



## Tipo de fertilización y edad de rebrote de *Tithonia diversifolia* sobre parámetros ruminales<sup>1</sup>

### Fertilization type and regrowth age of *Tithonia diversifolia* on ruminal parameters

Luis Mauricio Arias-Gamboa<sup>2</sup>, Michael López-Herrera<sup>3</sup>, Miguel Castillo-Umaña<sup>2</sup>, Andrés Alpízar-Naranjo<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Recepción: 21 de noviembre, 2022. Aceptación: 22 de febrero, 2023. Este trabajo formó parte de la tesis de Maestría del primer autor en Agricultura Ecológica de la Universidad Nacional de Costa Rica.
- <sup>2</sup> Universidad Nacional de Costa Rica, Escuela de Ciencias Agrarias Heredia, Costa Rica. [luis.arias.gamboa@una.cr](mailto:luis.arias.gamboa@una.cr) (autor para la correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-1214-5648>); [miguel.castillo.umana@una.cr](mailto:miguel.castillo.umana@una.cr) (<https://orcid.org/0000-0001-8114-744X>); [andres.alpizar.naranjo@una.cr](mailto:andres.alpizar.naranjo@una.cr) (<https://orcid.org/0000-0002-9612-4918>).
- <sup>3</sup> Universidad de Costa Rica, Escuela de Zootecnia, Centro de Investigación en Nutrición Animal, San José, Costa Rica. [michael.lopez@ucr.ac.cr](mailto:michael.lopez@ucr.ac.cr) (<https://orcid.org/0000-0003-4301-9900>).

## Resumen

**Introducción.** Los forrajes en el trópico presentan una baja digestibilidad, por lo que se buscan alternativas alimenticias como la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) para aumentar la calidad de la dieta ofrecida. **Objetivo.** Evaluar el efecto del tipo de fertilizante y la edad de rebrote del forraje de *Tithonia diversifolia* sobre los parámetros ruminales. **Materiales y métodos.** El trabajo se realizó en el año 2020 en la Finca Experimental Santa Lucía de la Universidad Nacional, Costa Rica. Se utilizó un diseño de parcelas divididas completamente al azar con el tipo de fertilizante como parcela principal y edad de rebrote como subparcela, con tres repeticiones por tratamiento. Los tipos de fertilizante fueron: lombricompost (L), químico (Q) y control (C) sin fertilizante. Las edades de rebrote evaluadas fueron 30, 50 y 70 días para un total de nueve tratamientos. Las variables evaluadas fueron: cinética de degradabilidad *in situ* de la materia seca (DISMS), pH, nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>), producción de gas y metano *in vitro* (CH<sub>4</sub>). Se realizó un ANDEVA para parcelas divididas. **Resultados.** La mayor DISMS se encontró en C30 (92,84 %) y menor en Q70 (64,21 %). El tipo de fertilización influyó sobre los contenidos de NH<sub>3</sub>, el mayor valor se presentó en los tratamientos con fertilización química (275,88 mg NH<sub>3</sub>/L fluido ruminal). C70 produjo la mayor cantidad de gas (79,59 mL/g), en contraste con Q30 que fue el de menor promedio (28,38 mL/g). La producción de CH<sub>4</sub> no mostró diferencias significativas, con valores entre 3,42 y 8,67 mL CH<sub>4</sub>/g MS. **Conclusión.** La fertilización y edad de rebrote modificaron los parámetros ruminales *in situ* e *in vitro*. Los resultados obtenidos permiten considerar este recurso forrajero como un complemento de las gramíneas de pastoreo en el trópico, donde se generen efectos positivos sobre la digestibilidad de la MS, la producción de gas y de CH<sub>4</sub>.

**Palabras clave:** forrajes, fertilizantes nitrogenados, ganadería, emisiones de gas, emisiones de metano.

## Abstract

**Introduction.** Forages in the tropics have low digestibility, which is why alternative feed option such as *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) are sought to improve the quality of the offered diet. **Objective.** To evaluate the effect of



fertilizer type and the regrowth age of *Tithonia diversifolia* forage on ruminal parameters. **Materials and methods.** The study was conducted in 2020 at the Santa Lucía Experimental Farm of the Universidad Nacional, Costa Rica. A completely randomized split-plot design was used with fertilizer type as the main plot and regrowth age as subplot, with three replications per treatment. The fertilizer types were: vermicompost (L), chemical (Q), and control (C) without fertilizer use. The evaluated regrowth ages were 30, 50, and 70 days, resulting in a total of nine treatments. The variables assessed were: in situ dry matter degradability kinetics (DISMS), pH, ammoniacal nitrogen ( $\text{NH}_3$ ), *in vitro* gas, and methane production ( $\text{CH}_4$ ). An ANOVA was carried out for divided plots. **Results.** The highest DISMS was found in C30 (92.84 %) and the lowest in Q70 (64.21 %). The type of fertilization influenced  $\text{NH}_3$  contents, with the highest value observed in chemical fertilizer treatments (275.88 mg  $\text{NH}_3/\text{L}$  rumen fluid). C70 produced the highest amount of gas (79.59 mL/g), whereas Q30 had the lowest average (28.38 mL/g). Methane production did not show significant differences, with values ranging from 3.42 to 8.67 mL  $\text{CH}_4/\text{g}$  DM. **Conclusion.** Fertilization and regrowth age modified in situ and in vitro ruminal parameters. The obtained results suggest that this forage resource can be considered a supplement to grazing grasses in the tropics, where positive effects are generated on DM digestibility, gas, and  $\text{CH}_4$  production.

**Keywords:** forages, nitrogenous fertilizers, livestock, gas emissions, methane emission.

## Introducción

El sector ganadero juega un papel muy importante en la economía mundial, genera empleo para 1300 millones de personas y suministra un tercio del consumo mundial de proteínas (Vega-Fonseca, 2016). En Costa Rica, del total de fincas agropecuarias (93 017), 37 171 cuentan con producción de ganado bovino, 2348 con ganado caprino y 1792 con ovino, por lo tanto, el 44,40 % de las fincas nacionales tiene integrados los rumiantes en los sistemas productivos (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC], 2014).

La industria ganadera es criticada, debido al impacto ambiental generado, por la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) como el metano ( $\text{CH}_4$ ) producido por la fermentación entérica de los rumiantes, el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) producto de prácticas como las quemadas de pastos, la utilización de hidrocarburos como los combustibles fósiles en toda la cadena productiva y el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) causado por la fertilización química de forrajes y la mala gestión de los desechos como excreta y orina (Chacón Navarro et al., 2015).

La producción de  $\text{CH}_4$  por los rumiantes se genera mediante el proceso de metanogénesis, el cual se lleva a cabo por microorganismos ruminales como las bacterias metanogénicas, archaeas y protozoarios que oxidan el hidrógeno molecular y reducen el  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$  (Alayón-Gamboa et al., 2018). El hidrógeno y  $\text{CO}_2$  se producen en el rumen por la síntesis de ácidos grasos volátiles (AGV), en especial acetato y butirato que son producto de la degradación de materiales forrajeros ricos en celulosa consumidos por los rumiantes (López-Herrera et al., 2021).

Los forrajes son la principal fuente de nutrientes de los rumiantes en el trópico, sin embargo, la composición nutricional de la gran mayoría de gramíneas tropicales es variable (Rojas-Cordero et al., 2020) y presentan altos contenidos de fibra y baja digestibilidad (Ku Vera et al., 2014), lo cual promueve la metanogénesis con la consiguiente producción de metano. Por esta razón, se buscan alternativas alimenticias que puedan aumentar la calidad de la dieta ofrecida a los animales y que estén disponibles durante todo el año (Vega Fonseca, 2016). Dentro de las alternativas, se encuentra la utilización de bancos forrajeros de especies de alta calidad nutricional como las leguminosas que aportan altos contenidos de proteína, menores contenidos de fibras y lignina, son más digestibles y han demostrado ser una estrategia viable para la suplementación de los rumiantes en el trópico (Cardona-Iglesias et al., 2017).

Una especie forrajera no leguminosa con alto potencial para utilizarse en la alimentación de rumiantes en el trópico es la *T. diversifolia*. Se trata de una planta autóctona de Mesoamérica que posee características agronómicas y nutricionales que la hacen destacar como un forraje de alta calidad para la alimentación de rumiantes, y es utilizada en bancos de proteína (Arias-Gamboa et al., 2018; Astúa-Ureña et al., 2021; Paniagua-Hernández et al., 2020).

Dentro de los atributos de la *T. diversifolia* resaltan su alta degradabilidad de la materia seca (superiores al 70 %) (Arias-Gamboa, et al., 2018), característica que puede mitigar las emisiones de CH<sub>4</sub> (Pérez Can et al., 2020). El uso de leguminosas y plantas como la *T. diversifolia* pueden contribuir a reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> por su alto contenido de nitrógeno y la presencia de metabolitos secundarios como los taninos, los cuales pueden inhibir las poblaciones de microorganismos metanogénicos del rumen (López-Herrera et al., 2021).

La calidad de un forraje está relacionada con el momento de cosecha, el cual estará definido por el momento óptimo donde se obtenga la mayor cantidad de biomasa con la mejor calidad nutricional posible (Merlo-Maydana et al., 2017). En el caso de la *T. diversifolia*, existen estudios que demuestran que la edad de cosecha juega un papel importante en la composición del forraje (Paniagua-Hernández et al., 2020), donde al aumentar la edad de rebrote, la calidad nutricional del forraje tiende a verse afectada de manera negativa. Otro factor que influye sobre la composición de esta planta es la fertilización, ya que se ha evidenciado que el uso de químicos nitrogenados en *T. diversifolia*, genera un efecto positivo sobre la producción de biomasa y las características bromatológicas como proteína cruda (Astúa-Ureña et al., 2021; Botero Londoño et al., 2019; Cerdas-Ramírez, 2018; dos Santos Silva et al., 2021).

No existen investigaciones que evalúen la respuesta de esta planta a la aplicación de lombricompost, ni que comparen el efecto de la fertilización química u orgánica a diferentes edades de cosecha. Estas razones fundamentan el objetivo de esta investigación de evaluar el efecto del tipo de fertilizante y la edad de rebrote del forraje de *Tithonia diversifolia* sobre los parámetros ruminales.

## Materiales y métodos

### Sitio de estudio

La investigación se llevó a cabo en el año 2020, durante la época lluviosa (junio-septiembre), en la Finca Experimental Santa Lucía (FESL) perteneciente a la Universidad Nacional Costa Rica (UNA), ubicada en Santa Lucía, Barva de Heredia, entre las coordenadas 10°01'19,63" latitud norte y 84°06'43,53" longitud oeste, altitud de 1250 m s. n. m. El suelo es predominante del orden Andisoles. La topografía varía de plana a escarpada, con suelos superficiales a profundos, moderadamente fértiles, bien estructurados y mucha pedregosidad (Arias Gamboa, 2018). El sitio presenta una precipitación anual de 2371 mm, una humedad relativa de 78 % y temperatura media anual de 21,50 °C (Instituto Meteorológico Nacional [IMN], 2017).

En el año 2018, durante la época lluviosa, se estableció el cultivo de *T. diversifolia* (material de la Estación La Managua del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), Quepos), en un área de 1000 m<sup>2</sup>, con una densidad de siembra de 2 plantas/m<sup>2</sup>, a una distancia de 1 m entre surcos y 0,50 m entre plantas. La preparación del suelo se realizó mediante el método de mínima labranza. No se aplicaron herbicidas, fertilizantes ni riego.

Las características químicas del suelo donde se llevó a cabo la investigación fueron; un pH en agua de 5,80, 0,64 cmol(+)/L de potasio, 9,80 cmol(+)/L calcio, 2,42 cmol(+)/L de manganeso, una acidez de 0,19 cmol(+)/L, capacidad de intercambio catiónico (CICE) de 12,33 cmol(+)/L, fósforo de 2 mg/L, hierro de 129 mg/L, cobre de 6

mg/L, zinc de 8,30 mg/L, magnesio de 9 mg/L y 3 % saturación de acidez, los análisis de suelos se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica en el año 2019.

Para el establecimiento de las parcelas se utilizaron estacas (semilla vegetativa) de 20-30 cm de longitud, tomadas del primero y segundo tercio del tallo. Se sembró de manera vertical una estaca por sitio. El forraje fue cosechado por primera vez a los cinco meses (150 días). Antes de iniciar el ensayo de campo, se realizó un corte de homogenización en todo el cultivo, a una altura de 0,50 m del suelo Arronis Díaz (2015).

En el área total de 1000 m<sup>2</sup>, se trazaron nueve parcelas de 112 m<sup>2</sup> (8 × 14 m) con una zona de amortiguamiento de 2 m. Se utilizó un diseño de parcelas divididas completamente al azar, donde se evaluaron: 1) tipo de fertilización (a nivel de parcela) con tres niveles: abono orgánico mediante el uso de lombricompost (L), fertilizante químico con urea (Q) y un control sin aplicación de fertilización (C), y 2) edad de rebrote (a nivel de subparcela) con tres niveles: 30, 50 y 70 días. En total se establecieron nueve tratamientos (L30, L50, L70, Q30, Q50, Q70, C30, C50 y C70) con tres repeticiones por tratamiento.

Como fertilizante orgánico se utilizó lombricompost de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*), producido en la FESL, a base de estiércol de ganado bovino, el cual presentó la siguiente composición: materia seca de 40 %, pH en H<sub>2</sub>O de 8,2, nitrógeno de 1,43 %, carbono de 14,77 %, fósforo de 0,58 %, potasio de 0,82 %, calcio de 1,72 %, manganeso de 0,56 %, azufre de 0,26 %, cobre de 124 mg/kg, zinc de 213 mg/kg, magnesio de 968 mg/kg, hierro de 38130 mg/kg y boro de 15 mg/kg. Los análisis de suelos se llevaron a cabo en el CIA de la Universidad de Costa Rica en el año 2018. La cantidad de lombricompost a utilizar se calculó a partir de la concentración de nitrógeno en el humus y la materia seca del mismo, con la finalidad de proveer 150 kg/ha/año de N al terreno.

Como fertilizante químico se utilizó urea, en la misma dosis que la fuente orgánica (150 kg/ha/año de N). La materia seca de los fertilizantes fue de 98,50 % para la urea y 40 % para el lombricompost, el contenido de nitrógeno fue de 46 % en la urea y del 1,43 % en el abono orgánico, para garantizar el aporte de 150 kg/ha/año de N. En cada una de las parcelas experimentales se utilizaron 0,016 kg de urea por planta (331,05 kg/ha) y 1,31 kg de lombricompost por planta (26 220 kg/ha). La dosis de 150 kg/ha/año de N se estableció al tomar como referencia los resultados obtenidos en las investigaciones de Botero Londoño et al. (2019) y Cerdas Ramírez (2018).

Para conocer la composición química de los materiales de *T. diversifolia* evaluados, se realizaron análisis de proteína cruda (PC) mediante el método de Kjeldahl (Nx6,25) Association of Official Analytical Chemist [AOAC], (1998), fibra en detergente ácido (FDA), fibra en detergente neutro (FDN) y lignina según la metodología descrita por Van Soest et al. (1991), y el porcentaje de carbohidratos no fibrosos (CNF) se obtuvo mediante las ecuaciones reportadas por Detmann et al. (2008) (Cuadro 1).

Para obtener cada muestra se cortó el forraje de veinte plantas por subparcela, a una altura de 50 cm del suelo, se tomó una submuestra representativa de 1 kg, la cual se troceó en partículas de 2,50 cm con una picadora para forrajes de motor eléctrico de 7,50 HP, modelo ES 650® (Trapp Ltda). Las muestras fueron empacadas en bolsas transparentes plásticas, identificadas y se trasladaron al Laboratorio de Análisis de Productos Animales y Vegetales (LAPAV) de la UNA, donde se secaron con un horno de circulación de aire forzado a 60 °C modelo OV-11 (Lab Companion, JEIO TECH) y se molieron.

Dentro de las variables evaluadas estuvieron los parámetros de la cinética de degradabilidad ruminal *in situ*. Para medirlos se colocaron, por duplicado, 5 g de la muestra de cada tratamiento molidos y filtrados en una criba de 5 mm en bolsas de poliéster R1020® de 10 × 20 cm, con porosidad de 40 µm (ANKOM Technology), las cuales se incubaron en el rumen de una vaca canulada con una dieta de pasto *Cynodon nlemfuensis* como base alimenticia en pastoreo directo. Las bolsas se introdujeron en la vaca canulada en diferentes horas y se extrajeron todas juntas. En el caso de la hora cero, se realizó un lavado a 39 °C durante al menos 20 min, esto para determinar la fracción soluble. En cada momento de incubación se midió el pH y la temperatura ruminal, con un medidor de pH modelo ST3100 (OHAUS), con la finalidad de verificar que las condiciones ruminales del animal se encontraban dentro de los parámetros normales.

**Cuadro 1.** Composición bromatológica de la *T. diversifolia* según tipo de fertilización y edad de rebrote. Finca Experimental Santa Lucía. Heredia, Costa Rica. 2020.

**Table 1.** Bromatological composition of *T. diversifolia* according to fertilization type and regrowth age. Finca Experimental Santa Lucía. Heredia, Costa Rica. 2020.

Tratamiento	PC	FDN	FDA	LIG	CNF
C30	19,53	29,04	21,80	14,86	30,00
C50	12,88	37,69	30,68	21,12	29,81
C70	10,12	44,28	36,45	21,81	27,52
L30	22,26	29,95	21,67	14,65	26,84
L50	13,24	36,52	29,10	18,60	31,26
L70	12,11	41,96	34,92	24,36	27,51
Q30	27,61	31,71	22,45	15,46	19,36
Q50	19,13	39,62	31,47	19,14	23,08
Q70	11,57	52,64	41,52	22,80	20,81

PC: proteína cruda, FDA: fibra en detergente ácido, FDN: fibra en detergente neutro, LIG: lignina, CNF: carbohidratos no fibrosos, C30: control 30 días de rebrote, C50: control 50 días de rebrote, C70: control 70 días de rebrote, L30: Lombricompost 30 días de rebrote, L50: lombricompost 50 días de rebrote, L70: lombricompost 70 días de rebrote, Q30: químico 30 días de rebrote, Q50: químico 50 días de rebrote, Q70: químico 70 días de rebrote. / PC: crude protein, FDA: fiber in acid detergent, FDN: fiber in neutral detergent, LIG: lignin, CNF: non-fibrous carbohydrates, C30: control 30 days of regrowth, C50: control 50 days of regrowth, C70: control 70 days of regrowth, L30: vermicompost 30 days of regrowth, L50: vermicompost 50 days of regrowth, L70: vermicompost 70 days of regrowth, Q30: chemical 30 days of regrowth, Q50: chemical 50 days of regrowth, Q70: chemical 70 days of regrowth.

Para determinar los parámetros de la cinética de degradabilidad ruminal de la MS se utilizó el modelo planteado por Orskov & McDonald (1979), el cual mide el tiempo de incubación como variable independiente (X) y las variables potencialmente digeribles como variable dependiente (Y). Además, a partir de estos parámetros se determinó la degradabilidad efectiva con base en diferentes tasas de pasaje (2, 5 y 8 %/hora) según la ecuación 1.

$$Y = a + b(1 - e^{-kd \cdot t}) \quad (1)$$

Donde, Y es la degradación potencial, t el tiempo de incubación, a representa el sustrato completamente degradable, b representa la fracción que se degradó a las 72-48-24-12-8-6-4-2-0 h, kd la tasa de degradación dada en %/h, y e logaritmo natural

La degradabilidad efectiva (DE; g/kg) se calculó a partir de los parámetros antes mencionados en la ecuación 1, con base en tasas de pasaje fraccionadas (kp) de 2, 5 y 8 %/h según la ecuación 2.

$$DE = a + b(kd / (kd + kp)) \quad (2)$$

Donde, DE es la degradabilidad efectiva, a representa el sustrato completamente degradable, b la fracción que se degradó, kd tasa de degradación y kp las tasas de pasaje fraccionadas de 2, 5 y 8 %/h.

La producción de gas se determinó con un equipo ANKOM RF Gas Production System® (ANKOM Technology), según la metodología descrita por Sobalvarro-Mena et al. (2020), en el programa informático del incubador ANKOM Gas Production System® (ANKOM Technology) en el LAPAV. Para ello, se pesó 1 g de la muestra seca y molida, combinado con licor ruminal de animales fistulados con una dieta conocida de pasto

*Cynodon nlemfuensis*, en conjunto con soluciones amortiguadoras y minerales. Las muestras fueron incubadas durante 48 h a  $39 \pm 0,5$  °C, en recipientes de vidrio con capacidad de 250 mL, con el objetivo de cuantificar la producción de gas acumulada. El volumen de gas producido se determinó con un sistema inalámbrico basado en principios barométricos, conformado por las unidades de botellas de vidrio de 250 mL, equipadas cada una con un módulo sensor de presión, temperatura y válvulas electromecánicas que controlan la salida de gas, el cual incluye un microchip y un emisor de señal de radio receptada en una computadora para registrar el volumen con intervalos de tiempo definidos, los datos se transmiten por frecuencia de radio a una computadora con intervalos de 5 min, los datos en la computadora se registran y se procesan en tiempo real, generándose gráficos de producción de gas y una base de datos que se exporta en formato .xls para su análisis posterior. La producción de gas total se corrigió con la producción de gas de la inoculación promedio de los blancos.

Los datos de presión acumulada medidos en psi, se transformaron a mL, con base en la ley de Avogadro que indica que 1 psi equivale a 6,894757293 kPa, 1 mol ocupa 22,400 mL a 273,15 °K y 101,325 kPa en condiciones ambientales estándar, según la ecuación 3.

$$n = p(V/RT) \quad (3)$$

Donde, n es la producción de gas en mol, p la presión en kPa, V el espacio ocupado por el gas, T la temperatura en K y R la constante de gas: 8,314472 L/kPa/K/mol, la producción de gas =  $n \times 22400$  (Sobalvarro-Mena et al., 2020).

A las 48 h de incubación, se procedió a la colecta del gas, la muestra se tomó de los recipientes de vidrio con capacidad de 250 mL con un tubo de vacutainer con capacidad de 20 mL. Para la cuantificación de la concentración de metano, se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FIT) Autosystem XL® (PerkinElmer Inc) y una columna capilar O/V, de 60 cm de longitud y 0,32 mm de diámetro interno. La lectura de CH<sub>4</sub> se realizó por medio de cromatogramas, se tomó en cuenta el tiempo de retención de un patrón de CH<sub>4</sub>, en el Laboratorio de Química de la Atmósfera (LAQAT-UNA).

Una vez finalizadas las 48 h de incubación y posterior a la toma de la muestra para cuantificación de metano, se tomó una muestra de 3 mL del medio de cultivo, la cual fue trasvasada a tubos de ensayo para la determinación del contenido de nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>). Para lo cual, al contenido del tubo de ensayo se agregaron cinco gotas de ácido sulfúrico concentrado para detener la actividad microbiana, después se procedió a centrifugar a 3000 rpm durante 15 min para lograr la precipitación del material sin digerir, una vez separado el material sin digerir, se agregaron 150 µL de ácido tricloroacético.

El contenido de NH<sub>3</sub> se cuantificó por medio de la técnica de Kjeldahl (AOAC, 1998). También, se determinó el pH al medio de cultivo una vez finalizado el proceso de incubación de 48 h, con un medidor de pH modelo ST3100 (O'Haus), para esto se utilizó un potenciómetro con electrodo de hidrógeno.

Se realizó un análisis de varianza para parcelas divididas según lo descrito por Kaps y Lamberson (2004) con la ecuación 4:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ik} + \theta_j + (\alpha\theta)_{ij} + \epsilon_{ijk} \quad (4)$$

Donde, Y<sub>ijk</sub> es la variable respuesta,  $\mu$  la media general,  $\alpha_i$  el efecto del i-ésimo nivel del factor densidad de siembra (parcela),  $\beta_{ik}$  el error de parcela,  $\theta_j$  el efecto del i-ésimo nivel del factor edad de rebrote (subparcela),  $(\alpha\theta)_{ij}$  el efecto de la interacción de la parcela por la subparcela y  $\epsilon_{ijk}$  el error experimental.

La comprobación del cumplimiento de los supuestos de normalidad se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianza según prueba de Levene. Las medias se contrastaron mediante la prueba de

Tukey. En todo momento se declaró significancia cuando  $p < 0,05$ , sin embargo, cuando  $0,05 < p < 0,10$ , se declaró tendencia del efecto en el tratamiento. Los datos se analizaron con el software estadístico SAS® versión 9.0 (SAS Institute Inc, 2009). Además, se realizaron análisis de correlación mediante coeficientes de Pearson entre los indicadores de fermentación ruminal y las variables de composición bromatológica, para establecer la relación entre variables.

## Resultados

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ), provocadas por la interacción entre fertilización y edad de rebrote (parámetro b, degradabilidad potencial a las 72 h y degradabilidad efectiva del 2 y 5 %/h). El resto de las variables analizadas no mostraron una interacción estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ), sino influenciadas significativamente por la fertilización y/o edad de rebrote. El parámetro kd, no mostró diferencias entre tratamientos por ninguno de los efectos analizados (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Parámetros de la cinética de degradabilidad ruminal, potencial y efectiva de la materia seca a diferentes tasas de pasaje del forraje de *Tithonia diversifolia* fertilizada con urea (Q) o lombricompost (L), sin fertilización (C) cosechados 30, 50 o 70 días de rebrote. Finca Experimental Santa Lucía. Heredia, Costa Rica. 2020.

**Table 2.** Parameters of the ruminal kinetics, potential, and effective degradability of dry matter at different rates of passage of *Tithonia diversifolia* forage fertilized with urea (Q) or vermicompost (L), without fertilization (C) harvested 30, 50 or 70 days of regrowth. Finca Experimental Santa Lucía. Heredia, Costa Rica. 2020.

Tratamiento	a %	b %	kd %/h	DP 72 h (%)	DE 2 %/h	DE 5 %/h	DE 8 %/h
C30	40,71	53,57a	5,38	92,84a	79,44a	68,18a	62,02
C50	37,47	48,07ab	4,26	83,21ab	70,11b	59,52b	54,13
C70	34,9	45,10b	3,82	77,06b	64,47c	54,41bc	49,46
L30	39,17	51,14ab	4,90	88,72a	75,43ab	64,45ab	58,58
L50	37,78	47,93ab	4,65	83,62ab	70,98b	60,61b	55,21
L70	34,77	45,63b	4,55	78,64b	66,43b	56,48bc	51,29
Q30	41,74	51,44ab	5,65	92,08a	79,55a	68,88a	62,93
Q50	36,92	44,37b	4,48	79,48b	67,53b	57,82b	52,79
Q70	31,63	33,07c	6,48	64,21c	56,62c	49,99c	46,16
Error estándar	0,817	1,186	0,002	1,739	1,448	1,234	1,12
p-valor fertilización	0,869	0,021	0,317	0,055	0,13	0,419	0,646
p-valor edad de rebrote	0,005	<,0001	0,279	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Fertilización*edad de rebrote	0,696	0,002	0,159	0,008	0,013	0,029	0,057

Letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ , Tukey). a: fracción soluble; b: fracción potencialmente degradable; kd: tasa de degradación de b; DP: degradabilidad potencial (a+b) a 72 h; DE: degradabilidad efectiva a tasas de pasaje ruminal (2, 5 y 8 %/h). / Different letters in the same column are significantly different ( $p < 0,05$ , Tukey). a: soluble fraction; b: potentially degradable fraction; kd: degradation rate of b; DP: potential degradability (a+b) at 72 h; DE: effective degradability at ruminal passage rates (2; 5 and 8 %/h).

Las medias de la fracción soluble “a” presentaron diferencias significativas ( $p=0,0054$ ) debidas a la edad de rebrote (Cuadro 3). Los valores más altos se obtuvieron a la edad de 30 días (40,54 %), sin ser estadísticamente diferente que el rebrote a 50 días (37,39 %). La edad de rebrote de 70 días mostró menor contenido de esta fracción (33,76 %).

**Cuadro 3.** Medias de los tratamientos para las variables de pH, nitrógeno amoniacal, producción de gas y metano entérico *in vitro* según tipo de fertilización y edad de rebrote del forraje de *T. diversifolia*. Finca Experimental Santa Lucía. Heredia, Costa Rica. 2020.

**Table 3.** Means of the treatments for the variables of pH, ammoniacal nitrogen, gas production, and enteric methane *in vitro* according to fertilization type, and age of regrowth of *T. diversifolia* forage. Finca Experimental Santa Lucía. Heredia, Costa Rica. 2020.

Parámetro	Fertilización			p-valor	Edad rebrote (días)			p-valor	p-valor fertilización* edad	±EE
	Control	Orgánica	Química		30	50	70			
pH	6,75	6,74	6,73	0,895	6,81a	6,75ab	6,66b	0,026	0,3473	0,021
NH <sub>3</sub> (mg NH <sub>3</sub> /L fluido ruminal)	218,24b	234,71ab	275,88a	0,024	300a	218,29b	210,00b	0,001	0,0860	11,420
Producción de gas (mL/g)	63,25	45,50	43,54	0,017	46,37	39,06	68,86	0,002	0,0452	3,583
CH <sub>4</sub> (mL/g MS)	8,47	8,23	3,42	0,381	8,67	5,97	4,55	0,556	0,9594	1,233

Letras diferentes en la misma fila son significativamente diferentes ( $p<0,05$ , Tukey). NH<sub>3</sub>: nitrógeno amoniacal. CH<sub>4</sub> (mL/g MS): mililitros por gramo de materia seca de metano entérico; ±EE: error estándar de las medias. / Different letters in the same row are significantly different ( $p<0,05$ , Tukey). NH<sub>3</sub>: ammoniacal nitrogen. CH<sub>4</sub> (mL/g MS): milliliters per gram of dry matter of enteric methane; ±EE: standard error of the means.

La fracción “b” potencialmente degradable presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p=0,0016$ ), debidas a la interacción entre el tipo de fertilización y la edad de rebrote. La media más alta se encontró en C30 (53,57). El tratamiento con el valor de fracción degradable más bajo fue el Q70 (33,07), que se diferenció de los demás tratamientos evaluados (Cuadro 2).

La tasa de degradación no presentó diferencias significativas ( $p>0,05$ ) por el tipo de fertilización, por la edad de rebrote, ni por la interacción entre ambos factores.

La degradabilidad potencial de la MS a las 72 h también presentó diferencias significativas ( $p=0,0081$ ) por la interacción entre el tipo de fertilización y la edad de rebrote. Las medias más altas se obtuvieron en C30 y Q30 (92,84 % y 92,08 %, respectivamente). Los valores más bajos se observaron en Q70 (64,21 %), y fue estadísticamente diferente a las medias obtenidas en los demás tratamientos.

La degradabilidad efectiva con una tasa de pasaje ruminal del 2 %/h y 5 %/h presentaron un efecto significativo ( $p<0,05$ ) de la interacción entre el tipo de fertilización y la edad de rebrote, donde en los valores de los tratamientos control y con fertilización química disminuyeron significativamente conforme aumentó la edad de rebrote, mientras que en los tratamientos con fertilización orgánica los valores no disminuyeron de manera significativa al aumentar la edad de rebrote del forraje. Las medias más altas obtenidas se encontraron en los tratamientos Q30 y C30.

La edad de rebrote presentó un efecto significativo ( $p=<,0001$ ) sobre degradabilidad efectiva a una tasa de pasaje ruminal del 8 %/h (Cuadro 2). Los valores más altos se obtuvieron a la edad de rebrote de 30 días (61,18 %), y fue diferente estadísticamente del tratamiento con edad de rebrote de 50 días (50,04 %). La media más baja se presentó en los tratamientos con edad de 70 días (48,97 %), valor inferior estadísticamente a los obtenidos en las demás edades de rebrote evaluadas.

Los tratamientos evaluados presentaron una diferencia en la tasa de la degradabilidad partir de la hora 12, creándose tres grupos, el primero con una mayor tasa de degradación de la materia seca con los tratamientos con

edad de rebrote de 30 días y los tratamientos C50 y L50, los cuales alcanzaron degradabilidades potenciales iguales o superiores al 80 % a partir de la hora 48 y fueron superiores al 90 % en C30 y Q30.

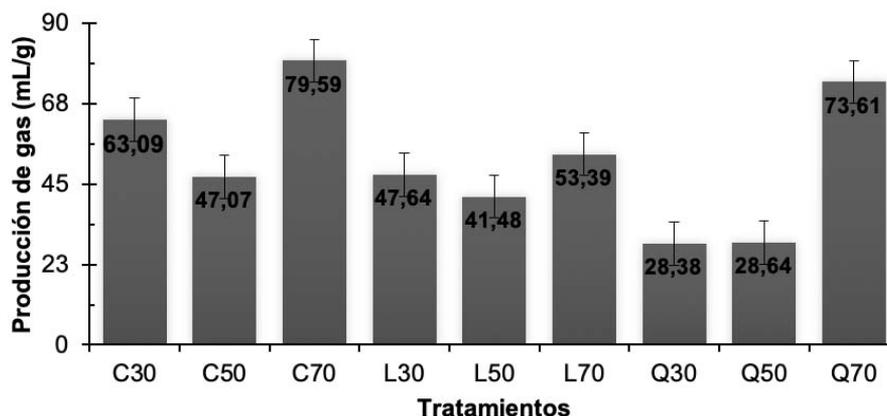
Un segundo grupo lo integraron los tratamientos Q50, C70 y L70, los cuales alcanzaron una degradabilidad potencial superior al 70 %. El último grupo estuvo compuesto por Q70, el cual desde la hora 24 presentó una menor degradabilidad potencial que los demás tratamientos (DP a las 72 horas del 64 %).

Los valores del pH a las 48 h presentaron diferencias significativas ( $p=0,0260$ ) provocadas por efecto de la edad de rebrote, los mayores promedios se obtuvieron en los forrajes a 30 días de rebrote, valores estadísticamente diferentes a los de la edad de 70 días (Cuadro 3). El tipo de fertilizante utilizado no modificó de manera significativa los valores del pH en el licor ruminal.

Los contenidos de  $\text{NH}_3$  mostraron diferencias significativas debido al tipo de fertilización ( $p=0,0238$ ) y a la edad de rebrote ( $p=0,0001$ ). Para el tipo de fertilización los contenidos más altos se encontraron en el forraje que se fertilizó con lombricompost y urea, sin ser diferentes entre ellos, mientras que el tratamiento con fertilización química fue significativamente mayor al promedio obtenido en el tratamiento control.

En cuanto a la edad de rebrote, el promedio más alto de  $\text{NH}_3$  se encontró en las plantas con 30 días, y fue significativamente diferente a los valores obtenidos en las otras dos edades de rebrote (50 y 70 días), entre las cuales no hubieron diferencias.

Para la producción de gas se detectó un efecto significativo ( $p=0,0452$ ) de la interacción entre el tipo de fertilización y las edades de rebrote. La producción de gas más alta se encontró en C30 (79,59 mL/g de MS), mientras que la menor producción se obtuvo del Q30 (28,38 mL/g de MS) (Figura 1).



**Figura 1.** Producción de gas *in vitro* del follaje de *T. diversifolia* según tipo de fertilización y edad de rebrote. Finca Experimental Santa Lucía, Costa Rica. 2020.

**Figure 1.** *In vitro* gas production of *T. diversifolia* foliage according to fertilization type and regrowth age. Finca Experimental Santa Lucía, Heredia, Costa Rica. 2020.

Se pudo determinar que con la fertilización nitrogenada química se presentó un incremento en la producción de gas al aumentar la edad de rebrote, que fue significativo entre las edades de 50 y 70 días. En el caso de los tratamientos control y fertilización orgánica el comportamiento de la producción de gas no presentó un crecimiento significativo al aumentar la edad de rebrote.

Las medias de producción de CH<sub>4</sub> no presentaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en ninguna de las variables evaluadas (fertilización, edad y la interacción entre ambas), por lo que ni el tipo de fertilizante ni la edad de cosecha modificaron la producción de CH<sub>4</sub> entérico *in vitro* del forraje *T. diversifolia* en el presente estudio.

## Discusión

Las medias obtenidas en las edades de 30 y 50 días fueron superiores a las reportadas por Arronis y Abarca (2016), quienes obtuvieron porcentajes para la fracción “a” de 30,40, 25,50 y 29, con edades de rebrote de 40, 50 y 60 días, respectivamente, para planta entera de *T. diversifolia* ecotipo INTA-Quepos, sin fertilización. También fueron superiores a las reportadas por Valenciaga et al. (2018) al evaluar la cinética de degradación ruminal de distintos materiales vegetales de *T. diversifolia* a los 60 días de edad de rebrote.

Los resultados obtenidos en los estudios antes mencionados fueron similares a los encontrados en esta investigación a los 70 días. La disminución de la fracción “a” ocurrida de la edad de 70 días con respecto a las edades de 30 y 50 días de rebrote, fue similar al detectado por Arronis y Abarca (2016), quienes observaron que la fracción soluble disminuyó al aumentar la edad de rebrote.

En los tratamientos control al pasar de 30 a 70 días la fracción “b” bajó un 15,80 %, en los tratamientos con fertilización química (Q30, Q50 y Q70), la fracción “b” disminuyó en un 35,70 %, mientras que en los tratamientos donde se utilizó fertilización orgánica no se encontraron diferencias significativas al aumentar la edad de rebrote.

La disminución de la fracción “b” en los tratamientos control y fertilización química, podría estar influenciada por la relación hoja/tallo, la cual fue menor en los tratamientos donde se utilizó fertilización química con edades de cosecha más avanzadas, dicho comportamiento fue similar al obtenido en la investigación de Botero Londoño et al. (2019), donde al aplicar niveles superiores a 200 kg/ha/año de N, las plantas presentaron una mayor producción de tallos, hubo un efecto sobre la composición química de la planta, aumentó los contenidos de pared celular, disminuyeron los porcentajes de PC y CNF (Cuadro 1), la cual a su vez generó un efecto directo sobre la degradabilidad de la MS del forraje de las plantas de *T. diversifolia*.

La mayor tasa de degradabilidad obtenida puede estar relacionada a los bajos contenidos de pared celular encontrados en los tratamientos evaluados (Cuadro 1), lo cual tuvo un efecto sobre una menor retención de la MS en el rumen, por lo tanto, se incrementó el consumo de materia seca (Razz et al., 2004). Los resultados son similares a los obtenidos por Valenciaga et al. (2018), quienes evaluaron distintos materiales vegetales de *T. diversifolia* en Cuba, y obtuvieron valores de la tasa de degradación variables desde 0,05 a 0,08.

En los tratamientos control y con fertilización orgánica, la degradabilidad potencial de la MS solo presentó diferencias significativas entre las edades de 30 y 70 días, en los tratamientos con fertilización química sí se observaron diferencias significativas entre todas las edades de rebrote evaluadas, esto pudo deberse a menores relaciones hoja/tallo en los tratamientos con edades de cosecha más avanzadas, con un efecto más marcado en los tratamientos donde se utilizó fertilización química, lo cual generó un impacto directo en la composición bromatológica del forraje (Cuadro 1) y sobre la degradabilidad potencial de los tratamientos evaluados.

Los resultados obtenidos para la degradabilidad potencial fueron consistentes con los reportados por Meza-Bone et al. (2021), ya que en ambas investigaciones se generó una disminución de la degradabilidad potencial en el forraje de *T. diversifolia* al aumentar la edad de rebrote. Se evidenció que la relación hoja/tallo de este forraje estuvo relacionada con la edad de rebrote, debido a que los tratamientos cosechados a edades tempranas tendieron a tener mayores porcentajes de PC y bajos contenidos de FDN y FDA (Cuadro 1).

Los resultados de degradabilidad ruminal de la *T. diversifolia* pudieron estar relacionados con su composición química (altos porcentajes de PC y bajos valores de carbohidratos estructurales), lo que podría propiciar una mayor

disponibilidad de compuestos como amoníaco, aminoácidos, péptidos y ácidos grasos de cadena corta ramificados, lo que genera una sincronización de nitrógeno y energía para los microorganismos del rumen (Valenciaga et al., 2018).

Los valores obtenidos para la degradabilidad efectiva con una tasa de pasaje ruminal del 2 %/h y 5 %/h, fueron similares a los reportados por La O et al. (2012), quienes reportaron valores de 77,14 % con una tasa de pasaje del 2 %/h y de 65,83 % a la tasa de pasaje de 5 %/h al evaluar la DIVMS de diferentes ecotipos de *T. diversifolia*. Los datos de ambas investigaciones están en el rango de valores para plantas tropicales.

El comportamiento de la cinética de degradabilidad ruminal *in situ* observado pudo estar relacionado con la composición bromatológica de la planta (altos contenidos de PC, bajos contenidos de FDN, FDA y de CNF), así como del tipo y cantidad de compuestos fenólicos que pueden favorecer la degradabilidad ruminal de los nutrientes. Los resultados son comparables a los obtenidos por otros autores (La O et al., 2012; Ruíz et al., 2016; Valenciaga et al., 2018) y concuerdan con el observado en estudios con otras plantas forrajeras no leguminosas que constituyen excelentes fuentes suplementarias para rumiantes en condiciones tropicales (Valenciaga et al., 2018).

La degradabilidad ruminal de los materiales vegetales evaluados pudo estar relacionada con su composición química (altos contenidos de PC y bajos valores en carbohidratos estructurales, Cuadro 1). La degradabilidad efectiva encontrada en todos los tratamientos evaluados contrasta con lo que sucede con la gran mayoría de las gramíneas tropicales que no alcanzan valores de degradabilidad efectiva de la MS superiores al 40 % (Ascencio-Rojas et al., 2018). Esto demuestra la calidad de esta especie para su utilización en la alimentación animal (La O et al., 2012).

Los valores de pH obtenidos en la presente investigación se encontraron entre 6,66 y 6,81, fueron superiores a los encontrados en la investigación de Avila-Serrano et al. (2020), quienes reportaron valores entre 6,21 y 6,40 al determinar el pH del licor ruminal *in vitro* en distintas mezclas de forrajes tropicales. Pero, similares a los obtenidos por Prieto-Manrique et al. (2016) que determinaron valores de entre 6,82 y 6,91, para los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* en forrajes de silvopasturas intensivas con *Leucaena leucocephala*. También, son similares a los obtenidos por Galindo-Blanco et al. (2018) y Jamarun et al. (2019), donde se determinaron valores de pH del licor ruminal con el empleo del forraje de *T. diversifolia*, de 6,78 en ambas investigaciones.

Los valores de pH a la edad de rebrote de 30 días (6,81) se pueden atribuir a mayores concentraciones de amoníaco ruminal, las elevadas concentraciones de NH<sub>3</sub> reportadas en esta investigación o a una mayor fermentación de fibra del forraje (Galindo-Blanco et al., 2018). Esto debido a los elevados porcentajes en PC del forraje de *T. diversifolia* a la edad de 30 días (Cuadro 1).

Los resultados de NH<sub>3</sub> determinados en los tratamientos van desde 210 hasta los 300 mg NH<sub>3</sub>/L de fluido ruminal. En Costa Rica los valores óptimos de NH<sub>3</sub> en el rumen varían entre 150 y 200 mg/L de NH<sub>3</sub>, debido a los altos contenidos de FDN y bajos porcentajes de PC presentes en las pasturas tropicales, y a que concentraciones superiores de 250 mg/L de NH<sub>3</sub> podrían predisponer a intoxicación en los animales (Alvarez-Brito, 2017).

Los datos de NH<sub>3</sub> de los tratamientos control, con fertilización orgánica y a edades de rebrote 50 y 70 días, fueron similares a los obtenidos por Jamarun et al. (2019). Con fertilización química y 30 días de rebrote fueron superiores a los reportados por Jamarun et al. (2019) y a los reportados por Alvarez-Brito et al. (2020) al evaluar el efecto del guineo cuadrado (*Musa ABB*) en ensilajes con leguminosas, debido a que el guineo cuadrado se sincroniza con el amonio de las leguminosas, baja el NH<sub>3</sub> en el licor ruminal. Debido a ello, sería recomendable que exista una fuente energética complementaria a la *T. diversifolia* para asegurar un adecuado aprovechamiento del nitrógeno en rumen. Las mayores concentraciones de NH<sub>3</sub> en el licor ruminal en los tratamientos con edad de cosecha de 30 días y con fertilización química, pueden estar relacionados con los contenidos de PC encontrados (Cuadro 1).

Se detectó que la edad de rebrote posee mayor impacto en la interacción con respecto al tipo de fertilizante utilizado. Diversas investigaciones han demostrado que el forraje de *T. diversifolia* contiene niveles moderados de metabolitos secundarios como los fenoles y taninos totales (1,10 y 0,60 % MS), respectivamente (Rodríguez et al.,

2019; Verdecia et al., 2018). En el estudio de Olfaz et al. (2018) se demostró que factores antinutricionales como los taninos redujeron la producción de gas *in vitro*, dicho efecto podría explicar la similitud entre las producciones de gas encontradas en el presente estudio con las reportadas en estudios como el de Olfaz et al. (2018).

En cuanto a la edad de rebrote, bajos contenidos de fibra generan menores producciones de gas Mejía-Díaz et al. (2017), por lo que el incremento en la producción de gas en los tratamientos con fertilización química al aumentar la edad de rebrote, se explica por el crecimiento de las plantas con este tipo de fertilización, donde a la edad de rebrote de 70 días se presentó un desarrollo superior (mayor elongación de los tallos), donde la relación hoja/tallo fue muy baja comparada con los demás tratamientos evaluados, este comportamiento modificó de manera significativa los parámetros de la pared celular del forraje (Cuadro 1) e impactó la producción de gas (Cuadro 3).

Los valores de CH<sub>4</sub> obtenidos en el presente estudio fueron inferiores a los reportados por Cardona-Iglesias et al. (2021) y Pérez-Can (2019) al evaluar el forraje de *T. diversifolia*, las diferencias pudieron deberse a la variedad evaluada, las condiciones agroclimáticas y las edades de rebrote en las que se cosechó el forraje, en el caso del trabajo de Cardona-Iglesias et al. (2021) el forraje de *T. diversifolia* contaba con una edad de rebrote de 70 días, en el estudio de Pérez-Can (2019) no se especifica la edad de rebrote de los forrajes utilizados. Los resultados fueron similares a los obtenidos en el trabajo de Alvarez-Brito et al. (2020) con leguminosas arbustivas en Costa Rica.

Los contenidos de CH<sub>4</sub> presentes en todos los tratamientos evaluados, pueden estar relacionados con la presencia de taninos en la planta de *T. diversifolia* (Mejía-Díaz et al., 2017), debido a que existe una relación inversa entre el contenido de metabolitos secundarios como los taninos en los forrajes, con la producción de CH<sub>4</sub> (Meale et al., 2012), donde los metabolitos secundarios de estas plantas ejercen efectos defaunantes, al reducir la población de protozoos del rumen.

Los contenidos de lignina presentes en el forraje de los tratamientos evaluados (Cuadro 1) pudieron tener un efecto sobre la emisión de CH<sub>4</sub> entérico, debido a que alimentos ricos en fibras lignificadas producen menores volúmenes de CH<sub>4</sub>, debido al acceso limitado de los microorganismos del rumen al sustrato (Apráez-Guerrero et al., 2016). Además, López-Herrera et al. (2021) indicaron que al disminuir la digestibilidad de FDN (aumento de lignina) por mayor edad de rebrote, se reduce la cantidad de CH<sub>4</sub>, debido a una menor cantidad de materia orgánica (principalmente fibra) fermentándose en el rumen. Esto es de importancia, ya que la digestibilidad de la fibra tiene mayor impacto en la producción, comparada con la digestibilidad de cualquier otro nutrimento (Combs, 2014).

## Conclusiones

La edad de cosecha y el tipo de fertilización influyeron de manera significativa sobre los indicadores de fermentación en el rumen, tanto *in situ*, como *in vitro*, del forraje de *T. diversifolia*, donde a mayor edad de rebrote en los tratamientos con fertilización química los parámetros de degradabilidad *in situ* de la materia seca fueron estadísticamente inferiores a los demás tratamientos evaluados.

Los resultados obtenidos permiten considerar este recurso forrajero como un complemento de las gramíneas de pastoreo en el trópico, por su alta degradabilidad de la MS, baja producción de gas y metano entérico *in vitro*. Este puede repercutir de manera positiva tanto a nivel productivo como ambiental en los sistemas ganaderos del trópico. Sin embargo, debe considerarse su manejo agronómico a la hora de realizar los balances nutricionales, ya que estas prácticas no solo pueden cambiar el aporte de nutrientes del forraje, sino que también pueden variar la dinámica del forraje en el rumen.

Se recomiendan estudios más prolongados que permitan evidenciar el efecto del uso del lombricompost (fertilizante orgánico) sobre los parámetros ruminales *in situ* e *in vitro* del forraje de la plata *T. diversifolia*.

## Referencias

- Alayón-Gamboa, J. A., Jiménez-Ferrer, G., Piñeiro-Vázquez, Á. T., Canul-Solís, J., Albores-Moreno, S., Villanueva-López, G., Nahed-Toral, J., & Ku-Vera, J. C. (2018). Estrategias de mitigación de gases de efecto invernadero en la ganadería. *Agroproductividad*, 11(2), 9–15. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/112>
- Alvarez-Brito, R., Rojas-Bourrillon, A., & López-Herrera, M. (2020). Efecto del guineo cuadrado sobre la proteína cruda, almidón, fibra y fermentación ruminal de ensilados de leguminosas. *Nutrición Animal Tropical*, 14(2), 131–155. <https://doi.org/10.15517/nat.v14i2.44684>
- Alvares-Brito, R. X. (2017). *Emisiones in vitro de metano y parámetros ruminales a partir de mezclas ensiladas de Cratylia (Cratylia argentea), Poró (Erythrina poeppigiana) y Guineo cuadrado (Musa acuminata x balbisiana, Grupo ABB)* [Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio SIBDI de la Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/16726>
- Association of Official Analytical Chemist. (1998). *Official methods of analysis of AOAC International* (16<sup>th</sup> ed., 4<sup>th</sup> rev.). AOAC International.
- Apréaz-Guerrero, J., Delgado-Jurado, D., & Solarte-Portilla, C. (2016). Evaluación *in vitro* de la producción de metano en variedades de pastos neozelandeses del altiplano de Nariño. *Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 90–105. <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/3409>
- Arias Gamboa, L. M. (2018). *Evaluación del uso de Botón de oro (Tithonia diversifolia) como suplemento de vacas Jersey en etapa productiva* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional]. Repositorio de la Universidad Nacional. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/14864>
- Arias-Gamboa, L. M., Alpízar-Naranjo, A., Castillo-Umaña, M. Á., Camacho-Cascante, M. I., Arronis-Díaz, V., & Padilla-Fallas, J. E. (2018). Producción, calidad bromatológica de la leche y los costos de suplementación con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, en vacas Jersey. *Pastos y Forrajes*, 41(4), 266–272. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=2063>
- Arronis, V., & Abarca, S. (2016). *Degradación in situ de botón de oro (Tithonia diversifolia) y su relación con la emisión de metano entérico* [Informe final]. Repositorio Red Nacional de Pastos y Forrajes. <https://bit.ly/3gr43qw>
- Arronis Díaz, V. (2015). *Banco forrajero de Botón de oro (Tithonia Diversifolia)*. InfoAgro Costa Rica.
- Ascencio-Rojas, L., Valles-de la Mora, B., Castillo-Gallegos, E., & Ibrahim, M. (2018). *In situ* ruminal degradation and effective degradation of foliage from six tree species during dry and rainy seasons in Veracruz, Mexico. *Agroforestry Systems*, 93, 123–133. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0184-z>
- Astúa-Ureña, M., Campos-Granados, C. M., & Rojas-Bourrillon, A. (2021). Efecto de la fertilización nitrogenada y la edad de rebrote sobre las características morfológicas y rendimiento agronómico del botón de oro (*Tithonia diversifolia*) ecotipo INTA-Quepos. *Nutrición Animal Tropical*, 15(1), 1–18. <https://doi.org/10.15517/nat.v15i1.47521>
- Avila-Serrano, N. Y., López-Garrido, S. J., Galicia-Jiménez, M. M., González-Crespo, G. de J., & Camacho-Escobar, M. A. (2020). Efecto de la incorporación de arbóreas a dietas de *Cynodon nlemfuensis* durante la fermentación ruminal *in vitro*. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 403–412. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.618>

- Botero Londoño, J. M., Gómez Carabalí, A., & Botero Londoño, M. A. (2019). Rendimiento, parámetros agronómicos y calidad nutricional de la *Tithonia diversifolia* con base en diferentes niveles de fertilización. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(3), 789–800. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4667>
- Cardona-Iglesias, J. L., Urbano-Estrada, M. F., Guatusmal-Gelpud, C., Ríos-Peña, L. M., & Castro-Rincón, E. (2021). Producción de metano *in vitro* en recursos forrajeros del trópico altoandino de Nariño. *Pastos y Forrajes*, 44, 1–10. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=2213>
- Cardona-Iglesias, J. L., Mahecha-Ledesma, L., & Angulo-Arizala, J. (2017). Efecto sobre la fermentación *in vitro* de mezclas de *Tithonia diversifolia*, *Cenchrus clandestinum* y grasas poliinsaturadas. *Agronomía Mesoamericana*, 28(2), 405–426. <http://doi.org/10.15517/ma.v28i2.25697>
- Cerdas-Ramírez, R. (2018). Extracción de nutrientes y productividad del botón de oro (*Tithonia diversifolia*) con varias dosis de fertilización nitrogenada. *InterSedes*, 19(39), 172–187. <https://doi.org/10.15517/isucr.v19i39.34076>
- Chacón Navarro, M., Reyes Rivero, C., & Segura Guzmán, J. (2015). *Estrategia para la ganadería baja en carbono en Costa Rica (Informe final: estrategia y plan de acción)*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/L01-11006.pdf>
- Combs, D. (2014). Using *in vitro* total-tract NDF digestibility in forage evaluation. *Focus on Forage*, 15(2), 1–3. <https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2016/02/TTNDFD-FOF.pdf>
- Detmann, E., Valadares Filho, S. C., Pina, D. S., Henriques, L. T., Paulino, M. F., Magalhães, K. A., Silva, P. A., & Chizzotti, M. L. (2008). Prediction of the energy value of cattle diets based on the chemical composition of the feeds under tropical conditions. *Animal Feed Science and Technology*, 143(1–4), 127–147. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.008>
- dos Santos Silva, A. M., Santos, M. V., da Silva, L. D., Barbosa dos Santos, J., Alves Ferreira, E., & Tuffi Santos, L. D. (2021). Effects of irrigation and nitrogen fertilization rates on yield, agronomic efficiency and morphophysiology in *Tithonia diversifolia*. *Agricultural Water Management*, 248, Article 106782. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.106782>
- Galindo-Blanco, J. L., Rodríguez-García, I., González-Ibarra, N., García-López, R., & Herrera-Villafranca, M. (2018). Sistema silvopastoril con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray: efecto en la población microbiana ruminal de vacas. *Pastos y Forrajes*, 41(4), 273–280. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=2054>
- Instituto Meteorológico Nacional. (2017). *Datos climáticos estación meteorológica Santa Lucía*. Instituto Meteorológico Nacional.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2014). *VI Censo Nacional Agropecuario*. Instituto Nacional de Estadística y Censos.
- Jamarun, N., Pazla, R., Zain, M., & Arief. (2019). Comparison of *in vitro* digestibility and rumen fluid characteristics between the tithonia (*Tithonia diversifolia*) with elephant grass (*Pennisetum purpureum*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 287, Article 012019. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/287/1/012019/pdf>
- Kaps, M., & Lamberson, W. R. (2004). *Biostatistics for animal science*. CABI Publishing.
- Ku Vera, J. C., Briceño, E. G., Ruiz, A., Mayo, R., Ayala, A. J., Aguilar, C. F., Solorio, F. J., & Ramírez, L. (2014). Manipulation of the energy metabolism of ruminants in the tropics: options for improving meat and milk production and quality. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(1), 43–53. <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/426>

- La O, O., González, H., Orozco, A., Castillo, Y., Ruiz, O., Estrada, A., Ríos, F., Gutiérrez, E., Bernal, H., Valenciaga, D., Castro, B. I., & Hernández, Y. (2012). Composición química, degradabilidad ruminal *in situ* y digestibilidad *in vitro* de ecotipos de *Tithonia diversifolia* de interés para la alimentación de rumiantes. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46(1), 47–53. <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/81>
- López-Herrera, M., Arias-Gamboa, L. M., Alpízar-Naranjo, A., & Castillo-Umaña, M. (2021). Calidad de fibra y producción de metano en ensilados de leguminosas con fuentes de carbohidratos. *Nutrición Animal Tropical*, 15(2), 1–24. <https://doi.org/10.15517/nat.v15i2.47909>
- Mejía-Díaz, E., Mahecha-Ledesma, L., & Angulo-Arizala, J. (2017). *Tithonia diversifolia*: especie para ramoneo en sistemas silvopastoriles y métodos para estimar su consumo. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 289–302. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22673>
- Meale, S. J., Chaves, A. V., Baah, J., & McAllister, T. A. (2012). Methane production of different forages *in vitro* ruminal fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(1), 86–91. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11249>
- Merlo-Maydana, F. E., Ramírez-Avilés, L., Ayala-Burgos, A. J., & Ku-Vera, J. C. (2017). Efecto de la edad de corte y la época del año sobre el rendimiento y calidad de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Staff en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4(2), 116–127. <http://ucbconocimiento.cba.ucb.edu.bo/index.php/JSAAS/article/view/55/32>
- Meza-Bone, G., Meza-Bone, C., Avellaneda-Cevallo, J., Godoy-Montiel, L., Barros-Rodríguez, M., & Jines-Fernández, F. (2021). *In vitro* ruminal degradation of *Tithonia diversifolia*. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1), Article 43206. <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.43206>
- Olfaz, M., Kilic, U., Boga, M., & Mohamoud, A. (2018). Determination of the *in vitro* gas production and potential feed value of olive, mulberry and sour orange tree leaves. *Open Life Science*, 13(1), 269–278. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0033>
- Ørskov, E., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), 499–503. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>
- Paniagua-Hernández, D., Arias-Gamboa, L. M., Castillo-Umaña, M., Alpízar-Naranjo, A., Camacho-Cascante, I., Padilla-Fallas, J., & Campos-Aguilar, M. (2020). Efecto de la densidad de siembra y edad de rebrote en la producción y composición bromatológica de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Pastos y Forrajes*, 43(4), 275–283. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=2202>
- Pérez-Can, G. E., Tzec-Gamboa, M., Albores-Moreno, S., Sanginés-García, J., Aguilar-Urquizo, E., Chay-Canul, A., Canul-Solís, J., Muñoz-Gonzalez, J., Diaz-Echeverria, V., & Piñero-Vázquez, A. (2020). Degradabilidad y producción de metano *in vitro* del follaje de árboles y arbustos con potencial en la nutrición de rumiantes. *Acta Universitaria*, 30, 1–13. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2840>
- Pérez Can, G. E. (2019). *Potencial nutritivo del forraje de arbóreas y arbustivas: cinética de fermentación in vitro y producción de metano* [Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Conkal]. Repositorio del Instituto Tecnológico de Conkal. <https://bit.ly/3UVCYe0>
- Prieto-Manrique, E., Vargas-Sánchez, J., Angulo-Arizala, J., & Mahecha-Ledesma, L. (2016). Ácidos grasos, fermentación ruminal y producción de metano, de forrajes de silvopasturas intensivas con *Leucaena*. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 337–352. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.24386>

- Razz, R., Clavero, T., & Vergara, J. (2004). Cinética de degradación *in situ* de la *Leucaena leucocephala* y *Panicum maximum*. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 14(5), 424–430. <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/28233/art6.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Rodríguez, R., Galindo, J., Ruíz, T. E., Solís, C., Scull, I., & Gómez, S. (2019). Valor nutritivo de siete ecotipos de *Tithonia diversifolia* colectados en la zona oriental de Cuba. *Livestock Research for Rural Development*, 31(8), Artículo 119. <http://www.lrrd.org/lrrd31/8/ruiz31119.html>
- Rojas-Cordero, D., Alpízar-Naranjo, A., Castillo-Umaña, M., & López-Herrera, M. (2020). Efecto de la inclusión de *Musa* sp. en la conservación de *Morus alba* Linn. *Pastos y Forrajes*, 43(3), 210–219. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path%5B%5D=2203>
- Ruíz, T. E., Alonso, J., Febles, G. J., Galindo, J. L., Savón, L. L., Chongo, B. B., Torres, V., Martínez, Y., La O, O., Gutiérrez, D., Crespo, G. J., Cino, D. M., Scull, I., & González, J. (2016). *Tithonia diversifolia*: I. Estudio integral de diferentes materiales para conocer su potencial de producción de biomasa y calidad nutritiva. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 20(3), 63–82.
- SAS Institute Inc. (2009). *SAS/STAT® User's guide: Statistics (Versión 9.0)*. SAS Institute Inc.
- Sobalvarro-Mena, J. L., Elizondo-Salazar, J. A., & Rojas-Bourillón, A. (2020). La producción de gas *in vitro* para estimar la energía neta de lactancia. *Agronomía Mesoamericana*, 31(2), 311–328. <https://doi.org/10.15517/am.v31i2.38497>
- Valenciaga, D., López, J. R., Galindo, J., Ruiz T., & Monteagudo, F. (2018). Cinética de degradación ruminal de materiales vegetales de *Tithonia diversifolia* recolectados en la región oriental de Cuba. *Livestock Research for Rural Development*, 30(11), Artículo 186. <http://www.lrrd.org/lrrd30/11/daiky30186.html>
- Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vega Fonseca, A. (2016). *Análisis de herramientas para la estimación de gases de efecto invernadero (GEI) y su aplicación en sistemas de producción doble propósito en fincas ganaderas de la cuenca del río Jesús María, Costa Rica* [Tesis de maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza]. Repositorio del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/8543>
- Verdecia, D. M., Herrera, R. S., Ramírez, J. L., Bodas, R., Leonard, I., Giráldez, F. J., Andrés, S., Santana, A., Méndez-Martínez, Y., & López, S. (2018). Componentes del rendimiento, caracterización química y perfil polifenólico de la *Tithonia diversifolia* en el Valle del Cauto, Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4), 457–471. <https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/838>