

Producción de metano *in vitro* en recursos forrajeros del trópico altoandino de Nariño

In vitro methane production in forage resources of the high Andean tropic of Nariño

Juan Leonardo Cardona-Iglesias* <https://orcid.org/0000-0001-5225-8108>, María Fernanda Urbano-Estrada <https://orcid.org/0000-0002-1304-098X>, Carolina Guatusmal-Gelpud <https://orcid.org/0000-0002-2304-7720>, Lina Marcela Ríos-Peña <https://orcid.org/0000-0002-7452-2317> y Edwin Castro-Rincón <https://orcid.org/0000-0001-9841-8242>

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia, Centro de Investigación Obonuco km 5 Vía Pasto, Obonuco, Nariño, Colombia. Correo electrónico: *jlcardonaa@agrosavia.co, carolinagg080@gmail.com, ecastro@agrosavia.co

Resumen

Objetivo: Evaluar la producción de metano *in vitro* en recursos forrajeros y sus mezclas, utilizados en la alimentación de bovinos en el trópico altoandino de Nariño, Colombia.

Materiales y Métodos: Se evaluaron tres arbustivas forrajeras, provenientes de un banco forrajero de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, *Sambucus nigra* L. y *Smilax pyramidalis* (Triana) H. Rob. (70 días de edad); dos gramíneas, *Cenchrus clandestinum* (Chiov.) y *Lolium perenne* L. (37 y 28 días), y cuatro mezclas de estas forrajeras y gramíneas. Se analizaron muestras representativas de los forrajes y sus mezclas, a las 24 y 48 horas de incubación, para evaluar la producción de metano, degradación de la materia seca y producción de ácidos grasos volátiles. La información se procesó mediante un análisis de variancia y por la prueba de comparación de medias Tukey.

Resultados: La concentración de metabolitos secundarios y taninos fue numéricamente mayor en la especie forrajera *S. nigra* (22,1 g/kg de MS) con respecto a la gramínea *C. clandestinus* (8,9 g/kg de MS). Los mayores porcentajes de degradación de MS ($p < 0,01$) se obtuvieron en *S. nigra* (70,6 %), *T. diversifolia* (70,2 %) y *L. perenne* (71,6 %). *C. clandestinus* (87,2 mL) registró la mayor producción de metano y *T. diversifolia*, la menor (34 mL CH₄/g de MS). En la mezcla de *L. perenne* + *S. nigra* se encontró la mayor degradación (78,3 %). La menor producción de metano fue para *C. clandestinus* + *S. nigra* ($p < 0,01$).

Conclusiones: Se encontró mayor concentración de metabolitos secundarios en las arbustivas forrajeras con respecto a las gramíneas. Cuando se incluyó 20 % de las forrajeras en las mezclas, disminuyó la producción de metano y aumentó la degradabilidad de los sustratos.

Palabras clave: efecto de invernadero, gases, metabolitos

Abstract

Objective: To evaluate the *in vitro* methane production in forage resources and their mixtures, used in cattle feeding in the high Andean tropic of Nariño, Colombia.

Materials and Methods: Three forage shrubs, from a forage bank of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, *Sambucus nigra* L. and *Smilax pyramidalis* (Triana) H. Rob. (70 days old); two grasses, *Cenchrus clandestinum* (Chiov.) and *Lolium perenne* L. (37 and 28 days), and four mixtures of these forage shrubs and grasses, were evaluated. Representative samples of the forages and their mixtures were analyzed, at 24 and 48 hours of incubation, to evaluate the methane production, dry matter degradation and production of volatile fatty acids. The information was processed through a variance analysis and by Tukey's mean comparison test.

Results: The concentration of secondary metabolites and tannins was numerically higher in the forage species *S. nigra* (22,1 g/kg DM) compared with the grass *C. clandestinus* (8,9 g/kg DM). The highest DM degradation percentages ($p < 0,01$) were obtained in *S. nigra* (70,6 %), *T. diversifolia* (70,2 %) and *L. perenne* (71,6 %). *C. clandestinus* (87,2 mL) recorded the highest methane production and *T. diversifolia*, the lowest one (34 mL CH₄/g DM). In the mixture of *L. perenne* + *S. nigra* the highest degradation was found (78,3 %). The lowest methane production was for *C. clandestinus* + *S. nigra* ($p < 0,01$).

Conclusions: Higher concentration of secondary metabolites was found in the forage shrubs with regards to the grasses. When 20 % of the forage species was included in the mixtures, methane production decreased and substrate degradability increased.

Keywords: greenhouse effect, gases, metabolites

Introducción

En los sistemas de producción de leche del trópico alto colombiano, la alimentación de los bovinos se

basa en gramíneas, como *Cenchrus clandestinus* (Chiov.) y *Lolium perenne* L. (Cardona-Iglesias *et al.*, 2020; Quiñonez-Chillambo *et al.*, 2020).

Recibido: 22 de diciembre de 2020

Aceptado: 04 de marzo de 2021

Como citar este artículo: Cardona-Iglesias, Juan Leonardo; Urbano-Estrada, María Fernanda; Guatusmal-Gelpud, Carolina; Ríos-Peña, Lina Marcela & Castro-Rincón, Edwin. Producción de metano *in vitro* en recursos forrajeros del trópico altoandino de Nariño. *Pastos y Forrajes*. 44:eE06, 2021.

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>. El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

Cardona-Iglesias *et al.* (2019a) plantearon que a las inadecuadas prácticas agronómicas y de pastoreo, y a las condiciones edafoclimáticas adversas que causa la llamada estacionalidad forrajera, la calidad nutricional de estas pasturas no es la apropiada, lo que ocasiona desbalances nutricionales en los animales y la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), como el metano (CH_4).

En el sector agropecuario de Colombia, 26 % de la producción de CH_4 se atribuye a la fermentación entérica del ganado bovino (Pulido-Guio *et al.*, 2015). Si se considera que en vacas lecheras en pastoreo se informan emisiones promedio de 55 kg de CH_4 /vaca/año, se podría predecir en Colombia una producción de hasta 181 207 kg de CH_4 /año, proveniente de las 3 294 676 vacas lecheras que hay en el país (Cardona-Iglesias *et al.*, 2017; DANE, 2019). Además del daño ambiental que puede ocasionar la acumulación del metano en la atmósfera, la formación de este gas en el rumen representa un gasto energético para el animal, que puede variar entre 15 y 18 % de la energía digestible consumida en la dieta (Cardona-Iglesias *et al.*, 2017; Sandoval-Pelcastre *et al.*, 2020).

Las estrategias nutricionales basadas en el mejoramiento de la calidad composicional y digestibilidad de la dieta son las que han demostrado mayor efectividad en la disminución de metano en los sistemas ganaderos (Pérez-Can, 2020; Sandoval-Pelcastre *et al.*, 2020).

Actualmente, en el trópico altoandino colombiano se posiciona para la alimentación de rumiantes el uso de especies arbustivas forrajeras perennes, como *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray, *Sambucus nigra* L. y *Smalanthus pyramidalis* (Triana) H. Rob. Su buen aporte de nutrientes, que mejora el balance de energía y proteína en el rumen; la presencia de metabolitos secundarios, como los taninos y saponinas; además de la disminución importante de la producción de metano mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*

(Cardona-Iglesias *et al.*, 2017; Quiñonez-Chillambo *et al.*, 2020) justifican su utilización con este fin.

A partir de lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la producción de metano *in vitro* en recursos forrajeros y sus mezclas, utilizados en la alimentación de bovinos en el trópico altoandino de Nariño, Colombia..

Materiales y Métodos

Localización. El estudio se desarrolló en el Centro de Investigación Obonuco, propiedad de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), ubicado en el corregimiento de Obonuco, municipio de Pasto (Nariño-Colombia), con coordenadas N 1°11'29,6" y W 77°18'47,9" y altura de 2 865 msnm.

Condiciones climáticas. La temperatura media es de 10 °C, la precipitación anual de 841,57 mm y la humedad relativa de 83 %, que corresponde a la zona de vida bosque seco montano bajo (Holdridge, 1966).

Diseño experimental y tratamientos. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial para los forrajes (cinco especies por dos horarios de evaluación, 24 y 48 h) como para las cuatro mezclas (dos horarios de evaluación, 24 y 48 h).

Los tratamientos fueron tres arbustivas forrajeras: *T. diversifolia*, *S. nigra*, y *S. pyramidalis*, a la edad de 70 días, cosechadas en un banco de forraje. También se evaluaron las gramíneas *C. clandestinus* y *L. perenne*; además de cuatro mezclas entre forrajeras y gramíneas (*C. clandestinus* 80 % + *S. nigra* 20 %, *C. clandestinus* 80 % + *T. diversifolia* 20 %, *L. perenne* 80 % + *S. nigra* 20 % y *L. perenne* 80 % + *T. diversifolia* 20 %).

Los porcentajes de inclusión de las forrajeras se determinaron de acuerdo con un estudio de caracterización de sistemas de alimentación, llevado a cabo en la zona por Agrosavia (datos no publicados). En la tabla 1 se relacionan las características de los recursos forrajeros evaluados.

Tabla 1. Recursos forrajeros del trópico alto evaluados.

Recurso forrajero	Categoría	Edad de cosecha, días
<i>T. diversifolia</i>	Arbustiva forrajera perenne	70
<i>S. nigra</i>		
<i>S. pyramidalis</i>		
<i>C. clandestinus</i>	Gramínea	37
<i>L. perenne</i>		28
<i>C. clandestinus</i> (80 %) + <i>S. nigra</i> (20 %)	Mezclas gramínea + forrajera perenne	Gramínea, 37 + arbustiva, 70
<i>C. clandestinus</i> (80 %) + <i>T. diversifolia</i> (20 %)		
<i>L. perenne</i> (80 %) + <i>S. nigra</i> (20 %)		Gramínea, 28 + arbustiva, 70
<i>L. perenne</i> (80 %) + <i>T. diversifolia</i> (20 %)		

Recolección de los forrajes. Las muestras de forrajes se recolectaron una sola vez, en diciembre de 2019. Las arbustivas forrajeras procedían de un sistema silvopastoril (en banco forrajero). Se cosechó la parte consumible por los animales (hojas y tallos tiernos) y las gramíneas se recolectaron en potreros de 1,5 ha (monocultivo). Mediante la inspección visual se cosechó lo consumible por el animal (Ramírez *et al.*, 2015).

Composición química de los forrajes. Para cada una de las arbustivas forrajeras, como para las gramíneas, se obtuvo una muestra de 500 g de forraje fresco, que se secó en una estufa de ventilación forzada a 65 °C durante 72 h y se analizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Centro de Investigación Tibaitatá (Agrosavia) en la ciudad de Mosquera (Cundinamarca). Mediante la técnica de espectroscopía de reflectancia en infrarrojo cercano (NIRS) (Ariza-Nieto *et al.*, 2018) se determinó la proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), carbohidratos no estructurales (CNE), energía neta de lactancia (ENL), taninos totales (TT), taninos condensados (TC) y saponinas (Sap.).

Producción de metano. Se utilizó la técnica de producción *in vitro* (Mauricio *et al.*, 1999) en el Laboratorio de Investigación y Nutrición Animal (NUTRILAB), ubicado en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, a 1 540 msnm. La incubación se realizó en frascos de vidrio, con capacidad para 100 mL. En cada frasco se adicionó 0,5 g de sustrato seco y molido a 1 mm, y 45 mL de saliva artificial. Se utilizó una relación saliva artificial / inóculo ruminal de 9/1 (45/5 mL/mL). Los frascos con la saliva artificial permanecieron en estufa de ventilación forzada a 39 °C durante 6 h, antes de la inoculación con el fluido ruminal. El líquido ruminal se obtuvo de tres vacas Holstein con fístula, que consumían pasto *C. clandestinus*, sal mineralizada y agua a voluntad. En el laboratorio, los inóculos se filtraron mediante un paño de algodón, se gasearon con CO₂ y se conservaron en baño María durante el proceso de inoculación.

Se inocularon 156 frascos en total, 144 (12 sustratos x 3 repeticiones/ tratamiento (inóculos) y 2 horarios de lectura x 2 réplicas por horario) y 12 correspondientes a los blancos (2 horarios x 3 inóculos x 2 blancos por horario). Los frascos contenían solución tampón e inóculo, pero sin sustrato, con la función de corregir la producción de gas generada por los microorganismos ruminales. La presión ori-

ginada por los gases producto de la fermentación, medida en libras por pulgada cuadrada (PSI), se cuantificó con un transductor digital, a las 24 y 48 h de incubación, según lo descrito por Theodorou *et al.* (1994). Para transformar los datos de presión (PSI) (x) en volumen de gas (mL), se utilizó la ecuación $Y = -0,1375 + (5,1385X + 0,0777X^2)$, obtenida por Posada *et al.* (2006). La producción de gas se expresó como gramo de materia seca degradada (MSd).

Degradación *in vitro* de la materia seca. Esta determinación, expresada en porcentaje, se realizó a las 24 y 48 h. Al finalizar la incubación, el contenido de los frascos se filtró con crisoles de peso conocido y se utilizó una bomba de vacío. El residuo resultante se secó en un horno durante 48 h a 65 °C, después se pesó y se usó para calcular por gravimetría la degradabilidad de la MS (García-González *et al.*, 2008).

Determinación del perfil de la fermentación. La concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), acético, propiónico y butírico, se determinó en el líquido resultante de la filtración de los crisoles, a las 24 y 48 h de incubación. Este líquido se preservó mediante la adición de ácido sulfúrico (98 % v/v) hasta alcanzar pH de 2 aproximadamente, y después se centrifugó repetidas veces a 4 000 rpm hasta que no hubo presencia de precipitado (Ramírez *et al.*, 2015). Para la determinación de AGV, las muestras de 1 µL de líquido se inyectaron en un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC Ultra, equipado con un detector FID y una columna de 30 m; 0,32 mm y 0,25 µm. La concentración de AGV (mmol/L) se calculó a partir de la concentración (ppm) determinada por cromatografía. Se asumió una masa molar de 60,05; 74,08 y 88,11 g/mol para el ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente.

Análisis estadístico de la información. Los datos de la degradabilidad, la producción de metano y la concentración de AGV se analizaron mediante un análisis de varianza a través del programa estadístico R. V.3.5.1., acompañado de una prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,01$) para aquellas variables que presentaron diferencias estadísticas.

Resultados y Discusión

Composición química. En la tabla 2 se muestra la caracterización bromatológica de los recursos forrajeros. Las especies arbustivas forrajeras presentaron mayor cantidad de PB, CNE, y ENL y menor FDN y FDA, respecto a las gramíneas. Esto coincide con trabajos de Londoño *et al.* (2019),

Tabla 2. Composición química de cinco especies forrajeras del trópico altoandino de Nariño.

Especie	MS, %	PB, %	FDN, %	FDA, %	CNE, %	ENL, Mcal/kg de MS	TT, g/kg de MS	TC, g/kg MS	Sap, g/kg de MS
<i>T. diversifolia</i>	14,0	17,5	46,7	23,6	13,7	1,4	16,0	2,0	10,8
<i>S. nigra</i>	17,5	23,6	45,9	24,8	13,9	1,5	22,1	4,1	17,1
<i>S. pyramidales</i>	12,8	17,9	43,2	21,3	17,3	1,4	12,8	2,4	13,8
<i>C. clandestinus</i>	15,8	19,4	57,7	34,4	7,0	1,3	8,9	1,2	12,3
<i>L. perenne</i>	15,0	18,3	55,7	32,9	13,3	1,4	6,9	1,2	7,4

MS materia seca, PB proteína bruta, FDN fibra detergente neutro, FDA fibra detergente ácido, CNE carbohidratos no estructurales, ENL energía neta de lactancia, TT taninos totales, TC taninos condensados, Sap saponinas.

Cardona-Iglesias *et al.* (2019a; 2019b), donde se encontraron mayores valores en estas fracciones en arbustivas forrajeras con respecto al kikuyo (*Pennisetum clandestinum*; Hochst. ex Chiov.) y ryegrases (*L. perenne*). Si se tiene en cuenta que en este trabajo la FDN y FDA fueron menores en las arbustivas con relación a las gramíneas, se podría esperar en este tipo de especies mayor contenido de componentes intracelulares y alto contenido de hemicelulosa, carbohidrato de mayor solubilidad y fuente energética fácilmente aprovechable en rumiantes (Portillo-López *et al.*, 2019).

En este estudio, para *T. diversifolia*, a los 70 días, se obtuvo 17,5 % de PB, que coincide con lo informado por Lezcano *et al.* (2012) en *Megathyrsus maximus* (Jacqs.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs (guinea), a una edad similar. Para *S. nigra* se registró 23,0 % de PB, lo que coincide con lo referido por Guatusmal-Gelpud *et al.* (2020), quienes a los 60 días obtuvieron 26,0 % de PB. Esto se puede deber a que las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrollaron ambos trabajos fueron similares, así como la edad de corte.

Con respecto a los CNE de *T. diversifolia*, se alcanzaron contenidos hasta de 33 % en la época de prefloración (Ferreira, 2015), superiores a los que aportó *C. clandestinus*. Vargas-Martínez *et al.* (2018) reportaron para esta especie un contenido de CNE similar al del presente estudio. Estos autores señalan que la relación inadecuada entre la concentración de carbohidratos no estructurales y de proteína en *C. clandestinus* limita la calidad nutricional de este recurso por sí solo.

Los resultados en las gramíneas coinciden con lo informado en varias investigaciones de Cardona-Iglesias *et al.* (2017) y de Arce-Ramírez *et al.* (2020), quienes señalan a una edad de 33-35 días de corte de *C. clandestinus* y *L. perenne*, PB promedio de 20 % y un comportamiento similar de FDN (superior a 50 %) y FDA (cercano a 30 %).

En cuanto a la ENL, para *L. perenne*, Castro-Rincón *et al.* (2019) encontraron como promedio 1,4 Mcal/kg de MS a los 35 días en varias localidades de Nariño, valor similar al de este estudio (1,38 Mcal/kg), pero a los 28 días. Urbano-Estrada *et al.* (2020) informan para *C. clandestinus* 1,15 Mcal/kg de MS de ENL como promedio, cifras por debajo de lo referido para las arbustivas forrajeras. Los contenidos de FDN y FDA para *C. clandestinus* y *L. perenne* fueron de 57,71 y 34,4 %; 55,7 y 32,9 % respectivamente, similares a los obtenidos por Vargas-Martínez *et al.* (2018).

Según Vargas-Martínez *et al.* (2018), Cardona-Iglesias *et al.* (2019b) y Castro-Rincón *et al.* (2019) son precisamente los valores altos de fibra los que limitan la calidad nutricional y el consumo de gramíneas en el trópico alto.

En cuanto a los taninos totales, taninos concentrados y saponinas, las arbustivas presentaron mayor cantidad de estos metabolitos en comparación con las gramíneas (tabla 2). La presencia de estos compuestos en las plantas forrajeras permite manipular la ecología microbiana ruminal y, por lo tanto, reducir la producción de metano (Cardona-Iglesias *et al.*, 2017).

En estudios de Fasuyi y Ibitayom (2011) se informa en *T. diversifolia* 2,09 mg de taninos y 2,76 mg de saponinas. En tanto, Cardona-Iglesias *et al.* (2017) encontraron 1,4 g de taninos y 4,53 g de saponinas (kg/MS). Carvajal *et al.* (2012) registraron para *S. nigra* contenido de taninos totales de 0,08 mg y 0,6 mg/kg de TC (Cárdenas *et al.*, 2016). Para la especie *S. pyramidalis* son aún escasos los trabajos de caracterización de metabolitos secundarios. Sin embargo, Apráez-Gerrero y Galvéz-Cerón (2019) refieren ausencia de taninos y saponinas para dicha especie, contrario a lo hallado en esta investigación.

En la tabla 3 se muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre los recursos forrajeros evaluados para la producción de metano,

Tabla 3. Producción de metano, degradabilidad de la materia seca y ácidos grasos volátiles en cinco especies forrajeras.

Especie	Tiempo de incubación, h	Degradación MS, %	CH ₄ /g/mL MSD	Acético, Mmol/L	Propiónico, Mmol/L	Butírico, Mmol/L
<i>C. clandestinus</i>	24	40,6e	40,9d	80,9e	33,5de	12,2c
	48	59,9b	87,2a	98,8bcd	42,9bcd	13,5abc
<i>L. perenne</i>	24	47,3cd	28,5f	80,0e	39,6cde	13,5abc
	48	71,6a	74,2b	128, a	59,5a	16,6a
<i>T. diversifolia</i>	24	48,5c	21,2g	76,e	33,9de	11,9c
	48	70,2a	34,0e	97,9bcd	33,6de	11,7c
<i>S. nigra</i>	24	57,8b	22,3g	85,1de	32,3e	13,1bc
	48	70,6a	46,9c	111,2b	41,2bdce	16,2ab
<i>S. pyramidales</i>	24	44,2de	24,6fg	99,9bc	47,1bc	13,0bc
	48	50,7 c	41,2d	112,b	50,2ab	12,6 c
EE ±		0,61	0,67	2,40	0,58	0,57
Valor - P		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0102

CH₄: metano, MSD: materia seca degradada, Mmol milimol, EE: error estándar de la media
Medias con letras diferentes en las columnas difieren entre sí, según la prueba de Tukey (p < 0,01)

la degradación de MS y los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, y butírico).

L. perenne y *S. nigra* presentaron los valores más altos de degradación (71,6 y 70,6 %; respectivamente). Castro-Hernández *et al.* (2017) encontraron resultados de hasta 71,0 % de degradación en *L. perenne* cosechado a los 28 días, valor que relacionaron con mayor eficiencia en la síntesis de proteína microbiana en el rumen. Mientras, García-Morcote y Ortegón-Espejo (2014) refirieron para *S. nigra* 82,5 % de degradación a las 48 h de incubación, valor superior al de este estudio. Con relación a esto, Jaramillo-Benavides (2019) señala que el forraje de *S. nigra* se destaca por la alta degradación *in vitro* de la MS y su calidad nutricional.

La producción de metano fue menor en las arbustivas forrajeras en comparación con las gramíneas (p < 0,01). *T. diversifolia* alcanzó, como promedio, 34,0 mL/g de MS/día, y le siguieron *S. pyramidalis* (41,2) y *S. nigra* (46,9 mL/g de MS/día). En tanto, *C. clandestinus* presentó el valor más alto de producción de metano (87,22 mL/gMSd), y le siguió *L. perenne* (74,2 mL/g de MS/día).

Los resultados aquí obtenidos se corresponden con lo informado en una investigación de Cardona-Iglesias *et al.* (2017), donde se informó mayor producción de metano en *C. clandestinus* y menores concentraciones en *T. diversifolia*. El contenido de metano en *C. clandestinus* y *L. perenne* fue superior a lo reportado por Restrepo (2016) quien indicó valores de 35,9 y 35,8 mL/g de MS/día, a los 37 y 30 días de corte, respectivamente. En un estudio de Marín *et al.* (2014) se encontraron para *C. clandestinus*

producciones de metano que variaron entre 109,7 y 204,1 mL/gMSd, valores que difirieron en dependencia de las zonas donde se llevó a cabo el estudio. Para *Lolium* sp se han informado valores de metano de hasta 329 mL/g de MS/día (Tabla-Rojas, 2019).

Para *T. diversifolia*, Pérez-Can *et al.* (2020) reportaron producción de metano de 20,17 mL/g de MS/día, mientras que Cardona-Iglesias *et al.* (2017), a los 70 días de corte, informaron valores de 19,3 mL/g de MS/día, también a las 48 h de incubación. Rivera *et al.* (2011) observaron baja producción de este gas en los forrajes *S. nigra* y *T. diversifolia* en comparación con otros forrajes.

Benaouda *et al.* (2017) señalan que el empleo de forrajeras como *T. diversifolia* puede influir en la disminución de la producción de metano a nivel ruminal, y que esta acción depende de la especie, edad de la planta y contenido de metabolitos secundarios. Al respecto, algunos autores sostienen que este potencial en la disminución de las emisiones de metano se debe a que estas modifican la fermentación ruminal y la población de metanógenos y protozoarios (Galindo *et al.*, 2014).

En general, el presente estudio evidenció que las arbustivas forrajeras presentan menor producción de metano en comparación con las gramíneas evaluadas, resultados que pueden estar asociados al mayor contenido de metabolitos secundarios, como los taninos y saponinas.

Según refieren Bayat y Shingfield (2012), Cardona-Iglesias *et al.* (2017) y Galindo-Blanco *et al.* (2018), los metabolitos secundarios inhiben la metanogénesis a través de determinados mecanismos,

como la disminución de la formación de hidrógeno en el rumen, la inhibición de enzimas funcionales en los metanógenos y la reducción en la población de protozoarios. Por ello, los recursos forrajeros con presencia de metabolitos secundarios tienen potencial para disminuir el metano entérico (Pérez-Can, 2019).

En este estudio, la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) fue mayor a las 48 h de incubación con respecto al horario de 24 h. Esto se puede deber, según señalan Ramírez *et al.* (2015), a que en la técnica *in vitro* de producción de gases no existe remoción de AGV vía absorción, por lo que su concentración depende de la tasa de fermentación y se puede incrementar gradualmente.

La proporción molar de ácido acético fue mayor en todas las especies en comparación con la fracción propiónica y butírica, resultado que se explica debido a que las especies evaluadas constituyen fuentes de origen forrajero con contenidos de fibra de moderados a altos. Con respecto ello, Cardona-Iglesias *et al.* (2017) señalan que el perfil de AGV se modifica de acuerdo con la calidad composicional del sustrato, siendo mayor en los forrajes la fermentación tipo acética.

En un estudio realizado por Vélez-Ruiz *et al.* (2017) también se informó mayor fermentación acética y menor propiónica y butírica, para *L. perenne* y *C. clandestinus*. El contenido de ácido acético fue mayor en *L. perenne* (117,2 mmol/L) en comparación con el resto de los forrajes.

En lo que respecta a la producción de ácido propiónico, fue mayor ($p < 0,01$) para *L. perenne* (59,5 mmol/L), valor que supera el registrado por Vélez-Ruiz *et al.* (2017). Según señalan Cardona *et al.* (2017) y Castro-Rincón *et al.* (2019), la fermentación propiónica está relacionada, generalmente, con la edad y el contenido de azúcares en la planta.

En las figuras 1 y 2 se muestran los resultados de degradación de la MS y producción de metano *in vitro*, al mezclar *T. diversifolia* y *S. nigra* con las dos gramíneas.

En cuanto a la degradación de MS (fig. 1), los resultados indicaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las mezclas de forrajes. Los mayores valores se registraron a las 48 h de incubación. Hubo mayor porcentaje de degradación en las mezclas de *S. nigra* (78,9 %) y *L. perenne* (78,3 %) con *C. clandestinus*. El menor porcentaje de degradación (65,0 %) correspondió a la mezcla *C. clandestinus* + *T. diversifolia*.

Generalmente, se registró menor degradación de la MS en las gramíneas, cuando se analizaron por separado (tabla 3). En cambio, esta fracción aumentó al mezclarlas con 20 % de las arbustivas forrajeras. En este estudio, la degradabilidad superó lo encontrado para la mezcla *T. diversifolia* (5 %) con *C. clandestinus* (95 %), reportada por Cardona-Iglesias *et al.* (2017) los cuales presentaron una degradabilidad (48 h) del 61,1 y 60,1 % para *T. diversifolia* y *C. clandestinus*, respectivamente.

La degradabilidad de la MS está asociada a la especie, estado fenológico y composición nutricional

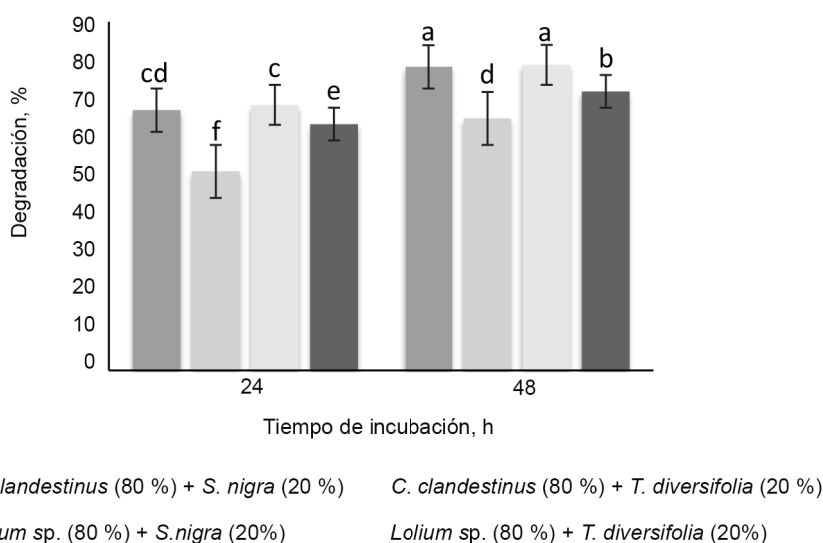


Figura 1. Porcentaje de degradación de la MS de cuatro mezclas forrajeras. Barras verticales representan intervalos de confianza de 95 % y letras diferentes muestran diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,01$).

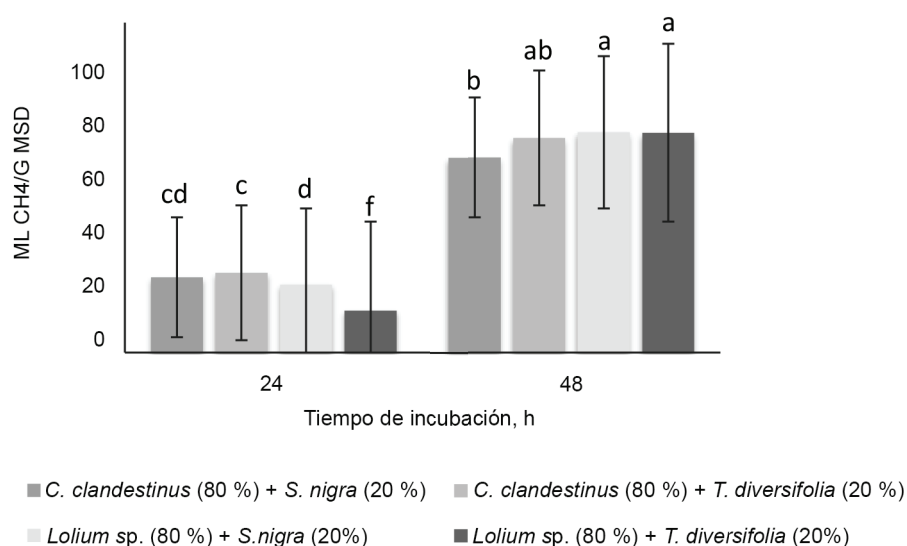


Figura 2. Producción de metano *in vitro* de cuatro mezclas
Barras verticales representan intervalos de confianza de 95 % y letras diferentes muestran diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,01$)

de la planta. Generalmente, una mayor degradabilidad en la dieta aumenta el consumo de forraje (Cardona-Iglesias *et al.*, 2019b; Argüello-Rangel *et al.*, 2020). Un factor que incide en la degradabilidad ruminal es el contenido de FDN y FDA de la ración (Castro-Rincón *et al.*, 2019). En este trabajo, las gramíneas presentaron mayores contenidos de fibra que las arbustivas (tabla 2). Sin embargo, al añadirse *S. nigra*, la degradabilidad total de la mezcla aumentó hasta 18,4 y 7,2 % para las mezclas con *C. clandestinus* y *L. perenne*, respectivamente.

En un estudio realizado por Tabla-Rojas (2019) se reportó menor degradabilidad de la MS en *S. nigra* en comparación con especies de gramíneas como *L. perenne*. Esta respuesta se atribuye al estado fisiológico de la planta, ya que se evaluó en prefloración y floración. Según el autor, en estas etapas aumentan los carbohidratos estructurales, a expensas de la degradabilidad y el aprovechamiento de los nutrientes por parte del animal.

La producción de metano a las 48 h fue menor ($p < 0,01$) para la mezcla *C. clandestinus* + *S. nigra* (66,3 mL/g de MS/día), y mayor para *L. perenne* (80 %) + *S. nigra* (20 %) y *L. perenne* (80 %) + *T. diversifolia* (20 %), con 74,8 y 74,0 mL/g de MS/día, respectivamente. Autores como Quiñonez-Chillambo *et al.* (2020) argumentan que *C. clandestinus* tiene mayor concentración de metabolitos secundarios con relación a *L. perenne*, y en mezcla con arbustivas taníferas se podría esperar menor

producción de metano, con respecto a las mezclas con *L. perenne*. Contrario a lo anterior, Vélez-Ruiz *et al.* (2017) afirman que *C. clandestinus* produce hasta 14,3 % más de metano que *L. perenne*, debido a que presenta mayor proporción de celulosa y lignina por ser una especie C4, lo que coincide con lo registrado en este trabajo (tabla 3).

La mezcla de *L. perenne* más *S. nigra* tuvo mayor producción de metano a las 48 h (74,7 mL/g de MS/día) con respecto a la mezcla de *C. clandestinus* y *S. nigra* (66,3 mL/g de MS/día). Lo anterior se podría deber a una mejor respuesta de *C. clandestinus* en la disminución de metano, cuando se mezcló con especies que contienen metabolitos secundarios como *S. nigra*. También se puede explicar porque la concentración de taninos en *C. clandestinus* fue mayor que en *L. perenne*, y por el balance nutricional que proporciona la mezcla con forrajeras perennes, ya que se mejora la eficiencia nutricional y disminuyen las pérdidas energéticas en la síntesis de metano (Carro-Travieso *et al.*, 2019; Pérez-Can, 2019).

Conclusiones

Se encontró mayor concentración de metabolitos secundarios en las arbustivas forrajeras con respecto a las gramíneas. Cuando se incluyó 20 % de las forrajeras en estas mezclas, disminuyó la producción de metano, y aumentó la degradabilidad de los sustratos.

Es necesario continuar la evaluación de la dinámica e interacción ruminal entre los diferentes

componentes nutricionales para establecer los mejores porcentajes de inclusión de arbustivas forrajeras en dietas basadas en gramíneas, como estrategia para mejorar la calidad nutricional y disminuir las emisiones de metano en los sistemas ganaderos del trópico alto colombiano.

Agradecimientos

Se agradece al Convenio Especial de Cooperación de Ciencia Tecnología e Innovación (No. 882-2015) entre el Departamento de Nariño y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia por financiar esta investigación con recursos del Sistema General de Regalías SGR, asignados al Departamento de Nariño, y propios de AGROSAVIA. También se agradece a Martín Valenzuela-Chirán por su colaboración en la toma de datos en campo.

Contribución de los autores

- Juan Leonardo Cardona-Iglesias. Ideó la investigación y su metodología, así como participó en el procesamiento de los datos, la redacción y la revisión final del manuscrito..
- María Fernanda Urbano-Estrada. Realizó la investigación, el procesamiento de los datos y la redacción del borrador original.
- Edwin Castro-Rincón. Supervisó la investigación, la redacción y la revisión final del manuscrito.
- Carolina Guatusmal-Gelpud. Realizó la investigación, participó en la búsqueda de bibliografía y en la redacción del borrador original.
- Lina Marcela Ríos-Peña. Realizó la investigación, participó en la búsqueda de bibliografía y en la redacción del borrador original.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

Referencias bibliográficas

- Apráez-Guerrero, J. E. & Gálvez-Cerón, A. L. *Alternativas alimentarias para la producción pecuaria del trópico alto de Nariño*. San Juan de Pasto, Colombia: Universidad de Nariño. <http://sired.udenar.edu.co/6115/1/alternativas%20alimentarias.pdf>, 2019.
- Arce-Ramírez, W.; Rojas-Bourrillon, A. & Campos-Granados, C. M. Determinación del contenido energético de materiales forrajeros a través de la relación entre la técnica de producción de gas *in vitro* y la ecuación mecanicista del NRC (2001). *Nut. Anim. Trop.* 14 (1):13-35, 2020. DOI: <https://doi.org/10.15517/nat.v14i1.41475>.
- Argüello-Rangel, Jeraldyn; Mahecha-Ledesma, Liliana & Angulo-Arizala, J. Perfil nutricional y productivo de especies arbustivas en trópico bajo, Antioquia (Colombia). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 21 (3):1-20, 2020. DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art1700.
- Ariza-Nieto, C.; Mayorga, O. L.; Mojica, B.; Parra, D. & Afanador-Téllez, G. Use of LOCAL algorithm with near infrared spectroscopy in forage resources for grazing systems in Colombia. *J. Near Infrared Spectrosc.* 26 (1):44-52, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/0967033517746900>.
- Bayat, Alireza & Shingfield, K. J. Overview of nutritional strategies to lower enteric methane emissions in ruminants. *Suomen Maataloustieteellisen Seuran Tiedote*. 28:1-7, 2012. DOI: <https://doi.org/10.33354/smst.75433>.
- Benaouda, M.; González-Ronquillo, M.; Molina, Luisa T. & Castelán-Ortega, O. A. Estado de la investigación sobre emisiones de metano entérico y estrategias de mitigación en América Latina. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 8 (4):965-974. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263152088015>, 2017.
- Cárdenas, C. A.; Rocha, Cristina & Castañeda, R. D. Efecto de la edad de corte sobre las medidas morfométricas, la composición bromatológica y el fraccionamiento de la proteína del sauco (*Sambucus nigra*). *Agron. Costarricense*. 40 (2):107-116, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.15517/rac.v40i2.27390>.
- Cardona-Iglesias, J. L.; Mahecha-Ledesma, Liliana & Angulo-Arizala, J. Efecto sobre la fermentación *in vitro* de mezclas de *Tithonia diversifolia*, *Cenchrus clandestinum* y grasas poliinsaturadas. *Agron. Mesoam.* 28 (2):405-426, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.15517/ma.v28i2.25697>.
- Cardona-Iglesias, J. L.; Mahecha-Ledesma, Liliana & Angulo-Arizala, J. Methane estimation in cows grazing silvopastoral systems with *Tithonia diversifolia* and supplemented with polyunsaturated fats. *Rev. Cient., FVC-LUZ*. 29 (2):107-118. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/29593>, 2019a.
- Cardona-Iglesias, J. L.; Rincón-Castro, E.; Valenzuela-Chirán, M.; Hernández-Oviedo, F. & Avellaneda-Avellaneda, Y. Efecto del ensilaje de avena sobre la productividad de vacas lactantes en Nariño-Colombia. *Rev. Cient., FVC-LUZ*. 29 (3):165-177. <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/46700>, 2019b.
- Cardona-Iglesias, J. L.; Urbano-Estrada, María F. & Castro-Rincón, E. Evaluación de sólidos solubles en recursos forrajeros del trópico alto en el departamento de Nariño. *Rev. CES Med. Zootec.* 15 (2):8-22, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21615/cesmvz.15.2.1>.
- Carro-Travieso, María D.; Evan, T. de & González-Cano, J. Emisiones de metano en los animales rumiantes:

- influencia de la dieta. *Albéitar*. 220:32-35. https://issuu.com/editorialservet/docs/albeitar_220_mr, 2018.
- Carvajal, Teresa; Lamela, L. & Cuesta, Aurora. Evaluación de las arbóreas *Sambucus nigra* y *Acacia decurrens* como suplemento para vacas lecheras en la sabana de Bogotá, Colombia. *Pastos y Forrajes*. 35 (4):417-430. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v35n4/pyf07412.pdf>, 2012.
- Castro-Hernández, H.; Domínguez-Vara, I. A.; Morales-Almaráz, E. & Huerta-Bravo, M. Composición química, contenido mineral y digestibilidad *in vitro* de raigrás (*Lolium perenne*) según intervalo de corte y época de crecimiento. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8 (2):201-210, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i2.4445>.
- Castro-Rincón, E.; Cardona-Iglesias, J. L.; Hernández-Oviedo, F.; Valenzuela-Chiran, M. & Avellaneda-Avellaneda, Y. Evaluación de tres cultivares de *Lolium perenne* L. con vacas lecheras, en el trópico alto de Nariño-Colombia. *Pastos y Forrajes*. 42 (2):161-170. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942019000200161&lng=es&tlng=es, 2019.
- DANE. *Encuesta nacional agropecuaria, serie histórica por departamento pecuaria (2012-II semestre 2019)*. Bogotá: Departamento Administrativo Nacional de Estadística. <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuaria/encuesta-nacional-agropecuaria-ena>, 2019.
- Fasuyi, A. O. & Ibitayom, F. J. Preliminary analyses and amino acid profile of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) leaves. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5 (1):164-170, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v5i1.68094>.
- Ferreira, L. H. *Produtividade e valor nutricional da Tithonia diversifolia para ruminantes*. Tesis MSc. Minas Gerais, Brasil: Universidade Federal de São João del-Rei, 2015.
- Galindo, Juana; González, Niurca; Marrero, Yoandra; Sosa, Areadne; Ruiz, T.; Febles, G.; Torres, Verena *et al.* Effect of tropical plant foliage on the control of methane production and *in vitro* ruminal protozoa population. *Cuban J. Agric. Sci.* 48 (4):359-364. <https://ejscience.com/index.php/CJAS/article/view/564>, 2014.
- Galindo-Blanco, Juana L.; Rodríguez-García, Idalmis; González-Ibarra, Niurca; García-López, R. & Herrera-Villafranca, Magaly. Sistema silvopastoril con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray: efecto en la población microbiana ruminal de vacas. *Pastos y Forrajes*. 41 (4):273-280. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v41n4/pyf06418.pdf>, 2018.
- García-González, R.; López, S.; Fernández, M. & González, J. S. Dose-response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145 (1-4):319-334, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.040>.
- García-Morcote, Diana P. & Ortégón-Espejo, N. P. *Producción de biomasa y calidad nutricional de la asociación pasto kikuyo (Pennisetum clandestinum) y sauco (Sambucus nigra) en el trópico alto*. Trabajo de grado para optar al título de Zootecnista. Bogotá: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de la Salle, 2014.
- Guatusmal-Gelpud, Carolina; Escobar-Pachajo, Laura D.; Meneses-Buitrago, D. H.; Cardona-Iglesias, J. L. & Castro-Rincón, E. Producción y calidad de *Tithonia diversifolia* y *Sambucus nigra* en trópico altoandino colombiano. *Agro. Mesoam.* 31 (1):193-208, 2020. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.36677>.
- Holdridge, L. R. *Life zone ecology*. San José, Costa Rica: Tropical Science Center. http://reddcr.go.cr/sites/default/files/centro-de-documentacion/holdridge_1966_-_life_zone_ecology.pdf, 1966.
- Jaramillo-Benavides, A. H. *Evaluación de dos especies arbóreas: sauco (Sambucus nigra) y acacia (Acacia decurrens) en la alimentación animal*. Mosquera, Colombia: SENA, Centro de Biotecnología Agropecuaria, 2019.
- Lezcano, Yohanka; Soca, Mildrey; Ojeda, F.; Roque, E.; Fontes, Dayamí; Montejo, I. L. *et al.* Caracterización bromatológica de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en dos etapas de su ciclo fisiológico. *Pastos y Forrajes*. 35 (3):275-282. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v35n3/pyf03312.pdf>, 2012.
- Londoño, J.; Mahecha, Liliana & Angulo, J. Desempeño agronómico y valor nutritivo de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray para la alimentación de bovinos. *RECIA*. 11 (1):28-41, 2019. DOI: <https://doi.org/10.24188/recia.v0.n0.2019.693>.
- Marín, Alejandra; Giraldo, L. A. & Correa, G. Parámetros de fermentación ruminal *in vitro* del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *LRRD*. 26 (3). <http://www.lrrd.org/lrrd26/3/mari26057.html>, 2014.
- Mauricio, R. M.; Mould, F. L.; Dhanoa, M. S.; Owen, E.; Channa, K. S. & Theodorou, M. K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79 (4):321-330, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4).
- Pérez-Can, Génesis E. *Potencial nutritivo del forraje de arbóreas y arbustivas: cinética de fermentación in vitro y producción de metano*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical. Conkal, México: Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Conkal, 2019.

- Pérez-Can, Genesis E.; Tzec-Gamboa, Magnolia; Albores-Moreno, S.; Sanginés-García, J.; Aguilar-Urquiza, E.; Chay-Canul, A. *et al.* Degradabilidad y producción de metano *in vitro* del follaje de árboles y arbustos con potencial en la nutrición de rumiantes. *Acta Universitaria*. 30:e2840, 2020. DOI: <https://doi.org/10.15174/au.2020.2840>.
- Portillo-López, Paola A.; Meneses-Buitrago, D. H.; Morales-Montero, Sonia P.; Cadena-Guerrero, Máryory M. & Castro-Rincón, E. Evaluación y selección de especies forrajeras de gramíneas y leguminosas en Nariño, Colombia. *Pastos y Forrajes*. 42 (2):93-103. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v42n2/2078-8452-pyf-42-02-93.pdf>, 2019.
- Posada, Sandra L.; Noguera, R. & Bolívar, Diana. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pecu.* 19 (4):407-414. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v19n4/v19n4a06.pdf>, 2006.
- Pulido-Guio, Ana D.; Rodríguez-Jiménez, R.; Turriago, D. & Mendoza, J. *Inventario nacional de gases de efecto invernadero (GEI) Colombia. Tercera Comunicación Nacional de Cambio Climático*. Bogotá: IDEAM, PNUD, MADS, DNP, FMAM, 2015.
- Quiñonez-Chillambo, J. D.; Cardona-Iglesias, J. L. & Castro-Rincón, E. Ensilaje de arbustivas forrajeras para sistemas de alimentación ganadera del trópico altoandino. *Rev. investig. Altoandín*. 22 (3):285-301, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.662>.
- Ramírez, J. F.; Posada-Ochoa, Sandra & Rosario-Noguera, R. Effect of lovastatin on *in vitro* methane production and dry matter digestibility of kikuyu grass (*Cenchrus clandestinus*). *CES Med. Vet. Zootec.* 10 (2):111-121. <http://www.scielo.org.co/pdf/cmzv/v10n2/v10n2a03.pdf>, 2015.
- Restrepo, C. *Evaluación de diversas estrategias nutricionales para mitigar las emisiones de metano en ganadería de leche especializada*. Tesis para optar por el título de Magister en Ciencias Animales. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia, 2016.
- Rivera, J. E.; Naranjo, J. F.; Cuartas-Cardona, C. A.; Arenas, F.; Murgueitio, E. & Mauricio, R. M. Evaluación nutricional de algunos forrajes arbustivos y dietas ofrecidas en lecherías de trópico de altura en Colombia con el empleo de la técnica *in vitro* de producción de gas. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 24 (3):521. http://www.researchgate.net/publication/279442950_Evaluacion_nutricional_de_algunos_forrajes_arbustivos_y_dietas_ofrecidas_en_lecherias_de_tropico_de_altura_en_Colombia_con_el_empleo_de_la_tecnica_in_vitro_de_produccion_de_gas#full-TextFileContent, 2011.
- Sandoval-Pelcastre, A. A.; Ramírez-Mella, M.; Rodríguez-Ávila, N. L. & Candelaria-Martínez, B. Árboles y arbustos tropicales con potencial para disminuir la producción de metano en rumiantes. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 23 (33):1-16. https://www.researchgate.net/publication/342433653_Revision_Review_ARBOLES_Y_ARBUSTOS_TROPICALES_CON_POTENCIAL_PARA_DISMINUIR_LA_PRODUCCION_DE_METANO_EN_RUMIANTES_TROPICAL_TREES_AND_SHRUBS_WITH_POTENTIAL_TO_REDUCE_THE_PRODUCTION_OF_METHANE_IN_RUMINANT, 2020.
- Tabla-Rojas, J. A. *Efecto del estado fenológico y los niveles de inclusión de Sambucus nigra sobre la producción de metano*. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias. Palmira, Colombia: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencia Animal, Universidad Nacional de Colombia, 2019.
- Theodorou, M. K.; Williams, Barbara A.; Dhanoa, M. S.; Mcallan, A. B. & France, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48 (3-4):185-197, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6).
- Urbano-Estrada, María F.; Cardona-Iglesias, J. L. & Castro-Rincón, E. Variación en la concentración de sólidos solubles en tres especies arbustivas forrajeras del trópico alto de Colombia. *Pastos y Forrajes*. 43 (3):201-209. <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v43n3/2078-8452-pyf-43-03-201.pdf>, 2020.
- Vargas-Martínez, J. de J.; Sierra-Alarcón, Andrea M.; Mancipe-Muñoz, E. A. & Avellaneda-Avellaneda, Yesid. El kikuyo, una gramínea presente en los sistemas de rumiantes en trópico alto colombiano. *CES. Med. Vet. Zootec.* 13 (2):137-156, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21615/cesmvz.13.2.4>.
- Vélez-Ruiz, J. P.; Tequin-Ocampo, Elsa B. & Vargas-Sánchez, J. E. Efecto *in vitro* del aceite de girasol (*Helianthus annuus* L.) sobre ácido transvacénico y patrón de ácidos grasos de cadena larga en la digesta ruminal. *Veterinaria y Zootecnia*. 11 (1):37-53, 2017. DOI: <https://doi.org/10.17151/vetzo.2017.11.1.4>.