

Efecto de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray (Botón de oro) en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*

Juana Galindo, Niurca González, Areadne Sosa, T. Ruiz, Verena Torres, Ana Irma Aldana, H. Díaz, Onidia Moreira, Lucía Sarduy y Aida C. Noda

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Correo electrónico: jgalindo@ica.co.cu

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Tithonia diversifolia* en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*. Los tratamientos se diseñaron de acuerdo con el nivel de *T. diversifolia* y fueron: (A) 0 (control); (B) 10 % y (C) 20 %. El resto de la dieta consistió en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Los muestreos se efectuaron a las 0, 2 y 4 horas después de iniciada la fermentación. La composición química de la planta mostró los siguientes valores: 23.95 % PC, 33.43 % FDN y 29.54 % FDA. El tamizaje fitoquímico demostró la presencia de taninos y saponinas. La población de protozoos fue 3.75, 3.25 y 1.5 x 10⁵ células. mL⁻¹ para A, B y C, respectivamente. Las bacterias metanogénicas se redujeron en 1.64 y 2.7 veces con 10 y 20 % de *T. diversifolia*, respectivamente. La inclusión de 10 % activó la población de bacterias celulolíticas aunque el 20 % no difirió del control. No se encontraron efectos en la población de hongos ruminales. Se concluye que *Tithonia diversifolia* reduce la población de protozoos y los metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: rumen, *Tithonia diversifolia*, protozoos, metanógenos, bacterias celulolíticas.

Los rumiantes son responsables de alrededor del 23 % de la producción de metano global. Esto es una consecuencia inevitable de la fermentación de los carbohidratos en el rumen. El gas se emite a la atmósfera mediante la eructación y la cantidad liberada depende del volumen de alimento consumido y de la composición de la ración, la que es menor en dietas bajas en fibra (Gil 2004). Más del 10 % de la energía bruta en el alimento se pierde en forma de metano. Además, la producción de metano por los microorganismos del rumen es estimada en 300-600 L al año en ganado adulto, lo que representa aproximadamente 80 000 000 Tg al año (Jouany 1994) y representa alrededor del 23 % de la producción de metano total. Este gas es uno de los que más contribuye al efecto invernadero y es responsable del 18 % del fenómeno (Johnson *et al.* 2000). Por estas razones, muchas investigaciones se dirigen a encontrar vías para reducir la emisión de metano por los rumiantes.

En los rumiantes, la producción de metano se afecta por una variedad de factores dietarios y microbianos y se conoce que muchos agentes químicos son capaces de inhibir la producción de metano (Itabashi *et al.* 2000). Sin embargo, todos estos productos son costosos y el país no dispone de recursos económicos para su adquisición en el mercado internacional.

Se ha demostrado que las bacterias metanogénicas viven de manera endosimbiótica dentro o sobre la superficie de los protozoos. Cualquier factor que disminuya la población protozoaria será capaz de reducir los metanógenos, así como la producción de metano.

El empleo de plantas, árboles y arbustos de leguminosas, entre otras, puede ser capaz de cumplir este propósito debido a la presencia de metabolitos secundarios, tales como taninos y saponinas capaces de ejercer efectos defaunantes (Galindo *et al.* 2009).

Por las razones anteriormente expuestas, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Tithonia diversifolia* en la población de protozoos y metanógenos ruminales en condiciones *in vitro*.

Materiales y Métodos

a) *Tratamientos experimentales.* Los tratamientos experimentales se diseñaron de acuerdo con el nivel de *T. diversifolia* y fueron: (A) 0 (control); (B) 10 % y (C) 20 %. El resto de la dieta experimental consistió en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*).

La muestra de *Tithonia diversifolia* de la investigación tuvo una edad de 30 d y su composición química (% de MS) se determinó según AOAC (1995) y fue de 23.95 PB, 33.43 FDN y 29.54 FDA, respectivamente. La composición en PB del pasto estrella fue 7.26; y el tenor de FDN, ceniza, calcio y fósforo fue de 74.57, 10.11, 0.42 y 0.18 %, respectivamente.

El análisis fitoquímico de *Tithonia diversifolia* mostró la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: taninos, ++; flavonoides, ++; saponinas, + y triterpenos, +.

b) *Procedimiento Experimental.* El experimento se condujo en condiciones *in vitro*, para lo cual se utilizó la técnica de Theodorou *et al.* (1994), donde se utilizan 18 botellas de 100 mL selladas para incubar las muestras de alimento en líquido ruminal y un medio amortiguador. Para incubar las muestras de alimento, se utilizará 30 mL de la mezcla, integrada por líquido de rumen y solución buffer en una proporción 1:3 (10 mL de líquido de rumen, 20 mL de solución amortiguadora).

Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0), a las 2 y 4 h, para las determinaciones de las bacterias y los hongos. Se replicó 6 veces en el tiempo para lo que se efectuaron 3 corridas de dos réplicas cada una.

El pH se midió en pH- metro digital marca WPA.

El inoculo ruminal se obtuvo a partir de tres toros mestizos, estabulados y con cánula en el saco dorsal del rumen. Estos se alimentaron con una dieta de forraje de gramíneas, sin suplementación adicional y libre acceso al agua. La muestra de líquido ruminal se colectó a través de la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío y se conservó en un termo herméticamente cerrado hasta su traslado al laboratorio.

El procedimiento se realizó bajo atmósfera de CO₂, con el propósito de garantizar las condiciones de estricta anaerobiosis.

c) *Técnicas de cultivo y conteos de microorganismos.*

Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate (1950) en tubos rodados y en condiciones de anaerobiosis estricta para determinar las poblaciones de bacterias viables totales, celulolíticas, metanogénicas y de hongos anaerobios.

La siembras de bacterias viables totales y celulolíticas se efectuaron en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (1966), modificado por Elías (1971) y Galindo (1988). Para la determinación de la población de hongos anaerobios, se utilizó el medio de cultivo de Joblin (1981). Las bacterias metanogénicas se contaron por el mismo método; pero se utilizó una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (60:40) en la fase gaseosa. El medio de cultivo fue descrito por Anderson y Horn (1987). El número de unidades formadoras de colonia y de talo se determinó por conteo visual de aparición de las colonias en los tubos rodados, bajo lupa.

Los protozoos se preservaron en formol al 10 % en una dilución 1:1 (v/v). Las muestras preservadas se guardaron en refrigerador a 4 °C y se contaron, posteriormente, al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Para ello, los protozoos se tiñeron con una solución de violeta genciana al 0.01 % en ácido acético glacial al 1 %.

d) *Tratamiento estadístico.* Se utilizó el análisis de varianza multivariado según Torres *et al.* (2003) para el análisis de la interacción de los tratamientos con los

tiempos de fermentación que se evaluaron.

Se utilizó la Dócima de Duncan para $P < 0.05$ en los casos necesarios. Los análisis estadísticos se realizaron con los paquetes estadísticos Info Stat (2002) y SPSS+ (Visauta 1998)

Los conteos de microorganismos se transformaron según Ln N, para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento. Para el análisis, se aplicó la fórmula $(K+N).10^x$, donde K es la constante que representa el logaritmo de la dilución en la que se inoculó el microorganismo; N es el logaritmo del conteo de colonias, determinado como $ufc \times mL^{-1}$, $uft \times mL^{-1}$, ó células $\times mL^{-1}$; 10 es la base de los logaritmos y X es la dilución a la cual se efectuó la inoculación.

Resultados

No se encontró interacción entre los factores en estudio para ninguno de los indicadores.

La suplementación con 20 % en base seca de *Tithonia diversifolia* en la dieta para rumiantes produjo un marcado efecto reductor de la población de protozoos en el rumen, aunque este efecto no se puso de manifiesto cuando se empleó el 10 % de *T. diversifolia*. No se encontró efectos debido a la inclusión de la planta en la población de hongos celulolíticos del rumen bajo las condiciones experimentales en las que se ejecutó el trabajo (tabla 1).

La inclusión de *T. diversifolia* al 20 % redujo la población de bacterias viables totales (10^{11} ufc.mL⁻¹), tal y como se muestra en la misma tabla. Por su parte, esta planta produjo incrementos en la población de bacterias celulolíticas del rumen, cuando se incluyó a razón del 10 % de la MS total. Su inclusión al 20 % no produjo modificaciones en los referidos grupos microbianos.

La inclusión de 10 y 20 % de *T. diversifolia* produjo reducciones en la población de metanógenos ruminales, lo que reviste una gran importancia ya que estos microorganismos son responsables de la producción de metano a nivel de rumen (figura 1).

Tabla 1. Efecto de *Tithonia diversifolia* en algunos miembros de la población microbiana ruminal en condiciones *in vitro*

Indicador	% <i>Tithonia diversifolia</i>			EE ± sign
	0	10%	20%	
Protozoos, 10 ⁵ cel. mL ⁻¹	1.32 ^a (3.75)	1.17 ^a (3.25)	0.69 ^b (1.5)	0.02*
Hongos celulolíticos, 10 ⁵ uft. mL ⁻¹	3.26 (26.1)	3.36 (28.9)	3.23 (25.2)	0.15
Bacterias viables totales, 10 ¹¹ ufc. mL ⁻¹	4.18 ^a (65.35)	4.17 ^a (65.00)	3.90 ^b (49.60)	0.20*
Bacterias celulolíticas, 10 ⁶ ufc. mL ⁻¹	3.21 ^a (24.9)	4.00 ^b (55.8)	3.37 ^a (29.2)	0.12*

ufc. Unidades formadoras de colonias; uft unidades formadoras de talos. Datos transformados según Ln X, medias originales entre paréntesis. ^{a, b} Medias con letras diferentes dentro de la misma fila, difieren a $p < 0.05$ (Duncan 1955) * $P < 0.05$

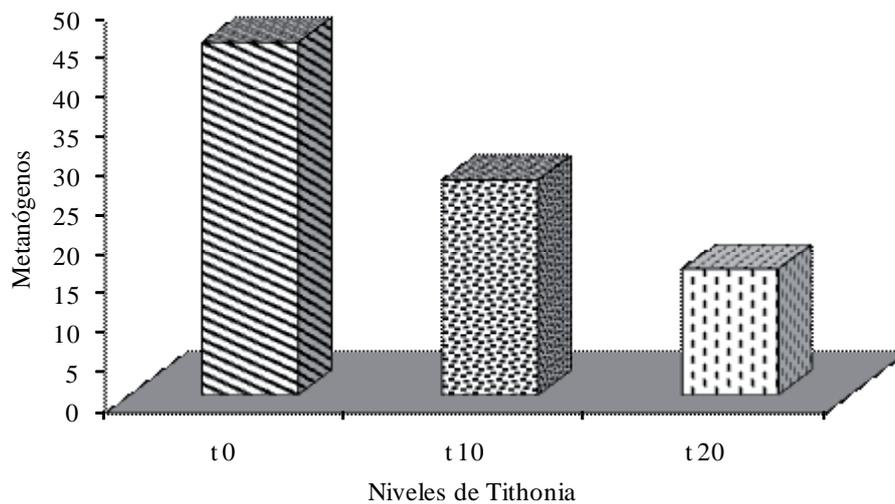


Figura 1. Efecto de *Tithonia diversifolia* en la población de metanógenos, 10^9 ufc. mL⁻¹.
EE \pm 0.31*

La tabla 2 muestra el efecto del tiempo de fermentación en algunos de los integrantes de la población microbiana del rumen. Como se aprecia, no se encontró efecto del tiempo en las poblaciones de protozoos, hongos celulolíticos y bacterias celulolíticas. Sin embargo, las poblaciones de bacterias viables totales y metanogénicas se modificaron en el tiempo de fermentación. A partir de las 2 horas, se encontraron las mayores poblaciones de viables totales, mientras que los metanógenos fueron más numerosos a las 2 horas, para reducir su población a las 4, sin diferencias con los valores que se alcanzaron antes de incubar.

Discusión

Los resultados que se obtuvieron a partir de la presente investigación demostraron, una vez más, que es posible utilizar el follaje de árboles y arbustos como una de las vías manipuladoras de la fermentación microbiana

ruminal, las que resultan económicas y amigables con el medio ambiente.

Tithonia diversifolia manifestó su potencial fermentativo, informado previamente por Rosales (1996) cuando incubó esta planta mediante la técnica de producción de gas *in vitro* y halló 195.4 mL después de un período de incubación de 166 horas, así como una tasa de fermentabilidad de 3.66 mL. h⁻¹ y 20.76 mL.h⁻¹ para los compuestos altamente y lentamente fermentables, respectivamente. Estos procesos dependen, en lo fundamental, de diferentes factores tales como la proporción y nivel de consumo, el contenido de nutrientes, su digestibilidad, así como la eficiencia de utilización por el animal (La O *et al.* 2009).

El efecto estimulador de las poblaciones de bacterias celulolíticas cuando se utilizó 10 % del follaje de *T. diversifolia* se pudiera relacionar con el elevado contenido de proteína que presentó esta planta (23.91 %). Al respecto, trabajos desarrollados por Galindo *et al.*

Tabla 2. Efecto del tiempo de fermentación en algunos miembros de la población microbiana ruminal en condiciones *in vitro*

Indicador	Tiempo, h			EE \pm sign
	0	2	4	
Protozoos, 10^5 cel. mL ⁻¹	1.26 (3.54)	1.35 (3.87)	1.39 (4.02)	0.03
Hongos celulolíticos, 10^5 uft. mL ⁻¹	3.46 ^a (31.87)	2.93 ^b (18.77)	2.15 ^b (18.60)	0.21
Bacterias viables totales, 10^{11} ufc. mL ⁻¹	3.87 ^b (48.40)	4.16 ^a (64.31)	4.24 ^a (69.66)	0.17**
Bacterias celulolíticas, 10^6 ufc. mL ⁻¹	3.53 (34.13)	3.46 (32.12)	3.14 (23.20)	0.35
Bacterias metanogénicas, 10^{10} ufc. mL ⁻¹	3.48 ^b (32.82)	3.81 ^a (45.32)	3.45 ^b (31.78)	0.19*

ufc. Unidades formadoras de colonias; uft unidades formadoras de talos. Datos transformados según Ln X, medias originales entre paréntesis

abMedias con letras diferentes dentro de la misma fila difieren a $P < 0.05$ (Duncan 1955)

** $P < 0.01$ * $P < 0.05$

(2009) demostraron que cuando se emplea el follaje de arbustos, leguminosos o no, capaces de aportar fuentes proteicas se pone a disposición de los microorganismos del rumen, específicamente los celulolíticos, compuestos como el amoníaco, aminoácidos, péptidos y ácidos grasos de cadena corta ramificados (Araque 2003 y De Luca 2003). Estas sustancias favorecen la degradación de la fibra (Hoover y Stokes 1991) y también justifican la alta fermentabilidad de la materia seca y, por lo tanto, una rápida disponibilidad de nutrientes, productos de la fermentación, aspectos que se reportaron por Mahecha y Rosales (2006).

Es importante que se considere que la inclusión del 20 % de *T. diversifolia* mantiene la población de bacterias celulolíticas igual al tratamiento control, lo que pudiera indicar que niveles superiores serían capaces de provocar efectos reductores en esta importante población microbiana ruminal. Varios son los factores idóneos que influyen de manera negativa en las poblaciones de bacterias celulolíticas, fundamentalmente con estos sistemas. Entre ellos, se destacan por su importancia: la presencia de metabolitos secundarios, los que se relacionan de manera estrecha con la edad de los vegetales. (Ku Vera 2000).

En estudios realizados por Galindo *et al.* (2005) y Galindo *et al.* (2007) al suplementar vacas con 30 % de *Leucaena leucocephala* como parte del consumo total de MS, estos autores encontraron incrementos en las poblaciones de bacterias celulolíticas, así como en la actividad específica de sus enzimas, al mismo tiempo que se redujo la población de protozoos ruminales. Sin embargo, niveles superiores no fueron capaces de producir efectos similares. De cualquier manera, se prevé continuar los estudios con *T. diversifolia* y evaluar diferentes niveles de participación de la planta en la dieta de los animales.

El efecto que se encontró en la población de protozoos puede tener su origen en la deposición de metabolitos secundarios de esta arbustiva: fenoles totales, taninos, saponinas, entre otros. La respuesta en este sentido es variable y, al respecto, estudios realizados por García *et al.* (2008a) y García *et al.* (2008b) al comparar la aceptabilidad de 12 arbustos tropicales demostraron que *T. diversifolia* contenía 1.49 % de fenoles totales, aunque no detectaron la presencia de taninos condensados ni taninos precipitantes de proteínas y el consumo de MS kg PV⁻¹ a las 6 horas fue 0.67, 0.99 y 3.88 para vacunos, ovinos y caprinos, respectivamente. Indicaron, además, que algunos de los compuestos secundarios pueden, además, disminuir la parasitosis, evitar el timpanismo y aumentar la longevidad y el tiempo de vida productivo de los animales debido a su carácter anti-oxidante.

La respuesta que se obtuvo en la población de metanógenos era esperada. Es reconocido que la dieta y, principalmente, el contenido de fibra influyen en la densidad poblacional de estos grupos microbianos en el rumen. De esa manera, en los sistemas de alimentación

Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 45, Número 1, 2011.

basados en gramíneas se observan 10⁹-10¹⁰ unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de líquido ruminal para estos grupos microbianos (Joblin 2004), lo que se puede modificar mediante diferentes vías, dentro de las cuales se encuentra el uso de compuestos como taninos, saponinas, alcaloides y, además, productos comerciales.

Otro aspecto que se debe considerar en los resultados que se alcanzaron es el hecho de que los metanógenos pueden vivir en el interior o adheridos a la superficie de los protozoos ciliados del rumen y, en esas condiciones, establecen relaciones de endosimbiosis y son responsables de más del 37 % de las emisiones de metano (Hegarty 1999). En tales circunstancias, la inclusión de 20 % de *T. diversifolia* ejerció efecto defaunante, lo que contribuyó a reducir la población de metanógenos.

Al respecto, Galindo *et al.* (2005 y 2006) demostraron que los taninos condensados y los polifenoles totales, entre otros metabolitos, son capaces de reducir los protozoos, así como las saponinas. Abreu *et al.* (2003), Liu (2008) y Galindo *et al.* (2009) demostraron que la presencia de saponinas puede ejercer efectos similares, lo que contribuye a “lavar” del rumen estas poblaciones microbianas.

De los resultados que se obtuvieron, se puede concluir que la inclusión de *Tithonia diversifolia* redujo la población de protozoos y los metanógenos ruminales cuando se evalúa en condiciones *in vitro* a los niveles que se evaluó en esta investigación.

Agradecimientos

Los autores del trabajo desean agradecer a la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA) por el financiamiento de esta investigación en el marco del Proyecto No. 12667 “Utilización de un suplemento activador de la fermentación microbiana ruminal en el control de la metanogénesis ruminal.

Referencias

- Abreu, A., Carulla, J., Kreuzer, M., Lascano, C., Díaz, T.E., Cano, A. & Hess, H.D. 2003. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. Rev. Col. Cienc. Pec. 16:147
- Anderson, M.A. & Horn, G.M. 1987. Effect of Lasalocic in weight gain, ruminal fermentation and forage intake of stocker cattle grazing winter pasture. J. Anim. Sci. 65:865
- AOAC 1995. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Assoc. Off Anal. Chem. Arlington, V.A.
- Araque, C. 2003. Uso de la urea en la alimentación de rumiantes. Disponible: <<http://ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd50/urea.htm>> [Consultado: julio]
- Caldwell, D. R. & Bryant, M.P. 1966. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microbiol. 14:794
- De Luca, L. J. 2003. Urea: su utilización en rumiantes.

Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 45, Número 1, 2011.

- Disponble: <<http://www.ergomix.com/nuevo/prueba/areadeganaderialeche1.asp> valor=133>
- Duncan, D.E. 1955. Multiple range and multiple F. test. *Biometrics*. 11:1
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high-molasses urea diet. Thesis PhD. Aberdeen
- Galindo, J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje Tesis Dr. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba
- Galindo, J., García, C., Marrero, Y., Castillo, E., Aldana, A.I., Torres, V. & Sarduy, L. 2007. Efecto de la composición del pastizal de *Leucaena leucocephala* con gramíneas en la población microbiana ruminal de toros. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 41:145
- Galindo, J., González, N. & Delgado, D. 2009. Los árboles como controladores de los metanógenos y producción de metano en el rumen. II Taller Internacional Salud y Producción Animal, II Congreso cubano de Desarrollo Local. Granma, Cuba
- Galindo, J., Scull, I., Delgado, D., González, N., Marrero, Y., Febles, G., Ruiz, T., Sosa, A., Aldana, A. I., Moreira, O., Torres, V., Sarduy, L., Noda, A., Achang, G., Chongo, B. & Pedraza, R. 2006. Efecto de los metabolitos secundarios de árboles, arbustos y otras leguminosas como agentes defaunantes del rumen y su repercusión en el metabolismo energético de los rumiantes. Premio CITMA provincial. La Habana. Cuba
- Galindo, J., Sosa, A., González, N., Delgado, D., González, R., Aldana, A.I., Moreira, O., Cueto, M. & Cairo, J. 2005. Effect of ruminal fermentation activator on the on the population of protozoa, methanogenic and cellulolytic bacteria and fungi in the rumen. Informe OIEA
- García, D., Medina, M.G., Clavero, T., Humbría, J., Baldizán, A. & Domínguez, C. 2008b. Preferencia de árboles forrajeros por cabras en la zona baja de los andes Venezolanos. *Revista Científica ISSN 0798-2259*
- García, D.E., Medina, M.G., Cova, L., Soca, M., Pizzani, P., Baldizán, A. & Domínguez, C.E.. 2008a. Aceptabilidad de follaje de árboles tropicales por vacunos, ovinos y caprinos en el estado de Trujillo, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 26:191
- Gil, S.B. 2004. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo (feedlot). Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente. Disponible: <<http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/feedlot.htm>>
- Hegarty, R.S. 1999. Reducing rumen methne emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agr. Res.* 50:1321
- Hoover, W.H. & Stokes, S. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630
- Hungate, R.G. 1950. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacterial Ref.* Vol. 14 (1).
- Itabashi, H., Bayaru, E., Kanda, S., Nishida, T., Ando, S., Ishida, M., Itoh, T., Isobe, Y. & Nagara, K. 2000. Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility in cattle. The 3rd Joint Symposium of Japan and Korea on Rumen Metabolism and Physiology. 11, 72. Miyazaki, Japan
- Joblin K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 1119
- Joblin, K.N. 2004. Methanogenic Archaea. I Planning Meeting of Project Contract Research and Training Workshop "Development and Use of Rumen Molecular Techniques for Predicting and Enhancing Productivity", 19-30 April, 2004, Brisbane, Australia
- Johnson, D.E., Johnson, K.A., Ward, G.M. & Branine, M.E. 2000. Ruminants and other animals. Chapter 8. In: Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment. Ed. M.A.K. Khalil. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, p. 112
- Jouany, J.P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann. Zootech.* 43:49
- Ku Vera, J., Ramírez, C., Jiménez, G., Alayón, J. & Ramírez, L. 2000. Árboles y arbustos para la producción animal en el trópico mexicano. Conferencia electrónica. FAO. www.fao.org/wa Su 02 apr 18:37:08
- La O, O., Valenciaga, D., Chongo, B. & Ruiz, O. 2009. Efecto de la combinación de *Tithonia diversifolia* en la cinética y producción de gas *in vitro* de *Pennisetum purpureum* Cuba CT-115. Informe final de Proyecto CITMA - GEPROP.
- Liu, J. 2008. Effect of tea saponins on microbial flora in faunated and defaunated rumen fluids. The 6th Joint Symposium of China-Japan-Korea on Rumen Metabolism and Physiology
- Mahecha, L. & Rosales, M. 2006. Valor Nutricional del Follaje de Botón de Oro *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, en la Producción Animal en el Trópico. Conferencia Electrónica. Fundación CIPAV. Fecha de publicación 17-112006
- Rosales, M. 1996. *In vitro* assessment of the nutritive value of mixtures of leaves from tropical fodder trees. PhD Thesis. Departament of Plant Sciences, Oxford University, Oxford, UK. 214 pp.
- 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 ruminants feed. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 48:185
- Torres, V., Navarro, J.R. & Pérez, T. 2003. Modelos estadísticos para el procesamiento de experimentos con mediciones repetidas en la misma unidad experimental. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 37:227
- Visauta, B. 1998. Análisis estadístico con SPSS para Window. Estadística multivariada. Vol II. Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, S.A.V. p. 358.

Recibido: 12 de octubre de 2009