

Variabilidad fenotípica y genética de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) A. Gray, una planta para la producción animal sostenible en Colombia

Julian Esteban Rivera Herrera, Zoot., MSc.

Comité tutorial:

Director: Rolando Barahona Rosales BSc, MSc, PhD.
Co director: Julian David Chará Orozco MVZ, MSc, PhD.
Asesor: Tomás Elías Ruiz Vásquez IA, MSc, PhD.
Asesor: Juan Florencio Gómez Leyva Biól. MSc, PhD.

Programa de posgrado: Doctorado en Ciencias Animales

Universidad de Antioquia
2020

Agradecimientos

De una manera obligada, necesaria y justa, agradezco a mi familia, quienes a pesar de no entender mucho este proceso siempre estuvieron para apoyarme.

A mis amigos, colegas y compañeros David (El Güerito), Ramona, Norma, Frank, Edgar, Carlos y Manuel en México; a Celina, Ramiro, Gonzalo, Hernán, José Luis, Pablo, Adolfo, Julian, Karen y otros muchos otros que compartieron cada una de las dificultades presentadas, así como cada una de las metas alcanzadas.

Agradezco a Los predios El Porvenir en San Luis de Cubarral (Meta) y Los Alpes en Villamaría (Caldas), por permitir llevar a cabo las diferentes evaluaciones de campo en sus instalaciones y por el apoyo constante en cada una de las actividades programadas.

A Rolando Barahona, Julian Chará, Tomás Ruiz y Juan Florencio Gómez, mi comité de tesis quienes siempre han sido más que mis tutores.

A los laboratorios de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco en México y de Fitotecnia Tropical de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín), por ofrecer sus instalaciones y otros recursos necesarios para las evaluaciones a nivel molecular. Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente por el apoyo en la propagación vegetal de los genotipos de *T. diversifolia*.

Al proyecto *Ganadería Colombiana Sostenible*, financiado por el Gobierno del Reino Unido y el Fondo Mundial para el Medio Ambiente (GEF), por aportar recursos necesarios para las evaluaciones y recolección de materiales.

A Colciencias en su convocatoria de Doctorados Nacionales 727 de 2015.

Y finalmente mis más sinceras gracias a Dios, que siempre está y estará.

Tabla de Contenido

AGRADECIMIENTOS	2
TABLA DE CONTENIDO	3
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ECUACIONES	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN GENERAL	16
GENERAL ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN GENERAL	20
Bibliografía	21
OBJETIVOS	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA	24
Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de <i>Tithonia diversifolia</i> A. Gray para la producción animal sostenible	24
Resumen	24
Phenotypic variability and phytochemical composition of <i>Tithonia diversifolia</i> A. Gray for sustainable animal production	25
Abstract	25
Introducción	25
Materiales y métodos	26
Resultados y discusión	27
Compuestos fitoquímicos en <i>T. diversifolia</i> y su uso en la producción animal	28
Composición proximal de <i>T. diversifolia</i> y sus efectos en poblaciones microbianas de rumen	31
<i>T. diversifolia</i> en la producción animal y su diversidad	32
Capacidad de <i>T. diversifolia</i> para acumular Nitrógeno y Fósforo	35
Conclusiones	38
Agradecimientos	39
Bibliografía	39
CAPÍTULO 2. DIVERSIDAD GENÉTICA DE MATERIALES DE <i>TITHONIA DIVERSIFOLIA</i>	50
Diversidad genética, morfológica y química de colectas de <i>Tithonia diversifolia</i> para la alimentación animal	50
Resumen	50
Abstract	51
Introducción	51
Materiales y métodos	52
Sitios de colecta	52
Extracción y procesamiento de ADN	54
Determinación de la diversidad genética mediante marcadores moleculares y análisis ITS	54
Análisis bromatológico	55

Determinaciones morfológicas	56
Análisis de la información	56
Resultados	56
Diversidad e identificación genética de las colectas de <i>T. diversifolia</i>	56
Estructura genética	58
Composición química y características morfológicas	59
Discusión	61
Diversidad genética	62
Composición bromatológica y morfológica	63
Conclusiones	65
Agradecimientos	65
Bibliografía	65
CAPÍTULO 3. INTERACCIÓN GENOTIPO AMBIENTE	70
Interacción genotipo ambiente y estabilidad de ecotipos promisorios de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray orientados a la producción animal	70
Resumen	70
Abstract	71
Introducción	71
Materiales y métodos	72
Identificación de genotipos	72
Localización de parcelas experimentales	73
Establecimiento de parcelas experimentales	74
Análisis de suelos	74
Medición de condiciones ambientales	74
Variables morfológicas y químicas	75
Interacción genotipo ambiente, diseño experimental y análisis de la información	76
Resultados	78
Identificación de genotipos	78
Análisis de suelos	78
Condiciones ambientales	79
Composición química y variables agronómicas	81
Interacción genotipo x ambiente	85
Estabilidad de los materiales a través de los ambientes	87
Discusión	89
Adaptabilidad	89
Variables morfológicas y agronómicas	89
Composición química	90
Conclusiones	94
Agradecimientos	94
Bibliografía	94
CAPÍTULO 4. FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>TITHONIA DIVERSIFOLIA</i> (HEMSL.) A. GRAY.	

100

Efecto de la inclusión de diferentes materiales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. en los productos de la fermentación de dietas ofrecidas bajo condiciones tropicales 100

RESUMEN	100
ABSTRACT	101
INTRODUCCIÓN	101
MATERIALES Y MÉTODOS	102
Materiales vegetales	102
Evaluación <i>in vitro</i> de la fermentación, producción de CH ₄ y AGV y degradabilidad de la materia seca	103
Composición química de los materiales de <i>T. diversifolia</i> evaluados	104
Diseño experimental y análisis estadístico	104
RESULTADOS	105
Fermentación <i>in vitro</i>	105
Degradabilidad de la materia seca	108
Producción de AGV	108
Producción de metano	109
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	117
Agradecimientos	117
Bibliografía	118
CAPÍTULO 5. PROPAGACIÓN DE <i>TITHONIA DIVERSIFOLIA</i> (HEMSL.) A. GRAY.	123
Parámetros de propagación y crecimiento de ecotipos destacados de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray. bajo condiciones tropicales	123
RESUMEN	123
ABSTRACT	124
INTRODUCCIÓN	124
MATERIALES Y MÉTODOS	125
Genotipos evaluados	125
Localización	126
Medición de condiciones ambientales	126
Análisis de suelos	126
Variables de crecimiento y reproducción	126
Germinación de la semilla sexual	127
Diseño experimental y análisis de la información	127
RESULTADOS	128
Condiciones ambientales	128
Fases de desarrollo	130
Germinación	130
DISCUSIÓN	132
CONCLUSIONES	134
Agradecimientos	135
Bibliografía	135
CAPÍTULO 6. CONSUMO DE <i>TITHONIA DIVERSIFOLIA</i> (HEMSL.) A. GRAY.	138
Consumo de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray. por bovinos bajo condiciones de suelos ácidos de Colombia	138
RESUMEN	138

ABSTRACT	139
INTRODUCCIÓN	139
MATERIALES Y MÉTODOS	140
Genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> usados y localización del experimento	140
Selección de animales y variables medidas	141
Diseño experimental y análisis de la información	142
RESULTADOS	142
Composición química	142
Consumo de forraje verde	143
Número de idas al comedero	145
DISCUSIÓN	145
CONCLUSIONES	147
Bibliografía	148
CONCLUSIONES GENERALES	153
RECOMENDACIONES	154
ANEXOS	155
ANEXO I	155
ANEXO II	162
ANEXO III	164

Lista de Tablas

Capítulo 1

Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en forraje de <i>T. diversifolia</i>	29
Tabla 2. Composición química y proximal de <i>T. diversifolia</i> bajo diferentes condiciones edafoclimáticas.....	31
Tabla 3. Diferencias encontradas en algunos parámetros morfológicos y químicos en distintos ecotipos de <i>T. diversifolia</i> evaluados en Cuba.....	32

Capítulo 2

Tabla 1. Características generales de los sitios de colecta para México y Colombia....	53
Tabla 2. Marcadores ISSR y P450 utilizados en la determinación de la diversidad genética de <i>T. diversifolia</i> en México y Colombia	55
Tabla 3. Parámetros de diversidad genética de los iniciados utilizados en el análisis ..	57
Tabla 4. Composición química de <i>T. diversifolia</i> colectados en Colombia	61
Tabla 5. Características morfológicas de <i>T. diversifolia</i> colectados en Colombia	60

Capítulo 3

Tabla 1. Valores del índice de potencial forrajero ponderado (IPFP) de los genotipos seleccionados.....	78
Tabla 2. Variables químicas y físicas de los suelos donde fueron establecidas las parcelas experimentales en ambas regiones.....	79
Tabla 3. Medidas de las variables morfológicas y agronómicas de los genotipos en ambos sitios de evaluación	82
Tabla 4 Composición química (g/100 g de MS; Mcal/kg) de los genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> en REG1 y el efecto de la época y la fertilización.	84
Tabla 5 Composición química (g/100 g de MS; Mcal/kg) de los genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> en REG2 y el efecto de la época.....	84
Tabla 6. Análisis de varianza del modelo AMMI para la interacción GxA de la producción de materia seca	87
Tabla 7. Estabilidad de los genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> evaluados según el índice de Shukla (Kang, 1993) a través de tres ambientes	88

Capítulo 4

Tabla 1. Composición química de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> ofrecidas bajo condiciones de trópico bajo (g/100 g MS; Mcal/Kg; % Ac. Tánico)	106
Tabla 2. Composición química de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> ofrecidas bajo condiciones de trópico de altura (g/100 g MS; Mcal/Kg; % Ac. Tánico).....	106
Tabla 3. Parámetros de fermentación ajustados al modelo Gompertz de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> bajo condiciones de trópico bajo	107
Tabla 4. Parámetros de fermentación ajustados al modelo Gompertz de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> bajo condiciones de trópico de altura.....	107
Tabla 5. Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS, %) de dietas con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> bajo condiciones de trópico bajo	108
Tabla 6. Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS, %) de dietas con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> bajo condiciones de trópico de altura	108
Tabla 7. Producción de AGV de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> bajo condiciones de trópico bajo	110
Tabla 8. Producción de AGV de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> bajo condiciones de trópico alto	111
Tabla 9. Producción de metano durante la fermentación de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> bajo condiciones de trópico bajo	112
Tabla 10. Producción de metano durante la fermentación de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> bajo condiciones de trópico alto	112

Capítulo 5

Tabla 1. Características químicas y físicas del suelo	129
Tabla 2. Fases de desarrollo agronómico y producción se semilla sexual de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i>	130
Tabla 3. Porcentaje de germinación de la semilla sexual de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i>	131
Tabla 1. Composición química de los diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> evaluados	142

Lista de Figuras

Capítulo 2

Figura 1. Localización de los sitios de colecta de <i>T. diversifolia</i> en Colombia y México	53
Figura 2. Gel de agarosa al 1.2% mostrando los productos de amplificación para los marcadores moleculares de <i>T. diversifolia</i> . A) ISSR (GA)8YT, B) citocromo P450 CYP1A1F/heme2B6.	57
Figura 3. Dendrograma generado por el método de UPGMA para las 31 colectas de <i>T. diversifolia</i> de México y Colombia empleando el índice de disimilitud de Dice.	58
Figura 4. Estructura genética de las colectas realizadas en Colombia y México.	59
Figura 5. Análisis de componentes principales de características: A) morfológicas, B) químicas de las colectas de <i>T. diversifolia</i>	60

Capítulo 3

Figura 1. Localización de los sitios de trabajo	73
Figura 2. Condiciones ambientales presentadas durante el periodo de evaluación en la Región 1.	80
Figura 3. Condiciones ambientales presentadas durante el periodo de evaluación en la Región 2.	81
Figura 4. Correlación de las variables agronómicas de los genotipos de <i>T. diversifolia</i> .	83
Figura 5. Correlación de las variables químicas de los genotipos de <i>T. diversifolia</i> .	83
Figura 6. Representación GGEplot del rendimiento de materia seca de los genotipos evaluados de <i>T. diversifolia</i> en REG1 sin uso de fertilizante	86
Figura 7. Representación GGEplot del rendimiento de materia seca de los genotipos evaluados de <i>T. diversifolia</i> en REG1Fert.	86
Figura 8. Representación GGEplot del rendimiento de materia seca de los materiales evaluados de <i>T. diversifolia</i> en REG2	86
Figura 9. Representación GGEplot del rendimiento de materia seca de los genotipos evaluados de <i>T. diversifolia</i> bajo los tres ambientes trabajados	87
Figura 10. Ranking de los genotipos respecto al genotipo ideal	87
Figura 11. Supervivencia de los genotipos de <i>T. diversifolia</i> evaluados en los dos sitios de trabajo.	89

Capítulo 6

Figura 1. Condiciones ambientales observadas durante el periodo de experimentación	129
Figura 1. Consumo de forraje verde (kg) de los diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> estudiados	144
Figura 2. Tiempo (s) dedicado al consumo de diferentes genotipos de <i>Tithonia diversifolia</i> evaluados	144

Lista de ecuaciones

Capítulo 3

Ecuación 1. índice de potencial forrajero ponderado (IPFP).....	72
Ecuación 2. Área de una circunferencia.....	75
Ecuación 3. Modelo general de un diseño de bloques completos al azar	76
Ecuación 4. Expresión matemática del análisis AMMI.....	77
Ecuación 5. Expresión básica de un modelo GGE-Biplot	77
Ecuación 6. Expresión matemática de un modelo GGE-Biplot con los valores singulares del ACP y los valores de vectores propios de genotipos y ambientes.....	77
Ecuación 7 Expresión básica de un modelo SREG	77

Capítulo 4

Ecuación 1. Ajuste del volumen de producción de gas a partir de la presión	103
Ecuación 2. Modelo no lineal de Gompertz.....	103
Ecuación 3. Modelo general de un diseño de bloques completos al azar	104
Ecuación 1. Modelo general de un diseño de bloques completos al azar	127
Ecuación 1. Modelo general de un diseño de rectángulo latino.....	142

Lista de Abreviaturas

%	Porcentaje
a	Fracción rápidamente degradable
A	Adenina
A:P	Relación acético propiónico
a+b	Fracción potencialmente degradable
AA	Absorción atómica
Ac.	Ácido
ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGROSAVIA	Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
AGV	Ácidos grasos volátiles
Al	Aluminio
AltPH	Altura a la primera hoja
Altplan	Altura de la planta
AMB	Ambiente
AMMI	Additive main effects and multiplicative interaction
AOAC	The Association of Official Analytical Chemists
ArD	Área del dosel
ArH	Área de la hoja
ATP	Adenosín Trifosfato
b	Fracción potencialmente degradable
bh-T	Bosque húmedo tropical
c	Tasa constante de degradación
C	Citocina
C	Carbono
C.E.	Conductividad eléctrica
C.I.C.E.	Capacidad de intercambio catiónico
Ca	Calcio
CAQ	Caquetá
cc	Centímetro cuadrado
Cel	Celulosa
Cen	Cenizas
CH ₄	Metano
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
Coef. De Var.	Coeficiente de variación
Coeff var	Coeficiente de variación

CP	Componente principal
DAIVFDA	Digestibilidad aparente <i>in vitro</i> de la FDA
DAIVFDN	Digestibilidad aparente <i>in vitro</i> de la FDN
DAIVMO	Digestibilidad aparente <i>in vitro</i> de la materia orgánica
DAP	Fosfato di amónico
Deg	Degradabilidad
DiamT	Diámetro de los tallos
Dig	Digestibilidad
DINMS	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
dS	Decisiemens
DVIVFDA	Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de la FDA
DVIVFDN	Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de la FDN
DVIVMO	Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de la materia orgánica
EB	Energía Bruta
EBM	Ecorregión del Bajo Magdalena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Extracto Etéreo
EEC	Ecorregión del Eje Cafetero
EEM	Erros estándar de la media
EMA	Ensayos multi-ambiente
EnI	energía neta de lactancia
EPO	Ecorregión del Piedemonte Orinocense
ESB	Ecorregión de Santander y Boyacá
EVRC	Ecorregión del Valle del Río Cesar
ExLat	Expansión lateral
FBN	Fijación Biológica del Nitrógeno
FDA	Fibra Detergente Ácida
FDN	Fibra Detergente Neutra
Fe	Hierro
FFI	Fresh fodder intake
FL	Fase lag – tiempo de colonización
ForrV	Forraje verde por planta
FT	Fenoles totales
FV	Forraje verde
g	Gramo
G	Guanina
GEI	Gases de efecto invernadero
Gen	Genotipo
GPI	Gas al punto de inflexión
GxE	Interacción Genotipo x Ambiente

h	Hora
H	Índice de Nei de diversidad genética
HCl	Ácido Clorhídrico
Hem	Hemicelulosa
HojM	Hojas marchitas
HojMue	Hojas muertas
HojV	Hojas verdes
HPI	Hora al punto de inflexión
I	Índice de Shannon de diversidad
ICONTEC	Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación
IPFP	índice de potencial forrajero ponderado
ISSR	Inter simple sequence repeat
ITS	Internal transcribed spacer
JAL	Jalisco
k	Tasa fraccional de pasaje ruminal
K	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
kg	Kilogramo
l	Litros
Lig	Lignina
m	Metros
Mcal	Mega calorías
MCMC	Cadena de Monte Carlo Markov Chain
meq	Miliequivalente
Mex	México
Mg	Magnesio
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MICH	Michoacán
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Materia seca
MSC	Materia seca Consumida
MSD	Materia seca degradada
MSI	Materia seca incubada
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MSP	Microorganismos solubilizadores de fosfato
N	Nitrógeno
N	Norte

N ₂	Di nitrógeno
Na	Número de alelos observados
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDT	Nutrientes totales digestibles
Ne	Número efectivo de alelos
ng	Nano gramo
NH ₄ ⁺	Amonio
NIRS	Espectroscopia del infrarrojo cercano
NO ₃ ⁻	Nitrato
NTC	Norma Técnica Colombiana
O	Oeste
°C	Grados Centígrados
P	Fósforo
P	Número de loci polimórfico
p	Valor p – probabilidad
pb	Pares de bases
PC	Proteína Cruda
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PHojM	Peso de las hojas marchitas
PHojMue	Peso de las hojas muertas
PHojV	Peso de las hojas verdes
Pi	Fósforo inorgánico
Po	Fósforo orgánico
ppm	Partes por millón
R	Ramas
REG1	Región 1 (Ambiente 1)
REG1Fert	Región 1 con uso de fertilizante (Ambiente 2)
REG2	Región 2 (Ambiente 3)
REP	Repetición
RHT	Relación hoja tallo
RPCP	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas
s	Segundos
SB	Borato de sodio
SREG	Biplot method using sites regression
Sup	Supervivencia
T	Tiamina
t	Tonelada
Tan	Taninos
TBE	Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA
TC	Taninos Condensados

TH	Taninos Hidrolizables
THSW	Sensación térmica a causa del viento, la humedad relativa, la irradiancia (radiación solar instantánea) y la temperatura °C
TMPG	Tasa máxima de producción de gas
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colinas
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages
UV	Ultravioleta
Y _m	Porcentaje de la energía bruta contenida en el alimento perdida como CH ₄
Zn	Zinc
μ	Media – promedio
μl	Microlitro
μM	Micrómetro

Resumen general

El presente documento tiene como propósito dar a conocer los resultados obtenidos en el trabajo de investigación: “*Variabilidad fenotípica y genética de Tithonia diversifolia (hemsl.) A. Gray, una planta para la producción animal sostenible en Colombia*”, desarrollado para optar por el título de Doctor en Ciencias Animales.

Con el fin de agrupar los resultados obtenidos en cada una de las temáticas trabajadas, este documento de tesis está conformado por seis capítulos estructurados en forma de artículos científicos y su objetivo general es evaluar diferentes genotipos de *T. diversifolia* e identificar aquellos con mayor potencial para la producción forrajera en sistemas con rumiantes. En el primer capítulo se revisa la literatura sobre la diversidad química y agronómica de *T. diversifolia* y sus usos en la alimentación animal y en otras áreas; el capítulo dos reporta la diversidad genética de esta arbustiva en materiales colectados en Colombia y México, y su potencial para la alimentación de rumiantes; el tercer capítulo evalúa la interacción GxA y la estabilidad de genotipos destacados de *T. diversifolia* para la producción de biomasa y su composición química bajo diferentes condiciones edafoclimáticas; el cuarto capítulo muestra los resultados de una evaluación *in vitro* de la dinámica de fermentación y una cuantificación de AGV y CH₄ de dietas con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia*; en el quinto capítulo se describen las fases de crecimiento, desarrollo y reproducción de esta especie junto con su potencial de producción de semilla sexual y su germinación; y finalmente en el sexto capítulo se reporta una evaluación del consumo voluntario y selectividad de los diferentes genotipos estudiados por bovinos en fase de crecimiento.

La revisión de literatura se basó en una búsqueda de artículos publicados en revistas científicas durante los últimos 10 años. Se encontró que, desde el punto de vista fitoquímico se han identificado más de 150 compuestos presentes en *T. diversifolia*, algunos con propiedades farmacológicas o capaces de modular la dinámica de degradación y fermentación en el rumen. También se destaca que *T. diversifolia* tiene una alta adaptabilidad a condiciones edafoclimáticas adversas lo que puede atribuirse en parte a la capacidad de asociarse con microorganismos diazotróficos del suelo y solubilizadores de fosfatos, además, de su diversidad y plasticidad genotípica y fenotípica.

En cuanto al análisis de diversidad genética (capítulo Dos), se evaluaron 31 poblaciones seleccionadas y colectadas en Colombia y México. El análisis de diversidad genética se realizó mediante marcadores moleculares ISSR y del gen del citocromo P450 y sus características químicas y morfologías fueron analizadas con estadística multivariada. Los materiales evaluados presentaron diferencias en el contenido de PC (29.4% ± 3.29), EE (1.6% ± 0.67), Ca (2.3% ± 0.2), P (0.6% ± 0.18), FDA (44.99 ± 9.43) y FDN (46.82 ± 12.52). Igualmente, se encontraron diferencias en el peso total de la planta, área foliar, hojas por rama y altura de planta ($p < 0.05$). Finalmente se identificó una amplia diversidad

genética con cinco grupos bien definidos y mediana relación geográfica entre materiales, con un índice de Nei de 0.281 y un índice de Shannon de 0.432.

La interacción GxA se evaluó en siete genotipos destacados para la producción de MS en tres ambientes y se midieron algunas características químicas y morfológicas. La interacción GxA se estudió con los modelos AMMI y SREG. Para la producción de MS se encontraron diferencias significativas entre los genotipos ($p < 0.05$), en el análisis GxA la interacción resultó significativa y se observaron efectos del ambiente sobre la productividad ($p < 0.05$). De otro lado, fueron encontrados dos genotipos estables y otros con mayor adaptación a cada uno de los ambientales.

En el estudio de la dinámica de fermentación y degradación ruminal, se evaluaron mezclas de siete materiales de *T. diversifolia* y las gramíneas *Cenchrus clandestinus* y *Urochloa brizantha* cv Marandú. La inclusión de *T. diversifolia* en dietas basadas en *U. brizantha* mejoró la oferta de nutrientes y modificó los parámetros de dinámica de fermentación ($p < 0.05$); la degradación de la MS se incrementó 4.72 puntos porcentuales frente a dietas únicamente con esta gramínea ($p < 0.05$), las emisiones de CH_4 fueron significativamente menores en dietas que tuvieron *T. diversifolia* ($p < 0.05$) y se disminuyó la relación A:P. En dietas basadas en *C. clandestinus*, la inclusión de *T. diversifolia* modificó la composición química de las dietas y la degradación de la MS ($p < 0.05$), pero tuvo poco efecto en los parámetros de dinámica de fermentación y en sus productos.

En la evaluación de los aspectos reproductivos los genotipos tuvieron diferencias significativas en todas las variables medidas a excepción del tiempo de secado de aquenios y del porcentaje de semillas rudimentarias ($p < 0.05$). En la producción de semilla sexual, la fertilización tuvo efecto significado ($p < 0.05$) y en general incrementó el tiempo de las fases evaluadas; con relación al porcentaje de germinación hubo diferencias significativas entre genotipos y entre los tratamientos ($p = 0.000118$), y se encontró que algunos procesos pre-germinativos pueden incrementar el porcentaje de germinación.

Finalmente, en las determinaciones de consumo se encontró una ingesta de 0.39 ± 0.045 kg de MS en cada periodo de evaluación con diferencias significativas entre algunos genotipos, pero todos los materiales fueron consumidos. No se encontró diferencias en cuanto al tiempo en el comedero entre los genotipos ($p = 0.0818$).

Se concluye que *T. diversifolia* es una especie que puede ser utilizada como arbustiva forrajera bajo diferentes condiciones edafoclimáticas como suelos ácidos y de baja fertilidad gracias a su alta diversidad genética. A pesar de que se identificó que esta especie ofrece una alta calidad nutricional debido a su baja fibra, alta oferta de nutrientes y degradabilidad existe la posibilidad de seleccionar materiales superiores para el crecimiento y producción de biomasa para condiciones específicas.

Palabras Clave: adaptación, botón de oro, composición química, diversidad genética, forrajera arbustiva, interacción genotipo ambiente, producción de biomasa.

General abstract

The purpose of this document is to present the results obtained in the research work: "*Phenotypic and genetic variability of Tithonia diversifolia (hemsl.) A. Gray, a plant for sustainable animal production in Colombia*", carried out to opt for the title of PhD in Animal Science.

In order to group the results obtained around specific topics, this thesis document is comprised of six chapters structured in the form of scientific articles and its general objective is to evaluate different genotypes of *T. diversifolia* and identify those with the greatest potential for forage production in systems with ruminants. The first chapter reviews the literature on the chemical and agronomic diversity of *T. diversifolia* and its uses in animal feed and in other areas; Chapter two reports on the genetic diversity of this shrub in accessions collected in Colombia and Mexico, and its potential for feeding ruminants; the third chapter reports the GxA interaction and the stability of prominent *T. diversifolia* genotypes for biomass production and its chemical composition under different edaphoclimatic conditions; the fourth chapter reports the results of an evaluation of the fermentation dynamics and a quantification of AGV and CH₄ from diets with the inclusion of different genotypes of *T. diversifolia*; in the fifth chapter the growth, development and reproduction phases of this species are described together with its potential for the production of sexual seed and its germination; and finally in the sixth chapter an evaluation of the voluntary consumption of the different genotypes studied by growing bovines is reported.

The review was based on a search for articles published in scientific journals during the last 10 years. It was found that *T. diversifolia* has more than 150 compounds, some with pharmacological properties or capable of modulating the dynamics of degradation and fermentation in the rumen. It is also highlighted that *T. diversifolia* has a high adaptability to adverse edaphoclimatic conditions, which can be partially attributed to its ability to associate with diazotrophic and phosphate solubilizer microorganisms in the soil, in addition to its diversity and genotypic and phenotypic plasticity.

Regarding the genetic diversity analysis (Chapter Two), 31 selected and collected populations in Colombia and Mexico were evaluated. Genetic diversity analysis was performed using ISSR molecular markers and the cytochrome P450 gene, and their chemical characteristics and morphologies were analyzed with multivariate statistics. The genotypes evaluated showed differences in the CP content ($29.4\% \pm 3.29$), EE ($1.6\% \pm 0.67$), Ca ($2.3\% \pm 0.2$), P ($0.6\% \pm 0.18$), ADF (44.99 ± 9.43) and NDF (46.82 ± 12.52) ($p < 0.05$). Also, differences were found in the total weight of the plant, leaf area, leaves per branch and plant height ($p < 0.05$). Finally, a high genetic diversity was identified with five defined groups and a medium geographic relationship between materials, with a Nei index of 0.281 and a Shannon index of 0.432.

The GxE interaction included seven genotypes evaluated for the production of DM in three environments and also some chemical and morphological characteristics were measured. The GxE interaction was studied with the AMMI and SREG models. For the production of DM, significant differences were found between genotypes ($p < 0.05$), in the GxE analysis the interaction was significant and effects of the environment on productivity were observed ($p < 0.05$). On the other hand, two stable genotypes were identified in addition to materials with greater adaptation capacity to each of the environments.

In the study of the fermentation and ruminal degradation, mixtures of seven materials of *T. diversifolia*, with *Cenchrus clandestinus* and *Urochloa brizantha* cv Marandú grasses were evaluated. Inclusion of *T. diversifolia* in diets based on *U. brizantha* improved the supply of nutrients (less fiber, more protein, fat and minerals) and modified the fermentation parameters ($p < 0.05$); the DM degradation increased 4.72% compared to diets with only this grass ($p < 0.05$) and CH₄ emissions were significantly lower in diets that had *T. diversifolia* ($p < 0.05$). Finally, in diets with *C. clandestinus*, the inclusion of *T. diversifolia* modified the chemical composition in the diets and the degradation of DM ($p < 0.05$) but did not affect fermentation parameters.

In the reproductive evaluation, the genotypes had significant differences in all the variables measured except for the drying time of achenes and percentage of rudimentary seeds ($p < 0.05$). In sexual seed production, fertilization had a significant effect ($p < 0.05$) and in general increased the time of the phases evaluated; and regarding the germination percentage there were significant differences between genotypes and between treatments ($p = 0.000118$), with some pre-germination processes increasing the germination percentage.

Finally, observed biomass intake was 0.39 ± 0.045 kg of DM per day, with significant differences between some genotypes, but all materials were consumed. In intake time there were no differences between genotypes ($p = 0.0818$).

It is concluded that *T. diversifolia* is a species that can be used as a forage shrub under different edaphoclimatic conditions due to its high genetic diversity. Although it was identified that this species offers nutritional quality, there is the possibility of selecting superior materials for biomass growth and production.

Keywords: adaptation, biomass production, chemical composition, genetic diversity, genotype environment interaction, Mexican sunflower, shrub fodder.

Introducción general

Tanto a nivel poblacional como de especie, la variabilidad genética y fenotípica conceden a plantas y animales la capacidad de responder a retos y amenazas (Govindaraj et al., 2015). La mutación, la deriva genética, la migración y la selección natural son fuentes que modifican la conformación genética de las poblaciones, por lo cual existe la posibilidad que dentro de una especie se observen individuos o poblaciones con características sobresalientes (Hedrick, 2005).

Bajo este contexto, la evaluación e identificación de genotipos de especies vegetales orientadas a la producción animal es de gran importancia para seleccionar aquellos que gocen de características deseadas, como por ejemplo la resistencia al ramoneo, rápido crecimiento, alta oferta nutricional, producción de semilla viable, adaptación a ciertas condiciones ambientales, entre otras (Ruiz et al., 2013; Holguín et al., 2015).

Es bien conocido que *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. se encuentra desde hace muchos años en África, Asia y América del Sur, producto de su introducción y diseminación. Esta condición ha favorecido su desarrollo en un sinnúmero de ambientes, lo que favorece un alto grado de diversidad en sus propiedades agronómicas, químicas y de adaptación (Ruiz et al., 2010; Ruiz et al., 2013; Miranda et al., 2015; Holguín et al., 2016; Luo et al., 2016). Colombia no es ajena a esta condición por lo cual existe la posibilidad de identificar y seleccionar genotipos superiores orientados a lograr un mayor aprovechamiento de esta especie.

El uso de arbustivas como forraje de alta calidad en sistemas ganaderos tropicales y subtropicales, ha tomado gran importancia durante los últimos años, debido a su contribución nutricional, productiva y ambiental (Schultze-Kraft et al., 2018). Especies como *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit., *T. diversifolia*, *Sambucus peruviana* H.B.K., *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze, *Guazuma ulmifolia* Lam., entre otras, han demostrado mejorar la oferta de nutrientes bajo diferentes condiciones de producción, incrementando la eficiencia de los sistemas, su economía y la calidad de sus productos (Rivera et al., 2015; Ribeiro et al 2016; Gallego-Castro et al., 2017).

T. diversifolia comúnmente conocida como botón de oro, falso girasol o girasol mexicano, es una arbustiva que, por su facultad de adaptación a múltiples condiciones ambientales, edáficas y de manejo, capacidad de rebrote, rápido crecimiento, y alto valor y aporte nutricional, ha demostrado potencial para la alimentación animal (Olabode et al., 2007; Ribeiro et al., 2015; Mauricio et al., 2017).

A pesar de todo lo anterior autores como Ruiz et al., (2010), Holguín et al. (2015) y Rivera et al. (2019), mencionan que no todas las poblaciones son apropiadas para todos los ambientes y, por tanto, identificar las de mayor potencial es fundamental para que el aporte de esta especie sea mayor. Según esto, se deben adelantar evaluaciones para contribuir al mejoramiento de la producción animal basado en la investigación de plantas

forrajeras en el trópico, con el objetivo de identificar y desarrollar germoplasmas de especies adaptadas a condiciones marginales como son los suelos ácidos e infértiles de los trópicos y subtropicos (Calsavara et al., 2016). En la selección de forrajeras en diferentes condiciones geográficas y sistemas de producción, la determinación de la influencia de factores del medio ambiente en la calidad y posibles interacciones con los genotipos está aumentando en importancia y debe ser la base para lograr fuentes nutricionales más eficientes y económicas para fortalecer los sistemas agropecuarios.

Con el objetivo de identificar genotipos con un mayor potencial para la alimentación animal en Colombia, se determinó la diversidad genética, morfológica y química de materiales de *T. diversifolia*, así como su interacción genotipo ambiente para la producción de forraje, además, de la viabilidad de su semilla sexual y consumo por parte de bovinos.

Bibliografía

- Calsavara, L., Ribeiro, R.S., Rocha e Silveira, S., Delarota, G.D., Freitas, D.S., Sacramento, J.P., Paciullo, D.S., Mauricio, R.M. 2016. Potencial forrageiro da *Tithonia diversifolia* para alimentação de ruminantes. *Livestock Research for Rural Development*, 28: Article #17. <http://www.lrrd.org/lrrd28/2/ferr28017.html>
- Gallego-Castro, L.A., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2017. Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray bajo tres sistemas de siembra en el trópico alto. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1): 213-222. DOI:10.15517/am.v28i1.21671
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., Srinivasan, M. 2015. Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. *Genetics Research International*. Article ID 431487: 1- 14. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/431487>
- Gualberto, R., O. Souza, N. Costa, C. Bracciali, L. Gaion. 2010. Influência do espaçamento e do estágio de desenvolvimento da planta na produção de biomassa e valor nutricional de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray. *Nucleus*, 7 (2): 135-149.
- Hedrick, P.W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59 (8): 1633–1638.
- Holguín VA, Ortíz S, Velasco A, Mora J. 2015. Evaluación multicriterio de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en Candelaria, Valle del Cauca. *Revista de medicina veterinaria y zootecnia*, 62(2): 57-72
- Luo, L., Zhang, P., Ou, X., Geng, Y. 2016. Development of EST-SSR markers for the invasive plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *Applications in Plant Sciences*, 4 (7), apps.1600011. <http://doi.org/10.3732/apps.1600011>.
- Mauricio, R.M., Calsavara, L.H.F., Ribeiro, R.S., Pereira, L.G.R., Freitas, D.S., Paciullo, D.S., Barahona, R., Rivera, J.E., Chará, J., Murgueitio, E. 2017 Feeding ruminants

- using *Tithonia diversifolia* as forage *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(4): 00146. DOI: 10.15406/jdvar.2017.05.00146.
- Miranda, M.A.F.M., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G., Gualtieri, S.C.J., Macias, F.A. 2015. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Natural Products*, 78, 1083 -1092. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00040>.
- Olabode O.S.; Sola O.; Akanbi W.B.; Adesina G.O., Babajide P.A. 2007. Evaluation of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray for Soil Improvement. *World Journal of Agricultural Sciences* 3 (4): 503-507.
- Ribeiro, R.S., Terry, S.A., Sacramento, J.P., Rocha e Silveira, S., Bento, C.B., Silva, E.F., Montovani, H.C., Gama, M.A.S., Pereira, L.G., Tomich, T.R., Mauricio, R.M., Chaves, A. 2016. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *Plos One* 11: e0165751 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>.
- Rivera, J.E., Cuartas, C.A., Naranjo, J.F., Tafur, O., Hurtado, E.A., Arenas, F.A., Chará, J., Murgueitio E. 2015. Efecto de la oferta y el consumo de *Tithonia diversifolia* en un sistema silvopastoril intensivo (SSPi), en la calidad y productividad de leche bovina en el piedemonte Amazónico colombiano. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 27, Article #189. <http://www.lrrd.org/lrrd27/10/rive27189.html>.
- Rivera, J., Lopera, J., Chará, J., Gómez-Leyva, J., Barahona, R., Enrique, E. 2019. Genetic and morphological diversity of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray for use in silvopastoral systems of Latin America. Dupraz, C., Gosme, M., Lawson, G. (Editors). *Book of Abstract 4th World Congress on Agroforestry*. Montpellier: CIRAD, INRA, World Agroforestry. pp 712.
- Ruiz, T.E., Febles, G., Torres, V., González, J., Achang, G., Sarduy, L., Díaz, H. 2010. Evaluación de materiales recolectados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en la zona centrooccidental de Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44 (3): 291-296.
- Ruiz, T.E., Torres, V., Febles, G., Díaz, H., González, J. 2013. Estudio del comportamiento de genotipos destacados de *Tithonia diversifolia* en relación con algunos componentes morfológicos. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 25, Article #154. <http://www.lrrd.org/lrrd25/9/ruiz25154.htm>.
- Schultze-Kraft, R., Rao, I.M., Peters, M., Clements, R.J., Bai, C., Liu, G. 2018. Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview. *Tropical Grasslands*, 6 (1), 1–14. <http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/article/view/394/241>.

Hipótesis

Existe variabilidad fenotípica en los materiales de *T. diversifolia* existentes en Colombia que causan diferencia en la composición química, producción de semilla sexual viable, desempeño productivo y adaptabilidad edafoclimática

Objetivos

Objetivo general

Determinar la variabilidad fenotípica de materiales de *Tithonia diversifolia* con potencial en la alimentación animal en diferentes zonas de Colombia.

Objetivos específicos

- Establecer la diversidad genética entre poblaciones de *T. diversifolia* colectadas en diferentes lugares de Colombia y México.
- Determinar la interacción genotipo x ambiente con relación a parámetros agronómicos y de calidad de forraje entre poblaciones de *T. diversifolia* colectadas en diferentes lugares de Colombia.
- Identificar materiales superiores de *T. diversifolia* con potencial forrajero para rumiantes colectadas en diferentes lugares de Colombia.

Capítulo 1. Revisión de literatura

Los aspectos más relevantes encontrados en la revisión de literatura fueron publicados en el mes de diciembre del año 2018 como artículo en la revista internacional: *Livestock Research for Rural Development*. El formato usado en este capítulo corresponde al exigido por la revista.

Rivera J E, Chará J, Gómez-Leyva J F, Ruíz T E y Barahona R 2018: Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 30, Article #200. from <http://www.lrrd.org/lrrd30/12/rive30200.html>

Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible

J E Rivera¹, J Chará¹, J F Gómez-Leyva², T E Ruíz³ and R Barahona⁴

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia. jerivera@fun.cipav.org.co; ²Laboratorio de Biología Molecular, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México; ³Instituto de Ciencia Animal, Cuba; ⁴Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Resumen

Tithonia diversifolia ha llamado la atención en diferentes campos de la investigación más allá de la producción pecuaria, incluyendo su potencial de adaptación, producción vegetal, oferta de nutrientes y propiedades terapéuticas. El objetivo de la presente revisión es explorar aspectos de diversidad, adaptación, compuestos fitoquímicos y el asocio de otros organismos con *T. diversifolia*, para explicar la oferta nutricional de esta especie y sus propiedades como forraje de alto valor. Se realizó una búsqueda sistemática de artículos publicados en revistas científicas durante los últimos 10 años para lo cual se usaron nueve criterios de búsqueda y las investigaciones encontradas se clasificaron en siete temáticas principales. Se hallaron en total más de 300 artículos relacionados con *T. diversifolia* en revistas especializadas. Desde el punto de vista fitoquímico se han reportado más de 150 compuestos presentes en diferentes tejidos, algunos con propiedades farmacológicas o capaces de modular la dinámica de degradación y fermentación en el rumen. También se destaca que *T. diversifolia* tiene una alta adaptación a condiciones edafoclimáticas adversas lo que puede atribuirse en parte a la capacidad de asociarse con microorganismos diazotróficos del suelo y

solubilizadores de fosfatos, además, de su plasticidad genotípica que le ha permitido establecerse en más de 50 países.

Palabras clave: adaptación, arbusto forrajero, botón de oro, fijación de Nitrógeno, metabolitos secundarios, sistemas sostenibles.

Phenotypic variability and phytochemical composition of *Tithonia diversifolia* A. Gray for sustainable animal production

Abstract

Tithonia diversifolia has attracted attention in different fields of research beyond livestock production, including its potential for adaptation, biomass production, nutrient supply and therapeutic properties. The objective of the present review is to explore aspects of diversity, adaptation, phytochemical content and the association of other organisms with *T. diversifolia*, to explain the nutritional offer of this species and its properties as high value forage. A systematic search was made of articles published in scientific journals during the last 10 years, for which nine search criteria were used and the research found was classified into seven main thematic areas. A total of more than 300 articles related to *T. diversifolia* were found in specialized journals. From the phytochemical point of view, more than 150 compounds have been reported in different tissues of *T. diversifolia*, some with pharmacological properties or capable of modulating the degradation and fermentation dynamics in the rumen. It is also noted that *T. diversifolia* has a high adaptation to adverse edaphoclimatic conditions, which can be attributed in part to the ability to associate with soil diazotrophic microorganisms and phosphate solubilizers, in addition to its genotypic plasticity that has allowed it to thrive in more than 50 countries.

Key words: adaptation, forage shrub, nitrogen fixation, secondary metabolites, sunflower, sustainable systems.

Introducción

El uso de arbustivas como forraje en sistemas pecuarios tanto de pastoreo como de corte y acarreo ha tomado gran importancia durante los últimos años, debido a su contribución nutricional, productiva y ambiental (Schultze-Kraft et al 2018). Arbustos como *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit., *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, *Sambucus peruviana* H.B.K., *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze, *Guazuma ulmifolia* Lam., entre otros, han demostrado mejorar la alimentación animal en condiciones tropicales y subtropicales (Ribeiro et al 2016; Rivera et al 2017; Gallego-Castro et al 2017).

T. diversifolia comúnmente conocida como botón de oro, falso girasol o girasol mexicano, goza de una amplia adaptación edafoclimática pues ha sido reportada en más de 50 países. Tiene una alta producción de biomasa y composición química superior frente a la mayoría de las pasturas utilizadas en condiciones tropicales (Yang et al 2012; Oludare y Muoghalu 2014; Terry et al 2016; Mauricio et al 2017). Esta arbustiva es una planta herbácea originaria de Centro América (Nash 1976), diploide de cromosomas ($2n = 34$) con 16 pares metacéntricos y un par submetacéntrico (Alcorcés de Guerra et al 2007), y pertenece a la familia Asteraceae, tribu Heliantheae y subtribu Helianthinae (Schilling y Panero 2002).

Esta arbustiva perenne, contiene bajos valores de fibra detergente ácida (FDA) y neutra (FDN), alto contenido de nitrógeno y calcio, así como aceptables porcentajes de degradación y contenido de carbohidratos no estructurales. Estas características modifican el balance de nutrientes de las dietas ofrecidas y también modulan su dinámica fermentativa y de degradación de forma física y química, por lo cual es una planta idónea para ser ofertada en dietas para animales (Ribeiro et al 2016; Mauricio et al 2017; Gallego-Castro et al 2017).

En otros campos, *T. diversifolia* es una especie considerada de mucho potencial debido a sus propiedades fitoquímicas (Ejelonu et al 2017), pues contiene compuestos de actividad farmacológica, insecticida y herbicida (Miranda et al 2015). Adicionalmente, debido a su fácil establecimiento en zonas de topografía con pendiente, es una especie empleada en la rehabilitación de suelos, protección de taludes y biorremediación; además de ser una excelente especie de uso apícola por su abundante floración (Mustonen et al 2015). En lo referente a su contenido de metabolitos secundarios y su impacto en alimentación animal, conviene recordar que compuestos como las saponinas, taninos, aceites esenciales, flavonoides, entre otros, han demostrado reducir la metanogénesis ruminal por diferentes mecanismos, y de modificar la degradación de las dietas (Banik et al 2013); por lo cual, *T. diversifolia* cuenta con propiedades químicas más allá de las tradicionalmente consideradas en la alimentación animal, especialmente de rumiantes. Debido a su distribución, esta especie también goza de una amplia diversidad que le confiere gran adaptación y variación en sus propiedades (Rivera et al 2017; Ruiz et al 2017).

El objetivo de la presente revisión es explorar aspectos de diversidad, adaptación y de asocio con otros organismos en *T. diversifolia*, para explicar la oferta nutricional de esta especie, especialmente en lo referente a sus contenidos de Nitrógeno (N) y Fósforo (F), y el potencial de su contenido de metabolitos secundarios en la alimentación animal.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda de artículos publicados durante los últimos 10 años en las bases de datos *Redalyc.Red*, *Science Direct*, *Ebsco* y *SciELO*, relacionadas con el uso de *T. diversifolia* en diferentes áreas de investigación. Los términos de búsqueda utilizados en inglés y español fueron: “*Tithonia diversifolia*”, “sistemas silvopastoriles”, “propagación de *T. diversifolia*”, “diversidad de materiales de *T. diversifolia*”, “compuestos fitoquímicos”, “metabolitos secundarios” y “usos de *T. diversifolia*”.

De acuerdo con las temáticas encontradas, los artículos se clasificaron como: (1) uso de *T. diversifolia* para la alimentación animal, (2) evaluación de la diversidad fenotípica de *T. diversifolia*, (3) *T. diversifolia* como controlador de otros organismos, (4) compuestos fitoquímicos o metabolitos secundarios en *T. diversifolia*, (5) *T. diversifolia* como abono orgánico, (6) comportamiento agronómico y (7) otros usos. Los trabajos identificados y revisados fueron clasificados de acuerdo con el país o región donde fueron generados.

Con el propósito de una mejor explicación a diferentes aspectos relevantes de *T. diversifolia*, se usaron otros criterios generales de búsqueda como “fijación biológica de nitrógeno”, “solubilización de fósforo”, “fuentes de evolución vegetal” y “efecto ambiental sobre la variabilidad de especies vegetales”.

Resultados y discusión

Para el periodo 2008 – 2018, se encontraron 306 escritos relacionados directamente con la evaluación de *T. diversifolia*. Sobresalieron trabajos orientados a la exploración de su contenido de metabolitos secundarios para la salud humana y animal (39.7% de los artículos revisados), potencial para la alimentación animal (21.8%), control de otros organismos (10.6%) y comportamiento agronómico de esta especie (10.6%). También se encontraron investigaciones sobre temas como diversidad fenotípica de materiales de *T. diversifolia* (3.3%), uso de *Tithonia* como abono verde (9.30%) y otros usos, como el control de cárcavas y suelos degradados (4.64%).

Con relación a la localización geográfica de los estudios publicados, Cuba (14.6%), Brasil (13.9%), Nigeria (13.2%), Colombia (11.3%), China (10.6%), Taiwán (4.64%), Camerún (4.64%) y México (3.31%) fueron los países con más publicaciones generadas. Sin embargo, en los últimos años otros países de África como Kenia, Ghana, Congo, Tanzania, y Uganda han venido adelantado algunas evaluaciones relacionadas con su propagación, control y usos medicinales.

Se identificaron 228 artículos vinculados con las temáticas objetivo, que representan el 75.5% de los escritos encontrados. Las investigaciones se centraron en los metabolitos secundarios de *T. diversifolia* para el control de insectos, modulación de la metanogénesis en rumen y fines terapéuticos (Chagas-Paula et al 2012; Kim et al 2013; Galindo et al 2014); alimentación de especies animales como bovinos, caprinos, cerdos,

peces y conejos (Hahn-von-Hessberg et al 2016; Mauricio et al 2017; Gallego-Castro et al 2017; Sánchez-Laiño et al 2018); diversidad genética y morfológica (Ruiz et al 2010; Yang et al 2012; Holguín et al 2015; Del Val et al 2017; Rivera et al 2017) y estudios de su potencial invasor y propagación en diferentes ambientes (Obukohwo y Umar 2014; Oludare y Muoghalu, 2014). A continuación, se presentan los aspectos más relevantes relacionados con estos temas.

Compuestos fitoquímicos en *T. diversifolia* y su uso en la producción animal

El uso de compuestos de origen vegetal en la alimentación animal es una herramienta para modificar las poblaciones de microorganismos en el tracto digestivo, reducir la metanogénesis ruminal, mejorar el balance de nutrientes e incrementar la salud animal (Lezcano-Más et al 2016; Patra et al 2017). Compuestos como las saponinas, taninos, aceites esenciales, flavonoides, entre otros, han demostrado favorecer los sistemas de producción por medio de diferentes mecanismos. Las plantas de *T. diversifolia* producen metabolitos secundarios como medio de defensa y de adaptación a ambientes adversos. Actualmente se han identificado más de 200,000 estructuras definidas de estos compuestos, de los cuales, su actividad y concentración varía de acuerdo con la especie vegetal, parte de la planta y condiciones ambientales (Patra et al 2017). Generalmente se ha observado que, en algunas plantas, el estrés por sequía, las altas temperaturas y la intensidad luminosa tienden a incrementar la presencia de metabolitos secundarios (Bhatta et al 2013).

En *T. diversifolia* los metabolitos secundarios de interés generalmente se encuentran en niveles moderados, por lo cual no afectan el consumo ni la degradabilidad de la materia seca (Galindo et al 2014; Lifongo et al 2014; Terry et al 2016; Ejelonu et al 2017). La presencia de metabolitos secundarios en el forraje fresco de *T. diversifolia* fue evaluado por Lezcano et al (2012), quienes no encontraron presencia de saponinas, glucósidos cardiotónicos ni flavonoides, pero sí de taninos. En otra investigación se reportó un bajo contenido de fenoles y ausencia de saponinas (Vargas et al 2012).

El contenido de taninos extractables totales de *T. diversifolia* es de 29.2 y 37.7 g/kg MS, para hojas jóvenes y maduras, respectivamente (Osuga et al 2012). En Colombia, Santacoloma y Granados (2012) reportaron contenidos de polifenoles de 6.30 g/kg MS, taninos totales de 5.40 g/kg MS, taninos condensados de 6.6 g/kg MS para plantas adultas de *T. diversifolia* (hojas y peciolos), y un contenido bajo de saponinas (2.50 mm de altura en espuma). Aunque el impacto nutricional de los taninos depende también de su peso molecular y composición monomérica (Barahona 1999), experimentos *in vivo* sugieren que el consumo de esta arbustiva no reduce de manera importante la emisión de metano entérico (Molina et al 2015). Quizás sería necesario alcanzar consumos en

altas cantidades de esta arbustiva (>30%) para lograr estos valores de taninos y ejercer efectos sobre CH₄ ruminal. Cardona-Iglesias et al (2017) encontraron reducción de metano cuando se incluyó *T. diversifolia* en estudios *in vitro*, aunque estos efectos podrán ser atribuibles a otros metabolitos secundarios.

Chagas-Paula et al (2012) encontraron que el género *Tithonia* es una fuente importante y natural de diversos productos, particularmente lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, flavonoides y saponinas, razón por la cual pueden modificar las poblaciones microbianas a nivel de rumen sin afectar la degradabilidad y aprovechamiento de los nutrientes en la dieta. En la Tabla 1, se presentan algunos metabolitos secundarios reportados por distintos autores para *T. diversifolia*.

Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en forraje de *T. diversifolia*.

Compuesto	Clase de compuesto	Compuesto	Clase de compuesto
Tagitinin C 2- metilbutirato ¹	Sesquiterpeno	Limonona ⁵	Terpeno
1 β -metoxidiversifolina ¹	Sesquiterpeno	Acetaldehído de benceno ⁵	Terpeno
2-O-Metiltagitininina B ¹	Sesquiterpeno	Terpinolona ⁵	Terpeno
Tagitinin H ²	Sesquiterpeno	Linalool ⁵	Terpeno
Tagitinin D ²	Sesquiterpeno	Pinocarvona ⁵	Terpeno
Hispidulin ²	Flavonoide	Mirtenol ⁵	Terpeno
Nepetin ²	Flavonoide	Cumin aldehído ⁵	Terpeno
Luteolin ²	Flavonoide	Alcanfor ⁵	Terpeno
Cymaroside ²	Flavonoide	Geranial ⁵	Terpeno
luteolin-3 -xyloside ²	Flavonoide	α-Copaeno ⁵	Terpeno
Vernodalol ²	Sesquiterpeno	α-Isocariofileno ⁵	Terpeno
Vernodalinol ²	Sesquiterpeno	Cariofileno ⁵	Terpeno
11,13- dihidrovernodalín ²	Sesquiterpeno	Eremofileno ⁵	Terpeno
Vernonioside B1 ²	Sesquiterpeno	Espatuleno ⁵	Terpeno
Vernonioside D ²	Sesquiterpeno	Cadalin ⁵	Terpeno
Vernocuminoside G ²	Sesquiterpeno	Ácido mirístico ⁵	Terpeno
Ácido lílico ³	Sesquiterpeno	Linoleato de metilo ⁵	Terpeno
Tagitinin E ³	Sesquiterpeno	Escualeno ⁵	Terpeno
3-O-Metiltirotundín ³	Sesquiterpeno	4,5-ácido dicafeoilquinico ⁶	Fenólico
Diversifolin ³	Sesquiterpeno	3,5-ácido dicafeoilquinico ⁶	Fenólico
Sobrerol ⁴	Monoterpeno	3,4-ácido dicafeoilquinico ⁶	Fenólico
2-heptanona ⁵	Terpeno	Tagitinin C ⁷	Sesquiterpeno
Canfeno ⁵	Terpeno	Tagitinin A ⁷	Sesquiterpeno
α-Pineno ⁵	Terpeno	Tirotundín ⁷	Sesquiterpeno
α-tujeno ⁵	Terpeno	Botcinin D ⁷	Sesquiterpeno
Benzaldehído ⁵	Terpeno	Tagitinin F ⁷	Sesquiterpeno
Sabineno ⁵	Terpeno	1β-hidroxidiversifolin-3-O-metil eter ⁷	Sesquiterpeno
2,3-octanodiona ⁵	Terpeno	2α-Hidroxitirotundina ⁷	Sesquiterpeno

Ambrosio et al (2008)¹; Green et al (2017)²; Kuroda et al (2007)³; Li et al (2013)⁴; Orsomandoa et al (2016)⁵; Pulido et al (2017)⁶; Zhao et al (2012)⁷.

Los taninos que son polifenoles de alto peso molecular tienen la capacidad para formar complejos con proteínas del alimento y microorganismo del rumen (Patra et al 2017). Los taninos se clasifican en hidrolizables (TH) y condensados (TC), y se han propuesto varios

mecanismos para explicar sus propiedades. Los efectos antimicrobianos de los compuestos fenólicos están relacionados con la inhibición de las enzimas bacterianas, como celulasas, xilanasas, pectinasas, lactasas (Barahona et al 2016); las alteraciones en la permeabilidad de las paredes celulares que reaccionan con iones de calcio de la pared celular; la inhibición de permeasas del periplasma involucradas en el transporte de aminoácidos y carbohidratos, la reducción de la tensión superficial; y la quelación de minerales esenciales, particularmente hierro con un deterioro del sistema metabólico oxidativo microbiano (Patra et al 2017).

Por otro lado, las saponinas son glúcidos de alto peso molecular formados de una aglicona (hidrófoba) y un sacárido hidrófilo (Sparg et al 2004). Las plantas que contienen saponinas no tienen un solo compuesto, sino una mezcla compleja, lo que influye en sus propiedades (Apráez et al 2017). Al igual que los taninos, las saponinas poseen gran actividad antibacteriana, relacionada con cambios en la permeabilidad de la célula (Patra y Saxena 2009; Knapp et al 2014). Las saponinas tienen un efecto significativo en la disminución o eliminación de los protozoos del rumen sin inhibir la actividad bacteriana, esto debido a que interactúan con el colesterol presente en la membrana celular de eucariotas, pero no en las células procariotas (Katakura et al 2005).

Los flavonoides también son importantes debido a su amplia gama de actividades biológicas y en particular las propiedades antimicrobianas. Los flavonoides se clasifican en compuestos polifenólicos y en las plantas están generalmente presentes en la forma de glucósidos con la aglicona unida a un azúcar variable por un enlace β -glucosídico, principalmente en la posición 3 del anillo C (Crozier et al 2007). La presencia del azúcar reduce la bioactividad del flavonoide y, por tanto, su eliminación no sólo mejora las propiedades funcionales del flavonoide, sino que también mejora la biodisponibilidad. Estos compuestos generalmente actúan contra los microorganismos a través de la inhibición de la función de la membrana citoplásmica, la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, o la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Cushnie y Lamb 2005).

Los efectos de los aceites esenciales (terpenos, terpenoides) varían dependiendo de su composición química, y el mismo extracto puede tener efectos estimulantes o inhibidores cuando se obtienen de diferentes especies de plantas (Patra y Saxena 2009). Debido a la variedad de compuestos implicados, existen una serie de mecanismos químicos por los cuales el crecimiento bacteriano es inhibido por los aceites esenciales (Calsamiglia et al 2007). Por ejemplo, el carvacrol actúa como un portador transmembrana de cationes monovalentes intercambiando un protón hidroxilo (del grupo fenólico) por un catión como K^+ , reduciendo así la síntesis de ATP y causando la muerte celular (Busquet et al 2006). Los aceites esenciales también pueden reducir la actividad peptidolítica de las bacterias ruminales (Busquet et al 2006) e inhiben efectivamente el crecimiento de las bacterias

ruminales implicadas en la producción de amoníaco, causando así la inhibición de la desaminación de aminoácidos (McIntosh et al 2003). Los aceites esenciales y sus constituyentes también interactúan con la membrana bacteriana, causando trastornos a través de productos lipofílicos. Estas perturbaciones conducen a la expansión de la membrana, al aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana, a la alteración de las proteínas embebidas en la membrana, a la inhibición de la respiración y a la alteración de los procesos de transporte iónico en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Nazzarro et al 2013).

Composición proximal de *T. diversifolia* y sus efectos en poblaciones microbianas de rumen

En *T. diversifolia* los bajos tenores de FDA (<40%) y FDN (<50%), sus contenidos intermedios de carbohidratos solubles (>12%), su aceptable degradabilidad (>60%) y altos contenidos de PC (>20%), se perfilan como las principales características nutricionales para disminuir la emisión de CH₄ a nivel ruminal. Yan et al (2006) reportaron que disminuir en 1% los contenidos de FDN y FDA, reduce en 2.01 y 2.26 l CH₄ por kg de materia seca consumida (MSC), respectivamente. Estos mismos autores coinciden igualmente que por cada 1% que aumente la proteína, el metano disminuye en 6.22 l/kg de MSC. De igual forma, el consumo de praderas menos lignificadas tiene un claro efecto en la digestibilidad ruminal y la tasa de pasaje (O` Mara 2004). Estudios desarrollados por Blaxter y Clapperton (1965) reportaron que al disminuir la digestibilidad de los forrajes de 75 a 55%, la emisión de metano puede aumentar de 306 a 499 g/día. Los valores de degradabilidad relativamente altos de *T. diversifolia* (cerca al 65%) contribuyen a la menor emisión de CH₄.

Según el análisis proximal de *T. diversifolia*, su contenido de MS es mayor del 15%, lo cual, combinado con el alto contenido de proteína y bajo contenido de FDN y FDA puede influir en la disminución de emisiones de CH₄. Esto se da al aumentar la PC de la dieta (se aumentaría un 1.50% con pasturas del 9% de PC y 23% en *T. diversifolia*), mejorar las tasas de pasaje por su disposición física en rumen y por la disminución del FDN y FDA total de la dieta (se pasaría de 65 a 60% la FDN en la dieta total con contenidos de 65% y 50% para alguna pastura tropical y Tithonia, respectivamente). En la Tabla 2 se presenta el análisis químico de *T. diversifolia* bajo distintas condiciones agroecológicas.

Tabla 2. Composición química y proximal de *T. diversifolia* bajo diferentes condiciones edafoclimáticas.

MS	PC	FDN	FDA	Ca	P	Mg	Cen	EE	Lig	Cel	Hem	Referencia
19.10	24.1	38.6	34.5	-	-	-	-	-	-	-	-	Naranjo y Cuartas, (2011) ¹
	25.4	25.2	23.5	2.22	0.29	-	-	-	-	-	-	Rivera et al., (2015) ²

17.90	21.1	29.4	23.3	2.63	0.29	-	16.0	-	-	-	-	Rivera <i>et al.</i> , (2013) ³
12.90	12.7	50.2	48.9	-	-	-	-	-	-	-	-	Gallego-Castro <i>et al.</i> , (2017) ⁴
10.13	21.9	-	-	1.91	-	0.065	13.3	-	-	-	-	Lezcano <i>et al.</i> , (2012) ⁵
12.78	19.1	-	-	3.14	-	0.063	12.5	-	-	-	-	Lezcano <i>et al.</i> , (2012) ⁶
19.77	28.9	43.7	27.7	-	-	-	-	-	6.62	21.1	15.9	Verdecia <i>et al.</i> , (2011) ⁷
18.21	27.5	40.4	24.1	-	-	-	-	-	7.15	16.9	16.3	Verdecia <i>et al.</i> , (2011) ⁸
11.24	18.3	38.4	-	-	-	-	21.9	-	-	-	-	La O <i>et al.</i> , (2012) ⁹
16.30	29.4	49.1	46.1	2.35	0.60	-	15.1	1.60	-	-	-	Rivera <i>et al.</i> , (2017) ¹⁰
-	17.2	39.1	27.2	0.83	0.35	-	12.5	1.10	-	-	-	Cardona-Iglesias <i>et al.</i> , (2017) ¹¹
20.00	16.5	47.6	33.3	-	-	-	-	1.57	13.4	26.8	14.3	Ferreira <i>et al.</i> , (2016) ¹²

MS: materia seca; PC: proteína cruda; FDN: fibra en detergente neutra; FDA: fibra en detergente ácida; Ca: calcio; P: fósforo; Mg: magnesio; Cen: cenizas; EE: extracto etéreo; Lig: lignina; Ce: celulosa; Hem: hemicelulosa; (1) Foliolo y pecíolo de varias edades provenientes de un banco forrajero; (2) Material de 40 días de edad incluyendo hojas y tallos tiernos en Ultisoles; (3) Material de 50 días de edad incluyendo hojas y tallos tiernos; (4) Material de 56 días de edad y utilizando toda la planta para el análisis; (5) Material con 60 días de edad, en época de lluvias y teniendo en cuenta hojas y tallos tiernos; (6) Material con 60 días de edad, en época seca y teniendo en cuenta hojas y tallos tiernos; (7) Material con 60 días de edad y en época de lluvias; (8) Material con 60 días de edad y en época de pocas lluvias; (9) Material de 77 días de edad de un suelo ferralítico rojo típico (Hernández et al 1999) y usando hojas y tallos tiernos; (10) Promedio de 16 materiales con una edad de 40 días, establecidos en diferentes condiciones ambientales y utilizando sólo las hojas; (11) Material de 70 días de edad asociado a *Cenchrus clandestinus*; (12) Material de 90 días de edad en oxisoles y tomando hojas y tallos tiernos.

T. diversifolia en la producción animal y su diversidad

Los trabajos revisados fueron desarrollados en Cuba, Colombia, México y África, e incluyeron temas como diversidad genética, dinámica de fermentación, compuestos fitoquímicos, respuesta al pastoreo, degradabilidad, características morfológicas, composición química, producción de gases, degradabilidad y germinación de la semilla de diferentes ecotipos de *T. diversifolia* (Ruiz et al 2010; La O et al 2012; Ruiz et al 2013a; Ruiz et al 2013b; Velasco et al 2014; Holguín et al 2015; Florence et al 2015; Ruiz et al 2016; Del Val et al 2017; Rivera et al 2017). Como se puede observar en la Tabla 3, las características morfológicas y la composición bromatológica pueden variar entre procedencias.

Tabla 3. Diferencias encontradas en algunos parámetros morfológicos y químicos en distintos ecotipos de *T. diversifolia* evaluados en Cuba

Parámetro evaluado	Material								
	3	5	6	10	13	17	23	24	25
Germinación a los 7 días (%) ¹	13.5	16.5	39.1	2.02	42.0	72.5	9.50	14.5	23.5
Germinación a los 28 días (%) ¹	15.5	17.5	43.0	6.50	74.0	77.5	20.0	28.0	73.0
Consumo bajo ramoneo como % del total ofertado ²	24.0	26.5	22.5	30.5	29.8	8.80	38.1	17.3	22.0
Número de hojas/tallo en época de lluvias ²	12	14	11	15	13	13	17	14	13
Peso de las hojas en época de lluvias (g de MS) ²	10.5	9.02	7.50	9.03	6.50	6.03	14.5	10.0	10.1

Número de hojas/tallo en época con pocas lluvias²	8	8	7	7	5	3	6	7	6
Peso de las hojas en época con pocas lluvias (g de MS)²	3.50	2.02	2.50	2.00	1.50	2.50	1.50	2.03	1.50
Altura del tallo (cm)*³	250	250	160	250	200	190	250	250	200
Altura de la primera hoja verde (cm)*₃	160	160	100	160	125	140	160	160	125
Grosor del tallo (mm)*³	210	210	240	210	255	260	210	210	255
Peso de la planta a las 6 semanas (g de FV)⁴	-	200	95.0	105	-	35.0	-	-	-
-Peso de la planta a las 8 semanas (g de FV)⁴	-	240	110	135	-	40.3	-	-	-
Peso de la planta a las 12 semanas (g de FV)⁴	-	255	135	145	-	48.5	-	-	-
Humedad (%)⁵	11.2	10.9	11.6	11.1	11.1	11.8	10.8	11.3	11.2
Cenizas (%)⁵	21.9	21.1	17.7	20.2	16.8	16.1	19.1	19.1	17.5
Materia orgánica (%)⁵	78.1	79.8	82.3	79.8	83.1	83.9	80.9	80.8	82.5
Extracto etéreo (%)⁵	1.11	1.31	0.91	1.35	2.05	1.49	1.25	1.22	1.12
Proteína cruda (%)⁵	18.3	19.2	23.6	19.9	25.9	26.4	24.6	20.8	20.8
FDN (%)⁵	38.4	34.1	37.6	36.2	32.6	37.4	38.3	41.8	38.5
FDA (%)⁵	15.6	15.8	19.8	15.5	17.8	17.9	14.8	16.5	19.9
Hemicelulosa (%)⁵	22.7	18.2	17.7	20.7	14.8	19.5	23.5	25.3	18.6
Celulosa (%)⁵	12.9	13.1	15.9	12.6	14.5	14.5	12.1	13.3	15.9
Silica (%)⁵	0.62	0.54	0.79	0.61	0.62	0.53	0.63	0.69	0.64
Lignina (%)⁵	2.14	2.21	3.11	2.30	2.71	2.90	2.02	2.48	3.34
DAIVMS (%)⁵	73.9	76.9	75.5	73.25	79.8	76.3	78.3	72.2	74.6
DVIVMS (%)⁵	83.6	83.9	81.4	83.4	84.4	83.3	85.7	83.4	81.2
DAIVMO (%)⁵	57.7	61.5	62.1	58.5	66.3	64.1	63.4	58.4	61.5
DVIVMO (%)⁵	65.3	67.1	67.1	66.6	70.2	69.9	69.3	67.4	66.9
DAIVFDN (%)⁵	28.4bc	26.3a	28.4bc	26.5a	26.1a	28.5bc	30.1c	30.2c	28.7bc
DVIVFDN (%)⁵	32.1c	28.6ab	30.6bc	30.2b	27.6a	31.2b	32.8c	34.8d	31.2bc
DAIVFDA (%)⁵	11.5a	12.2a	14.9b	11.3a	14.2b	13.6b	11.6a	11.9a	14.8b
DVIVFDA (%)⁵	13.2a	13.3a	16.1c	12.9a	15.1bc	14.9bc	12.6a	13.7a	16.1c
Efecto sobre bacterias metanogénicas (10⁹ ufc/ml)- Control	23.5	21.3	-	16.2	20	19.4	12.5	22.5	20.2
27.7⁶									
a (%)⁵	2.27	10.2	24.9	1.57	25.4	9.17	6.33	1.95	14.8
b (%)⁵	95.5	89.3	63.9	89.1	58.2	78.3	88.7	89.2	73.9
a+b (%)⁵	97.8	99.5	88.8	90.7	83.6	87.5	95.1	91.3	88.8
c⁵	0.13	0.39	0.09	0.17	0.11	0.13	0.15	0.18	0.17
k (0.01)⁵	81.6	73.6	82.9	82.8	79.2	82.7	82.1	86.5	84.9
k (0.02)⁵	75.8	68.2	78.1	78.5	75.3	78.1	76.6	82.3	81.4
k (0.03)⁵	70.8	63.1	73.8	74.7	92.1	73.9	71.6	78.5	78.2
k (0.04)⁵	66.3	58.3	70.3	71.2	69.1	70.4	67.2	75.1	75.3
k (0.05)⁵	62.3	53.6	67.2	68.2	66.5	67.1	63.1	71.9	72.6

*Resultados de un análisis de conglomerado (valores promedio); MS: materia seca; FV: forraje verde; FDN: fibra de detergente neutra; FDA: Fibra en detergente ácida; DAIVMS: digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca ; DVIVMS: digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca ; DAIVMO: digestibilidad aparente *in vitro* de la materia orgánica; DVIVMO: digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia orgánica; DAIVFDN: digestibilidad aparente *in vitro* de la FDN; DVIVFDN: digestibilidad verdadera *in vitro* de la FDN; DAIVFDA: digestibilidad aparente *in vitro* de la FDA; DVIVFDA: digestibilidad verdadera *in vitro* de la FDA; ufc: unidades formadoras de colonias; a: fracción rápidamente degradable; b: fracción potencialmente degradable ; a+b: fracción total degradable ; c: tasa constante de degradación; k: tasa fraccional de pasaje ruminal. Ruiz et al (2010a)¹; Ruiz et al (2013a)²; Ruíz et al (2010)³; Ruíz et al (2012a; 2013)⁴; La O et al (2012)⁵; Galindo et al (2010)⁶.

Ruiz et al (2013b) informaron sobre diversas líneas de *T. diversifolia* colectadas en Cuba que pueden ser pastoreadas por bovinos orientados a la producción de leche. Estos autores observaron que algunas no eran apetecibles para los animales (colectas 15, 20 y 28), mientras que las colectas 3, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 fueron las más pastoreadas (100%), junto a las líneas 1, 2, 5 y 6 con un 80% de remoción de follaje. De igual forma en Cuba, la capacidad de germinación de la semilla verdadera de 29 líneas evaluadas varió de 3 a 73% y se demostró que 12 de ellas tenían valores superiores al 28%. De manera general, el 72% de las líneas evaluadas tuvieron germinaciones mayores al 28% en los primeros 7 días y 50% en las primeras dos semanas (Ruiz et al 2017).

Con relación a la composición química de diferentes procedencias de *T. diversifolia* en Cuba, La O et al (2012) encontraron que la degradabilidad ruminal efectiva de la MS fluctuó entre 76.3 y 86.6%. Los valores de digestibilidad aparente *in vitro* de la MS (DAIVMS) estuvieron en el rango de 72.2 a 79.8%, y los de la digestibilidad aparente *in vitro* de la materia orgánica (DAIVMO) entre 57.7 y 66.2 %. Por su parte, las cifras de DVIVMS (digestibilidad verdadera) y DVIVMO oscilaron de 81.1 a 85.7%, y de 65.3 a 70.2% respectivamente, existiendo diferencias entre cada uno de los materiales vegetales por indicador ($p < 0.01$).

La diversidad genética de *T. diversifolia* ha sido poco estudiada. En México, se evaluaron 20 materiales mediante marcadores ISSR provenientes de ocho localidades y se obtuvieron un total de 157 bandas amplificadas de las cuales 33 fueron monomórficas y 124 polimórficas, lo que indicó un 79% de polimorfismo (Del Val et al 2017). El tamaño de los fragmentos de DNA producto de la PCR varió de 170 hasta 1450 pb, y se encontró gran variabilidad entre las procedencias estudiadas. De tal manera que no se encontró una relación significativa entre 10 muestras y sólo dos resultaron similares (hubo dos grupos a un nivel de similitud de 1.47). Por otro lado, Yang et al (2012), encontraron gran variabilidad genética en esta especie en cuatro regiones de China y dos en Laos. En esta investigación, los valores medios de Nei de diversidad genética (H) y el índice de Shannon de diversidad (I) fueron 0.294 y 0.431, respectivamente, demostrando amplia diversidad en materiales intra y entre poblaciones de *T. diversifolia* y sugiriendo gran adaptación a diversos ambientes.

Finalmente, en Colombia Holguín et al (2015) evaluaron la respuesta productiva forrajera de 44 introducciones de *T. diversifolia*, e identificaron ocho introducciones como las de mayor producción y de mejor calidad nutricional. Posteriormente, sólo cuatro fueron identificados como las más promisorias de acuerdo con un índice multicriterio (17.9; 22.1; 13.5 y 1.20). Además, concluyeron que el uso de índices integrales multicriterio facilita la selección de materiales rendidores, con base en diferentes criterios de adaptabilidad,

productividad y calidad de las especies. De acuerdo con estos estudios, existen múltiples diferencias entre materiales de *T. diversifolia* que obedecen a diferencias genéticas, razón por la cual es necesario identificar, caracterizar y seleccionar genotipos superiores dentro de esta especie, y llevar a cabo evaluaciones integrales multicriterio con el fin de optimizar su uso. Esto permitiría tener ecotipos adaptados a condiciones específicas de producción, con la capacidad de ofrecer mayor biomasa, mayor oferta de nutrientes y lograr una mayor persistencia en el tiempo.

Capacidad de *T. diversifolia* para acumular Nitrógeno y Fósforo

Los valores de PC como porcentaje de la materia seca (MS) en *T. diversifolia* son tan altos como los observados en algunas leguminosas tropicales como *Stylosanthes guianensis* (18.2 %, Morgado et al 2009), *Arachis pintoi* (19.7%, Khan et al 2013) y *Gliricidia sepium* (18.2%, Silva et al 2017), y son superiores a los observados en la mayoría de las gramíneas tropicales, como *Urochloa brizantha* (9.30%, Ribeiro et al 2016), *Cynodon plectostachyus* (9.23%, Montoya et al 2017) y *Megathyrsus maximus* (9.30%, Carvalho et al 2017). *T. diversifolia* se ha utilizado a través de experimentos como forraje de alta calidad que puede reemplazar concentrados en rumiantes o incrementar la producción animal cuando se ofrece en dietas basadas en pasturas tropicales (Ribeiro et al 2016).

Las plantas absorben el N disponible en el suelo a través de sus raíces en forma de amonio (NH_4^+) y nitratos (NO_3^-) (Santi et al 2013). Bajo condiciones naturales, algunos organismos procariotes son capaces de utilizar el N atmosférico a través de un proceso conocido como Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN), que es la conversión del N_2 atmosférico a NH_3 , una forma que puede ser utilizado por las plantas (Franche et al 2009). La propiedad de fijar N por las plantas vasculares se encuentra en dos grupos principales de bacterias no relacionadas filogenéticamente: los rizobios (*Alpha*-proteobacteria) que se asocian a leguminosas (Sprent y James 2007) y Frankia (Actinobacteria) que se asocian con un grupo más amplio de plantas (Vessey et al 2004). Otro grupo importante de bacterias fijadoras de N es el de las cianobacterias, encontradas en asociación con una gran variedad de plantas superiores e inferiores, hongos y algas (Meeks y Elhai 2002).

Entre los medios a través de los cuales *T. diversifolia* podría lograr valores altos de N se encuentran la simbiosis asociativa. La simbiosis asociativa se refiere a un mecanismo en una amplia variedad de especies fijadoras de N basado en la colonización por microorganismos de la superficie radicular de plantas no leguminosas. Entre éstos, se han identificado los endófitos fijadores de N y organismos diazótrofos libres (Baldani y Baldani 2005), además Jama et al (2000) destacan que esta especie posee gran

capacidad de recuperar nutrientes del suelo. En contraste con las endosimbiosis (proceso dado en leguminosas), estas bacterias no inducen estructuras diferenciadas en las raíces y, aunque las bacterias endofíticas invaden los tejidos vegetales, no pueden considerarse endosimbiontes que residen intracelularmente.

Las bacterias que colonizan la rizosfera se denominan rizobacterias, y las rizobacterias con efectos beneficiosos sobre el desarrollo de las plantas se denominan Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (RPCP) (Coats y Rumpho 2014). Cuando se encuentran en estrecha asociación con las raíces, suelen denominarse bacterias endófitas fijadores de N (Elmerich 2007). Por otro lado, las bacterias fijadoras de nitrógeno “diazótrofos libres” se han definido como bacterias detectadas en la superficie de plantas o internamente (Reinhold-Hurek y Hurek 2011).

Los diazótrofos endofíticos pueden tener una ventaja sobre los diazótrofos asociativos o libres de la superficie radicular, ya que colonizan el interior de las raíces de las plantas y pueden establecerse en nichos que proporcionan condiciones más apropiadas para la fijación eficaz del nitrógeno y posterior transferencia del N fijado a la planta huésped (Reinhold- Hurek y Hurek 2011). Se han identificado rizobacterias diazotróficas en varios géneros de proteobacterias alfa y beta, incluyendo *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbasprillum*, *Glucenobacter* y *Pseudomonas* (Richardson et al 2009). Entre estos, *Azoarcus* spp., *Herbasprillum seropedicae* y *Glucenobacter* son reconocidos como endófitos.

La interacción planta-bacteria tiene lugar en la rizósfera donde los RPCP son estimulados por los exudados radiculares de plantas no leguminosas como por ejemplo *T. diversifolia* (Compant et al 2010). La composición de los exudados radiculares depende del tipo de suelo, de la disponibilidad de nutrientes, del genotipo de la planta y de la etapa de crecimiento, así como del estrés biótico y abiótico ambiental (Abdel-Lateif et al 2012).

Las plantas emplean una variedad de estrategias para movilizar y adquirir fósforo inorgánico (Pi) del suelo, empleándolas simultáneamente para evitar la deficiencia de este elemento (Jain et al 2007). En respuesta a la deficiencia de P, las plantas pueden:

- (1) Por medio de sus raíces acidificar la rizosfera, secretar aniones orgánicos de bajo peso molecular y enzimas fosfatasas en el suelo para movilizar Pi, y de relacionarse con microorganismos para solubilizar P de forma libre;
- (2) Invertir una mayor proporción de su biomasa en el desarrollo del sistema de raíces;
- (3) Alterar la morfología del sistema de raíces, no sólo para explorar el volumen del suelo de manera más efectiva, sino también para explotar cualquier sitio localizado con una alta disponibilidad de Pi;
- (4) Aumentar la capacidad de las raíces para absorber Pi, acelerando la tasa de absorción desde la solución del suelo, y
- (5) Formar relaciones simbióticas con hongos micorrícicos para aumentar su capacidad de explorar el volumen del suelo y movilizar P de fuentes

orgánicas e inorgánicas remotas. A continuación, se describen algunas estrategias que *T. diversifolia* utiliza.

Según Karanja et al (2004), Cong y Merckx (2005) y Mwangi y Mathenge (2014) los siguientes mecanismos se presentan en *T. diversifolia*: (1) aumento del pH del suelo que conduce a una mayor solubilidad del fosfato (gran capacidad de secretar compuestos orgánicos para aprovechar el P del suelo); (2) aumento de la macroagregación y por lo tanto el aumento de la superficie específica que conduce a más sitios de adsorción para P y mayores tasas de difusión (aumento del sistema radicular y asociación con microorganismos micorrícicos); (3) aumento de las cargas negativas en la superficie del suelo y la reducción de las cargas positivas en la superficie del suelo para un aumento neto en la fuerza de repulsión hacia P y (4) la reducción de las concentraciones de Al y, por lo tanto, la absorción o precipitación del P.

Las raíces de las plantas pueden liberar protones (H^+) para acidificar la rizosfera y así facilitar el acceso a formas de P asimilables. Además, secretan aniones orgánicos de bajo peso molecular con diferentes niveles de eficacia para liberar P_i de los minerales del suelo (Delhaize et al 2007). Las raíces de las plantas también secretan enzimas en la rizosfera para liberar P_i de los compuestos orgánicos en el suelo. Estas enzimas incluyen fosfatasas ácidas y fitasas que hidrolizan fosfomonoésteres orgánicos, que son la forma dominante de P orgánico en el suelo, y apirasas y RNasas que hidrolizan los fosfodiésteres (Jain et al 2007). Según Barrios y Cabo (2004) este podría también ser un mecanismo usado por *T. diversifolia*.

En cuanto a los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSP), se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés *plant growth promotion rhizobacteria*). Estas bacterias son de vida libre en el suelo y son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento y desarrollo (Baldani y Baldani 2005). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) pertenecen al grupo de las PGPRs y son capaces de solubilizar fosfato inorgánico de diferentes compuestos, como son el fosfato bicálcico, fosfato tricálcico y rocas fosfóricas. En general existen 13 géneros de bacterias con la capacidad de solubilizar fosfato: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia* (Rodríguez y Fraga 1999). Se ha reportado al ácido glucónico como el agente más frecuente de solubilización de fosfato, el cual es producido por *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* y *Burkholderia cepacia* (Song et al 2008). Otro metabolito solubilizador de fosfato es el ácido 2-cetoglucónico, sintetizado por *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Bacillus firmus* y otras bacterias del suelo aún no identificadas (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria 2010).

Hasta el momento, se conocen otros ácidos orgánicos producidos por las BSP, los cuales dependen del tipo de suelo y la especie de la planta (se ha reportado diferencias entre genotipos en su capacidad de expresar ácidos orgánicos y acceder a diferentes formas de P mineral). Dentro de estos ácidos se destacan: oxálico (Kim et al 1997), cítrico, malónico, láctico, succínico, málico, oxalacético, acético, fórmico, isovalérico, fumárico, glicólico, adípico, indolacético, butírico e isobutírico (Jones et al 2003).

Otra respuesta de las plantas a un ambiente deficiente de P es la asignación de biomasa orientada al desarrollo de su sistema radicular, lo que aumenta la tasa de crecimiento de las raíces y el volumen de suelo que puede ser explorado (Hammond y White 2008). Para aprovechar los efectos locales de la secreción de aniones orgánicos y enzimas en la rizosfera, las plantas aumentan la longitud de la raíz en regiones con mayor disponibilidad de P. En respuesta a la deficiencia de P, las plantas producen preferentemente raíces en la capa superior del suelo, ya que el P se concentra a menudo cerca de la superficie, proliferan las raíces laterales en zonas ricas de P e incrementan la longitud y densidad de los pelos radicales para ampliar el área superficial efectiva del sistema radicular (Zhu et al 2005).

Finalmente, para aumentar su exploración del suelo, muchas plantas se asocian con hongos micorrícicos (Smith et al 2003). Esta asociación puede beneficiar a ambos organismos, ya que los hongos reciben C de las plantas y las plantas reciben P y otros elementos minerales de los hongos. Se estima que entre el 4% y el 20% del material fotosintético neto se transfiere de las plantas a sus socios fúngicos (Morgan et al 2005). Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son microorganismos del suelo que forman simbiosis con el 80% de las plantas terrestres, formando arbusculos, vesículas (en algunas especies) e hifas, dentro de las células corticales de las plantas que colonizan. Las hifas fúngicas aumentan el volumen de suelo explorado, aumentan el área superficial para la absorción de P_i , se extienden a los poros del suelo demasiado pequeños para que entren las raíces y, en algunos casos, hidrolizan compuestos orgánicos de P que las plantas no pueden (Morgan et al 2005). En consecuencia, las raíces de las plantas micorrícicas pueden adquirir entre tres y cinco veces más P_i que las de las plantas no micorrícicas cuando se cultivan en suelos con bajo P (Morgan et al 2005).

Conclusiones

T. diversifolia es un arbusto con diversas propiedades que la convierten en una planta idónea como alimento animal: bajos tenores de FDN (<45.0%) y FDA (<40.0%), valores iguales o superiores de PC que especies leguminosas (>20.0%), valores de fósforo y Ca superiores a los encontrados en pasturas tropicales y la presencia de compuestos fitoquímicos como taninos, flavonoides, aceites esenciales y saponinas. *T. diversifolia*

debido a su diversidad, cuenta con una amplia capacidad de adaptación, puede presentar asociaciones con otros microorganismos para mejorar su desempeño productivo y una selección. Así mismo el uso de materiales superiores de *T. diversifolia* puede incrementar su aprovechamiento y ser una herramienta viable en la búsqueda de sistemas más sostenibles en condiciones adversas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto *Ganadería Colombiana Sostenible*, financiado por el Departamento de Negocios, Energía y Estrategia Industrial del Reino Unido y el Fondo Mundial para el Medio Ambiente (GEF), así como a Colciencias en su convocatoria de Doctorados Nacionales 727 de 2015.

Bibliografía

- Abdel-Lateif K, Bogusz D and Hoher V 2012** The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signaling and Behavior*, 7, 636–641. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.20039>.
- Alcorces de Guerra N, Larez A and Mayz J 2007** Additions to the cytogenetic knowledge of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae). *Acta Botánica Venezuelica*, 30, 267–275.
- Ambrosio S R, Oki Y, Heleno V C G, Chaves J S, Nascimento P G P D, Lichston J E, Constantino M G, Varanda E M and Da Costa F B 2008** Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry*, 69, 2052–2060.
- Apréaz G, Gálvez A L y Navia JF 2017** Evaluación nutricional de arbóreas y arbustivas de bosque muy seco tropical (bms- T) en producción bovina. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 98-107. <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/3424/4152>.
- Baldani J I and Baldani V L D 2005** History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77, 549–579. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652005000300014.
- Banik B K, Durmic Z, Erskine W, Ghamkhar K and Revell C 2013** In vitro ruminal fermentation characteristics and methane production differ in selected key pasture species in Australia. *Crop & Pasture Science*, 64, 935–942.
- Barahona R 1999** Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. PhD thesis. University of Reading, Reading, UK. 400 pp.

<https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57a08d70ed915d622c0019c5/R6421c.pdf>.

- Barahona R, Sánchez S, Lascano C E, Owen E, Morris P and Theodorou M K 2006** Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 281-288.
- Barrios E and Cobo J G 2004** Plant growth, biomass production and nutrient accumulation by slash/mulch agroforestry systems in tropical hillsides of Colombia. *Agroforestry Systems*, 60 (3), 255- 265.
- Bhatta R, Saravanan M, Baruah L, Sampath K T and Prasad C S 2013** Effect of plant secondary compounds on in vitro methane, ammonia production and ruminal protozoa population. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 455-65.
- Blaxter K L and Clapperton J L 1965** Prediction of amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition*, 19 (1), 511-522.
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A and Kamel C 2006** Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *British Journal of Nutrition*, 89, 761–771.
- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo P W, Castillejos L and Ferret A 2007** Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Dairy Science*, 90, 2580–2595.
- Cardona-Iglesias J L, Mahecha-Ledesma L y 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. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/25697/28748>.
- Carvalho A L S, Martuscello J A, Almeida O, Braz T, Cunha D, Figueiredo V and Jank L 2017** Production and quality of Mombaça grass forage under different residual heights. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 39(2), 143- 148. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86722017000200143.
- Chagas-Paula D A, Oliveira R B, Rocha B A and Da Costa F B 2012** Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*, 9, 2010–2234.
- Coats V C and Rumphom M E 2014** The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Frontiers in Microbiology*, 5, 368- 378. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4107844/>.
- Compant S, Clément C and Sessitsch A 2010** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669–678.
- Cong P H and Merck R 2005** Improving phosphorus availability in two upland soils of Vietnam using *Tithonia diversifolia* H. *Plant and Soil*, 269, 11–23.

- Crozier A, Jaganath I B and Clifford M N 2007** Phenols, polyphenols and Tannins: an overview. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds). *Plant Secondary Metabolites*, Blackwell Publishing, Oxford, UK 1- 24 pp. https://www.researchgate.net/publication/228035536_Phenols_Polyphenols_and_Tannins_An_Overview.
- Cushnie T P T and Lamb A J 2005** Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5), 343–356. [https://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(05\)00255-4/fulltext](https://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(05)00255-4/fulltext).
- Delhaize E, Gruber B D and Ryan P R 2007** The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Lett*, 581, 2255–2262. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2007.03.057>.
- Del Val R, Miranda J M, Flores M X, Gómez J M, Solorio B, Solorio F J y González S 2017** Diversidad genética de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray de Michoacán: Análisis con marcadores de ADN-SSR. *Reaxion: Ciencia y tecnología universitaria*, 4 (3), 9 - 14. http://reaxion.utleon.edu.mx/Art_Diversidad_genetica_de_Tithonia_diversifolia_Hemsl_gray_de_Michoacan_analisis_con_marcadores_de_ADN-SSR.html.
- Ejelonua O C, Elekofehintia O O and Adanlawob I G 2017** *Tithonia diversifolia* saponin-blood lipid interaction and its influence on immune system of normal wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 589–595.
- Elmerich C 2007** Historical perspective: from bacterization to endophytes. In: Elmerich, C., Newton, W.E. (eds). *Associative and endophytic nitrogenfixing bacteria and cyanobacterial associations*. Dordrecht, The Netherlands 1–20.
- Ferreira L H, Ribeiro R S, Silveira S R, Delarota G, Freitas D S, Sacramento J P, Paciullo D S and Maurício R M 2016** Potencial forrageiro da *Tithonia diversifolia* para alimentação de ruminantes. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 28, Article #17 Retrieved November 18, from <http://www.lrrd.org/lrrd28/2/ferr28017.html>.
- Florence A B, Léon W E and Félix T Z 2015** Chemical Variability of *Tithonia Diversifolia* (Hemsl.) A. Gray Leaf and Stem oil from Côte D'ivoire. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (5): 2214-2222. <http://ijpsr.com/bft-article/chemical-variability-of-tithonia-diversifolia-hemsl-a-gray-leaf-and-stem-oil-from-cote-divoire/>.
- Franché C, Lindstrom K and Elmerich C 2009** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321: 35–59. https://www.researchgate.net/publication/225535435_Franche_C_Lindstrom_K_Elmerich_C_Nitrogen-fixing_bacteria_associated_with_leguminous_and_non-leguminous_plants_Plant_and_Soil_321_35-59.
- Galindo J, González N, Marrero Y, Sosa A, Ruiz T, Febles G, Torres V, Aldana A I, Achang G, Moreira O, Sarduy L and Noda A C 2014** Effect of tropical plant foliage

- on the control of methane production and in vitro ruminal protozoa population. Cuban Journal of Agricultural Science, 48 (4), 359 – 364. <http://cjasience.com/index.php/CJAS/article/view/564>.
- Gallego-Castro L, Mahecha-Ledesma L y Angulo-Arizala J 2017** Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray bajo tres sistemas de siembra en el trópico alto. Agronomía Mesoamericana, 28 (1), 213-222. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v28n01_213.pdf.
- Green P W C, Belmain S R, Ndakidemiclain P A, Farrell I W and Stevenson P C 2017** Insecticidal activity of *Tithonia diversifolia* and *Vernonia amigdalina*. Industrial Crops and Products, 110, 15-21.
- Hahn-von-Hessberg C M, Grajales-Quintero A y Narváez-Solarte W 2016** Coeficiente de Digestibilidad Aparente de Plantas Forrajeras Comunes en Zona Andina para Alimentación de Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*). Información Tecnológica, 27(4), 63-72. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v27n4/art07.pdf>.
- Hammond J P and White P J 2008** Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. Journal of Experimental Botany, 59, 93–109. <https://academic.oup.com/jxb/article/59/1/93/430725>.
- Holguín V A, Ortíz S, Velasco A and Mora J 2015** Evaluación multicriterio de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en Candelaria, Valle del Cauca. Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 62(2), 57-72. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remezvez/article/view/51995/53619>.
- Jain A, Vasconcelos M J, Raghothama K G and Sahi S V 2007** Molecular mechanisms of plant adaptation to phosphate deficiency. Plant Breeding Reviews, 29, 359–419.
- Jama B, Palm C A, Buresh R J, Niang A, Gachengo C, Nziguheba G and Amadalo B 2000** *Tithonia diversifolia* as a green manure for soil fertility improvement in western Kenya: A review. Agroforestry Systems, 49, 201–221.
- Jones D L, Dennis P G, Owen A G and van Hess P A W 2003** Organic acid behavior in soils-misconceptions and knowledge gaps. Plant Soil, 248, 31-41.
- Karanja N K, Gachene C K, Savini I and Smithson P C 2004** The effect of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray biomass on the solubility of rock phosphates: a laboratory incubation experiment. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 4, 75 – 83. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93940203>.
- Katakura K, Suzuki M, Kobayashi S and Chairul T 2005** Evaluation of the inhibitory activities of the extracts of Indonesian traditional medicinal plants against *Plasmodium falciparum* and *Babesia gibsoni*. Journal of Veterinary Medical Science, 67, 829–831.
- Khan M T, Khan N A, Bezabih M, Qureshi M S and Rahman A 2013** The nutritional value of peanut hay (*Arachis hypogaea* L.) as an alternate forage source for sheep. Tropical Animal Health and Production, 45, 849–853.

- Kim K Y, Jordan D and Krishnan H B 1997** *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters*, 153, 273-277.
- Kim E T, Min K S, Kim C H, Moon Y H, Kim S C and Lee S S 2013** The Effect of Plant Extracts on In-vitro Ruminant Fermentation, Methanogenesis and Methane-related Microbes in the Rumen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(4), 517–522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093393/pdf/ajas-26-4-517-9.pdf>.
- Knapp J R, Laur G L, Vadas P A, Weiss W P and Tricarico J M 2014** Invited review: enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*, 97, 3231-3261. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(14\)00289-6/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(14)00289-6/fulltext).
- Kuroda M, Yokosuka A, Kobayashi R, Jitsuno M, Kando H, Nosaka K, Ishii H, Yamori T and Mimaki Y 2007** Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55, 1240–1244.
- La O O, González H, Orozco A, Castillo Y, Ruiz O, Estrada A, Ríos F, Gutiérrez E, Bernal H, Valenciaga D, Castro BI y 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. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46 (1), 57 – 53. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193024313008>.
- Lezcano Y, Soca M, Sánchez L, Ojeda F, Olivera Y, Fontes D, Montejo I y Santana H 2012** Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.). *Pastos y Forrajes* 35: 283-291. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000300004.
- Lezcano-Más Y, Soca-Pérez M, Roque-López E, Ojeda-García F, Machado-Castro R y Fontes-Marrero D 2016** Forraje de *Tithonia diversifolia* para el control de estrongílicos gastrointestinales en bovinos jóvenes. *Pastos y Forrajes*, 39(2), 133-138. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942016000200008.
- Li X, Huang G, Zhao G, Chen W, Li J and Sun L 2013** Two new monoterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. *Records of Natural Products* 7: 351–354. <https://pdfs.semanticscholar.org/75a7/880065889421a483b9607e98e66bfdcca3e0.pdf>.
- Lifongo L L, Simoben C V and Ntie-Kang F 2014** A bioactivity versus ethnobotanical survey of medicinal plants from Nigeria, West Africa. *Natural Products and Bioprospecting* 4: 1–19.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3956980/pdf/13659_2014_Article_5.pdf.

- Mauricio R M, Calsavara L H F, Ribeiro R S, Pereira L G R, Freitas D S, Paciullo D S, Barahona R, Rivera J E, Chará J and Murgueitio E 2017** Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(4), 00146. <http://medcraveonline.com/JDVAR/JDVAR-05-00146.php>.
- McIntosh F M, Williams P, Losa R, Wallace R J, Beever D A and Newbold C J 2003** Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5011–5014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC169102/pdf/0337.pdf>.
- Meeks J C, Elhai J 2002** Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 94–121. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120779/pdf/0002.pdf>.
- Miranda M A, Varela R M, Torres A, Molinillo J M G, Gualtieri S C J and Macias F A 2015** Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Natural Products*, 78, 1083–1092.
- Molina I C, Donneys G, Montoya S, Villegas G, Rivera J E, Chará J, Lopera J J y Barahona R 2015** Emisiones in vivo de metano en sistemas de producción con y sin inclusión de *Tithonia diversifolia*. 3^{er} Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles y VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, pp. 678-682.
- Montoya E, Barahona R and Chará J 2017** The nutritional balance of early lactation dairy cows grazing in intensive silvopastoral systems. *Ciência Animal Brasileira*, 18, 1-12. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912017000100218.
- Morgado E, Almeida F, Silva V P, Gomes A, Galzerano L, Torres H y Rodrigues L M 2009** Digestão dos carboidratos de alimentos volumosos em equinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(1), 75-81. <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v38n1/a10v38n1.pdf>.
- Morgan J A W, Bending G D and White P J 2005** Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1729–1739. <https://academic.oup.com/jxb/article/56/417/1729/484470>.
- Mustonen P S J, Oelbermann M and Kass D C L 2015** Biomass production and phosphorus use efficiency in two *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 38, 1083–1096.
- Mwangi P M and Mathenge P W 2014** Comparison of tithonia (*Tithonia diversifolia*) green manure, poultry manure and inorganic sources of nitrogen in the growth of kales (*Brassicae oleraceae*) in Nyeri county, Kenya. *African Journal of Food*,

- Agriculture, Nutrition and Development, 14 (3), 8791- 8808.
<https://www.ajol.info/index.php/ajfand/article/view/104794/94832>.
- Naranjo J F y Cuartas C 2011** Caracterización nutricional y de la cinética de degradación ruminal de algunos de los recursos forrajeros con potencial para la suplementación de rumiantes en el trópico alto de Colombia. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, 6(1), 9-19. <http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428105002.pdf>.
- Nash D 1976** Flora de Guatemala. Fieldiana, Botánica, 24(12), 323-325.
- Naumann H D, Tedeschi L O, Zeller W E and Huntley N F 2017** The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. Revista Brasileira de Zootecnia, 46(12), 929-949.
<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v46n12/1806-9290-rbz-46-12-0929.pdf>.
- Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R and De Feo V 2013** Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals, 6 (12), 1451–1474.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873673/pdf/pharmaceuticals-06-01451.pdf>.
- O'Mara F 2004** Greenhouse gas production from dairying: Reducing methane production. Advances in Dairy Technology, 16, 295-309.
<http://www.dairyweb.ca/Resources/WCDS2004/OMara2.pdf>.
- Obukohwo E and Umar B 2014** Seed Production, Germination, Emergence and Growth of *Tithonia diversifolia* (HEMSL) A. Gray as Influenced by Different Sowing Depths and Soil Types. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 14 (5), 440-444. [https://www.idosi.org/aejaes/jaes14\(5\)14/9.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes14(5)14/9.pdf).
- Oludare A and Muoghalu J I 2014** Impact of *Tithonia diversifolia* (Hemsly) A. Gray on the soil, species diversity and composition of vegetation in Ile-Ife (Southwestern Nigeria), Nigeria. International Journal of Biodiversity and Conservation, 6, 555-562.
http://www.academicjournals.org/article/article1408094887_Oludare%20and%20%20Muoghalu.pdf.
- Orsomando G, Agostinelli S, Bramucci M, Cappellacci L, Damiano S, Lupidi G, Maggi F, Ngahang S L, Biapa PC, Papa F, Petrelli D, Quassinti L, Sorci L, Vitali L A and Petrelli R 2016** Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) volatile oil as a selective inhibitor of *Staphylococcus aureus* nicotinate mononucleotide adenyltransferase (NadD). Industrial Crops and Products, 85, 181-189.
https://www.researchgate.net/publication/297880352_Mexican_sunflower_Tithonia_diversifolia_Asteraceae_volatile_oil_as_a_selective_inhibitor_of_Staphylococcus_aureus_nicotinate_mononucleotide_adenyltransferase_NadD.
- Osuga I, Abdulrazak S, Muleke C and Fujihara T 2012** Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya. Journal of the Science of Food and Agriculture, 10, 632-635. <http://ir->

library.ku.ac.ke/bitstream/handle/123456789/7810/Potential%20nutritive%20value%20of%20various%20parts%20of%20wild%20sunflower.pdf?sequence=4&isAllowed=y.

- Paredes-Mendoza M y Espinosa-Victoria D 2010** Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28 (1), 61-70. <http://www.redalyc.org/pdf/573/57316076007.pdf>.
- Patra A K and Saxena J 2009** Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton van Leeuwenhoek*, 96, 363–375. https://www.researchgate.net/publication/26652343_Dietary_phytochemicals_as_rumen_modifiers_A_review_of_the_effects_on_microbial_populations.
- Patra A, Park T, Kim M and Yu Z 2017** Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(13). <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>.
- Pulido K D P, Dulcey A J C and Martinez J H I 2017** New caffeic acid derivative from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray butanolic extract and its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 109 (2), 1079-1085.
- Santacoloma L y Granados J 2012** Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(1), 53-62. <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/934/933>.
- Smith S E, Smith F A and Jakobsen I 2003** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology*, 133, 16–20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1540331/pdf/hw0016.pdf>.
- Sparg S, Light G and Staden M 2004** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- Reinhold-Hurek B and Hurek T 2011** Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 435–443.
- Richardson A E, Barea J M, McNeill A M and Prigent-Combaret C 2009** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321, 111–117.
- Ribeiro R S, Terry S A, Sacramento J P, Rocha S, Bento C B, Silva E F, Montovani H C, Gama M A, Pereira L G, Tomich T R, Mauricio R M and Chaves A 2016** *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *PLoS ONE*, 11(12): e0165751. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0165751>.
- Rivera J E, Naranjo J F, Cuartas C A y Arenas F A 2013** Fermentación in vitro y composición química de algunos forrajes y dietas ofrecidas bajo un Sistema Silvopastoril en el trópico de altura. *Livestock Research for Rural Development*.

- Volume 25, Article #174. Retrieved November 18, 2018, from <http://www.lrrd.org/lrrd25/10/rive25174.htm>.
- Rivera J E, Cuartas C A, Naranjo J F, Tafur O, Hurtado E A, Arenas F A, Chará J y Murgueitio E 2015** Efecto de la oferta y el consumo de *Tithonia diversifolia* en un sistema silvopastoril intensivo (SSPi), en la calidad y productividad de leche bovina en el piedemonte Amazónico colombiano. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 27, Article #189. Retrieved November 18, 2018, from <http://www.lrrd.org/lrrd27/10/rive27189.html>.
- Rivera J E, Gómez-Leyva J F, Castaño K, Morales J G, Chará J and Barahona R 2017** Diversidad molecular, química y morfológica en materiales de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray para la alimentación animal en Colombia y México. IX Congreso Internacional Sobre Sistemas Silvopastoriles. 249 – 255 pp.
- Rivera-Herrera J E, Molina-Botero I, Chará J, Murgueitio-Restrepo E and Barahona-Rosales R 2017** Intensive silvopastoral systems with *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit: productive alternative in the tropic in view of the climate change. *Pastos y Forrajes*, 40(3), 171-183. http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v40n3/en_pyf01317.pdf.
- Rodríguez H and Fraga R 1999** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339.
- Ruíz T E, Febles G, Torres V, González J, Achan G, Sarduy L y Díaz H 2010** Evaluación de materiales recolectados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la zona centro-occidental de Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44, 291 - 296. <http://www.redalyc.org/html/1930/193015664013/>.
- Ruíz T E, Torres V, Febles G, Díaz H y González J 2013a** Estudio del comportamiento de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* en relación con algunos componentes morfológicos. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 25, Article #154 Retrieved March 22, 2018, from <http://www.lrrd.org/lrrd25/9/ruiz25154.html>.
- Ruíz T E, Febles G, Díaz H, González J y Achang G 2013b** Evaluación en pastoreo de materiales vegetales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) colectados en Cuba. *Revista cubana Ciencia Agrícola*, 47, 305 – 309. <http://www.redalyc.org/pdf/1930/193029230015.pdf>.
- 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 GJ, Cino DM, Scull I y 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. <http://ww.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2016/sept/5.pdf>.
- Ruíz T E, Febles GJ, Alonso J, Crespo G and Valenciaga N 2017** Agronomy of *Tithonia diversifolia* in Latin America and the Caribbean region In: Savon L L, Gutierrez O,

- Febles F (Eds). Mulberry, moringa and tithonia in animal feed, and other uses. Results in Latin America and the Caribbean. ICA / EDICA. Cuba, 171 - 202 pp.
- Sánchez-Laiño A, Torres-Navarrete E D, Buste- Castro F, Barrera-Álvarez A and Sánchez-Torres J 2018** Tropical forages as a dietary alternative in fattening rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Acta Agronómica*, 67 (2), 333-338.
- Santi C, Bogusz D and Franche C 2013** Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111, 743–767. https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/59220/64296
- Schilling E E and Panero J L 2002** A revised classification of subtribe Helianthinae (Asteraceae: Heliantheae): I. Basal lineages. *Biological Journal of the Linnean Society*, 140, 65-76. <https://academic.oup.com/botlinnean/article/140/1/65/2433642>.
- Schultze-Kraft R, Rao I M, Peters M, Clements R J, Bai C and Liu G 2018** Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview. *Tropical Grasslands*, 6(1), 1–14. <http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/article/view/394/241>
- Silva S F, Carneiro M S, Edvan R L, Pereira E S, Neto L, Pinto A P and Camilo D 2017** Agronomic characteristics and chemical composition of *Gliricidia sepium* grown under different residual heights in different seasons. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(1), 35-42. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ciagr/v44n1/art04.pdf>.
- Song O R, Lee S J, Lee Y S, Lee S C, Kim K K and Choi Y L 2008** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by Burkholderia cepacia DA23 isolated from cultivated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 151-156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768359/pdf/bjm-39-151.pdf>.
- Sprent J I and James E K 2007** Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology*, 144, 575– 581. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1914177/pdf/pp1440575.pdf>.
- Terry S A, Ribeiro R S, Freitas D S, Delarota G D, Pereira L G, Tomich T R, Maurício R M and Chaves AV 2016** Effects of *Tithonia diversifolia* on *in vitro* methane production and ruminal fermentation characteristics. *Animal Production Science*, 56, 437-441.
- Vargas J, Cárdenas E, Pabón M y Carulla J 2012** Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Archivos de Zootecnia*, 61, 51-66. <http://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/2958/1728>.
- Velasco A, Holguín V A y Ortiz S 2014** Productividad de diferentes ecotipos de *Tithonia diversifolia* provenientes de la región cafetera y valle de rio cauca. *Agroforestería Neotropical*, 4, 35 - 39. <http://revistas.ut.edu.co/index.php/agroforesteria/article/view/399/332>.
- Verdecia D M, Ramírez J L, Leonard I, Álvarez Y, Bazán Y, Bodas R, Andrés S, Álvarez J, Giráldez F y López S 2011** Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una

zona del Valle del Cauca. Revista Electrónica de Veterinaria, 12(5), 1695-7504.
<http://www.redalyc.org/html/636/63622168004/>.

- Vessey J K, Pawlowski K and Bergman B 2004** Root-based N₂- fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, Parasponia and cycads. Plant Soil, 266, 205–230.
- Yan T, Mayne C S and Porter M G 2006** Effects of dietary and animal factors on methane production in dairy cows offered grass silage based diets. 2nd International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture, Switzerland, 1293, 123-126. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2006.02.024>.
- Yang J, Tang L, Guan Y and Sun W 2012** Genetic Diversity of an Alien Invasive Plant Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China. Weed Science, 60, 552–557. https://www.researchgate.net/publication/236627193_Genetic_Diversity_of_an_Alien_Invasive_Plant_Mexican_Sunflower_Tithonia_diversifolia_in_China.
- Zhao G, Li X, Chen W, Xi Z and Sun L 2012** Three new sesquiterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. Fitoterapia, 83, 1590–1597.
- Zhu J, Kaeppler S M and Lynch J P 2005** Topsoil foraging and phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*). Functional Plant Biology, 32, 749–762.

Capítulo 2. Diversidad genética de materiales de *Tithonia diversifolia*

Los resultados consignados en este segmento corresponden al capítulo 2 de la tesis, y serán sometidos como artículo científico en la revista *Genetic Resources and Crop Evolution* ISSN: 0925-9864 (Print) 1573-5109 (Online).

Diversidad genética, morfológica y química de colectas de *Tithonia diversifolia* para la alimentación animal

J.E. Rivera^{1*}; J.F. Gómez-Leyva^{2*}; D. Ramírez²; J. Chará¹; K. Castaño¹; J.G. Morales³; R. Barahona³

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia; ²Laboratorio de Biología Molecular, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México; ³Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. *Autor para correspondencia: *jerivera@fun.cipav.org.co; jfgleyva@hotmail.com

Resumen

Tithonia diversifolia es un arbusto con un alto potencial para la alimentación animal, pero ha demostrado tener una alta variabilidad en su rendimiento agronómico, oferta de nutrientes y adaptación a condiciones específicas de producción. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genética, química y morfológica de materiales silvestres de *T. diversifolia* en Colombia y México, y así perfilar genotipos destacados para la producción animal. Partiendo de 31 materiales colectados de ambos países, se llevó a cabo un estudio de diversidad genética mediante el uso de siete marcadores moleculares ISSR y cuatro del gen del citocromo P450. Asimismo, diferencias en características químicas y en morfología fueron analizadas con estadística multivariada. Los materiales evaluados presentaron diferencias en contenido de PC (29.4% ± 3.29), EE (1.6% ± 0.67), Ca (2.3% ± 0.2), P (0.6% ± 0.18), FDA (44.99% ± 9.43) y FDN (46.82% ± 12.52) (p<0.05). Además, se encontraron diferencias en el peso total de la planta, área foliar, hojas por rama y altura de planta (p<0.05). Finalmente se identificó una amplia diversidad genética con cinco grupos bien definidos y mediana relación geográfica entre materiales, encontrándose un índice de Nei de 0.281 y un índice de Shannon de 0.432. Se concluye que *T. diversifolia* cuenta con una amplia diversidad fenotípica y adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas, y que existe la necesidad de seleccionar materiales con el fin de conservar y resguardar germoplasma con características agronómicas y nutricionales destacadas para un mejor aprovechamiento de esta especie.

Palabras clave: Botón de oro, calidad nutricional, Citrochromo P450, ISSR, marcadores moleculares, variabilidad fenotípica.

Abstract

Tithonia diversifolia is a shrub with great potential for animal feeding thanks to its chemical composition, edaphoclimatic adaptability and biomass production, but has shown differences in its agronomic performance and nutritional quality. The objective of this work was to determine the genetic, chemical and morphological diversity of wild *T. diversifolia* materials in Colombia and Mexico, and thus outline outstanding genotypes for animal production. Based on 31 materials collected from both countries, a genetic diversity study was carried out using seven ISSR and four cytochrome P450 gene molecular markers. Likewise, differences in chemical characteristics and morphology were analyzed with multivariate statistics. The evaluated materials presented differences in their PC content ($29.4\% \pm 3.29$), EE ($1.6\% \pm 0.67$), Ca ($2.3\% \pm 0.2$), P ($0.6\% \pm 0.18$), ADF ($44.99\% \pm 9.43$), NDF ($46.82\% \pm 12.52$), among other traits ($p < 0.05$). In addition, differences were found in the total weight of the plant, leaf area, leaves per branch and plant height ($p < 0.05$). Finally, a wide genetic diversity was identified with five well-defined groups and a medium geographical relationship between materials, finding a Nei index of 0.281 and a Shannon index of 0.432. It is concluded that *T. diversifolia* has a wide phenotypic diversity and adaptation to different edaphoclimatic conditions, and that there is also the need to select materials in order to conserve and protect germplasm with outstanding agronomic and nutritional characteristics for a better use of this species.

Keywords: Citrochromo P450, ISSR, Mexican Sunflower, molecular markers, nutritional quality, phenotypic variability.

Introducción

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray popularmente conocida como botón de oro, falso girasol o girasol mexicano, es un arbusto perenne de la familia Asteraceae, nativo de México y América Central pero ampliamente distribuido en Asia, África, América del Sur e islas del Caribe (Obukohwo y Umar, 2014; Miranda *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2016). A pesar de ser considerada una planta pionera e invasora que puede afectar el crecimiento de otras especies (Oludare y Muoghalu, 2014; Luo *et al.*, 2016), se han identificado propiedades farmacéuticas derivadas de sus numerosos metabolitos secundarios como sesquiterpenoides, diterpenos, fenoles y flavonoides (Lifongo *et al.*, 2014; Ejelonu *et al.*, 2017), algunos con propiedades insecticidas o herbicidas (Kolawole *et al.*, 2011, Miranda *et al.*, 2015). También como especie se ha empleado en rehabilitación de suelos,

protección de taludes, biorremediación, producción de abono verde y uso apícola bajo diferentes condiciones (Mustonen *et al.*, 2015).

Gracias a sus bajos valores de fibra detergente ácida (FDA) y neutra (FDN), alto contenido de proteína cruda (PC) y minerales, y alta digestibilidad y contenido de carbohidratos no estructurales, *T. diversifolia* es una especie que posee un alto potencial para la alimentación animal y la disminución de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Gualberto *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016; Mauricio *et al.*, 2017). Además, *T. diversifolia* presenta una gran adaptabilidad edafoclimática y una alta producción de biomasa (Ramírez-Rivera *et al.* 2010; Ribeiro *et al.*, 2016), con alta variabilidad en su capacidad de rebrote, desempeño agronómico, composición química y de adaptación, debido probablemente a su alta diversidad genética (Yang *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2016; Gallego *et al.*, 2017).

Actualmente en Colombia y en otros países donde se ha usado esta especie, no se tiene un registro de la diversidad genética de las poblaciones naturales de *T. diversifolia*, lo que dificulta planificar y diseñar estrategias de conservación y manejo, así como para la selección de líneas de germoplasma y el mejoramiento genético de esta especie (Ruiz *et al.*, 2013; Tabin *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016). La diversidad genética, que revela el grado de polimorfismo entre diferentes poblaciones e individuos, es un patrón para medir el potencial evolutivo y la capacidad de adaptación de las especies (Chai *et al.*, 2014). Dentro de las evaluaciones de diversidad genética, el marcador de Secuencias Intergénicas Repetidas Simples (ISSR) se ha perfilado como una buena herramienta debido a su alta repetitividad, alto polimorfismo, bajo costo y fácil manejo (Kalpana *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016).

El objetivo del presente estudio fue determinar la diversidad genética, morfológica y bromatológica de materiales silvestres de *T. diversifolia* por medio del uso de marcadores ISSR y citocromo P450 en colectas de Colombia y México, y así perfilar orígenes con un mayor potencial para la alimentación animal en ambos países debido al uso que esta especie ha tenido durante los últimos años.

Materiales y métodos

Sitios de colecta

Se identificaron poblaciones silvestres con antecedentes de uso como forraje (Tabla 1) donde se colectaron hojas jóvenes y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Se utilizó una matriz de calificación que incluyó 100 sitios previos los cuales fueron calificados teniendo en cuenta características como: facilidad de acceso, área establecida, representatividad de las condiciones de producción (tipo de suelo y medio ambiente), tipo de semilla usada (sexual o por estaca), origen del material usado en las siembras y comportamiento productivo, con el propósito de identificar de manera representativa los

mejores sitios de colecta (datos no mostrados).

Un total de 82 muestras de *T. diversifolia* fueron colectadas en los 31 sitios seleccionados a partir de los 100 lugares inicialmente incluidos en la evaluación, distribuidos en Colombia y México (Figura 1). En Colombia, las colectas se realizaron en las ecoregiones del Eje Cafetero (EEC), Valle del Río Cesar (EVRC), Piedemonte Orinocense (EPO), Bajo Magdalena (EBM), Caquetá (CAQ), y Santander y Boyacá (ESB); y en México en los estados de Michoacán (MICH) y Jalisco (JAL). La asterácea *Heliopsis longipes* (A. Gray) fue incluida en el análisis a manera de control. Las colectas de Colombia en realizaron en sitios representativos donde tradicionalmente se ha utilizado esta arbustiva como alimentación animal y con diversidad de condiciones biofísicas y en México la toma de muestras se hizo en dos de los estados donde desde hace algunos años *T. diversifolia* se ha usado en los sistemas bovinos de producción.



Figura 1. Localización de los sitios de colecta de *T. diversifolia* en Colombia y México

Tabla 1. Características generales de los sitios de colecta para México y Colombia

Código	País	asnm (m)	Precipitación (mm/año)	Temperatura (°C)	Coordenadas	
					Latitud (N)	Longitud (O)
1EEC	Colombia	2346	2480	15.5	6°8'39.538"	-75°28'3.149"
268EPO	Colombia	552	4120	26.5	4°25'9.9"	-74°20' 27.48"
1416EPO	Colombia	579	4080	26.4	4°18'38.70"	-74°22'09.41"
1EPO	Colombia	326	2410	27.2	3°53' 42.06"	-74° 11' 48.72"
2583EEC	Colombia	2159	2545	16.3	5°0'51.538"	-75°33'58.302"
2388EEC	Colombia	2283	2459	16.4	5°0'39.888"	-75°26'10.333"
953EEC	Colombia	1870	2610	16.2	4°52'39.430"	-75°34'58.563"
1250EVRC	Colombia	623	1220	27.2	10° 14' 18.66"	-73° 6' 21.539"
1716EVRC	Colombia	284	1124	27.5	10° 26' 31.8"	-73° 22' 59.4"

225ESB	Colombia	1608	870	22.3	6° 11' 26.52"	-73° 8' 49.139"
2785ESB	Colombia	1383	2130	23.4	6° 16' 46.8"	-73° 9' 49.499"
2529ESB	Colombia	1893	1680	19.8	6° 20' 4.98"	-73° 2' 0.359"
1CAQ	Colombia	232	2840	23.5	01°14'49.2"	-75°46'28.3"
2CAQ	Colombia	303	3460	23.3	01°16'56.7"	-75°52'16.3"
3CAQ	Colombia	283	3980	23.6	01°16'55.1"	-75°59'14.8"
1BOY	Colombia	2681	892	14.1	5° 53' 11.22"	-73° 9' 41.76"
3700EBM	Colombia	20	930	27.2	10° 29' 1.62"	-75° 12' 23.28"
1ESB	Colombia	2492	912	16.9	5° 46' 30"	-73° 0' 0.899"
1EVRC	Colombia	578	952	28.1	10° 45' 48"	-72° 52' 1.2"
2ESB	Colombia	2501	990	14.1	5°47'18.3"	-73°2'48.059"
1MICH	México	405	720	27.7	19° 4'48.31"	-102°33'19.42"
2MICH	México	350	700	28	19°19'3.49"	-101°46'6.63"
3MICH	México	590	1215	24.1	18°42'39.90"	-103° 3'31.85"
4MICH	México	1552	700	26.7	20° 26'35.298"	-103°25'18.292"
1JAL	México	1574	890	20.2	20°27' 45.72"	-103°26'43.86"
2JAL	México	1560	879	20.2	20°19'38.32"	-102°15'28.13"
<i>H. longipes</i>	México	1561	890	20.2	20°26' 36.48"	-103°25'15.46"
1-1EEC	Colombia	2353	2480	16.5	6°8'26.153"	-75°28'3.968"
1EEC-UNALMED	Colombia	1476	1612	21.6	6°8'26.433"	-75°28'3.822"
1ESB-Carretera	Colombia	2286	1020	14.4	6°15'47.359"	-75°34'43.088"
1250EVRC-1	Colombia	571	1220	27.2	5°53' 51.66"	-73°11'23.1"
1EEC-SENA	Colombia	1870	2334	19.2	10°14' 18.9"	-73°6'22.32"

EEC: Ecorregión del Eje Cafetero; EVRC: Ecorregión del Valle del Río Cesar; EPO: Ecorregión del Piedemonte Orinocense; EBM: Ecorregión del Bajo Magdalena; CAQ: Caquetá; ESB: Ecorregión de Santander y Boyacá; MICH: Michoacán; JAL: Jalisco.

Extracción y procesamiento de ADN

Para la extracción de ADN se usó el kit comercial DNeasy Plant mini Kit (Qiagen®). La evaluación de la calidad del ADN se realizó mediante geles de agarosa al 0.8% corridos en tampón TBE 1X (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M y EDTA 0.002 M) a 80 voltios durante una hora y teñidos con Bromuro de etidio (10 mg/ml). Las concentraciones de ADN y la relación A260/A280 se determinaron mediante el uso de Nanodrop (Thermo Scientific®). Estos trabajos fueron realizados en el Laboratorio de Fitotecnia Tropical de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (Colombia) y en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco (México).

Determinación de la diversidad genética mediante marcadores moleculares y análisis ITS

Para la amplificación de los fragmentos, se evaluaron 45 iniciadores, de los cuales 11 fueron seleccionados (Tabla 1), siete oligos ISSR y cuatro para el gen citocromo P450 (Yamanaka *et al.*, 2003). Las amplificaciones de PCR se realizaron en un volumen de 12.5 µl que contienen Tris-HCl, 10 mM (pH 9.0), KCl 50 mM, MgCl₂ 2.0 mM, dNTPs 0.20 mM, gelatina 0.1 %, 5 µM de cada oligo, 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Fermentas), y 20

ng de DNA genómico. Las condiciones del proceso fueron: termociclador SelectCycler, programado para un primer ciclo térmico de 4 min a 94°C, seguido por 35 ciclos correspondientes a la desnaturalización (1 min a 94°C), alineación del iniciador 46 - 56 °C por 1 min (acuerdo al oligo, Tabla 2) y elongación a 72°C por 2 min. Posteriormente, el producto se mantuvo a 72°C por 7 min para luego ser conservado a 4°C.

Con el fin de confirmar la identidad de las muestras, se amplificó la región ITS del DNA ribosomal empleando los oligos ITS1 5' AGGAGAAGTCGTAACAAGGT 3' e ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' de acuerdo con White *et al.* (1990). Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados en un secuenciador automático *Applied Biosystem* empleando los mismos oligos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) empleado el algoritmo BLASTn. (Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabla 2. Marcadores ISSR y P450 utilizados en la determinación de la diversidad genética de *T. diversifolia* en México y Colombia

Oligo	Tipo	Secuencia 5' → 3'	Temperatura de anillamiento °C
(GA)8YT	ISSR	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	47.4
(AG)8C	ISSR	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48.8
(GA)8C	ISSR	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52.0
(AG)8YC	ISSR	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	48.8
(CT)8AGA	ISSR	CTCTCTCTCTCTCTAGA	48.1
T(CT)7CC	ISSR	TCTCTCTCTCTCTCC	48.1
(CT)8RG	ISSR	CTCTCTCTCTCTCTRG	48.1
CYP1A1F/CYP2B6R	P450	GCCAAGCTTTCTAACAATGC/GACTCTTG CTACTACTCCTGGTT	52.0
CYP1A1F/heme2B6	P450	GCCAAGCTTTCTAACAATGC/ACCAAGAC AAATCCGCTTCCC	52.0
CY2C19F/CYP21A1R	P450	TCCTTGTGCTCTGTCTCTCA/AAGGACAT GCTCTGACCATT	46.6
CY2C19F/heme2B6	P450	TCCTTGTGCTCTGTCTCTCA/ACCAAGAC AAATCCGCTTCCC	56.0

Los productos de amplificación con los marcadores ISSR y del citocromo P450 fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en amortiguador SB 1X (borato de sodio 10 mM, pH 8.5) a 100 voltios, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un fotodocumentador UV. Los patrones de amplificación se registraron en una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0) con la ayuda de software Gel Analyzer[®]. La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Dice (1979).

Análisis bromatológico

Las determinaciones químicas fueron: proteína cruda (PC), cenizas (Cen), fibra en detergente neutra y ácida (FDN y FDA), grasa (EE), Calcio (Ca), Fósforo (P) y Hierro (Fe). El porcentaje de N y PC se determinaron por el método de Kjeldahl según NTC 4657 (ICONTEC, 1999), FDN y FDA según la técnica secuencial descrita por Van Soest *et al.* (1991) según AOAC 2002.04 y 973.18 respectivamente (AOAC, 2005), y EE por extracción Soxhlet por inmersión (NTC 668- ICONTEC, 1973). Finalmente, el contenido de cenizas se determinó por incineración directa en una mufla a 500°C según AOAC 942.05 (AOAC, 2005) y el contenido de los minerales Ca, P y Fe y por espectrofotometría AA y UV- VIS basado en NTC 5151 (ICONTEC, 2003) y 4981 (ICONTEC, 2001).

Determinaciones morfológicas

Las medidas morfológicas evaluadas fueron: peso de las hojas (g), peso de los tallos (g), número de hojas por planta, número de ramas por planta (#), altura de la planta (cm), diámetro de los tallos (mm), relación hoja/tallo y área foliar (cm²).

Análisis de la información

El análisis de agrupamiento se realizó por el método UPGMA (*unweighted pair-group method*) y se generó un dendrograma utilizando el paquete estadístico NTSYS (*Numerical Taxonomy System for personal Computer*, versión 2.02 PC). Para cada oligo o su combinación se calculó el número de alelos observados y efectivos, (Na, Ne), número de bandas polimórfica (P), índice de diversidad genética de Nei (H) e índice de Shannon (I) empleando el software POPGENE versión 3.2 (Yeh *et al.*, 1999).

La probabilidad de encontrar un individuo dentro de un grupo dado fue analizada empleando una aproximación Bayesiana del programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). El número de posibles poblaciones (K) fue establecido de 2 a 10, realizando un análisis de 100,000,000 iteraciones y una cadena de Monte Carlo Markov Chain (MCMC) de 1,000,000, usando un modelo no mezclado y frecuencias alélicas. El número de K poblaciones fue definido por el valor de delta-K (Earl y VonHoldt, 2012).

Los resultados químicos, de morfología y aspectos agronómicos se analizaron por métodos multivariados, mediante un análisis de componentes principales (ACP) y gráficas Biplot. Estos análisis fueron llevados a cabo en el entorno R (R Core Team, 2019) usando la librería “*FactorMiner*”, “*Vegan*” y “*Agricolae*”. Estas características fueron evaluadas en plantaciones de 40 días pos-corte y empleando cinco plantas por sitio.

Resultados

Diversidad e identificación genética de las colectas de *T. diversifolia*

La concentración promedio de ADN purificado fue de 168.2 ± 56 ng/ μ l y la relación A260/A280 fue de 1.81 ± 0.04 , evidenciando una concentración adecuada y una buena pureza del ADN (Turashvili *et al.*, 2012). De un total de 105 fragmentos amplificados, 5% fueron monomórficos y 95% polimórficos. El tamaño de los fragmentos de ADN, productos de la PCR varió desde los 300 hasta 2,500 pb (Figura 2) y las medidas de variación genética se presentan en la Tabla 3.

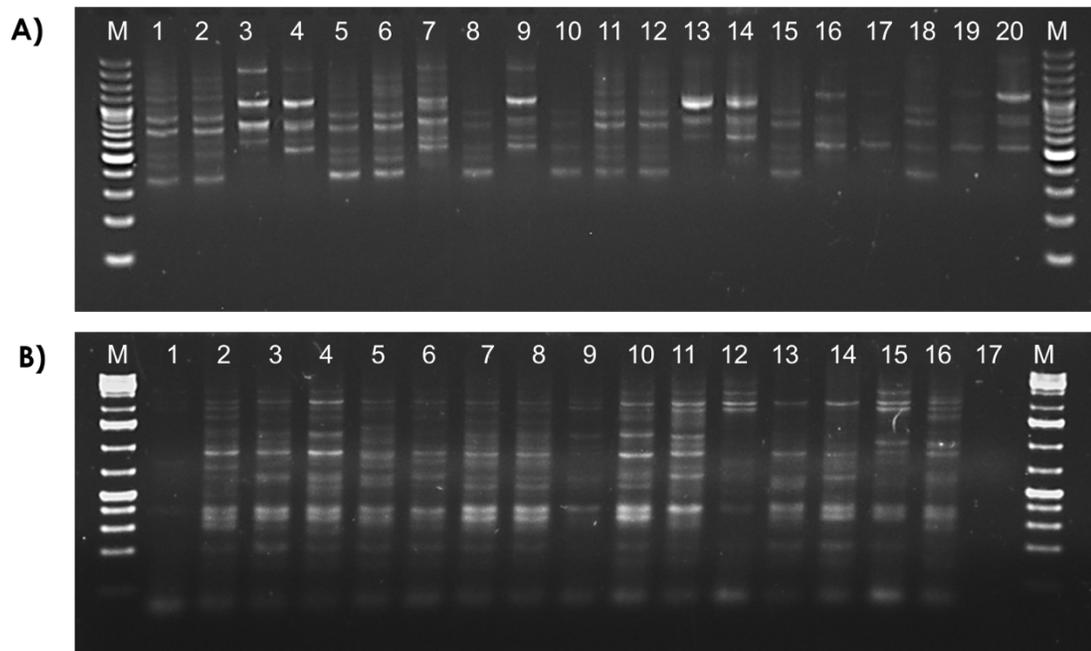


Figura 2. Gel de agarosa al 1.2% mostrando los productos de amplificación para los marcadores moleculares de *T. diversifolia*. A) ISSR (GA)8YT, B) citocromo P450 CYP1A1F/heme2B6.

La cantidad de alelos efectivos en los cebadores ISSR estudiados varió de 1.0 a 1.9. Esta medida proporciona información complementaria a la diversidad genética de Nei y los valores de diversidad (H) mostraron un total de 6.0% a 48.8% de heterocigosidad. Del mismo modo, los índices de información de Shannon (I) fueron 0.13 a 0.67, representando una medición de diversidad genética con un promedio de 0.432 ± 0.227 (Tabla 3) indicando el alto polimorfismo en *T. diversifolia*.

Tabla 3. Parámetros de diversidad genética de los iniciados utilizados en el análisis

Oligos	Número de muestras	Na*	Ne*	H*	I*	P
(GA)8YT	32	2	1.8824	0.4688	0.6616	10
(AG)8C	32	2	1.7534	0.4297	0.6211	9

(GA)8C	32	2	1.2047	0.1699	0.3111	9
(AG)8YC	32	2	1.9321	0.4824	0.6755	8
(CT)8AGA	32	2	1.3581	0.2637	0.4334	9
T(CT)7CC	32	2	1.8824	0.4688	0.6616	6
(CT)8RG	32	2	1.0644	0.0605	0.1391	10
CYP1A1F/CYP2B6R	32	2	1.5193	0.3418	0.5253	8
CYP1A1F/heme2B6	32	2	1.0644	0.0605	0.1391	10
CY2C19F/CYP21A1R	32	2	1.1327	0.1172	0.2338	13
CY2C19F/heme2B6	32	2	1.8221	0.4512	0.6435	13
Mean	32	2	1.4734	0.2812	0.432	
St. Dev		0	0.3631	0.1787	0.2267	

* Na = Número de alelos observados

* Ne = Número de alelos efectivos (Kimura y Crow, 1964)

* H = Diversidad genética de Nei (1973)

* I = Índice de Shannon (Lewontin, 1972)

*P = Número de loci polimórfico

Se destaca que el conglomerado tuvo una correlación cofenética alta (0.874) y un coeficiente de aglomeración de 0.8, lo cual significa una alta correspondencia entre grupos y diferencia entre los mismos. El análisis de las secuencias en la base de datos del NCBI mostró un porcentaje de homología del 99.9% en la región ITS de DNA ribosomal con lo que se confirma plenamente la identidad de estos materiales colectados.

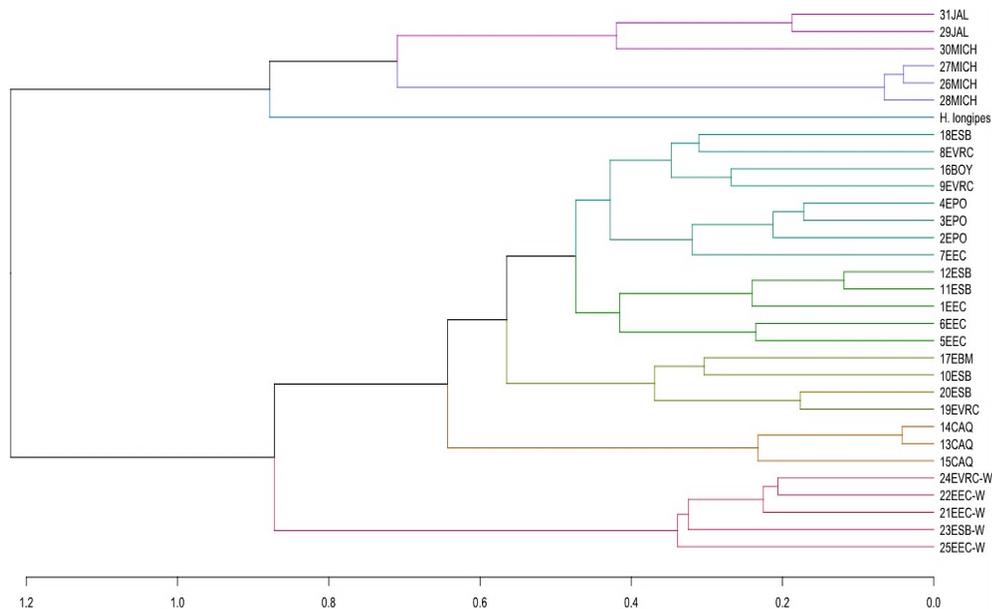


Figura 3. Dendrograma generado por el método de UPGMA para las 31 colectas de *T. diversifolia* de México y Colombia empleando el índice de disimilitud de Dice.

Estructura genética

En la Figura 4 se observa la estructura genética de las 31 colectas de *T. diversifolia* evaluadas y de *H. longipes*. Para *T. diversifolia*, el análisis basado en la proporción del genoma de cada población mostró 5 grupos bien definidos los cuales coinciden con el agrupamiento obtenido en el análisis de conglomerados (Figura 3).

El programa STRUCTURE fue utilizado para analizar los datos generados con los ISSR y el citocromo P450, en las 31 poblaciones de *T. diversifolia* y en *H. longipes*. El programa utiliza un modelo de agrupamiento basado en un modelo estadístico Bayesiano usando datos genotípicos de marcadores no ligados. Una de las aplicaciones consiste en demostrar la presencia de una estructura poblacional, identificando distintas subpoblaciones genéticas asignando individuos a subpoblaciones (Figura 4). Para este propósito, se asume un modelo en el cual existen K poblaciones, cada uno de los cuales es caracterizado por un set de frecuencias alélicas en cada locus. Los individuos son asignados probabilísticamente en la población al cual presentan mayor posibilidad de pertenencia que dentro de los grupos generados los loci estén en equilibrio Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento. Usando en el análisis de estructura el modelo puede asumir que la población i ha heredado una fracción de su genoma del grupo K. Como se observa la Figura 4, los grupos generados coinciden con el dendrograma en el cual se observa una diferenciación clara entre las poblaciones de Colombia con cuatro grupos y México con dos grupos.

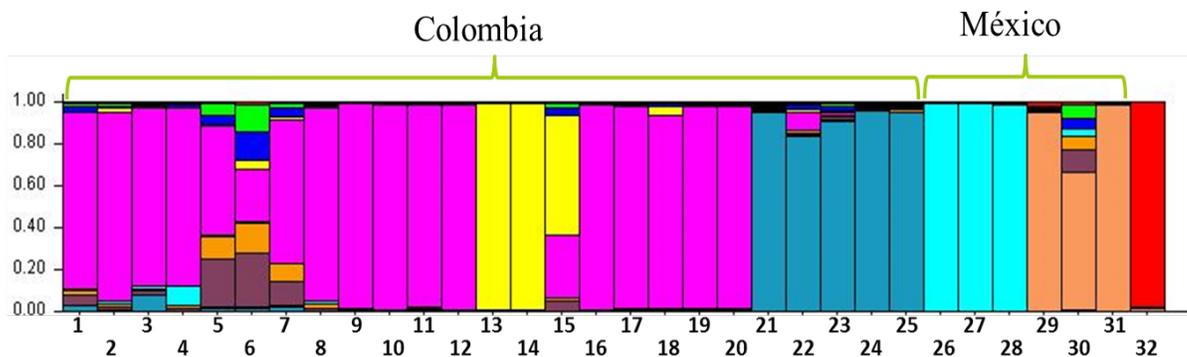


Figura 4. Estructura genética de las colectas realizadas en Colombia y México.

K=9 1:1EEC; 2: 268EPO; 3: 1416EPO; 4: 1EPO; 5: 2583EEC; 6: 2388EEC; 7: 953EEC; 8: 1250EVRC; 9: 1716EVRC; 10: 225ESB; 11: 2785ESB; 12: 2529ESB; 13: 1CAQ; 14: 2CAQ; 15: 3CAQ; 16: 1BOY; 17: 3700EBM; 18: 1ESB; 19: 1EVRC; 20: 2ESB; 21: 1-1EEC; 22: 1EEC-UNAL; 23: 1ESB-Carr; 24: 1250EVRC; 25: 1EEC-SENA; 26: 1MICH; 27: 2MICH; 28: 3MICH; 29: 1JAL; 30: 4MICH; 31: 2JAL; 32: *H. Longipes*

Composición química y características morfológicas

Al evaluar los valores máximos y mínimos, coeficientes de variación y desviaciones estándar, se observa gran variación entre colectas para las medidas tomadas. Los parámetros morfológicos (Tabla 4) que presentaron diferencias fueron: peso total de la

planta ($p < 0.0001$), peso de las hojas ($p < 0.0001$), peso de los tallos ($p < 0.0001$), número de ramas ($p < 0.0032$), peso de las ramas ($p = 0.013$), hojas por rama ($p = 0.014$) y área foliar ($p = 0.006$); y las características: número de hojas ($p = 0.062$), altura de planta ($p = 0.119$), diámetro de los tallos ($p = 0.121$) y la relación hojas tallos ($p = 0.066$), no mostraron diferencias. En la Figura 5 se muestra la relación de las variables químicas y morfológicas con cada una de las colectas.

Tabla 4. Características morfológicas de *T. diversifolia* colectados en Colombia

	Peso hojas	Peso tallos	Hojas	Tallos	Peso planta	Dim. tallo	Relación H:T	Área hoja
	g	g	#	#	cm	mm		cm ²
Promedio	803.2	1353.9	404.2	26.8	139.5	11.9	0.72	178.5
Max	1798.2	3663.0	1281.0	96.8	253.8	16.1	1.40	286.2
Min	249.0	194.0	122.6	5.2	61.2	6.7	0.40	96.1
Coef. de var. (%)	45.3%	63.2%	92.0%	78.1%	33.1%	22.5%	38.1%	34.7%

En las variables morfológicas evaluadas, los dos primeros componentes del ACP representaron el 77.3% de la variabilidad total. El primer componente, representó el 47.07% de la variabilidad y las características con mayor contribución fueron diámetro del tallo (23.68%), peso de los tallos (20.37%), relación hoja/tallo (20.27%) y altura de la planta (17.08%); en el segundo componente, que representó el 29.7% de la variabilidad, las características con mayor contribución fueron el número de hojas (33.81%), número de ramas (31.11%) y el área foliar (18.02%) (Figura 5). En las evaluaciones químicas, los tres primeros componentes representaron una alta variabilidad (76.41%). En el primer componente que representó el 41.11%, las variables cenizas (16.45%), PC (15.75%) y fósforo (13.88%) fueron las de mayor contribución; en el componente 2 (22.15%) las variables FDN y FDA fueron las de mayor contribución y en el tercer componente las variables de mayor contribución fueron ELN y Zinc.

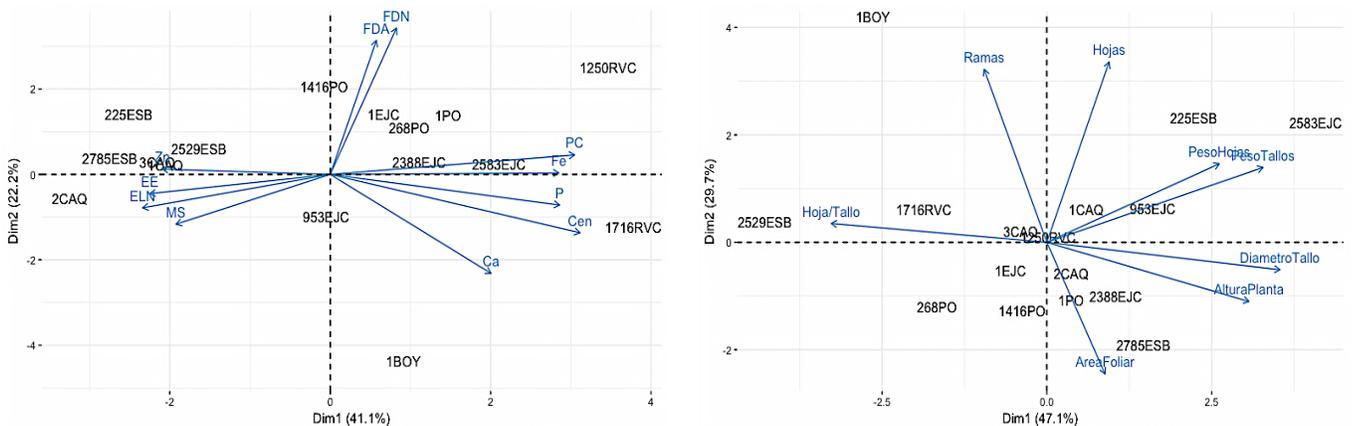


Figura 5. Análisis de componentes principales de las características evaluadas: A) características químicas (Izquierda); B) características morfológicas (Derecha), de las colectas de *T. diversifolia*

Las colectas de la EEC tuvieron mayor peso de las plantas, peso total de las hojas y peso de los tallos describiendo valores de 3453.1, 1237.3 y 2215.8 g en promedio, respectivamente ($p < 0.0001$). Por otro lado, las plantas de la ESB y EEC mostraron mayor número de hojas (696.1 y 428, respectivamente) y las plantas de las regiones que presentaron menores valores para este parámetro fueron las de CAQ y EPO con valores en promedio de 271.5 y 170.7 hojas, respectivamente ($p < 0.0001$). Con relación al número de ramas por planta, las colectadas en la ESB (39.3) fueron las de mayor número al igual que las de la CAQ (30.7). Finalmente, las plantas de las regiones EPO (252.9 cm²) y EEC (220.3 cm²) fueron las que tuvieron mayor área foliar y las de menores valores fueron las de ESB y EVRC con 125.8 y 122.5 cm², respectivamente.

Tabla 5. Composición química de *T. diversifolia* colectados en Colombia

	MS	Cen	EE	FDA	FDN	PC	ELN	P	Ca	Fe	Zn
	%							ppm			
Promedio	16.38	15.40	1.57	44.99	46.82	29.34	24.01	0.63	2.43	136.8	120.0
Max	18.20	20.90	3.46	58.90	72.30	36.10	47.00	0.85	5.00	359.0	185.0
Min	13.10	11.00	1.02	29.50	14.80	25.10	5.90	0.39	1.02	28.0	65.0
Coef. de var. (%)	9.2	21.1	42.2	21.0	26.7	11.2	53.3	21.3	37.1	52.6	28.6

MS: materia seca; Cen: cenizas; EE: extracto etéreo; FDA: fibra en detergente ácida; FDN: fibra en detergente neutra; PC: proteína cruda; ELN: extracto libre de nitrógeno P: fósforos; Ca: calcio; Fe: hierro; Zn: Zinc; ppm: partes por millón.

En cuanto a la composición química (Tabla 5), según los coeficientes de variación encontrados para las fracciones analizadas, Cen, EE, Ca y Zn fueron los parámetros de mayor dispersión. Se identificó que los materiales de la EVRC tuvieron mayor cantidad de proteína cruda en sus hojas (34.5%), en cuanto a FDN y FDA no se encontraron diferencias entre las plantas de las diferentes zonas debido a su gran dispersión y para Ca y P los materiales de CAQ fueron los que presentaron los valores más bajos (1.7 y 0.4%, respectivamente).

Discusión

Hasta ahora, la mayor parte de los estudios sobre *T. diversifolia* orientados hacia la alimentación animal, se han centrado en la evaluación de campo y el análisis de rasgos fenotípicos (Ruiz *et al.*, 2013; Mauricio *et al.*, 2017), razón por la cual los resultados obtenidos en este estudio tienen implicaciones en la generación de nuevo conocimiento para esta especie y para la implementación de futuros programas de selección y mejoramiento orientados hacia la alimentación animal.

La diversidad genética mediante el uso de marcadores ISSR y del P450 gen fue adecuada para el análisis de diversidad genética y estructura debido a que logró

discriminar de buena forma los genotipos evaluados (Pradeep *et al.*, 2002). Este último marcador es empleado por primera vez para esta especie por lo que se abre una nueva estrategia de análisis. La estructura genética mostró claramente la existencia de grupos homogéneos que pueden ser empleados como un criterio de selección de materiales con fines de mejoramiento y adaptación a cada condición edafoclimática. Estudios anteriores han mostrado que *T. diversifolia* cuenta con gran diversidad fenotípica, variabilidad que ha favorecido su productividad, composición nutricional y adaptabilidad a diferentes condiciones de producción (Yang *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2016). Estos aspectos han sido evaluados por autores como Ruíz *et al.* (2010) y Holguín *et al.* (2015), los cuales identificaron que esta especie puede variar considerablemente en su capacidad de rebrote, desempeño agronómico y composición química.

Diversidad genética

El análisis de agrupamiento UPGMA (Figura 3), separó significativa los materiales de México y Colombia, observándose muestras similares sólo a nivel de región. Por ejemplo, las muestras como de MICH, CAQ y JAL resultaron homogéneas entre sí, pero distantes a las demás colectas, y los orígenes de regiones como EEC, EVRC y ESB estuvieron distribuidos en los diferentes grupos de Colombia. A un índice de disimilitud de 0.6 se lograron establecer 6 grupos. Es importante destacar, que la técnica empleada en este estudio mostró un alto grado de polimorfismo y sensibilidad para la discriminación de orígenes. Además, según índice de Hubert se formarían cuatro grupos a un corte de disimilitud de 0.8.

En estudios realizados en México, Del Val *et al.* (2017) evaluaron 20 materiales con propósitos alimenticios provenientes de ocho localidades, obtuvieron en total 157 bandas de las cuales 33 fueron monomórficas y 124 polimórficas, lo que indica un 79% de polimorfismo. El tamaño de los fragmentos de DNA producto de la PCR varió de 170 hasta 1,450 pb, y se encontró gran variabilidad entre los orígenes estudiados. Tal es así que en el dendrograma realizado con el coeficiente de Dice y mediante el método de clasificación de UPGMA no se encontró una relación significativa entre 10 muestras y solo dos resultaron similares (a un nivel de similitud de 1.47 se observaron 2 grupos).

Por otro lado, Yang *et al.* (2012) encontraron gran variabilidad genética en colectas de esta especie obtenidas en cuatro regiones de China y dos de Laos. En esta investigación, los valores medios de Nei de diversidad genética (H) y el índice de Shannon de diversidad (I) fueron 0.2937 y 0.4314, respectivamente, y se observó un 84.62% de polimorfismo demostrando amplia diversidad en materiales de *T. diversifolia* y confiriéndole gran adaptación a diversos ambientes.

Los materiales de Caquetá evaluados en este estudio, por ejemplo, formaron un grupo homogéneo (color amarillo) a excepción del material 3CAQ, el cual muestra un grado de

semejanza cercado al 33% con relación al grupo de color morado. Así mismo los orígenes 1-1EEC, 1EEC-UNAL, 1ESB-Carr, 1250EVRC y 1EEC-SENA (color verde azul) se agruparon, los cuales son colectas silvestres a borde de carretera tomadas en diferentes zonas de Colombia. Es importante destacar que los materiales de México se agruparon homogéneamente en dos grupos, especialmente los provenientes de Michoacán (color aguamarina), ya que 2JAL-Mex presenta cierto grado de hibridación o de cruzamiento dentro del grupo de Jalisco incluyendo un origen de Michoacán (color café), evidenciando cruzamiento de materiales entre estas zonas.

Finalmente, el grupo genético más grande estuvo conformado por 17 colectas (color morado); este grupo estuvo conformado por materiales de orígenes EEC, EPO, EVRC y ESB. Dentro de este grupo se presentaron tres materiales con un grado de cruzamiento importante pero muy similar entre ellos, observándose el traslado de materiales entre regiones (2583EEC, 2388EEC y 953EEC). Este estudio mostró una relación significativa entre las colectas de diferentes regiones a nivel de país. Además, se identificaron poblaciones muy homogéneas y con un perfil genético diferente al de otras poblaciones, demostrando gran diversidad en la especie *T. diversifolia*.

Composición bromatológica y morfológica

T. diversifolia se ha utilizado a través de experimentos como forraje de alta calidad que puede reemplazar concentrados en rumiantes o incrementar la producción animal cuando es ofrecido en dietas basadas en pasturas tropicales (Ramírez-Rivera *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2016). En todos los casos encontrados en este estudio, se lograron observar altos porcentajes de PC en las hojas (> 25%), bajos contenidos de fibra (FDA y FDA) y aceptables contenidos de minerales. Los resultados de este estudio son acordes a lo reportado por investigadores como La O *et al.* (2009), Ribeiro *et al.* (2016) y Mauricio *et al.* (2017).

Para PC, valores expresados como porcentaje de la materia seca (MS), son tan altos como los observados en algunas leguminosas tropicales como *Stylosanthes guianensis* (18.2 %, Morgado *et al.*, 2009), *Arachis pintoi* (19.7%, Khan *et al.*, 2013) y *Gliricidia sepium* (18.23%, Silva *et al.*, 2017), y son superiores a los observados en la mayoría de las gramíneas tropicales, como *Urochloa brizantha* (9.3%, Ribeiro *et al.*, 2017), *Cynodon plectostachyus* (9.23%, Montoya *et al.*, 2017) y *Megathyrsus maximus* (9.3%, Carvalho *et al.*, 2017). Además, FDN y FDA fueron menores que los valores comunes observados para forrajes tropicales (Souza *et al.*, 2007), aspecto que no limita el consumo voluntario, la degradabilidad de los nutrientes y su adecuado aprovechamiento por parte de los animales.

Esta planta ofrece altas contenidos de nitrógeno debido a que puede establecer simbiosis asociativas con una amplia variedad de especies fijadoras de N que colonizan la

superficie radicular de plantas no leguminosas (Reinhold- Hurek y Hurek, 2011). Entre estos, se han identificado los endófitos fijadores de N y organismos diazotrofos libres (Baldani y Baldani, 2005), los cuales, por sus características podrían ser los causantes de las altas cantidades de N en especies como *T. diversifolia*. Estas asociaciones igualmente pueden favorecer factores de crecimiento en las plantas, ayudando a un mayor desarrollo de los sistemas radiculares, mayor absorción de nutrientes y mayor capacidad de contrarrestar enfermedades (Santi *et al.*, 2013). Los valores de N tradicionalmente reportados en *T. diversifolia* coinciden con lo encontrado en esta evaluación (>25% de PC).

La composición química de *T. diversifolia* observada en este estudio pueden ser la causa de que su consumo incremente la producción animal o mejore la eficiencia de los sistemas. Por ejemplo, Ribeiro *et al.* (2016), evaluaron los efectos de la sustitución de la caña de azúcar fresca y concentrados por *T. diversifolia* (0, 6, 4, 15%) en vacas lactantes, reportando que es posible reemplazar la caña de azúcar (20% de la MS) y concentrado (11.2% de MS) sin ningún cambio en la ingesta total (18.7 kg MS/día), rendimiento de leche (22.9 kg/día) y su composición. Además, la inclusión de *T. diversifolia* no afecta negativamente a los parámetros de glucosa, urea, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos no esterificados y β -hidroxibutirato.

De igual forma en Colombia, Rivera *et al.* (2015a) al comparar un sistema de monocultivo de *U. brizantha* y un sistema con *T. diversifolia* (4000 arbustos/ha), encontraron que con este último se incrementó la producción de leche (Kg/vaca/día o Kg/ha/día), los sólidos no grasos (kg/vaca/día o kg/ha/día) y los sólidos totales (kg/vaca/día o kg/ha/día). La producción diaria de leche por vaca con *T. diversifolia* fue de 4.92 kg, 7% más que el sistema con *U. brizantha*. Además, la capacidad de carga aumentó 32%, se incrementaron los ingresos al agricultor en un 25% y también se alcanzaron beneficios para la industria lechera, ya que hay un mayor volumen de leche con contenido más alto de sólidos y menos estacionalidad en la producción a lo largo del año.

En cuanto a características morfológicas, las variables de mayor peso en el análisis de componentes principales fueron número de tallos, peso de las ramas y diámetro del tallo, razón por la cual estas características pueden servir como parámetros de selección. Para Ruiz *et al.* (2010), estas características son importantes para determinar el rendimiento de crecimiento de materiales en especies como *T. diversifolia*. Según los valores encontrados en este estudio, en general, en el germoplasma evaluado existe probablemente material disponible con potencial para la producción de biomasa tanto para zonas altas y frías como para cálidas, bajas y con pH ácidos.

Según los valores de peso de las hojas y peso de las ramas encontrados en este estudio, se puede considerar que *T. diversifolia* es de alta productividad de biomasa, lo que junto

con sus cualidades químicas convierte a *T. diversifolia* en un arbusto de gran valor alimenticio para animales (Herrero *et al.*, 2013; Mauricio *et al.*, 2017).

Conclusiones

Se reporta por primera vez la diversidad genética de una colección de *T. diversifolia* presente en Colombia con la estructura genética de por lo menos cuatro grupos y dos claramente diferentes en México. Los resultados encontrados evidencian que *T. diversifolia* cuenta con un alto potencial para la alimentación animal bajo diferentes condiciones ambientales, porque ofrece altos contenido PC (>25%) y minerales como Ca y P. Además, posee bajas concentraciones de FDN y FDA (49 y 46%, respectivamente) y alta adaptabilidad. De acuerdo con los resultados encontrados esta especie tiene una amplia diversidad genética en Colombia y México, afectando características morfológicas y químicas. Debido a lo anterior, es posible seleccionar materiales con mayor rendimiento, calidad nutricional para la alimentación animal y con gran adaptabilidad edafoclimática como por ejemplo los materiales de la EEC.

Según los presentes resultados, se recomienda avanzar en evaluaciones de adaptación e interacción genotipo x ambiente donde todos los genotipos sean evaluados bajo las mismas condiciones y así identificar aquellos con mayor potencial forrajero para ser usados en ecosistemas particulares.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto *Ganadería Colombiana Sostenible*, financiado por el Gobierno del Reino Unido y el Fondo Mundial para el Medio Ambiente, por aportar recursos necesarios para las evaluaciones y recolección de materiales. También, los autores agradecen al Instituto Tecnológico de Tlajomulco (México), especialmente a su Laboratorio de Biología Molecular y estudiantes, al laboratorio de Fitotecnia Tropical de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín) por ofrecer sus instalaciones y otros recursos para las evaluaciones a nivel molecular, así como a Colciencias en su convocatoria de Doctorados Nacionales 727 de 2015.

Bibliografía

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Method 942.05. Determination of Ash in Animal Feed. En Official Methods of Analysis of AOAC International (18 ed.). Gaithersburg, MD, USA.
- Carvalho, A.L.S., Martuscello, J.A., Almeida, O., Braz, T., Cunha, D. Figueiredo V., Jank, L. 2017. Production and quality of Mombaça grass forage under different residual heights. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 39(2): 143- 148. <https://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v39i2.34599>

- Chai, S.F., Zhuang, X.Y., Zou, R., Chen, Z.Y., Jiang, Y.S., Wei, X., 2014. Genetic diversity analysis of endangered plant camellia pubipetala detected by ISSR. *Acta Botanica Boreali*, 34: 0093-0098.
- Del Val, R., Miranda, J.M., Flores, M.X., Gómez, J.M., Solorio, B., Solorio, F.J., González, S. 2017. Diversidad genética de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray de Michoacán: Análisis con marcadores de ADN-SSR. *Reaxion: Ciencia y tecnología universitaria*, 4 (3): 9 - 14.
- Ejelonua, O.C., Elekofehintia, O.O., Adanlawob, I.G. 2017. *Tithonia diversifolia* saponin-blood lipid interaction and its influence on immune system of normal wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87: 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.017>
- Gallego-Castro, L.A., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2017. Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray bajo tres sistemas de siembra en el trópico alto. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1): 213-222. DOI:10.15517/am.v28i1.21671.
- Gualberto, R., O. Souza, N. Costa, C. Braccialli, L. Gaion. 2010. Influência do espaçamento e do estágio de desenvolvimento da planta na produção de biomassa e valor nutricional de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray. *Nucleus*, 7(2):135-149.
- Herrero, M., P. Havlik, H. Valin, A. Notenbaert, M. Rufino, P. Thornton, M. Blummel, F. Weiss, Grace, D. and Obersteiner. 2013. Global livestock systems: Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 20888–20893.
- Holguín, V.A., Ortíz, S., Velasco, A., Mora, J. 2015. Evaluación multicriterio de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en Candelaria, Valle del Cauca. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62(2): 57-72.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 1973. NTC 668. Alimentos y materias primas. Determinación de los contenidos de grasa y fibra cruda. Bogotá, Colombia. 9 pp.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 1999. NTC 4657. Alimento para animales. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de proteína cruda. Método Kjeldahl. Bogotá, Colombia. 11 pp.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 2001. NTC 4981. Alimentos para animales. Determinación del contenido de fósforo. Método espectrofotométrico. Bogotá, Colombia. 10 pp.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 2003. NTC 5151. Alimento para animales. Determinación de los contenidos de Calcio, Cobre, Hierro, Magnesio, Manganeso, Potasio, Sodio y Zinc. Método usando espectrometría de absorción atómica. Bogotá, Colombia. 11 pp.
- Kalpana, D., Choi, S.H., Choi, T.K. 2012. Assessment of genetic diversity among varieties of mulberry using RAPD and ISSR fingerprinting. *Scientia Horticulturae*, 134: 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.002>.

- Khan, M.T., Khan, N.A., Bezabih, M., Qureshi, M.S., Rahman, A. 2013. The nutritional value of peanut hay (*Arachis hypogaea* L.) as an alternate forage source for sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 45: 849–853. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0297-8>.
- Kolawole, A.O., Okonji, R.E., Ajele, J.O., 2011. *Tithonia diversifolia*, *Cyperus rotundus* and *Hyptis suaveolens* ethanol extracts combinatorially and competitively inhibit affinity purified cowpea storage bruchid (*Callosobrochus maculatus*) glutathione S-transferase. *Arthropod-Plant Interactions*, 5: 175–184.
- La O, O., Valenciaga, D., González, H., Orozco, A., Castillo, Y., Ruíz, O., Gutiérrez, E., Rodríguez, C., Arzola, C. 2009. Efecto de la combinación de *Tithonia diversifolia* y *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 en la cinética y producción de gas in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43 (2): 142- 152.
- Lifongo, L.L., Simoben, C.V., Ntie-Kang, F. 2014. A bioactivity versus ethnobotanical survey of medicinal plants from Nigeria, West Africa. *Natural products and bioprospecting*, 4: 1–19. DOI:10.1007/s13659-014-0005-7.
- Luo, L., Zhang, P., Ou, X., Geng, Y. 2016. Development of EST-SSR markers for the invasive plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *Applications in Plant Sciences*, 4 (7): apps.1600011. <http://doi.org/10.3732/apps.1600011>.
- Mauricio, R.M., Calsavara, L.H.F., Ribeiro, R.S., Pereira, L.G.R., Freitas, D.S., Paciullo, D.S., Barahona, R., Rivera, J.E., Chará, J., Murgueitio, E. 2017 Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(4): 00146. DOI: 10.15406/jdvar.2017.05.00146.
- Miranda, M.A.F.M., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G., Gualtieri, S.C.J., Macias, F.A. 2015. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Natural Products*, 78: 1083 -1092. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00040>.
- Montoya, E., Barahona, R., Chará, J. 2017. The nutritional balance of earley lactation dairy caws grazing in intensive silvopastoral systems. *Ciência Animal Brasileira*, 18: 1-12. DOI: 10.1590/1089-6891v18e-40419.
- Morgado, E., Almeida, F., Silva, V.P., Gomes, A., Galzerano, L., Torres, H., Rodrigues, L. M. 2009. Digestão dos carboidratos de alimentos volumosos em eqüinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38 (1): 75-81. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009000100010>.
- Mustonen, P. S. J., Oelbermann, M., Kass, D. C. L. 2015. Biomass production and phosphorus use efficiency in two *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) gray genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 38: 1083–1096.
- Nei, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321 - 3326.
- Obukohwo, E., Umar, B. 2014. Seed Production, Germination, Emergence and Growth of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as Influenced by Different Sowing Depths and Soil Types. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 14

(5): 440-444.

- Oludare, A. and J.I. Muoghalu, 2014. Impact of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray on the soil, species diversity and composition of vegetation in Ile-Ife (Southwestern Nigeria), Nigeria. *International Journal of Biodiversity*, 6: 555-562.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramírez-Rivera, U., Sangines-García, J.R., Escobedo-Mex, J.G., Cen-Chuc, F., Rivera-Lorca, J.A., Lara-Lara, P.E. 2010. Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems*, 80: 295-302.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 435–443.
- Ribeiro, R.S., Terry, S.A., Sacramento, J.P., Rocha e Silveira, S., Bento, C.B., Silva, E.F., Montovani, H.C., Gama, M.A.S., Pereira, L.G., Tomich, T.R., Mauricio, R.M., Chaves, A. 2016. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *Plos One* 11: e0165751 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>.
- Ribeiro, M.R. Costa, C.A., de Souza, W.F., Cruvinel, W.S., da Silva, J.T., dos Santos, D.R. 2017. Silage quality of sorghum and *Urochloa brizantha* cultivars monocropped or intercropped in different planting systems. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 39 (3): 243-250. DOI: 10.4025/actascianimsci.v39i3.33455.
- Rivera, J.E., Cuartas, C.A., Naranjo, J.F., Tafur, O., Hurtado, E.A., Arenas, F.A., Chará, J., Murgueitio E. 2015a. Efecto de la oferta y el consumo de *Tithonia diversifolia* en un sistema silvopastoril intensivo (SSPi), en la calidad y productividad de leche bovina en el piedemonte Amazónico colombiano. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 27, Article #189. <http://www.lrrd.org/lrrd27/10/rive27189.html>.
- Rivera, J. E., Molina, I.C., Donney`s, G., Villegas, G., Barahona, R. 2015b. Composición nutricional y degradabilidad de la materia seca de dietas de sistemas silvopastoriles intensivos y tradicionales en Colombia. 3er Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles y VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, 176-181 pp.
- Pradeep, M., Sarla, N., Siddiq, E 2002.. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128, 9–17.
- Ruiz, T. E., Febles, G., Torres, V., González, J., Achan, G., Sarduy, L. y Díaz, H. 2010. Evaluación de materiales recolectados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la zona centro-occidental de Cuba. *Rev. Revista cubana de ciencia agrícola*, 44: 291 - 296.

- Ruiz, T.E., Febles, G., Díaz, H., González, J., Achan, G. 2013. Evaluación en pastoreo de materiales vegetales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) colectados en Cuba. *Revista cubana de ciencia agrícola*, 47: 305- 309.
- Santi, C., Bogusz, D., Franche, C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111: 743–767.
- Silva, S.F., Carneiro, M. S. de S., Edvan, R.L., Pereira, E.S., Neto, L., Pinto, A.P., Camilo, D. 2017. Agronomic characteristics and chemical composition of *Gliricidia sepium* grown under different residual heights in different seasons. *Ciencia e investigación agraria*, 44(1):35-42.
- Tabin, S., Kamilib, A.N., Ganiec, S.A. Zargard, O., Sharmaa, V., Gupta, R.A. 2016. Genetic diversity and population structure of *Rheum* species in Kashmir Himalaya based on ISSR markers. *Flora*, 223: 121–128.
- Turashvili, G., Yang, W., McKinney, S., Kalloger, S., Gale, N., Ng, Y., Chow, K., Bell, L., Lorette, J., Carrier, M., Luk, M., Aparicio, S., Huntsman, D., Yip, S. 2012. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/ RNA extraction techniques. *Experimental and Molecular Pathology*. 92(1):33-43.
- Yang, J., Tang, L., Guan, Y., Sun, W. 2012. Genetic Diversity of an Alien Invasive Plant Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China. *Weed Science*, 60: 552–557. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00175.1>
- Yang, J., Li, Q., Yu, N., Yin, G., Wu, Z., Li, R., Zou, W. 2016. Genetic diversity and structure among natural populations of *Sindora glabra* in Hainan Island, China as revealed by ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 69: 145-151 <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.09.005>.
- Yamanaka, E. Suzuki, M. Tanaka, Y. Takeda, J. A. Watanabe, K. N. Watanabe. 2003. Assessment of cytochrome P450 sequences offers a useful tool for determining genetic diversity in higher plant species. *Theoretical Applied Genetics*, 108:1-9.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T. 1999. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology center, University of Alberta, Canada.

Capítulo 3. Interacción genotipo ambiente

Los resultados consignados en este segmento corresponden al capítulo 3 de la tesis, y serán sometidos como artículo científico en la revista *Agroforestry Systems* ISSN: 0167-4366 (Print) 1572-9680 (Online).

Interacción genotipo ambiente y estabilidad de ecotipos promisorios de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray orientados a la producción animal

J.E. Rivera^{1*}; T. E. Ruiz²; J. Chará¹; J. F. Gómez-Leyva³; R. Barahona⁴

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia; ²Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, La Habana. Cuba;

⁴Laboratorio de Biología Molecular, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México; ⁴Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Resumen

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray. es una arbustiva con excelentes características forrajeras, que ha demostrado tener amplia diversidad genética y fenotípica. El objetivo de este estudio fue evaluar bajo condiciones de trópico bajo y alto, siete genotipos destacados por su potencial para la alimentación de rumiantes, determinando la interacción GxA para la producción de MS en tres ambientes, y midiendo algunas características químicas y morfológicas bajo un diseño de bloques completos al azar. La interacción GxA se estudió con los modelos AMMI y SREG, y se incluyeron mediciones en época seca y de lluvias. Hubo diferencias en la producción de MS significativas entre los genotipos ($p < 0.05$). En el análisis GxA, la interacción resultó significativa y se observaron efectos del ambiente sobre la productividad de biomasa ($p < 0.05$). Además, fueron identificados dos genotipos estables y materiales con mayor adaptación a cada uno de los ambientes. En los tres sitios, la composición química de los materiales resultó adecuada para ser ofrecida a rumiantes, aunque la época tuvo efecto sobre algunas de estas variables ($p < 0.05$). Es de destacar los altos contenidos de PC (28.89 ± 2.66 g/100 g de MS), los bajos contenidos de fibra (30.95 ± 0.89 g de FDN/100 g de MS), el buen aporte de energía bruta (4.21 ± 0.055 Mcal/kg de MS) y los altos porcentajes de degradación *in vitro* de la MS (más del 75%). Se concluye que existen genotipos superiores de *T. diversifolia* con la capacidad de tener mejor desempeño productivo y de adaptación tanto para fincas de trópico de altura como para aquellas ubicadas en trópico bajo con suelos de poca fertilidad. Adicionalmente, se destaca que el forraje de esta especie contiene una alta cantidad de nutrientes aún cuando crece bajo diferentes condiciones ambientales, razón por la cual *T. diversifolia* es una excelente alternativa forrajera para distintos escenarios de producción.

Palabras clave: adaptación edafoclimática, análisis multivariado, diversidad genética modelo SREG, oferta de nutrientes, productividad forrajera.

Abstract

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray. It is a shrub with excellent forage characteristics, which has been shown to have wide genetic and phenotypic diversity. The objective of this study was to evaluate, under lowland and highland tropical conditions, seven genotypes noted for their potential for feeding ruminants, determining the GxE interaction for DM production in three environments, and measuring some chemical and morphological characteristics under a randomized full block design. The GxE interaction was studied with the AMMI and SREG models and included measurements in the dry and rainy season. There were significant differences in DM production between genotypes ($p < 0.05$). In the GxE analysis, the interaction was significant and effects of the environment on biomass productivity were observed ($p < 0.05$). In addition, two stable genotypes and some with greater adaptation to each of the environments were identified. In the three sites, the chemical composition of the materials was adequate to be offered to ruminants, although the season had effect on some of these variables ($p < 0.05$). It is worth noting the high content of PC (28.89 ± 2.66 g/100 g of DM), the low fiber content (30.95 ± 0.89 g of NDF/100 g of DM), the good contribution of gross energy (4.21 ± 0.055 Mcal/ kg DM) and the high percentages of *in vitro* DM degradation (more than 75%). It is concluded that there are superior genotypes of *T. diversifolia* with the ability to have a better productive and adaptive performance both for highland tropical farms and for those located in the lowland tropics with low fertility soils. Additionally, it is highlighted that the forage of this species contains a high quantity of nutrients even when it is grown under different environmental conditions, which is why *T. diversifolia* is an excellent forage alternative for different production scenarios.

Keywords: Genetic diversity, edaphoclimatic adaptation, forage productivity, multivariate analysis, nutrient supply, SREG model.

Introducción

La identificación y evaluación de diferentes genotipos en especies forrajeras, debe ser el punto de partida para seleccionar aquellos que tengan mayor número de características deseables (Ruiz *et al.*, 2013; Holguín *et al.*, 2015). Actualmente es necesario adelantar evaluaciones con el objetivo de identificar germoplasma élite de especies adaptadas a condiciones marginales como son los suelos ácidos y de baja calidad de los trópicos y subtrópicos a fin de contribuir al mejoramiento de la producción animal en el trópico (Calsavara *et al.*, 2016).

En la selección de forrajeras, la determinación de la influencia de factores ambientales en la calidad y sus posibles interacciones con los genotipos de interés debe ser la base para identificar fuentes nutricionales más eficientes y económicas para fortalecer los sistemas agropecuarios (Schultze-Kraft *et al.*, 2018). Durante los últimos años los modelos AMMI (*Additive main effects and multiplicative interaction*) y SREG (*Biplot method using sites regression*) han sido herramientas útiles para determinar la interacción genotipo ambiente en cultivos agrícolas (Bhartiya *et al.*, 2017; Carter *et al.*, 2018). Estos modelos incluyen un análisis de varianza y otro de componentes principales (ACP), donde el análisis de varianza permite estudiar los efectos principales de los genotipos y ambientes y el de CP la interacción GxA la cual es tratada de forma multivariada para su interpretación de forma gráfica (Alejos *et al.*, 2006).

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray. cuenta con excelentes características forrajeras bajo diferentes ambientes, aunque también ha mostrado una amplia variedad fenotípica, la cual posibilita la identificación de genotipos destacados capaces de lograr una mayor productividad (Ruiz *et al.*, 2013; Holguín *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2016; Rivera *et al.*, 2019). Esta especie, se ha estudiado en distintas condiciones edafoclimáticas, siendo evidente un alto grado de diversidad genética, y de variabilidad en sus propiedades agronómicas, contenido de nutrientes y adaptabilidad (Ruiz *et al.*, 2013; Holguín *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Rivera *et al.*, 2019).

Con el objetivo de identificar genotipos de *T. diversifolia* estables y de mayor potencial para la alimentación animal tanto en condiciones de trópico bajo como alto, en este estudio se evaluó la interacción genotipo x ambiente de materiales colectados en diferentes lugares de Colombia por medio de modelos multivariados.

Materiales y métodos

Identificación de genotipos

Para llevar a cabo el presente estudio, se seleccionaron siete genotipos de *T. diversifolia* a partir de resultados previos (Capítulo 2). Se usó el análisis de agrupamiento UPGMA (*unweighted pair-group method*) basado en el índice de disimilitud de Dice y el índice de potencial forrajero ponderado (IPFP), el cual relaciona características de interés de las colectas en un análisis de componentes principales (ACP), para comparar e identificar materiales con mayor potencial forrajero (Holguín *et al.*, 2015). El modelo matemático usado para determinar el IPFP se muestra en la ecuación 1:

$$\sum_{n=1}^n F(1) \left(\frac{X_i(\text{intr}) - X(i)}{S(i)} \right)$$

Ecuación 1. índice de potencial forrajero ponderado (IPFP)

Donde:

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

$\bar{X}(i)$: promedio general de la característica i -ésima considerando todas las introducciones

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

$F(1)$: Factor de ponderación determinado con base al peso de las comunales constituidas con la matriz de correlaciones de las variables originales según el ACP.

Si bien con el agrupamiento UPGMA construido en el capítulo 2 se obtuvieron cuatro grupos a un corte en 0.8 de disimilitud según el índice de Hubert, para este trabajo se usó una disimilitud de 0.4 con el fin de incluir un mayor número de materiales en el estudio. Dentro de cada uno de los grupos formados a un corte de 0.4, se asumió similitud genética y con base en el mayor IPFP al interior de cada conjunto fueron seleccionados los genotipos a evaluar. Para el ACP se utilizaron las librerías “*devtools*” y “*FactoMineR*” de la herramienta R-Studio Versión 1.1.447 (R Core Team, 2019).

Localización de parcelas experimentales

El estudio fue realizado en dos sitios y bajo tres condiciones ambientales (Ambiente 1: Trópico bajo sin fertilización – REG1; Ambiente 2: Trópico bajo con fertilización – REG1Fert; Ambiente 3: Trópico alto sin Fertilización – REG2). Para la selección de los sitios, se utilizaron los criterios de representatividad edafoclimática del lugar y la potencialidad de crecimiento de *T. diversifolia* (precipitación, temperatura, radiación solar, suelo y vocación ganadera).



Figura 1. Localización de los sitios de trabajo

Las parcelas experimentales correspondientes a los Ambientes 1 y 2 fueron establecidas en el Predio El Porvenir (3°47'21.43"N, 73°49'15.93"O), localizado en el municipio de San Luis de Cubarral (Meta, Colombia) a 530 msnm, con una precipitación media anual de 4100 mm, una temperatura promedio de 24.8 °C y bajo la zona de vida de bosque húmedo tropical (bh-T) (Holdridge, 1986). Las parcelas del Ambiente 3 se establecieron en el predio Los Alpes, municipio de Villamaría (Caldas, Colombia), (5°0'44.92"N, 75°25'47.28"O), a una altitud de 2300 msnm, con una temperatura media de 15 °C y una precipitación anual de 2850 mm año, lo que corresponde con un bosque húmedo montano bajo (bmh-MB) (Holdridge, 1986).

Establecimiento de parcelas experimentales

Para cada uno de los tres ambientes se establecieron parcelas experimentales con los siete genotipos identificados. Las plantas usadas se propagaron en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente (Rionegro, Antioquia-Colombia) a partir de una reproducción clonar por explantes con el fin de asegurar homogeneidad genética. Cada una de las parcelas de 30.35 m² estuvo conformada por 36 plantas sembradas a una distancia tanto entre plantas como entre surcos de 0.8 m. A nivel de sitio, todas las parcelas estuvieron bajo los mismos manejos agronómicos y actividades de siembra. En San Luis de Cubarral fueron evaluadas parcelas sin y con un nivel de fertilización acorde a la extracción de nutrientes previamente reportado para plantas de *T. diversifolia* (Botero, 2017) (Ambiente 2). Según este autor, plantas de *T. diversifolia* de 40 días extraen 8.26 g de nitrógeno, 4.3 g de potasio y 1.07 g de fósforo. Esta cantidad de nutrientes fue aplicada fertilizando con urea (46% de N), fosfato de amónico (DAP) ((NH₄)₂HPO₄) (46% de P₂O₅, 18% de N) y cloruro de potasio (KCl, K₂O del 60 al 63% y Cl del 45 al 47%) a razón de 16.22, 2.15 y 4.89 g/planta de urea, DAP y KCL, respectivamente.

Análisis de suelos

Las variables químicas y físicas medidas en el suelo fueron: pH, Conductividad eléctrica (C.E.) (dS/m), Densidad aparente (g/cc), Carbono orgánico (%), Materia orgánica (%), Textura, Potasio intercambiable (mg/kg), Calcio intercambiable (mg/kg), Magnesio intercambiable (mg/kg), Sodio intercambiable (mg/kg), Acidez intercambiable (mg/kg), Hierro (mg/kg), Manganeso (mg/kg), Cobre (mg/kg), Zinc (mg/kg), Boro (mg/kg), Fósforo (mg/kg), Azufre (mg/kg) y Capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.E.) (meq/100g).

Medición de condiciones ambientales

Durante todo el periodo de muestreo las variables precipitación (mm), temperatura (°C), humedad (%), radiación solar (W/m²), punto de rocío (°C), velocidad del viento (m/s) e índice THSW (Sensación térmica a causa del viento, la humedad relativa, la irradiancia (radiación solar instantánea) y la temperatura °C) fueron monitoreadas por medio de una estación meteorológica Vantage Pro 2™ (Davis ®).

VARIABLES MORFOLÓGICAS Y QUÍMICAS

Las variables agronómicas y morfológicas evaluadas fueron: (1) altura de la planta (Altplan, cm), (2) expansión lateral (ExLat, cm), (3) diámetro de los tallos (DiamT, mm), (4) número de hojas verdes (HojV, n), (5) hojas marchitas (HojM, n) y (6) hojas muertas por planta (HojMue, n), (7) relación hoja tallo (RHT), (8) número de ramas (R, n), (9) área de la hoja (ArH, cm^2), (10) peso de las hojas verdes (PHojV, g), (11) marchitas (PHojM, g) y (12) muertas por planta (PHojMue, g), (13) peso de los tallos (PesT, g), (14) forraje verde por planta (ForrV, g), (15) materia seca por planta (MS, g), (16) supervivencia (Sup, %), (17) área del dosel (ArD, cm^2), (18) altura a la primera hoja (AltPH, cm) y (19) presencia de plagas o enfermedades.

Las mediciones de altura del dosel, expansión lateral y altura de la primera hoja se hicieron por medio de una cinta métrica a partir de la base del tallo principal de cada planta. Para medir el diámetro de tallo se utilizó un Vernier y el número de hojas verdes, marchitas y muertas por planta se midió mediante conteo manual de cada una de ellas. El área del dosel se determinó con base en la ecuación del área de un círculo tomando la medida de dos diámetros perpendiculares del dosel y cada uno dividiéndolo entre 2 para luego ser usados en la ecuación 2.

$$A = \pi (D1/2 * D2/2)$$

Ecuación 2. Área de una circunferencia

Donde, D es el diámetro y π : 3.14159.

Para determinar el área foliar se tomaron diez hojas al azar de cada planta, las cuales fueron fotografiadas y analizadas en el software ImageJ® 1.47v. El peso de las hojas verdes, marchitas y muertas por planta, así como el peso de los tallos y forraje verde fueron determinados a nivel de campo mediante una balanza electrónica ES-PS01 Dr. Meter con una exactitud de 5 g. El contenido materia seca (MS) se determinó en laboratorio en una estufa de aire forzado a 60 °C. La presencia de plagas se calificó en cada una de las parcelas al observar durante un minuto la presencia de plagas con evidente daño en el material vegetal. En caso de haber presencia de plagas se calificaron los daños de 1 a 3, siendo 1 daño bajo y 3 daño grave. También se buscó identificar el organismo causal, es decir si el daño fue hecho por un cortador, chupador o por hongos. Los daños fueron definidos así: 1: 1 a 10% de daño; 2: de 11 al 30% y 3: >31%. Estos porcentajes fueron establecidos a partir del número de hojas afectadas en las cinco plantas evaluadas.

Finalmente, las valoraciones químicas y nutricionales estuvieron alrededor de las fracciones: (1) contenido de humedad y otras materias volátiles (MS, g/100 de MS), (2) proteína cruda (PC g/100 de MS), (3) Cenizas (Cen g/100 de MS), (4) extracto etéreo (EE

g/100 de MS), (5) fibra en detergente neutra (FDN g/100 de MS), (6) fibra en detergente ácida (FAD g/100 de MS), (7) Calcio (Ca g/100 de MS), (8) Fósforo (P g/100 de MS), (10) total de nutrientes digestibles (NDT g/100 de MS), (11) digestibilidad de la MS (Dig g/100 de MS), (12) energía bruta (EB, Mcal/kg de MS) y (13) energía neta de lactancia (Enl, Mcal/kg de MS). Estas variables fueron determinadas en el laboratorio de Nutrición Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) por medio de espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS) utilizando las ecuaciones generadas para recursos forrajes del trópico colombiano (Ariza-Nieto, *et al.*, 2018) y el porcentaje Ca y P se determinó por espectrofotometría AA y UV- VIS basado en NTC 5151 (2003) y 4981 (2001), respectivamente. Estas variables fueron determinadas una vez durante la época de lluvias y otra vez durante la de sequía.

Las variables morfológicas se midieron durante cuatro cortes en cinco plantas por parcela. Para el predio Los Alpes, trópico de altura, los cortes se realizaron cada 60 días y en el predio El Porvenir cada 40 días. Los periodos de corte se establecieron con base en los tiempos habitualmente usados para el pastoreo de las gramíneas usadas en cada zona.

Interacción genotipo ambiente, diseño experimental y análisis de la información

Para el análisis de las variables de productividad y de contenido de nutrientes a nivel de sitio se usó un diseño de bloques completos al azar. El modelo matemático se presenta en la ecuación 3.

$$y_{klj} = \mu + \alpha_k + \gamma_l + \xi_{kl} + \beta_j + \varphi_{klj}$$

Ecuación 3. Modelo general de un diseño de bloques completos al azar

Donde:

y_{klj} = Observación en la unidad experimental de la variable a evaluar; μ = es la media del efecto general; α_k = efecto del factor k (materiales colectados 1, 2, 3...7); γ_l = efecto del factor l (nivel de fertilización 1,2...); β_j = efecto del bloque j; ξ_{kl} = interacción de los dos factores; φ_{klj} = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental lkj .

Para el análisis de la interacción genotipo ambiente (GxA), se utilizaron dos métodos no paramétricos: el análisis tipo AMMI (por sus siglas en inglés *Additive main effects and multiplicative interaction*) (Mandel, 1971), y el análisis SREG (análisis de regresión de sitios) (Yan *et al.*, 2000), además de gráficas Biplot. La estabilidad de los materiales a través de los tres ambientes se midió usando el índice de estabilidad de la varianza de Shukla (Kang, 1993).

La expresión matemática del análisis AMMI es la siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + e_j + \sum_{k=1}^p \lambda_k \gamma_{ik} \alpha_{jk} + \varepsilon_{ij}$$

Ecuación 4. Expresión matemática del análisis AMMI

Donde:

Y_{ij} : Es la respuesta media de un genotipo i en un ambiente j ; μ : Es la media general de las observaciones (Su estimación se hace por medio de $\hat{\mu} = \bar{Y}_{..}$); g_i : Es el efecto del genotipo i (Desvío respecto al promedio general del genotipo i , y se estima a través de $\hat{g}_i = \bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{..}$); e_j : Es el efecto del ambiente j (Desvío respecto al promedio general del ambiente j , y se estima por medio de $\hat{e}_j = \bar{Y}_{.j} - \bar{Y}_{..}$); λ_k : Es el valor propio del eje k de componentes principales; γ_{ik} : Son los vectores propios unitarios genotípicos asociados a λ_k ; α_{jk} : Son los vectores propios unitarios ambientales asociados a λ_k ; ε_{ij} : Error del genotipo i en el ambiente j ; p : Número de ejes de componentes principales considerados en el modelo AMMI.

En cuanto al modelo SREG, este fue construido utilizando el modelo básico:

$$Y_{ij} - \mu - E_j = G_i + GE_{ij}$$

Ecuación 5. Expresión básica de un modelo SREG

En la ecuación 5, el conjunto de datos de rendimiento bidireccional que comprende los genotipos (G_i) y los ambientes (E_j) se sometió a una descomposición de valor singular (DVS) para generar un análisis de componentes principales (ACP) junto con los valores de vectores propios de genotipos y ambientes. Utilizando los valores singulares del ACP y los valores de vectores propios de genotipos y ambientes, se usó el siguiente modelo:

$$Y_{ij} - \mu - E_j = \lambda_1 \xi_{i1} \eta_{1j} + \lambda_2 \xi_{i2} \eta_{2j} + e_{ij}$$

Ecuación 6. Expresión matemática de un modelo SREG con los valores singulares del ACP y los valores de vectores propios de genotipos y ambientes.

El modelo SREG esta dado por:

$$Y_{ij} = \mu_j + \sum_{k=1}^p \lambda_k \gamma_{ik} \alpha_{jk} + \varepsilon_{ij}$$

Ecuación 7 Expresión básica de un modelo SREG

Donde:

Y_{ij} : Es la respuesta media de un genotipo i en un ambiente j ; μ_j : Media del ambiente j para todos los genotipos y en este modelo se estima por medio de $\hat{\mu}_j = \bar{Y}_{\cdot j}$; λ_k : Es el valor propio del eje k de componentes principales; γ_{ik} : Son los vectores propios unitarios genotípicos asociados a λ_k ; α_{jk} : Son los vectores propios unitarios ambientales asociados a λ_k ; ε_{ij} : Error del genotipo i en el ambiente j ; p : Número de ejes de componentes principales considerados en el modelo SREG.

Todos los análisis fueron realizados en la herramienta RStudio usando las librerías “*gge*”, “*ggbiplot*”, “*plantbreeding*” “*GGEBiplotGUI*” y “*agricolae*” (R Core Team, 2019). Para los análisis a nivel de sitio se evaluó la normalidad, homogeneidad de la varianza y la aditividad. Además, cuando fue identificada diferencia entre las medias se utilizó la prueba de contraste de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Finalmente, cuando los grupos de datos no cumplieron con las condiciones para un análisis paramétrico, fue usada la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos.

Resultados

Identificación de genotipos

De acuerdo con el agrupamiento UPGMA y a la determinación del IPFP, los genotipos seleccionados en cada uno de los clústeres fueron: 1EPO (GEN1), 1CAQ (GEN2), 1250RVC (GEN3), 953EJC (GEN4), 225ESB (GEN5), 2785ESB (GEN6) y 2583EEC (GEN7). Para calcular el IPFP se utilizaron las variables peso de las hojas, peso de los tallos, número de ramas por planta, altura de la planta, área foliar, proteína cruda, fibra en detergente neutra, fibra en detergente ácida y porcentaje de supervivencia. En la Tabla 1 se presentan los IPFP de cada uno de materiales seleccionados.

Tabla 1. Valores del índice de potencial forrajero ponderado (IPFP) de los genotipos seleccionados.

Genotipo	Valor IPFP
1EPO (GEN1)	0.4812
1CAQ (GEN2)	0.8237
1250RVC (GEN3)	-0.2940
953EJC (GEN4)	2.4368
225ESB (GEN5)	2.5490
2785ESB (GEN6)	1.5745
2583EEC (GEN7)	6.6441

Análisis de suelos

Las características químicas y físicas de los suelos donde fueron establecidas las parcelas experimentales de ambas regiones se presentan en la Tabla 2. De acuerdo con los análisis, los suelos corresponden a suelos ácidos con diferente fertilidad.

Tabla 2. Variables químicas y físicas de los suelos donde fueron establecidas las parcelas experimentales en ambas regiones

ítem	REG1 (Meta)			REG2 (Caldas)		
	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
pH	4.71	4.7	4.67	5.54	5.39	5.43
C.E (dS/m)	0.07	0.06	0.06	0.18	0.17	0.15
Densidad aparente (g/cc)	1.51	1.46	1.44	0.98	0.98	1
Carbono orgánico (%)	1.02	0.88	0.62	4.7	4.81	4.7
Materia orgánica (%)	1.76	1.52	1.07	8.1	8.28	8.1
Arena (%)	68	60	50	34	36	42
Limo (%)	12	16	18	46	44	38
Arcilla (%)	20	24	32	20	20	20
	Fanco - Arcillo - Arenoso	Fanco - Arcillo - Arenoso	Fanco - Arcillo - Arenoso	Franco	Franco	Franco
Textura						
Potasio intercambiable (mg/kg)	23.4	23.4	15.6	89.7	105	50.7
Calcio intercambiable (mg/kg)	274	130	132	510	450	318
Magnesio intercambiable (mg/kg)	24	16.8	18	92.4	106	58.8
Sodio intercambiable (mg/kg)	23	18.4	16.1	41.4	27.6	29.9
Acidez intercambiable (mg/kg)	218	219	172	52.3	31.5	40.5
Hierro (mg/kg)	305	358	459	250	234	123
Manganeso (mg/kg)	9.6	6	3.3	25	21	8.6
Cobre (mg/kg)	1	0.75	0.53	3.6	2.5	2.3
Zinc (mg/kg)	0.7	0.4	0.4	21	21	12
Boro (mg/kg)	0.11	0.17	0.13	0.06	0.07	0.05
Fósforo (mg/kg)	7.6	3.7	5.5	13	12	16
Azufre (mg/kg)	7.8	9.6	3.6	46	18	19
C.I.C.E. (meq/100g)	3.64	3.35	2.82	3.72	3.88	2.78

Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales medidas durante el periodo de evaluación en las zonas de trabajo se muestran en las Figuras 2 y 3. Según los registros obtenidos en el sitio de experimentación 1 (REG1 y REG1Fert), la temperatura promedio fue de 25.1 ± 1.3 °C, la humedad relativa fue $77.8 \pm 9.4\%$, el punto de rocío promedio fue 20.6 ± 1.17 °C, la velocidad del viento fue de 0.68 ± 0.2 m/s, el índice THSW promedio fue 27.73 ± 1.7 °C, la radiación solar 478 ± 48.3 W/m² y la precipitación acumulada fue de 1119 mm.

Los periodos de lluvias y sequía se establecieron a partir de las precipitaciones observadas durante la evaluación. En el periodo de lluvias se presentó una precipitación acumulada de 922.6 mm (segunda mitad de la evaluación) y en la época de sequía fue de 195.4 mm. Las otras variables no presentaron diferencias considerables como se observa en la Figura 2.

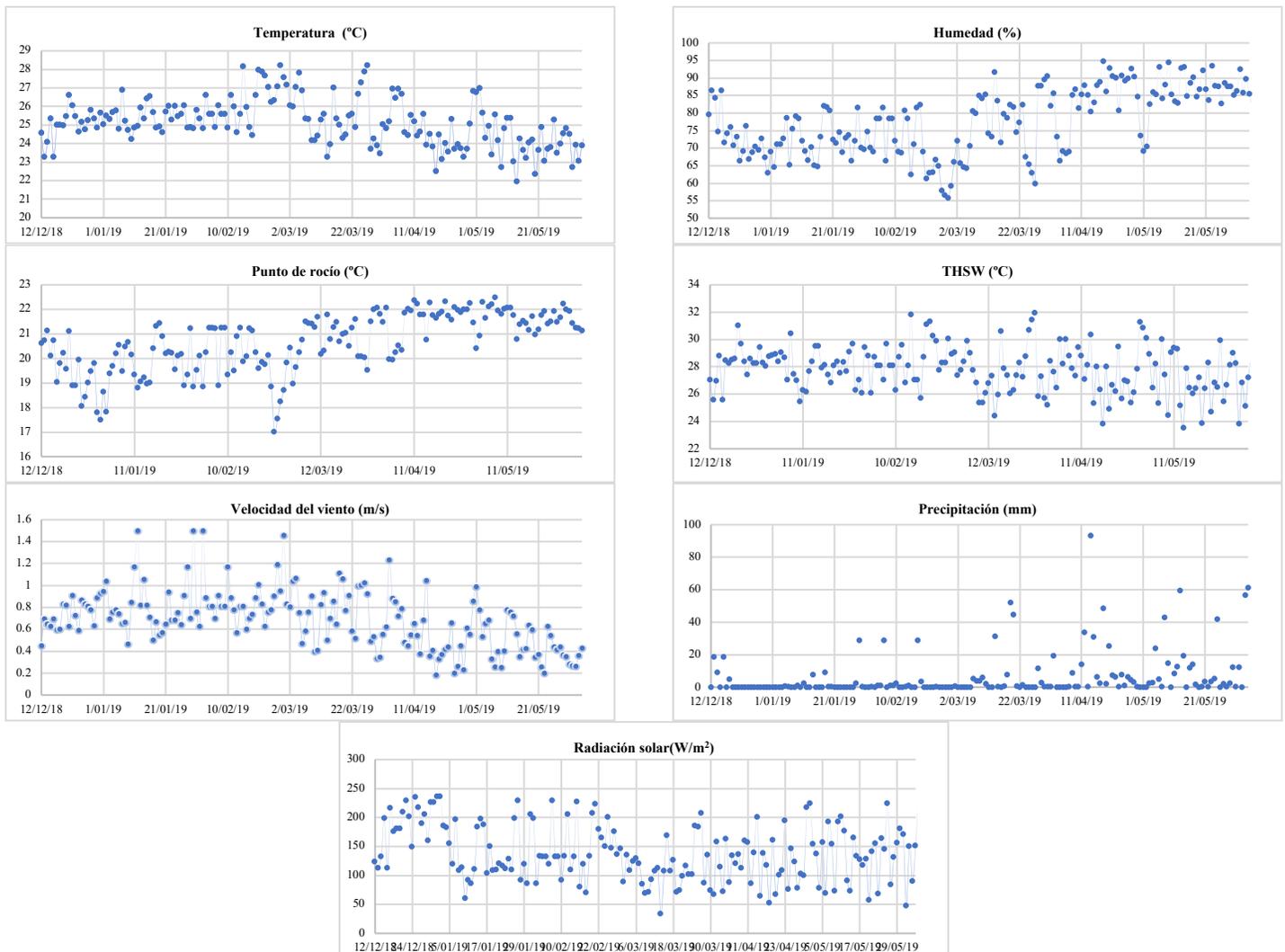


Figura 2. Condiciones ambientales presentadas durante el periodo de evaluación en la Región 1 (Ambientes 1 y 2).

De otro lado, en el sitio de experimentación 2 (REG2), la temperatura promedio fue de 15.3 ± 0.85 °C, la humedad relativa fue $87.4 \pm 5.4\%$, el punto de rocío promedio fue 13.2 ± 0.77 °C, la velocidad del viento fue de 0.42 ± 0.13 m/s, el índice THSW promedio fue 15.53 ± 1.24 °C, la radiación solar 249.98 ± 40.54 W/m² y la precipitación acumulada fue de 905.9 mm.

Durante el periodo de lluvias se presentó una precipitación acumulada de 673.6 mm (momentos 1 y 4 de muestreo) y en la época de sequía fue de 232.3 mm. Las otras variables no presentaron diferencias considerables, como se observa en la Figura 3.

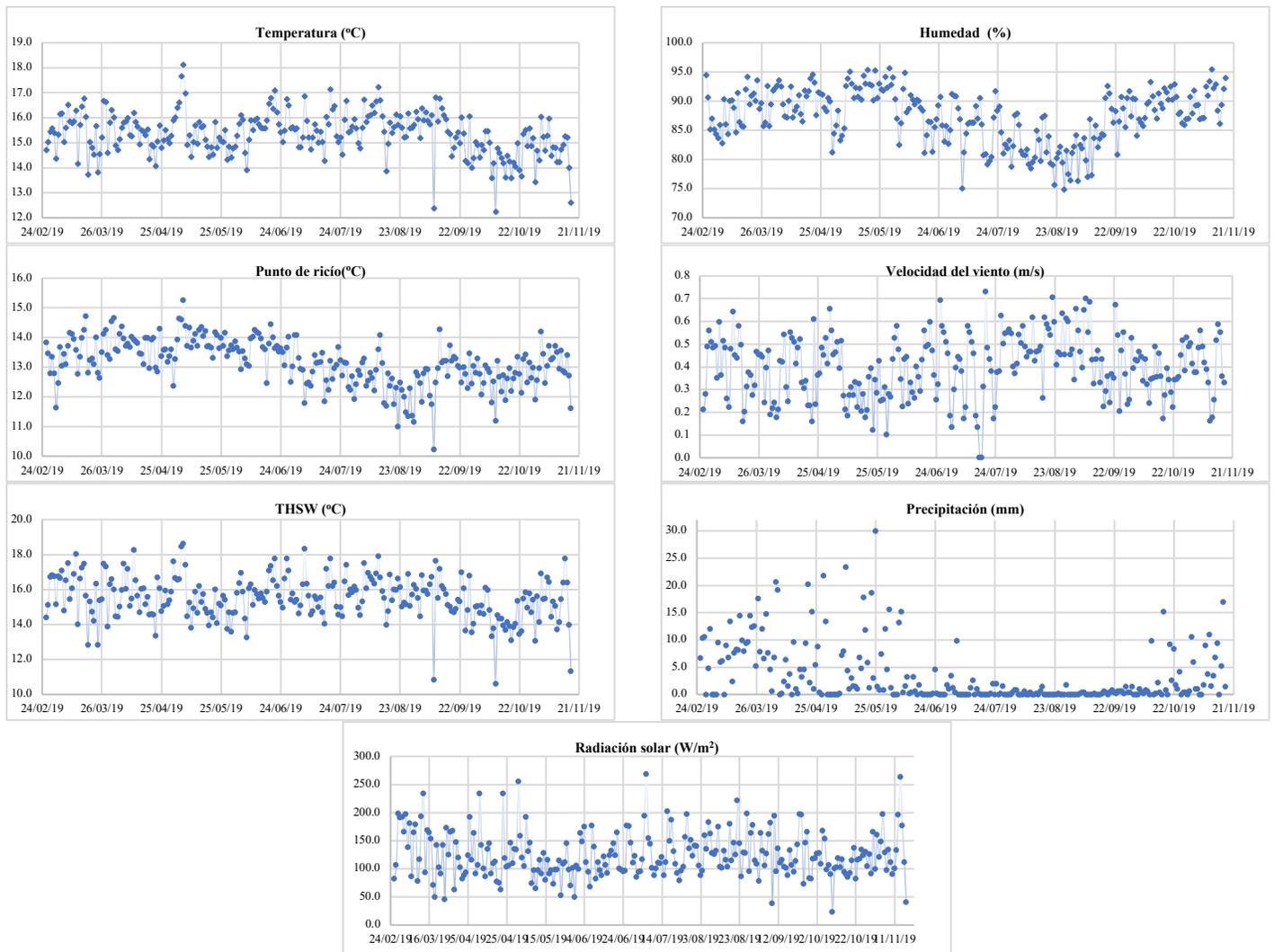


Figura 3. Condiciones ambientales presentadas durante el periodo de evaluación en la Región 2 (Ambiente 3).

Composición química y variables agronómicas

Las medidas de las variables morfológicas y agronómicas encontradas en los tres ambientes se presentan en la Tabla 3. El uso de fertilización incrementó los valores de todas las variables evaluadas, también hubo gran variabilidad entre genotipos, ambientes y épocas. Durante el periodo de evaluación solo se presentaron daños por plagas o enfermedades a un nivel 1 dado por la presencia de hormiga cortadora (*Acromyrmex* spp. y *Atta* spp.) y no hubo relación con el genotipo de *T. diversifolia*.

Tabla 3. Medidas de las variables morfológicas y agronómicas de los genotipos en ambos sitios de evaluación

Genotipo	Ambiente	AltPlan	ExLat	AltPH	DiamT	HojV	PHojV	R	PesT	HojM	PHojM	HojMue	PHojMue	RHT	ArD	ArH
Gen1	Ambiente 1	62.1bc	63.2bcd	11.1	8.75bc	193.3ab	194.4cd	9.64ab	228.8bc	30.1	18.9	48.3	4.77	0.89	789bcd	46.2c
Gen2		58.3c	58.5d	12.6	8.04c	161.1b	171.2d	8.03b	193.1c	33.0	26.2	52.6	6.24	0.98	689d	44.9c
Gen3		63.8bc	65.2bcd	12.2	8.93bc	186.4ab	196.3cd	8.72ab	215.2bc	29.5	25.6	50.1	6.35	0.96	878bcd	54.2abc
Gen4		59.7c	61.2cd	13.0	8.43c	190.4ab	161.0cd	8.42ab	193.4nc	30.1	21.1	68.5	7.01	0.93	745cd	48.7bc
Gen5		75.1ab	74.5ab	14.1	10.1ab	197.3ab	258.1b	9.75ab	276.6b	35.2	28.3	43.8	4.47	0.96	1135ab	59.4ab
Gen6		66.1bc	70.7abc	12.5	9.99ab	168.6b	218.3bc	8.75ab	248.1bc	36.2	29.4	33.5	4.15	0.91	1022abc	49.6bc
Gen7		84.5a	80.1a	14.6	10.9a	216.1a	330.1a	11.1a	358.3a	33.5	28.8	47.6	5.01	0.92	1299a	66.2a
	p- value	<0.001*	<0.001*	0.177	<0.001*	0.004*	<0.001*	0.013*	<0.001*	0.856	0.192	0.422	0.392	0.929	<0.001*	<0.001*
	EEM	2.07	1.74	0.38	0.28	6.21	11.33	0.48	11.40	2.09	1.38	6.40	0.69	0.04	47.99	2.95
	Efecto época	<0.001*	0.008	0.115	0.004	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.004*	<0.001*	0.0102*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.006*	<0.001*
	Verano	60.6	70.1	12.2	9.71	212.8	185.3	6.55	264.7	42.1	28.7	81.3	9.01	0.71	1015	36.73
	Lluvias	72.6	64.2	13.4	8.72	159.9	247.7	11.6	221.7	22.6	21.9	17.3	1.84	1.14	844	67.92
Gen1	Ambiente 2	98.6c	83.1b	16.1	11.3b	246.5	369.2b	11.4ab	481.8b	38.4b	39.8ab	71.1	7.28	0.78	1373b	74.01b
Gen2		97.9c	89.8ab	14.1	11.4b	253.1	418.3b	11.1ab	503.3b	39.7b	38.8ab	56.6	5.69	0.83	1644ab	71.3b
Gen3		90.4c	87.5b	14.6	12.1ab	253.6	368.6b	10.1b	434.3b	35.1b	35.9b	52.7	5.33	0.86	1540b	75.3b
Gen4		92.3c	80.9b	14.6	11.1b	289.6	392.9b	12.6ab	480.2b	38.0b	33.2b	94.2	8.53	0.83	1294b	74.9b
Gen5		117.1ab	90.8ab	17.4	13.2a	265.4	509.8ab	12.4ab	640.6ab	45.9ab	43.7ab	68.5	7.14	0.81	1646ab	84.4b
Gen6		103.3bc	87.2b	16.5	12.3ab	242.2	471.1ab	10.4ab	610.6ab	38.7b	40.7ab	60.8	6.58	0.8	1502b	79.8b
Gen7		122.4a	102.4a	19.1	12.5ab	292.6	600.4a	13.9a	757.3a	55.1a	54.8a	77.7	8.14	0.8	2097a	102.6a
	p- value	<0.001*	0.002*	0.054	0.002*	0.088	<0.001*	0.023*	0.005*	0.003*	0.009*	0.078	0.081	0.578	0.001*	0.001*
	EEM	3.89	1.56	0.48	0.18	7.39	25.71	0.64	34.53	2.50	1.79	8.26	0.78	0.01	57.54	4.80
	Efecto época	<0.001*	0.227	0.043*	0.029*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.003	<0.001*	<0.001*	0.494	0.365	<0.001*
	Verano	82.3	87.9	15.2	11.7	293.1	319.2	8.23	399.4	54.4	45.6	114.3	2.52	0.808	1547	52.8
	Lluvias	123.5	90.4	16.9	12.3	232.3	573.5	15.2	715.9	28.8	36.6	23.2	11.4	0.824	1629	107.4
Gen1	Ambiente 3	75.5d	91.6c	16.66d	8.59c	128.3d	236.4e	13.84ab	318.51f	21.9b	23.47c	19.45bc	1.94bc	0.75a	1554d	69.1c
Gen2		100abc	99.5b	20.7c	10.35ab	145d	411.3c	16.3ab	606.4cd	19.6b	26.5bc	16c	1.61c	0.68ab	1981bc	84.1a
Gen3		86.2c	93bc	23.7abc	9.85b	132.8d	329.5d	12.3b	465.7e	19.4b	27.5bc	19.5bc	1.89bc	0.74ab	1742cd	72.3ab
Gen4		111a	114.9a	24.9a	10.98a	258.6a	620.8a	18.9a	979.3a	35.3a	44.4a	22.8abc	2.28ab	0.65b	2615a	82.8ab
Gen5		101.5ab	102b	21bc	9.97b	220.8b	430.4c	16.3ab	627.5c	25.8b	30.3bc	30.3a	2.83a	0.7ab	2063b	59.8c
Gen6		95bc	103.4b	22.5abc	9.71b	185.4c	372.4cd	15.2ab	522.1de	22.4b	29.2bc	16.5c	1.58c	0.72ab	2129b	71bc
Gen7		111.7a	114.6q	24.2ab	10.23ab	243.9ab	535.6b	18.3ab	824.9b	24.2b	30.8b	24.3ab	2.36ab	0.66ab	2613a	77.9ab
	p- value	0.003*	0.007*	<0.001*	<0.001*	0.011*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.0105*	<0.001*	<0.001*
	EEM	2.62	1.98	0.66	0.13	8.26	19.35	0.62	32.92	0.98	1.13	0.95	0.08	0.01	76.69	2.01
	Efecto época	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.014	0.157	<0.001*	<0.001*	0.948	0.484	0.122	0.0736	0.116	<0.001*	<0.001*	<0.001*
	Verano	89.1	95.9	19.1	9.74	183.8	395.9	12.7	621.2	24.4	31.2	20.1	2.01	0.65	1822	65.9
	Lluvias	104.2	107.9	24.7	10.2	191.9	443.1	18.9	620.1	23.5	29.3	22.5	2.16	0.74	2378	78.9

Altplan (cm): altura de la planta; ExLat (cm): expansión lateral; AltPH (cm) altura a la primera hoja; DiamT (mm): diámetro de los tallos; HojV (n): número de hojas verdes; PHojV (g): peso de las hojas verdes; R (n): número de ramas; PesT (g): peso de los tallos; HojM (n): número de hojas marchitas; PHojM (g): peso de las hojas marchitas; HojMue (n): número de hojas muertas; PHojMue (g): peso de las hojas muertas; RHT: relación hojas tallos; ArD (cm²): área del dosel; ArH (cm²): área de la hoja. EEM: error estándar de la media, *Letras diferentes en una misma columna denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05).

En la Tabla 4 y Tabla 5 se presentan los resultados de las variables químicas evaluadas en ambos sitios. En REG1 (Ambientes 1 y 2) no se encontraron diferencias entre los materiales de *T. diversifolia*, pero sí se presentaron diferencias frente a la pastura testigo *U. brizantha* mostrando todos los genotipos mayor oferta de nutrientes que la forrajera base.

La época tuvo efecto sobre todos los parámetros con excepción del contenido de FDN y de EB. Adicionalmente el uso de fertilizante no tuvo efectos en los parámetros de extracto etéreo, cenizas y FDN y hubo interacción fertilización x época en los contenidos de FDN, FDA, Ca y EB.

De otro lado en el ambiente 3 (REG2), existieron diferencias entre materiales y de estos frente al forraje base *C. clandestinus*. La PC, EE, FDN, FDA, NDT, Dig y Enl tuvieron diferencias entre los materiales ($p < 0.05$) pero todos contaron con propiedades físicas y químicas deseables en forrajes para ser ofrecidos en rumiantes. También la época en este sitio modificó la composición química de los genotipos evaluados (Tabla 4).

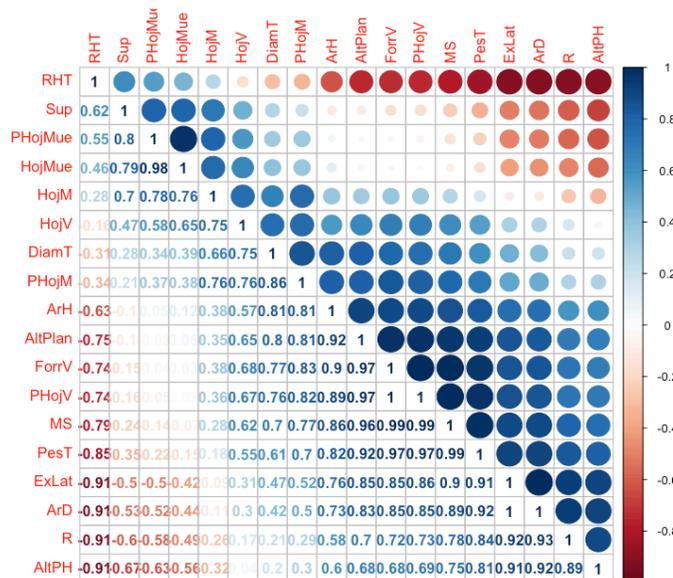


Figura 4. Correlación de las variables agronómicas de los genotipos de *T. diversifolia*.

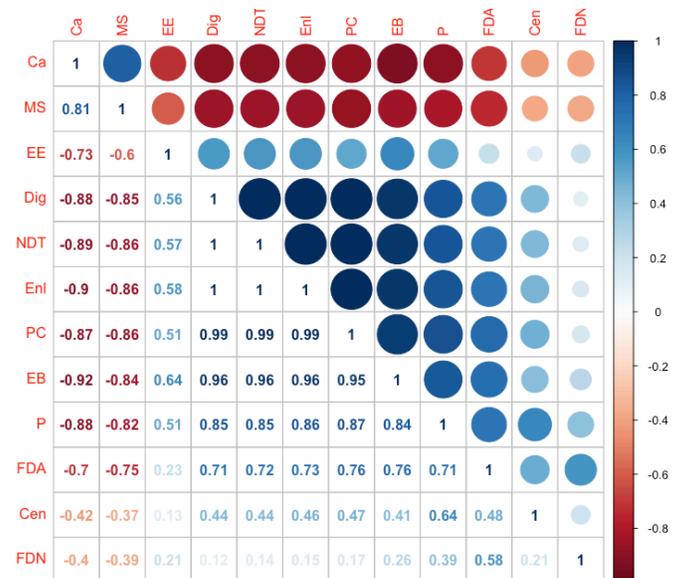


Figura 5. Correlación de las variables químicas de los genotipos de *T. diversifolia*.

Las Figuras 4 y 5 muestran la relación tanto entre características morfológicas y químicas como entre las variables agronómicas estudiadas. En términos morfológicos y agronómicos, las variables área de la hoja, área del dosel, relación hoja tallo, peso de los tallos y número de ramas fueron las que presentaron una correlación significativa y directa con la producción de MS.

Tabla 4. Composición química (g/100 g de MS; Mcal/kg) de los genotipos de *T. diversifolia* en REG1 y el efecto de la época y la fertilización.

Parámetro	Genotipo							Fertilización		Época		U. brizantha	Genotipo	Época	Fertilización	Época x Fertilización	EEM
	Gen1	Gen2	Gen3	Gen4	Gen5	Gen6	Gen7	No	Si	Lluvias	Seca						
MS	15.9	16.1	15.7	16.2	15.8	15.9	15.8	16.3	15.5	14.6	17.2	21.7*	0.667	<0.001*	<0.001*	0.500	0.208
PC	31.8	30.3	31.5	29.5	31.6	31.0	31.9	29.2	33.0	29.0	33.1	10.9*	0.388	<0.001*	<0.001*	0.522	0.550
Cen	14.9	14.6	15.2	14.6	15.1	15.1	14.8	14.8	15.0	14.4	15.3	7.9*	0.257	0.003*	0.235	0.393	0.161
EE	2.05	2.14	2.07	2.25	2.05	2.14	1.95	2.11	2.07	1.48	2.71	1.59*	0.305	<0.001*	0.514	0.280	0.075
FDN	30.8	31.3	30.5	31.5	31.6	31.3	31.2	30.9	31.5	30.8	31.5	65.3*	0.878	0.115	0.214	0.035*	0.701
FDA	14.7	14.1	14.3	13.2	15.2	14.2	14.6	13.2	15.5	12.4	15.8	48.5*	0.431	<0.001*	0.005*	0.003*	0.713
Ca	2.14	2.04	2.07	2.06	1.90	2.13	1.97	2.28	1.81	1.84	2.25	0.40*	0.575	<0.001*	<0.001*	0.049*	0.049
P	0.44	0.46	0.47	0.45	0.49	0.47	0.47	0.44	0.49	0.53	0.40	0.19*	0.191	<0.001*	0.004*	0.718	0.010
NDT	74.8	73.5	74.4	73.2	74.3	74.0	74.6	73.0	75.3	75.2	73.1	51.7*	0.177	0.003*	0.001*	0.599	0.503
Dig	81.5	80.2	81.2	79.9	81.0	80.7	81.4	79.6	82.1	82.1	79.5	57.7*	0.132	<0.001*	<0.001*	0.156	0.012
EB	4.27	4.24	4.25	4.22	4.25	4.24	4.27	4.21	4.28	4.25	4.29	4.09*	0.381	0.707	0.004*	0.031*	0.527
Enl	1.72	1.69	1.71	1.68	1.71	1.70	1.71	1.67	1.73	1.73	1.67	1.14*	0.177	<0.001*	<0.001*	0.510	0.010

MS: materia seca; PC: proteína cruda; Cen: cenizas; EE: extracto etéreo; FDN: fibra en detergente neutra; FDA: fibra en detergente ácida; Ca: calcio; P: fósforo; NDT: nutrientes digestibles totales; Dig: digestibilidad; EB: energía bruta; Enl: energía neta de lactancia; EEM: error estándar de la media; *Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05).

Tabla 5. Composición química (g/100 g de MS; Mcal/kg) de los genotipos de *T. diversifolia* en REG2 y el efecto de la época.

Parámetro	Genotipo							Época		C. clandestinus	Genotipo p- value	Época	EEM
	Gen1	Gen2	Gen3	Gen4	Gen5	Gen6	Gen7	Lluvias	Seca				
MS	16.3	16.6	17.3	17.1	17.3	17.5	17.0	16.7	17.3	18.1*	0.058	0.005*	0.127
PC	27.1ab	28.7a	27.1ab	29.5a	28.9a	25.4b	26.2b	27.5	27.1	20.9*	0.005*	0.879	0.292
Cen	14.7	15.1	14.4	15.1	14.6	15.1	14.4	14.5	15.0	12.1*	0.246	0.029*	0.106
EE	1.84c	2.34a	1.93bc	2.19ab	2.15abc	1.93bc	2.04abc	1.59	1.89	2.31*	0.002*	0.095	0.029
FDN	32.1a	30.9ab	29.8bc	28.5c	29.7bc	31.6a	31.1ab	28.8	32.2	44.5*	0.006*	0.008*	0.377
FDA	14.8a	13.5ab	11.4c	12.5bc	12.6bc	13.2b	13.6ab	12.3	13.9	32.7*	0.003*	0.005*	0.254
Ca	2.52	2.16	2.42	2.23	2.32	2.27	2.22	2.08	2.53	0.65*	0.055	<0.001*	0.051
P	0.38	0.40	0.36	0.41	0.38	0.36	0.38	0.35	0.41	0.35	0.382	<0.001*	0.006
NDT	71.1bc	71.9abc	71.4abc	73.2a	72.5ab	70.1c	70.9bc	71.6	71.5	63.6*	0.001*	0.8020	0.202
Deg	77.6bc	78.5abc	77.9abc	79.8a	79.1ab	76.5c	77.4bc	78.2	78.1	67.6*	0.001*	0.7978	0.218
EB	4.15	4.17	4.13	4.21	4.19	4.14	4.16	4.12	4.20	4.09	0.429	0.001*	0.012
Enl	1.62bc	1.64abc	1.63abc	1.67a	1.65ab	1.60c	1.62bc	1.64	1.63	1.34*	0.002*	0.801	0.005

MS: materia seca; PC: proteína cruda; Cen: cenizas; EE: extracto etéreo; FDN: fibra en detergente neutra; FDA: fibra en detergente ácida; Ca: calcio; P: fósforo; NDT: nutrientes digestibles totales; Deg: degradabilidad de la MS; EB: energía bruta; Enl: energía neta de lactancia. EEM: error estándar de la media; *Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05).

Si bien no se encontraron diferencias significativas particularmente en REG1 en términos de g/100 g de MS, se destaca que en la oferta total de nutrientes por planta si hubo diferencias gracias a la mayor productividad de los genotipos 7 y 5. Por ejemplo la oferta de PC fue de 29.16 y 34.77 g/planta para los genotipos 5 y 7 respectivamente, y la oferta para los genotipos 4, 2, 1, 3 y 6 la producción de PC fue de 19.95, 21.99, 22.06, 22.11 y 26.11 g/ planta de PC, respectivamente.

En el ACP realizados, los dos primeros componentes representaron el 91.3% de la variación total observada en las características agronómicas y morfológicas. El componente 1 representó el 60.3% de la variación total y las variables con mayor aporte fueron peso de los tallos (8.96%), peso de las hojas verdes (8.74%), altura de la planta (8.45%), la expansión lateral (8.22%) y el área de las hojas (7.33%). Por otro lado, en el análisis de las variables químicas las características con mayor peso en el primer componente, que representó 72.28% de la variabilidad total, fueron: PC (10.83%), EB (10.46%), NTD (10.35%), Dig (10.30), Ca (9.89%), P (9.55%) y MS (9.47%); la FDN fue la variable con mayor aporte en el componente 2 (10.4% de la variación total) con un 56.34%.

Interacción genotipo x ambiente

En los ambientes REG1 y REG1Fert los materiales con mayor rendimiento fueron el Gen7 (106.51 g) y el Gen5 (85.92 g), y los materiales con menor rendimiento de MS fueron el Gen1, Gen4 y Gen3 con un promedio de 65.85, 68.67 y 73.54 g de materia seca cada 40 días. La Figuras 6 y la Figura 7 muestran la representación gráfica de cada uno de los materiales en cada ambiente de acuerdo con su rendimiento de MS.

En promedio la producción de MS en la época de lluvias fue de 1.4 veces superior frente a lo encontrado en la época de baja precipitación, y el uso de fertilizante en promedio incrementó la MS/planta en un 98.6% siendo esta diferencia mayor en época de lluvias (2.3 veces). Los materiales con mayor respuesta a la fertilización fueron genotipos 2, 4 y 6 y los de menor respuesta fueron los genotipos 7 y 3. De otro lado los genotipos con mejor respuesta a la época sequía, representada con una menor disminución de la producción de biomasa frente la época de lluvias, fueron los genotipos 3, 1 y 2, aunque ninguno de estos estuvo en el grupo de genotipos con mejor desempeño bajo estas condiciones. Los genotipos 4 y 1 fueron los que mayor aportaron a la variabilidad al encontrar más alejados de los ejes representados por cada uno de los ambientes en REG1.

Para el caso de la zona REG2 (Figura 8), los materiales con mayor producción fueron el Gen4 y el Gen7 con rendimiento de MS por planta de 152.63 y 128.87 g, respectivamente, a pesar de describir una mayor variabilidad. En cuanto a los materiales con menor rendimiento fueron los Gen1, Gen3 y Gen6 con 63.58, 82.73 y 94.42 g de MS/planta cada 60 días. En esta zona los materiales en promedio disminuyeron su rendimiento en un

13.5% comparando la época de lluvias con la de sequía y los materiales con menor efecto de la época fueron el Gen5 y Gen6.

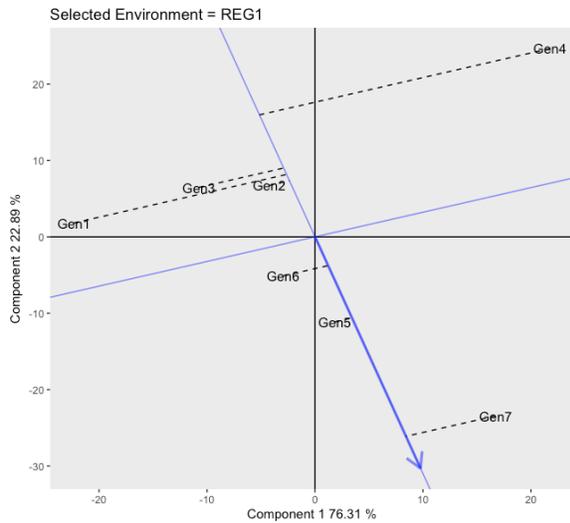


Figura 6. Representación GGEplot del rendimiento de materia seca de los genotipos evaluados de *T. diversifolia* en REG1 sin uso de fertilizante

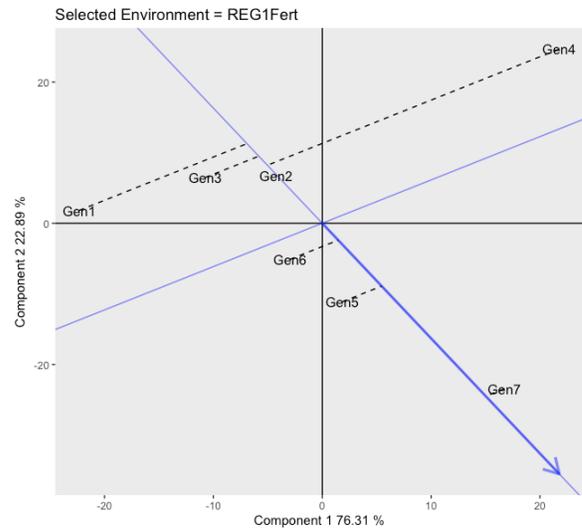


Figura 7. Representación GGEplot del rendimiento de materia seca de los genotipos evaluados de *T. diversifolia* en REG1Fert (con uso de fertilizante)

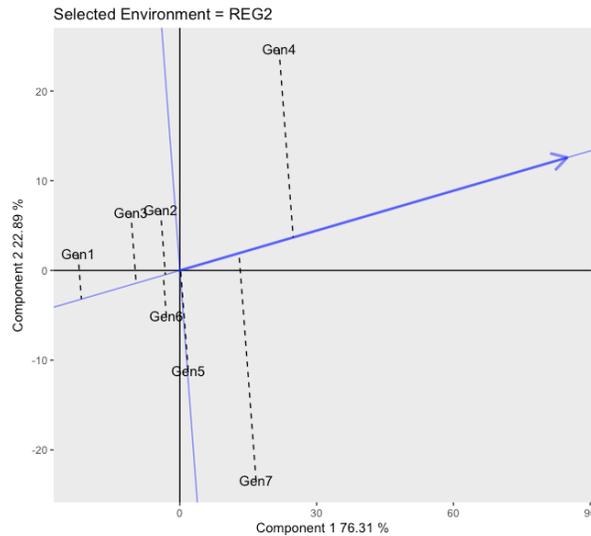


Figura 8. Representación GGEplot del rendimiento de materia seca de los materiales evaluados de *T. diversifolia* en REG2

En el análisis de varianza del modelo AMMI (Tabla 6), tanto los genotipos como los ambientes y la interacción GxA presentaron diferencias significativas para el rendimiento

de MS por planta ($p < 0.05$). Esta condición se presenta gráficamente en la Figura 9 donde los materiales Gen7 y Gen5 son asociados a mejores rendimientos en las zonas REG1 y REG1Fert, y Gen4 en REG2. Las gráficas GGEPlot son herramientas ilustrativas basadas en un análisis de componentes principales para asociar genotipos con ambientes de acuerdo con la cercanía de sus coordenadas. De otro lado Gen7 y Gen5 fueron identificados como genotipos ideales por encontrarse más cercanos al origen de las circunferencias presentadas en la Figura 10.

Tabla 6. Análisis de varianza del modelo AMMI para la interacción GxA de la producción de materia seca

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	% de la variación	Pr(>F)	
Ambiente	2	72305	36152	98.55	53.26	0.000026	***
REP(Ambiente)	6	2201	367	1.237	1.621	0.294	
Genotipo	6	32820	5470	18.44	24.17	2.77E-14	***
Ambiente : Genotipo	12	28418	2368	7.98	20.93	2.97E-10	***
Residuales	99	29360	297				

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Coeff var promedio MS

19.45 88.50

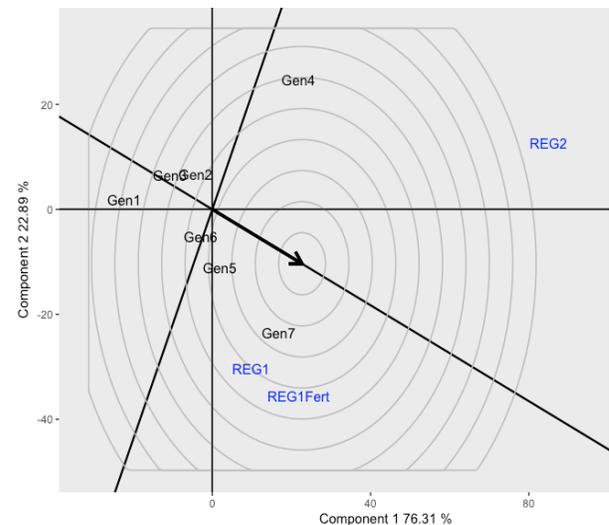
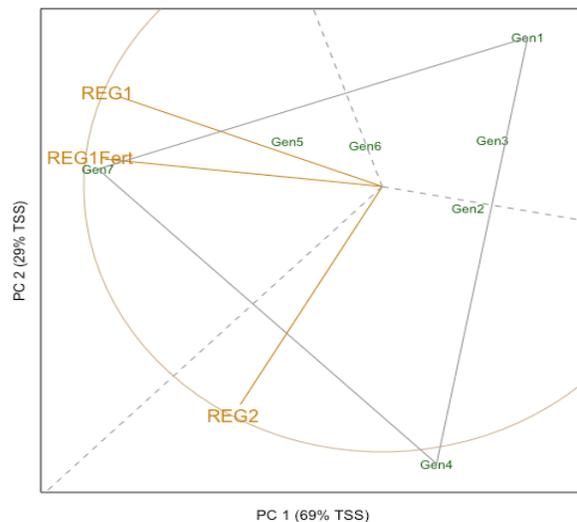


Figura 9. Representación GGEplot del rendimiento de materia seca de los genotipos evaluados de *T. diversifolia* bajo los tres ambientes trabajados

Figura 10. Ranking de los genotipos respecto al genotipo ideal

Estabilidad de los materiales a través de los ambientes

En la Tabla 7 se muestran los índices de estabilidad de Shukla como indicador de la capacidad de los materiales para mantener su rendimiento productivo a través de los tres ambientes incluidos en el análisis de interacción GxA.

Tabla 7. Estabilidad de los genotipos de *Tithonia diversifolia* evaluados según el índice de Shukla (Kang, 1993) a través de tres ambientes

Genotipo	Rendimiento (MS)	Rank	Adj.rank	Adjusted	Stab.var	Stab.rating	YSi
Gen1	64.7	1	-3	-2	2639.2	-8	-10
Gen2	80.4	3	-2	1	-65.02	0	1
Gen3	74.5	2	-3	-1	131.8	0	-1
Gen4	99.5	6	3	9	5620.6	-8	1
Gen5	95.56	5	2	7	23.9	0	7 +
Gen6	87.6	4	-1	3	225.3	-4	-1
Gen7	117.2	7	3	10	-103.5	0	10 +

Rendimiento (MS): 88.52; YS Mean: 1; LSD (0.05): 5.42; + selected genotype

Según el índice de Shukla, los Gen7 y Gen5 fueron los genotipos más estables, esto debido a su relativo alto rendimiento productivo a través de los ambientes estudiados. Si bien el Gen4 presenta un rendimiento promedio alto dentro del grupo de materiales, no cuenta con estabilidad ya que en los ambientes REG1 y REG1Fert tuvo una baja productividad.

Finalmente, también se encontró interacción GxA en la supervivencia de los materiales durante el periodo de experimentación (Figura 11). El promedio de supervivencia al finalizar el experimento en REG1 y REG1Fert fue de 82.32% con efecto de la fertilización ($p=0.0068$). En REG2 el promedio fue de 65.78% con diferencias significativas entre los materiales y frente los porcentajes observados en REG1 y REG1Fert ($p<0.0001$).

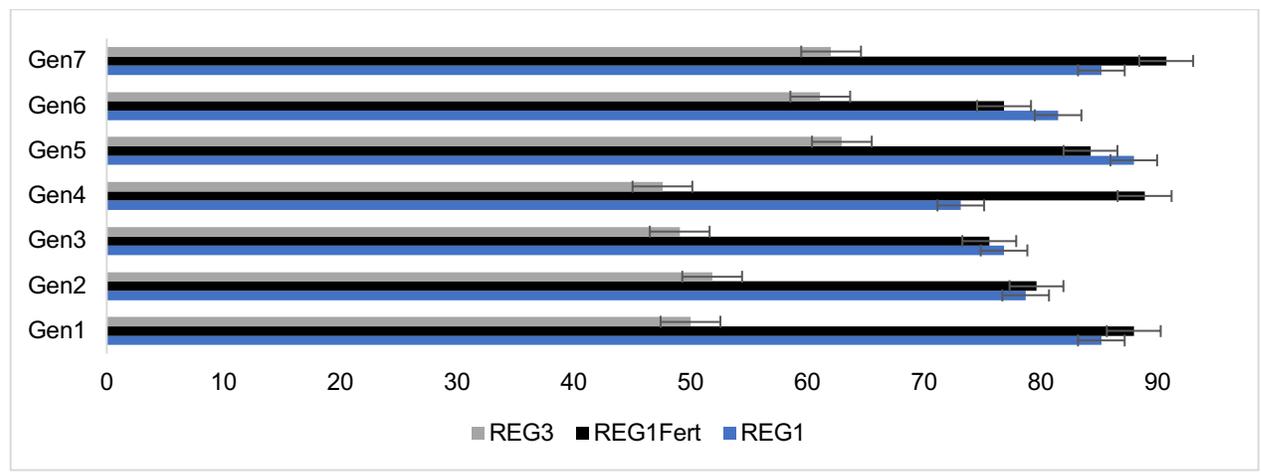


Figura 11. Supervivencia de los genotipos de *Tithonia diversifolia* evaluados en los dos sitios de trabajo

Discusión

Diferentes estudios han evaluado ecotipos de *T. diversifolia* con el objetivo de identificar materiales destacados para la producción forrajera y oferta de nutrientes (Ruiz *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013; Holguín *et al.*, 2015). A pesar de que estas evaluaciones han identificado diferencias significativas y posibilidad de seleccionar ecotipos sobresalientes, no se han reportado estudios de interacción genotipo por ambiente de esta especie. Adicionalmente, esta evaluación determina la adaptabilidad de *T. diversifolia*, el efecto del ambiente sobre su composición química, la supervivencia y el efecto de la fertilización sobre la producción de MS, las variables agronómicas y la oferta de nutrientes.

Adaptabilidad

Las distintas características climáticas y edáficas bajo las cuales se desarrolló esta investigación permitieron identificar el potencial de adaptación de *T. diversifolia*, ya que fueron observados materiales sobresalientes en cada uno de los ambientes estudiados. Los genotipos Gen5 y Gen7 tuvieron mayor adaptación en REG1, y Gen7 y Gen4 en la REG2 al tener una mayor producción durante todo el periodo evaluación.

Según Wanjau *et al.*, (1998), Jama *et al.*, (2000) y Pérez *et al.*, (2009), *T. diversifolia* posee un gran volumen radicular, característica que le permite obtener de forma eficiente los escasos nutrientes del suelo. Igualmente, autores como Baldani y Baldani (2005), Elmerich (2007) y Saharan y Nehra (2011) destacan la capacidad de esta especie de asociarse con diferentes poblaciones de microorganismos favoreciendo aún más esta propiedad, especialmente en suelos de baja fertilidad. Otra de las razones por las cuales *T. diversifolia* goza de una amplia adaptabilidad, se debe a su alta diversidad genética que le confiere una significativa aptitud de adaptación y capacidad de responder a retos y amenazas tales como enfermedades, depredadores y cambios ambientales (Govindaraj *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2016; Del Val *et al.*, 2017).

VARIABLES MORFOLÓGICAS Y AGRONÓMICAS

Las características morfológicas y agronómicas tuvieron gran variabilidad entre genotipos y ambientes, las variables área foliar, área del dosel, relación hoja tallo, peso de los tallos y número de ramas presentaron una correlación significativa y directa con la producción de MS. Estas características coinciden con las medidas agronómicas que mayor variabilidad representaron en el ACP por lo cual pueden ser usadas como indicativo del potencial productivo de plantas de *T. diversifolia*. Para Ruiz *et al.* (2010), características de estructura como las anteriormente mencionadas deben ser consideradas en la determinación del crecimiento de *T. diversifolia* y, por ende, ser utilizadas para la

selección de genotipos con mayor productividad y de adaptación. De acuerdo con Ruiz *et al.*, (2013), quienes estudiaron el crecimiento de cinco ecotipos seleccionados a partir de una población de 29 materiales, en *T. diversifolia* existen orígenes de porte bajo, medio y alto con diferencias en el desarrollo y crecimiento.

Ruiz *et al.* (2010) determinaron el número de ramas, altura del tallo principal (m), diámetro del tallo (mm), altura de la primera hoja (cm), número de flores, y número de hojas verdes, amarillas, secas y totales. En el análisis de componentes principales para la interrelación entre variables en la estación lluviosa, 43.7% de los coeficientes de correlación fueron mayores a 0.40, mientras en la estación seca alcanzaron 83.3% los valores superiores a 0.40. Debido a las características evaluadas, en dos componentes para ambas épocas se logró representar más del 80% de la variabilidad total. Aquí las variables de mayor preponderancia fueron las hojas totales, verdes, amarillas, secas y caídas/planta y tallos/planta, todas con relación positiva. Este resultado indicó la importancia de tener en cuenta el comportamiento del crecimiento de las hojas en el estudio de estos materiales. Además, la variabilidad encontrada se puede utilizar estratégicamente en programas de selección y futuros de mejoramiento varietal. Los resultados de estos autores en Cuba mostraron genotipos con alturas similares, así como número de ramas, pero menor número de hojas y mayor diámetro de los tallos que lo observado en este estudio.

La variabilidad hallada en este estudio también fue corroborada por Holguín *et al.*, (2015). Estos autores evaluaron la respuesta productiva forrajera de 44 introducciones de *T. diversifolia*, e identificaron ocho introducciones como las de mayor producción y de mejor calidad nutricional. Posteriormente, sólo cuatro fueron identificados como las más promisorias de acuerdo con un índice multicriterio. Además, concluyeron que el uso de índices integrales multicriterio facilita la selección de materiales rendidores, con base en diferentes criterios de adaptabilidad, productividad y calidad de las especies.

De acuerdo con estos estudios, existen múltiples diferencias entre materiales de *T. diversifolia* que obedecen a diferencias genéticas, razón por la cual es necesario identificar, caracterizar y seleccionar genotipos superiores dentro de esta especie, y realizar evaluaciones integrales multicriterio con el fin de optimizar su uso. Esto permitiría identificar ecotipos adaptados a condiciones específicas de producción, con la capacidad de ofrecer mayor biomasa, mayor oferta de nutrientes y lograr una mayor persistencia en el tiempo (Rivera *et al.*, 2019).

Composición química

Según Ramírez-Rivera *et al.*, (2010) y Ribeiro *et al.*, (2015) *T. diversifolia* ofrece altos contenidos de nutrientes, ya sea como complemento de dietas basadas en pasturas tropicales, o como fuente forrajera capaz de reemplazar alimentos comerciales concentrados en rumiantes de forma parcial. Las fracciones químicas más destacadas en *T. diversifolia* son los altos porcentajes de PC en las hojas (> 25 g/100 g de MS), los bajos contenidos de fibra (FDA y FDA), los aceptables contenidos de minerales (Ca y P) y los buenos valores de degradabilidad de la MS y energía. Los resultados de este estudio

son acordes a lo reportado por investigadores como La O *et al.* (2009), Ribeiro *et al.* (2015) y Mauricio *et al.* (2017), quienes evaluaron su uso en la alimentación de ganado de leche de alta producción, su composición química, así como su dinámica de fermentación.

Los siete genotipos evaluados presentaron mayores cantidades de PC y menores porcentajes de fibra (FDN y FDA) que lo reportado por La O *et al.*, (2012), quienes evaluaron nueve ecotipos de *T. diversifolia* en Cuba y hallaron valores de proteína y FDN, de 18.26 a 26.40 y de 14.79 a 25.74 g/100 g de MS, respectivamente. De igual forma se destaca que para la PC, se observaron valores tan altos o inclusive superiores a los encontrados en leguminosas tropicales como *Stylosanthes guianensis* (18.2%, Morgado *et al.*, 2009), *Arachis pintoi* (19.7%, Khan *et al.*, 2013) y *Gliricidia sepium* (18.23%, Silva *et al.*, 2017). Otras fracciones de interés desde el punto de vista nutricional destacadas en este estudio para *T. diversifolia* fueron la digestibilidad, la energía y los valores de Ca y P, aspectos que no limitan el consumo voluntario y la disponibilidad de los nutrientes a nivel ruminal (Barahona y Sánchez *et al.*, 2005, a pesar de los 60 días de corte usados en la Región 2. Aunque los genotipos en este sitio tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$), todos presentaron alta oferta de nutrientes comparado con lo reportado en gramíneas de origen tropical.

Los altos contenidos de nitrógeno en *T. diversifolia* encontrados en este estudio se debe probablemente a la simbiosis asociativa con diferentes grupos de microorganismos que puede establecer esta especie. Este tipo de asociación se refiere a una amplia variedad de especies fijadoras de N que colonizan la superficie radicular de plantas no leguminosas (Elmerich, 2007). Se han identificado los endófitos fijadores de N y organismos diazotrófos libres (Baldani y Baldani, 2005), los cuales por sus características podrían ser los causantes de las altas cantidades de N en especies como *T. diversifolia*.

Los bajos contenidos de FDN y FDA, así como la energía contenida en los materiales de *T. diversifolia* independientemente de su genotipo, permite que esta planta pueda ser ofertada parcialmente a otras especies animales como conejos (18 – 25 de FDN%), cerdos (13-18 % de FDN), aves (13.8-19.2 % de FDN) y peces (19 – 24 % de FDN) (Hahn-von-Hessberg *et al.*, 2016; Mauricio *et al.*, 2017; Gallego-Castro *et al.*, 2017; Sánchez-Laiño *et al.*, 2018). Como resultado de las evaluaciones en los dos sitios, tres ambientes y dos épocas, también se pudo determinar que la composición química de *T. diversifolia* se mantiene bajo diferentes condiciones ambientales presentando una oferta superior a la dada por pasturas tropicales. Autores como Verdecia *et al.* (2011); Lezcano *et al.* (2012) y Osuga *et al.*, (2012) mencionan que esta especie varía poco su calidad química con el aumento de su edad.

Interacción genotipo x ambiente y estabilidad

Los resultados de este estudio mostraron que los ambientes lograron discriminar el rendimiento de los genotipos en términos de producción de MS en ambos modelos de interacción GxA. La identificación de genotipos estables y adaptados a distintas condiciones y con la capacidad de alcanzar un alto rendimiento en entornos variables ha sido un desafío continuo en el estudio de especies forrajeras (Liang *et al.*, (2015).

La estabilidad encontrada en los genotipos 5 y 7 y la evaluación de diferentes genotipos a través de diferentes ambientes arroja una importante información en el desarrollo de alternativas de mejoramiento en *T. diversifolia*, debido a que esta labor es de difícil ejecución por la frecuente aparición de las interacciones genotipo por ambiente (IGxA) (Alwala *et al.*, 2010; Senger *et al.*, 2016). Los ensayos multi-ambiente (EMA), como los trabajados en esta evaluación que incluyen diferentes condiciones ambientales, y el análisis de varianza EMA, proporcionan buenas estimaciones de los efectos principales del genotipo (G) y del ambiente (A) y los efectos de interacción genotipo por ambiente de los cuales los efectos G y GxA son principalmente relevantes para la evaluación e identificación de genotipos con potencial productivo y de adaptación (Alwala *et al.*, 2010; Taïbi *et al.*, 2015).

Según el análisis de varianza en el modelo AMMI y los resultados observados en las Figuras 6, 7, 8 y 9, los genotipos, ambientes y su interacción tuvieron diferencias significativas ($p < 0.01$), con un mayor aporte del ambiente a la variación total (Tabla 6). Los genotipos Gen7 y Gen5 se asociaron a los mayores rendimientos en los ambientes REG1 y REG1Fert, y Gen4 en REG2, además, Gen1 al observarse más alejado en la representación GGEplot de la Figura 9, presentó los menores rendimientos de MS para los tres ambientes; Gen3, Gen 6 y Gen2 no tuvieron asociación alguna con los ambientes evaluados, fueron estables, pero no se asociaron con una alta producción de MS.

Yan (2002) y Brar *et al.* (2010) indicaron que típicamente, el ambiente explica la mayoría (hasta 70% o más) de la variación de rendimiento total de las plantas, mientras que los genotipos y la interacción GxE son generalmente pequeños, como se observó en este trabajo. Las interacciones significativas de genotipos x ambientes sugieren que el rendimiento de MS de los genotipos del presente estudio varió entre los ambientes de prueba.

De otro lado, Según Yan y Hunt (2001), otra herramienta importante de análisis es la representación del genotipo "ideal" (Figura 10), la cual permite identificar al genotipo ideal como aquel con alta puntuación en el primer eje del componente principal (CP1) que está asociada a altos rendimientos y las puntuaciones cercanas a cero en el segundo eje del componente principal (CP2). Según los resultados obtenidos esta condición fue alcanzada por los genotipos 5 y 7. El mismo criterio se aplica para determinar el ambiente ideal. Además, en el Biplot GGE, los genotipos que se encuentran ubicados hacia el centro de la figura son menos representativos que aquellos localizados en las esquinas o vértices del polígono los cuales se consideran más responsivos (positiva o

negativamente) (Figura 9). Los genotipos ubicados en los sectores donde no hay localidades son consideradas de pobre comportamiento en rendimiento en la mayoría de las localidades evaluadas (Yan *et al.*, 2000; Yan y Hunt 2001; Yan *et al.*, 2001), esto se observó para los genotipos 1, 3 y 2.

Un genotipo "ideal" se define como uno que tiene el mayor rendimiento en los entornos de prueba y tiene un rendimiento absolutamente estable (que ocupa el más alto en todos los entornos de prueba) (Yan y Kang, 2003). Aunque tal genotipo "ideal" puede no existir en la realidad, puede usarse como referencia para la evaluación de los diferentes genotipos. Un genotipo es más deseable si se encuentra más cerca del genotipo "ideal" (Kaya *et al.*, 2006). Los genotipos más cercanos al "ideal" fueron Gen7 y Gen5.

Los genotipos evaluados en este estudio tuvieron una producción promedio de 55.22, 102.71 y 103.95 g de MS, 338.05, 667.06 y 621.04 g de forraje verde y 608.37, 1266.44 y 1274.24 g de peso total de la planta para las REG1, REG1Fert y REG2 respectivamente. Los pesos encontrados estuvieron por debajo de los reportados por Alonso *et al.* (2015), quienes evaluaron cuatro frecuencias de pastoreo y diferentes distancias de siembra en Cuba y encontraron pesos de las plantas entre 1400 a 2300 g de peso verde y 200 a 600 g de peso en seco de la planta completa. De otro lado estos pesos se encontraron similares a los reportados por Gallego *et al.* (2015) en Colombia bajo condiciones similares a las dadas en la REG2, y Ruiz *et al.* (2013), quienes encontraron pesos de 100 hojas verdes entre 110 g y 190 a los 42 días y entre 150 y 240 g a los 60 días. Finalmente es importante destacar que independiente del estudio, cuando se evalúan diferentes ecotipos de *T. diversifolia* estos presentan diferencias en los rendimientos productivos.

Las diferencias de productividad entre épocas fueron superiores a las reportadas por Alonso *et al.*, (2015), quienes hasta los 120 días identificaron pocas discrepancias, así como en los parámetros de altura de la planta y tallos por estaca, pero estas diferencias son similares a las encontradas por Verdecia *et al.*, (2018). Estos autores de igual forma hallaron diferencias entre épocas de las variables MS, FDN, FDA y PC.

Con relación al efecto de la fertilización sobre las variables morfológicas y químicas, Botero *et al.*, (2019) encontraron respuesta positiva de *T. diversifolia* cuando era fertilizada de acuerdo con su extracción de nutrientes. La respuesta encontrada por estos autores fue mayor a la reportada en este estudio (2.5 veces más de MS cuando *T. diversifolia* fue fertilizada), además, variables como altura de la planta, tamaño de la hoja, tallos por planta, relación hoja tallo y peso de la hoja también fueron significativamente superiores en plantas fertilizadas a razón de 1.5, 1.38, 1.67, 0.63 y 1.86 veces, respectivamente. Botero *et al.*, (2019) también identificaron que la fertilización disminuye

el contenido de MS, incrementa los contenidos de PC y energía bruta pero no afecta el EE y las cenizas.

Finalmente, en lo referente a supervivencia, se encontraron diferencias significativas entre genotipos tanto para condiciones de bosque húmedo montano como bosque húmedo tropical, evidenciándose que las altas precipitaciones en suelos franco-arcillosos afectan negativamente la supervivencia de *T. diversifolia*. Para este parámetro Gallego *et al.* (2015), encontraron supervivencias por encima del 90% para plantas a partir de tres métodos de establecimiento bajo condiciones de trópico de altura (estacas, semilla sexual germinada *in vitro* y semilla sexual sembrada directamente) después de un mes de sembradas. Estos autores tuvieron un crecimiento lento hasta la tercera semana después del corte de uniformación y a partir de la cuarta semana su crecimiento se aceleró logrando a las 8 semanas alturas entre 65 y 70 cm. Las diferencias entre ambos estudios probablemente se deben a las condiciones ambientales adversas dadas durante el establecimiento de las plántulas en este estudio.

Conclusiones

T. diversifolia tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones edafoclimáticas y ofrecer una alta cantidad de nutrientes para rumiantes. El alto porcentaje de PC (> 25 g/100 g de MS), los bajos valores de fibra (FDN y FDA) y los elevados porcentajes de energía (> 4.15 Mcal/kg de MS de EB) y degradabilidad (>75%) de la MS se perfilan como las características más destacables en esta especie. A pesar de su amplia plasticidad, las condiciones ambientales modifican el rendimiento de genotipos de *T. diversifolia* producto la interacción GxA favoreciendo la posibilidad de identificar y seleccionar ecotipos con un mayor potencial productivo. En este estudio, los genotipos 7 y 5 fueron identificados como materiales de gran estabilidad capaz de ofrecer altos rendimientos de MS tanto en condiciones de bosque húmedo tropical como de bosque húmedo montano y al genotipo 4 como un ecotipo de gran aptitud productiva para zonas por encima de los 2000 msnm.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto *Ganadería Colombiana Sostenible*, financiado por el Gobierno del Reino Unido y el Fondo Mundial para el Medio Ambiente, por aportar recursos necesarios para las evaluaciones y recolección de materiales. También, a los predios El Porvenir y Los Alpes por permitir llevar a cabo las evaluaciones en sus instalaciones, así como a Colciencias en su convocatoria de Doctorados Nacionales 727 de 2015.

Bibliografía

- Alejos, G., Monasterio, P., Rea, R. 2006. Análisis de la interacción genotipo ambiente para rendimiento de maíz en la región maicera del estado Yaracuy, Venezuela. *Agronomía Tropical*, 56 (3): 369-384.
- Alonso Lazo, J., Achang Fraga, G., Tuffi Santos, L. D., Arruda Sampaio, R. 2015. Comportamiento productivo de *Tithonia diversifolia* en pastoreo con reposos diferentes en ambas épocas del año. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 27, Article #115. Retrieved December 7, 2019, from <http://www.lrrd.org/lrrd27/6/alon27115.html>.
- Alwalaa, S., Kwolekb, T., McPhersonc, M., Pellowc, J., Meyera, D. 2010. A comprehensive comparison between Eberhart and Russell joint regression and GGE biplot analyses to identify stable and high yielding maize hybrids. *Field Crops Research*, 119: 225–230.
- Ariza-Nieto, C., Mayorga, O., Mojica, B., Parra, D., Afanador-Tellez, G. 2018. Use of LOCAL algorithm with near infrared spectroscopy in forage resources for grazing systems in Colombia. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 26(1), 44–52. <https://doi.org/10.1177/0967033517746900>
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77: 549–579.
- Bhartiya, A., Aditya, J.P., Singh, K., Pushpendra, Purwar, P.J., Agarwal, A. 2017. AMMI & GGE biplot analysis of multi environment yield trial of soybean in North Western Himalayan state Uttarakhand of India. *Legume Research*, 40 (2): 306-312. DOI: 10.18805/lr.v0iOF.3548
- Botero, J. 2017. Potencial de extracción y utilización de nutrientes de *Tithonia diversifolia* y su relación con el rendimiento y calidad nutricional. Tesis para optar al Título de Ph.D en Ciencias Agrícolas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. 82 pp.
- Botero Londoño, J., Gómez Carabalí, A., Botero Londoño, M. 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. doi:<https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4667>.
- Brar, K.S., P., Singh, P.V., Mittal, C.P., Singh, M.L., Jakhar, Y. Yadav, M.M., Sharma, U.S., Shekhawat, C. Kumar. 2010. GGE bi-plot analysis for visualization of mean performance and stability for seed yield in taramira at diverse locations in India. *Journal Oil seed Brassica*, 1(2): 66 - 74
- Calsavara, L., Ribeiro, R.S., Rocha e Silveira, S., Delarota, G.D., Freitas, D.S., Sacramento, J.P., Paciullo, D.S., Mauricio, R.M. 2016. Potencial forrageiro da *Tithonia diversifolia* para alimentação de ruminantes. *Livestock Research for Rural Development*, 28: Article #17. <http://www.lrrd.org/lrrd28/2/ferr28017.html>.
- Carter, A., Rajcan, I., Woodrow, L., Navabi, A., Eskandari, M. 2018 Genotype, environment, and genotype by environment interaction for seed isoflavone

- concentration in soybean grown in soybean cyst nematode infested and non-Infested environments. *Field Crops Research*, 216: 189–196.
- Del Val, R., Miranda, J. M., Flores, M. X., Gómez, J. M., Solorio, B., Solorio, F. J., González, S. 2017. Diversidad genética de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray de Michoacán: Análisis con marcadores de ADN-SSR. *Reaxion: Ciencia y tecnología universitaria*, 4 (3): 9 - 14.
- Elmerich, C. 2007. Historical perspective: from bacterization to endophytes. In: Elmerich, C., Newton, W.E. (eds). *Associative and endophytic nitrogenfixing bacteria and cyanobacterial associations*. Dordrecht, The Netherlands, 1–20 pp.
- Gallego, L., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2015. Crecimiento y desarrollo de *Tirhonia diverisfolia* Hemsl. A Gray en condiciones de trópico alto. En: *Memorias 3° Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles - VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales*, Santa Cruz: Ediciones INTA, 53 – 58 pp.
- Gallego-Castro, L., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2017. Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray bajo tres sistemas de siembra en el trópico alto. *Agronomía Mesoamericana*, 28 (1): 213-222. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v28n01_213.pdf.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., Srinivasan, M. 2015. Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. *Genetics Research International*. Article ID 431487: 1- 14. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/431487>.
- Holdridge, L. R. 1986. *Ecología basada en zonas de vida*. Leslie Holdridge. IICA. San José, Costa Rica.
- Holguín, V.A., Ortíz, S., Velasco, A., Mora, J. 2015. Evaluación multicriterio de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en Candelaria, Valle del Cauca. *Revista de medicina veterinaria y zootecnia*, 62(2): 57-72.
- Hahn-von-Hessberg, C. M., Grajales-Quintero, A., Narváez-Solarte. W. 2016. Coeficiente de Digestibilidad Aparente de Plantas Forrajeras Comunes en Zona Andina para Alimentación de Tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Información Tecnológica*, 27(4): 63-72. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v27n4/art07.pdf>.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 2001. NTC 4981. Alimentos para animales. Determinación del contenido de fosforo. Método espectrofotométrico. Bogotá, Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 2003. NTC 5151. Alimento para animales. Determinación de los contenidos de Calcio, Cobre, Hierro, Magnesio, Manganeso, Potasio, Sodio y Zinc. Método usando espectrometría de absorción atómica. Bogotá, Colombia.
- Jama, B., Palm, C. A., Buresh, R. J., Niang, A., Gachengo, C., Nziguehbh, G., Amadalo, B. 2000. *Tithonia diversifolia* as a green manure for soil fertility improvement in western Kenya. A review. *Agroforestry systems*, 49 (2): 201–222.

- Kaya, Y., Akcura, M., Taner, S., 2006. GGE biplot analysis of multi-environment yield trials in bread wheat. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 30, 325-337
- Khan, M. T., Khan, N. A., Bezabih, M., Qureshi, M. S., Rahman, A. 2013. The nutritional value of peanut hay (*Arachis hypogaea* L.) as an alternate forage source for sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 45: 849–853.
- La O, O., Valenciaga, D., González, H., Orozco, A., Castillo, Y., Ruíz, O., Gutiérrez, E., Rodríguez, C., Arzola, C. 2009. Efecto de la combinación de *Tithonia diversifolia* y *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 en la cinética y producción de gas in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43 (2): 142- 152.
- 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. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46 (1): 47 – 53.
- Lezcano, Y., Soca, M., Ojeda, F., Roque, E., Fontes, D., Montejo, I.L., Santana, H., Martínez, J., Cubillas, N. 2012. Caracterización bromatológica de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en dos etapas de su ciclo fisiológico. *Pastos y Forrajes*, 35 (3): 275-282.
- Luo, L., Zhang, P., Ou, X., Geng, Y. 2016. Development of EST-SSR markers for the invasive plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *Applications in Plant Sciences*, 4 (7), apps.1600011. <http://doi.org/10.3732/apps.1600011>
- Mandel, J. 1971. A new analysis of variance model for non-additive data. *Technometrics*, 13: 1-18.
- Mauricio, R.M., Calsavara, L.H.F., Ribeiro, R.S., Pereira, L.G.R., Freitas, D.S., Paciullo, D.S., Barahona, R., Rivera, J.E., Chará, J., Murgueitio, E. 2017 Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(4): 00146. DOI: 10.15406/jdvar.2017.05.00146.
- Morgado, E., Almeida, F., Silva, V.P., Gomes, A., Galzerano, L., Torres, H., Rodrigues, L. M. 2009. Digestão dos carboidratos de alimentos volumosos em eqüinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(1): 75-81.
- Osuga, I.M., Abdulrazak, S.A., Muleke, C.I., Fujihara, T. 2012. Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10 (2): 632-635.
- Pérez A, Montejo I, Iglesias J, López O, Martín GJ, García DE, Milián I, Hernández A. 2009. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Pastos y Forrajes*, 32 (1): 1 – 15.
- Ramírez-Rivera, U., Sangines-García, J.R., Escobedo-Mex, J.G., Cen-Chuc, F., Rivera-Lorca, J.A., Lara-Lara, P.E. 2010. Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems*, 80: 295-302.
- Ribeiro, R.S., Terry, S.A., Sacramento, J.P., Rocha e Silveira, S., Bento, C.B., Silva, E.F., Montovani, H.C., Gama, M.A.S., Pereira, L.G., Tomich, T.R., Mauricio, R.M.,

- Chaves, A. 2016. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *Plos One* 11: e0165751 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>.
- Rivera, J., Lopera, J., Chará, J., Gómez-Leyva, J., Barahona, R., Enrique, E. 2019. Genetic and morphological diversity of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray for use in silvopastoral systems of Latin America. Dupraz, C., Gosme, M., Lawson, G. (Editors). *Book of Abstract 4th World Congress on Agroforestry*. Montpellier: CIRAD, INRA, World Agroforestry. 712 pp.
- Rivera, J. E., Chará, J., Gómez-Leyva, J. F., Ruíz, T., Barahona, R. 2018. Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 30, Article #200. <http://www.lrrd.org/lrrd30/12/rive30200.html>.
- Ruiz, T. E., Febles, G., Torres, V., González, J., Achan, G., Sarduy, L. y Díaz, H. 2010. Evaluación de materiales recolectados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la zona centro-occidental de Cuba. *Revista cubana de ciencia agrícola*, 44: 291 - 296.
- Ruiz, T.E., Torres, V., Febles, G., Díaz, H., González, J. 2013. Estudio del comportamiento de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* en relación con algunos componentes morfológicos. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 25, Article #154. <http://www.lrrd.org/lrrd25/9/ruiz25154.htm>.
- RStudio Team. 2019. *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
- 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.
- Saharan, B.S., Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21: 1–30.
- Sánchez-Laiño, A., Torres-Navarrete, E. D., Buste-Castro, F., Barrera-Álvarez, A., Sánchez-Torres, J. 2018. Tropical forages as a dietary alternative in fattening rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Acta Agronómica*, 67 (2): 333-338.
- Schultze-Kraft, R., Rao, I.M., Peters, M., Clements, R.J., Bai, C., Liu, G. 2018. Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview. *Tropical Grasslands*, 6(1): 1–14. <http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/article/view/394/241>.
- Senger, E., Martin, M., Dongmeza, E., Montes, J.M. 2016. Genetic variation and genotype by environment interaction in *Jatropha curcas* L. germplasm evaluated in different environments of Cameroon. *Biomass and Bioenergy*, 91: 10 – 16.
- Silva, S. F., Carneiro, M. S., Edvan, R. L., Pereira, E. S., Neto, L., Pinto, A. P., Camilo, D. 2017. Agronomic characteristics and chemical composition of *Gliricidia sepium* grown under different residual heights in different seasons. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(1): 35-42. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ciagr/v44n1/art04.pdf>.

- Taïbia, K., del Campoa, A.D., Aguadoc, A., Muletta, J.M. 2015. The effect of genotype by environment interaction, phenotypic plasticity and adaptation on *Pinus halepensis* reforestation establishment under expected climate drifts. *Ecological Engineering*, 84: 218–228.
- Verdecia, D. M., Ramírez, J. L., Leonard, I., Álvarez, Y., Bazán, Y., Bodas, R., Andrés, S., Álvarez, J., Giráldez, F., López, S. 2011. Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una zona del Valle del Caucho. *Revista Electrónica de Veterinaria- REDVET*, 12 (5): 1-13.
- 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. Yield components, chemical characterization and polyphenolic profile of *Tithonia diversifolia* in Valle del Caucho, Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52 (4): 457- 471.
- Wanjau, S., Mukalama, J., Thijssen, R. 1998. Transferencia de biomasa: Cosecha gratis de fertilizante. *Boletín de ILEIA*, 25 pp.
- Yan, W., Hunt, L.A., Sheng, Q., Szlavnics, Z., 2000. Cultivar evaluation and mega environment investigation based on the GGE biplot. *Crop Science*, 40: 597–605.
- Yan, W., Hunt, L.A. 2001. Interpretation of genotype x environment interaction for winter wheat yield in Ontario. *Crop Science*, 41:19-25.
- Yan, W., Cornelius, P.L., Crossa, J., Hunt, L.A. 2001. Two types of GGE biplots for analyzing multi-environment trial data. *Crop Science*, 41:656–663.
- Yan W. 2002. Singular Value Partitioning in Bi-plot Analysis of Multi-environment trial data. *Agron. J.* 94: 990-996
- Yan, W., M.S., Kang .2003. *GGE Bi-plot Analysis: A Graphical Tool for Breeders, Geneticists, and Agronomists*. CRC Press. Boca Raton, FL, 288 pp.

Capítulo 4. Fermentación *in vitro* de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.

Los resultados consignados en este segmento corresponden al capítulo 4 de la tesis, y serán sometidos como artículo científico en la revista *Crop and Pasture Science* ISSN: 1836-0947 (Print) 1836-5795 (Online).

Efecto de la inclusión de diferentes materiales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. en los productos de la fermentación de dietas ofrecidas bajo condiciones tropicales

J.E. Rivera^{1*}; J. Chará¹; J. Arango²; R. Barahona³

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia; ²Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Cali. Colombia;

³Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

RESUMEN

Tithonia diversifolia es una arbustiva forrajera cuyo potencial para modificar la dinámica de fermentación en rumiantes y mejorar la oferta de nutrientes ha despertado el interés de varios investigadores. El objetivo de este estudio fue conocer el efecto de incluir diferentes genotipos de *T. diversifolia* en la dinámica de fermentación y degradación ruminal, producción de AGV y generación de CH₄ de dietas de sistemas pastoriles. Bajo un diseño de bloques completos al azar se evaluaron mezclas de siete materiales de *T. diversifolia* y las gramíneas *Cenchrus clandestinus* y *Urochloa brizantha* cv Marandú usando de la técnica *in vitro* de producción de gases. La inclusión de *T. diversifolia* en dietas basadas en *U. brizantha* mejoró la oferta de nutrientes (menor contenido de fibra y más proteína, grasa y minerales) y modificó los parámetros de dinámica de fermentación ($p < 0.05$). Además, la degradación de la MS se incrementó 4.72% frente a dietas basadas únicamente en esta gramínea ($p < 0.05$). Las emisiones de CH₄ fueron significativamente menores en dietas con inclusión de *T. diversifolia* ($p < 0.05$) y la relación A:P fue más baja. En las dietas basadas en *C. clandestinus*, la inclusión de *T. diversifolia* modificó la composición química y la degradación de la MS ($p < 0.05$), pero tuvo poco efecto en los parámetros de dinámica de fermentación, producción de CH₄ y concentraciones de AGV. Se concluye que *T. diversifolia* incrementa la oferta de nutrientes en dietas pastoriles tanto de trópico bajo como alto, y puede modificar los productos de la fermentación y disminuir la emisión de CH₄ entérico, en dietas basadas en gramíneas de baja calidad como *U. brizantha*.

Palabras clave: AGV, botón de oro, composición química, degradabilidad, *in vitro*, metano.

ABSTRACT

Tithonia diversifolia is a forage shrub whose potential to modify the dynamics of fermentation in ruminants and improve the supply of nutrients has aroused the interest of several researchers. The objective of this study was to know the effect of including different genotypes of *T. diversifolia* in the dynamics of ruminal fermentation and degradation, production of AGV and generation of CH₄ from diets of pastoral systems. Under a randomized complete block design, mixtures of seven materials of *T. diversifolia* and *Cenchrus clandestinus* and *Urochloa brizantha* cv Marandú grasses were evaluated using the *in vitro* gas production technique. The inclusion of *T. diversifolia* in diets based on *U. brizantha* improved the supply of nutrients (lower fiber content and more protein, fat, and minerals) and modified the parameters of fermentation dynamics ($p < 0.05$). In addition, the DM degradation was 4.72% higher when compared with diets based only on this grass ($p < 0.05$). CH₄ emissions were significantly lower in diets with *T. diversifolia* ($p < 0.05$), and the A:P ratio was lower. In diets based on *C. clandestinus*, the inclusion of *T. diversifolia* modified the chemical composition and the degradation of DM ($p < 0.05$) but did not affect the parameters of fermentation dynamics, production of CH₄ and VFA. It is concluded that *T. diversifolia* increases the supply of nutrients in pastoral diets under both low and high tropic conditions and can modify the products of enteric fermentation and decrease enteric CH₄ emissions, especially in diets based on low quality grasses such as *U. brizantha*.

Keywords: Chemical composition, degradability, *in vitro*, methane, Mexican sunflower, VFA.

INTRODUCCIÓN

Bajo condiciones tropicales y subtropicales, existe un nutrido número de especies arbustivas con la capacidad de producir elevadas cantidades de biomasa de alto valor nutritivo, representando una incuestionable alternativa al desarrollo de sistemas de producción animal bajo pastoreo (Rivera *et al.*, 2018). A pesar de esta riqueza, muchas de estas especies se utilizan de forma empírica, lo que limita su verdadero potencial productivo (Mejía-Díaz *et al.*, 2017; Rodríguez, 2017). Evaluar especies forrajeras con la capacidad de ofrecer una alta calidad nutritiva desde diferentes puntos de vista, es un reto que se debe afrontar si se quieren hallar sistemas más eficientes y acordes a las exigencias ambientales y productivas de la actualidad (Mustonen *et al.*, 2015; Velenciaga *et al.*, 2018).

En los últimos años, los arbustos y árboles tropicales como *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray., han despertado el interés por parte de los investigadores debido a su potencial para incrementar la eficiencia fermentativa y aumentar la degradación de las dietas

ofrecidas en condiciones de pastoreo, así como la modulación en la generación de ácidos grasos volátiles (AGV) y reducir las emisiones de metano (CH₄) entérico, en comparación con las forrajeras tradicionalmente ofrecidos en dietas pastoriles (Rivera *et al.*, 2013; Terry *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2016; Galindo-Blanco *et al.*, 2018). Los beneficios de *T. diversifolia* están dados por su mayor calidad nutricional basada en altos contenidos de proteína cruda, minerales y energía, bajos tenores de fibra, la presencia de gran variedad de compuestos fitoquímicos, y por su capacidad de adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas (Chagas-Paula *et al.*, 2012; Mejía-Díaz *et al.*, 2017; Mauricio *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que algunos compuestos fitoquímicos, como los taninos, las saponinas y aceites esenciales, contribuyen a disminuir la producción entérica de metano y a modificar las tasas de producción de gases a nivel ruminal debido a sus efectos inhibidores sobre ciertos grupos de microorganismo del rumen ya que limitan físicamente la degradación (Barahona *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2012; Banik *et al.*, 2013; Barahona *et al.*, 2014; Bhatta *et al.*, 2013). Mahecha *et al.*, (2007) encontraron que *T. diversifolia* puede reemplazar hasta un 35% de materia seca (MS) de concentrados en la dieta de vacas lecheras sin ningún efecto adverso en la producción y composición de la leche. Además, un estudio *in vitro* realizado por Terry *et al.* (2016) encontró que la sustitución de hasta el 15.2% de la caña de azúcar y el 14% de los concentrados (base de MS) por *T. diversifolia*, aumentó la producción de AGV ($p < 0.01$), lo que puede indicar un mejor rendimiento del animal en condiciones de campo. La diversidad de *T. diversifolia* en Latinoamérica es muy alta (Rivera *et al.*, 2017; capítulos 2 y 3 de esta tesis), lo que va acompañado de diferentes ofertas de nutrientes y muy probablemente de diferencias en cuanto a su patrón de fermentación en el rumen, incluyendo emisiones entéricas de metano.

Con el objetivo de conocer el efecto de diferentes genotipos de *T. diversifolia* en la dinámica de fermentación y degradación, producción de AGV y generación de CH₄ en dietas pastoriles en trópico de altura y trópico bajo, se evaluaron siete materiales de esta especie por medio de la técnica *in vitro* de producción de gases (Theodorou *et al.*, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales vegetales

Se evaluaron siete genotipos destacados de *T. diversifolia* identificados por Rivera *et al.* (2017) (Capítulo 2), establecidos en parcelas experimentales tanto en condiciones de trópico de altura (5°0'44.92"N, 75°25'47.28"O – 2300 msnm) como de trópico bajo (3°47'21.43"N, 73°49'15.93"O – 530 msnm). Los diferentes genotipos fueron mezclados con pasturas tradicionalmente utilizadas en cada localidad de acuerdo con Donneys *et al.* (2015) y Molina *et al.* (2015). Según estos autores el consumo en sistemas de *T. diversifolia* en alta densidad asociada con *Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov.) es

de 80% pastura y 20% de arbustiva (trópico de altura) de la materia seca (MS) total de la dieta, y para el caso de la asociación con pasturas de género *Urochloa* como por ejemplo *Urochloa brizantha* cv Marandú el consumo es de 75% para la pastura y 25% de *T. diversifolia* (trópico bajo) (MS de la dieta). En el sitio de trópico bajo, fueron colectados materiales tanto fertilizados de acuerdo con su extracción estimada de nutrientes (Botero, 2017) como materiales no fertilizados, ambos a una edad de rebrote de 40 días.

Evaluación *in vitro* de la fermentación, producción de CH₄ y AGV y degradabilidad de la materia seca

El comportamiento fermentativo, la producción de metano (CH₄), la generación de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV) y la degradabilidad de la MS de los diferentes materiales fueron estudiadas por medio de la técnica *in vitro* de producción de gases (Theodorou *et al.*, 1994). Para la técnica de producción de gases, se usaron botellas de 110 ml en las que se incubaron 0.5 g de cada una de las 21 dietas, 5 ml de líquido ruminal y 45 ml de solución tampón (relación líquido ruminal: solución tampón, 1:9). La solución tampón fue preparada siguiendo las recomendaciones de Brooks y Theodorou (1997), saturadas con CO₂ y mantenidas en estufa a 39 °C. Las dietas trabajadas obedecieron a mezclas entre los diferentes genotipos de *T. diversifolia* y las pasturas acompañantes, y de las gramíneas solamente.

El líquido ruminal fue obtenido de un animal fistulado alimentado con *Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov.) Morrone. Las mediciones de presión (PSI) de los gases se hicieron a los horarios de 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 y 72 h pos-inoculación, con la ayuda de un transductor de presión (Ashcroft Inc., USA). Para determinar el volumen total de producción de gas en cada horario, se usó la ecuación 1 (Rivera *et al.*, 2015).

$$Y=0.1312 + 4.9203x$$

Ecuación 1. Ajuste del volumen de producción de gas a partir de la presión

Donde, Y = volumen del gas a un horario dado, X = presión del gas a un horario dado.

Los datos de producción de gas fueron ajustados al modelo no lineal de Gompertz (Lavrencic *et al.*, 1997) (Ecuación 2). Las evaluaciones de degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) se hicieron a las 24 y 72 horas de incubación.

$$Y = e^{a-be^{cx}}$$

Ecuación 2. Modelo no lineal de Gompertz

Donde, Y es igual a la producción acumulada de gas a un tiempo x, a > 0 es la producción máxima de gas, el parámetro b > 0 es la diferencia entre el gas inicial y el gas final a un tiempo x y el parámetro c > 0 describe la tasa específica de acumulación de gas.

La producción de AGV (acetato, propionato y butirato), fue medida a las 24 y 72 horas junto con la producción de CH₄. Para ambas mediciones, se acumuló el gas producido

para cada uno de los horarios y se obtuvo una submuestra en viales de 10 ml. La determinación de AGV se hizo en el laboratorio NUTRILAB – GRICA de la Universidad de Antioquia y las concentraciones de CH₄ en el laboratorio de Gases de Efecto Invernadero del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) utilizando cromatografía de gases.

Composición química de los materiales de *T. diversifolia* evaluados

Cada una de las dietas fueron valoradas por: (1) humedad y otras materias volátiles (MS, g/100 de MS), (2) proteína cruda (PC, g/100 de MS), (3) cenizas (Cen, g/100 de MS), (4) extracto etéreo (EE, g/100 de MS), (5) fibra en detergente neutro (FDN, g/100 de MS), (6) fibra en detergente ácido (FDA, g/100 de MS), (7) calcio (Ca, g/100 de MS), (8) fósforo (P, g/100 de MS), (9) nutrientes digestibles totales (NDT, g/kg de MS), (10) degradabilidad de la MS (Deg., g/100 de MS), (11) energía bruta (EB, Mcal/Kg de MS), (12) energía neta de lactancia (EB, Mcal/Kg de MS), (13) fenoles totales (FT, % Ac. Tánico) y (14) taninos totales (Tan, % ácido tánico). Estas determinaciones se realizaron en el laboratorio de Nutrición Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) por medio de espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS) utilizando las ecuaciones generadas para recursos forrajes del trópico colombiano (Ariza-Nieto, *et al.*, 2018) y el porcentaje Ca y P se determinó por espectrofotometría AA y UV- VIS basado en NTC 5151 (2003) y 4981 (2001), respectivamente. Los fenoles totales (FT) y taninos (Tan) fueron cuantificados en el Animal Nutrition & Forages Quality Laboratory del CIAT de acuerdo con la metodología Folin -Ciocalteu.

Diseño experimental y análisis estadístico

La comparación entre dietas se hizo por medio de un diseño de bloques completos al azar con dos factores, los genotipos y el nivel de fertilización, de acuerdo con la distribución de las parcelas experimentales en campo. El modelo matemático de este diseño se presenta en la ecuación 3.

$$y_{klj} = \mu + \alpha_k + \gamma_l + \xi_{kl} + \beta_j + \varphi_{klj}$$

Ecuación 3. Modelo general de un diseño de bloques completos al azar

Donde:

y_{klj} = Observación en la unidad experimental de la variable a evaluar; μ = es la media del efecto general; α_k = efecto del factor k (materiales colectados 1, 2, 3...7); γ_l = efecto del factor l (nivel de fertilización 1,2...); β_j = efecto del bloque j; ξ_{kl} = interacción de los dos factores; φ_{klj} = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental lkj.

Todos los análisis fueron realizados con la herramienta RStudio usando las librerías “*agricolae*” y “*easynls*” (R Core Team, 2019). Para los análisis se evaluó la normalidad, homogeneidad de la varianza y de aditividad. Para identificar diferencias entre medias se utilizó la prueba de contraste de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. Cuando los grupos de datos no cumplieron con las condiciones para un análisis paramétrico, fue usada la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos.

RESULTADOS

La composición química de las dietas evaluadas se muestra en las Tablas 1 y 2. Para las condiciones de trópico bajo (Tabla 1), la inclusión de *T. diversifolia* resultó en diferencias significativas en todas las variables medidas a excepción de EE y EB ($p < 0.05$) frente a la dieta base de *U. brizantha*, pero no hubo diferencias entre las dietas que incluyeron *T. diversifolia*. En general la inclusión de *T. diversifolia* disminuyó el contenido de materia seca y de la fibra de la dieta, pero incrementó la oferta de minerales y Enl, además de mejorar la degradabilidad de la MS ($p < 0.05$). También se destaca que el uso de fertilización en *T. diversifolia*, resulta en aumentos de PC, Ca, P y Enl y degradabilidad, frente a dietas de *T. diversifolia* sin fertilizar.

Por otro lado, en las dietas de trópico de altura (Tabla 2), la inclusión de *T. diversifolia* incrementó la PC con algunos genotipos frente a dietas basadas en *C. clandestinus* (genotipos 3, 4 y 5), disminuyó la fibra (FDN y FDA) y el EE, e incrementó el Ca en la dieta ($p < 0.05$). El uso de esta arbustiva en dietas de trópico de altura no tuvo efecto en las variables de MS, P, degradabilidad y energía. Para los FT y Tan no se encontraron diferencias entre los genotipos, pero si hubo efecto de la fertilización.

Fermentación *in vitro*

La inclusión de *T. diversifolia* en dietas basadas en *U. brizantha* modificó algunos parámetros de fermentación ruminal *in vitro* (Tabla 3). Su uso tuvo efectos significativos en las variables de tasa máxima de producción de gas (TMPG) y fase lag (FL) ($p < 0.05$), pero no en la hora al punto de inflexión (HPI) y gas al punto de inflexión (GPI). Para el caso de la fertilización de *T. diversifolia*, su uso tuvo un incremento significativo en la tasa máxima de producción de gases frente a las dietas donde ésta no fue fertilizada ($p < 0.05$). Entre las mezclas, los genotipos 1, 3 y 7 presentaron menores valores de TMPG y la mezcla de los genotipos 2 y 3 mostraron mayores valores de FL ($p = 0.007$).

La Tabla 4 muestra los parámetros de fermentación según el modelo Gompertz de las dietas estudiadas para las condiciones de trópico de altura. De acuerdo con las características químicas tanto de los genotipos de *T. diversifolia* como de *C. clandestinus*, así como del porcentaje de inclusión, para ninguno de los parámetros estudiados la utilización de la arbustiva tuvo efectos significativos ($p > 0.05$).

Tabla 1. Composición química de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* ofrecidas bajo condiciones de trópico bajo (g/100 g MS; Mcal/Kg; % Ac. Tánico)

Parámetro	Dieta							Fertilización		<i>U. brizantha</i> 100%	Dieta		EEM
	Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>	No	Si		<i>p- value</i>		
MS	20.31b	20.23b	20.11b	20.23b	20.15b	20.26b	20.20b	20.41	20.25	22.07a	0.006*	0.320	0.101
PC	17.18a	16.95a	17.10a	16.87a	17.22a	17.01a	17.61a	16.62	17.65	11.81b	<0.001*	<0.001*	0.232
Cen	10.31a	10.27a	10.47a	10.27a	10.50a	10.41a	10.38a	10.37	10.39	8.72b	<0.001*	0.787	0.072
EE	1.65	1.62	1.64	1.70	1.62	1.62	1.63	1.63	1.64	1.70	0.401	0.636	0.012
FDN	55.23b	55.41b	55.58b	55.57b	55.58b	55.52b	55.53b	55.55	55.44	63.73a	<0.001*	0.545	0.371
FDA	38.43b	38.71b	38.56b	38.21b	38.57b	38.55b	38.62b	38.41	38.64	46.11a	<0.001*	0.064	0.323
Ca	0.71a	0.73a	0.715a	0.69a	0.69a	0.72a	0.67a	0.77	0.64	0.433b	0.002*	<0.001*	0.017
P	0.25a	0.26a	0.26a	0.25a	0.27a	0.27a	0.27a	0.26	0.27	0.19b	<0.001*	0.008*	0.003
NDT	58.66a	58.29a	58.44a	58.12a	58.53a	58.38a	58.80a	58.16	58.77	52.88b	<0.001*	0.007*	0.275
Deg	64.49a	64.10a	64.26a	64.16a	64.35a	64.19a	64.65a	63.96	64.68	58.37b	<0.001*	<0.001*	0.240
EB	4.14	4.13	4.13	4.13	4.13	4.13	4.14	4.12	4.14	4.09	0.998	0.436	0.012
Enl	1.31b	1.31b	1.31b	1.30b	1.31b	1.31b	1.32b	1.30	1.32	1.17b	<0.001*	0.034*	0.006
FT	1.67	2.09	2.03	1.88	1.84	1.56	1.64	2.28	1.35	1.53	0.338	<0.001	0.113
Tan.	1.06	1.30	1.28	1.25	1.10	1.00	1.05	1.49	0.82	0.65	0.775	<0.001	0.085

MS: materia seca; PC: proteína cruda; Cen: cenizas; EE: extracto etéreo; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácida; Ca: calcio; P: fósforo; NDT: nutrientes digestibles totales; Deg: degradabilidad; EB: energía bruta; Enl: energía neta de lactancia. FT: Fenoles totales (% Ac. Tánico); Tan: Taninos totales (% Ac. Tánico); EEM: error estándar de la media; *Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05).

Tabla 2. Composición química de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* ofrecidas bajo condiciones de trópico de altura (g/100 g MS; Mcal/Kg; % Ac. Tánico)

Parámetro	Dieta								Dieta <i>Cenchrus clandestinus</i>	<i>p- value</i>	EEM
	Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>				
MS	17.1	17.25	17.33	17.49	17.32	17.49	17.30	17.43	0.231	0.040	
PC	22.28ab	22.61a	22.27ab	22.75a	22.65a	21.93ab	22.10ab	20.94b	0.008*	0.138	
Cen	12.89	12.93	12.78	12.88	12.78	13.04	12.85	12.38	0.159	0.056	
EE	2.01b	2.086ab	1.99b	2.07ab	2.05ab	2.01ab	2.04ab	2.13a	0.029*	0.011	
FDN	40.46b	40.48b	40.06b	39.94b	40.02b	40.37b	40.39b	42.81a	0.008*	0.224	
FDA	25.65b	25.13b	24.68b	24.94b	24.97b	25.16b	25.01b	27.68a	<0.001*	0.209	
Ca	0.92a	0.85a	0.88a	0.88a	0.89a	0.86a	0.85a	0.57b	<0.001*	0.023	
P	0.42	0.42	0.41	0.42	0.41	0.41	0.42	0.42	0.893	0.001	
NDT	65.88	65.84	65.81	66.20	66.03	65.63	65.80	64.02	0.433	0.237	
Deg	71.06	71.45	71.29	71.61	71.52	70.90	71.07	70.32	0.429	0.144	
EB	4.11	4.12	4.10	4.13	4.12	4.10	4.11	4.08	0.986	0.012	
Enl	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.49	1.49	1.45	0.372	0.005	
FT	2.94	3.40	3.23	3.04	3.14	2.79	3.24	2.21	0.963	0.167	
Tan.	2.08	2.32	2.26	2.15	2.12	1.99	2.27	1.23	0.992	0.129	

MS: materia seca; PC: proteína cruda; Cen: cenizas; EE: extracto etéreo; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácida; Ca: calcio; P: fósforo; NDT: nutrientes digestibles totales; Deg: degradabilidad; EB: energía bruta; Enl: energía neta de lactancia. FT: Fenoles totales (% Ac. Tánico); Tan: Taninos totales (% Ac. Tánico); EEM: error estándar de la media; *Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05).

Tabla 3. Parámetros de fermentación ajustados al modelo Gompertz de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* bajo condiciones de trópico bajo

Parámetro	Dietas							<i>U. brizantha</i> 100%	Fertilización		Dieta <i>p- value</i>	Fertilización <i>p- value</i>	EEM
	Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>		No	Si			
a	200.66	217.66	206.38	205.75	205.64	222.65	211.28	225.07	213.6	208	0.201	0.238	2.507
b	1.31b	1.36b	1.35b	1.30b	1.36b	1.33b	1.32b	1.57a	1.343	1.362	0.001*	0.249	0.012
c	0.11	0.10	0.10	0.11	0.11	0.10	0.10	0.12	0.10	0.11	0.463	0.001*	0.002
HPI	13.00	13.67	13.93	12.30	12.89	13.23	13.30	13.46	14.03	12.27	0.785	0.001*	0.314
GPI	73.82	80.07	75.92	75.69	75.65	81.91	77.72	82.80	78.60	76.51	0.201	0.238	0.922
TMPG	7.70b	8.13ab	7.59b	8.14ab	8.07ab	8.47ab	7.82b	9.74a	7.68	8.60	0.023*	0.004*	0.199
FL	3.11b	3.59ab	3.63ab	2.77b	3.38b	3.28b	3.23b	4.92a	3.55	3.23	0.007*	0.102	0.118

a = producción máxima de gas (ml); b = diferencia entre el gas inicial y el gas final en un tiempo x; c = tasa de acumulación de gas específica; HPI, h: hora al punto de inflexión; GPI, ml: gas al punto de inflexión; TMPG, ml/h: tasa máxima de producción de gas; FL o establecimiento microbiano, h: fase Lag. HPI = b/c; GPI = a/e; TMPG = (a*c)/e; FL = ((b/c)-(1/c)); donde "e" es el número de Euler, equivalente a ≈ 2.718281828459 ; *Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Tabla 4. Parámetros de fermentación ajustados al modelo Gompertz de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* bajo condiciones de trópico de altura

Parámetro	Dietas							<i>C. clandestinus</i>	Dieta <i>p- value</i>	EEM
	Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>			
a	232.00	236.06	229.03	227.06	215.81	253.17	268.02	252.74	0.698	7.637
b	1.30	1.18	1.23	1.33	1.27	1.21	1.11	1.12	0.231	0.029
c	0.14	0.14	0.13	0.14	0.13	0.12	0.13	0.14	0.539	0.002
HPI	9.65	8.66	9.39	9.39	9.49	10.43	8.37	7.94	0.248	0.276
GPI	85.35	86.84	84.25	83.53	79.39	93.14	98.60	92.98	0.698	2.809
TMPG	11.52	11.80	11.04	11.72	10.63	11.07	13.05	12.90	0.439	0.347
FL	2.24	1.31	1.76	2.28	2.03	1.71	1.52	1.56	0.207	0.215

a = producción máxima de gas (ml); b = diferencia entre el gas inicial y el gas final en un tiempo x; c = tasa de acumulación de gas específica; HPI, h: hora al punto de inflexión; GPI, ml: gas al punto de inflexión; TMPG, ml/h: tasa máxima de producción de gas; FL o establecimiento microbiano, h: fase Lag. HPI = b/c; GPI = a/e; TMPG = (a*c)/e; FL = ((b/c)-(1/c)); donde "e" es el número de Euler, equivalente a ≈ 2.718281828459 ; *Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Degradabilidad de la materia seca

Los porcentajes de degradación a los horarios de 24 y 72 horas de todas las dietas se presentan en las Tablas 5 y 6. En las mezclas de *T. diversifolia* y *U. brizantha* (Tabla 5), no hubo diferencias al horario de 24 horas, pero a las 72 horas de fermentación, las dietas que incluyeron *T. diversifolia* presentaron en promedio 4.72% más de degradación de la MS que la dieta con 100% gramínea ($p < 0.05$), pero sin diferencias entre las dietas que incluyeron *T. diversifolia*. Los materiales fertilizados presentaron una diferencia significativa frente a las dietas con los genotipos de *T. diversifolia* sin fertilizar ($p < 0.05$).

Tabla 5. Degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS, %) de dietas con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* bajo condiciones de trópico bajo

Dietas							<i>U. brizantha</i> 100%	Fertilización		Dieta <i>p</i> -value	Fertilización	EEM
Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>		No	Si			
24 horas												
47.51	45.84	46.96	47.83	49.91	48.83	47.57	45.76	44.64	51.07	0.793	0.002*	0.910
72 horas												
68.18a	68.33a	68.31a	67.72a	67.29a	68.21a	68.76a	63.38b	67.07	68.64	<0.001*	<0.001*	0.292

*Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En lo referente a las dietas de trópico alto, la inclusión de los diferentes genotipos de *T. diversifolia* a dietas basadas solo en *C. clandestinus* disminuyó la degradación en ambos horarios de forma significativa en un 4.6%, pero entre las mezclas que tuvieron *T. diversifolia* no hubo diferencias (Tabla 6).

Tabla 6. Degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS, %) de dietas con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* bajo condiciones de trópico de altura

Dietas							<i>C. clandestinus</i> 100%	Dieta <i>p</i> -value	EEM
Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>			
24 horas									
59.72ab	63.06ab	59.77ab	62.51ab	56.71b	63.91ab	62.07ab	65.55a	0.038*	0.704
72 horas									
65.29b	69.65ab	70.60ab	68.84ab	68.99ab	70.27ab	69.21ab	73.60a	0.010*	0.478

*Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Producción de AGV

La producción de AGV de cadena corta de las dietas de trópico bajo se presenta en la Tabla 7. A las 24 horas de incubación, *U. brizantha* presentó menor producción de ácido propiónico (mol/100 mol) con diferencias frente a las mezclas que incluyeron los genotipos 5, 6 y 7 de *T. diversifolia* ($p = 0.0321$), los genotipos 2 y 4 fueron los que

generaron mayores cantidades de acético y la dieta Gen6 fue la que produjo menores valores de AGV totales entre las mezclas con *T. diversifolia* (mol/100mol); la relación A:P también presentó diferencias significativas con los mayores valores en la dieta 100% *U. brizantha* ($p = 0.004$), condición igualmente encontrada para la producción de ácido acético ($p=0.012$).

En el horario de 72 horas, la producción de acético, propiónico, butírico, producción total de AGV totales y la relación A:P tuvieron diferencias significativas ($p<0.05$) tanto para los valores en mol/100 mol como para Mmol/L. La inclusión de *T. diversifolia* generó menores cantidades de acético y mayor producción de propiónico, además, la relación A:P fue menor en todas las dietas con *T. diversifolia*. La mezcla de Gen4, Gen7 y *U. brizantha* 100% fueron los tratamientos con menor producción de ácido butírico y las dietas con Gen4 y 100% *U. brizantha* fueron las que mayor producción de AGV totales generaron con diferencias significativas con la mezcla Gen1, Gen5 y Gen6. El uso de fertilizante presentó diferencias significativas en las variables de ácido acético, propiónico y butírico, así como en la relación A:P.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de las dietas de trópico de altura. Para estas dietas solo se encontraron diferencias en los Mmol/L de propiónico en los horarios de 24 y 72 horas.

Producción de metano

La producción de metano fue expresada en tres unidades de medida: Ym, mg de CH₄/g de MSI y mg de CH₄/g de MSD, tanto para el horario de 24 como de 72 horas de incubación. En las dietas de trópico bajo (Tabla 9), la inclusión de *T. diversifolia* favoreció significativamente la disminución de CH₄ frente a la dieta 100% de *U. brizantha* especialmente en las emisiones por mg de CH₄/g de MSD a las 72 horas. En promedio al horario de 72 horas el uso de la arbustiva disminuyó en 1.2, 2.42 y 5.79 unidades de Ym, mg de CH₄/g de MSI y mg de CH₄/g de MSD, respectivamente. Además, entre las mezclas con *T. diversifolia*, Gen2, Gen4 y Gen7 tuvieron las emisiones más bajas en términos de mg de CH₄/g de MSI ($p = 0.006$), y el Ym mas alto fue el reportado por *U. brizantha* 100% y la dieta con Gen6. Para las dietas evaluadas la fertilización no tuvo efecto significativo ni diferencias entre las mezclas que incluyeron *T. diversifolia*.

La Tabla 10 presenta los resultados de CH₄ de las dietas de trópico alto. La inclusión de *T. diversifolia* no tuvo diferencias significativas para ninguna de las unidades de medición evaluadas ni en los horarios trabajados ($p> 0.05$).

Tabla 7. Producción de AGV de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* bajo condiciones de trópico bajo

Parámetro	Dietas							U. brizantha 100%	Fertilización		Dieta p- value	Fertilización	EEM
	Gen1 + brizantha	Gen2 + brizantha	Gen3 + brizantha	Gen4 + brizantha	Gen5 + brizantha	Gen6 + brizantha	Gen7 + brizantha		No	Si			
24 horas													
AGV, mol/100 mol													
Acético (A)	69.09bc	70.13ab	69.01bc	69.48abc	67.64bc	66.47c	68.42bc	71.73a	68.3	67.41	0.012*	0.217	0.482
Propiónico (P)	22.08ab	21.49ab	22.13ab	22.05ab	23.51a	23.22a	22.57a	19.61b	22.7	24.03	0.006*	0.079	0.591
Butírico	8.82	8.36	8.84	8.46	8.84	9.31	9.01	8.64	9.01	8.56	0.605	0.074	0.171
Relación (A:P)	3.13b	3.26b	3.12b	3.15b	2.88b	2.86b	3.03b	3.66a	3.08	2.96	0.004*	0.073	0.081
Total, AGV (mmol/L)	97.32ab	104.84ab	106.79ab	114.66a	97.37ab	95.10b	93.38ab	97.38ab	97.46	101.2	0.045*	0.432	3.041
AGV, Mmol/L													
Acético (A)	66.25ab	72.54ab	72.66ab	78.92a	64.93ab	61.31b	62.93ab	70.80ab	66.77	68.39	0.028*	0.647	1.966
Propiónico (P)	22.66	23.56	24.71	26.34	23.83	26.28	22.11	18.16	22.01	24.28	0.188	0.087	0.694
Butírico	8.41ab	8.73ab	9.43a	9.39a	8.61ab	7.51b	8.33ab	8.41ab	8.68	8.54	0.020*	0.583	0.146
72 horas													
AGV, mol/100 mol													
Acético (A)	69.45b	67.82b	68.42b	68.71b	68.22b	68.09b	69.72b	71.88a	65.16	67.22	0.024*	0.0192*	0.359
Propiónico (P)	22.74a	23.47a	23.91a	24.38a	24.07a	23.81a	23.46a	21.47b	26.92	25.55	0.016*	0.112*	0.279
Butírico	7.79ab	8.70a	7.66ab	6.89b	7.71ab	8.08ab	6.81b	6.63b	7.92	7.23	0.003*	0.006*	0.165
Relación (A:P)	3.05b	2.89b	2.86b	2.83b	2.86b	2.86b	2.97b	3.35a	2.75	2.95	0.001*	0.005*	0.055
Total, AGV (mmol/L)	137.86d	171.79bc	188.33abc	220.87a	155.55cd	160.36cd	187.34bcd	199.20ab	170	183.3	<0.001*	0.014*	5.191
AGV, Mmol/L													
Acético (A)	92.00c	111.35bc	122.56ab	145.10a	103.11bc	104.43bc	124.91ab	145.20a	111.1	123.4	<0.001*	0.004*	3.340
Propiónico (P)	35.23e	45.56bcd	51.75ab	60.55a	40.52de	42.98bcde	49.62bc	40.78cde	45.67	46.84	<0.001*	0.404	1.301
Butírico	10.63d	14.87ab	14.01abc	15.20a	11.92cd	12.94bcd	12.80bcd	13.22abcd	13.28	13.11	<0.001*	0.611	0.272

*Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05).

Tabla 8. Producción de AGV de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* bajo condiciones de trópico alto

Parámetro	Dietas							<i>C. clandestinus</i> 100%	Dieta p- value	EEM
	Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>			
24 horas										
AGV, mol/100 mol										
Acético (A)	68.38	67.89	72.93	68.83	65.89	73.36	72.72	72.38	0.1735	1.115
Propiónico (P)	22.92	24.74	19.62	23.24	25.68	18.87	19.59	18.37	0.1223	1.057
Butírico	8.68	7.36	7.44	7.92	8.42	7.76	7.67	9.237	0.112	0.194
Relación (A:P)	2.98	2.74	3.72	2.96	2.57	3.89	3.71	3.94	0.109	0.159
Total, AGV (mmol/L)	89.06	99.02	109.77	85.83	107.99	96.8	101.14	83.47	0.3375	3.798
AGV, Mmol/L										
Acético (A)	61.26	68.29	82.29	59.99	72.51	71.32	73.33	62.09	0.535	3.243
Propiónico (P)	20.09abs	23.58ab	19.34abc	19.20abc	26.44a	18.04bc	20.10abc	13.68c	0.004*	0.954
Butírico	7.71	7.15	8.13	6.64	9.04	7.43	7.71	7.71	0.362	0.258
Relación (A:P)	2.46	2.42	3.46	2.64	2.21	3.18	3.08	3.68	0.108	0.159
72 horas										
AGV, mol/100 mol										
Acético (A)	64.93	65.97	62.93	62.65	61.99	62.11	67.59	68.39	0.405	1.273
Propiónico (P)	25.22	24.93	27.33	27.95	28.93	28.42	24.12	23.13	0.455	1.166
Butírico	9.85	9.11	8.74	9.41	9.08	9.47	8.29	8.48	0.274	0.337
Relación (A:P)	2.57	2.65	2.30	2.24	2.14	2.19	2.80	2.96	0.208	0.115
Total, AGV (mmol/L)	158.16	186.7	186.46	158.87	187.84	177.52	187.77	163.51	0.139	1.705
AGV, Mmol/L										
Acético (A)	102.63	126.02	130.11	103.14	122.31	121.55	131.89	117.74	0.3171	3.943
Propiónico (P)	40.99ab	45.55a	41.53ab	40.81ab	50.02a	41.74ab	41.02ab	30.46b	0.020*	1.414
Butírico	14.52	15.13	14.82	14.93	15.52	14.23	14.89	15.31	0.978	0.289

*Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Tabla 9. Producción de metano durante la fermentación de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* bajo condiciones de trópico bajo

Parámetro	Dietas							U. <i>brizantha</i> 100%	Fertilización		Dieta <i>p- value</i>	EEM	
	Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>		No	Si			
24 horas													
Ym (%)	3.35b	3.31b	3.25b	3.38b	3.56ab	3.47ab	3.34b	4.16a	3.34	3.54	0.014*	0.035*	0.094
mg de CH ₄ /g de MSI	10.43ab	10.32ab	10.11b	10.51ab	11.10ab	10.79ab	10.38ab	12.53a	10.35	11.01	0.030*	0.029	0.289
mg de CH ₄ /g de MSD	22.07b	22.52ab	21.45b	21.74b	22.45ab	22.17b	21.77b	26.24a	23.02	21.49	0.034*	0.005*	0.431
72 horas													
Ym (%)	8.18b	8.13b	8.17b	7.85b	8.26b	8.29ab	7.99b	9.19a	8.17	8.23	0.001*	0.504	0.071
mg de CH ₄ /g de MSI	25.46ab	25.28b	25.43ab	24.36b	25.74ab	25.80ab	24.86b	27.69a	25.32	25.58	0.006*	0.379	0.204
mg de CH ₄ /g de MSD	37.66b	37.69b	37.72b	35.99b	38.20b	38.15b	36.88b	43.26a	38.37	37.42	0.007*	0.084	0.393

Ym (%): porcentaje de la energía bruta contenida en el alimento perdida como CH₄; MSI: materia seca incubada; MSD: materia seca degradada.

*Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05).

Tabla 10. Producción de metano durante la fermentación de dietas pastoriles con la inclusión de diferentes genotipos de *T. diversifolia* bajo condiciones de trópico alto

Parámetro	Dietas							<i>C. clandestinus</i> 100%	Dieta <i>p- value</i>	EEM
	Gen1 + <i>brizantha</i>	Gen2 + <i>brizantha</i>	Gen3 + <i>brizantha</i>	Gen4 + <i>brizantha</i>	Gen5 + <i>brizantha</i>	Gen6 + <i>brizantha</i>	Gen7 + <i>brizantha</i>			
24 horas										
Ym (%)	4.68	4.92	4.82	5.16	4.77	5.02	4.49	5.16	0.551	0.083
mg de CH ₄ /g de MSI	14.69	15.46	15.13	16.29	15.05	15.76	14.04	16.12	0.407	0.246
mg de CH ₄ /g de MSD	24.60	24.51	25.33	26.25	26.57	24.70	22.61	24.02	0.518	0.441
72 horas										
Ym (%)	7.12	7.05	6.27	7.02	7.01	6.80	6.74	7.19	0.425	0.124
mg de CH ₄ /g de MSI	22.68	22.12	19.68	22.18	22.14	21.41	21.07	22.48	0.460	0.386
mg de CH ₄ /g de MSD	32.77	31.77	27.92	32.20	32.15	30.43	30.50	30.54	0.196	0.658

Ym (%): porcentaje de la energía bruta contenida en el alimento perdida como CH₄; MSI: materia seca incubada; MSD: materia seca degradada.

*Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey (p<0.05).

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados de este estudio, la inclusión de *T. diversifolia* tiene un mayor potencial en pasturas de baja calidad como aquellas del género *Urochloa* u otras de origen tropical, su inclusión al 25% de la dieta incrementa la oferta de PC, P, Ca y Enl en un 31, 27, 38 y 11%, respectivamente. Además, disminuye el contenido de FDN y FDA de la dieta en un 15 y 19%, respectivamente. Por otro lado, sus bajos contenidos de fibra favorecen la degradabilidad de la MS, lo cual beneficia un mayor aprovechamiento de los nutrientes (9% más comparado con una dieta de solo pastura) y por ende una mayor productividad animal (Mahecha *et al.*, 2017). Según Ferreira *et al.* (2016) *T. diversifolia* cuenta también con la particularidad de modificar muy poco su calidad nutricional con la edad, razón por cual puede ser usada bajo diferentes condiciones de producción y de manejo.

Para el caso de la inclusión de *T. diversifolia* en dietas basadas en pasturas de mayor calidad como *C. clandestinus*, si bien esta especie modifica la oferta de nutrientes ($p < 0.05$) su efecto es menor. Según Mejía-Díaz *et al.* (2017) la oferta de *T. diversifolia* en sistemas de trópico de altura basados en *C. clandestinus* favorecen el incremento del consumo total de MS y, por su calidad nutricional esta arbustiva puede reemplazar parcialmente la oferta de alimentos concentrados comerciales disminuyendo los costos de producción sin afectar la producción o la calidad de la leche. La capacidad de *T. diversifolia* de reemplazar parcialmente alimentos comerciales también ha sido evaluado por Ribeiro *et al.* (2016), quienes encontraron que esta arbustiva por su calidad nutricional puede reemplazar el 15.5% del alimento concentrado de vacas lecheras de alta producción (22.5 l/animal/día) sin afecta el consumo total de MS, el balance de N, la calidad y la cantidad de leche producida.

Los resultados encontrados en este estudio evidencian que independiente del genotipo de *T. diversifolia* usado, esta especie ofrece altos contenidos de nutrientes. Esta condición igualmente ha sido reportada por autores como La O *et al.* (2012) quienes, a pesar de que indicaron diferencias significativas entre ecotipos, todos presentaron altos valores nutricionales.

Con relación a los parámetros de fermentación evaluados, la inclusión de *T. diversifolia* moduló su comportamiento especialmente en las dietas con *U. brizantha*, pero algunos ecotipos presentaron diferencias entre si (Tabla 3). Autores como Mahecha *et al.* (2017) y Galindo-Blanco *et al.* (2018) mencionan que debido a la composición química y fitoquímica de *T. diversifolia*, esta especie modifica los productos de fermentación cuando es incluida en dietas basadas en pasturas. Los cambios en la producción de gas pueden deberse a la menor concentración de carbohidratos insolubles (Barahona y Sánchez, 2005) y mayor oferta de nutrientes de fácil fermentación, así como a la optimización de la fermentación microbiana con la presencia de este arbusto proteico en el medio de

incubación. Dhanoa *et al.* (2000) y Fondevilla y Barrios (2001) reportaron que los microorganismos ruminales y sus enzimas atacan primeramente a los carbohidratos fácilmente fermentables y luego, con la colonización de la fibra y su degradación, se logra incrementar la producción de gases. Según Gallego-Castro *et al.* (2017) *T. diversifolia* contiene valores de proteínas solubles de hasta 40% de la proteína total, altos valores de azúcares totales (39.8%) y carbohidratos solubles en agua (7.2%), por lo cual se afecta la dinámica de fermentación.

Si bien el TMPG y la FL presentaron diferencias significativas entre las dietas que incluyeron *T. diversifolia* y la dieta testigo basada en *U. brizantha*, no todos los ecotipos presentaron el mismo comportamiento, describiendo diferencias entre ellos ($p < 0.05$). En una evaluación hecha por La O *et al.* (2012), se encontraron diferencias en los parámetros de fermentación y de degradación de nueve ecotipos de *T. diversifolia*. Estos autores identificaron una alta variabilidad en los parámetros a, b, a + b y c según el modelo Orskov y McDonald (1979) en cada uno de los ecotipos, con valores desde 1.95 a 24.99; 58.20 a 95.53, 83.62 a 99.5 y 0.09 a 0.39 para a, b, a+b y c, respectivamente, y comentaron que esto puede deberse a variaciones químicas y físicas dentro de los ecotipos que modifican su fermentación gracias a la interacción genotipo-ambiente.

La cuantificación de la producción de gas juega un papel importante porque permite conocer y analizar el valor nutritivo de los alimentos, la velocidad a la que estos o sus componentes químicos son digeridos en el rumen y la extensión de la digestión. Los resultados encontrados evidencian la modificación en los parámetros de fermentación cuando se incluyó *T. diversifolia* alterando los parámetros de FL y TMPG en dietas basadas en *U. brizantha*. La velocidad a la que diferentes componentes químicos son fermentados es un reflejo del crecimiento microbiano y accesibilidad por parte de estos a la alimentación (Getachew *et al.*, 2004) por lo cual se espera una mayor eficiencia en la fermentación en las dietas con *U. brizantha* especialmente cuando se incluyeron los genotipos 1, 4, 5 y 6 y 7 (Tabla 3). Se ha reportado que los alimentos ricos en precursores de ácido propiónico (ej. los ricos en almidón) producen menos gas que aquellos ricos en precursores de los ácidos acético y butírico (Beever y Mould, 2000).

Es bien conocido que un aumento en la proporción de especies arbustivas alternativas en la dieta de los rumiantes conduce a una modificación de la producción de AGV y reducción en la emisión de CH₄ como fue el caso de este estudio (Terry *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2017; Molina *et al.*, 2016). Otros estudios han indicado que la inclusión de especies alternativas puede conducir a un aumento en la ingesta de MS (Cuartas *et al.*, 2015; Gaviria-Uribe *et al.*, 2015), una fermentación ruminal más eficiente y cambios en las poblaciones microbianas en el rumen dado a la alteración de la composición física y química de la dieta como por ejemplo menores cantidades de fibra y mayor aporte de PC y compuestos fitoquímicos (Rivera *et al.*, 2013; Terry *et al.*, 2016; Mahecha *et al.*, 2017).

Las diferencias encontradas en algunos parámetros en las dietas con *U. brizantha* probablemente se debieron a estos cambios por el uso de *T. diversifolia*.

Las proporciones y cantidades de AGV producidas a partir de la fermentación son el resultado del sustrato y la velocidad a la que ocurre la degradación. Las bacterias fibrolíticas se adhieren a las partículas, por lo que el grado en que el tamaño de partícula del forraje se reduce durante la masticación (o la preparación del forraje para estudios *in vitro*) afectará la producción de AGV (Terry *et al.*, 2016). En el presente estudio, la inclusión de *T. diversifolia* en la dieta disminuyó la cantidad total de AGV, modificó la proporción de acetato y butírico, pero solo cuando se utilizó *U. brizantha* como dieta base. El cambio de las concentraciones de AGV a partir de un cambio de las fuentes forrajeras en el forraje puede explicarse por la menor porción de carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa) en la dieta, que se fermentan lentamente como pudo darse en las dietas con *U. brizantha* donde la FDN y FDA fue de 63.7 y 46.1, respectivamente. El aumento de los carbohidratos estructurales en la dieta promueve la producción de AGV hacia el acetato y en menor proporción hacia el propionato y butirato (Martin *et al.*, 2008). Por su parte, la no diferencia encontrada en las dietas con *C. clandestinus* se debió probablemente a su mayor calidad nutricional como por ejemplo menor cantidad de FDN y FDA. Ribeiro *et al.* (2017) encontraron resultados similares a los reportados en este estudio, al evaluar la sustitución parcial de alimentos concentrados basados en caña de azúcar, soya y maíz hasta un 15% sin encontrar diferencias en la producción de AGV.

Finalmente, con relación a las emisiones de CH₄, la inclusión de *T. diversifolia* disminuyó su producción en las dietas con en *U. brizantha* (Tabla 9). Delgado *et al.* (2012) reportaron que *T. diversifolia* posee propiedades reductoras de metano cuando se suplementa al 30% en una dieta basada en pasto *Cynodon nlemfuensis* e indicaron que esto se debió a la presencia de metabolitos secundarios en *T. diversifolia*, como taninos condensados y saponinas. De acuerdo con Chagas-Paula *et al.* (2012) y Ejelonu *et al.*, (2017) *T. diversifolia* contiene mas de 150 compuestos fitoquímicos particularmente lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, flavonoides, taninos y saponinas, razón por la cual pueden modificar las poblaciones microbianas a nivel de rumen sin afectar la degradabilidad y aprovechamiento de los nutrientes en la dieta. La presencia de estos metabolitos y la calidad química y física de los diferentes ecotipos de *T. diversifolia* evaluados probablemente fueron las causas en la disminución de CH₄ cuando se mezclaron con *U. brizantha*.

Los resultados de este estudio donde se determinaron las concentraciones de fenoles totales y taninos (Tablas 1 y 2) demuestran que *T. diversifolia* no contiene valores por encima de los encontrados en *U. brizantha* y *C. clandestinus*.

Algunos estudios han evaluado el efecto de *T. diversifolia* sobre las emisiones de CH₄ (Molina *et al.*, 2015; Donney's *et al.*, 2015; Terry *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2017;

Cardona-Iglesias *et al.*, 2017), aunque los resultados son contradictorios. Según los resultados de estos estudios, el efecto de *T. diversifolia* sobre las emisiones de CH₄ depende del porcentaje de inclusión en la dieta, la calidad de dieta base y al parecer algunos ecotipos de esta especie ofrecen mayor cantidad de compuestos fitoquímicos como por ejemplo aceites esenciales y polifenoles. Los resultados encontrados en este estudio se encontraron por encima de lo reportado por Donney's *et al.* (2015) en un estudio *in vitro* de dietas basadas en *U. decumbens* y *C. clandestinus* quienes no encontraron reducciones de CH₄, y estuvieron por debajo en un 10% de los valores reportados por Molina *et al.* (2015) en un estudio *in vivo* por la técnica de Politúnel; estos mismos autores no encontraron diferencias entre dietas con *T. diversifolia* y sin la inclusión de esta arbustiva (p = 0.645).

Los bajos tenores de FDA (<40%) y FDN (<50%), los aceptables porcentajes de carbohidratos solubles (>12%), la alta degradabilidad (>70%) y los altos contenidos de PC (>20%), se perfilan como las principales características proximales para disminuir CH₄ a nivel ruminal. Yan *et al.* (2006) reportaron que disminuir al 1% los contenidos de FDN y FDA, reduce en 2.01 y 2.26 l CH₄ por Kg de MSC, respectivamente. Estos mismos autores coinciden igualmente que por cada 1% que aumente la proteína, el metano disminuye en 6.22 l kg⁻¹ de materia seca consumida. De igual forma el consumo de praderas menos lignificadas tiene un claro efecto en la digestibilidad ruminal y la tasa de pasaje (O` Mara, 2004); es así como, estudios desarrollados por Blaxter y Clapperton (1965) han informado que al disminuir la digestibilidad de los forrajes de 75 a 55%, la emisión de metano puede aumentar de 306 a 499 g/día.

Según el análisis proximal de *T. diversifolia*, su oferta por encima de un 25% como MS de la dieta total podría ejercer efectos en la disminución de CH₄. Esto se da al aumentar la PC de la dieta (se aumentaría un 34% con pasturas del 9% de PC y 28 % en *T. diversifolia* como lo encontrado en este estudio), mejorar las tasas de pasaje por su disposición física en rumen y por la disminución del FDN y FDA total de la dieta (se pasaría de 63 a 55.5% la FDN en la dieta total con valores de 63% y 32% para alguna pastura tropical y *Tithonia* respectivamente).

En cuanto los compuestos fitoquímicos, *T. diversifolia* presenta valores relativamente bajos y variables para taninos, saponinas y flavonoides como se describió anteriormente pues no se encontraron diferencias entre las gramíneas y los genotipos de *T. diversifolia* (Tablas 1 y 2). Otros estudios han encontrados que el nivel de taninos extractables totales puede estar entre 29.2 y 37.7 gramos por kilogramo de MS, para hojas maduras y jóvenes, respectivamente (Maina *et al.*, 2012). En un estudio realizado en Colombia, se reportaron para plantas adultas de *T. diversifolia* (hojas y peciolas), valores de polifenoles de 6.3 g/kg MS, de taninos totales de 5.4 g/kg MS, de taninos condensados de 6.6 g/kg MS (Santacoloma y Granados, 2012) y un valor bajo de saponinas (2.5 mm de altura en espuma). Debido a que se considera que la concentración ideal de taninos en la dieta de

bovinos debe variar entre el 2 y 4% de la materia seca (Barry y McNabb, 1999), sería necesario lograr consumos en altas cantidades de esta arbustiva (>40%) para lograr estos valores de taninos y así ejercer efectos sobre CH₄ ruminal. Estos estudios confirman que bajo otras condiciones *T. diversifolia* puede tener contenidos de taninos más altos que los encontrados en este estudio.

A pesar de lo anterior y de los bajos contenidos de Taninos identificados en este estudio, los resultados encontrados por Galindo *et al.* (2011) demuestran que la inclusión de *T. diversifolia* puede reducir la población de protozoos y los metanógenos ruminales cuando se evalúa en condiciones *in vitro* a niveles por encima del 15% de la MS. La posibilidad de generar menores cantidades de CH₄ también se puede deber al incremento de la degradabilidad dada por menor contenido de fibra en la dieta, a pensar que entre las mezclas no se encontró diferencias, la inclusión de *T. diversifolia* si aumentó la degradación de la MS frente a la dieta de solo *U. brizantha* y a la presencia de otros compuestos fitoquímicos como aceites esenciales.

Los resultados encontrados en este estudio son muy importantes porque sugieren que bajo condiciones de trópico bajo *T. diversifolia* tiene potencial de mitigar las emisiones de CH₄. En estas condiciones de producción identificar alternativas de mitigación es muy importante porque as dietas ofrecidas allí se caracterizan por ser de mala calidad, lo cual se asocia a altas emisiones de CH₄, y porque en estas condiciones se encuentra la mayor parte del inventario bovino de los países tropicales y subtropicales.

CONCLUSIONES

El uso de *T. diversifolia* en dietas tanto de trópico alto como de bajo en Colombia mejora la oferta de nutrientes, especialmente de PC, energía y minerales, y disminuye los porcentajes de fibra. Además, por sus características químicas y contenido de nutrientes, esta arbustiva modifica los parámetros de fermentación incrementando la generación de ácido propiónico, la eficiencia general del proceso fermentativo, y disminuyendo la proporción A:P con algunas diferencias entre genotipos en dietas basadas en *U. brizantha*. Finalmente, se sugiere que *T. diversifolia* en dietas de baja calidad puede disminuir las emisiones de CH₄ bajo condiciones *in vitro* independiente del genotipo u origen del material utilizado bajo condiciones de trópico bajo, donde encontrar opciones para reducir dichas emisiones es una tarea de gran importancia, dado el gran número de animales y su baja productividad. Se recomienda adelantar experimentos *in vivo* con diferentes inclusiones de *T. diversifolia* para corroborar los resultados encontrados.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto *Ganadería Colombiana Sostenible*, financiado por el Gobierno del Reino Unido y el Fondo Mundial para el Medio Ambiente, por aportar recursos necesarios para las evaluaciones y recolección de materiales. También, a los predios El Porvenir y Los Alpes por permitir llevar a cabo las evaluaciones en sus instalaciones, así como a Colciencias en su convocatoria de Doctorados Nacionales 727 de 2015.

Bibliografía

- Ariza-Nieto, C., Mayorga, O., Mojica, B., Parra, D., Afanador-Tellez, G. 2018. Use of LOCAL algorithm with near infrared spectroscopy in forage resources for grazing systems in Colombia. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 26(1), 44–52. <https://doi.org/10.1177/0967033517746900>
- Banik, B.K., Durmic, Z., Erskine, W., Ghamkhar, K., Revell, C. 2013. In vitro ruminal fermentation characteristics and methane production differ in selected key pasture species in Australia. *Crop & Pasture Science* 64, 935–942. <http://dx.doi.org/10.1071/CP13149>.
- Barahona, R., Sánchez, S. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 69-82.
- Barahona, R., Lascano, C. E., Narvaez, N., Owen, E., Morris, P., Theodorou, M. K. 2003. In vitro degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1256-1266.
- Barahona, R., Sánchez, M. S., Murgueitio, E., Chará, J. 2014. Contribución de la *Leucaena leucocephala* Lam (de Wit) a la oferta y digestibilidad de nutrientes y las emisiones de metano entérico en bovinos pastoreando en sistemas silvopastoriles intensivos. *Revista Carta Fedegán*, 140(1).
- Barry, T., McNabb, W. 1999. The effect of condensed tannins in temperate forages on animal nutrition and productivity. *Tannins in livestock and human nutrition*, 92: 30-35.
- Beever, D.E., Mould, F. L. 2000. Forage Evaluation for Efficient Ruminant Livestock Production. In: Givens DI, E Owen, RFE Axford, HM Omededs Forage Evaluation in Ruminant Nutrition, 15–42. CABI, Oxfordshire, UK. <http://www.cabdirect.org/abstracts/20001414390.html>.
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., Sampath, K.T., Prasad, C.S. 2013. Effect of plant secondary compounds on in vitro methane, ammonia production and ruminal protozoa population. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2): 455-65. DOI: 10.1111/jam.12238.
- Blaxter, K.L., Clapperton, J.L. 1965. Prediction of amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition*, 19 (1): 511-522.
- Brooks, A., Theodorou, M. K. 1997. Manual for gas production technique. Institute of

- Grassland and Environmental Research (IGER), Aberystwyth, UK.
- Chagas-Paula, D. A., Oliveira, R. B., Rocha, B. A., Da Costa, F. B. 2012. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*, 9: 2010–2234.
- Cuartas, C. A., Narnajo, J. F., Tarazona, A. M., Correa, G. A., Barahona, R. 2015. Dry matter and nutrient intake and diet composition in *Leucaena leucocephala*- based intensive silvopastoral systems. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 18(3), 303-311.
- Dhanao, M.S., López, S., Dijkstra, K., Davis, D. R., Sandeson, R., Williams., B. A., Sileshi, Z.Y., France, J. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feed from a description of their gas profiles observed in vitro: Comparison of models. *British Journal of Nutrition*, 83:131 – 142.
- Delgado, D.C., Galindo, J., González, R., González, N., Scull, I., Dihigo, L., Cairo, J., Aldama, A.I., Moreira, O. 2012. Feeding of tropical trees and shrub foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 1097–1104. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0045-5>.
- Donneys, G., Molina, I.C., Rivera, J.E., Villegas, G., Chará, J., Barahona. R. 2015. Producción in vitro de metano de dietas ofrecidas en sistemas silvopastoriles intensivos con *Tithonia diversifolia* y sistemas tradicionales. 3^{er} Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles y VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, 672-677 pp.
- Ejelonua, O.C., Elekofehintia, O. O., Adanlawob, I. G. 2017. *Tithonia diversifolia* saponin-blood lipid interaction and its influence on immune system of normal wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87: 589–595.
- Ferreira, L. H., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Delarota, G., Freitas, D. S., Sacramento, J. P., Paciullo, D. S., Maurício, R. M. 2016. Potencial forrageiro da *Tithonia diversifolia* para alimentação de ruminantes. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 28, Article #17. <http://www.lrrd.org/lrrd28/2/ferr28017.html>.
- Fondevilla, M., Barrios, A. 2001. La técnica de producción de gas y su aplicación al estudio del valor nutritivo de los forrajes. *Revista cubana de ciencia agrícola*, 35:197 – 211.
- France, J., Dhanao, M.S., Theodorou, M.K., Lister, S.J., Davies, D.R., ISAC, D. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. *Journal of Theoretical Biology*, 163: 99 - 111.
- Galindo, J., González, N., Sosa, A., Ruíz, T., Torres, V., Aldana, A., Díaz, H., Moreira, O., Sarduy, L., Noda, A. 2011. Efecto de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones in vitro. *Revista cubana de ciencia agrícola*, 45: 33-37.

- 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.
- Gallego-Castro, L.A., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2017. Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray bajo tres sistemas de siembra en el tropico alto. *Agron. Mesoam.* 28(1): 213-222. DOI:10.15517/am.v28i1.21671.
- Gaviria-Urbe, X., Naranjo-Ramírez, J. F., Bolívar-Vergara, D. M., Barahona-Rosales, R. 2015. Consumo y digestibilidad en novillos cebuínos en un sistema silvopastoril intensivo. *Archivos de zootecnia*, 64(245), 21-27.
- Getachew, G., DePeters, E. J., Robinson, P. H. 2004. In vitro gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. *California Agriculture*, 58: 54–58.
- 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. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46 (1): 47 – 53.
- Lavrencic, A., Stefanon, B., Susmel, P. 1997. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Anim Sci*, 64: 423 - 431.
- Liang, S., Renc, G., Liud, J., Zhaob, X., Zhoua, M., McNeila, D., Ye, G. 2015. Genotype-by-environment interaction is important for grain yield irrigated lowland rice. *Field Crops Research*, 180: 90–99.
- Mahecha, L., Escobar, J.P., Suárez, J.F., Restrepo, L.F. 2007. *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray (botón de oro) como suplemento forrajero de vacas F1 (Holstein por Cebú). *Livestock Research for Rural Development*. Volume 19, Article #16. <http://www.lrrd.org/lrrd19/2/mahe19016.htm>.
- Maina, I., Abdulrazak, S., Muleke, C., Fujihara, T. 2012. Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10: 632-635.
- Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J., Barragán-Hernández, W. 2017. Calidad nutricional, dinámica fermentativa y producción de metano de arreglos silvopastoriles *Agronomía Mesoamericana*, 28(2): 371.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J.P., Doreau, M., Chilliard, Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*, 86: 2642–2650. DOI:10.2527/jas.2007-0774.
- Mauricio, R. M., Calsavara, L. H. F., Ribeiro, R. S., Pereira, L. G. R., Freitas, D. S., Paciullo, D. S., Barahona, R., Rivera, J. E., Chará, J., Murgueitio, E. 2017. Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(4): 00146.

- 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.
- Molina, I.C., Donneys, G., Montoya, S., Villegas, G., Rivera, J.E., Chará, J., Lopera, J.J., Barahona, R. 2015. Emisiones in vivo de metano en sistemas de producción con y sin inclusión de *Tithonia diversifolia*. 3^{er} Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles y VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, 678-682 pp.
- Mustonen, P.S.J., Oelbermann, M., Kass, D. C. L. 2015. Biomass production and phosphorus use efficiency in two *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) gray genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 38:1083–1096.
- Ørskov, E. R., McDonald, I. 1979. The estimate of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92: 499-503.
- O'Mara, F. 2004. Greenhouse gas production from dairying: Reducing methane production. *Advances in Dairy Technology*, 16: 295-309.
- Ørskov, E. R., 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: 499-503.
- Ribeiro, R.S., Terry, S.A., Sacramento, J.P., Rocha e Silveira, S., Bento, C.B., Silva, E.F., Montovani, H.C., Gama, M.A.S., Pereira, L.G., Tomich, T.R., Mauricio, R.M., Chaves, A. 2016. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *Plos One* 11: e0165751 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>.
- Rivera, J.E., Naranjo, J.F., Cuartas, C.A., Arenas, F.A. 2013. Fermentación in vitro y composición química de algunos forrajes y dietas ofrecidas bajo un Sistema Silvopastoril en el trópico de altura. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 25, Article #174. <http://www.lrrd.org/lrrd25/10/rive25174.htm>.
- Rivera, J.E., Molina, I.C., Donney`s, G., Villegas, G., Chará, J., Barahona, R. 2015. Dinámica de fermentación y producción de metano en dietas de sistemas silvopastoriles intensivos con *L. leucocephala* y sistemas convencionales orientados a la producción de leche. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 27, Article #76. <http://www.lrrd.org/lrrd27/4/rive27076.html>.
- Rivera, J.E., Gómez-Leyva, J.F., Castaño, K., Morales, J.G., Chará, J., Barahona, R. 2017. Diversidad molecular, química y morfológica en materiales de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray para la alimentación animal en Colombia y México. IX Congreso Internacional Sobre Sistemas Silvopastoriles. Manizales, Colombia, 249 – 255 pp.
- Rivera, J.E., Chará, J., Gómez-Leyva, J.F., Ruíz, T., Barahona, R. 2018. Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 30, Article #200. <http://www.lrrd.org/lrrd30/12/rive30200.html>.

- Rodríguez, I. 2017. Potencialidades de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la alimentación animal. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 29, Article #63. <http://www.lrrd.org/lrrd29/4/idal29063.html>.
- RStudio Team. 2019. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
- Schofield, P., Pitt, R. E., Pell, A. N. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*, 72: 2980-2991.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds, 48: 185-197. *Animal Feed Science and Technology*, 48 (3-4): 185-197.
- Terry, S. A., Ribeiro, R. S., Freitas, D. S., Delarota, G. D., Pereira, L. G. R., Tomich, C.T.R., Mauricio, R. M., Chaves, A.V. 2016. Effects of *Tithonia diversifolia* on in vitro methane production and ruminal fermentation characteristics. *Animal Production Science*, 56: 437–441.
- 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*. Volume 30, Article #186. <http://www.lrrd.org/lrrd30/11/daiky30186.html>.
- Yan, T., Mayne, C.S., Porter, M.G. 2006. Effects of dietary and animal factors on methane production in dairy cows offered grass silage-based diets. *International Congress Series*, 1293: 123-126.

Capítulo 5. Propagación de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.

Los resultados consignados en este segmento corresponden al capítulo 5 de la tesis, y serán sometidos como artículo científico en la *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* ISSN:2428-6698 (Online).

Parámetros de propagación y crecimiento de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. bajo condiciones tropicales

J.E. Rivera^{1*}; T.E. Ruiz²; J. Chará¹; J.F. Gómez-Leyva³; R. Barahona⁴

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia; ²Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, La Habana. Cuba;

³Laboratorio de Biología Molecular, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México; ⁴Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

RESUMEN

La propagación eficiente de especies vegetales con alto potencial alimenticio juega un papel fundamental en su adopción y utilización por parte de los productores. Es importante, por tanto, desarrollar métodos económicos y rápidos para permitir el establecimiento exitoso de sistemas basados en gramíneas y arbustivas. Con el objetivo de conocer algunos aspectos reproductivos de diferentes genotipos destacados de *T. diversifolia* y así favorecer su propagación y mejor uso, se evaluó su potencial de germinación, producción de semilla y duración del ciclo reproductivo bajo condiciones tropicales. Se usaron 42 parcelas experimentales dispuestas en un diseño de bloques completos al azar con siete genotipos de *T. diversifolia* y dos niveles de fertilización en las que se midió la duración de la fase vegetativa y reproductiva, mientras que la germinación fue medida en laboratorio. Los genotipos tuvieron diferencias significativas en todas las variables agronómicas y de producción de semilla a excepción del tiempo de secado de aquenios y en el porcentaje de semillas rudimentarias ($p < 0.05$); los genotipos 1 y 2 fueron los que presentaron mayores tiempos. Con relación a la producción de semilla sexual, la fertilización tuvo efecto significado ($p < 0.05$) y en general incrementó el tiempo de las fases evaluadas. La mayor producción de semilla se dio en los genotipos 7 y 5. Finalmente, el porcentaje de germinación tuvo diferencias significativas entre genotipos y entre los tratamientos ($p = 0.000118$) con mayores porcentajes en los genotipos 3 y 6. Se concluye que a pesar de la baja viabilidad de la semilla sexual de *T. diversifolia* existen genotipos con un mayor potencial de producción de semilla y porcentaje de germinación, parámetros que pueden ser mejorados por medio de tratamientos pre-germinativos y el uso de fertilizantes.

Palabras clave: Fase reproductiva, fase vegetativa, germinación, semilla sexual, viabilidad de la semilla.

ABSTRACT

The efficient propagation of plant species with high nutritional potential plays a fundamental role in their adoption and use by producers. Therefore, it is important to develop inexpensive and rapid methods to allow the successful establishment of grass and shrub-based systems. In order to have information about some reproductive traits of different *T. diversifolia* genotypes and thus favor its propagation and better use, their germination potential, seed production and duration of the reproductive cycle were evaluated under tropical conditions. Forty-two experimental plots arranged in a randomized complete block design with seven genotypes of *T. diversifolia* and two levels of fertilization were used, in which the duration of the vegetative and reproductive phases was measured, while germination was measured in the laboratory. The different genotypes evaluated had significant differences in all variables measured except to the drying time of achenes and the percentage of rudimentary seeds ($p < 0.05$). Regarding the production of sexual seed, fertilization had a significant effect ($p < 0.05$) and in general increased the time of the phases evaluated. The highest seed production occurred in genotypes 7 and 5. Finally, regarding the germination percentage there were significant differences between genotypes in the three treatments evaluated and additionally there were differences between the genotypes ($p = 0.000118$), with higher percentages in genotypes 3 and 6. It is concluded that despite the low viability of the sexual seed of *T. diversifolia* there are genotypes with a greater potential for seed production and germination percentage which can be improved through pre-germination treatments and fertilization.

Keywords: Germination, reproductive phase, sexual seed, seed viability, vegetative phase.

INTRODUCCIÓN

La inclusión de plantas forrajeras altamente proteicas y con bajo contenido de fibra en la dieta de bovinos, resulta en un incremento de la calidad de la biomasa forrajera, que, a su vez, se traduce en un aumento de la producción de leche y carne (Barahona y Sánchez, 2005; Schultze-Kraft *et al.*, 2018). Por esta razón, una adecuada y eficiente propagación debe ser un objetivo de estudio para mejorar su utilización.

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray es una arbustiva de la familia Asteraceae que, por su facultad de adaptación a múltiples condiciones ambientales, edáficas y de manejo,

capacidad de rebrote y rápido crecimiento, y alto valor y aporte nutricional, ha demostrado su potencial para la alimentación animal (Ribeiro *et al.*, 2015; Mauricio *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2018). *T. diversifolia* puede reproducirse tanto por semilla gámica como por semilla asexual, confiriéndole gran capacidad de reproducción y colonización de nuevos hábitats (Ruiz *et al.*, 2009; Obukohwo y Umar, 2014). Esta especie florece y produce semillas durante todo el año especialmente en los meses de octubre y noviembre, aunque por condiciones ambientales puede ser de floración anual (Pérez *et al.*, 2009; Chagas-Paula *et al.*, 2012). Las plantas típicamente maduras producen entre 80,000 a 160,000 semillas por metro cuadrado anualmente, de las cuales se desarrollan completamente el 70%. Sin embargo, autores como Alcorcés (1996) y Obukohwo y Umar (2014) reportaron porcentajes de germinación por debajo del 30% en condiciones naturales.

Aunque observaciones de campo indican que *T. diversifolia* tiene una gran capacidad para crecer clonalmente (Ruiz *et al.*, 2009), en la actualidad se sabe que material proveniente de semilla sexual puede favorecer el desarrollo de sistemas radiculares más extensos, plantas más vigorosas, mayor persistencia de los cultivos y recuperación más rápida después del corte o pastoreo. Sin embargo, aún es difícil alcanzar material seminal de buena calidad (Romero *et al.*, 2014), y adicionalmente, dentro de esta especie existen genotipos con diferentes capacidades de germinación (Ruiz *et al.*, 2017).

Según Alcorcés *et al.*, (2007), aproximadamente el 65% de los granos de polen carecen de núcleos espermáticos, generando una fertilidad cercana al 30%. De igual manera, al estudiar el desarrollo de la microsporogénesis, se reconocen anomalías cromosómicas en 32% de células en metafase I y anafase I, identificando cromosomas rezagados. Por otro lado, las razones de la esterilidad del polen en *T. diversifolia* podrían converger en las irregularidades observadas en su división meiótica. La presencia de cromosomas rezagados en anafase I puede deberse a la falta de tensión que las enzimas sensitivas del cinetocoro ejercen sobre las fuerzas del huso, evitando así el arrastre de los cromosomas hacia los polos (Taylor *et al.*, 2004).

Con el objetivo de conocer algunos aspectos reproductivos de genotipos destacados de *T. diversifolia* y así favorecer su propagación y mejor uso, se evaluó el potencial de germinación, su desarrollo vegetativo y producción de semillas viables bajo condiciones tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos evaluados

Fueron evaluados los siete genotipos destacados de *T. diversifolia* identificados por Rivera *et al.* (2017), colectados en diferentes sitios de Colombia orientados a la producción bovina bajo pastoreo.

Localización

Las mediciones se desarrollaron en el municipio de San Luis de Cubarral (Meta, Colombia), Finca El Porvenir a 3°47'21.43"N, 73°49'15.93"O a una altura sobre el nivel del mar de 530 m. El sitio cuenta con una precipitación media anual de 4100 mm, una temperatura promedio de 24.8°C y se ubica en la zona de vida de bosque húmedo tropical (bh-T) (Holdridge, 1986).

Medición de condiciones ambientales

Durante todo el periodo de muestreo las variables ambientales de precipitación (mm), temperatura (°C), humedad relativa (%), radiación solar (W/m^2), punto de rocío (°C), velocidad del viento (m/s) e índice THSW (sensación térmica a causa del viento, la humedad relativa, la irradiancia (radiación solar instantánea) y la temperatura °C) fueron monitoreadas por medio de una estación meteorológica Vantage Pro 2™ (Davis ®).

Análisis de suelos

Las variables químicas y físicas del suelo medidas fueron: pH, C.E (dS/m), capacidad de campo (%), punto de marchitez permanente (%), densidad aparente (g/cc), carbono orgánico (%), materia orgánica (%), textura, potasio intercambiable (mg/kg), calcio intercambiable (mg/kg), magnesio intercambiable (mg/kg), sodio intercambiable (mg/kg), acidez intercambiable (mg/kg), hierro (mg/kg), manganeso (mg/kg), cobre (mg/kg), zinc (mg/kg), boro (mg/kg), fósforo (mg/kg), azufre (mg/kg) y C.I.C.E. (meq/100g).

VARIABLES DE CRECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN

Las variables de duración de la fase vegetativa (días), duración de la fase reproductiva (días), duración del secado de aquenios (días), fase de floración (días), cabezuelas por plantas (#), semillas por cabezuela (#), semillas por planta (#), semillas llenas (%), semillas vacías (%) y semillas rudimentarias (%), fueron medidas en los siete genotipos de *T. diversifolia* evaluados.

Las duración de la fase vegetativa fue determinada desde el momento de corte de las plantas hasta el inicio de la floración de más del 50% de los individuos que conformaban las parcelas experimentales; la duración de la fase reproductiva fue desde el momento de la aparición de botones florales hasta la caída de pétalos en el 50% de las plantas; la duración de secado de aquenios fue desde la caída de pétalos en las plantas hasta lograr un color marrón oscuro de las cabezuelas y la fase de floración fue la sumatoria de las fases vegetativa, reproductiva y secado de aquenios. Las variables de cabezuelas por

plantas (#), semillas por cabezuela (#), semillas por planta (#), semillas llenas (%), semillas vacías (%) y semillas rudimentarias (%), fueron medidas de forma manual y en cinco plantas de cada una de las parcelas experimentales.

Germinación de la semilla sexual

Se evaluaron dos tratamientos pre-germinativos y un tratamiento sin proceso previo (Tratamiento 1). Los tratamientos pre-germinativos fueron: agua a 80°C durante 10 minutos (Tratamiento 2) siguiendo las recomendaciones de Akinola *et al.* (2000), Agboola *et al.* (2005) y Nasreen *et al.* (2015), y ácido sulfúrico al 50% (H₂SO₄) durante 5 minutos (Tratamiento 3) (Muoghalu y Chuba, 2005). La semilla estuvo almacenada durante 4 meses después de ser colectada con el objetivo de disminuir la latencia fisiológica de la semilla (Agboola *et al.* 2005; Santos-Gally *et al.* 2019), y la germinación fue evaluada en macetas experimentales en laboratorio durante 20 días.

Diseño experimental y análisis de la información

Los siete genotipos de *T. diversifolia* fueron establecidos en parcelas experimentales en un diseño de bloques completos al azar con dos factores, los genotipos y los niveles de fertilización. Cada material contó con tres repeticiones las cuales estuvieron conformadas por 36 plantas cada una (0.8 m x 0.8 m) y dos niveles de fertilización (cero fertilización y fertilización de acuerdo con la extracción de nutrientes a los 40 días de crecimiento (Botero, 2017). El modelo matemático de este diseño se presenta en la ecuación 1.

$$y_{klj} = \mu + \alpha_k + \gamma_l + \xi_{kl} + \beta_j + \varphi_{klj}$$

Ecuación 1. Modelo general de un diseño de bloques completos al azar

Donde:

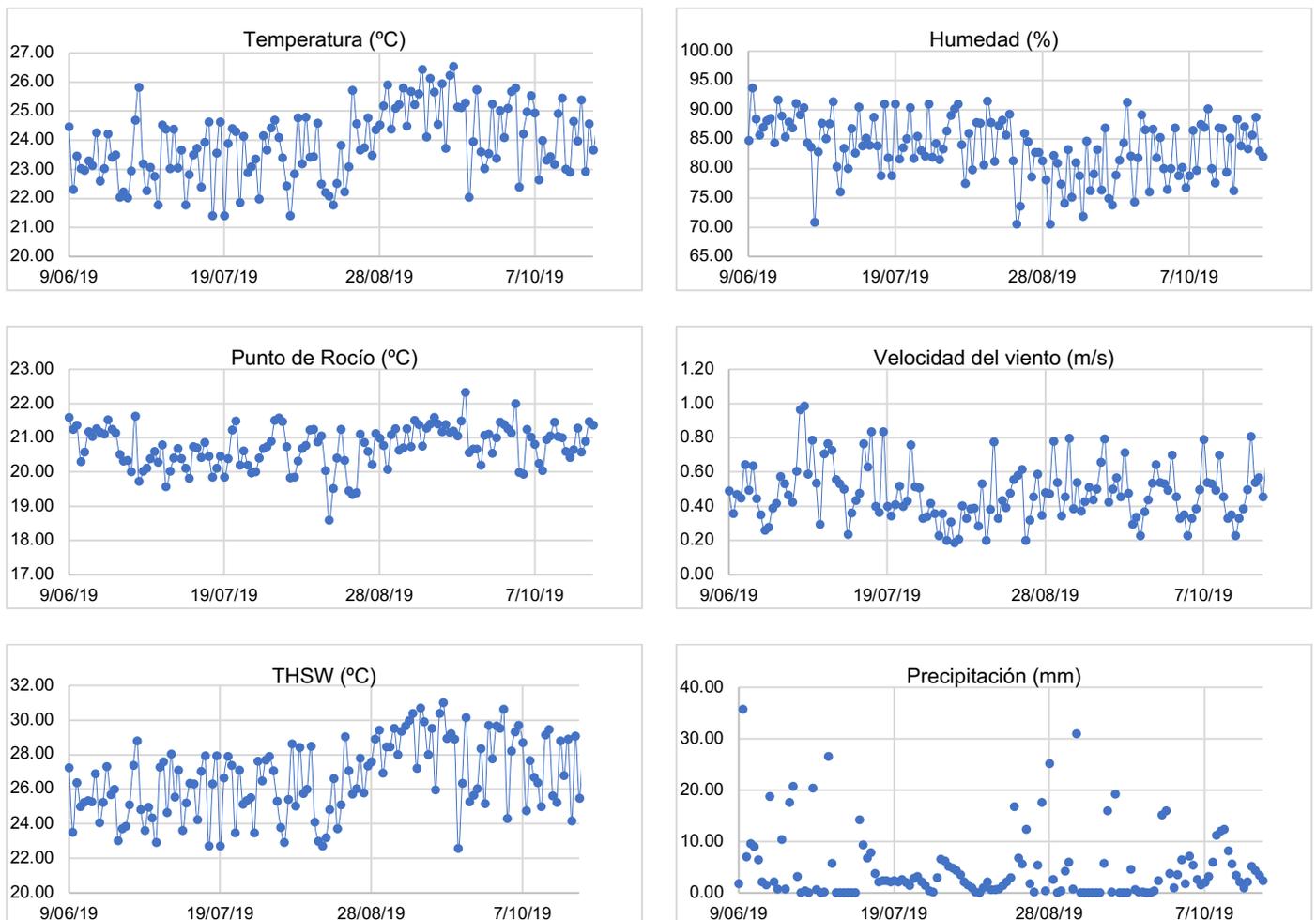
y_{klj} = Observación en la unidad experimental de la variable a evaluar; μ = es la media del efecto general; α_k = efecto del factor k (materiales colectados 1, 2, 3...7); γ_l = efecto del factor l (nivel de fertilización 1,2...); β_j = efecto del bloque j; ξ_{kl} = interacción de los dos factores; φ_{klj} = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental lkj.

Todos los análisis fueron realizados en la herramienta RStudio usando la librería “*agricolae*” (R Core Team 2019). Para los análisis se evaluó la normalidad, homogeneidad de la varianza y de aditividad, además, cuando fue identificada diferencia entre las medias se utilizó la prueba de contraste de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Finalmente, cuando los grupos de datos no cumplieron con las condiciones para un análisis paramétrico, fue usada la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para las comparaciones.

RESULTADOS

Condiciones ambientales

La Figura 1 muestra las condiciones ambientales observadas durante el periodo de evaluación. Según los registros obtenidos en el sitio de experimentación, la temperatura promedio fue de 23.9 ± 1.2 °C, la humedad relativa fue de $83.4 \pm 5\%$, el punto de rocío promedio fue 20.8 ± 0.6 °C, la velocidad del viento fue de 0.7 ± 0.2 , el índice THSW promedio fue 26.7 ± 2.1 °C, la radiación solar 147 ± 53.3 W/m² y la precipitación acuminada fue de 556.2 mm.



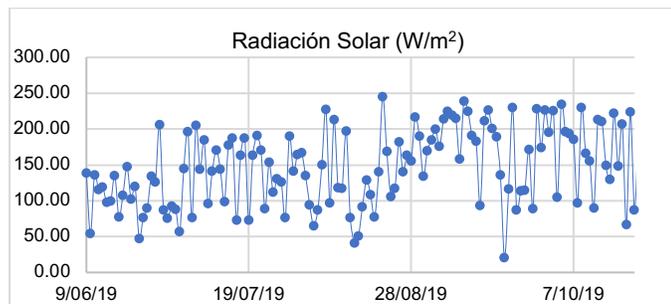


Figura 1. Condiciones ambientales observadas durante el periodo de experimentación

Las principales características químicas y físicas de los suelos donde se encontraron las parcelas experimentales se muestran en la Tabla 1. Cada uno de bloques que conformaron el diseño experimental fue analizado. Los suelos fueron ácidos y presentaron baja fertilidad por limitado aporte de nutrientes, características habitualmente encontradas bajo condiciones tropicales.

Tabla 1. Características químicas y físicas del suelo

ítem	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
pH	4.71	4.73	4.67
C.E (dS/m)	0.07	0.06	0.06
Capacidad de campo (%)	18.5	15.8	13.8
Punto de marchitez permanente (%)	9.25	7.9	6.9
Densidad aparente (g/cc)	1.51	1.46	1.44
Carbono orgánico (%)	1.02	0.88	0.62
Materia orgánica (%)	1.76	1.52	1.07
Arena (%)	68	60	50
Limo (%)	12	16	18
Arcilla (%)	20	24	32
Textura	Franco - Arcillo - Arenoso	Franco - Arcillo - Arenoso	Franco - Arcillo - Arenoso
Potasio intercambiable (mg/kg)	23.4	23.4	15.6
Calcio intercambiable (mg/kg)	274	130	132
Magnesio intercambiable (mg/kg)	24	16.8	18
Sodio intercambiable (mg/kg)	23	18.4	16.1
Acidez intercambiable (mg/kg)	218	219	172
Hierro (mg/kg)	305	358	459
Manganeso (mg/kg)	9.6	6	3.3
Cobre (mg/kg)	1	0.75	0.53
Zinc (mg/kg)	0.7	0.4	0.4
Boro (mg/kg)	0.11	0.17	0.13

Fósforo (mg/kg)	7.6	3.7	5.5
Azufre (mg/kg)	7.8	9.6	3.6
C.I.C.E. (meq/100g)	3.64	3.35	2.82

pH: potencial de hidrogeniones; C.E.: conductividad eléctrica; mg: miligramos; kg: kilogramos; C.I.C.E.: capacidad de intercambio catiónico.

Fases de desarrollo

Los genotipos evaluados tuvieron diferencias significativas en todas las variables de desarrollo a excepción del tiempo de secado de aquenios y del porcentaje de semillas rudimentarias ($p < 0.05$) (Tabla 2). El genotipo 1 (140.1 días) fue el material que tomó mayor tiempo en la sumatoria de las etapas de crecimiento y desarrollo (fase de floración) y el genotipo 4 (127.2 días) fue el que presentó menores tiempos con diferencias significativas ($p < 0.05$).

Con relación a la producción de semilla sexual, la fertilización tuvo efecto significado al generar 2.14 veces más semillas ($p < 0.05$) y en general incrementó el tiempo de las fases evaluadas en aproximadamente 5 días. Los genotipos 5 y 7 fueron los materiales con mayor producción de cabezuelas por plantas, mayor porcentaje de semillas llenas y presentaron el número más alto de semillas por planta (Tabla 2), esto asociado probablemente a su mayor número de ramas. De igual forma se destaca el alto porcentaje de semillas vacías en todos los genotipos, así como de semillas rudimentarias, observándose que más del 30% de las semillas no tienen viabilidad física.

Germinación

En la Tabla 3 se presenta el porcentaje de germinación de la semilla sexual de los genotipos evaluados con tres tratamientos usados. De acuerdo con los resultados obtenidos hubo diferencias significativas entre genotipos y tratamientos ($p = 0.000118$). En promedio los porcentajes de germinación fueron 46.87, 53.53 y 25.97 para el tratamiento testigo, uso de agua a 80°C y ácido sulfúrico, respectivamente, y este proceso inició a los tres días después de la siembra.

La germinación de las semillas sin tratamiento fue significativamente menor en el genotipo 1 que los otros 6 genotipos ($p < 0.0001$). Además, este mismo genotipo tuvo los valores más bajos cuando se usó el tratamiento con agua y de ácido sulfúrico, aunque no tuvo diferencias significativas con los genotipos 2 y 7. De otro lado la fertilización incrementó en promedio 9.2% la germinación de los diferentes genotipos y el tratamiento que logró mayor germinación fue el uso de agua a 80°C y el tratamiento con menor germinación fue el que utilizó ácido sulfúrico. En general los genotipos 3 y 6 fueron los que presentaron mayor porcentaje de germinación, pero solo tuvieron diferencias significativas frente al genotipo 1.

Tabla 2. Fases de desarrollo agronómico y producción de semilla sexual de diferentes genotipos de *Tithonia diversifolia*

Parámetro	Genotipo							Fertilización		Genotipo	Fertilización	EEM
	Gen1	Gen2	Gen3	Gen4	Gen5	Gen6	Gen7	No	Si	<i>p- value</i>		
Fase vegetativa (días)	86.83a	84.02a	80.66ab	74.16c	76.02bc	80.66ab	76.33bc	77.14	82.48	<0.001*	<0.001*	0.920
Fase reproductiva (días)	31.83a	29.16ab	28.83ab	31.51ab	29.33ab	27.51b	31.33ab	29.86	30.00	0.022*	0.845	0.401
Secado de aquenios (días)	21.83	21.67	22.67	21.50	23.33	23.33	21.67	22.86	21.71	0.670	0.134	0.361
Fase de floración (días)	140.5a	134.8ab	132.2bc	127.2c	128.7bc	131.5bc	129.3bc	129.9	134.1	<0.001*	0.001*	0.911
Cabezuelas por planta (#)	32.13b	62.96a	46.03ab	53.63ab	70.12a	45.066ab	71.86a	36.35	72.73	0.002*	<0.001*	4.141
Semillas por cabezuela (#)	142.4c	155.5ab	149.1bc	152.6ab	153.7ab	156.5ab	164.0c	147.3	159.6	<0.001*	<0.001*	1.591
Semillas por planta (#)	4668.1c	10112.8ab	6958.1bc	8237.9abc	10908.2ab	7217.1bc	11946.4a	5460	11697	<0.001*	<0.001*	713.1
Semillas llenas (%)	63.50b	69.50a	62.33b	71.16a	69.33a	67.00ab	62.66b	65.52	67.48	0.025*	0.244	0.913
Semillas vacías (%)	23.00ab	22.83ab	25.00a	20.00b	20.83b	22.83ab	25.66a	21.48	24.29	0.041*	0.006*	0.565
Semillas rudimentarias (%)	13.50	7.67	12.67	8.83	9.83	10.17	11.67	11.05	10.19	0.059	0.418	0.557

*Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Tabla 3. Porcentaje de germinación de la semilla sexual de diferentes genotipos de *Tithonia diversifolia*

Tratamiento	Genotipo							Fertilización		Genotipo	Fertilización	EEM
	Gen1	Gen2	Gen3	Gen4	Gen5	Gen6	Gen7	No	Si	<i>p- value</i>		
Tratamiento 1	32.62b	45.36a	54.02a	45.82a	47.69a	53.99a	48.62a	42.65	51.11	<0.001	0.002	1.53
Tratamiento 2	39.54b	51.64a	58.18a	54.01a	52.89a	62.23a	56.88a	46.94	59.46	0.001	<0.001	1.89
Tratamiento 3	17.53c	22.31abc	31.97a	30.34ab	19.68a	31.83a	26.59abc	23.36	30.15	0.001	0.025	1.31

Tratamiento 1: sin tratamiento previo; Tratamiento 2: agua a 80°C por 10 minutos; Tratamiento 3: Inmersión en ácido sulfúrico; *Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Conocer la fenología de las especies arbustivas y su potencial de propagación permite lograr un mayor aprovechamiento y un uso más eficiente y económico. Los resultados de los tiempos de cada una de las fases evaluadas en este estudio a pesar de encontrar diferencias significativas entre los genotipos coinciden con lo reportado por Saavedra (2016). En general los tiempos de crecimiento y desarrollo fueron modificados por la fertilización debido probablemente a la disminución de algunos factores de estrés. De acuerdo con Márquez *et al.* (2007) un uso adecuado de fertilización favorece la producción de semilla y genera un mejor desarrollo. Saavedra (2016) al evaluar tres orígenes de *T. diversifolia*, encontró una duración del proceso de desarrollo muy similar entre los materiales, con una duración del desarrollo vegetativo entre 88 y 137 días, el proceso de floración entre 18 y 22 días, y una formación de frutos entre 13 y 18 días. En cuanto a las semillas llenas, vacías y rudimentarias, esta misma autora encontró valores entre 65 y 75%; 15.75 a 26% y 9.31 a 12%, respectivamente.

La producción de semilla para *T. diversifolia* también ha sido determinada por diferentes autores. Etejere y Olayinka (2014) y Etejere y Olayinka (2015) en estudios en África encontraron que esta especie puede producir entre 35 y 212 capítulos por planta, entre 32 y 62 semillas por capítulo, entre 1,120 a 13,144 semillas por planta y que 1000 semillas pesan entre 6.42 y 7.5 g. Estos resultados evidencian gran variabilidad en esta especie y los resultados concuerdan con los encontrados en esta evaluación a excepción del número de semillas por capítulo, ya que en este estudio se encontró un mayor número en todos los genotipos.

Los resultados de este estudio evidencian que los genotipos 5 y 7 fueron los que tuvieron mayor producción de cabezuelas por plantas, mayor porcentaje de semillas llenas y presentaron el número más alto de semillas por planta. Además, el genotipo con menor cantidad de producción de semillas fue el genotipo 1 el cual fue significativamente menor al de los demás orígenes.

T. diversifolia se puede reproducir tanto por semilla gámica como por semilla asexual, lo que le confiere gran capacidad de reproducción y colonización de nuevos hábitats (Ruiz *et al.*, 2010; Obukohwo y Umar, 2014). Esta especie florece y produce semillas durante todo el año especialmente en los meses de octubre y noviembre, aunque por condiciones ambientales puede ser anual (Pérez *et al.*, 2009; Chagas-Paula *et al.*, 2012). Las plantas maduras producen de 80,000 a 160,000 semillas por metro cuadrado anualmente, de las cuales se desarrollan completamente el 70%, pero autores como Alcorcés (1996) y Obukohwo y Umar (2014) reportan porcentajes de germinación por debajo del 30% en condiciones naturales.

Los resultados encontrados en este estudio indican que la germinación de *T. diversifolia* durante los primeros meses de pos-cosecha es aceptable, aunque variable entre genotipos. Algunos autores destacan que esta variabilidad puede deberse a una latencia fisiológica (Santos-Gally *et al.*, 2019) y a irregularidades observadas en su división meiótica (Taylor *et al.*, 2004; Alcorcés *et al.*, 2007). Existen diferencias entre ecotipos en su capacidad de germinación. Los resultados encontrados coinciden con lo reportados por Ruiz *et al.*, (2018), quienes en un estudio de 29 materiales colectados en Cuba hallaron diferencias significativas en los porcentajes de germinación los cuales oscilaron entre el 5 y el 67%. También los resultados coinciden con lo encontrado por Padilla *et al.*, (2018), pero están por debajo de lo encontrado por Santos-Gally *et al.*, (2019) y Agboola *et al.*, (2006) quienes alcanzaron porcentajes por encima del 70% en algunos materiales. Los genotipos 3 y 6 estudiados en esta investigación fueron los de mayor porcentaje de germinación y el genotipo 1 fue el que tuvo menor viabilidad de semillas.

Las limitantes en la reproducción sexual en *T. diversifolia* han sido reportados por Alcorcés *et al.* (2007). Estos autores encontraron que aproximadamente el 65% de los granos de polen carecen de núcleos espermáticos, indicando una fertilidad cercana al 30%. De igual manera al estudiar el desarrollo de la microsporogénesis, se reconocieron anomalías cromosómicas en 32% de células en metafase I y anafase I, identificando cromosomas rezagados, y en la metafase II 47% de las células presentaron asincronía de un juego de cromosomas y cromosomas rezagados. Se ha observado que en algunas especies de dicotiledóneas los dos núcleos resultantes de la primera división meiótica entran asincrónicamente en la segunda (González *et al.*, 2001), lo cual podría resultar en esterilidad masculina, anomalía que también la han relacionado con la orientación del huso, cromosomas rezagados y puentes anafásicos que afectan la conformación de las tétradas (Mendes- Bonato *et al.*, 2002). Imery y Cequea (2002), estudiando la microsporogénesis de *Aloe vera*, encontraron baja viabilidad del polen ($39.3 \pm 10.54\%$), relacionándola con hallazgos tales como: quiasmas persistentes entre homólogos grandes y desplazamiento precoz de cromosomas pequeños, presencia de puentes dicéntricos solitarios o acompañados de fragmentos acéntricos en la meiosis I, así como también la presencia ocasional de puentes y fragmentos. Esta situación puede ser similar a lo que ocurre en especies como *T. diversifolia*.

De otro lado, las razones de la esterilidad del polen en *T. diversifolia* también podrían obedecer a las irregularidades observadas en su división meiótica. La presencia de cromosomas rezagados en la anafase I puede deberse a la falta de tensión que las enzimas sensitivas del cinetocoro ejercen sobre las fuerzas del huso, evitando así el arrastre de los cromosomas hacia los polos, o a que al menos uno de los cromosomas esté desalineado, generando señales negativas que la

célula identifica (Taylor *et al.*, 2004).

También es importante mencionar que existen criterios divergentes sobre la viabilidad y latencia de la semilla de *T. diversifolia*. Por ejemplo, Santos-Gally *et al.* (2019) mencionan que el almacenamiento de la semilla y el momento de colección juegan un importante papel en la viabilidad de la semilla sexual de esta especie. Estos autores reportaron que un almacenamiento por encima de los cuatro meses y una recolección de semilla cuando los aquenios se encuentren de color marrón puede incrementar el porcentaje de germinación hasta un 90%. Otros autores de igual forma reportan de procesos pre-germinativos como el ácido sulfúrico y el agua a altas temperaturas por algunos minutos (80 a 100 °C) pueden incrementar la germinación (Muoghalu y Chuba, 2005; Agboola *et al.*, 2006). Finalmente, Padilla *et al.*, (2018) mencionaran también que el momento de colectar la semilla puede mejorar la germinación de la semilla, y destacan que el mejor momento es cuando la cabezuela se encuentra con brácteas y pedúnculos secos (color marrón) lo que coincide con lo mencionado por Santos-Gally *et al.* (2019).

Mejorar la reproducción de esta especie vía semilla sexual incrementaría su potencial como arbustiva forrajera en los sistemas de producción pecuaria. Observaciones de campo indican que *T. diversifolia* tiene una gran capacidad para crecer clonalmente (Ruiz *et al.*, 2009), pero en la actualidad se sabe que material proveniente de semilla sexual puede favorecer el desarrollo de sistemas radiculares más extensos, plantas más vigorosas, mayor persistencia en el tiempo de los cultivos y recuperación más rápida después del corte o pastoreo, aunque aún es difícil alcanzar material seminal de buena calidad (Romero *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

T. diversifolia cuenta con genotipos capaces de tener fases de crecimiento y desarrollo significativamente diferentes entre ellos, modificando su momento reproductivo y de producción de semilla sexual. Gracias al crecimiento diferenciado, existen genotipos con una mayor producción de semilla sexual viable asociada al número de tallos y flores por planta como los genotipos 5 y 7 evaluados en este estudio.

Los resultados encontrados en este estudio confirman que, si bien esta especie tiene una germinación baja, existen procesos pre-germinativos con la capacidad de incrementar el porcentaje de germinación. También el uso de fertilizante aumenta no solo la producción de semilla viable sino también su germinación, razón por la cual puede ser una alternativa viable para tratar plantas productoras de semilla y

así mejorar la propagación de esta especie como sucedió con los genotipos 3 y 6 quienes fueron los que presentaron mayor porcentaje de germinación.

Finalmente, este estudio confirma que la especie *T. diversifolia*, posee un alto porcentaje de semillas no viables, aspecto que invita a desarrollar trabajos orientados a entender los factores responsables de este fenómeno con el fin de facilitar su utilización, especialmente la de los genotipos destacados identificados en este trabajo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto *Ganadería Colombiana Sostenible*, financiado por Gobierno del Reino Unido y el Fondo Mundial para el Medio Ambiente, por aportar recursos necesarios para las evaluaciones y recolección de materiales. También, a los predios El Porvenir y Los Alpes por permitir llevar a cabo las evaluaciones en sus instalaciones, así como a Colciencias en su convocatoria de Doctorados Nacionales 727 de 2015.

Bibliografía

- Agboola, D.A., Idowu, W.F., Kadiri, M. 2005. Seed germination and seedling growth of the Mexican sunflower *Tithonia diversifolia* (Compositae) in Nigeria, Africa. *Revista de Biología Tropical*, 54 (2): 395-402.
- Akinola, J.O., Larbi, A., Farinu, G. O., Odunsi, A.A. 2000. Seed treatment methods and duration effects on germination of wild sunflower. *Expl Agric.*, 36: 63 – 69.
- Alcorcés, N. 1996. Estudios citogenéticos comparativos entre *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray y *Helianthus annuus* L. (Asteraceae – Heliantheae). *Oriente Agropecuario*, 21: 62-79.
- Alcorcés, N., Lárez, A., Mayz, J. 2007. Adiciones al conocimiento citogenético de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray (Asteraceae). *Acta Botanica Venezuelica*, 30(2): 267 – 275.
- Barahona, R.B., Sánchez, S. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1): 69-82.
- Botero, J. 2017. Potencial de extracción y utilización de nutrientes de *Tithonia diversifolia* y su relación con el rendimiento y calidad nutricional. Tesis para optar al Título de PhD en Ciencias Agrícolas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia.
- Chagas-Paula, D. A., Oliveira, R. B., Rocha, B. A., Da Costa, F. B. 2012. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*, 9(2): 210-235. doi:10.1002/cbdv.201100019.
- Etejere, E. O., Olayinka, B. U. 2014. Seed Production, Germination, Emergence and Growth of *Tithonia diversifolia* (HEMSL) A. Gray as Influenced by Different

- Sowing Depths and Soil Types. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 14 (5): 440-444.
- Etejere, E. O., Olayinka, B. U. 2015. Seed Production, Germination, Emergence and Growth of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray as Influenced by Different Sowing Depths and Soil Types. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 14 (3): 294-299.
- González, F., Rudall, P., Furness, C. 2001. Microsporogenesis and systematics of Aristolochiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 137: 221-242.
- Holdridge, L. R. 1986. *Ecología basada en zonas de vida*. Leslie Holdridge. IICA. San José, Costa Rica.
- Imery, J., Cequea, H. 2002. Anormalidades cromosómicas en la microsporogénesis de *Aloe vera* (L.) Burm.f. (Aloaceae). *Acta Bot. Venez.* 25(2): 143-152.
- Márquez, F., J. Sánchez, D. Urbano, y C. Dávila. 2007. Evaluación de la frecuencia de corte y tipos de fertilización sobre tres genotipos de pasto elefante (*Pennisetum purpureum*). *Zootecnia Tropical*. 25(4): 253-259.
- Mauricio, R. M., Calsavara, L. H. F., Ribeiro, R. S., Pereira, L. G. R., Freitas, D. S., Paciullo, D. S., Barahona, R., Rivera, J. E., Chará, J., Murgueitio, E. 2017. Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(4): 00146. <http://medcraveonline.com/JDVAR/JDVAR-05-00146.php>.
- Mendes-Bonato, A.B., Junqueira, R., Pagliarini, M.S., Valle, C.B., Oliveira, M.I. 2002. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens* abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. *Cell Biology International Reports*, 26(7): 641-646.
- Muoghalu, J.I., Chuba, D.K. 2005. Seed germination and reproductive strategies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and *Tithonia rotundifolia* (P.M.) Blake. *Applied ecology and environmental research*, 3(1): 39 – 46.
- Nasreen, S., Khan, M.A., Uddin, S. 2015. Response of sunflower to various pre-germination techniques for breaking seed dormancy. *Pakistan Journal of Botany*, 47(2): 413-416.
- Obukohwo, E., Umar, B. 2014. Seed Production, Germination, Emergence and Growth of *Tithonia diversifolia* (HEMSL) A. Gray as Influenced by Different Sowing Depths and Soil Types. *American-Eurasian journal of agricultural & environmental sciences*, 14 (5): 440-444.
- Padilla, C., Rodríguez, I., Ruiz, T. E., Herrera, M. 2018. Determinación del mejor momento de cosecha de semilla gámica, *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 30, Article #71. <http://www.lrrd.org/lrrd30/4/idal30071.html>.
- Pérez, A., Montejo, I., Iglesias, J., López, O., Martín, G.J., García, D.E., Milián, I., Hernández, A. 2009. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Pastos y Forrajes*, 32 (1): 1 – 15.
- Ribeiro, R.S., Terry, S.A., Sacramento, J.P., Rocha e Silveira, S., Bento, C.B., Silva, E.F., Montovani, H.C., Gama, M.A.S., Pereira, L.G., Tomich, T.R., Mauricio, R.M., Chaves, A. 2016. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *Plos One* 11: e0165751 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>.
- Rivera, J.E., Gómez-Leyva, J.F., Castaño, K., Morales, J.G., Chará, J., Barahona, R. 2017. Diversidad molecular, química y morfológica en materiales de

- Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray para la alimentación animal en Colombia y México. IX Congreso Internacional Sobre Sistemas Silvopastoriles. Manizales, Colombia, 249 – 255 pp.
- Rivera, J.E., Chará, J., Gómez-Leyva, J. F., Ruíz, T.E., Barahona, R. 2018. Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 30, Article #200. from <http://www.lrrd.org/lrrd30/12/rive30200.html>
- Romero, O., Galindo, A., Murgueitio, E., Calle, Z. 2014. Primeras experiencias en la propagación de botón de oro (*Tithonia diversifolia*, Hemsl. Gray) a partir de semillas para la siembra de sistemas silvopastoriles intensivos en Colombia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17: 524 – 528.
- Ruiz, T.E., Febles, G., Díaz, H., Achang, G. 2009. Efecto de la sección y el método de plantación del tallo en el establecimiento de *Tithonia diversifolia*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43(1): 91-96.
- Ruíz, T.E., Febles, G., Torres, V., González, J., Achan, G., Sarduy, L. y Díaz, H. 2010. Evaluación de materiales recolectados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la zona centro-occidental de Cuba. *Revista cubana de ciencia agrícola*, 44: 291 - 296.
- Ruiz, T.E., Febles, G.J., Alonso, J., Crespo, G., Valenciaga, N. 2017. Agronomy of *Tithonia diversifolia* in Latin America and the Caribbean region. In: Savon, L.L, Gutierrez, O., Febles, F. (Eds). *Mulberry, moringa and tithonia in animal feed, and other uses. Results in Latin America and the Caribbean*. ICA / EDICA. Cuba, 294 pp.
- Ruiz, T.E., Febles, G., Achan, G., Díaz, H., González, J. 2018. Capacidad germinativa de semilla gámica de materiales colectados de *Tithonia diversifolia*(Hemsl.) Gray en la zona centro-occidental de Cuba. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 30, Article #81. <http://www.lrrd.org/lrrd30/5/ruiz30081.html>
- RStudio Team. 2019. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
- Saavedra, S. 2016. Fenología y fisiología de semillas de botón de oro *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray. Tesis para optar en título de máster en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Medellín, Colombia. 74 pp.
- Santos-Gally, R., Muñoz, M., Franco, G. 2019. Efecto de la latencia sobre la germinación de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). En: Rivera J., Peri P., Chará J., Díaz M., Colcombet L., Murgueitio E. (Ed.). *X Congreso internacional sobre sistemas silvopastoriles: por una producción sostenible*. Libro de Actas. Editorial CIPAV, Cali. 417 – 425 pp.
- Schultze-Kraft, R., Rao, I.M., Peters, M., Clements, R.J., Bai, C., Liu, G. 2018. Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview. *Tropical Grasslands*, 6(1): 1–14. <http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/article/view/394/241>.
- Taylor, S., Scott, M., Holland, A. 2004. The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Research*, 12: 599-616.

Capítulo 6. Consumo de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.

Los resultados consignados en este segmento corresponden al capítulo 6 de la tesis, y serán sometidos como artículo científico en la *Revista Lasallista de Investigación* ISSN: 1794 – 4449 (Print) 2256 – 3938 (Online).

Consumo de diferentes genotipos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. por bovinos bajo condiciones de suelos ácidos de Colombia

J.E. Rivera^{1*}; T. E. Ruiz²; J. Chará¹; J.F. Gómez-Leyva³; R. Barahona³

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia; ²Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, La Habana. Cuba; ³Laboratorio de Biología Molecular, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México; ⁴Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

RESUMEN

El consumo voluntario de especies arbustivas como *T. diversifolia* mejora la oferta de nutrientes de la dieta de bovinos, aunque existen diferentes compuestos fitoquímicos que pueden limitar la palatabilidad y el consumo de esta especie. El objetivo de este estudio fue determinar el consumo y selectividad de diferentes genotipos de *T. diversifolia* con potencial forrajero para bovinos. Se evaluaron siete genotipos de *T. diversifolia*, en cuanto al consumo de forraje verde (FV), tiempo en el comedero y número de visitas al comedero por parte de bovinos en crecimiento. Se utilizó un diseño experimental de rectángulo latino con 4 parejas de animales con tres repeticiones y la composición química de los siete materiales fue determinada. En cada periodo de observación, el consumo promedio de FV fue de 0.39 ± 0.045 kg, con diferencias significativas entre los genotipos 1 y 7, aunque todos los materiales fueron consumidos. El tiempo en el comedero promedio usado en cada periodo de observación fue de 1.64 ± 0.3 minutos, aunque no hubo diferencias entre genotipos ($p = 0.0818$). Finalmente se encontraron diferencias en el número de idas al comedero (los genotipos con mayores idas fueron el 5 y 7 con 3.66 y 3.52 veces, respectivamente) y la composición química de los genotipos no presentó diferencias significativas en los distintos nutrientes evaluados ($p > 0.05$). Se concluye que, si bien hubo diferencias en el consumo de FV, *T. diversifolia* es consumida por bovinos en fase de crecimiento, y ofrece altas cantidades de nutrientes.

Palabras clave: Alimentación alternativa, arbusto forrajero, Botón de oro, palatabilidad, selectividad.

ABSTRACT

The voluntary intake of shrub species such as *T. diversifolia* improves the supply of nutrients in the bovine diet, although there are different phytochemical compounds that can limit the palatability and consumption of this species. The objective of this study was to determine the consumption and selectivity of different genotypes of *T. diversifolia* with forage potential for cattle. Seven genotypes of *T. diversifolia* were evaluated, regarding fresh fodder intake (FFI), time spent on intake and number of visits to the feeder; An experimental Latin rectangle design was used with 4 couples of animals with three repetitions; the chemical composition of the seven materials was also determined. The FFI was 0.39 ± 0.045 kg, with significant differences between genotypes 1 and 7, although all materials were consumed. The average intake time used in each observation period was 1.64 ± 0.3 minutes without significant differences between genotypes ($p = 0.0818$). Finally, differences were found in the number of visits to the feeder and the chemical composition of the genotypes did not show significant differences in the different fractions evaluated ($p > 0.05$). It is concluded that, although there were differences in the FF intake, *T. diversifolia* is consumed by bovines in the growth phase and offers good provision of nutrients regardless of the genotype.

Keywords: Alternative feed, forage shrubs, Mexican Sunflower, palatability, selectivity.

INTRODUCCIÓN

La contribución nutricional, productiva y ambiental de especies arbustivas como *Tithonia diversifolia*, durante los últimos años ha favorecido la eficiencia productiva de diferentes sistemas pecuarios (Ribeiro *et al.*, 2016; Gallego-Castro *et al.*, 2017; Schultze-Kraft *et al.*, 2018; Rivera *et al.*, 2019). Si bien diferentes investigaciones han coincidido que *T. diversifolia* constituye una excelente alternativa nutricional para rumiantes debido a sus bajos valores de fibra (FDA y FDN), alto contenido de nitrógeno, calcio y fósforo, así como aceptables porcentajes de degradación y contenido de carbohidratos no estructurales (Osuga *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2016; Mauricio *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2018), su conformación fitoquímica de saponinas, taninos, aceites esenciales y flavonoides (Chagas-Paula *et al.*, 2012; Ejelonu *et al.*, 2017), ha favorecido el juicio relacionado con su bajo consumo por rumiantes.

Según Kaitho *et al.* (1997) la palatabilidad está determinada por variables animales, vegetales y ambientales. La palatabilidad del forraje depende de la capacidad de proporcionar estímulos al sentido orofaríngeo del animal, por medio del sabor, olor y textura. Fenoles, alcaloides, taninos y compuestos aromáticos son algunas de las sustancias químicas que se sabe que alteran la palatabilidad y el consumo de especies vegetales (Ngwa *et al.*, 2003). Factores animales como el sentido, la especie, la experiencia previa y las condiciones fisiológicas influyen en la palatabilidad (Mokoboki *et al.*, 2011). De acuerdo con Personius *et al.*, (1987), los herbívoros pueden detectar algunos compuestos tóxicos por el olor antes de comer o inmediatamente después del primer bocado.

Se han reportado diferentes ensayos para evaluar la palatabilidad (Ngwa *et al.*, 2003). Sin embargo, algunos autores coinciden que los métodos convencionales no son convenientes para evaluar la palatabilidad porque son costosos y complejos (Ngwa *et al.*, 2003). Debido a esto Kaitho *et al.*, (1996) y Mokoboki *et al.*, (2011) reportaron que los métodos basados en la observación de alimentación directa y la ingesta de especies de plantas parecen ser más adecuados para determinar el consumo y la preferencia por especies vegetales.

El objetivo de este estudio fue determinar el consumo y preferencia de siete genotipos de *T. diversifolia* con potencial forrajero bajo condiciones de estabulación en animales en crecimiento y así aportar información sobre el consumo voluntario del forraje de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos de Tithonia diversifolia usados y localización del experimento

Fueron utilizados siete genotipos de *T. diversifolia* con potencial forrajeros para rumiantes procedentes de distintos lugares de Colombia (Rivera *et al.*, 2017). Los diferentes materiales se colectaron a la edad de 40 días de parcelas experimentales (3°47'21.43" N y 73°49'15.93" O) establecidas en el municipio de San Luis de Cubarral (Meta, Colombia), a una altura de 530 msnm, una precipitación media de 4100 mm/año, una temperatura promedio de 24.8°C y bajo la zona de vida de bosque húmedo tropical (bh-T) (Holdridge, 1986).

Composición química de los materiales

Cada uno de los genotipos se analizaron en las fracciones de: (1) contenido de humedad y otras materias volátiles (MS, g/100 de MS), (2) proteína cruda (PC g/100 de MS), (3) cenizas (Cen g/100 de MS), (4) extracto etéreo (EE g/100 de MS), (5)

fibra en detergente neutra (FDN g/100 de MS), (6) fibra en detergente ácida (FDN g/100 de MS), (7) calcio (Ca g/100 de MS), (8) fósforo (P g/100 de MS), (9) total de nutrientes digestibles (NDT g/100 de MS), (10) degradabilidad de la MS (Deg g/100 de MS), (11) energía bruta (EB, Mcal/kg de MS), (12) energía neta de lactancia (Enl, Mcal/kg de MS), (13) fenoles totales (FT, % ácido tánico) y (14) taninos totales (Tan, % ácido tánico). Estas variables fueron determinadas en el laboratorio de Nutrición Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) por medio de espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS) utilizando las ecuaciones generadas para recursos forrajes del trópico colombiano (Ariza-Nieto, *et al.*, 2018) y el porcentaje Ca y P se determinó por espectrofotometría AA y UV- VIS basado en NTC 5151 (2003) y 4981 (2001), respectivamente. Los fenoles totales y taninos fueron cuantificados en el Animal Nutrition & Forages Quality Laboratory del CIAT siguiendo la metodología Folin -Ciocalteu.

Selección de animales y variables medidas

Se eligieron ocho animales con un componente genético de diferentes cruces de *Bos tauros* x *Bos indicus*, con un peso promedio de 172.62 ± 12.45 kg (20.78 meses de edad) y alimentados con pasturas del genero *Brachiaria*, sal de mar y agua a voluntad. Los animales fueron adaptados a la alimentación con diferentes forrajes en confinamiento simulando el experimento durante un periodo de 5 días, donde se observó un consumo normal y constante bajo estabulación, después de los cuales se inició la oferta de los genotipos de *T. diversifolia* a estudiar y se procedió a la colecta de datos durante un periodo de tres días.

Durante el periodo de evaluación todos los animales tuvieron contacto con los materiales de *T. diversifolia* durante el mismo tiempo y número de veces. En la etapa diaria de consumo, cada pareja de animales no tuvo contacto visual entre sí y se ofreció el material forrajero a dos animales, durante 15 minutos (Larbi *et al.*, 1993).

El material fue ofrecido en comederos individuales, donde se colocó cada material, de manera que los animales tuvieran acceso a todos los genotipos al mismo tiempo. Cada pareja de individuos ingresó a la zona de evaluación de manera independiente, lo que le permitió seleccionar el forraje sin ninguna limitación. En cada momento de evaluación cada genotipo fue ofertado con una cantidad de 3 kg de FV con un total de 21 kg de FV (3.78 kg de MS) por momento de evaluación. La cantidad ofertada obedeció a observaciones durante al periodo de acostumbamiento teniendo en cuenta que esta no fuera un limitante para el consumo durante los tiempos de observación.

Durante cada nuevo ingreso de animales a la zona muestreo, los materiales fueron cambiados de posición, de manera que los animales no relacionaran lugares del

comedero con algún tipo de forraje en particular (Larbi *et al.*, 1999; Ayala *et al.*, 2015). Las variables medidas fueron: consumo voluntario de forraje verde por medio de la oferta y rechazo, número de visitas al comedero y tiempo en el comedero.

Diseño experimental y análisis de la información

Se usó un diseño experimental de rectángulo latino (7 materiales x 4 parejas de animales) con tres repeticiones las cuales obedecieron a bloques completos al azar de las parcelas donde fueron colectados los genotipos y que fueron ofrecidos en tres días diferentes. Todos los análisis fueron realizados en la herramienta RStudio usando la librería “*agricolae*” (R Core Team, 2019). Para los análisis se evaluó la normalidad, homogeneidad de la varianza y de aditividad, adicionalmente, cuando se identificaron diferencias entre las medias, se utilizó la prueba de contraste de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Cuando los grupos de datos no cumplieron con las condiciones para un análisis paramétrico, fue usada la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para realizar las comparaciones entre grupos.

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + \varepsilon_{k(ij)}$$

Ecuación 1. Modelo general de un diseño de rectángulo latino

Donde:

y_{ijk} es la variable respuesta, asociada al k -ésimo tratamiento en la j -ésima columna y en la i -ésima fila,

μ indica el efecto promedio del experimento,

τ_k indica el efecto promedio del k -ésimo tratamiento ($i = 1; 2::K$),

β_j representa el efecto de la j -ésima columna ($j = 1; 2::J$) (animales),

α_i representa el efecto de la i -ésima fila ($i = 1; 2::I$), (tratamiento) y

$\varepsilon_{k(ij)}$ son los errores experimentales

RESULTADOS

Composición química

La composición química de los siete genotipos de *T. diversifolia* evaluados se muestra en la Tabla 1. Para cada uno de los nutrientes estudiados, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) y se observaron características químicas adecuadas de un forraje para ser ofrecidas en dietas animales, resaltándose los bajos porcentajes de MS FDA y FDN, y altos aportes de PC, energía y de degradación (Barahona-Sánchez, 2005).

Tabla 1. Composición química de los diferentes genotipos de *Tithonia diversifolia* evaluados

	Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3	Genotipo 4	Genotipo 5	Genotipo 6	Genotipo 7	Valor p	EEM
MS g/kg de MS	16.38	15.91	15.95	15.83	15.86	15.88	16.26	0.894	0.225
PC g/kg de MS	31.24	31.39	31.07	29.87	30.96	31.87	29.51	0.732	0.482
Cen, g/kg de MS	14.93	15.06	14.44	14.98	15.10	14.68	14.91	0.856	0.147
EE, g/kg de MS	2.14	2.02	1.97	2.37	2.00	2.22	2.18	0.970	0.105
FDN, g/kg de MS	30.96	31.27	30.81	32.03	30.17	30.51	32.13	0.770	0.367
FDA, g/kg de MS	14.62	15.25	14.61	13.20	14.30	13.74	14.17	0.919	0.433
Ca, g/kg de MS	1.81	1.72	1.76	1.60	1.92	1.51	1.81	0.323	0.058
P, g/kg de MS	0.40	0.42	0.42	0.41	0.42	0.41	0.44	0.997	0.011
NDT, g/kg de MS	74.61	74.08	74.00	73.42	73.99	73.87	73.85	0.981	0.338
EB, Mcal/kg	4.25	4.27	4.23	4.25	4.23	4.26	4.22	0.634	0.009
Enl, Mcal/kg	1.71	1.70	1.70	1.68	1.70	1.70	1.70	0.996	0.008
DIVMS, g/kg de MS	81.37	80.80	80.72	80.10	80.70	81.55	79.58	0.636	0.363
FT, % Ac. Tánico	1.67	2.09	2.03	1.88	1.84	1.56	1.64	0.330	0.113
Tan, % Ac. Tánico	1.06	1.30	1.28	1.25	1.10	1.00	1.05	0.775	0.085

MS: materia seca; PC: proteína cruda; Cen: cenizas; EE: extracto etéreo; FDN: fibra en detergente neutra; FDA: fibra en detergente ácido; Ca: Calcio; P: Fósforo; NDT: nutrientes digestibles totales; DIVMS: degradabilidad in vitro de la MS; EB: energía bruta; Enl: energía neta de lactancia; FT: fenoles totales; Tan: taninos totales; EEM: error estándar de la media.

Consumo de forraje verde

El consumo promedio de forraje verde (FV) fue de 0.39 ± 0.045 kg (1.56 kg/h) durante cada periodo de observación (15 minutos), con diferencias significativas entre los genotipos 1 y 7. En la Figura 1 se muestran los consumos observados de cada uno de los materiales durante todo el periodo de evaluación. Se observó gran variabilidad en el consumo a nivel de genotipo encontrándose consumos altos (0.4 kg de FV) y bajos (<0.2 kg de FV) para cada uno de ellos durante el periodo de evaluación (Figura 1).

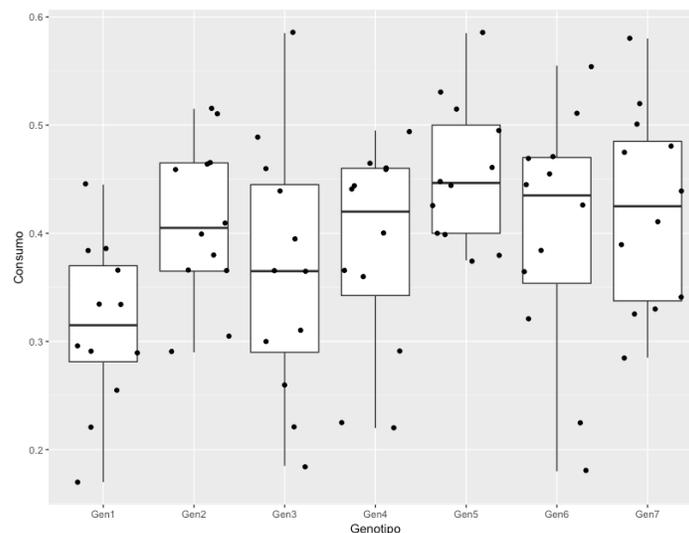


Figura 1. Consumo de forraje verde (kg) de los diferentes genotipos de *Tithonia diversifolia* estudiados

Con relación al tiempo en el comedero, en la Figura 2 se muestra la relación entre el tiempo en segundos empleado por los animales (tamaño de las esferas) y el consumo (kg) de cada uno de los genotipos estudiados (color de las esferas).

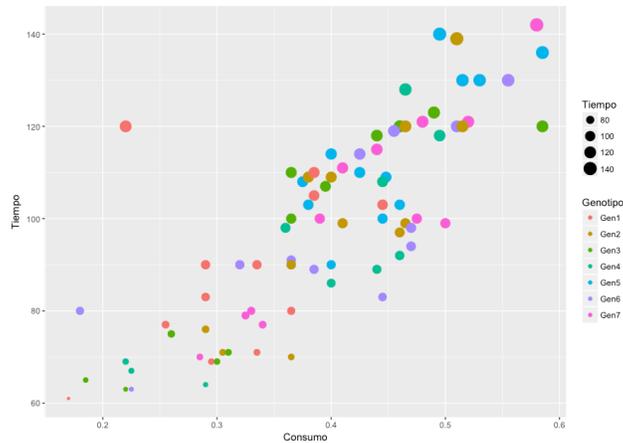
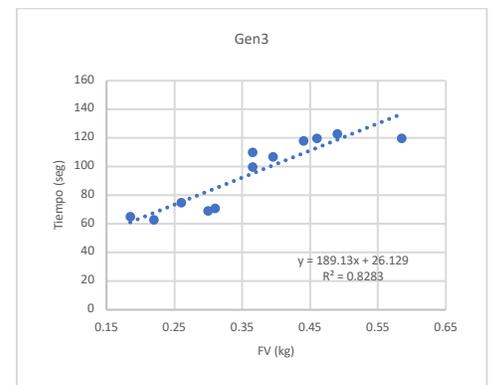
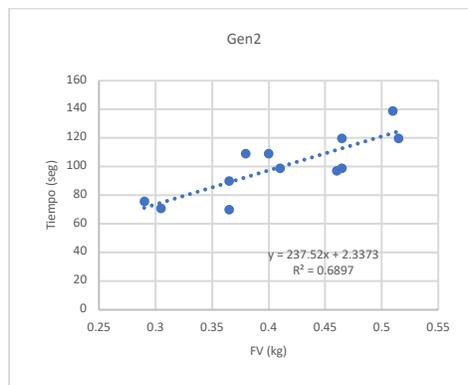
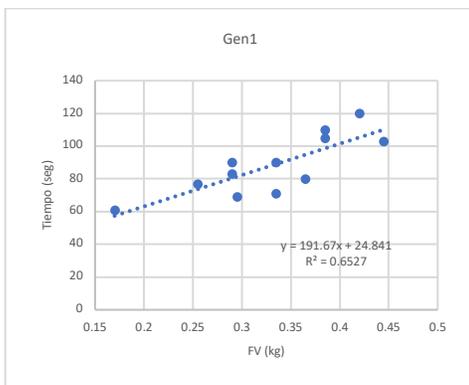


Figura 2. Tiempo (s) en el comedero de diferentes genotipos de *Tithonia diversifolia* evaluados

El tiempo relativo y total en el comedero no tuvo diferencias significativas entre genotipos ($p = 0.0818$). El tiempo promedio usado en cada periodo de observación fue de 1.64 ± 0.3 minutos y el tiempo total fue de 11.5 ± 1.1 minutos de los 15 minutos totales de cada período. La relación entre el tiempo en el comedero y el consumo real para cada uno de los genotipos se presenta en la Figura 2.



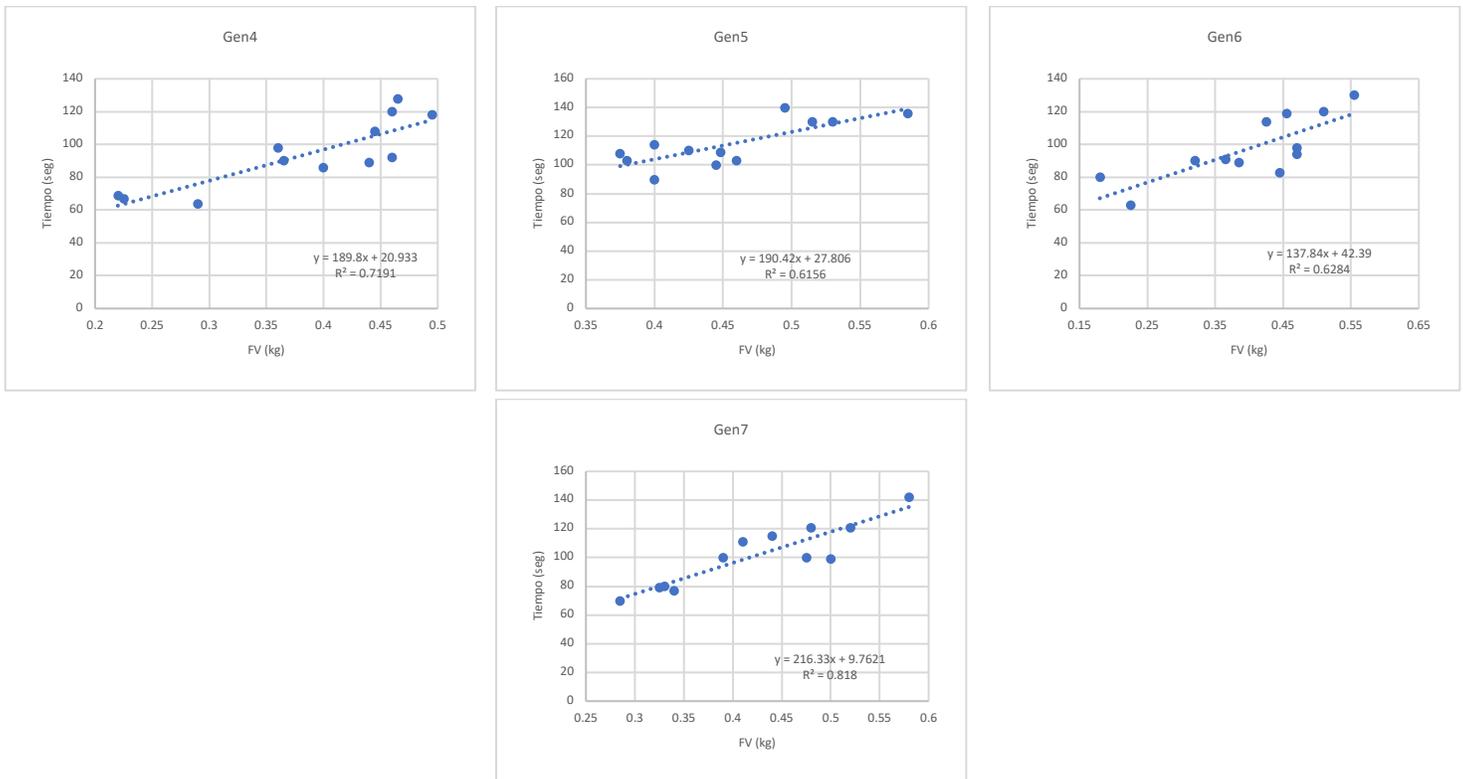


Figura 3. Regresión lineal entre el consumo de forraje verde y tiempo en el comedero para cada uno de los genotipos evaluados

Número de idas al comedero

El número de idas al comedero durante el periodo de evaluación tuvo diferencias significativas entre los genotipos ($p = 0.00229$), sin diferencias entre repeticiones y grupo de animales ($p > 0.05$). En promedio, cada genotipo por periodo de muestreo (15 minutos) presentó 3.28 idas al comedero, los genotipos con mayores idas fueron el 5 y 7 con 3.66 y 3.52 veces respectivamente, y los genotipos con menor número de idas fueron 1 y 3 con 2.5 y 3.16 veces, respectivamente.

Finalmente, en cuanto a la conducta de consumo, si bien en los días 2 y 3 se observaron mayores tiempos en el comedero, no se encontraron diferencias entre las variables de tiempo en el comedero ($p = 0.3669$), idas al comedero ($p = 0.930$) y kg de FV consumido ($p = 0.888$).

DISCUSIÓN

Los diferentes genotipos evaluados presentaron una composición química adecuada para ser incluidos en dietas para rumiantes. *T. diversifolia* en diferentes

estudios ha sido considerada como una arbustiva forrajera de alta calidad nutricional debido principalmente a sus altos contenidos de minerales, PC, carbohidratos no estructurales y porcentaje de degradabilidad, y a sus bajos contenidos de FDN y FDA (Ramírez-Rivera *et al.*, 2010; Ferreira, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015). Los valores de PC encontrados en esta especie, son tan altos o inclusive superiores a los observados en algunas leguminosas tropicales como *Stylosanthes guianensis* (18.2 %, Morgado *et al.*, 2009), *Arachis pintoi* (19.7%, Khan *et al.*, 2013) y *Gliricidia sepium* (18.23%, Silva *et al.*, 2017), y son muy superiores a los observados en la mayoría de las gramíneas tropicales, como *Urochloa brizantha* (9.3%, Ribeiro *et al.*, 2017), *Cynodon plectostachyus* (9.23%, Montoya *et al.*, 2017) y *Megathyrsus maximus* (9.3%, Carvalho *et al.*, 2017). Además, FDN y FDA fueron menores que los valores comunes observados para forrajes tropicales (Souza *et al.*, 2007), aspecto que no limita el consumo voluntario, la degradabilidad de los nutrientes y su adecuado aprovechamiento por parte de los animales (Barahona y Sánchez, 2005).

En *T. diversifolia* se ha reportado la presencia de diferentes compuestos fitoquímicos asociados a una baja palatabilidad como saponinas, taninos, aceites esenciales y flavonoides (Chagas-Paula *et al.*, 2012; Ejelonu *et al.*, 2017), pero autores como Mejía- Díaz *et al.* (2017) han reportado que, si bien esta especie contiene estos compuestos, sus niveles son aceptables (capítulo 4 de esta tesis) y no afectan considerablemente su consumo. De otro lado, hay resultados asociados a un bajo contenido de taninos totales en esta especie en comparación con otras especies forrajeras como *Gliricidia sepium* (5.4 y 11.14 g/kg, respectivamente) (Santacoloma y Granados, 2015). También, existen reportes de contenidos de taninos totales en botón de oro incluso menores en períodos poco lluviosos, 2.17 g/kg (Verdecia *et al.*, 2011). Estos valores coinciden con lo encontrado en este estudio.

En algunos estudios realizados con rumiantes, se evidencia la aceptación del forraje de *T. diversifolia* por los animales, el cual puede ser incluido en el plan de alimentación, obteniendo buenos consumos de MS (Mahecha *et al.*, 2007; Ramírez-Rivera *et al.*, 2010; Alonso *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2015; Gallego-Castro *et al.*, 2017; Mejía-Díaz *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha observado la necesidad de un período de adaptación de los animales al consumo de la *T. diversifolia*, encontrando un bajo consumo de la arbustiva los primeros cuatro días de suministro, el cual aumenta gradualmente en los siguientes días y es estabilizado a partir del octavo día (García *et al.*, 2008).

Por otro lado, el consumo de *T. diversifolia* se ha visto asociado a incrementos de la productividad animal y de la capacidad de carga en los sistemas. Rivera *et al.* (2015) evaluaron el efecto de esta arbustiva bajo condiciones de pastoreo en la producción y calidad de la leche bovina y encontraron que su consumo tuvo efectos

significativos en los litros de leche leche/ha/día (9.70 y 15.4 kg respectivamente). Además, la producción de proteína, grasa y sólidos totales también fue mayor cuando los animales consumieron *T. diversifolia* ($p < 0.05$). Otros autores como Ribeiro *et al.* (2015) y Gallego-Castro *et al.* (2017), evaluaron la capacidad de *T. diversifolia* para reemplazar parcialmente el concentrado comercial hasta en 25% y encontraron que hasta estos niveles de sustitución, el consumo de esta arbustiva no afecta los parámetros de consumo, productivos y metabólicos en vacas de alta producción de leche (> 20 litros/día), pero si disminuyeron los costos de alimentación.

Bajo condiciones de pastoreo se han reportados consumos de *T. diversifolia* entre el 5% y el 15% del total de la MS (Rivera *et al.*, 2015; Mejía-Díaz *et al.*, 2017), pero en experimentos en estabulación, este porcentaje ha llegado hasta 25%, evidenciando que el consumo de esta puede lograr un alto porcentaje de la MS total de las dietas ($> 25\%$) (Molina *et al.*, 2015). Si bien estos valores son diversos, el consumo de *T. diversifolia* depende de la oferta y de la experiencia previa de los animales a su ingestión como se observó en este estudio donde los consumos fueron aceptables de acuerdo con la clase de animales incluidos en el experimento. La diferencia presentada entre el genotipo 1 y 7 se debe probablemente a la calidad diferencial de almacenar compuestos fitoquímicos ya que esta especie cuenta con una amplia diversidad genética que puede modular la acumulación de estos componentes (Yang *et al.*, 2012; Del Val *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2019).

Dentro de los resultados encontrados en este estudio se destaca la correlación positiva entre el tiempo en el comedero y el consumo dado a los diferentes genotipos. La Figura 2 muestra que los tiempos de visita a los comederos fueron dedicados a consumir el forraje y no a olfatear o a hacer otras actividades, también en la Figura 3 se observa la regresión lineal entre el consumo y el tiempo en comedero para cada uno de los genotipos y se encontraron valores de r^2 por encima del 0.6, razón por la cual existe un alto porcentaje de variación de la variable respuesta (consumo) que explica su relación con la variable predictora (tiempo). Los genotipos que tuvieron mayor r^2 fueron los materiales 3 y 8.

Finalmente, con relación a las idas al comedero, los resultados obtenidos evidencian que todos los genotipos tuvieron visitas efectivas de consumo en cada uno los periodos de muestreo demostrando una mediana aceptabilidad por parte de los animales.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la composición química de *T. diversifolia* encontrada en esta evaluación, esta arbustiva tiene un alto potencial para la alimentación de rumiantes debido a los altos contenidos de los minerales Ca y P, de proteína cruda y de energía, y bajos tenores de fibra.

De otro lado debido a que solo existieron diferencias entre los genotipos 1 y 5, se puede establecer *T. diversifolia* puede ser consumida sin mayores inconvenientes por bovinos en crecimiento a pesar de no tener una adaptación o periodo de acostumbamiento prolongado (<5 días).

Bibliografía

- Alonso, J., Ruiz, T., Achang, G., Santos, L. D. T., Sampaio, R. A. 2012. Producción de biomasa y comportamiento animal en pastoreo con *Tithonia diversifolia* a diferentes distancias de plantación. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 24, Article # 160. <http://www.lrrd.org/lrrd24/9/lazo24160.htm>.
- Alonso, J., Achang, G., Santos, L., Sampaio, R. 2013. Productividad de *Tithonia diversifolia* y conducta animal a diferentes momentos de comenzar el pastoreo. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 25, Article #192. <http://www.lrrd.org/lrrd25/11/alon25192.htm>.
- Ariza-Nieto, C., Mayorga, O., Mojica, B., Parra, D., Afanador-Tellez, G. 2018. Use of LOCAL algorithm with near infrared spectroscopy in forage resources for grazing systems in Colombia. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 26(1), 44–52. <https://doi.org/10.1177/0967033517746900>
- Ayala, A.M., Rincón, J.C., Navas, A., Gonzáles, J. 2015. Evaluación de la selectividad de especies arbóreas con potencial forrajero en bovinos en ecosistemas de bosque húmedo premontano. *Revista de Ciencias Animales*, 9: 41-55.
- Barahona, R., Sánchez, S. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 69-82.
- Chagas-Paula, D. A., Oliveira, R. B., Rocha, B. A., Da Costa, F. B. 2012. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*, 9: 2010–2234.
- Del Val, R., Miranda, J.M., Flores, M.X., Gómez, J.M., Solorio, B., Solorio, F.J., González, S. 2017. Diversidad genética de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray de Michoacán: Análisis con marcadores de ADN-SSR. *Reaxion: Ciencia y tecnología universitaria*, 4 (3): 9 - 14.
- Ejelonua, O. C., Elekofehintia, O. O., Adanlawob, I. G. 2017. *Tithonia diversifolia*

- saponin-blood lipid interaction and its influence on immune system of normal wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87: 589–595.
- Ferreira, L.H. 2015. Produtividade e valor nutricional da *Tithonia diversifolia* para ruminantes. Tesis MSc, Universidade Federal de São João del-Rei. Minas Gerais, BRA.
- Ferreira, L. H., Ribeiro, R. S., Silveira, S. R., Delarota, G., Freitas, D. S., Sacramento, J. P., Paciullo, D. S., Maurício, R. M. 2016. Potencial forrageiro da *Tithonia diversifolia* para alimentação de ruminantes. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 28, Article #17. <http://www.lrrd.org/lrrd28/2/ferr28017.html>.
- Gallego-Castro, L.A., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2017. Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray bajo tres sistemas de siembra en el tropico alto. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1): 213-222. DOI:10.15517/am.v28i1.21671.
- García, D.E., M.G. Medina, T. Clavero, J. Humbría, A. Baldizán, y C. Domínguez. 2008. Preferencia de árboles forrajeros por cabras en la zona baja de los andes Venezolanos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 18: 549-555.
- Holdridge, L. R. 1986. *Ecología basada en zonas de vida*. Leslie Holdridge. IICA. San José, Costa Rica.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 2001. NTC 4981. Alimentos para animales. Determinación del contenido de fosforo. Método espectrofotométrico. Bogotá, Colombia. 10 pp.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 2003. NTC 5151. Alimento para animales. Determinación de los contenidos de Calcio, Cobre, Hierro, Magnesio, Manganeso, Potasio, Sodio y Zinc. Método usando espectrometría de absorción atómica. Bogotá, Colombia. 11 pp.
- Kaitho, R.J., Umunna, N.N., Nsahlai, I.V., Tamminga, S., Van Bruchem, T., Hanson, I. 1997. Palatability of wilted and dried multipurpose tree species fed to sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, 65:151–165.
- Khan, M.T., Khan, N.A., Bezabih, M., Qureshi, M.S., Rahman, A. 2013. The nutritional value of peanut hay (*Arachis hypogaea* L.) as an alternate forage source for sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 45: 849–853.
- Larbi, A., Osakwe, I.I and Lambourne, J.W (1993). Variation in relative palatability to sheep among *Gliricidia sepium* provenances. *Agroforestry Systems* 22: 221-224.
- Mahecha, L., Escobar, J.P., Suárez, J.F., Restrepo, L. F. 2007. *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray (botón de oro) como suplemento forrajero de vacas F1 (Holstein por Cebú). *Livestock Research for Rural Development*. Volume 19, Article #16. <http://www.lrrd.org/lrrd19/2/mahe19016.htm>.

- Mauricio, R. M., Calsavara, L. H. F., Ribeiro, R. S., Pereira, L. G. R., Freitas, D. S., Paciullo, D. S., Barahona, R., Rivera, J. E., Chará, J., Murgueitio, E. 2017. Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(4): 00146. <http://medcraveonline.com/JDVAR/JDVAR-05-00146.php>.
- Mejía-Díaz, E., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2017. Consumo de materia seca en un sistema silvopastoril de *Tithonia diversifolia* en trópico alto. *Agronomía Mesoamericana*, 28(2): 389-403. doi:10.15517/ma.v28i2.23561.
- Mokoboki, H. K., Ndlovu, L. R., Malatje, M. M. 2011. Intake and relative palatability indices of acacia species fed to sheep and goats. *Agroforestry Systems*, 81:31–35. DOI 10.1007/s10457-010-9352-5.
- Molina, I. C., Donneys, G., Montoya, S., Villegas, G., Rivera, J.E., Chará, J., Lopera, J. J., Barahona, R. 2015. Emisiones in vivo de metano en sistemas de producción con y sin inclusión de *Tithonia diversifolia*. 3^{er} Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles y VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, 678-682 pp.
- Montoya, E., Barahona, R., Chará, J. 2017. The nutritional balance of early lactation dairy cows grazing in intensive silvopastoral systems. *Ciência Animal Brasileira*, 18: 1-12.
- Morgado, E., Almeida, F., Silva, V.P., Gomes, A., Galzerano, L., Torres, H. Rodríguez, L. M. 2009. Digestão dos carboidratos de alimentos volumosos em equinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(1): 75-81. <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v38n1/a10v38n1.pdf>.
- Ngwa, A.T., Nsahla, I.V., Bonsi, M.L.K. 2003. Feed intake and dietary preferences of sheep and goats offered hay and legume-tree pods in South Africa. *Agroforestry Systems*, 57(1): 29–37.
- Osuga, I., Abdulrazak, S., Muleke, C., Fujihara, T. 2012. Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10: 632-635.
- Personius, T.L., Warnbolt, C.L., Stephens, J.R., Kelsey, R.C. 1987. Crude terpenoid influence on mule deer preference for sagebrush. *Journal of Range Management*, 40:84–88.
- Ramirez-Rivera, U, Sangines-Garcia, J.R., Escobedo-Mex, J.G., Cen-Chuc, F., Rivera-Lorca, J.A., Lara-Lara, P.E. 2010. Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems*, 80: 295- 302.
- Ribeiro, R.S., Terry, S.A., Sacramento, J.P., Rocha e Silveira, S., Bento, C.B., Silva, E.F., Montovani, H.C., Gama, M.A.S., Pereira, L.G., Tomich, T.R., Mauricio,

- R.M., Chaves, A. 2016. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. Plos One 11: e0165751 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>.
- Rivera, J.E., Cuartas, C.A., Naranjo, J.F., Tafur, O., Hurtado, E.A., Arenas, F.A., Chará, J., Murgueitio E. 2015. Efecto de la oferta y el consumo de *Tithonia diversifolia* en un sistema silvopastoril intensivo (SSPi), en la calidad y productividad de leche bovina en el piedemonte Amazónico colombiano. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 27, Article #189. <http://www.lrrd.org/lrrd27/10/rive27189.html>.
- Rivera, J.E., Gómez-Leyva, J.F., Castaño, K., Morales, J. G., Chará, J., Barahona, R. 2017. Diversidad molecular, química y morfológica en materiales de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray para la alimentación animal en Colombia y México. IX Congreso Internacional Sobre Sistemas Silvopastoriles. 249 – 255 pp.
- Rivera, J.E., Chará, J., Gómez-Leyva, J. F., Ruíz, T.E., Barahona, R. 2018. Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 30, Article #200. from <http://www.lrrd.org/lrrd30/12/rive30200.html>
- Rivera, J., Lopera, J., Chará, J., Gómez-Leyva, J., Barahona, R., Enrique, E. 2019. Genetic and morphological diversity of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray for use in silvopastoral systems of Latin America. Dupraz, C., Gosme, M., Lawson, G. (Editors). *Book of Abstract 4th World Congress on Agroforestry*. Montpellier: CIRAD, INRA, World Agroforestry. 712 pp.
- RStudio Team. 2019. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
- Santacoloma, L., Granados, J. 2012. Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental - RIAA*, 3(1): 53-62.
- Schultze-Kraft, R., Rao, I.M., Peters, M., Clements, R.J., Bai, C., Liu, G. 2018. Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview. *Tropical Grasslands*, 6(1): 1–14. <http://www.tropicalgrasslands.info/index.php/tgft/article/view/394/241>.
- Silva, S.F., Carneiro, M.S., Edvan, R.L., Pereira, E.S., Neto, L., Pinto, A.P., Camilo, D. 2017. Agronomic characteristics and chemical composition of *Gliricidia sepium* grown under different residual heights in different seasons. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(1): 35-42. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ciagr/v44n1/art04.pdf>.
- Souza, L.F., Maurício, R.M., Gonçalves, L.C., Saliba, E.O.S., Moreira, G.R. 2007. Produtividade e valor nutritivo da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em um

- sistema silvipastoril. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(4): 1029-1037.
- Verdecia, D., J.L. Ramírez, I. Leonard, Y. Álvarez, Y. Bazán, R. Bodas, S. Andrés, J. Álvarez, F. Giráldez, y S. López. 2011. Calidad de la *Tithonia diversifolia* en una zona del Valle del Caucho. *Revista electrónica de Veterinaria – REDVET*, 12(5): 1-13.
- Yang, J., Tang, L., Guan, Y., Sun, W. 2012. Genetic Diversity of an Alien Invasive Plant Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China. *Weed Science*, 60: 552–557.

Conclusiones generales

T. diversifolia es una especie que puede ser utilizada como arbustiva forrajera bajo diferentes condiciones edafoclimáticas gracias a su alta diversidad genética. A pesar de que se identificó una alta calidad nutricional en todos los genotipos evaluados, basada en altos contenido PC (>25%), energía y minerales como Ca y P, además, de brindar bajos valores de FDN y FDA (49 y 46%, respectivamente) y una alta degradabilidad *in vitro*, existe la posibilidad de seleccionar materiales superiores con el objetivo de aumentar su crecimiento y producción de biomasa.

Se identificó que los genotipos 5 y 7 tienen un mayor desempeño agronómico bajo condiciones de suelos ácidos y de baja calidad en zonas cálidas, y que el genotipo 4 posee mayor desarrollo en condiciones de trópico de altura debido a la interacción genotipo x ambiente de esta especie.

Por sus características químicas, esta arbustiva modifica los parámetros de fermentación incrementando la generación de ácido propiónico, la eficiencia general del proceso fermentativo y disminuyendo la proporción A:P. También *T. diversifolia* en dietas de baja calidad tiene el potencial de disminuir las emisiones de CH₄ en condiciones *in vitro* pero que existen diferencias entre algunos genotipos evaluados en cuanto a su potencial de modificar la dinámica de fermentación *in vitro* y la producción de CH₄.

De otro lado, *T. diversifolia* cuenta con genotipos capaces de tener fases de crecimiento y desarrollo significativamente diferentes entre ellos, modificando su momento reproductivo y de producción de semilla sexual. Además, gracias al crecimiento diferenciado, existen genotipos con una mayor producción de semilla sexual viable asociada al número de tallos y flores por planta como fue el caso de los genotipos 5 y 7.

Los resultados encontrados en este estudio confirman que, si bien esta especie tiene una germinación baja, existen procesos pre-germinativos con la capacidad de incrementar el porcentaje de germinación, también el uso de fertilizante aumenta no solo la producción de semilla viable sino también su germinación y producción de biomasa, razón por la cual puede ser una alternativa viable para tratar plantas productoras de semilla y así mejorar la propagación de esta especie.

Finalmente, se destaca que, a pesar de la identificación de diferentes compuestos fitoquímicos como por ejemplo los taninos, su consumo por bovinos parece no verse afectado por la presencia de estos, razón por la cual esta especie puede ser ofrecida sin ningún tipo de inconvenientes.

Recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos se recomienda adelantar esfuerzos hacia la construcción de un germoplasma para el cuidado, propagación y promoción de los genotipos destacados encontrados en esta investigación como lo fueron los materiales 7, 5 y 4. De igual forma se propone la continuación de estudios orientados a un mayor conocimiento de la propagación de esta especie con el objetivo de incrementar su uso eficiente.

También se recomienda extender evaluaciones de adaptación e interacción genotipo x ambiente a otras condiciones de producción, buscando identificar genotipos con mayor adaptación a ambientes más secos o con otro tipo de suelos y oferta medioambiental. Los resultados encontrados en esta investigación perfilan los genotipos 7, 5 y 4 para ser incluidos en futuras evaluaciones.

Por otro lado, se recomienda adelantar estudios *in vivo* para un mayor conocimiento del efecto de *T. diversifolia* en las emisiones de CH₄ a partir de la inclusión de diferentes niveles en la dieta y de la identificación de los componentes o características físicas y químicas que podrían favorecer una menor emisión y tal vez la generación de productos bioactivos. También una nueva ruta de investigación que se podría explorar sería la relacionada con el estudio de los microorganismos que se asocian a esta especie para la solubilidad del fósforo y para incorporar altas cantidades de N en sus tejidos. Además, se recomienda estudiar la distribución del nitrógeno de esta especie como por ejemplo aquel ligado a fibra y cual podría ser se sobrepaso.

Finalmente se recomienda una adaptación previa a *T. diversifolia* para que su consumo sea adecuado, si bien se ha demostrado que esta arbustiva puede ser consumida no solo por rumiantes sino por otras especies animales, hay situaciones que puede limitar su adecuado consumo.

ANEXOS

ANEXO I

Trabajo presentado en el IX Congreso Internacional de Sistemas Silvopastoriles, Manizales Colombia 2017.

Rivera, J.E., Gómez-Leyva, J.F., Castaño, K., Morales, J.G., Chará, J., Barahona, R. 2017. Diversidad molecular, química y morfológica en materiales de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray para la alimentación animal en Colombia y México. IX Congreso Internacional Sobre Sistemas Silvopastoriles. Manizales, Colombia, 249 – 255 pp.

Diversidad molecular, química y morfológica en materiales de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray para la alimentación animal en Colombia y México

J. E. Rivera^{1*}; J. F. Gómez-Leyva²; J. Chará¹; K. Castaño¹; J. G. Morales³; R. Barahona³; R. Del Val Díaz^{2,4}

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia; ²Laboratorio de Biología Molecular-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México; ³Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín;

⁴Fundación Produce Michoacán, México. *Autor para correspondencia:
jerivera@fun.cipav.org.co

Resumen

Tithonia diversifolia, es un arbusto de gran potencial para la alimentación animal gracias a su calidad nutricional, adaptabilidad edafoclimática y alta producción de biomasa, pero muestra diferencias en rendimiento agronómico y calidad nutricional. En el presente trabajo se caracterizó la diversidad genética, nutricional y morfológica de materiales silvestres de *T. diversifolia* en Colombia y México. En el análisis, se incluyeron 31 colectas de zonas contrastantes de ambos países. La diversidad genética se realizó mediante marcadores moleculares Secuencias Intergénicas Repetidas Simpleso ISSR. Los materiales evaluados, presentaron diferencias en su contenido de PC (29.4%), EE (1.6%), Cenizas (15.1%), Ca (2.3%), P (0.6%), FC (30.7%) y ELN (23.2%) ($p < 0.05$). Además, se encontraron diferencias en el peso total de la planta, área foliar, hojas por rama, altura de planta, entre otras características morfológicas ($p < 0.05$). Se identificó una amplia diversidad genética con en cinco grupos bien definidos y mediana relación geográfica entre materiales. Se concluye que *T. diversifolia* cuenta con una amplia diversidad genética y adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas. También existe la necesidad de seleccionar materiales con el fin de conservar y resguardar germoplasma con características agronómicas y nutrimentales destacadas para el establecimiento de diferentes sistemas silvopastoriles.

Palabras clave: *Arbusto forrajero, diversidad genética, ISSR, marcador molecular, producción tropical, sistemas silvopastoriles.*

Molecular, chemical and morphological diversity in *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray for animal feed in Colombia and Mexico

Abstract

Tithonia diversifolia is a shrub with great potential for animal feed thanks to its adequate nutritional quality, edaphoclimatic adaptability and high production of biomass, but it shows great differences in its agronomic performance and nutritional quality depending on the origin of the material used. The objective of the present study was to characterize the genetic, nutritional and morphological diversity of *T. diversifolia* materials from both Colombia and Mexico and thus provide elements for the selection of improved lines. In the analysis, 31 materials harvested in contrasting areas of both countries were included, and ISSR type molecular markers were used to establish the difference between origins. The evaluated materials showed differences in their content of Crude Protein (29.4%), Ether Extract (1.6%), Ash (15.1%), Calcium (2.3%), Phosphorus (0.6%), Crude Fiber (30.7%) and Nitrogen-free extract (23.2%) ($p < 0.05$). Also, there were differences in total plant weight, leaf area, leaves per branch, plant height and other morphological characteristics ($p < 0.05$). Finally, a wide genetic diversity and a median geographic relationship between materials were found. We concluded that *T. diversifolia* has both, a wide genetic diversity and adaptation to different edaphoclimatic conditions, but there is a need for material selection due to its wide variety.

Key Word: *Fodder shrub, genetic diversity, ISSR, molecular marker, silvopastoral systems, tropical production.*

Introducción

Los forrajes son la base de la alimentación en sistemas bovinos y otros sistemas en el trópico, gracias a su alta disponibilidad, capacidad de producción de biomasa y bajo costo (Rao *et al.*, 2015). Dentro de este contexto, los sistemas de producción bovina en los que se asocian gramíneas, arbustivas y árboles de uso múltiple, como los sistemas silvopastoriles (SSP), están mejor adaptados a las condiciones y desafíos que enfrenta la producción pecuaria actual, porque brindan mayores beneficios que los monocultivos en términos económicos, ambientales y sociales (Thornton y Herrero, 2010).

Desde hace algunos años, *Tithonia diversifolia* (hemsl.) A. Gray ha recibido atención por su potencial para la alimentación animal a diferentes escalas y condiciones ambientales, gracias a su calidad nutricional, adaptabilidad edafoclimática y alta producción de biomasa, convirtiéndola en una especie adecuada para el establecimiento de distintos SSP (Ribeiro *et al.*, 2016). Sin embargo, Ruiz *et al.*, 2013 reportaron que esta especie puede variar considerablemente su capacidad de rebrote, desempeño agronómico, composición química y adaptación a condiciones específicas producto de la interacción genotipo – ambiente (Yang *et al.*, 2012).

El objetivo del presente estudio, fue determinar la diversidad genética de materiales silvestres de *T. diversifolia* por medio del uso de marcadores moleculares en colectas de Colombia y México, así como determinar parámetros bromatológicos y morfológicas. Estas evaluaciones permitirán perfilar materiales con mayor capacidad productiva y así, apoyar el desarrollo adecuado de diferentes SSP.

Materiales y Métodos

Sitios de colecta

Los materiales evaluados fueron colectados en 31 sitios de Colombia y México (Figura 1). En Colombia, las colectas se llevaron a cabo en las regiones del Eje Cafetero (EEC), Valle del Río Cesar (EVRC), Piedemonte Orinocense (EPO), Bajo Magdalena (EBM), Caquetá (CAQ) y Santander y Boyacá (ESB); y en México las colectas se hicieron en los estados de

Michoacán (MICH) y Jalisco (JAL). Se utilizaron marcadores de ADN ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) y las evaluaciones fueron desarrolladas en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México. En la Figura 1 se muestra la localización de cada sitio de colecta

Extracción y procesamiento de ADN

Para la extracción de ADN, se usó un método CTAB (*bromuro de hexadeciltrimetilamonio*) modificado (Doyle y Doyle, 1999). Se evaluó la calidad del ADN mediante geles de agarosa y se cuantificó su concentración y pureza midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Para ello se usaron las ecuaciones:

$[DNA$

$$\mu g/\mu l] = (Lectura_{260}) * (Dilución) * 50/1000$$

Donde.

[DNA]=Concentración de DNA, expresado en $\mu g/\mu L$

Dilución = Factor de dilución de la muestra de DNA (generalmente 100).

$$Pureza = Abs_{260}/Abs_{280}$$

Donde.

Pureza= Es la pureza con la que se obtiene el DNA en la extracción.

Abs260= Absorbancia a 260 nm.

Abs280= absorbancia medida a 280 nm.

Para la amplificación de los fragmentos, se utilizaron tres iniciadores $(GA)_8YT$, $(AG)_8C$ y $(GA)_8C$ seleccionados a partir de la evaluación de 20 oligos, y la PCR estuvo programada para un primer ciclo térmico de 4 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos correspondientes a la desnaturalización (1 min a 94 °C), alineación (46 a 52 °C por 1 min de acuerdo al iniciador trabajado) y elongación (72 °C por 2 min). Posteriormente, el producto se mantuvo constante a 72 °C por 7 min y luego fue conservado a 4 °C hasta la realización de la electroforesis.



Figura 1. Localización de sitios de recolección en Colombia y México

Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1.2% corridos a 100 voltios por 35 minutos y teñidos con bromuro de etidio. Los patrones de banda obtenidos se registraron en una matriz binaria de presencia y ausencia con la ayuda de software Gel Analyzer ®, y se estudiaron mediante el coeficiente de distancia de Dice mediante el programa NTSYS 2.0.

Composición nutricional y características morfológicas

Las determinaciones bromatológicas estuvieron alrededor de fracciones como: Proteína Cruda (PC), Cenizas (Cen), Fibra bruta (FB), Fibra en detergente Neutra y Ácida (FDN y

FDA), Grasa (EE), Calcio (Ca), Fósforo (P), Nitrógeno (N), Hierro (Fe) y Zinc (Zn). Las medidas morfológicas evaluadas fueron: peso total de la planta (g), peso de las hojas (g), peso de los tallos (g), número de hojas por planta (#), número de ramas por planta (#), altura de la planta (cm), diámetro de los tallos (mm), relación hoja tallo, peso por hoja (g), peso de las ramas con hojas (g), número de hojas por tallo (#) y área foliar (cm²). Estas características fueron evaluadas en 16 sitios en Colombia a una edad de 40 días postcorte y en cinco plantas por lugar.

Las características morfológicas, fueron contrastadas por medio de un análisis de varianza (ANOVA), con la ayuda del entorno de desarrollo integrado para lenguaje R-Project.

Resultados y discusión

Composición nutricional y características morfológicas

Según los coeficientes de variación encontrados para la composición nutricional, Cen, EE, FC, ELN, Ca y Zn fueron los que mayor dispersión tuvieron. Los resultados encontrados, son acordes a lo reportado por Donney's *et al.* (2015), quienes concluyen que botón de oro cuenta con alto porcentaje de PC, bajos porcentajes de fibra y alta fracción de cenizas bajo distintas condiciones de producción. En la Tabla 1 se muestran los valores encontrados para la composición química.

A partir de las características químicas de interés, se observó que los materiales del Valle del Río Cesar (Colombia) tuvieron mayor cantidad de PC, en cuanto a FDN y FDA no se encontraron diferencias entre las zonas debido a su gran dispersión, y para Ca y P los materiales de CAQ fueron los que presentaron los valores más bajos.

Tabla 1. Composición química de materiales evaluados de *T. diversifolia*.

	MS	Cen	PP V	EE	FC	FDA	FDN	N	PC	ELN	P	Ca	Zn	Fe
	%												ppm	
Promedio	16.		84.										135.	119.
	3	15.1	9	1.6	30.7	46.0	49.0	4.7	29.4	23.2	0.6	2.3	5	5
	18.		89.										359.	185.
Max	2	20.9	0	3.5	48.7	58.9	72.3	5.8	36.1	47.0	0.8	3.4	0	0
	13.		79.											
Min	1	11.0	1	1.0	13.2	30.5	37.2	4.0	25.1	5.9	0.4	1.0	28.0	65.0
	1.5		3.1							12.7			74.3	35.4
DesvE	0	3.13	3	0.69	9.99	8.77	9.48	0.55	3.38	9	0.13	0.61	1	4
CoefVar	9.2	20.7	3.6	43.3	32.5	19.0	19.3	11.7	11.4	55.1	20.8	26.9	54.8	29.6
(%)	3	5	9	0	0	6	7	4	8	9	3	6	5	5

MS: materia seca; Cen: cenizas; PPV: pérdidas por volatilización; EE: extracto etéreo; FC: fibra cruda; FDA: fibra en detergente Ácida; FDN: fibra en detergente neutra; N: nitrógeno; PC: proteína cruda; ELN: extracto libre de nitrógeno; P: fósforo; Ca: calcio; Zn: zinc; Fe: Hierro; Max: máximo; min: mínimo; DesvE: desviación estándar; CoefVar: coeficiente de variación

Los resultados obtenidos de las características morfológicas se muestran en la Tabla 2. Se encontraron diferencias en: peso total de la planta ($p < 0.0001$), peso de las hojas ($p < 0.0001$), peso de los tallos ($p < 0.0001$), número de ramas ($p < 0.0032$), peso de cada hoja ($p < 0.0033$), peso de las ramas ($p = 0.013$), hojas por rama ($p = 0.014$) y área foliar ($p = 0.006$); y para características como: número de hojas ($p = 0.062$), altura de planta ($p = 0.119$), diámetro de los tallos ($p = 0.121$) y relación hojas tallos ($p = 0.066$), no se encontraron diferencias.

Tabla 2. Medidas de dispersión y de tendencia central para algunos parámetros morfológicos de *T. diversifolia*

	Peso total (g)	Peso de hojas (g)	Peso de tallos (g)	Hojas por planta (#)	Ramas por planta (#)	Altura de la planta (cm)	Diámetro de tallos (mm)	Relación Hoja/Tallo	Área foliar (cm ² / hoja)
Promedio	2194.55	804.21	1390.33	355.15	22.16	143.68	12.26	0.69	183.62
Max	6202.00	2093.00	4203.00	2814.00	58.00	296.00	19.56	1.83	372.47
Min	170.00	110.00	60.00	75.00	3.00	44.00	5.54	0.27	58.44
DesvE	1340.07	414.07	961.95	384.08	10.78	47.77	3.07	0.29	73.50
Coef. V (%)	61.06	51.49	69.19	108.15	48.64	33.24	25.06	41.63	40.03
Mediana	1922.00	725.00	1140.00	235.00	23.00	140.00	12.50	0.70	167.50

Max: Valor máximo encontrado para la característica; Min: Valor mínimo para la característica; DesvE: Desviación estándar; Coef. V: Coeficiente de variación para la característica.

La EEC tuvo mayor peso de las plantas, peso total de las hojas y peso de los tallos ($p < 0.0001$). Por otro lado, las plantas de la ESB, y Eje Cafetero mostraron mayor número de hojas y las regiones que presentaron menores valores para este parámetro fueron Caquetá y la EPO ($p < 0.0001$). Con relación al número de ramas por planta, la ESB fue la zona con mayor número al igual que la de Caquetá. Finalmente, las regiones de EPO y EEC fueron las que tuvieron mayor área foliar y las de menor área fueron ESB y EVRC.

Diversidad genética

Los materiales trabajados presentaron una alta diversidad, identificándose diferencia entre los materiales provenientes de México y Colombia. En general, se logran identificar 5 grupos de materiales a un índice de distancia aproximado de 0.6, los cuales presentan una tendencia a ser conformados por orígenes geográficamente cercanos, aunque se observan materiales similares entre regiones y hasta a nivel de país (Figura 2). Esta condición de diversidad, puede conferir la posibilidad a esta especie de ser una alternativa de adaptación al cambio climático y ofrecer herramientas para mejorar los sistemas productivos y establecimiento de diversos SSP, desde zonas a nivel del mar hasta los 2300 msnm.

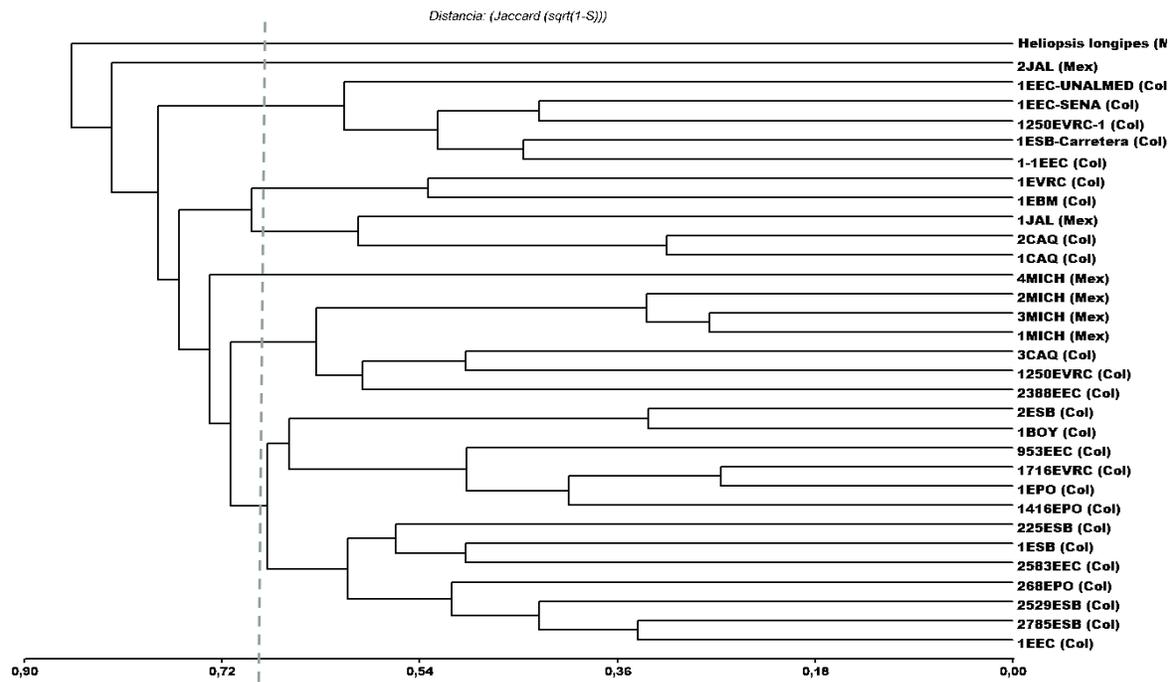


Figura 2. Dendrograma que muestra la diversidad genética de colectas de *T. diversifolia* de Colombia y México empleando marcadores ISSR con el índice de Dice. Correlación cofenética= 0.874

CAQ: Caquetá; EEC: Ecorregión del Eje Cafetero; EPO: Ecorregión del Piedemonte Orinocense; ESB: Ecorregión de Santander y Boyacá; EEVRC: Ecorregión del Valle del Río Cesar. Col: Colombia; Mex: México.

La ausencia de agrupamientos claros relacionados con la región de procedencia a partir del cálculo de semejanza mediante el uso de marcadores moleculares, indica heterogeneidad, debido probablemente al traslado de materiales de diferentes zonas para el establecimiento de sistemas. Por otra parte, es importante destacar, que la técnica empleada en este estudio mostró un alto grado de polimorfismo y sensibilidad para la discriminación de orígenes. Finalmente se destaca que el análisis de dendrograma describió una correlación cofenética alta (0.874), lo cual significa una alta correspondencia entre grupos y diferencia entre los mismos.

Conclusiones

T. diversifolia cuenta con un alto potencial para la alimentación animal, porque ofrece altos contenido PC (>25%) y minerales como Ca y P, además, brinda bajos tenores de FDN y FDA (49 y 46%, respectivamente) y alta adaptabilidad. Esta especie, tiene una amplia diversidad genética y los materiales cuentan con una mediana relación entre zonas, afectando características morfológicas y químicas. Fracciones como Cen, EE, fibras y ELN varían considerablemente entre materiales (cv>30%) y en características morfológicas: peso de la planta, hojas por planta y ramas por planta son los aspectos que más variación tienen (cv>60%). Debido a lo anterior, es posible seleccionar materiales de *T. diversifolia* con mayor rendimiento, calidad nutricional para la alimentación animal y con gran adaptabilidad edafoclimática, lo que la convierte en una alternativa real de adaptación al cambio climático y establecimiento de diversos SSP.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto *Ganadería Colombiana Sostenible*, financiado por el Departamento de Negocios, Energía y Estrategia Industrial del Reino Unido y el Fondo Mundial para el Medio Ambiente, por aportar recursos necesarios para las evaluaciones y recolección de materiales. También, los autores agradecen al Instituto Tecnológico de Tlajomulco (México), especialmente a su Laboratorio de Biología Molecular y estudiantes, por ofrecer sus instalaciones y otros recursos para las evaluaciones a nivel molecular.

Bibliografía

- Donney's Lemos, G., Botero, I. M., Herrera, J. R., Sánchez, G. V., Chará, J., Barahona, R., 2015. Producción in vitro de metano de dietas ofrecidas en sistemas silvopastoriles intensivos con *Tithonia diversifolia* y sistemas tradicionales. 3° Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles – VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales, At Misiones, Argentina, Pablo L. Peri, Editor. 1ª Ed. Santa Cruz. Ediciones INTA. ISBN 978-987-521-611-2. pp. 672-677.
- Doyle, J., Doyle, T., 1999. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. Focus 12, 13-15.
- Rao, I., Peters, M., Castro, A., Schultze-Kraft, R., White, D., Fisher, M., Miles, J., Lascano, L., Blümmel, M., Bungenstab, D., Tapasco, J., Hyman, G., Bolliger, A., Paul, B., van der Hoek, R., Maass, B., Tiemann, T., Cuchillo, M., Douxchamps, S., Villanueva, C., Rincón, A., Ayarza, M., Rosenstock, T., Subbarao, G., Arango, J., Cardoso, J., Worthington, M., Chirinda, N., Notenbaert, A., Jenet, A., Schmidt, A., Vivas, N., Lefroy, R., Fahrney, K., Guimarães, E., Tohme, J., Cook, S., Herrero, M.,

- Chacón, M., Searchinger, T., Rudel, T., 2015. LivestockPlus –The sustainable intensification of forage-based agricultural systems to improve livelihoods and ecosystem services in the tropics. *Tropical Grasslands* 3, 59–82.
- Ribeiro, R.S., Terry, S.A., Sacramento, J.P., Rocha e Silveira, S., Bento, C.B., Silva, E.F., Montovani, H.C., Gama, M.A.S., Pereira, L.G., Tomich, T.R., Mauricio, R.M., Chaves, A., 2016. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. *Plos One* 11, e0165751
- Ruiz, T.E., Torres, V., Febles, G., Díaz, H., González, J., 2013. Estudio del comportamiento de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* en relación con algunos componentes morfológicos. *Livestock Research for Rural Development* 25 (9). Retrieved September 19, 2016, from <http://www.lrrd.org/lrrd25/9/ruiz25154.htm>
- Thornton, P.K, Herrero, M., 2010. Potential for reduced methane and carbon dioxide emissions from livestock and pasture management in the tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (47), 19667–19672.
- Yang, J., Tang, L., Guan, Y., Sun, W., 2012. Genetic Diversity of an Alien Invasive Plant Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China. *Weed Science* 60, 552–557.

ANEXO II

Trabajo presentado en el 4th *World Congress on Agroforestry*, Montpellier Francia, 2019.

Rivera, J., Lopera, J., Chará, J., Gómez-Leyva, J., Barahona, R., Enrique, E. 2019. Genetic and morphological diversity of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray for use in silvopastoral systems of Latin America. Dupraz, C., Gosme, M., Lawson, G. (Editors). Book of Abstract 4th World Congress on Agroforestry. Montpellier: CIRAD, INRA, World Agroforestry. pp 712.

Genetic and morphological diversity of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray for use in silvopastoral systems of Latin America

Rivera Julian¹, Lopera Jhon¹, Chara Julian¹, Gómez Juan², Barahona Rolando³, Murgueitio Enrique¹.

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia, ²Laboratorio de Biología Molecular, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco, México; ³Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia.

In plant species, genetic and morphological variability are considered the basis for their adaptation and ability to respond to challenges and threats (Govindaraj et al., 2015). *Tithonia diversifolia*, a shrub of the Asteraceae family, is considered a forage species of great importance due to its chemical composition, productive performance, and adaptation to different conditions (Mauricio et al., 2017, Mauricio et al., 2018). It has been shown that forage from silvopastoral systems with *T. diversifolia* can replace commercial feeds (15% DM basis) in a total mixed ration diet fed to dairy cows without any change in total intake (18.7 kg MS/ day), milk yield (22.9 kg/day) and composition; thus providing important economic saving for farmers (Ribeiro et al., 2016). On the other hand, the daily milk production per cow is 8% higher in systems with *T. diversifolia* (5,000 shrubs/ha, alley cropping) compared to monoculture systems with Brachiaria or Urochloa grasses, whereas the stocking rate and milk production (ha/year) are 32.1% and 36.6% higher, respectively. Additionally, there is greater production of milk solids in *T. diversifolia* systems (Rivera et al., 2015). The objective of this work was to determine the diversity of *T. diversifolia* in Colombia and Mexico, as well as to recognize its social, productivity and economic potential for bovine systems. Molecular markers were used to determine genetic diversity, and differences in chemical characteristics and morphologies were analyzed with multivariate statistics and non-parametric statistics were used to analyze the economic and social variables. The materials presented differences in their crude protein (29.4% ± 3.29), extract ether (1.6% ± 0.67), Calcium (2.3%), acid detergent fiber (44.99 ± 9.43) and neutral detergent fiber (46.82 ± 12.52) contents (p <0.05). Differences were also found in the total weight of the plant, leaf area, leaves per branch and plant height (p <0.05), and a wide genetic diversity was determined with a Nei index of 0.281 and a Shannon index of 0.432. The inclusion of *T. diversifolia* in bovine systems increased the stocking rate and milk production ha⁻¹ year⁻¹ (3.7 ± 0.11 versus 0.5 ± 0.1, and 6605 ± 293.3 l versus 776 ± 338.7 l, respectively) (p <0.05) In addition, the Internal Rate of Return, had values of 3.40 and -0.10 with a Benefit / Cost ratio of 3.20 and 0.74 (p <0.05), favoring a higher level of employment generation (4.3 and 0.6, respectively).). It is concluded that *T. diversifolia* has

a wide phenotypic diversity and adaptation to different agroecological conditions, existing high quality provenances that offer greater nutritional contributions for different species of domestic animals and great potential to contribute to the income and welfare of livestock producers.

Govindaraj et al., 2015. *Genet Res Int*, 1- 14. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/431487>

Mauricio et al., 2017. *J Dairy Vet Anim Res* 5(4): 00146. DOI: 10.15406/jdvar.2017.05.00146

Mauricio et al., 2018. In: - *Reconciling contemporary agriculture*. Academic Press, 287 – 297

ANEXO III

Trabajo presentado en el X Congreso Internacional en Sistemas Silvopastoriles, Asunción Paraguay 2019.

Rivera, J.E., Chará, J., Gómez-Leyva, J.F., Ruíz, T.E., Barahona, R. 2019. Identificación y evaluación de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción en sistemas silvopastoriles en suelos ácidos de Colombia. En: Rivera J., Peri P., Chará J., Díaz M., Colcombet L., Murgueitio E (Eds). X Congreso internacional sobre sistemas silvopastoriles: por una producción sostenible. Libro de Actas. Editorial CIPAV, Cali. Asunción, Paraguay, 375 – 383 pp.

Identificación y evaluación de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción en sistemas silvopastoriles en suelos ácidos de Colombia

Identification and evaluation of superior ecotypes of *Tithonia diversifolia* A. Gray for silvopastoral systems in acid soils in Colombia

J.E. Rivera¹; J. Chará¹; J.F. Gómez-Leyva²; T.E. Ruíz³; R. Barahona⁴

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria – CIPAV. Carrera 25 # 6 – 62 Cali, Colombia jerivera@fun.cipav.org.co; ²Laboratorio de Biología Molecular, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México; ³Instituto de Ciencia Animal, Cuba; ⁴Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Resumen

El apropiado uso de arbustivas en sistemas silvopastoriles, tiene un papel fundamental en el mejoramiento de la productividad y sostenibilidad de la empresa pecuaria, debido a esto la identificación y evaluación de materiales destacados debe ser el punto de partida para incrementar la eficiencia en la utilización de los recursos forrajeros. El objetivo del presente trabajo fue identificar y evaluar ecotipos sobresalientes de *T. diversifolia* orientados a la producción bovina en suelos ácidos de Colombia. Se evaluaron siete ecotipos en un diseño de bloques completos al azar, desde el punto de vista agronómico, químico y de potencial forrajero con estadística multivariada, así como el efecto de la fertilización en el desempeño productivo de esta especie. Se encontraron diferencias en los parámetros agronómicos y de producción de nutrientes entre los materiales ($p < 0.05$), pero en los porcentajes de las variables químicas solo MS ($p = 0.012$) y Fósforo ($p = 0.017$) tuvieron diferencias. El uso de fertilizante a una tasa similar a la extracción de nutrientes tuvo efecto en todos los parámetros evaluados ($p < 0.05$), incrementado la productividad en un 65%. Se concluye que existe variedad en el desempeño agronómico y forrajero en ecotipos de *T. diversifolia* bajo las condiciones de suelos ácidos de Colombia, razón por la cual es posible identificar y seleccionar materiales superiores para la alimentación animal en sistemas silvopastoriles como los ecotipos 7 y 5 de este estudio.

Palabras clave: Botón de oro; composición química; fertilización; rumiantes; variables agronómicas.

Abstract

Proper implementation of shrubs in silvopastoral systems is a good practice to improve the productivity and sustainability in livestock systems, for this reason, the identification, and evaluation of different materials should be the first objective to increase efficiency in the utilization of forage species. The aim of this research was to evaluate and identify better ecotypes of *T. diversifolia* for cattle production in Colombian acid soils. Seven ecotypes were evaluated in a randomized complete block design in agronomic, chemical and forage potential characteristics with multivariate statistics, as well as the effect of fertilization on the productive performance of this species. Differences were found in the agronomic parameters and in the production of nutrients between materials ($p < 0.05$), but in the chemical variables ($\text{g } 100^{-1} \text{ DM}$) only DM ($p = 0.012$) and Phosphorus ($p=0.017$) had differences. The use of fertilizer at a rate similar to the extraction of nutrients had an effect on each evaluated parameters ($p < 0.05$), increasing productivity around 65%. We conclude that there is a variety of agronomic and forage performance in ecotypes of *T. diversifolia* under the conditions of acid soils of Colombia, and is possible to identify and select superior materials for animal feed in silvopastoral systems as ecotypes 7 and 5 evaluated in this research.

Keywords: *Agronomic characteristics; chemical composition; fertilization; Mexican sunflower; ruminants.*

Introducción

El uso de arbustivas como forraje en sistemas bovinos, ha tomado importancia en los últimos años debido a su contribución productiva, económica y ambiental (Schultze-Kraft *et al.*, 2018). *Tithonia diversifolia* comúnmente conocida como botón de oro, falso girasol o girasol mexicano, goza de una amplia adaptación edafoclimática, buena producción de biomasa y una oferta nutricional superior a la mayoría de las pasturas utilizadas en condiciones tropicales (Mauricio *et al.*, 2017). Esta arbustiva perenne, contiene bajos valores de fibra, alto contenido de Nitrógeno y Calcio, así como aceptables porcentajes de degradación y contenido de carbohidratos no estructurales (Mauricio *et al.*, 2017; Gallego-Castro *et al.*, 2017).

A pesar de contar con buenas características forrajeras, diferentes autores han encontrado que *T. diversifolia* tiene una amplia variedad fenotípica, la cual favorecería la posibilidad de identificar y seleccionar ecotipos destacados para la producción en condiciones ambientales específicas, además de optimizar su uso (Ruiz *et al.*, 2013; Holguín *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2017).

El objetivo del presente trabajo fue identificar y evaluar ecotipos superiores de *T. diversifolia* desde el punto de vista agronómico y químico, orientados a la producción bovina en sistemas silvopastoriles en suelos ácidos de Colombia.

Materiales y métodos

Identificación y selección de materiales a evaluar

La selección de materiales de *T. diversifolia* se hizo a partir de los resultados reportados por Rivera *et al.*, (2017), quienes por medio de un análisis de diversidad genética ilustrado en un agrupamiento UPGMA (unweighted pair-group method), identificaron el potencial forrajero de siete ecotipos de Colombia en un análisis multicriterio de 32 orígenes. La diversidad genética encontrada y el análisis de algunas características agronómicas y químicas sirvieron de base para la selección de los materiales.

Localización

Se establecieron 42 parcelas experimentales en el municipio de San Luis de Cubarral en el departamento del Meta (Colombia), a 3°47'18.68" N y 73°49'16.83" O; 21 parcelas sin fertilizar con los siete ecotipos seleccionados y 21 parcelas fertilizadas con los mismos materiales fueron empleadas. El sitio de trabajo se localizó a 530 msnm, cuenta con una precipitación media anual de 3800 mm, una temperatura promedio de 24.8°C, una humedad relativa del 74% y una radiación solar media de 3.8 KWh/m². Las parcelas experimentales se establecieron en suelos ácidos (pH 4.7) con saturación de Al y Fe, con baja materia orgánica (1.35%), de textura Franco-arcillo-arenoso y con una capacidad de intercambio catiónico efectiva de 3.35 meq/100g.

Establecimiento de parcelas experimentales

Se usaron plantas producidas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente (Rionegro, Antioquia- Colombia) a partir de una reproducción clonar por explantes. Cada una de las parcelas estuvo conformada por 36 plantas sembradas a una distancia de 0.8 x 0.8 m (30.35 m²), fueron dispuestas en bloques completos al azar y se utilizaron tres repeticiones por material.

Todas las parcelas estuvieron bajo los mismos manejos agronómicos y actividades de siembra, además, con el fin de conocer el efecto de la fertilización en cada una de las variables bajo estudio, fueron establecidas parcelas con un nivel de fertilización acorde a la extracción esperada de nutrientes por plantas de *T. diversifolia* de acuerdo a lo reportado por Botero (2017). Según este autor, la extracción de los principales nutrientes en esta especie a una edad de 40 días es: 8.26 g de N, 4.3 g de K, 1.07 g de P, y 2.11 de Fe; la fertilización se ofreció aplicando Urea (46% de N), Fosfato di amónico (DAP) ((NH₄)₂HPO₄) (46% de P₂O₅, 18% de N)) y Cloruro de Potasio (KCl, K₂O del 60 al 63% y Cl del 45 al 47%). Los nutrientes fueron ofrecidos con la aplicación de 16.22, 2.15 y 4.89 g planta⁻¹ de Urea, DAP y KCL, respectivamente.

VARIABLES MORFOLÓGICAS Y QUÍMICAS

Las evaluaciones agronómicas se llevaron a cabo en época de verano y transición verano-invierno cinco meses después del establecimiento del cultivo, fueron medidas en cinco plantas por parcela durante tres cortes y con periodos entre medición de 40 días. Las variables químicas fueron determinadas al finalizar las evaluaciones.

Las variables agronómicas y morfológicas evaluadas fueron: altura de la planta (cm), diámetro promedio de los tallos (mm), relación hoja tallo, número de ramas (#), área del dosel (cm²); área de las hojas (cm²), supervivencia (%), forraje verde (g) y materia seca (g). Por otro lado la composición químicas estuvo alrededor de las fracciones: contenido de materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra en detergente ácido (FDA), fibra en detergente neutro (FDN), cenizas (Cen), extracto etéreo (EE), lignina (Lig), Calcio (Ca), Fósforo (P), digestibilidad de la materia seca (DigMS) y energía neta de lactancia (ENL). Estas variables químicas fueron determinadas en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) por medio de Espectroscopia del Infrarrojo Cercano (NIRS).

Identificación de materiales destacados

Se utilizó el Índice de potencial forrajero ponderado (IPFP) para identificar los mejores materiales. El IPFP relaciona características de tanto químicas como agronómicas de las colectas en un análisis de componentes principales (ACP), para hacer una comparación multicriterio e identificar aquellos materiales con mayor potencial forrajero (Holguín *et al.*, 2015). En la ecuación 1 se presenta el modelo matemático usado para determinar el IPFP.

$$\sum_{n=1}^n F(1) \left(\frac{X_i(\text{intr}) - X(i)}{S(i)} \right)$$

Ecuación 1. índice de potencial forrajero ponderado (IPFP)

Donde: $X_i(\text{intr})$: promedio de la i -ésima característica para la introducción int. Con $i: 1,2,\dots,k$ características; $X(i)$; promedio general de la característica i -ésima considerando todas las introducciones; $S(i)$: desviación estándar general de la característica i -ésima considerando todas las introducciones.

$F(1)$: Factor de ponderación determinado con base al peso de las comunalidades constituidas con la matriz de correlaciones de las variables originales según el ACP.

Diseño experimental y análisis de la información

El análisis de las variables agronómicas y químicas fueron estudiadas por medio de un diseño de bloques completos al azar; los tres momentos de mediciones agronómicas fueron promediadas para el contraste. El modelo matemático de este diseño se presenta en la ecuación 2.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Ecuación 2. modelo general de un diseño de bloques completos al azar

Donde: μ = media del efecto general; τ_i = efecto del tratamiento i (materiales colectados 1, 2, 3...7); β_j = efecto del bloque j ; ϵ_{ij} = valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental i,j ; Y_{ij} = Observación en la unidad experimental de la variable a evaluar.

Todos los análisis fueron realizados en la herramienta RStudio usando las librerías “*agricolae*” y “*FactoMineR*” (R Core Team, 2018). Cuando fue identificada diferencia entre las medias se utilizó la prueba de contraste de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, además, las pruebas de normalidad, homogeneidad de la varianza y de aditividad igualmente fueron realizadas.

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se presentan los promedios encontrados de las variables agronómicas y morfológicas para los siete ecotipos estudiados. De las nueve variables incluidas en el análisis, solo la relación hoja/tallo y el diámetro de los tallos no mostraron diferencias ($p > 0.05$). Teniendo en cuenta todas las variables, los ecotipos 7 y 5 describieron mayor capacidad de crecimiento, mayor producción de forraje verde (FV) y por ende mayor MS. Un aspecto importante a destacar es que ambos ecotipos tuvieron mayor tamaño de las hojas, mayor altura y mayor área del dosel.

Ruiz *et al.*, (2013) evaluaron diferentes ecotipos de *T. diversifolia* colectados en Cuba, encontrando diferencias entre estos e identificando materiales más adecuados para ser incluidos en sistemas silvopastoriles. Las diferencias entre materiales se debe probablemente a la diversidad genética con que esta especie cuenta (Yang *et al.*, 2012; Rivera *et al.*, 2017). Los valores encontrados en este trabajo difieren a los reportados por Holguín *et al.*, (2015) en Colombia y Ruiz *et al.*, (2013) en Cuba, lo cual puede deberse a que las evaluaciones incluyeron ecotipos y condiciones medioambientales diferentes.

Tabla 1. Promedio de los parámetros agronómicos y morfológicos de los genotipos de *T. diversifolia* evaluados

	Ecotipo 1	Ecotipo 2	Ecotipo 3	Ecotipo 4	Ecotipo 5	Ecotipo 6	Ecotipo 7	Valor p
Altura de la planta (cm)	65.6 ^{bc}	68.4 ^{bc}	66.8 ^{bc}	63.3 ^c	83.4 ^{ab}	67.9 ^{bc}	89.3 ^a	0.0221*

Diámetro del tallo (mm)	16.1	15.7	15.3	15.1	15.4	16.9	16.4	0.241
Ramas (#)	7.11 ^{ab}	7.47 ^{ab}	7.08 ^{ab}	7.11 ^{ab}	7.66 ^{ab}	6.47 ^b	8.81 ^a	0.0465 [*]
Relación hojas/tallos	0.73	0.74	0.80	0.73	0.80	0.71	0.81	0.060
Área del dosel (cm ²)	1150 ^{ab}	1282 ^{ab}	1270 ^{ab}	980 ^b	1417 ^{ab}	1154 ^{ab}	1837 ^a	0.044 [*]
Área de las hojas (cm ²)	44.9 ^{ab}	38.9 ^b	43.1 ^{ab}	33.7 ^b	51.8 ^{ab}	40.9 ^b	62.7 ^a	0.00178 ^{**}
Supervivencia (%)	83.3 ^a	75.9 ^{ab}	65.3 ^b	81.9 ^a	82.4 ^a	72.7 ^{ab}	80.1 ^a	0.0103 [*]
Forraje verde (g)	350 ^b	371 ^b	378 ^{ab}	331 ^b	443 ^{ab}	385 ^{ab}	549 ^a	0.00426 ^{**}
Materia seca (g)	54.4 ^b	65.3 ^{ab}	62.8 ^{ab}	56.9 ^b	77.5 ^{ab}	67.8 ^{ab}	92.5 ^a	0.00135 ^{**}

Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística ($p < 0.05$). 0^{****} 0.001^{***} 0.01^{**} 0.05^{*} 0.1['] 1['].

Si bien la mayoría de las variables agronómicas describieron diferencias entre los materiales, solo los parámetros químicos MS y P presentaron diferencias en términos porcentuales (g 100 g⁻¹ de MS). En la Tabla 2 se muestran los valores promedio para cada una de las variables analizadas.

En general todos los ecotipos muestran características nutricionales superiores a las reportadas para pasturas tradicionalmente usadas en condiciones tropicales y subtropicales, además, se encuentran muy cercanas a la mayoría de leguminosas a pensar de no serlo. Valores altos para PC, digestibilidad, Ca y P, y valores bajos de fibras y lignina, se destacan en esta especie (Mauricio *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2017).

Tabla 2. Promedio de los parámetros químicos evaluados en los genotipos de *T. diversifolia*

	Ecotipo 1	Ecotipo 2	Ecotipo 3	Ecotipo 4	Ecotipo 5	Ecotipo 6	Ecotipo 7	Valor p
MS (g 100 g ⁻¹ MS)	15.5 ^b	17.7 ^a	16.6 ^{ab}	17.4 ^{ab}	17.5 ^a	17.7 ^a	17.1 ^{ab}	0.012 [*]
PC (g 100 g ⁻¹ MS)	28.4	26.5	29.2	25.9	28.7	28.2	27.5	0.055
Cenizas (g 100 g ⁻¹ MS)	14.7	14.2	14.6	14.1	14.4	14.7	14.2	0.666
EE (g 100 g ⁻¹ MS)	2.61	2.86	2.66	2.87	2.71	2.88	2.45	0.091
FDA (g 100 g ⁻¹ MS)	34.7	34.5	32.9	33.1	34.2	33.7	33.7	0.512
FDA (g 100 g ⁻¹ MS)	14.19	13.4	12.2	12.9	15.1	13.3	14.9	0.397
Lignina (g 100 g ⁻¹ MS)	2.65	2.62	2.08	1.94	2.36	2.45	1.95	0.523
Calcio (g 100 g ⁻¹ MS)	1.81	1.92	1.78	2.10	1.89	2.28	1.75	0.947
Fósforo (g 100 g ⁻¹ MS)	0.23 ^{ab}	0.22 ^{ab}	0.23 ^{ab}	0.21 ^b	0.24 ^a	0.21 ^b	0.25 ^a	0.017 [*]
DigMS (g 100 g ⁻¹ MS)	78.8	77.6	79.8	77.3	78.8	78.8	78.2	0.103
ENL (Mcal kg ⁻¹ de MS)	1.66	1.63	1.68	1.62	1.65	1.65	1.64	0.120

MS: materia seca; PC: proteína cruda; EE: extracto etéreo; FDA: fibra en detergente ácida; FDN: fibra en detergente neutra; DigMS: digestibilidad de la materia seca; ENL: energía neta de lactancia. Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística ($p < 0.05$). 0^{****} 0.001^{***} 0.01^{**} 0.05^{*} 0.1['] 1['].

Aunque pocas diferencias fueron encontradas en términos de g 100 g⁻¹ MS (%) en las características químicas, la producción total de nutrientes a nivel de planta si tuvo diferencias ($p < 0.05$). Esta diferencia se deben a la variabilidad en producción de biomasa entre los ecotipos. En la Tabla 3 se muestra la producción estimada de nutrientes y de MS de cada material (t ha⁻¹año⁻¹), en un escenario de 20.000 plantas por hectárea (banco forrajero de corte); los valores de producción superan a los sistemas pastoriles tradicionales en Suramérica, los cuales se encuentran alrededor de 8 ± 1.2 t de MS año⁻¹ (Herrero *et al.*, 2013).

Tabla 3. Producción promedio de nutrientes en los genotipos de *T. diversifolia* evaluados

	Ecotipo 1	Ecotipo 2	Ecotipo 3	Ecotipo 4	Ecotipo 5	Ecotipo 6	Ecotipo 7	Valor p
PC (t ha ⁻¹ año ⁻¹)	2.86 ^b	3.27 ^{ab}	3.36 ^{ab}	2.76 ^b	4.12 ^{ab}	3.53 ^{ab}	4.72 ^a	0.000125 ^{***}
Ca (kg ha ⁻¹ año ⁻¹)	179 ^b	228 ^b	204 ^b	218 ^b	267 ^{ab}	282 ^{ab}	294 ^a	0.000494 ^{***}
P (kg ha ⁻¹ año ⁻¹)	23.5 ^b	27.01 ^{ab}	25.95 ^b	22.45 ^b	35.16 ^{ab}	27.18 ^{ab}	42.8 ^a	0.00479 ^{**}
MS degradable (t ha ⁻¹ año ⁻¹)	7.85 ^b	9.35 ^{ab}	9.16 ^{ab}	8.06 ^b	11.18 ^{ab}	9.76 ^{ab}	13.2 ^a	0.0252 [*]
ENL (Mcal ha ⁻¹ año ⁻¹)	18070 ^b	21493 ^b	21090 ^b	18544 ^b	25725 ^{ab}	22425 ^b	30479 ^a	0.0264 [*]

MS (t ha⁻¹año⁻¹)	9.91 ^b	11.9 ^{ab}	11.7 ^{ab}	10.4 ^b	14.1 ^{ab}	12.7 ^{ab}	16.8 ^a	0.0135 [*]
---	-------------------	--------------------	--------------------	-------------------	--------------------	--------------------	-------------------	---------------------

PC: proteína cruda; MS: materia seca; Ca: Calcio; P: Fósforo; ENL: energía neta de lactancia. Letras diferentes en una misma fila denotan diferencia estadística ($p < 0.05$).
 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 ' 0.1 ' ' 1.

Finalmente según el IPFP, los ecotipos 7 (8.71) y 5 (5.94) fueron los más destacados, y los de menor potencial forrajero fueron los ecotipos 2 (-4.63) y 4 (-6.99). De igual forma analizando la respuesta de las diferentes variables a la fertilización, se encontró un efecto significado para todas las características morfológicas y para la MS, PC, FDA, Ca, DigMS y ENL; las variables de P, cenizas, EE y FDN no tuvieron efecto ($g\ 100\ g^{-1}\ MS$).

El uso de fertilización de acuerdo a la extracción de nutrientes por *T. diversifolia*, puede incrementar la obtención de PC, Ca, P, energía bruta y MS, en un 82, 24, 63, 58 y 57%, respectivamente.

Conclusiones

Es posible identificar y seleccionar materiales destacados de *T. diversifolia* para ser usados en sistemas silvopastoriles, gracias a su diversidad fenotípica. Seleccionar materiales superiores favorecerá un mejor uso de esta especie, así como una mayor oferta de nutrientes en sistemas bovinos. De igual forma se concluye que *T. diversifolia* responde positivamente a la fertilización, condición que podría ser una alternativa para mejorar su utilización aunque sería interesante buscar otras fuentes de fertilización más sostenibles.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto *Ganadería Colombiana Sostenible*, financiado por el Departamento de Negocios, Energía y Estrategia Industrial del Reino Unido y el Fondo Mundial para el Medio Ambiente (GEF), así como a Colciencias en su convocatoria de Doctorados Nacionales 727 de 2015 y al predio El Provenir, sitio donde fueron desarrolladas las evaluaciones.

Bibliografía

- Botero, J. 2017. Potencial de extracción y utilización de nutrientes de *Tithonia diversifolia* y su relación con el rendimiento y calidad nutricional. Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Agrícolas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. 82 pp.
- Gallego-Castro, L., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J. 2017. Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray bajo tres sistemas de siembra en el trópico alto. *Agronomía Mesoamericana* 28 (1), 213-222.
- Holguín, V.A., Ortíz, S., Velasco, A., Mora, J. 2015. Evaluación multicriterio de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en Candelaria, Valle del Cauca. *Revista de medicina veterinaria y zootecnia* 62 (2): 57-72
- Herrero, M., Havlik, P., Valin, H., Notenbaert, A., Rufino, M., Thornton, P., Blummel, M., Weiss, F., Grace, D. Obersteiner. M. 2013. Global livestock systems: Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 20888–20893.
- Mauricio, R.M., Calsavara, L.H., Ribeiro, R.S., Pereira, L.G., Freitas, D.S., Paciullo, D.S., Barahona, R., Rivera, J.E., Chará, J., Murgueitio. E. 2017. Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research* 5(4), 00146.
- RStudio Team. 2018. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>

- Rivera, J.E., Gómez-Leyva, J.F., Castaño, K., Morales, J.G., Chará, J., Barahona, R. 2017. Diversidad molecular, química y morfológica en materiales de *Tithonia diversifolia* (hemsl.) Gray para la alimentación animal en Colombia y México. IX Congreso Internacional Sobre Sistemas Silvopastoriles. Manizales, Colombia, 249 – 255 pp.
- Ruiz, T.E., Torres, V., Febles, G., Díaz, H. González, J. 2013. Estudio del comportamiento de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* en relación con algunos componentes morfológicos. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 25, Article #154 Retrieved april 11, 2019, from <http://www.lrrd.org/lrrd25/9/ruiz25154.html>
- Ruiz, 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.
- Schultze-Kraft, R., Rao, I.M., Peters, M., Clements, R.J., Bai, C., Liu, G. 2018. Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview. *Tropical Grasslands* 6(1), 1–14.
- Yang, J., Tang, L., Guan, Y., Sun, W. 2012. Genetic Diversity of an Alien Invasive Plant Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China. *Weed Science* 60, 552–557.