



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

**USO DE LEGUMINOSAS TROPICALES COMO ALTERNATIVA
PARA REDUCIR LA METANOGENÉISIS RUMINAL Y SU
EFECTO SOBRE LA FERMENTACIÓN *In vitro***

ELEAB SILVANO BEYTIA PACHECO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

Sihochac, Champotón, Campeche

2021

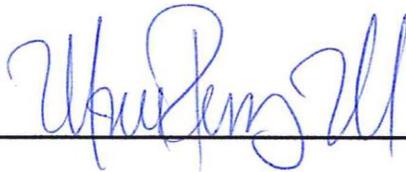
**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS
REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el(la) que suscribe **Eleab Silvano Beytia Pacheco**, Alumno(a) de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Dra. Mónica Ramírez Mella**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Uso de leguminosas tropicales como alternativa para reducir la metanogénesis ruminal y su efecto sobre la fermentación *In vitro*** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y El que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a 27 de enero de 2021.



Firma



Vo.Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **Uso de leguminosas tropicales como alternativa para reducir la metanogénesis ruminal y su efecto sobre la fermentación *In vitro***, realizada por el alumno: **Eleab Silvano Beytia Pacheco**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

Dra. Mónica Ramírez Mella

ASESOR

Dr. Alfredo Sánchez Villarreal

ASESORA

Dra. María Magdalena Crosby Galván

Sihochac, Champotón, Campeche, febrero, 2021

Uso de leguminosas tropicales como alternativa para reducir la metanogénesis ruminal y su efecto sobre la fermentación *in vitro*.

Eleab Silvano Beytia Pacheco, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

Los sistemas de producción bovina impactan negativamente al ambiente debido a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) de origen entérico. Una alternativa para mitigarlas es la utilización de follajes de árboles y arbustos leguminosos debido a su alto valor nutricional y presencia de metabolitos secundarios. En Campeche existen alrededor de 192 especies pertenecientes a la familia Leguminosae o Fabaceae, muchas de ellas con potencial forrajero. Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de metano (CH₄) y las características de la fermentación ruminal *in vitro* del follaje de las leguminosas *Caesalpinia vesicaria* L, *Piscidia piscipula*, *Dalbergia glabra* (Mill.) Standley y *Bauhinia divaricata* L. Se utilizó un diseño experimental en bloques completamente al azar con 4 tratamientos (cuatro leguminosas) y 1 testigo (pasto *Panicum máximum*). El follaje de *D. glabra* presentó el mayor contenido de proteína total (PT) (14.26%), así como menor producción de gas (PG) y de CH₄ a las 24 h (31.98 y 6.23 mL/g MS, respectivamente) y la más baja degradabilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) a las 24 y 72 h (23.46 y 27.93%), pero fue el follaje que presentó una mayor diversidad de metabolitos secundarios. Por el contrario, el follaje de *B. divaricata* L. y de *P. maximum* tuvieron la mayor PG (122.32 y 104.99 mL/g MS, respectivamente) y de CH₄ (29.14 y 26.19 mL/g MS, respectivamente) a las 24 h, así como la mayor DIVMS (36.45 y 36.11% a las 24 h y, 43.05 y 47.68% a las 72 h); sin embargo, el follaje de *B. divaricata* tuvo un mayor contenido de PT que *P. maximum* (12.12 y 5.06% respectivamente). Por lo anterior, el follaje de la leguminosa *D. glabra* puede ser una alternativa como recurso forrajero por su aporte de nutrientes y como modulador de la PG y CH₄. Adicionalmente, se establecieron las condiciones óptimas para la extracción de DNA de calidad para

PCR a partir de muestras de líquido ruminal provenientes de fermentaciones *in vitro* con el follaje de las especies de plantas forrajeras bajo estudio.

Palabras clave: Gases de efecto invernadero, leguminosas forrajeras, metabolitos secundarios, potencial forrajero y degradabilidad *in vitro* de la MS.

**Use of tropical legumes as an alternative to reduce ruminal methanogenesis
and its effect on *in vitro* fermentation.**

Eleab Silvano Beytia Pacheco, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

Cattle production systems have a negative impact on the environment due to the emission of Greenhouse Gases (GHG) of enteric origin. An alternative to mitigate the emission of these gases is the use of foliage of tropical legume trees and shrubs due to their high nutritional value and secondary metabolite content. Around 192 Leguminosae o Fabacea plant species thrive in the state of Campeche, Mexico and most of these plants have forage potential. Therefore, the objective of this research was the evaluation of the ruminal fermentation characteristics and methane (CH₄) production from foliage from *Caesalpinia vesicaria* L, *Piscidia piscipula*, *Dalbergia glabra* (Mill.) Standley and *Bauhinia divaricata* *in vitro*. A completely randomized blocks design was used with four treatments (one per plant species) and one control (the grass *Panicum máximum*). The foliage of *D. glabra* had the highest total protein (TP) (14.26%), the lowest gas production (GP) and CH₄ production at 24 h (31.98 y 6.23 mL/g DM respectively) as well as the lowest *in vitro* DM degradability (IVDMD) both at 24 and 72 h (23.46 y 27.93% respectively). *D. glabra* foliage had the highest diversity of secondary metabolites. On the other hand, foliage from *B. divaricata* L. and *P. maximum* had the highest GP (122.32 and 104.99 mL/g DM) and CH₄ (29.14 and 26.19 mL/g DM) production at 24 hours, as well as the highest degradability (36.45 and 36.11% DIVDM at 24 h and 43.05 and 47.68% DIVDM at 72 hours) even though *B. divaricata* foliage had a higher TP content (12.12%) that *P. maximum* (5.06%). Thus, the foliage of the legume tree *D. glabra* can be an alternative as fodder due to its nutritional value as well as a modulator of gas and methane production. Additionally, we established the optimal conditions for extraction of high-quality DNA suitable for PCR from

ruminal liquid from in vitro fermentation assays with the inclusion of the forage plants used in this work.

Key words: GreenHouse Gases, legume forage, secondary metabolites, fodder potential, degradability *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, simplemente por darnos el don del pensamiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios y desarrollar el presente trabajo de investigación.

A mi Directora de tesis, Dra. Mónica Ramírez Mella, por su paciencia, dedicación y apoyo, especialmente en los momentos que perdí la brújula, gracias. Al igual que a todo mi Consejo Particular, Dr. Alfredo Sánchez Villarreal y Dra. María Magdalena Crosby Galván.

A la Dra. Norma Laura Rodríguez Ávila, del Instituto Tecnológico de Chiná, por su apoyo para determinar la presencia de metabolitos secundarios.

A mis nuevos amigos y compañeros, así como a todos aquellos profesores que de alguna forma participaron en mi formación profesional, en especial a la MC. Elmi Cen. Gracias a todos.

DEDICATORIA

A mi esposa:

Claudia B. González Medina, por su apoyo incondicional, su confianza y amor que me ha demostrado en los momentos más difíciles, te amo.

A mis hijos:

Claudia B., Eleab J. y Mauricio N., que son mi fuente de motivación para siempre seguir adelante, los quiero mucho.

A mis padres:

†Eleodoro Beytia y Susana Pacheco, por darme la vida y su apoyo incondicional.

A mis hermanos:

Lidia, Eleodoro, Marciala, Gerardo, Gabriel, Marbelí, Leonel y Pablo, por todos los momentos que hemos pasado, siempre serán parte de mi vida.

A mis amigos y compañeros:

Gracias por su valioso apoyo durante mi formación.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE CUADROS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	2
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo General.....	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. HIPÓTESIS	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1. Situación de la ganadería bovina e inventario mundial	5
4.2. Situación de la ganadería bovina e inventario nacional	6
4.3. Importancia de la ganadería en la economía y la seguridad alimentaria.....	7
4.3.1. Seguridad alimentaria	8
4.3.2. Desafíos de la ganadería bovina.....	9
4.4. Sistemas de producción de ganado bovino en México	10
4.4.1. Tipología de productores	10
4.4.2. Principales sistemas de producción de ganado bovino	11
4.5. Ganadería y medio ambiente	14
4.6. Gases de Efecto Invernadero.....	15
4.6.1. Dióxido de carbono (CO ₂).....	17
4.6.2. Metano (CH ₄)	18
4.6.3. Óxido nitroso (N ₂ O).....	19
4.6.4. Otros gases de efecto invernadero	19
4.7. Fermentación entérica ruminal.....	20
4.8. Producción de AGV	21
4.9. Metanogénesis ruminal	22
4.10. Estrategias para reducir la metanogénesis ruminal.....	24
4.11. Modulación de la fermentación entérica por metabolitos secundarios	25
4.11.1. Taninos.....	27

4.11.2. Saponinas	29
4.11.3. Flavonoides.....	30
4.11.4. Antraquinonas.....	30
4.12. Sistemas silvopastoriles (SSP)	31
4.13. Las leguminosas.....	34
4.13.1. Leguminosas con potencial forrajero.....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
5.1. Ubicación	44
5.2. Colecta.....	44
5.3. Análisis químicos	44
5.4. Fermentación <i>In vitro</i>	45
5.5. Degradabilidad <i>In vitro</i> de la MS (DIVMS)	46
5.6. Producción de gas (PG) de follajes tropicales <i>In vitro</i>	46
5.7. Determinación de CH ₄	46
5.8. Determinación de metabolitos secundarios	47
5.8.1. Alcaloides.....	47
5.8.2. Flavonoides.....	47
5.8.3. Saponinas	48
5.8.4. Taninos.....	48
5.8.5. Quinonas	49
5.8.6. Cumarinas.....	49
5.9. Concentración de nitrógeno amoniacal en la fermentación <i>In vitro</i>	49
5.10 Cálculos y análisis estadístico.....	50
5.10.1 Energía metabolizable	50
5.10.2. Volumen máximo, tasa de fermentación y fase lag	50
5.10.3. Factor de partición	50
5.10.4. Diseño experimental	51
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1. Caracterización del contenido nutricional	52
6.2. Determinación de metabolitos secundarios en los follajes.....	53
6.3. Características de la fermentación ruminal <i>in vitro</i> y producción de CH ₄	54
6.4. Cinética de PG <i>in vitro</i>	57
6.5. Producción de NH ₃ -N y AGV <i>in vitro</i>	58

7. CONCLUSIONES.....	61
8. BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO I. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA RUMINAL <i>IN VITRO</i> POR PCR DIGITAL EN GOTAS	85
INTRODUCCIÓN	85
MATERIALES Y MÉTODOS	87
Extracción de DNA de microorganismos ruminales de la fermentación <i>in vitro</i> de forrajes tropicales.....	87
Electroforesis.....	89
Reacción de PCR punto final.....	90
RESULTADOS.....	90
Prueba con diferentes métodos de extracción de DNA genómico a partir de muestras de líquido ruminal para determinar la eficiencia de cada uno ellos.....	90
Extracción de DNA genómico de los tratamientos con el protocolo PCSA	92
Reacción de PCR para la detección del gen correspondiente a la subunidad pequeña del RNA ribosomal (16S) bacteriano en DNA extraído de las fermentaciones <i>in vitro</i> de los diferentes tratamientos.....	94
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA.....	98
ANEXO 2. Reactivos usados para preparar la solución buffer de la fermentación ruminal <i>in vitro</i>	101
ANEXO 3. Materiales, equipos y reactivos usados para el análisis bromatológico.....	102
ANEXO 4. Materiales y reactivos usados en la determinación cualitativa de metabolitos secundarios.....	105
ANEXO 5. Materiales, equipos y reactivos usados en el ANEXO 1	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Población de bovinos por continente. Fuente: FAOSTAT (2019).....	5
Figura 2. Contribución de la ganadería a las emisiones de GEI. Tomado de http://www.fao.org/gleam/results/es/	16
Figura 3. Fermentación ruminal a partir de glucosa. Adaptado de Moss <i>et al.</i> (2000).....	22
Figura 4. Principales rutas para la producción de CH ₄ en el rumen. Tomado de Mitsumori y Sun (2008).	24
Figura 5. Estrategias para reducir la producción de CH ₄ en los rumiantes (Modificado de Hook <i>et al.</i> , 2010).	25
Figura 6. Integridad de DNA de líquido ruminal de las fermentaciones <i>in vitro</i> con distintos protocolos de extracción	92
Figura 7. Resultados de integridad de DNA genómico obtenido a partir de líquido ruminal de las fermentaciones <i>in vitro</i> con distintos forrajes tropicales	93
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% del producto de PCR para el gen 16S de bacteria	94
Figura 9. Integridad de DNA genómico de líquido ruminal de las fermentaciones <i>in vitro</i> tras su purificación con el kit ONE STEP PCR INHIBITOR REMOVAL	96
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% del producto de PCR para el gen 16S de bacteria empleando DNA purificado.....	97

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Población bovina mundial.	5
Cuadro 2. Población bovina nacional	6
Cuadro 3. Población bovina del Sureste Mexicano.....	6
Cuadro 4. Emisiones de GEI de la ganadería en México expresado Gg de CO ₂ e.....	17
Cuadro 5. Identificación botánica de las especies arbóreas de mayor uso forrajero en dos regiones del sur de México.	33
Cuadro 6. Parámetros de producción de carne y emisiones de metano (CH ₄) en tres sistemas de producción ganadera tropical en Colombia.....	34
Cuadro 7. Composición química del follaje de las leguminosas <i>C. vesicaria</i> , <i>D. glabra</i> , <i>B. divaricata</i> y <i>P. pispipula</i> , así como del pasto <i>P. máximo</i>	53
Cuadro 8. Determinación cualitativa del follaje de las leguminosas <i>C. vesicaria</i> , <i>D. glabra</i> , <i>B. divaricata</i> y <i>P. pispipula</i> , así como del pasto <i>P. máximo</i>	54
Cuadro 9. Vmax, DIVMS, factor de partición, energía metabolizable, producción de CH ₄ y CO ₂ de la fermentación ruminal <i>in vitro</i> del follaje de las leguminosas <i>C. vesicaria</i> , <i>D. glabra</i> , <i>B. divaricata</i> y <i>P. pispipula</i> , así como del pasto <i>P. máximo</i>	57
Cuadro 10. Cinética de la producción de gas en la fermentación <i>in vitro</i> de la fermentación ruminal <i>in vitro</i> del follaje de las leguminosas <i>C. vesicaria</i> , <i>D. glabra</i> , <i>B. divaricata</i> y <i>P. pispipula</i> , así como del pasto <i>P. máximo</i>	58
Cuadro 11. Concentración de NH ₃ -N y AGV la fermentación ruminal <i>in vitro</i> del follaje de las leguminosas <i>C. vesicaria</i> , <i>D. glabra</i> , <i>B. divaricata</i> y <i>P. pispipula</i> , así como del pasto <i>P. máximo</i>	60
Cuadro 12. Métodos de extracción de DNA genómico	90
Cuadro 13. Calidad y cantidad de DNA de líquido ruminal de las fermentaciones <i>in vitro</i> con distintos protocolos de extracción	91
Cuadro 14. Resultados de calidad y cantidad de DNA genómico obtenido a partir de líquido ruminal de las fermentaciones <i>in vitro</i> con distintos forrajes tropicales.	93
Cuadro 15. Calidad y cantidad de DNA genómico de líquido ruminal de las fermentaciones <i>in vitro</i> tras su purificación con el kit ONE STEP PCR INHIBITOR REMOVAL	95

1. INTRODUCCIÓN

En las regiones tropicales de nuestro país existe una gran diversidad de especies arbóreas y arbustivas con alto potencial forrajero, dentro de las cuales se destacan las leguminosas. Algunas de las características de estas especies, aparte del valor forrajero, son su importancia en la apicultura, la belleza escénica o de paisajes, lo cual pueden dar un valor extra como servicios ambientales, sin olvidar el confort que la sombra proporciona a los animales dentro del potrero, sobre todo en los meses más calurosos y soleados (Ibrahim y Harvey, 2003).

La base de la alimentación para rumiantes superiores está constituida principalmente por monocultivos de gramíneas, ya sean mejoradas o nativas. Las gramíneas se caracterizan por presentar paredes celulares altamente lignificadas, la que representan niveles de digestibilidad bajos y, por ende, baja eficiencia en la utilización de estos forrajes. La producción de metano (CH_4) es una consecuencia inevitable de la fermentación de carbohidratos en el rumen, favoreciéndose cuando los animales son alimentados con forrajes de baja calidad, lo cual es una característica de los forrajes tropicales (Delgado *et al.*, 2012).

Las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a ambientes adversos (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011). Estos compuestos han demostrado capacidad para manipular algunos procesos metabólicos en los rumiantes y modular selectivamente las poblaciones microbianas del rumen permitiendo mejorar la fermentación, el metabolismo del nitrógeno y reducir la producción de CH_4 (Patra y Saxena, 2010; Bodas *et al.*, 2012). Los metabolitos que han demostrado influir en la producción de CH_4 se encuentran las saponinas, taninos, compuestos organosulfurados, aceites esenciales, alcaloides, entre otros; actualmente se reportan más de 200 mil estructuras definidas de compuestos secundarios, lo que demuestra el gran escenario que requiere ser investigado (Patra y Saxena, 2010; Santra *et al.*, 2012).

Una alternativa para mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) por los rumiantes es la utilización de follajes de árboles y arbustos leguminosos debido a su alto contenido proteico, elevada digestibilidad y presencia de metabolitos secundarios. Muchas especies son fuente de forraje cuando están disponibles al ganado dentro de los pastizales, y en las zonas de clima seco, el follaje, la hojarasca y los frutos se convierten en la fuente más importante de forraje a falta de gramíneas (Carranza-Montaña *et al.*, 2002; Velázquez-Martínez *et al.*, 2010).

Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de CH₄ y las características de la fermentación ruminal *in vitro* de las leguminosas *Caesalpinia vesicaria* L, *Piscidia piscipula*, *Dalbergia glabra* (Mill.) Standley y *Bauhinia divaricata* L.

1.1. Justificación

En México, la familia de las leguminosas está representada por 92 géneros y tres sub-familias: *Leguminoideae*, *Papilionoideae* y *Caesalpinoideae*; en Campeche, esta familia tiene un alto número de especies (Zamora *et al.*, 2011) que pueden ser usadas en la alimentación animal. Por tal motivo es necesario conocer las características nutritivas de las leguminosas, determinar su potencial productivo y así, hacer un uso más sustentable de estos recursos vegetales.

Por otro lado, los sistemas de producción bovina impactan negativamente al ambiente debido a las emisiones de GEI. Dentro de estos GEI se encuentran el dióxido de carbono (CO₂), el cual es producido por la respiración de los rumiantes; el CH₄, producido por la fermentación entérica y el manejo de las heces, con un poder de calentamiento atmosférico 28 veces superior al del CO₂; y el óxido nitroso, formado por los procesos de nitrificación y desnitrificación de la descomposición aeróbica de las heces, con un potencial de calentamiento de 298 veces mayor al dióxido de carbono. La contribución de los sistemas ganaderos en

las emisiones de CO₂, CH₄ y óxido nitroso es de 9, 37 y 65%, respectivamente (IPCC, 2014; Steinfeld *et al.*, 2009).

La producción de CH₄ causa pérdidas que van desde el 2% hasta un 12% de la energía del alimento, lo que indica que existe una relación negativa entre la producción de CH₄ entérico y la energía del alimento (Johnson y Johnson, 1995).

El uso de leguminosas forrajeras en asociación con gramíneas es relevante en la nutrición y sustentabilidad del sistema de producción pecuario. El contenido de proteína de las leguminosas forrajeras alcanza 25 % (Heinritz *et al.*, 2012) y fijan nitrógeno al suelo, lo que puede beneficiar a las gramíneas asociadas (Onyeonagu y Eze, 2013). Además, las leguminosas contienen metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, que puede beneficiar o afectar al animal que los consume (Jezierny *et al.*, 2010). Los compuestos fenólicos están relacionados con el sabor, olor y color del alimento, y pueden modificar la fermentación ruminal y reducir la emisión de gas CH₄ (Evans y Martin, 2000; Rochfort *et al.*, 2008), la cual es debida a los microorganismos ruminales.

Partiendo de lo antes mencionado, es posible reducir las emisiones de GEI provenientes de los rumiantes, principalmente el CH₄ entérico, lo que contribuye a la disminución del calentamiento global. Aunado a esto se obtendrían los beneficios del establecimiento de un sistema silvopastoril, con el manejo de leguminosas forrajeras locales, las cuales traen como beneficio el incremento de la biodiversidad de los sistemas, y por ende mejoran los procesos naturales tales como reciclado de nutrientes, conservación de agua y suelo, secuestro de carbono por las plantas, entre otros servicios ambientales.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la producción de CH₄ y las características de la fermentación ruminal *in vitro* de las leguminosas *Caesalpinia vesicaria* L, *Piscidia piscipula*, *Dalbergia glabra* (Mill.) Standley y *Bauhinia divaricata* L.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar el contenido nutricional de los follajes de cuatro leguminosas forrajeras mediante un análisis proximal, materia seca (MS), proteína total (PT), extracto etéreo (EE), cenizas (C), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA).
- Determinar la presencia de metabolitos secundarios en los follajes.
- Evaluar la degradabilidad de la materia seca *in vitro*.
- Calcular la producción de gas y la producción de CH₄ *in vitro* de los follajes.
- Cuantificar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃).

3. HIPÓTESIS

Las leguminosas bajo estudio disminuyen la producción de CH₄ debido al contenido de metabolitos secundarios y a cambios en la fermentación ruminal *in vitro*.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Situación de la ganadería bovina e inventario mundial

La población total de ganado bovino en el mundo es de aproximadamente 1,553,162,432 cabezas, de las cuales el 35.1% se encuentra en el continente americano (Figura 1) y el principal productor a nivel mundial es Brasil, con una población bovina superior a 213 millones de cabezas (Cuadro 1), México ocupa el octavo lugar con aproximadamente 34.8 millones de cabezas (FAOSTAT, 2019).

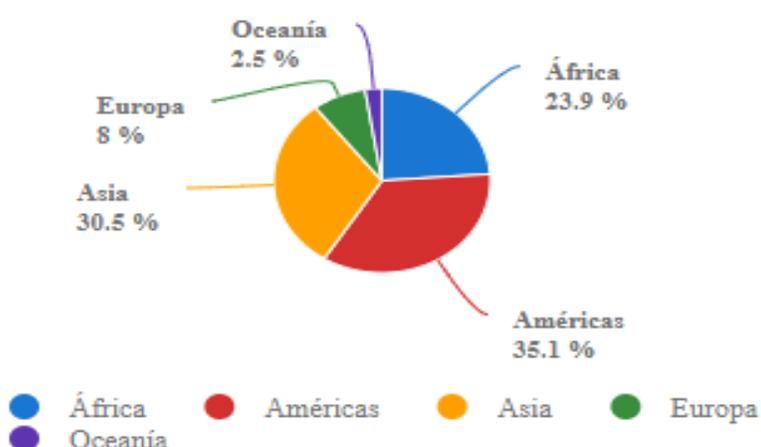


Figura 1. Población de bovinos por continente. Fuente: FAOSTAT (2019).

Cuadro 1. Población bovina mundial.

No.	País	Cabezas
1	Brasil	213,523,056
2	India	184,464,035
3	Estados Unidos de América	94,298,000
4	China	63,417,928
5	Etiopía	62,599,736
6	Argentina	53,928,990
7	Pakistán	46,084,000
8	México	34,820,271
9	Sudán	31,223,000
10	Chad	29,063,152

Fuente: FAOSTAT (2019).

4.2. Situación de la ganadería bovina e inventario nacional

La población bovina en México es de aproximadamente 35,224,960 cabezas (SIAP, 2019), y se encuentra posicionado en el octavo lugar en cuanto a países con mayor número de bovinos (FAOSTAT, 2019). Del total del inventario nacional, 32,661,138 cabezas corresponden a ganado para carne y 2,563,822 cabezas son bovinos para producción de leche (SIAP, 2019), los estados con la mayor producción de ganado bovino son Veracruz, Jalisco y Chiapas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Población bovina nacional

No.	Estado	Cabezas
1	Veracruz	4,386,162
2	Jalisco	3,326,573
3	Chiapas	2,594,339
4	Chihuahua	2,504,286
5	Michoacán	2,005,272
6	Oaxaca	1,813,434
7	Tabasco	1,682,798
8	Sonora	1,651,361
9	Sinaloa	1,614,256
10	Durango	1,598,253

Fuente: SIAP (2019).

La región sureste del país aporta aproximadamente el 8.6% del total del inventario nacional. El estado de Campeche cuenta con 664,464 cabezas de ganado bovino (Cuadro 3), y ocupa el décimo séptimo lugar a nivel nacional, y es el segundo estado con mayor número de cabezas en la región sureste del país (SIAP, 2019).

Cuadro 3. Población bovina del Sureste Mexicano

No.	Estado	Cabezas
1	Tabasco	1,682,798
2	Campeche	664,464
3	Yucatán	578,240
4	Quintana Roo	124,952

Fuente: SIAP (2019).

El sector primario aporta el 3.7% al PIB Nacional, de los cuales el sector ganadero aporta el 29.8%. Independiente a estos datos, la ganadería es una actividad de suma importancia, ya que en muchas regiones del país es una de las pocas actividades que se adaptan a las condiciones agroecológicas, y por lo tanto constituyen la única fuente de ingresos para muchas familias en condiciones de pobreza. Además, es la única fuente de proteína (carne y leche), lo que favorece a la seguridad alimentaria, principalmente al sector más desfavorecido (CEDRSSA, 2019).

4.3. Importancia de la ganadería en la economía y la seguridad alimentaria

Actualmente la ganadería representa alrededor del 40% del valor agregado en la agricultura mundial. Cinco de los diez principales productos agrícolas en términos de valor son productos de origen animal y, en su mayoría, son consumidos localmente. Menos del 15% de la producción mundial de carne, leche y huevos se comercializa internacionalmente y de los 770 millones de personas que sobreviven con menos de 1,90 dólares por día, aproximadamente la mitad depende directamente de la ganadería para su sustento (FAO, 2018).

A nivel mundial se prevé que para el año 2050 la demanda de alimentos de origen animal aumente y que lo haga de forma más rápida en los países en desarrollo, quienes a su vez generarán la mayor parte de este crecimiento. Se espera que la demanda mundial de carne y leche aumente en un 57% y 48% respectivamente entre 2005 y 2050 (Mottet *et al.*, 2017).

Por otro lado, la producción y comercialización de ganado son actualmente esenciales para el sustento de más de mil millones de personas pobres en África y Asia: una séptima parte de la humanidad (Smith *et al.*, 2013). Herrero *et al.* (2013) encontró que la producción y comercialización de carne de res en África occidental apoya a 70 millones de personas; los productos lácteos sustentan a 124 millones de personas en el sur de Asia y a 24 millones en el este de África; mientras que los pequeños rumiantes sostienen a 81 millones de personas en África occidental y 28 millones más en África meridional (Staal *et al.*, 2009). La contribución del

ganado a los ingresos familiares varía ampliamente, desde el 2% hasta más del 33% en varios países en desarrollo (Staal *et al.*, 2009; Pica-Ciamarra *et al.*, 2011).

En la región de América Latina y el Caribe, la ganadería está emergiendo claramente como un importante proveedor mundial de proteína animal, representando más de un cuarto de toda la producción mundial de carne vacuna. La región cuenta con los recursos, la historia y la capacidad para convertirse en un importante proveedor de este tipo de productos. La ganadería juega un papel preponderante, no sólo porque representa el 46% del producto interno bruto (PIB) agrícola regional (FAO, 2014), sino también por sus aportes al total de la economía, a la seguridad alimentaria, a la nutrición, a la reducción de la pobreza y a la sustentabilidad ambiental (CEPAL-FAO-IICA, 2018).

4.3.1. Seguridad alimentaria

La definición más aceptada de seguridad alimentaria establece que las personas deben tener en todo momento acceso físico, social y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para tener una vida sana y activa (IICA, 2013).

El sector ganadero es fundamental para la seguridad alimentaria no solo a nivel del hogar, para los pequeños productores que dependen directamente del ganado para obtener alimentos, ingresos y servicios, sino también a nivel nacional, al brindar a los consumidores acceso a alimentos de alta calidad nutricional (Rodríguez *et al.*, 2016). En este contexto, la cría de animales juega un papel importante y distinto en los cuatro pilares principales de la seguridad alimentaria: disponibilidad, acceso, estabilidad y uso (FAO, 2009). Datos proporcionados por la FAO (2012) mencionan que cerca de mil millones de las personas más pobres del mundo dependen del ganado para su sustento, por lo que se supone que los hogares que crían ganado consumen los alimentos de origen animal que producen y que el aumento de la productividad del ganado tendría un impacto positivo en la nutrición de la familia. Rodríguez *et al.* (2016) afirman que la producción animal, especialmente la producción familiar, juega un papel muy importante en la disponibilidad de alimentos: la cría de animales es una de las principales fuentes de proteínas para las familias rurales y proporciona una parte importante de sus

ingresos. Este mismo autor menciona que la ganadería es fundamental para el sustento de los pobres y es una parte integral de los sistemas agrícolas, a los que contribuye el ganado aumentando la productividad de las granjas y proporcionando un flujo continuo de alimentos e ingresos para los hogares.

Para el caso de la región de América Latina y el Caribe, la ganadería juega un papel importante en los ingresos de muchas familias, ya que proporciona acceso a otros productos y servicios básicos, además contribuye a la seguridad alimentaria mejorando la disponibilidad y el acceso a los alimentos, además ayuda a mejorar la calidad de vida de dos terceras partes de la población de esta región dedicada a la agricultura, cuyos medios de subsistencia dependen en parte de la producción pecuaria. Por lo tanto, la ganadería representa un elemento fundamental en el desarrollo de la región (CEPAL, FAO, IICA, 2018; Rodríguez *et al.*, 2016).

4.3.2. Desafíos de la ganadería bovina

Por otra parte, están los desafíos ambientales, dentro de los que sobresalen la degradación de tierras por efectos de sobrepastoreo (FAO estima que cerca del 70% de las tierras dedicadas al pastoreo muestran algún tipo de degradación); la deforestación para ampliar la frontera ganadera; la conversión de tierras marginales a la producción ganadera; la contaminación del agua, suelos y la alta emisión de gases de efecto invernadero (GEI), colocan a la región de América Latina y el Caribe como una de las zonas de mayor número de emisiones en el mundo, principalmente proveniente de la producción de carne bovina, aportando más del 30% de las emisiones totales de GEI de la ganadería a nivel mundial (Núñez, 2015; HPLE, 2016; FAO, 2018a).

Kaimowitz (2001), menciona que en los últimos 40 años el área destinada a pasturas en Centroamérica ha aumentado de 3.5 a 9.5 millones; esta expansión es la causa principal de la pérdida y fragmentación de bosques, con la consecuente creación de paisajes de monocultivos de pastos o cultivos agrícolas.

4.4. Sistemas de producción de ganado bovino en México

Para diferenciar los sistemas de producción de ganado bovino, de acuerdo con aspectos zootécnicos, se considera el nivel de tecnología utilizado, las razas que emplean y el tipo de alimentación (Pech *et al.*, 2002). La caracterización de los productores y sistemas de producción es determinante para el desarrollo de políticas, puesto que permite conocer la conformación de los sistemas de producción, sus componentes tecnológicos, el potencial y limitantes respecto a otros sistemas (Vilaboa *et al.*, 2009).

4.4.1. Tipología de productores

De acuerdo con Carrera *et al.* (2014), en México se pueden clasificar a los productores de ganado de manera general en cuatro grandes grupos. Existen aproximadamente 1,400,000 unidades de producción que incluyen ranchos, corrales de engorda, empresas integrales y otras unidades económicas dedicadas principalmente a la producción de ganado bovino, los sistemas de producción van desde altamente tecnificados e integrados hasta los tradicionales (Hernández-Martínez *et al.* 2011).

4.4.1.1. Pequeños productores de bajos ingresos

Productores con superficies pequeñas de agostadero para la explotación, con rebaños pequeños, animales de baja calidad genética y con una gran dependencia de esquilmos agrícolas para la alimentación. Esencialmente, la comercialización de su producto la realizan por medio de acopiadores.

4.4.1.2. Productores individuales

Poseen superficies considerables de tierras de agostadero, cuentan con grandes hatos de buena calidad genética y utilizan tecnologías productivas y sanitarias adecuadas. Por lo general comercializan su ganado en rastros, empacadoras o exportan becerros.

4.4.1.3. Grandes productores afiliados a la Asociación Mexicana de Engordadores de Ganado (AMEG)

Productores con un stock importante de ganado bovino de excelente calidad, cuentan con toda una cadena productiva que va desde corrales de acopio y engorda, plantas de alimento balanceado y en algunos casos rastros Tipo Inspección Federal (TIF), cuentan con puntos de venta directa para comercializar carne con alto valor agregado, hasta la exportación de becerros en pie.

4.4.1.4. Empresas integradas de engorda, producción y transformación de carne

Estas empresas desarrollan una ganadería de tipo industrial, intensiva en el empleo de capital, altamente tecnificadas y manejan grandes lotes de animales. Además, comparativamente, son las que corren con los menores riesgos de todo el proceso de producción dado que mantienen el ganado en sus instalaciones solo alrededor de tres meses, solo hasta que estos alcanzan el peso requerido para el sacrificio.

4.4.2. Principales sistemas de producción de ganado bovino

En nuestro país los sistemas de producción de ganado bovino varían considerablemente, dependiendo de factores internos (solvencia económica, nivel de estudios, experiencia, disponibilidad y calidad de forraje, superficie y adopción tecnológica) y externos (orografía, clima, precipitación, fauna silvestre y estado sanitario de la región) (Villanueva, 2010). En las regiones tropicales predominan los sistemas de doble propósito extensivos o semi-extensivos, basados en monocultivo de pasturas; los cuales se caracterizan por su baja productividad e impacto negativo al ambiente (Bacab *et al.*, 2013). En el centro del país predominan las unidades de producción que utilizan recursos y mano de obra familiar, orientados a la producción de leche pero en pequeña escala; mientras que en la región norte del país predominan los sistemas de producción intensivos-especializados en la producción de leche y carne (Álvarez *et al.*, 2007, citado por Ortiz, 2013).

4.4.2.1. Sistemas intensivos o tecnificados

Este sistema está encaminado a la producción láctea más que a la producción de carne, sin embargo, no por ello dejan de existir los denominados corrales de engorda (feedlots), aunque en menor cantidad. Para ello se utilizan razas de animales especializadas con un alto potencial genético. Los animales se encuentran estabulados, con hatos que van de 500 a 3000 cabezas en producción. El 17% del hato nacional se encuentra dentro de este tipo de sistema (Álvarez *et al.*, 2007, citado por Ortiz, 2013).

Algunos de los principales grupos ganaderos del país productores de bovinos para carne disponen de fábricas de alimentos balanceados y sistemas de formulación de raciones para cada etapa de la producción y a la calidad genética de los animales, inclusive de acuerdo con la disponibilidad de insumos, con lo cual se abarata este concepto del costo de producción, se obtienen los mejores niveles de conversión alimento-carne y disminuye con ello el gasto en alimentación, mismo que representa la mayor cantidad de las erogaciones en el proceso productivo (Carrera *et al.*, 2014).

Estos sistemas basan su producción en insumos externos como alimentos balanceados y productos químicos como antibióticos y promotores del crecimiento. Esto permite acelerar el ciclo de producción y aumentar la productividad por animal y por área, pero genera un alto impacto ambiental por el mal manejo de los residuos, las excesivas pérdidas de nutrientes y consiguientes emisiones de gases de efecto invernadero (Herrero *et al.*, 2009; Montaldo *et al.*, 2010).

4.4.2.2. Sistema semi-tecnificado

En este estrato se ubican principalmente los productores tradicionales y aquellos que, debido a limitados márgenes de utilidad, no tienen posibilidad de invertir para elevar las tecnologías y la genética utilizada. De hecho, al amparo de este sistema se ubican un sinnúmero de tipos de explotación que pueden mostrar algunos adelantos tecnológicos en ciertas áreas de la producción, sin embargo, la falta de una mejora integral se refleja en baja productividad y falta de competitividad (Carrera *et al.*, 2014).

A pesar de que estos sistemas cuentan en muchas ocasiones con pie de cría similar al del sistema tecnificado, la infraestructura y las medidas zoonosanitarias son inadecuadas y emplean alimentos balanceados comerciales que no siempre cubren las necesidades nutricionales del ganado en sus diferentes etapas de producción, aumentando con ello los costos. La comercialización del ganado normalmente es realizada a través de intermediarios, lo cual aplica elevadas cuotas o cobros por su participación que sobrepasan los márgenes de utilidad del ganadero. Además, la industrialización del ganado obtenido normalmente se realiza en rastros municipales y/o privados, y los mercados que atiende son básicamente regionales y locales (Carrera *et al.*, 2014).

4.4.2.3. Sistemas de producción familiar

Se realiza en unidades de producción donde la mano de obra familiar es predominante, así como recursos también del mismo origen, como son la tierra, agua y capital (Castelán-Ortega *et al.*, 2003). El tamaño del hato va desde 3 hasta 20 cabezas, el tipo racial no está bien definido, predominando las cruces de ganado europeo lechero con bajo potencial genético (Álvarez *et al.*, 2007, citado por Ortiz, 2013). La mayor parte de las unidades productivas de este tipo se encuentran en zonas rurales, pero cada vez es más frecuente encontrarlas en zonas urbanas y periurbanas, debido a sus atributos de flexibilidad, adaptabilidad, adecuación al ambiente y espacio disponible (Cervantes *et al.*, 2007, citado por Ortiz, 2013).

La alimentación se basa en cultivos agrícolas (maíz) y residuos de cosecha, provenientes de parcelas de producción familiar, en ocasiones se complementa con concentrado comercial, el resto de la alimentación se compone de pastoreo de especies nativas en besanas y en algunos casos de praderas inducidas (Castelán-Ortega *et al.*, 2003).

4.4.2.4. Sistema doble propósito

Son aquellos donde se produce conjuntamente carne y leche, sobre la base de ganado criollo producto de la cruce de *Bos indicus X Bos taurus*, asociado con la cría de todos los becerros (Cortes *et al.*, 2003). Este es el sistema con mayor

presencia en el país, ya que el 62% del hato nacional se encuentra en explotaciones de este tipo, siendo las regiones de climas tropicales y semitropicales en donde hay mayor presencia (Pinto *et al.*, 2005).

La alimentación se basa en el pastoreo de especies nativas en agostaderos, en algunos casos se observan praderas inducidas mediante el desmonte, el cual consiste en modificar el uso del suelo de la selva a zonas de pastoreo. En lo que se refiere a la suplementación mineral, se puede considerar incompleta ya que se basa en sal común sin refinar (Suárez y López, 1996).

El costo del terreno, el establecimiento de potreros y el ganado representan más del 80% del capital invertido, los gastos de operación se limitan a la mano de obra y mantenimiento de potreros (Ponce, 1981). Los niveles productivos se encuentran influenciados fuertemente por la estacionalidad, aumentando la producción en épocas de lluvias y disminuyendo en la época seca (Albarrán *et al.*, 2009).

4.5. Ganadería y medio ambiente

La ganadería es una práctica pecuaria importante porque produce alimento proteico de alta calidad, sin embargo, es una de las actividades antropogénicas que más daño causa a los ecosistemas y a la biodiversidad. En México, la ganadería ocupa aproximadamente el 56% de la superficie nacional, excediendo el potencial ganadero que constituye el 46.8% de la superficie. Desde 2002, la actividad ganadera superó la capacidad de carga de los ecosistemas en 24 estados del país provocando degradación y fragmentación del hábitat (INECOL, 2017).

Uno de los problemas ambientales hoy día es la degradación del suelo, la cual se puede deber a diversos factores tales como los naturales (precipitación, viento), pero también se deben a acciones humanas, como los cambios del uso de suelo (en especial la deforestación), el pastoreo excesivo y la gestión ineficiente de la tierra cultivable, en México el 19% de su territorio presenta problemas de erosión de suelos (Vargas *et al.*, 2015; OCDE-FAO, 2019).

Los hatos de ganado pastan dentro de los ecosistemas naturales, promoviendo en muchos casos su degradación, así como la erosión y compactación de los suelos, sobre todo cuando el número de cabezas excede la capacidad de la vegetación para recuperarse (SEMARNAT, 2017). Según las Cartas de Uso del Suelo y Vegetación del año 2011, los pastizales inducidos y cultivados cubrían poco más de 19 millones de hectáreas (9.7% del país), sin embargo, los datos de la Comisión Técnico Consultiva de Coeficientes de Agostadero (Cotecoca, 2004 y 2015), en 2012 la superficie ocupada por la actividad pecuaria era de casi 110 millones de hectáreas (56% de la superficie total de México). Esto podría sugerir que al menos 91 millones de hectáreas de superficie ganadera estarían fuera de los pastizales inducidos o cultivados, es decir, sobre superficies ocupadas por vegetación natural.

La creciente demanda de productos animales y la falta de tierra ha provocado que la industria ganadera se convierta en la principal causa de tala de bosques y su conversión en pastos (Dopelt *et al.*, 2019). Según el Centro Internacional de Investigaciones Forestales (CIFOR), durante los años 1990-2000, se perdió un área dos veces mayor que Portugal debido al establecimiento de pastos (Ilea, 2009). Otra razón para la tala de bosques es la producción de alimentos para animales. Aproximadamente el 40% de los cultivos cosechados en el mundo se utilizan como alimento para los animales (Dopelt *et al.*, 2019).

Según datos de la OCDE-FAO (2019), se prevé que la demanda de productos agrícolas aumentará 15% durante la próxima década. La manera de cubrir esta demanda determinará el impacto que el sector causará en la base de recursos naturales, sobre todo, la tierra, el agua y la biodiversidad. El incremento en la producción de alimentos también viene acompañado por mayores emisiones de GEI, de las cuales cerca de una cuarta parte proviene de la agricultura, la silvicultura y el cambio en el uso de la tierra.

4.6. Gases de Efecto Invernadero

La agricultura y la producción pecuaria contribuyen ampliamente a las emisiones antropogénicas de CH₄, CO₂ y óxido nitroso a la atmósfera. El aumento de las

concentraciones de estos gases provoca un calentamiento de la superficie terrestre y la destrucción de la capa de ozono en la estratosfera (Primavesi *et al.*, 2004). La ganadería mundial es reconocida como un sector que contribuye a la emisión de GEI, particularmente de CO₂, CH₄ y óxido nitroso, con cifras del 14.5% (Figura 2) (Gerber *et al.*, 2013).

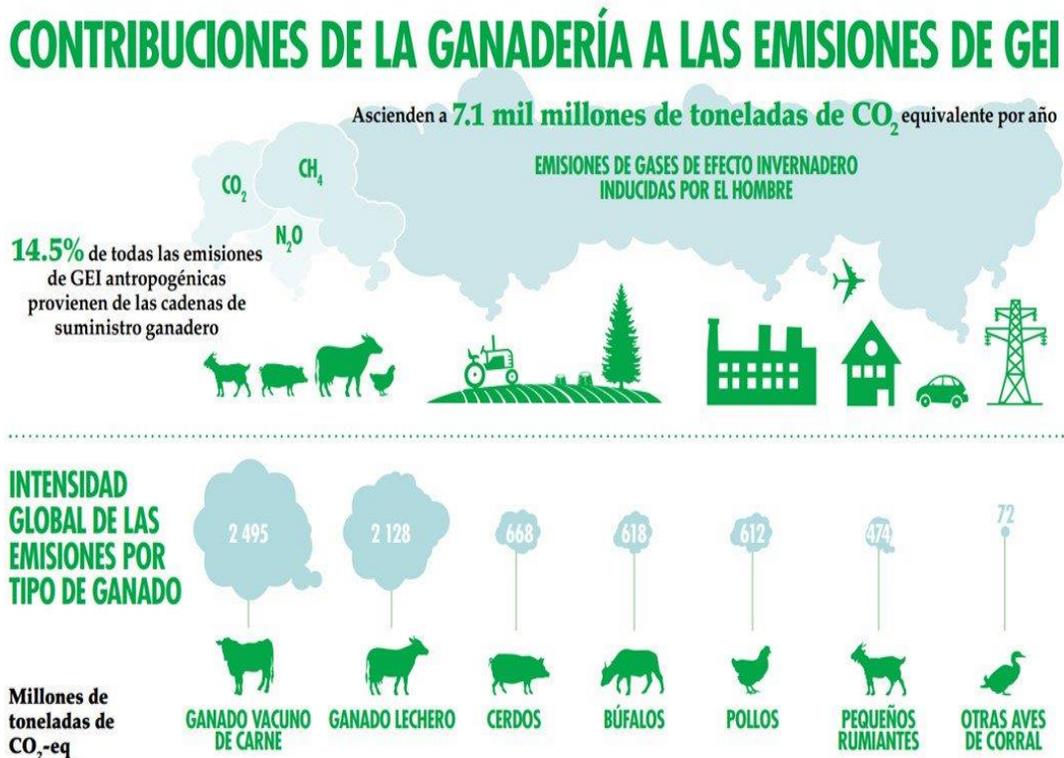


Figura 2. Contribución de la ganadería a las emisiones de GEI. Tomado de <http://www.fao.org/gleam/results/es/>.

Los GEI distintos del CO₂ (CH₄, óxido nitroso, hidrofluorocarburos, etc.) son convertidos a su valor equivalente en dióxido de carbono (CO₂-e), multiplicando la masa del gas en cuestión por su potencial de calentamiento global (GWP por sus siglas en inglés: Global Warming Potential). El GWP es una medida de cuánto calor atrapa un gas de efecto invernadero en la atmósfera hasta un horizonte temporal específico, en relación con el dióxido de carbono. A la hora de estimar emisiones de GEI, los resultados suelen darse en CO₂-e teniendo en cuenta el poder de calentamiento global a 100 años de los gases que están principalmente

activos en el sector agrario estableciéndose una equivalencia lineal temporal de 100 años, para expresar todos con relación al CO₂. Según el 5º Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (AR5), que es la evaluación del cambio climático más completa realizada hasta el momento por el IPCC, se establecen equivalencias (CO₂-e) de 28 para el caso del CH₄, y 265 para el caso del óxido nitroso (IPCC, 2014).

En el 2015, la ganadería en México aportó el 14.5% de GEI al inventario nacional, emitiendo 70,567.6 Gg de CO₂-e, de los cuales el 76% correspondió a la fermentación entérica, con 53,442.72 Gg de CO₂e, y el manejo de excretas representó 24% de las emisiones de la categoría con 17,124.88 Gg de CO₂-e (Cuadro 4). En cuanto a la contribución por fuente de emisión, la distribución de las emisiones ubica al ganado bovino como el mayor emisor de la categoría, con 87.4%, seguido por el ganado porcino con el 7.33% (INECC, 2018).

Cuadro 4. Emisiones de GEI de la ganadería en México expresado Gg de CO₂e

Categoría	2000	2005	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Fermentación entérica	49,317.05	49827.95	51761.08	51865.81	50139.49	51139.95	52082.12	53442.72
Manejo de excretas	14,459.21	14694.62	14673.91	15036.40	15222.26	15520.51	15310.42	17124.88

Modificado de INECC (2018).

4.6.1. Dióxido de carbono (CO₂)

El CO₂ es el principal GEI antropogénico de la atmosfera. Contribuye aproximadamente con 66% al forzamiento radioactivo ocasionado por el conjunto de GEI de larga duración. Es responsable de alrededor del 81% del aumento del forzamiento en los últimos 5 años, del total de las emisiones procedentes de actividades humanas durante el período 2009–2018; cerca del 44 % se acumularon en la atmósfera, el 23 % en los océanos y el 29 %, en la tierra (OMM, 2019). Las principales causas de emisiones de CO₂ son la quema de combustibles

fósiles, la producción de cemento, la deforestación y los cambios en el uso de la tierra (Agricultura y ganadería). La Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) menciona que el sector ganadero es responsable del 9% de las emisiones globales de CO₂ (Steinfeld *et al.*, 2006).

4.6.2. Metano (CH₄)

El CH₄ contribuye con el 17% al calentamiento global, causado por los GEI de larga duración, cerca del 40% del CH₄ que se emite a la atmósfera procede de fuentes naturales (por ejemplo, humedales y termitas), el 60% restante de estos GEI provienen de fuentes antropógenas, como son la ganadería de rumiantes, cultivo de arroz, explotación de combustibles fósiles, vertederos y combustión de biomasa (Sauniois *et al.*, 2019).

Los sistemas de producción de rumiantes, particularmente de bovinos, se asocian a problemas de impacto ambiental (cambio climático, degradación de la tierra, contaminación del agua, pérdidas de biodiversidad), donde el gas CH₄ proveniente de la fermentación entérica es el que tiene mayor contribución en el caso particular de los GEI (Steinfeld *et al.*, 2006; Gerber *et al.*, 2013). Datos proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) menciona que el sector ganadero es responsable del 35-40% de las emisiones globales de CH₄ (Steinfeld *et al.*, 2006).

Johnson y Johnson (1995), mencionan que el CH₄ entérico emitido al medio ambiente como resultado de la fermentación ruminal del alimento, implica una pérdida de energía digerida del 2-12%, debido a que utiliza hidrógeno metabólico (H₂) disponible en el rumen en la reducción del CO₂ a CH₄, por acción de las arqueas metanógenas, lo cual se traduce en una vía competitiva para la formación de los AGV. Estos mismos autores mencionan que un bovino adulto produce de 250 a 600 L de CH₄ por día.

La cantidad de CH₄ entérico expulsado por el animal depende de las características de la dieta como tipo de alimento, calidad del forraje, cantidad de energía consumida, tamaño y tasa de crecimiento del animal, así como el nivel de

producción y temperatura ambiental, el tipo y talla del animal (Cambra-López *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2017).

4.6.3. Óxido nitroso (N₂O)

El óxido nitroso contribuye con el 6% en el calentamiento global, ocupa el tercer lugar entre los GEI de larga duración y las emisiones de óxido nitroso de origen antropogénico representan el 40% del total de emisiones (OMM, 2019), las principales fuentes son la quema de biomasa, el uso de fertilizantes y diversos procesos industriales. Por otro lado, la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) menciona que el sector ganadero es responsable del 65% de las emisiones globales de óxido nitroso (Steinfeld *et al.*, 2006).

La mala gestión de los efluentes del ganado sin una aplicación y disposición adecuadas del estiércol, como la separación y el tratamiento de los componentes sólidos y líquidos de este, afecta directamente la carga de nitrógeno en el suelo y la posterior transferencia a los recursos de aguas superficiales y subterráneas, así como el riesgo sanitario que representa por el contenido de microorganismos patógenos (bacterias, virus, toxinas y parásitos). Las nuevas técnicas de manejo de estiércol pueden proteger el medio ambiente reduciendo emisiones de gases de efecto invernadero y generar líquidos y sólidos que pueden ser procesados por separado e incorporados a sistemas de reciclaje de nutrientes en aplicaciones agrícolas o en la producción de biogás (Martínez *et al.*, 2009).

El suministro de proteína en cantidades cercanas a los requerimientos del animal, incluida la concentración proteica correspondiente a las fases de lactancia y de crecimiento, es recomendado como una práctica eficaz para la disminución de las emisiones de amoníaco y de óxido nitroso provenientes del estiércol (Gerber *et al.*, 2013).

4.6.4. Otros gases de efecto invernadero

Los clorofluorocarbonos (CFC) que agotan la capa de ozono estratosférico y los gases halogenados menores contribuyen en aproximadamente un 11% al forzamiento radiactivo causado por los GEI de larga duración. Si bien los CFC y la

mayoría de los halones están disminuyendo, algunos hidroclorofluorocarbonos (e hidrofluorocarbonos, que también son potentes GEI) están aumentando a un ritmo relativamente rápido, aunque su abundancia es baja. Sin embargo, el hexafluoruro de azufre, con un nivel de abundancia igualmente bajo, es un GEI de larga duración sumamente potente. Es producido por la industria química y se usa principalmente como aislante eléctrico en los equipos de distribución eléctrica (OMM, 2019).

4.7. Fermentación entérica ruminal

Los rumiantes presentan una comunidad microbiana muy diversa dentro de su rumen, la cual está constituida por un consorcio de microorganismos encargado de fermentar el alimento y producir AGV que son rápidamente absorbidos a través del epitelio ruminal, sirviendo como fuente de energía para el animal hospedero (Hungate, 1975). Estos animales han desarrollado una compleja microbiota simbiote que incluye bacterias, protozoarios, hongos y arqueas (Van Soest, 1994), la cual les ha permitido adaptarse al consumo de vegetales y la digestión del material fibroso.

La fermentación ruminal de la fibra produce AGV, los cuales constituyen la principal fuente de energía para los rumiantes, biomasa microbiana que es utilizada como fuente de proteína, así como CO₂ y CH₄ que se desechan en el ambiente (Van Soest, 1994). Los carbohidratos estructurales de los alimentos fibrosos representan una de las principales fuentes de energía para el rumen. Los pastos tropicales proporcionan bajo contenido de proteína, por lo que la disponibilidad de N-NH₃ en el compartimento ruminal puede ser una condición limitante para el crecimiento de poblaciones microbianas (Silva *et al.*, 2009).

Según Martínez, (2005) dentro de las principales funciones del rumen y los microorganismos ruminales son:

- Digestión de los carbohidratos de las plantas como la celulosa, hemicelulosa, almidón y azúcares a glucosa.

- Conversión de glucosa a AGV, principalmente a acético, propiónico y butírico.
- Digestión de la proteína de los alimentos.
- Síntesis de proteína microbiana.
- Síntesis de vitaminas (hidrosolubles, principalmente vitaminas del complejo B y K).
- Digestión de lípidos.
- Hidrogenación de grasas insaturadas.

4.8. Producción de AGV

La degradación ruminal de la fibra y de los almidones genera hexosas, que para su fermentación siguen la ruta de la glucólisis, presenta el siguiente balance neto: $1 \text{ glucosa} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ P}_i + 2 \text{ NAD}^+ \rightarrow 2 \text{ piruvato} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH} + \text{H}^+$ (Murray *et al.*, 2011).

El piruvato obtenido en la glucólisis es convertido en AGV, principalmente acético, propiónico y butírico, a través de distintas rutas metabólicas (Figura 3). El acetil-CoA producido a partir del piruvato por reacciones fosforoclasticas es metabolizado a acetato, a través de acetil-fosfato, o a butirato, a través de acetoacetil-CoA. La producción total de NAD en su forma reducida (NADH+H⁺), H₂ y CO₂ por molécula de glucosa fermentada hacia acetato o butirato es: 2 NADH + 2 H⁺, durante la glucólisis, y 2 H₂ + 2 CO₂, durante la descarboxilación del piruvato, reacción catalizada por la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (Fd) acoplada a una hidrogenasa. En este balance, una molécula NADH+H⁺ es oxidada durante la reducción del acetoacetil-CoA a butirato (Kim y Gadd, 2008).

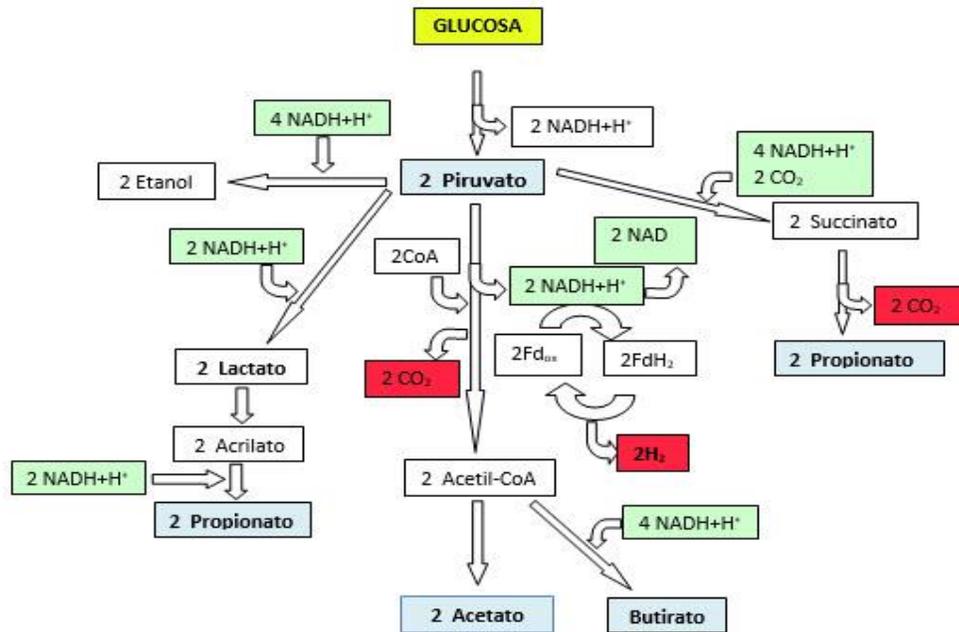


Figura 3. Fermentación ruminal a partir de glucosa. Adaptado de Moss *et al.* (2000).

4.9. Metanogénesis ruminal

La actividad metanogénica contribuye notablemente al sostenimiento de la fermentación ruminal, ya que mantiene una baja concentración de H_2 que favorece la oxidación del cofactor reducido nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), producido durante la glucólisis (Kim y Gadd, 2008), gracias a una relación sintrópica entre los microorganismos productores de H_2 y los metanógenos (Schink, 2006). El H_2 producido durante la glucólisis es perjudicial para el proceso fermentativo, ya que su acumulación inhibe la enzima $NADH+H^+$ ferredoxina oxidorreductasa, impidiendo la regeneración de NAD^+ , lo cual sólo es posible a muy baja presión de H_2 (Hegarty y Gerdes, 1998). Por lo que la producción continua de CH_4 representa uno de los mecanismos por los cuales la presión ruminal de H_2 disminuye (Kim y Gadd, 2008).

La relación existente entre metanógenos y protozoarios constituye un ejemplo de la transferencia de H_2 entre especies de microorganismos ruminales (Ramírez *et al.*, 2014). Se ha detectado la presencia de metanógenos en la superficie de protozoarios ciliados del rumen (Vogels *et al.*, 1980) y como endosimbiontes

dentro de los mismos (Finlay *et al.*, 1994). Newbold *et al.* (1995) estimaron que la relación entre metanógenos y protozoarios ciliados es responsable del 9 al 25% de la metanogénesis ruminal. Dado que en el rumen no es posible la respiración aeróbica, los protozoarios no contienen mitocondria sino organelos intracelulares denominados hidrogenosomas donde se libera el H₂ producido durante la oxidación del piruvato o malato (Müller, 1993). Por ello, se ha observado una estrecha relación entre metanógenos e hidrogenosomas (Ramírez *et al.*, 2014).

En el rumen existen principalmente tres sustratos para la metanogénesis (Figura 4): CO₂, compuestos con grupo metilo y acetato. Sin embargo, los metanógenos ruminales utilizan principalmente H₂ para reducir el CO₂ a CH₄ en una serie de reacciones acopladas a la síntesis de ATP, donde el CO₂ es utilizado como fuente de carbono y el H₂ como el principal donador de electrones (Leahy *et al.*, 2010). El formato también es un donador importante de electrones y puede llegar a contribuir con el 18% del CH₄ producido en el rumen (Hungate *et al.*, 1970).

Aunque las metilaminas y el metanol también pueden ser utilizados para la producción de CH₄ por los órdenes *Metanosarcinal* y *Metanobacterial*, su contribución en la metanogénesis total es muy pequeña (Janssen y Kirs, 2008). También se puede producir CH₄ a partir del acetato, a través de la vía acetilclástica, pero al igual que la reducción del grupo metilo, esta ruta metabólica es sólo utilizada por miembros del orden *Metanosarcinal*; además, el acetato es rápidamente absorbido y utilizado por el rumiante (Janssen y Kirs, 2008).

Debido a que el CH₄ es un producto final de la degradación del alimento en el rumen, las estrategias para reducir sus emisiones implican alterar los patrones de fermentación, reduciendo la producción de H₂ y formato, principales precursores para la metanogénesis en el rumen, y cualquier método para suprimir la producción de CH₄ en el rumen debe estar acompañado por un método para convertir el H₂ producido en otro producto de fermentación; de lo contrario, la acumulación de H₂ podría detener la degradación ruminal (Ramírez *et al.*, 2014).

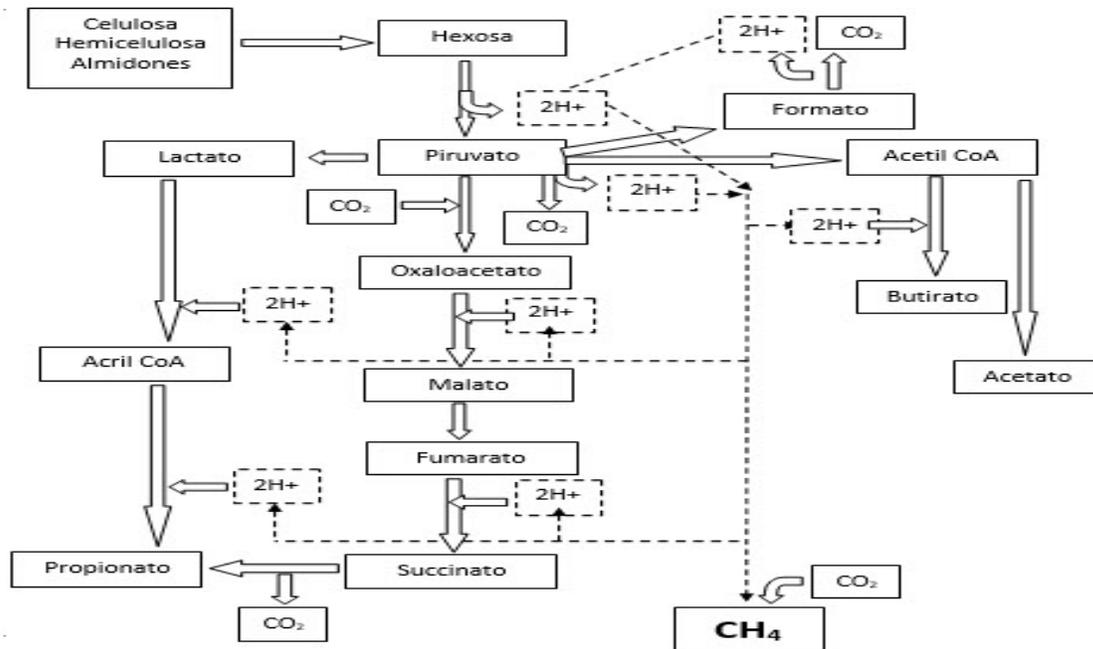


Figura 4. Principales rutas para la producción de CH₄ en el rumen. Tomado de Mitsumori y Sun (2008).

4.10. Estrategias para reducir la metanogénesis ruminal

La producción ruminal de CH₄ resulta en la conversión ineficiente de la energía contenida en el alimento, lo que se traduce en menor retención de esta por parte del animal hospedero (Ramírez *et al.*, 2014). El tema de la relación que tienen los metanógenos con otros microorganismos en el rumen es especialmente importante al considerar las estrategias de mitigación del CH₄. La mitigación del CH₄ es eficaz en una de dos formas: un efecto directo sobre los metanógenos o un efecto indirecto causado por el impacto de la estrategia sobre la disponibilidad de sustrato para la metanogénesis, generalmente a través de un efecto sobre los otros microorganismos del rumen (Hook *et al.*, 2010).

Numerosos autores (Beauchemin *et al.*, 2008; McAllister y Newbold, 2008; Eckard *et al.*, 2010; Benchaar y Greathead, 2011) han estudiado diferentes estrategias para disminuir la producción de CH₄, habiéndose estudiado el efecto que sobre la metanogénesis tienen la relación entre la cantidad de forraje y de concentrado en la dieta, el uso de aditivos (compuestos vegetales o compuestos sintéticos), que modulan la fermentación ruminal o la inmunización de los animales frente a

determinados microorganismos metanogénicos. También destacan otras estrategias, tales como, la utilización de lípidos en la dieta, el procesado del alimento para mejorar la digestibilidad, el tipo de forraje o el uso de nitratos (Figura 5) (Gerber *et al.*, 2013a).

Estrategia de reducción de metano	Mecanismo de acción y consideraciones a la hora de seleccionar la estrategia
Composición de la dieta (Incrementar hemicelulosa/almidón, disminuir pared celular)	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la tasa de pasaje, mayor proporción de propionato vs acetato, disminuye pH ruminal. • Cambio de la metanogénesis, riesgo de acidosis ruminal.
Lípidos (ácidos grasos, aceites, semillas, sebo)	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de metanógenos y protozoarios; mayor proporción de propionato vs. cetato; biohidrogenación. • Efecto sobre la palatabilidad, consumo, rendimiento y componentes de la leche.
Defaunación (químicos, aditivos)	<ul style="list-style-type: none"> • Elimina metanógenos asociados; menos hidrógeno para la metanogénesis. • Puede ocurrir adaptación de la microbiota; varía con la dieta; mantenimiento de animales defaunados.
Vacunas	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta inmune del huésped a los metanógenos. • Objetivos de vacunación; diferencia dependiendo del animal, dieta y localización geográfica.
Monensina	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe protozoarios y bacterias Gram+; falta de sustrato para la metanogénesis. • Puede ocurrir adaptación de la microbiota; varía con la dieta y el animal; prohibido en la UE.
Compuestos de plantas (taninos condensados, saponinas, aceites esenciales)	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad antimicrobiana; reduce disponibilidad de oxígeno. • Dosis óptima desconocida; se requiere más investigación in vivo; estudios a largo plazo; puede afectar la digestibilidad.
Ácidos orgánicos (fumarato, malato)	<ul style="list-style-type: none"> • Residuos de hidrógeno; mayor proporción de propionato versus acetato. • Varía con la dieta; se requiere más investigación in vivo; estudios a largo plazo; puede afectar la digestibilidad.

Figura 5. Estrategias para reducir la producción de CH₄ en los rumiantes (Modificado de Hook *et al.*, 2010).

4.11. Modulación de la fermentación entérica por metabolitos secundarios

Las plantas son organismos autótrofos que transforman energía luminosa en energía bioquímica como la glucosa mediante el proceso de fotosíntesis; además de su valor energético, su contenido de nutrientes las convierte en la base de la pirámide trófica del planeta (Azorín y Gómez, 2008). Entre las principales adaptaciones de las plantas están la formación de diversas moléculas orgánicas que no tienen una función directa con procesos del metabolismo primario como la fotosíntesis, respiración, asimilación y transporte de nutrientes, procesos anabólicos y catabólicos de aminoácidos y proteínas, azúcares simples y complejos, así como diferentes tipos de grasas y lípidos y, son conocidos como metabolitos secundarios (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

El metabolismo secundario se puede definir como el anabolismo y catabolismo de compuestos bioquímicos originados en el metabolismo primario, los cuales poseen funciones especializadas dependiendo de su origen celular (Piñol *et al.*, 2008). La presencia de estas defensas bioquímicas que protegen a la planta contra el ataque de diversos patógenos y el consumo de sus diferentes estructuras anatómicas por parte de artrópodos y vertebrados herbívoros (Wallace, 2004).

Patra y Saxena (2010) mencionan que se han estudiado y reportado más de 2×10^5 diferentes compuestos bioquímicos identificados como metabolitos secundarios; todos ellos conforman un grupo de muy alta heterogeneidad, la cual se explica por las diferentes condiciones físicas y edafológicas en las que se desarrollan las plantas. Actualmente se ha incursionado en la utilización de plantas arbóreas y arbustivas como fuente de alimento para el ganado productor de carne y leche, principalmente en las regiones tropicales; sin embargo, su uso se puede ver limitado debido a que poseen cantidades considerables de sustancias químicas naturales que son potencialmente peligrosas para la salud de los animales.

Los metabolitos secundarios que producen las plantas como defensa son muy variadas y se les atribuyen diferentes funciones: algunas inhiben la acción de agentes patógenos, mientras que otras provocan efectos negativos a distintos niveles del organismo que los consume, tales como irritación al contacto, náuseas o alteraciones gástricas (García *et al.*, 2005). Compuestos como las saponinas, ácidos fenólicos, taninos y lignina, tienen la capacidad de provocar efectos farmacológicos y toxicológicos en los animales que los consumen, también pueden tener efectos bactericidas o bacteriostáticos en la microbiota ruminal y actúan como inhibidores de la fermentación entérica (Carmona, 2007). De igual manera Ortiz *et al.* (2014), menciona que el consumo de algunos de estos puede afectar negativamente el consumo, la palatabilidad, la digestibilidad, la absorción de nutrientes o la salud del individuo.

Bodas *et al.* (2012), mencionan que los metabolitos secundarios pueden reducir el CH_4 de la fermentación ruminal. Idealmente, el CH_4 debería verse afectado por un

primario y selectivo efecto de los metabolitos secundarios a través de la inhibición directa de arqueas metanogénicas y/o la depresión de los procesos metabólicos microbianos involucrados en la metanogénesis. En algunos casos la producción de CH₄ se ve afectado como resultado de los efectos de los metabolitos secundarios sobre la fermentación ruminal, para redirigir los procesos a reacciones metabólicas que resultan en una menor producción de CH₄ (por ejemplo, fermentación hacia una mayor formación de propionato resultará en menos producción de CH₄), o reducirá el H₂ metabólico disponible para la metanogénesis (por ejemplo, con sumideros alternativos para eliminación de H₂). Finalmente, el CH₄ también se puede reducir si se deprime la fermentación ruminal, pero este efecto general inespecífico es de menor interés, ya que da como resultado una menor eficiencia en la utilización del alimento.

4.11.1. Taninos

Son compuestos polifenólicos de alto peso molecular (Kamra *et al.*, 2006) y tienen la capacidad de formar complejos con otros compuestos, especialmente proteínas, disminuyendo su digestibilidad (Waghorn, 2008). Son un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos solubles en agua, los cuales se encuentran en arbustos y árboles forrajeros, leguminosas, frutas, cereales y granos. Se han dividido en dos grupos con base a su origen químico: hidrolizables y condensados (Vélez *et al.*, 2014). Los taninos hidrolizables (TH) son ésteres fácilmente hidrolizables por ácidos, bases y enzimas. Están formados por una molécula de azúcar (generalmente glucosa) unida a un número variable de ácidos fenólicos, ácido gálico y elágico, agrupándose así en galotaninos y elagitaninos (Barbehenn y Constabel, 2011). Por su parte Peña (2007) menciona que los taninos condensados (TC) no son hidrolizables por ácidos ni enzimas y son conocidos como poliflavonoides o proantocianidinas, ya que están constituidos por flavonoides con diferente grado de condensación, además de carbohidratos y trazas de aminoácidos.

Los taninos afectan la digestibilidad de la celulosa en rumen debido a la disminución de la actividad microbiana; también alteran la estructura de la

celulosa, evitan la fijación de los microorganismos y el proceso fermentativo. El efecto inhibitorio de los taninos sobre la descomposición de la celulosa y la hemicelulosa en rumen se debe a la inactivación de las exoenzimas microbianas involucradas en el proceso de hidrólisis (Camacho-Escobar *et al.*, 2020). Adicionalmente disminuyen la absorción de nutrientes, principalmente aminoácidos esenciales como metionina y lisina (Carmona, 2007).

Vélez-Terranova *et al.* (2014) mencionan que el efecto de los taninos sobre la metanogénesis aún no se entiende completamente. Se ha encontrado que pueden inhibir el crecimiento o la actividad de los metanógenos y protozoarios del rumen por medio de mecanismos bactericidas o bacteriostáticos. También se pueden afectar las bacterias celulolíticas y consecuentemente la fermentación de los carbohidratos a ácidos grasos de cadena corta, en especial la producción de acetato; de esta manera se reduce la formación de CO₂ y H₂ necesarios para la metanogénesis (Bodas *et al.*, 2012).

Concentraciones dietarias de taninos entre 2–4% brinda beneficios sobre el metabolismo proteico, reduciendo la degradación a nivel ruminal y aumentando el flujo de aminoácidos que pueden ser absorbidos en el intestino delgado e incrementando el rendimiento animal sin afectar el consumo de alimento (Vélez-Terranova *et al.*, 2014). Por su parte Jayanegara, *et al.* (2012), a través de metaanálisis, concluyeron que el incremento en el nivel de taninos en la dieta disminuyó las emisiones de CH₄, sin embargo, los efectos claros y confiables sólo fueron alcanzados con niveles superiores a 20 g/kg MS.

Patra y Saxena (2010) mencionan que los taninos reducen la degradación de la proteína en el rumen a través de la formación de complejos entre estos compuestos, previniendo el ataque por los microorganismos. De manera general se considera que el modo de acción de los taninos para reducir la metanogénesis es a través de la disminución en el número de protozoarios y metanógenos, y por la reducción en la degradación de la fibra, sin embargo, todo va a depender de la estructura química y dosis en la dieta (Vélez-Terranova *et al.*, 2014).

4.11.2. Saponinas

De acuerdo con el carácter químico de la aglicona (conocida como sapogenina) las saponinas se dividen en esteroides y triterpenoides (Vélez-Terranova *et al.*, 2014). Los tipos de saponinas más encontradas son las triterpenoides especialmente en leguminosas, sin embargo, se puede encontrar una gran variedad de estos compuestos con diferentes propiedades biológicas dependiendo de la modificación en la estructura de su anillo y el número de azúcares adheridos (Patra y Saxena, 2010).

Las saponinas permiten disminuir la metanogénesis indirectamente al reducir la población de protozoarios (defaunación), los cuales están asociados a las bacterias metanógenas y cuya relación puede generar 9–37 % de las emisiones totales de CH₄ (Thagaard, 2007). Estos compuestos eliminan a los protozoarios formando complejos con esteroides en la superficie de sus membranas deteriorándolas hasta que finalmente se desintegran (Wina *et al.*, 2005). Por otra parte Patra y Saxena (2010), observaron una disminución en la tasa de producción de CH₄ por las bacterias metanogénicas cuando incluyeron saponinas, las cuales favorecen una mayor proporción de propionato, resultando en una menor oferta de hidrógenos necesarios para la producción de CH₄.

Wei-Lian *et al.*, (2005) encontraron que la inclusión de 0.2 g/L de saponinas redujo la producción de CH₄ sin afectar la digestibilidad *in vitro*, pero cuando se suministró una dosis de 0.4 g/L, se observó una disminución en la metanogénesis como consecuencia de una menor digestibilidad de la dieta la cual pudo ser ocasionada por la inhibición del crecimiento microbiano, incluyendo las bacterias celulolíticas y hongos. Patra y Yu (2013) observaron que la adición de dosis bajas de saponina combinada con nitrato, aumentan la población de *Fibrisolvans succinogenes*, mientras que al utilizar dosis altas se provoca su reducción. Por su parte, Zhou *et al.* (2011) al evaluar saponinas extraídas de té (*Camellia sinensis*) observaron una disminución de *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrisolvans succinogenes*, un aumento para *Butyrivibrio fibrisolvans* y ningún efecto sobre *Ruminococcus albus*.

Las saponinas en general tienen un efecto menor sobre el patrón de fermentación ruminal (Vélez-Terranova *et al.*, 2014). En muchos casos se aumenta la eficiencia ya que se disminuye la relación acetato:propionato sin afectar la degradabilidad de los sustratos, mejorando la productividad de los animales (Goel *et al.*, 2008).

4.11.3. Flavonoides

Según Vélez-Terranova *et al.* (2014), los flavonoides son compuestos polifenólicos que comprenden quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los compuestos fenólicos más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal, estando presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cascaras de las frutas. La mayoría de los flavonoides se encuentran comúnmente conjugados con azúcares en forma de glucósidos, también es común encontrar grupos hidroxilo en las posiciones 4, 5 y 7 (Crozier *et al.*, 2006; Patra y Saxena, 2010). Patra y Saxena (2010) afirman que las plantas que contiene flavonoides no solo reducen la producción de CH₄, sino que también estimulan el metabolismo microbiano en el rumen. Broudiscou y Lassalas (2000), realizaron un estudio donde evaluaron el efecto de *Lavandula officinalis* y *Equisetum arvense*, dos especies conocidas por el alto contenido de flavonoides, sobre la fermentación ruminal *in vitro* encontrando que el uso de ambas especies mejoró la tasa de fermentación en un 50% a través de un aumento en la liberación de acetato y propionato, reduciendo de esta manera la producción de CH₄.

4.11.4. Antraquinonas

Trabajos realizados por García-González *et al.* (2008) mostraron que la adición de plantas con alto contenido de antraquinonas, como la raíz de *Rheum officinale* y la corteza de *Frangula alnus*, mejoró la producción de butirato y propionato y redujo la producción de CH₄ y acetato; también se observó una baja disponibilidad de hidrógenos por lo que se supone que la primera forma de acción de estos compuestos es a través de la inhibición de las arqueas ruminales.

4.12. Sistemas silvopastoriles (SSP)

Estos sistemas se definen como una forma de producción de ganado en la que las especies de árboles y arbustos interactúan con los componentes tradicionales: pastos y ganado, bajo un esquema de manejo integral (Somarriba, 1992; Pezo e Ibrahim, 1998). Bajo tal definición se pueden incluir los sistemas agro-silvopastoriles, que son sistemas que combinan la producción agrícola y la ganadera, además de integrar a las especies perennes leñosas (Nair, 1985). En un SSP el componente forestal o silvícola lo representan especies leñosas, perennes y silvestres, que se preservan selectivamente, y que suelen estar bajo un manejo incipiente (Moreno-Calles *et al.*, 2013).

La integración de especies leñosas al sistema ganadero permite optimizar procesos biológicos como la fotosíntesis, el reciclaje de nutrientes y la actividad microbiana en el suelo, permitiendo incrementar la producción total por hectárea, empleando menos insumos externos (Devendra e Ibrahim, 2004; Murgueitio *et al.*, 2011). Asimismo, la presencia de una cobertura arbórea genera importantes beneficios ambientales: mejora la conectividad del paisaje (Chacón-León y Harvey, 2006), incrementando la biodiversidad que se mantiene (McNeely y Schroth, 2006; Estrada, 2008), y durante su desarrollo, las especies leñosas capturan grandes cantidades de carbono (Soto-Pinto *et al.*, 2009), contribuyendo a la mitigación del cambio climático. Zamora *et al.* (2001) menciona que los productores que incorporan árboles a sus potreros y lo utilizan como suplemento alimenticio encuentran múltiples ventajas en la época seca (no hay pérdida de peso, producción sostenida de leche, aumento de estros en las vacas y reducción del intervalo entre partos, la incidencia de enfermedades disminuye y se evita la trashumancia).

Entre los principales beneficios evaluados en los SSP, destaca el incremento en la fertilidad del suelo, ya que las raíces de los árboles aprovechan los nutrientes de capas más profundas, y pueden asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno o con micorrizas solubilizadoras de fósforo (Shibu, 2009). Se ha reportado también que la sombra que generan los árboles reduce el estrés calórico del ganado,

incrementando su tiempo destinado al pastoreo, lo que mejora la cantidad y calidad de leche y carne producida (Betancourt *et al.*, 2005). Además, se ha encontrado que algunas especies de leguminosas utilizadas como forraje presentan compuestos con actividad antihelmíntica por lo que el ganado presenta una menor incidencia de parásitos, mejorando la calidad de la carne producida (Murgueitio *et al.*, 2011).

Los SSP pueden ser diferenciados en: tradicionales (SSPt) o mejorados (SSPm), (Ibrahim *et al.*, 2007). Los SSPt incluyen sistemas silvopastoriles desarrollados empíricamente por la población local, como una forma de producción de acuerdo con los recursos a los que tienen acceso, por ejemplo, el uso de árboles como cercas vivas (Pezo e Ibrahim, 1998). Estos generalmente están asociados a sistemas de producción campesina que utilizan especies leñosas de la región como una forma de reducir costos de producción. Los SSPm incluyen sistemas silvopastoriles desarrollados experimentalmente en centros de investigación que posteriormente son promovidos para su adopción por parte de los productores. Por ejemplo, el establecimiento de un “banco de proteínas”, que se refiere a la siembra de árboles forrajeros (forrajes con 15% de proteína cruda o más) en bloques compactos y de alta densidad (Pezo e Ibrahim, 1998).

En un estudio realizado por Pinto y colaboradores (Cuadro 5) en el Estado de Chiapas, destacan la presencia la familia *Fabaceae*, (antes *Leguminosae*), la cual representa un 78,5% del total de las familias arbóreas y herbáceas considerados por los productores de la región como forrajeras. Las especies restantes pertenecen a la familia *Esterculiaceae* (7%), *Moraceae* (7%) y *Rubiaceae* (7%), el total de las especies identificadas por los productores son nativas.

Cuadro 5. Identificación botánica de las especies arbóreas de mayor uso forrajero en dos regiones del sur de México.

Nombres(s) local(es)	Nombre científico	Familia
Caulote, cuaulote	<i>Guazuma ulmifolia</i> Lamb	<i>Esterculiaceae</i>
Matarratón, cuchunuc	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq) Steud.	<i>Fabaceae</i>
Amate	<i>Ficus glabrata</i> HBK	<i>Moraceae</i>
Guanacaste	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq) Griseb.	<i>Fabaceae</i>
Quebracho, quiebracha	<i>Acacia milleriana</i> St.	<i>Fabaceae</i>
Guash, guaje	<i>Leucaena esculenta</i> (M.& S. ex A. DC.) Benth. Ssp. <i>collinsii</i> (B. & R.)	<i>Fabaceae</i>
Espino blanco, cuquet	<i>Acacia pennatula</i> Benth.	<i>Fabaceae</i>
Guamuchil	<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth.	<i>Fabaceae</i>
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Wild.	<i>Fabaceae</i>
Pie de venado, flor de murciélago	<i>Bauhinia unguolata</i> L.	<i>Fabaceae</i>
Maluco	<i>Genipa americana</i> L.	<i>Rubiaceae</i>
Guachipilin	<i>Diphysa robinoides</i> Benth.	<i>Fabaceae</i>
Guaje blanco	<i>Albizia caribaea</i> (Britton and Rose)	<i>Fabaceae</i>
Pitillo, machetito, pito	<i>Erythrina goldmanii</i> St.	<i>Fabaceae</i>

Fuente: Pinto *et al.* (2005).

En un estudio realizado en Colombia por Murgueito *et al.* (2014) (Cuadro 6), donde se evaluaron diferentes parámetros productivos en tres sistemas de producción de bovinos en el trópico, se observa que los sistemas silvopastoriles intensivos tienen la capacidad de sostener una mayor carga animal (3 UA/ha), mantener mayores ganancias de peso, tanto por animal como por superficie, se disminuye la cantidad producida de metano en relación a la cantidad de carne producida, y el balance de GEI es positivo, lo que implica que las emisiones generadas por los animales son superadas por la capacidad de captura de los diferentes estratos vegetales que componen estos sistemas de producción.

Cuadro 6. Parámetros de producción de carne y emisiones de metano (CH₄) en tres sistemas de producción ganadera tropical en Colombia.

Parámetro	Pastoreo convencional extensivo	Pastos mejorados sin árboles	SSPi (Sistema silvopastoril intensivo)
Carga UA/ha	0.5	1	3
Ganancia diaria/animal (Kg)	0.37	0.5	0.75
Ganancia diaria/ha	0.18	0.5	2.25
Días de ceba (de 250 a 440 Kg)	514	380	253
Emisión promedio de CH ₄ /año/ha (kg)	15.5	38	105
Kg de carne por ha/año (PV)	67.5	182.5	821.3
Emisión de CH ₄ por ton de carne producida	229.5	208.2	127.9
Emisión de CH ₄ (ton de CO ₂ eq)	48.20	43.73	26.85
Captura de C en el suelo (ton CO ₂ eq)	0	38.36	11.90
Captura de C (ton CO ₂ eq) en componente arbóreo y arbustivo	0	0	18.26
Balance GEI ton	-48204	-5370	3312

Modificado de Murgueitio *et al.* (2014).

4.13. Las leguminosas

La familia *Leguminosae* o *Fabaceae*, es una de las tres familias de plantas vasculares mejor representadas a nivel mundial. En la actualidad se reconocen 727 géneros y 19,325 especies de distribución cosmopolita, principalmente en las regiones cálidas y templadas. Las leguminosas comprenden 2,250 especies de *Caesalpinioideae*, 3,270 especies de *Mimosoideae* y 13,800 especies de *Papilionoideae*. En México esta familia se encuentra representada por 139 géneros y 1850 especies (Rzedowski *et al.* 2016).

Diversos autores consideran que las leguminosas constituyen el grupo más diverso en la península de Yucatán, formada por 260 especies con cinco variedades y una subespecie, sin mencionar que aún falta por explorar las poblaciones de los diferentes grupos, con la seguridad de que su flora aún deteriorada contiene especies nuevas (Standley, 1930; Sosa *et al.*, 1985; Flores y Espejel, 1994; Flores, 1987, 1999, 2001; Durán *et al.*, 2000; Arellano *et al.*, 2003; citados por Villalobos y Mendoza, 2010). De las 260 especies reportadas para la península de Yucatán, Campeche es el estado con mayor riqueza: tiene 192 especies, 6 variedades y 1 subespecie, de estas 120 son árboles, 95 hierbas y 18

arbustos (Villalobos y Mendoza, 2010). En un estudio florístico realizado en el Municipio de Tenabo, Campeche, se encontró que la familia más abundante fue la *Fabaceae*, con 35 géneros y 65 especies, representando el 30.9% del total de las especies (Zamora-Crescencio 2003). En otro estudio florístico realizado por Zamora-Crescencio *et al.* (2011) en el Ejido de Tepakán, Calkini, Campeche, las familias con mayor riqueza de especies fueron *Fabaceae* (14) y *Ebenaceae* (3), las cuales concentraron 39.53% del total de las especies encontradas. Las especies de mayor densidad fue *Acacia gaumeri* con 179 individuos, mientras que *Piscidia piscipula* ocupó el cuarto lugar con 87 individuos.

4.13.1. Leguminosas con potencial forrajero

La flora de la República Mexicana es rica en leguminosas forrajeras, y aunque son numerosas las especies de esta familia en las regiones áridas y templadas, la mayor diversidad se encuentra en las regiones tropicales (Claverán, 1978), el potencial de estas leguminosas no ha sido explorado adecuada ni suficientemente explotado.

Vélez-Terranova *et al.* (2014), sugieren que existe un gran número de especies de plantas con potencial para disminuir la producción de CH₄ que pueden ser usadas ya sea como aditivos alimenticios, suplementos o como alimento base para rumiantes en pastoreo. Por su parte, Van Soest (1994) indica que las leguminosas tropicales contienen mayor concentración de proteína y menor contenido de paredes celulares en su follaje con respecto a las gramíneas.

Estudios realizados por Jensen (2012) encontraron que el consumo de forrajes en pastoreo está influenciado por el tipo de metabolito secundario consumidos y la secuencia de alimentación, por ejemplo, en bovinos se observó mayor frecuencia de pastoreo cuando primero se les permitió pastorear leguminosas con contenidos ya sea de taninos o saponinas. Este estudio sugiere que los compuestos secundarios interactúan entre sí para influir en el consumo en pastoreo y que esta secuencia de alimentación se puede manipular. Por su parte Delgado *et al.*, (2007)

sugieren que la mezcla de gramíneas con un 25% de leguminosas mejoran el uso de la energía en los rumiantes y reducen entre 31 y 27% la producción de CH₄. Así mismo Molina *et al.*, (2013) en experimentos *in vitro* e *in vivo* demostraron que la inclusión de *Leucaena leucocephala* en dietas a base de gramíneas puede reducir la emisión de CH₄ en bovinos hasta en un 8%; mientras que Hess *et al.*, (2002), señalan que los taninos presentes en muchas leguminosas, como *Calliandra calothyrsus*, pueden estar asociados con la reducción en la producción de CH₄ hasta en un 50%, respecto a la dieta tradicional de pasto. Sin embargo, esto no está asociado a todas las leguminosas con potencial forrajero en el trópico; así, estos autores reportan que especies como *Cratylia argentea* y *Arachis pintoii* incrementaron los niveles de CH₄, hasta 3 a 4 veces la cantidad determinada en dietas con solo pasto.

Adicionalmente Ku *et al.* (2013) mencionan que una alternativa para reducir las emisiones de CH₄ generadas por los bovinos que pastorean gramíneas en las regiones tropicales, es la incorporación del follaje de árboles y arbustos en sus dietas, además se ha observado que esta práctica mejora los parámetros productivos. Por su parte Patra (2016) sugirió entre algunas opciones para la mitigación en las emisiones de CH₄ entérico, el uso del follaje de leguminosas tropicales dadas sus propiedades nutricionales y los servicios ambientales que prestan. En el estudio de Ku *et al.*, (2014) concluyen que los sistemas silvopastoriles podrían contribuir a reducir las emisiones de CH₄ procedentes del rumen por medio del efecto de algunos follajes y frutos que poseen metabolitos secundarios, capaces de afectar la fermentación ruminal. Por ejemplo, los frutos y el follaje de *Enterolobium cyclocarpum* (conocido como guanacastle o parota) contienen saponinas (compuestos terpenoides) que reducen la población protozoaria del rumen (afectando a las arqueas metanogénicas) y disminuyen consecuentemente la emisión de CH₄ al ambiente. Asimismo mencionan que estos sistemas pueden contribuir a mantener una productividad ganadera estable y sostenida durante todo el año, y que pueden ayudar a mejorar la calidad de la carne y o leche.

Por su parte Barros *et al.* (2012) refirieron que el follaje de *Leucaena leucocephala* contiene 29% de proteína cruda, que es altamente digestible (63 % *in vitro*), y que su producción de biomasa permanece constante durante el año. Por ello, la incorporación de leguminosas arbóreas como *Leucaena leucocephala* en los sistemas silvopastoriles es una alternativa para incrementar la producción de carne y leche de los rumiantes, ya que proveen de forraje rico en nutrientes indispensables para el crecimiento de los animales.

Diversos estudios han mostrado la importancia de incorporar leguminosas en la alimentación del ganado para mejorar los parámetros productivos. En un estudio realizado en Cuba por Lamela *et al.* (2005), se evaluó el comportamiento de toros cebú bajo cuatro sistemas de pastoreo con y sin árboles, utilizando pasto Guinea cv likoni en asociación con *Leucaena leucocephala*, *Bauhinia purpurea* y *Albizia lebbbeck*, y una carga animal de 3 cabezas/ha. Los resultados demostraron la superioridad de los sistemas de asociaciones comparado con el sistema tradicional fertilizado; sin embargo, no mostraron diferencias entre asociaciones, por lo que la inclusión de estos árboles forrajeros evidenció sus altos potenciales para ser utilizadas como alimento en sistemas con baja utilización de recursos externos. Por su parte Mayo-Eusebio *et al.* (2012) en estudios realizados en el Estado de Michoacán con bovinos en pastoreo en SPP con asociación de *Panicum máximum* var. Tanzania y 30.000 plantas de *Leucaena leucocephala*/ha informaron ganancias diarias de peso de 770 g.

Con respecto a la emisión de GEI, Naranjo *et al.*, (2012) mencionan que la mayor digestibilidad del forraje presente en los sistemas silvopastoriles es considerada como el principal factor para disminuir las emisiones de estos gases, observando que los sistemas silvopastoriles asociados con *Leucaena leucocephala* pueden disminuir hasta en un 30% las emisiones de CH₄ entérico por kg de MS consumido y hasta 38% las emisiones por animal. Por su parte Archimede *et al.* (2011) y Rivera *et al.* (2017) mencionan que el establecimiento de SPP que contemplen la presencia de leguminosas tropicales puede contribuir a una disminución de hasta en un 20% las emisiones de CH₄ por kilogramo de carne o leche producida, y por

kilogramo de materia seca consumida por bovinos, en comparación con el pastoreo en praderas de gramíneas.

Como se describió previamente, existe información respecto al uso de diversas leguminosas forrajeras tropicales en la alimentación del ganado; sin embargo, existen otras especies que han sido poco aprovechadas, debido a factores como la escasez de semilla comercial o desconocimiento de su manejo, por lo que se desconoce su potencial nutricional y en la fermentación ruminal (Sosa-Montes et al., 2020). A continuación, se describen las características de cuatro especies de leguminosas forrajeras:

4.13.1.1. *Bauhinia divaricata* L.

La especie *B. divaricata* es conocida comúnmente como tatil bichim (huasteco), pata de res, pata de vaca, pata de venado, pie de cabra (Rzedowski & Rzedowski, 1997); en Maya como chandzulutok, cocohoof, dsuruktok, ts'ulubtok, turku-tov, xdzuruntok, xpata, vaca-xmaywakax (Torres-Colín et al., 2009). En la zona de estudio (Maya) se le conoce como tzulutoc. Generalmente se encuentra en la selva baja caducifolia, selva mediana subcaducifolia y subperrenifolia, penetra también a encinares contiguos, a menudo en la vegetación secundaria derivada. Se distribuye en tierra caliente y húmeda a subhúmeda de casi todo México, extendiéndose hasta Costa Rica y las Antillas (Rzedowski & Rzedowski, 1997).

Es un arbusto hasta de 8 m de alto perteneciente a la subfamilia *Caesalpinioideae*; ramillas pubérulas o tomentulosas a glabrescentes; estípulas linear-subuladas a ovadas, de 1 a 3 mm de largo, moderadamente persistentes o caducas, peciolo de 0.5 a 4 (6) cm de largo, lámina suborbicular o subcuadrada a lanceolada en contorno general, ápice emarginado a profundamente bilobado, de 2 a 12 cm de largo y 2 a 10 cm de ancho, lóbulos divaricados a paralelos, acuminados a redondeados en el ápice, base cordada a redondeada, margen entero a algo repando, con 5 a 9 nervaduras principales, de textura membranácea a subcartácea, estrigulosa a tomentulosa y a menudo glabrescente en el haz, más densa y permanentemente pubescente en el envés; racimos terminales o subterminales, pedúnculo hasta de 5 cm de largo, eje floral hasta de 7 cm de

largo, llevando (10) 20 a 50 flores, pedicelos de 0.5 a 2 cm de largo; botones lineares a algo claviformes, de 1.2 a 2 cm de largo; hipantio de 2 a 3 mm de largo, cáliz espatáceo; pétalos 5, subiguales, blancos, pero a menudo tornándose rosados con la edad, de 1.5 a 2.8 cm de largo, sus láminas lanceoladas, de 1.5 a 6 mm de ancho, estrechándose hacia una uña glabra, tan larga o con más frecuencia más corta que la lámina; estambre fértil 1, su filamento tan largo a dos veces más largo que los pétalos, antera de 2 a 2.8 mm de largo, estaminodios 9, de 1 a 1.8 cm de largo, connatos en 2/3 o en casi toda su longitud, blancos o rosados, a veces llevando anteras diminutas; gineceo tan largo o más largo que el estambre fértil en la antesis, pilósulo, estípite hasta de 2.5 cm de largo; legumbre sobre un estípite de 2 a 2.5 cm de largo, linear-oblonga, de 8 a 12 cm de largo, de 1.2 a 1.8 cm de ancho, de color café; semillas oblongas a suborbiculares, de 8 a 10 mm de largo, cafés oscuras, opacas (Rzedowski & Rzedowski, 1997).

Entre los usos de *B. divaricata* se reportan los siguientes: la madera se utiliza para construcción de casas, palapas, gallineros, cercas y otras construcciones rurales, en medicina se emplea contra el dolor de estómago, bronquitis, asma, colitis y la mordedura de serpientes (Torres-Colín *et al.*, 2009). Rojas-Chávez (2010) la describe como una planta perene, se encuentra principalmente en ambientes ruderales, como orillas de carreteras. También se puede encontrar en potreros y plantaciones tropicales, ocasionalmente se usa como ornamental, además es una melífera importante. En Yucatán se reporta uso de la corteza interior para fabricar lazos toscos, para la construcción rural, cercas, etc. También se usa como forrajera, para propósitos de construcción y de fabricación de trampas para animales.

En un estudio realizado por Sosa-Rubio *et al.* (2004), donde se evaluó el potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales en el estado de Quintana Roo, se reportan diferentes usos (forraje, sombra y ornamental) por los productores para *B. divaricata*. En este estudio reportan valores de contenido de 13.75% de PC, 48.06% de FDN y 34.72% de FDA, así como una digestibilidad *in vitro* de MS de 38.7%. Por su parte, Cab-Jiménez *et al.* (2015), en un estudio realizado en

Campeche sobre la composición química y digestibilidad de árboles tropicales forrajeros, encontraron valores de digestibilidad a las 72 horas de la MS *in vivo* de 67.1%, así como un contenido de 16.9% de PC, 60.9% de FDN y 35.4% de FDA durante la época de sequía. Existen pocos reportes sobre el contenido de metabolitos secundarios; sin embargo, recientemente Albores-Moreno *et al.* (2018), reportaron un contenido de 38 g/kg de MS taninos condensados, así como presencia muy abundante de alcaloides. Estos mismos autores reportaron presencia abundante de saponinas, mientras que en el estudio de Cal-Jiménez *et al.* (2015) fue negativo.

4.13.1.2. *Dalbergia glabra* (Mill.) Standl

D. glabra es una leguminosa forrajera sin nombres comunes conocidos (CICY, 2010), pero conocida localmente como “muc” (Comunicación personal). Es un arbusto voluble o escandente, perteneciente a la subfamilia *Papilionoideae*. Presenta flores blancas, estigma truncado, anteras cordadas en la base; folíolos 1-9, folíolos de menos de 4 cm, la mayoría de folíolos de menos de 2 cm de largo, flores de 5-6 mm, inflorescencias muy densas, mayormente axilares, habitando mayormente en lugares abiertos o rocosos, no en lugares pantanosos o inundados, pedicelos, 1-2(-2.5) mm, frutos aplanados linear-oblongo u oblongos, 4-10.5 × 0.9-1.2(-1.4)cm, atenuados hacia los extremos, con una nudosidad conspicua a la altura de las semillas y con las nervaduras convergiendo oblongo (Linares y Sousa, 2007).

En una investigación realizada en el Ejido Kantunilkin, Lázaro Cárdenas, Quintana Roo, sobre plantas nativas forrajeras, López-Herrera *et al.* (2008), realizaron encuestas a productores, cazadores y practicantes de medicina tradicional, quienes reportaron a *D. glabra* como especie con potencial forrajero, en dicha zona se le conoce con el nombre común de “verde”. En dicho estudio, reportaron un contenido de PC, FDN y FDA de 18.74, 62.91 y 41.56% respectivamente, así como presencia de saponina, fenoles y alcaloides.

En la zona de estudio de esta tesis, *D. glabra* es comúnmente observada en potreros y en la vegetación natural, así como en áreas perturbadas. Se considera una maleza muy resistente en las plantaciones de caña de azúcar y es una especie altamente forrajada durante todo el año si se encuentra presente en los potreros (Comunicación personal). Además, es de interés relevante como especie melífera y maderable (CICY, 2010).

4.13.1.3. *Piscidia piscipula* (L.) Sarrg

P. piscipula se le conoce con el nombre común de jabín, habin o ja'abin (maya) (CICY, 2010). Es un árbol de 15 a 26 m de altura y de 57 a 62 cm de diámetro. Tiene ramas jóvenes verdes, con lenticelas. Estipulas anchas y caen rápido. Hojas compuestas, alternas, pinnadas con 3 a 4 pares de folíolos y uno terminal. Folíolos de 4 hasta 10 cm de largo y 2 a 5 cm de ancho, verde amarillento en el haz y verde grisáceo en el envés, con pelos cortos. Nervaduras secundarias conspicuas. Flores de color rosado con una parte morada, en inflorescencias axilares. El fruto es una vaina con cuatro alas onduladas, de color verde amarillento, de 2 a 8 cm de largo y 2 a 3 cm de ancho (Vester y Navarro, 2007).

Se reportan diversos usos de *P. piscipula* que son de importancia en la Península de Yucatán, como néctar-polinífera, forrajera, ornamental y nodriza para otras plantas, además de que sus hojas y madera son utilizados en la cobertura del foso de rocas incandescentes, propias del proceso de elaboración del Pib, requerido para preparar el Pibil, una especialidad culinaria Maya de la Península de Yucatán. También tiene usos medicinales y como combustible (Zamora-Crescencio *et al.*, 2009). En la zona de estudio de esta tesis, *P. piscipula* es de gran importancia como planta melífera, se usa como cercos vivos, forraje, para postes, como sombra para los animales, además de todos los servicios ambientales que prestan las especies leguminosas, en estado de floración aporta belleza escénica, y sus flores cuando caen son consumidas por especies silvestre como el venado cabrito o Yuc (*Mazama temama*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y el pavo ocelado o pavo de monte (*Meleagris ocellata*) (Comunicación personal).

Respecto a su potencial como alimento para ganado, en el estudio de Cab-Jiménez *et al.* (2015), realizado en el Estado de Campeche sobre árboles tropicales forrajeros, reportaron que *P. piscipula* tenía valores de PC del 18.3%, para FDN y FDA valores de 52.9 y 40.7%, mientras que de la digestibilidad de la MS fue cerca del 60.0%, y no mostró presencia de saponinas en muestras recolectadas en estación seca. Por su lado, Albores-Moreno *et al.* (2018), en un estudio realizado en arboles forrajeros de vegetación secundaria (Acahual), reportaron valores para PC del 15.5%, para FDN y FDA, valores de 55.3 y 44.8% respectivamente, para la digestibilidad *in vitro* e *in situ* reportan valores de 44.27 y 51.80%, así como un contenido de 2.6% de taninos condensados, y presencia abundante de saponinas y alcaloides. Por su parte Sosa-Rubio *et al.* (2004), en un estudio sobre evaluación de potencial forrajero de árboles y arbustos forrajeros en el Estado de Quintana Roo, *P. piscipula* fue identificada por los productores con usos forrajeros, para cercos vivos y como sombra para los animales. En este estudio tuvo un contenido de 11.51% de PC, y 61% y 47.8% de FDN y FDA, respectivamente, así como 51% de digestibilidad de la MS *in vitro*. Por otro lado, López-Herrera *et al.* (2008), reportaron 12.6% de PC, 50% de FDN y 34.6% de FDA (estos últimos menores a los reportados por Sosa-Rubio *et al.* (2004), así como presencia para saponinas y fenoles).

4.13.1.4. *Caesalpinia vesicaria* L.

C. vesicaria es conocida como mareña (español) o ya'ax k'iin che' (maya) (CICY, 2010). También se le conoce como carbón, y en la zona de estudio de esta tesis se le conoce localmente como “Chaquec” (Comunicación personal).

Es un árbol pequeño a mediano; el tronco tiene corteza con gruesas protuberancias parecidas a las del Jocote Jobo; ramitas y hojas armadas con acúleos rectos o inermes; hojas pinnadas con folíolo bilobulados en el ápice. Posee flores amarillas en racimos apicales, vainas un poco gruesas pero dehiscentes con semillas orbiculares de color café y lustroso. Es una especie del bosque seco (0- 400 msnm), que se distribuye desde México hasta Nicaragua (Quezada *et al.*, 2010).

Tiene diversos usos como: leña, carbón, horcones para construcciones rústicas, vigas, puentes, poste de cerca y ornamental. Las legumbres tienen un tinte negro permanente. El carbón pulverizado de la corteza es un remedio doméstico contra la diarrea en niños (Quezada *et al.*, 2010). En la zona de estudio, *C. vesicaria* es utilizada para la construcción de casas rústicas, en cercos vivos, para postes, debido a que su madera es muy dura y resistente; en los potreros se encuentra proporcionando sombra para los animales, sus hojas no son muy palatables y solo son consumidas cuando hay alta escasez de forraje (épocas secas), principalmente por ovinos. Aporta belleza escénica por sus flores coloridas (amarillas), y a diferencia de su follaje, sus frutos son bien consumidos por el ganado cuando caen en los potreros. Asimismo, se ha observado que son consumidos por especies de fauna silvestre como el venado cabrito o yuc (*Mazama temama*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), puerco de monte o pécarí de collar y localmente conocido como quitán (*Dicotyles tajacu*), por lo que también puede ser una especie potencial para la conservación de fauna silvestre.

Al momento, no hay estudios que reporten su aporte nutrimental o valor nutricional; sin embargo, se reporta como una especie rica en taninos (CICY, 2010).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación

La colecta de los follajes de las leguminosas se realizó en el ejido de Sihochac, en el municipio de Champotón, Campeche, localizado geográficamente 19° 50' latitud norte y 90° 58' longitud oeste, con una altitud de 20 msnm, con clima subhúmedo con lluvias en verano (García, 2004).

Los análisis de degradabilidad y producción de gas *In vitro* se realizaron en el Laboratorio de Ciencia Animal, en el Colegio de Postgraduados Campus Campeche, en Campeche. El análisis proximal, determinación de AGV y N-NH₃ se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal, del programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, localizado en el Estado de México. Mientras que el contenido de metabolitos secundarios se realizó en el laboratorio del Tecnológico de Chiná, en Campeche.

5.2. Colecta

En el mes de abril del 2019, se colectaron las muestras de los follajes de las cuatro especies de leguminosas (*Caesalpinia vesicaria*, *Piscidia piscipula*, *Dalbergia glabra* y *Bauhinia divaricata*), así como de la gramínea *Panicum máximum*.

Se colectaron 5 kg materia verde (hojas y tallos tiernos) de cada especie simulando el ramoneo de un bovino adulto (2.5 mt de altura). Las muestras se secaron a 50°C en una estufa de aire forzado por 72 h. Las muestras secas se molieron (malla de 1 mm) y se conservaron en refrigeración.

5.3. Análisis químicos

Se analizó por triplicado el contenido de MS, C, PT, y por duplicado el EE, de acuerdo con los métodos de la AOAC (2005); la FDA y FDN se determinó de acuerdo con la técnica de Van Soest *et al.*, (1991). La determinación de metabolitos secundarios se realizó de acuerdo con la metodología de Valencia del Toro y Garín-Aguilar (2010).

5.4. Fermentación *In vitro*

El procedimiento para la colecta de líquido ruminal estuvo alineado a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, 1999), “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, vigente en México. El líquido ruminal se colectó de 4 novillos de diferentes razas con un peso promedio de 530 kg, alimentados con paja de pasto (65%), y un concentrado de maíz molido y granos secos de destilería (35%), cubriendo los requerimientos mínimos de nutrientes. Los animales tuvieron un periodo de adaptación a la dieta de tres semanas, con la finalidad de obtener muestras homogéneas. La colecta de líquido ruminal se realizó por la mañana, una hora antes de la alimentación. El líquido ruminal colectado se filtró a través de cuatro capas de manta cielo, y se depositó en un termo a una temperatura de 39°C (esto con la finalidad de mantener las condiciones de temperatura al que se encuentra el rumen), e inmediatamente fue transportado al laboratorio. El líquido ruminal colectado fue filtrado nuevamente en cuatro capas de manta cielo, se mezcló con una solución buffer previamente preparada y calentada en baño María a 39° C y este fue utilizado como inóculo.

La preparación del inóculo se realizó bajo la metodología de Menke *et al.* (1979). Cada litro de inóculo se compone de 666 mL de solución mineral reductora (SMR) y 334 mL de líquido ruminal. Cada litro de SMR está compuesto por 750 mL de agua destilada, 50 mL de solución buffer, 150 mL de solución mineral, 50 mL de solución reductora y se adicionaron 2 gotas de rezarsurina.

Antes de la preparación del inóculo se pesaron 0.5 g de cada muestra del follaje molido, por triplicado y se colocaron en un vial de vidrio con capacidad de 120 mL. Posteriormente se adicionaron 50 mL de inóculo en cada vial, antes de ser tapados se suministró CO₂ para mantener las condiciones anaerobias, posteriormente se colocó un tapón de goma y arillo metálico para garantizar que estuvieran herméticamente serrados, los viales se colocaron en baño maría a 39°C, agitándose manualmente cada que se realizaron las mediciones de gas (Menke *et al.*, 1979).

5.5. Degradabilidad *In vitro* de la MS (DIVMS)

La DIVMS (mg/g MS) (Menke *et al.*, 1979), se determinó a las 24 y 72 horas. Para cada horario se sacaron los viales del baño maría y se colocaron en un recipiente con agua y hielo, posteriormente se conservaron en el refrigerador a 4°C, con la finalidad de detener la actividad de los microorganismos ruminales. Una vez realizado lo anterior se filtró el contenido del vial (pasado por filtro de papel número 1, con una bomba de vacío) y se colocaron a peso constante en una estufa a 80°C, durante 24 horas, para obtener PRS:

$$DMS, mg/g MS = \left(\frac{PMS - (PRS - PB)}{PMS} \right) * 1000$$

Dónde: **PMS**= Peso de la muestra seca al inicio de la fermentación en gramos.
PRS= Peso del residuo seco después de la fermentación en gramos. **PB**= Peso del blanco, inóculo sin muestra de follaje en gramos.

5.6. Producción de gas (PG) de follajes tropicales *In vitro*

La PG se registró a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 horas. Con un manómetro, se midió la presión pinchando el tapón del vial y se realizó la lectura directa (kg/cm²).

5.7. Determinación de CH₄

La determinación de CH₄ se realizó a las horas 6,12, 18 y 24 h de fermentación. Utilizando una jeringa de vidrio de 60 mL, se colectó el gas producido en los frascos incubados con el inóculo y el sustrato y se transfirió a un vial que contenía 40 mL de hidróxido de sodio 1N. Se agitó suavemente para asegurar la incorporación del gas a la solución y se colectó el gas residual utilizando la misma jeringa. El gas obtenido del vial con hidróxido de sodio corresponde a CH₄ más gases menores (Fieves *et al.*, 2005).

$$\text{Metano (\%)} = \left(\frac{\text{Residual} \cdot x \cdot 100}{\text{Total}} \right)$$

5.8. Determinación de metabolitos secundarios

Este análisis se efectúa para determinar los principales grupos de metabolitos presentes en plantas y hongos, los extractos obtenidos se ponen en contacto con diferentes reactivos químicos y se observan las reacciones de coloración y/o precipitación que se obtengan y a partir de ellas se determina la presencia o ausencia de los diferentes metabolitos (Valencia del Toro y Garín-Aguilar, 2010).

Lo primero fue obtener un extracto etanólico. Para ello se pesaron 25 g de muestra molida, se colocaron en un matraz de fondo plano de 250 a 500 mL, se agregó etanol procurando cubrir máximo 2/3 partes de su volumen, se cerró herméticamente y se dejó reposar por tres días en un lugar fresco y oscuro. El extracto etanólico obtenido se usa para los siguientes ensayos:

5.8.1. Alcaloides

Tomar una porción del extracto y adicionar entre 5 mL a 10 mL de ácido clorhídrico al 10%, calentar a ebullición por cinco minutos, enfriar y filtrar. Posteriormente dividir el filtrado en 3 tubos de ensaye, uno de los cuales servirá como testigo.

Tubo 1. Adicionar una gota del reactivo Dragendorff, la prueba se considera positiva si se forma un precipitado naranja.

Tubo 2. Se adiciona una gota del reactivo Sonneschain la prueba se considera positiva si se forma un precipitado naranja.

5.8.2. Flavonoides

Disolver 0.5 mL del extracto en 2 mL de etanol absoluto y dividir en tres tubos. El tercero será el testigo.

1) Reacción de Shinoda. Adicionar 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, si se obtiene una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas. En caso de haber cambio, se coloca un trozo de magnesio metálico, si se forma una coloración naranja a rojo, indica la presencia de flavonas; si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas.

2) Reacción de hidróxido de sodio al 10%. Se adicionan 3 gotas de hidróxido de sodio, si se forma una coloración de amarillo a rojo, indica la presencia de xantonas y flavonas; de café a naranja de flavonoles; de púrpura a rojizo de chalconas y azul de antocianinas.

5.8.3. Saponinas

Prueba de altura y estabilidad de espuma. En un tubo de ensaye colocar 1 mL de extracto, agitar vigorosamente, si se forma espuma se considera positivo si esta alcanza una altura de 8 mm a 10 mm y se mantiene estable por 30 minutos.

Reacción de Lieberman Bouchard. Se concentran 0.5 mL de extracto hasta 0.2 mL; después se agregan 2 gotas de acético anhidro y se estratifica con 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Al formarse una coloración azul o verde en la interfase, hay presencia de saponinas esteroidales; si la coloración es rosa, roja, magenta o violeta habrá presencia de saponinas triterpenoides.

Reacción de Rosenthaler. A otra porción del extracto concentrado, adicionar dos gotas del reactivo Rosenthaler y estratificando con dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Si se forma coloración violeta, se considera positiva para saponinas triterpenoides.

5.8.4. Taninos

A 1 mL del extracto adicionar 2 mL de agua destilada y 3 gotas de cloruro de sodio al 2%, calentar a ebullición por un minuto, enfriar y filtrar. Dividir el filtrado en cuatro tubos de ensaye, el cuarto utilizar como testigo.

Reacción de Cloruro férrico. Se adiciona una gota de cloruro férrico al 1%, la formación de coloraciones de azul a negro indica la presencia de derivados del ácido gálico y coloraciones verdes de derivados del catecol.

Al tercer tubo, se agrega una gota de ferricianuro de potasio al 1%. La formación de una coloración azul, indica la presencia de compuestos fenólicos.

5.8.5. Quinonas

Se colocan 2 mL del extracto en una cápsula de porcelana y se concentra a sequedad, posterior a ello se divide el extracto siruposo en tres porciones.

Reacción de hidróxido de amonio. Se adiciona una gota de hidróxido de amonio concentrado al extracto. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que aparece en los dos primeros minutos.

Reacción con ácido sulfúrico. Se agrega 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción del extracto. La formación de una coloración roja indica la presencia de antraquinonas.

Reacción de Börntrager. Se diluye una porción del extracto con 3 mL de agua destilada, filtrar, al líquido filtrado, se le añaden 3 mL de hidróxido de potasio al 5%; calentar a ebullición por 3 minutos, enfriar y realizar una extracción con 3 mL de cloroformo. Se elimina la fase acuosa y a la fracción clorofórmica se le adicionan 2 mL de hidróxido de potasio al 5%. Un color rojo indica la presencia de benzoquinonas; si es amarillo verdoso, adicionar 1 gota de peróxido de hidrógeno al 6%. Si la coloración cambia a roja, se consideró positiva para derivados de antrona.

5.8.6. Cumarinas

Reacción de Erlich. Se colocan 0.5 mL de extracto en una capsula de porcelana, se concentra y se agregan dos gotas de Reactivo de Erlich y una gota de ácido clorhídrico concentrado. Una coloración naranja indica la presencia de cumarinas.

Reacción con hidróxido de amonio. Se concentra una porción del extracto y se le adicionan 0.5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta.

5.9. Concentración de nitrógeno amoniacal en la fermentación *In vitro*

La cantidad de nitrógeno amoniacal de la fermentación *In vitro* a las 24 horas se determinó con la técnica de McCulloch (1967). Se colectaron 4 mL de inóculo de los

viales de la fermentación *in vitro* de las 24 horas y se colocaron en un tubo que contiene 1 ml de ácido metafosfórico al 25%. Posteriormente se centrifugó a 3500g durante 15 min, el sobrenadante se recuperó y almacenó a 4°C. Para el análisis se colocó 1 ml de fenol, 20 µl de la muestra y 1 ml de hipoclorito de sodio, esta se incubó en baño maría a 37°C durante 30 min y se agregaron 5 ml de agua destilada. Para medir la concentración de nitrógeno amoniacal se utilizó el espectrofotómetro y la lectura se realizó a una longitud de onda de 630 nm. La curva estándar se preparó a concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 mg/dl, para el blanco se utilizó 1 ml de fenol y 1 ml de hipoclorito.

5.10 Cálculos y análisis estadístico

5.10.1 Energía metabolizable

La energía metabolizable se calculó de acuerdo con Menke *et al.* (1979)

$$ME = 2.2 + 0.136 (PG) + 0.057 (PT)$$

Dónde: **ME**= Energía metabolizable en MegaJoules/kg MS, **PG**= Producción de gas acumulado a las 24 horas en ml/200mg MS, **PT**= Proteína total en g/kg MS.

5.10.2. Volumen máximo, tasa de fermentación y fase lag

Para obtener el volumen máximo (V_m), la tasa de fermentación (h^{-1}) y la fase lag (h), se usó el programa SAS (2002), utilizando el siguiente modelo (Kholif *et al.*, 2017):

$$V_o = V_m / (1 + e^{(2 - 4 * s(t - L))})$$

Dónde: **V_o**= volumen de gas acumulado en mL/ g MS, **V_m**= volumen máximo en mL/ g MS, **S**= tasa de fermentación (h^{-1}), **t**= tiempo, **L**= fase lag (h), **e**= base de logaritmos naturales.

5.10.3. Factor de partición

El FP es la relación entre la DIVMS (mg/g) y la PG (ml/g MS), el cual se calculó a las 24 horas de incubación y se utilizó el siguiente modelo (Kholif *et al.*, 2017):

$$FP_{24} = MSD / PG$$

Dónde: **MSD**= Materia seca degradada a las 24 horas en mg/g, **PG**= Producción de gas acumulado a las 24 horas en ml/g MS.

5.10.4. Diseño experimental

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño en bloques completamente al azar. Los resultados se analizaron con el procedimiento GLM del programa estadístico SAS 9.0 (2002) y se analizó la comparación de medias con la prueba de Tukey con una probabilidad menor o igual a 5%.

$$Y_{ij} = \mu + \bar{o}_i + \beta_j + E_{ij}$$

Dónde: **Y_{ij}**= Variable aleatoria observable del i-ésimo tratamiento a la j-ésima repetición, **μ**= Media aritmética, **Ö_i**= Efecto del i-ésimo y tratamiento, **β_j**= Efecto del j-ésimo bloque, **E_{ij}**= Error aleatorio correspondiente al i-ésimo tratamiento de la j-ésima repetición.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización del contenido nutricional

El análisis bromatológico mostró variaciones en el valor nutricional del follaje de las cuatro leguminosas y el pasto *P. maximum* (Cuadro 7). El contenido más alto de PT lo presentó *D. glabra*, mientras que el valor más bajo fue para *C. vesicaria*. En general, el contenido de PT de las leguminosas evaluadas fue menor que lo reportado en otros estudios. Al respecto, el valor de PT obtenido con *D. glabra* fue menor a lo reportado por López-Herrera *et al.* (2008), quienes mencionan un valor de 18.7% en muestras de plantas de Quintana Roo. Por otro lado, el contenido de PT de *B. divaricata* y *P. piscipula* también fue menor a lo reportado por Albores *et al.* (2018) y Cab *et al.* (2015), quienes reportan valores de 15.7% y de 16.9 a 18.8%, respectivamente para *B. divaricata*, y 15.5% y de 17.1 a 18.3%, respectivamente para *P. piscipula*, pero fue similar el contenido de 12.78% de PT de *B. divaricata* reportado por Gómez-Fuentes-Galindo *et al.* (2017). El valor de la PT obtenido para el pasto *P. maximum* fue similar al reportado por Gómez-Fuentes-Galindo *et al.* (2017), pero por debajo de lo reportado por Barros *et al.* (2012), de 6.26% y 11.4%, respectivamente.

La FDN se refiere al contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina principalmente. Los resultados obtenidos para los follajes estudiados también fueron variables, donde el menor contenido lo presentó *C. vesicaria*, y el más elevado por *D. glabra*, este último muy por debajo al reportado por López-Herrera *et al.* (2008), cuyo valor fue de 63% de FDN. La leguminosa *B. divaricata* presentó un contenido de FDN menor a lo reportado por Albores *et al.* (2018) y Gómez-Fuentes-Galindo *et al.* (2017), de 56.1% y 46.5%, respectivamente. El follaje de *P. piscipula* presentó un valor similar al reportado por Gómez-Fuentes-Galindo *et al.* (2017) (41.7%) pero menor al reportado por Albores *et al.* (2018), con 53.3%. El pasto *P. maximum* presentó el valor más alto de FDN siendo similar a lo reportado por Albores *et al.* (2018), Gómez-Fuentes-Galindo *et al.* (2017) y Ku *et al.* (2014).

Para el EE, que representa la fracción correspondiente a los lípidos que contienen los follajes, el valor más bajo lo presentó *D. glabra*, y el valor más alto fue para *C. vesicaria*; *B. divaricata* mostró un contenido ligeramente mayor al reportado por Albores *et al.* (2018) de 1.5%; mientras que *P. piscipula* presentó un contenido similar a lo reportado por Albores *et al.* (2018) y Ayala *et al.* (2006). Cabe mencionar que no se encontró información del contenido nutricional de *C. vesicaria*.

Cuadro 7. Composición química del follaje de las leguminosas *C. vesicaria*, *D. glabra*, *B. divaricata* y *P. piscipula*, así como del pasto *P. máximum*.

Follaje	MS ¹	C ¹	PT ¹	FDN ¹	FDA ¹	EE ¹
<i>Panicum máximum</i>	96.46	11.89	5.06	66.60	41.82	1.97
<i>Caesalpinia vesicaria</i>	96.11	12.01	8.52	33.24	28.23	3.05
<i>Dalbergia glabra</i>	95.78	6.58	14.26	44.31	37.69	0.96
<i>Bauhinia divaricata</i>	95.97	10.02	12.12	39.49	28.91	2.03
<i>Piscidia piscipula</i>	95.45	10.80	11.03	44.19	36.46	2.79

¹Valores expresados porcentaje en base seca. MS: materia seca, C: cenizas, PT: proteína total, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, EE: extracto etéreo.

6.2. Determinación de metabolitos secundarios en los follajes

Los resultados de las pruebas cualitativas para metabolitos secundarios se presentan en el Cuadro 8, observándose variaciones entre las diferentes especies de plantas forrajeras. Para el caso de taninos derivados del ácido gálico (taninos hidrolizables), todas las especies bajo estudio mostraron presencia cuantiosa a notable. Al respecto, diferentes estudios reportan que las leguminosas forrajeras presentan altas concentraciones de compuestos fenólicos, principalmente taninos y lignina (López-Herrera *et al.*, 2008; Cardona-Iglesias *et al.*, 2016; Albores *et al.*, 2018; Fuentes *et al.*, 2017), aunque Gómez-Fuentes-Galindo *et al.* (2017) sólo reporta presencia por arriba del 1% de taninos condensados en cuatro de veinte plantas forrajeras dominantes de selva secundaria subcaudicifolia de Yucatán, siendo *B. divaricata* la especie con el contenido más elevado (12.75%). El follaje de *D. glabra* fue el único que mostró presencia de saponinas, lo cual concuerda con lo reportado por López-Herrera *et al.* (2008); sin embargo, difiere en *P.*

piscipula en el cual sí tuvo presencia para este metabolito secundario. Cabe destacar que el follaje de *D. glabra* fue el que presentó la mayor cantidad de los metabolitos secundarios determinados, ya sea de en forma cuantiosa a notable, a excepción de los alcaloides, aunque este fue reportada su presencia positiva por López-Herrera *et al.* (2008). No se reporta información del contenido de metabolitos secundarios del follaje de *C. vesicaria*, sólo de las vainas y semillas (Ortiz-Domínguez *et al.*, 2017).

Cuadro 8. Determinación cualitativa del follaje de las leguminosas *C. vesicaria*, *D. glabra*, *B. divaricata* y *P. piscipula*, así como del pasto *P. máximo*.

		<i>Panicum máximo</i>	<i>Caesalpinia vesicaria</i>	<i>Dalbergia Glabra</i>	<i>Bahuinia divaricata</i>	<i>Piscidia piscipula</i>
Alcaloides		-	-	-	-	-
Saponinas	Esteroidales	-	-	+++	-	-
	Triterpenoides	-	-	-	-	-
Taninos	Ácido gálico	+++	++	++	+++	+++
	Catecol	-	-	-	-	-
Cumarinas		-	-	-	-	-
Quinonas	Benzoquinonas	-	+++	+++	-	-
	Antraquinonas	-	-	-	-	-
Flavonoides	Auronas	-	-	-	-	-
	Chalconas	-	-	-	-	-
	Xantonas	+	++	++	-	-
	Flavonas	+	++	++	-	-

+++presencias cuantiosas ++presencia notable +presencia leve -ausencia del metabolito

6.3. Características de la fermentación ruminal *in vitro* y producción de CH₄.

La S es la velocidad en la cual los microorganismos ruminales fermentan los componentes de la dieta y la L es el tiempo que los microorganismos tardan para iniciar la degradación de la dieta (Kholif *et al.* 2017). Los follajes no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) para la S y la L; pero sí hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para Vmax. Al respecto, no se presentaron diferencias estadísticas entre *P. maximum* y *B. divaricata*, que fueron los follajes que mostraron el Vmax más alto (≈ 300 mL/g MS); mientras que *D. glabra* tuvo un Vmax bajo, menor a 100 ml/g MS. El Vmax de *B. divaricata* y *P. piscipula* es muy diferente a lo obtenido por Albores *et al.* (2018), quienes obtuvieron un Vmax de

85.3 y 130.9 mL/g MS, respectivamente. De acuerdo con estos mismos autores, el contenido de PT y metabolitos secundarios puede influir en la intensidad de la fermentación ruminal, observando que especies de plantas forrajeras con alto contenido de PT y bajo contenido de metabolitos secundarios, presentaron una mayor fermentación, debido a que metabolitos secundarios como los taninos condensados forman complejos con las proteínas y carbohidratos, disminuyendo las poblaciones de protozoarios ruminales y disminuyendo la PG (Albores *et al.*, 2018).

La DIVMS a las 24 h solo fue diferente para *D. glabra* ($P \leq 0.05$), la cual fue menor que el resto de las plantas evaluadas. La DIVMS a las 72 h presentó mayores diferencias ($P \leq 0.05$) entre las diferentes especies de plantas forrajeras evaluadas. Nuevamente la menor DIVMS la presentó *D. glabra*, siendo menor al 30%. Sólo dos especies tuvieron una DIVMS a las 72 h mayor al 40%: *P. máximum* y *B. divaricata*, mientras que para *C. vesicaria* y *P. piscipula* fue de $\approx 37\%$. La variabilidad en la DIVMS e *in situ* de los follajes de diferentes especies de plantas ha sido reportado previamente, mismas que fluctúan entre 21 y 54% en estudios *in vitro* (Albores *et al.*, 2018) y entre 40 y hasta 80% en ensayos *in situ* (Cab *et al.*, 2015) a las 72 h de incubación.

El FP es la relación entre la MS degradada y la PG a las 24 h (Posada *et al.*, 2014). En el Cuadro 9, se presentan los valores del FP_{24} , donde se observan diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los forrajes evaluados. El valor más bajo lo presentó *B. divaricata* y el valor más elevado la *D. glabra*. No existen reportes sobre el FP en las especies de plantas forrajeras evaluadas; sin embargo, estos valores son superiores a los reportados por Naranjo *et al.* (2016) en un estudio realizado en sistemas silvopastoriles con diferentes niveles de inclusión de *L. leucocephala*. Blümmel *et al.* (1997) sugirieron que valores altos de FP pueden estar relacionados con valores bajos de producción de gas, mayor eficiencia en la síntesis de biomasa microbiana y por consiguiente una menor producción de CH_4 ; que estaría asociado a una mejor eficiencia en la fermentación.

La producción de CH₄ y CO₂ (%) no presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (P>0.05). No obstante, la producción de CH₄, expresada en mL/g MS, presentó diferencias significativas (P≤0.05) entre las plantas evaluadas. *D. glabra*, produjo 76% menos CH₄ con respecto a *P. maximum* y 78% menos con respecto a *B. divaricata*. Este resultado puede deberse a la mayor presencia de metabolitos secundarios, principalmente al de saponinas, las cuales tienen un efecto de control sobre los protozoarios y por ende un efecto indirecto sobre arqueas metanogenas (Albores *et al.*, 2018). Existe nula información sobre la producción ruminal de CH₄ y CO₂ por efecto de las leguminosas evaluadas; sin embargo, Avila-Serrano *et al.* (2020), reportaron que la inclusión de 45% de *L. leucocephala* en la dieta disminuyó 18 y 24% la producción de CH₄ y CO₂. Por su parte, Cardona-Iglesias *et al.* (2016) reportaron datos de producción *in vitro* de CH₄ de 4.3 y hasta 64.7 mL/g MS fermentada para otras plantas forrajeras, como *Samanea saman* y *Enterolobium cyclocarpum*.

Respecto a la EM, se observan diferencias significativas (P≤0.05) entre las diferentes especies. El contenido más alto de EM lo presentó *B. divaricata*, cercano a 1.5 Mcal/kg MS; mientras que los bajos fueron para *D. glabra* y *C. vesicaria*. Existe poca información respecto al contenido de EM de las leguminosas evaluadas; sin embargo, los valores son más bajos que los obtenidos por Gómez-Fuentes Galindo *et al.* (2017), quienes reportaron un valor de EM de 2.23 y 1.89 Mcal/kg MS para *B. divaricata* y *P. piscipula*, respectivamente. En su estudio, estos mismos autores reportaron valores de EM desde 1.81 Mcal/kg de MS para *B. unguata* y hasta 2.97 Mcal/g MS para *Senna uniflora*, evaluando 16 especies de plantas forrajeras de Yucatán.

Cuadro 9. Vmax, DIVMS, factor de partición, energía metabolizable, producción de CH₄ y CO₂ de la fermentación ruminal *in vitro* del follaje de las leguminosas *C. vesicaria*, *D. glabra*, *B. divaricata* y *P. piscipula*, así como del pasto *P. máximum*

4	Especie vegetal					EEM
	<i>Panicum máximum</i>	<i>Caesalpineia vesicaria</i>	<i>Dalbergia glabra</i>	<i>Bahuinia divaricata</i>	<i>Piscidia piscipula</i>	
Vmax, mL/g MS	285.73 ^a	174.87 ^c	91.81 ^d	309.87 ^a	229.53 ^b	13.16
S, h	0.0211	0.0200	0.0200	0.0222	0.0211	0.0004
L, h	10.17	12.83	11.56	9.89	12.15	0.37
DIVMS 24 h, %	36.11 ^a	35.56 ^a	23.46 ^b	36.45 ^a	34.24 ^a	0.80
DIVMS 72 h, %	47.68 ^a	36.76 ^c	27.93 ^d	43.05 ^b	38.12 ^c	1.09
FP ₂₄ , mg/mL	3.60 ^c	6.64 ^{ab}	8.09 ^a	3.08 ^c	4.60 ^{bc}	0.36
EM, Mcal/kg MS	1.28 ^b	1.00 ^c	0.93 ^c	1.48 ^a	1.18 ^b	0.03
CH ₄ , %	36.49	33.75	39.00	34.77	32.93	1.51
CO ₂ , %	63.51	66.25	61.00	65.23	67.07	1.51
CH ₄ mL/g MS	26.19 ^a	11.67 ^{bc}	6.23 ^c	29.14 ^a	16.38 ^b	1.48
CO ₂ mL/g MS	48.01 ^{ab}	23.37 ^{cd}	10.59 ^d	57.45 ^a	37.06 ^{bc}	3.23

Volumen máximo (Vmax), tasa de fermentación (S), fase lag (L), degradabilidad (Deg).
a, b, c, d Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

6.4. Cinética de PG *in vitro*

La cinética de PG *in vitro* se muestra en el Cuadro 10. Se observó que la leguminosa *B. divaricata* presentó la mayor cantidad de gas producido a las 72 horas con más de 300 mL/ g MS, seguida por el pasto *P. máximum*, no habiendo diferencias estadísticas significativas entre estos tratamientos (P>0.05). La menor producción de gas lo presentó la *D. glabra* en el mismo tiempo de fermentación con menos de 100 mL/g MS, presentando diferencias estadísticas significativas con los demás tratamientos (P<0.05). Es nula la información sobre la cinética de PG de las leguminosas evaluadas; sin embargo, los resultados obtenidos son similares a los reportados para otras leguminosas forrajeras. Al respecto, Vivas-Arturo *et al.* (2017) reportó una producción de gas de 242.04 mL/g MS para *L. leucocephala* a las 96 horas, valor similar al obtenido en este trabajo para *P. piscipula*, pero superior al obtenido para *D. glabra*. Por su parte Ramírez *et al.* (2012) reportó datos similares en producción de gas en leguminosas forrajeras

evaluadas a los obtenidos en este estudio para *C. vesicaria* y *P. piscipula*, inferiores a los observados para la *B. divaricata* y superiores a los observados para *D. glabra* a las 48 h de fermentación. Por otra parte Naranjo *et al.* (2016) evaluó la cinética de fermentación *in vitro* con distintos niveles de inclusión de *L. leucocephala*, reporto una producción total de gas a las 100 h de 97.3 mL cuando la dieta es 100% a base de esta leguminosa, dato similar al observado para la *D. glabra*, el cual fue el tratamiento con la menor producción de gas acumulado.

Cuadro 10. Cinética de la producción de gas en la fermentación *in vitro* de la fermentación ruminal *in vitro* del follaje de las leguminosas *C. vesicaria*, *D. glabra*, *B. divaricata* y *P. piscipula*, así como del pasto *P. maximum*.

Horas	Especie vegetal				
	<i>P. maximum</i>	<i>C. vesicaria</i>	<i>D. glabra</i>	<i>B. divaricata</i>	<i>P. piscipula</i>
2	2.67	1.73	0.71	1.57	1.34
4	7.36 ^a	4.55 ^{ab}	1.89 ^b	5.66 ^{ab}	3.93 ^{ab}
6	14.83 ^a	7.61 ^c	3.93 ^c	14.22 ^{ab}	9.04 ^{bc}
8	24.58 ^a	12.01 ^{bc}	7.15 ^c	25.77 ^a	16.27 ^b
12	38.73 ^a	19.47 ^{bc}	11.94 ^c	43.53 ^a	27.12 ^b
16	57.20 ^a	29.20 ^{bc}	17.99 ^c	66.63 ^a	41.50 ^b
20	79.29 ^a	41.06 ^{bc}	24.44 ^c	93.34 ^a	58.41 ^b
24	104.99 ^a	55.03 ^b	31.98 ^c	122.32 ^a	77.75 ^b
30	132.34 ^a	71.28 ^c	40.78 ^d	153.75 ^a	100.00 ^b
36	162.44 ^a	90.20 ^c	51.00 ^d	187.21 ^a	125.16 ^b
42	192.70 ^a	110.53 ^c	61.21 ^d	220.13 ^a	151.02 ^b
48	223.28 ^a	131.10 ^c	71.59 ^d	251.86 ^a	177.13 ^b
60	256.68 ^a	153.16 ^c	82.35 ^d	285.25 ^a	204.96 ^b
72	290.08 ^a	175.77 ^c	93.12 ^d	318.25 ^a	232.48 ^b

a, b, c, d Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticas significativas (P<0.05). Valores expresados en mL/g MS fermentada.

6.5. Producción de NH₃-N y AGV *in vitro*

En el Cuadro 11 se muestran las concentraciones de NH₃-N y AGV de la fermentación ruminal *in vitro* de los follajes evaluados. Se observaron diferencias estadísticas significativas (P≤0.05) entre *C. vesicaria*, la cual tuvo la concentración más baja de NH₃-N, y *B. divaricata*, que presentó la más alta. No existen reportes de efecto de las leguminosas evaluadas sobre la concentración ruminal de NH₃-N y AGV *in vitro*. Sin embargo, estudios realizados con otras leguminosas (tales como *Coronilla orientalis*, *Coronilla parviflora* (silvestre), *Dorycnium pentaphyllum*,

Arygrolobium, *Lotus corniculatus* y *Lotus langustissimus*) muestran concentraciones que van de 51 a 78 mg/dL de NH₃-N, siendo muy superiores a los obtenidos en el presente trabajo (Gurbuz, 2009).

La concentración total de AGV, acético, isobutírico e isovalérico no presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre las especies forrajeras evaluadas. Las concentraciones de ácido propiónico y ácido butírico sí presentaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), siendo *B. divaricata* la leguminosa con mayor concentración de ácido propiónico y *D. glabra* la más baja. Trabajos realizados con otras leguminosas forrajeras, ya sea en diferentes niveles de inclusión o solas, presentan datos superiores a los observados en este trabajo (Ávila-Serrano *et al.*, 2020; Gurbuz, 2009; Hernández-Morales *et al.*, 2018). En la relación acético/propiónico, solo *D. glabra* fue estadísticamente mayor ($P \leq 0.05$) que las demás plantas forrajeras. Gurbuz (2009) reportó datos superiores a estos en estudios realizados con diferentes leguminosas forrajeras, de 2.99 a 3.34, mientras que Ávila-Serrano *et al.* (2020) presento datos similares para diferentes niveles de inclusión de algunas leguminosas forrajeras y el pasto *C. nlemfuensis* a 72 horas de incubación. El acetato origina la producción de CH₄, por la mayor disponibilidad de CO₂ y H₂ para las arqueas metanogénicas; mientras que la formación de propionato se considera una forma de competencia por la captación de H₂ que causa una menor síntesis de CH₄ (Gidlund *et al.*, 2015), por lo que se espera que una menor relación acetato/propionato signifique una menor producción de CH₄.

Cuadro 11. Concentración de NH₃-N y AGV la fermentación ruminal *in vitro* del follaje de las leguminosas *C. vesicaria*, *D. glabra*, *B. divaricata* y *P. piscipula*, así como del pasto *P. máximum*.

Variable	Especie vegetal					
	<i>Panicum máximum</i>	<i>Caesalpineia vesicaria</i>	<i>Dalbergia glabra</i>	<i>Bahuinia divaricata</i>	<i>Piscidia piscipula</i>	
NH ₃ -N (mg/dL)	11.52 ^{ab}	8.47 ^b	11.29 ^{ab}	11.99 ^a	11.64 ^a	
AGVs (mmol/L)	Acético	11.63	8.58	11.42	10.39	7.85
	Propiónico	5.00 ^{ab}	4.40 ^{abc}	3.72 ^c	5.57 ^a	3.27 ^c
	Isobutírico	0.18	0.14	0.16	0.20	0.15
	Butírico	2.55 ^a	1.59 ^b	1.82 ^{ab}	2.13 ^{ab}	1.62 ^b
	Isovalérico	0.20	0.18	0.19	0.26	0.20
	Valérico	0.14 ^{ab}	0.09 ^b	0.10 ^{ab}	0.21 ^a	0.14 ^{ab}
	Total	19.70	15.00	17.41	18.76	13.21
Rel.	2.33 ^b	1.97 ^b	3.06 ^a	1.87 ^b	2.36 ^b	
AGVs (%)	Acético/Propiónico					
	Acético	59.03 ^{ab}	57.39 ^b	65.55 ^a	55.44 ^b	58.84 ^{ab}
	Propiónico	25.43 ^{ab}	29.26 ^a	21.46 ^b	29.75 ^a	25.10 ^{ab}
	Isobutírico	0.90	0.96	0.91	1.03	1.13
	Butírico	12.94 ^a	10.62 ^b	10.43 ^b	11.34 ^{ab}	12.38 ^{ab}
	Isovalérico	1.00	1.16	1.06	1.35	1.48
	Valérico	0.68 ^{ab}	0.60 ^b	0.59 ^b	1.09 ^a	1.07 ^a

a, b, c Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticas significativas (P < 0.05).

7. CONCLUSIONES

La PT, FDN y FDA que presentó la leguminosa *Dalbergia glabra* son características deseables para una especie con potencial forrajero, ya que representan una alternativa para la alimentación de rumiantes en las regiones tropicales. Aunque un importante factor en contra de esta especie es su baja tasa de degradabilidad, la cual se puede deber a la mayor presencia de los diferentes grupos de metabolitos secundarios, ya que fue la única especie que mostró presencia de saponinas, taninos, quinonas y flavonoides. Por lo que se puede deducir que la presencia de estos metabolitos secundarios, en especial la presencia cuantiosa de saponinas puede ser un factor determinante en la baja producción de gas, CH₄ y CO₂.

Por lo anterior, la leguminosa *Dalbergia glabra* puede ser una excelente alternativa como recurso forrajero por su aporte de nutrientes y así mejorar las dietas para bovinos bajo sistema de pastoreo en el trópico, además que puede representar un importante recurso en la disminución de las emisiones de CH₄ y CO₂, producto de la fermentación entérica al medio ambiente.

Se recomienda realizar estudios completos para la determinación de los metabolitos secundarios taninos y saponinas de las especies más promisorias, para poder tener un panorama más claro de la acción de estas sobre las modificaciones a los patrones y características de la fermentación ruminal, así como la producción de gases de efecto invernadero, además de realizar pruebas *in vivo*, ya sea como sustratos únicos o en diferentes niveles de inclusión, así poder obtener datos concretos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C., 2005. Official Methods of Analysis International Association of Official Analytical Chemists. 18 th Edition. Arlington.
- Albarrán, P.B., Salas, R.I.G., Esparza, J.S., Hernández, M.J., Rebollar, R.S. García, M.A. 2009. Caracterización socioeconómica de un sistema de producción de doble propósito del sur del Estado de México. Cavalloti, V.B., Marcof , A.C.F. y Ramírez, V.B. Ganadería y seguridad alimentaria en tiempos de crisis. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Albores M., S., J.A. Alayón G., L.A. Miranda R., J.G.O. Jiménez F., J.C. Ku V., L. Vargas V. 2018. Nutritional composition, *in vitro* degradation and potential fermentation of tree species grazed by ruminants in secondary vegetation (Acahual) of deciduous forest. Journal of Animal and Plant Sciences, 28(5): 1263-1275.
- Ángeles, M.Y., 2018. Producción de gases de efecto invernadero y fermentación ruminal In vitro de follajes tropicales, efecto de los metabolitos secundarios. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Pag. 68-80.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A. L., Patra, A. K., Sahlu, T., Varel, V. H., Wells, J. 2008. Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. Animal Feed. Science and Technology, 144:228-241.
- Archimede, H., Eugene, M., Marie, M.C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D.P., Lecomte, P., Doreau, M. 2011. Comparison of methane production between C₃ and C₄ grasses and legumes. Animal Feed Science and Technology, 166(23):59-64.
- Ávalos-García, A., Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología) Serie Fisiol. Veg. 2: 119-145.

- Ávila-Serrano, N.Y., López-Garrido, S.J., Galicia-Jiménez, M.M., González-Crespo, G. J., Camacho-Escobar, M.A. 2020. Efecto de la incorporación de arbóreas a dietas de *Cynodon nlemfuensis* durante la fermentación ruminal *in vitro*. Terra Latinoamericana. Número Especial, 38(2): 403-412.
- Ayala A. J., Cetina R., Capetillo C., Zapata C., y Sandoval C. A. 2006. Composición química–nutricional de árboles forrajeros. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Azorín A., Gómez G. 2008. Estrategias de las plantas frente al consumo de los herbívoros. pp. 189-203. In: F. Fillat, R. García-González, D. Gómez. 13: 189-203. ISBN: 978-84-00-08614-5.
- Bacab, H.M., Madera, N.B., Solorio, F.J., Vera, F., Marrufo, D.F. 2013. Los sistemas silvopastoriles intensivos con *Leucaena leucocephala*: una opción para la ganadería tropical. Avances en Investigación Agropecuaria. 17(3):67-81. ISSN: 0188789-0.
- Barbehenn, R.V., Constabel, C.P. 2011. Review Tannins in plant–herbivore interactions. Phytochemistry, 72(13):1551–1565.
- Barros, R.M., Solorio, S.J., Ku, V.J., Ayala, B.A., Sandoval, C.C., Solís, P.G. 2012. Productive performance and urinary excretion of mimosine metabolites by hair sheep grazing in a silvopastoral system with high densities of *Leucaena leucocephala*. Tropical Animal Health and Production, 44(8):1873-1878.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F., McAllister, T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture, 48(2):21-27.
- Benchaar, C., Greathead, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Animal Feed Science and Technology, 166-167:338-355.

- Betancourt, K., Ibrahim, M., Harvey, C.A., Vargas, B. 2003. Efecto de la cobertura arbórea sobre el comportamiento animal en fincas ganaderas de doble proposito en Matiguás, Matagalpa, Nicaragua. *Livestock Research for Rural Development*, 10(39-40): 47-51.
- Blümmel, M., Steingaas, H., Becker, K. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77(6): 911-921.
- Bodas, R., Lopez, S., Fernandez, M., García-González, R., Rodriguez, A.B., Wallace, R.J., Gonzalez, J.S. 2008. In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 145:245–258.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176:78– 93.
- Broudiscou, L.P., Lassalas, B. 2000. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reproduction Nutrition Development*, 40:431–440.
- Camacho-Escobar, M. A., Ramos-Ramos, D. A., Ávila-Serrano, N. Y., Sánchez-Bernal, E. I., López-Garrido, S. J. 2020. Las defensas físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. *Terra Latinoamericana Número Especial*, 38(2): 443-453.
- Cambra-López, M., García, P., Estellés, F., Torres, A. 2008. Estimación de las emisiones de los rumiantes en España: el factor de conversión de metano. *Archivos de Zootecnia*, 57(R): 89-101.

- Cardona-Iglesias J.L., Mahecha-Ledesma L., Angulo-Arizala J. 2016. Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1):273-288.
- Carmona, A. 2007. Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre la dinámica digestiva en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación*. 4:40-50.
- Carranza-Montaño, M.A., Sánchez-Velázquez, L.R., Pineda-López, M.R. Cuevas-Guzmán, R. 2002. Calidad y potencial forrajero de especies del bosque tropical caducifolio de la sierra de Manatlán, México. *Agrociencia*, 37:203-210.
- Carrera-Chávez, B., Gómez-Cruz, M.Á., Schwentesius-Rindermann, R. 2014. *La Ganadería Bovina de Carne en México: Un Recuento Necesario Después de la Apertura Comercial*. Primera edición 2014. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Castelán-Ortega, O.A., Fawcett, H.R., Arriaga-Jordán, C., Herrero, M. 2003. A decision support system for smallholder “campesino” maize-cattle production systems of the Toluca valley in central Mexico. *Agricultural Systems*, 75:1-21.
- CEDRSSA, 2019. El Sector Agropecuario en el PIB (segundo trimestre de 2019). Consultada en línea 21/02/2019. http://www.cedrssa.gob.mx/post_el_-n-sector_agropecuario_en_el_pib-n_-segundo_trimestre_de_2019-_.htm
- CEPAL, FAO, IICA. 2018. *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe 2017-2018*. San José. 268 p.
- Chacón-León, M., Harvey, C.A. 2006. Live fences and landscape connectivity in a neotropical agricultural landscape. *Agroforestry Systems*, 68:15-26.

- CICY. 2010. Flora de la Península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Consultada en línea 30/01/2020. https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/indice_busqueda.php.
- Claverán, A.R. 1978. Leguminosas forrajeras. En: Cervantes, S.T. (Ed.). Análisis de los recursos genéticos disponibles en México. Pag. 171-177.
- Clavero, T. 2011. Agroforestry Livestock Feeding Systems in Tropical America. Revista de la Universidad del Zulia, 3ª época. Ciencias del Agro, Ingeniería y Tecnología. Año 2(2):76-654.
- Cortés, E.H., Aguilar, C., Vera, R. 2003. Sistemas bovinos de doble propósito en el trópico bajo de Colombia. Modelo de simulación Archivos de Zootecnia, 52: 25-34.
- Cotecoca, Sagarpa. Monografías de Coeficientes de Agostadero. México. Abril 2015.
- Cotecoca. Monografías de Coeficientes de Agostadero, años 1972-1981. México. 2004.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), Plant Secondary Metabolites Occurrence Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing, Chennai, India, 1:1–24.
- Cunha, C.S., Veloso, C.M., Marcondes, M.I., Mantovani, H.C., Tomich, T.R., Pereira, L.G.R., Suen, G. 2017. Assessing the impact of rumen microbial communities on methane emissions and production traits in Holstein cows in a tropical climate. Systematic and Applied Microbiology, 40(8):492-499.
- Delgado, D., González, R., Galindo, J., Almeida, C., Almeida, M. 2007. Potencialidad de *Trichantera gigantea* y *Morus alba* para reducir la producción ruminal de metano *in vitro*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 41(4):339-342.

- 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. *Trop Anim Health Prod.* 44:1097–1104.
- Delgado, D.C., Galindo, J., González, R., Savón, L., Scull, I., González, N. and Marrero, Y. 2010. In E. Odongo, M. García & G.J. Viljoen (eds), *Sustainable Improve of animal Production and health*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 49-54.
- Demeyer, D., Fievez, V., 2000. Ruminants and environment: methanogenesis. *Annales de Zootechnie*, 49:95–112.
- Devendra, C., Ibrahim, M. 2004. Silvopastoral systems as a strategy for diversification and productivity enhancement from livestock in the tropics. En: Mannel, C.L., M. Ramirez, M. Ibrahim, C. Sandoval, N. Ojeda y J. Ku (Eds.). *The importance of silvopastoral systems in rural livelihoods to provide ecosystem services. Second international symposium of silvopastoral systems*. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, pp. 8-22.
- Dopelt K., Radon P., Davidovitch N. 2019. Environmental Effects of the Livestock Industry: The Relationship between Knowledge, Attitudes, and Behavior among Students in Israel. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(8):1359.
- Durmic, Z., Hutton, P., Revell, D.K., Emms, J., Hughes, S., Vercoe, P.E., 2010. In vitro fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 160:98–109.
- Eckard, R., Grainger, C., De Klein, C. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*, 130(1):47-56.

- Estrada, A. 2008. Fragmentación de la selva y agrosistemas como reservorios de conservación de la fauna Silvestre en Los Tuxtlas, México. En: Harvey, C.A. y J.C. Sánchez (Eds.). Evaluación y conservación de biodiversidad en paisajes fragmentados de Mesoamérica. *INBio*. 21:579-599.
- Evans, J.D., Martin, S.A. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology*, 41:336–340.
- FAO. 2009. El estado mundial de la agricultura y la alimentación: la ganadería, a examen. ISBN 978-92-5-106215-9. Consultada en línea 15/12/2020. <http://www.fao.org/docrep/019/i3788s/i3788s.pdf>.
- FAO. 2014. Agricultura Familiar en América Latina y el Caribe: Recomendaciones de política. E-ISBN 978-92-5-308364-0. Consultada en línea 15/12/2020 <http://www.fao.org/3/i3788s/i3788s>.
- FAO. 2017. The impact of disasters on agriculture. Addressing the information gap. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Consultada en línea 17/12/2020. <http://www.fao.org/3/a-i7279e.pdf>
- FAO. 2018. Livestock and agroecology. How they can support the transition towards sustainable food and agriculture. Consultado en línea 20/12/2020 http://www.fao.org/3/l8926EN/i8926en.pdf?utm_source=twitter&utm_medium=social%20media&utm_campaign=faoanimalhealth.
- FAO. 2018a. FAOSTAT. Datos sobre alimentación y agricultura. Consultado en línea 09/07/2019 <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.
- FAO. 2019. FAOSTAT. Ganadería. Consultado en línea 17/11/2020 <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QA>.

- Fieves V., Babayemi O.J., Demeyer D. 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*, 197-210.
- Finlay, B.J., Esteban, G., Clarke, K.J., Williams, A.G., Embley, T.M. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiol Lett.*, 117(2):157-161.
- Fuentes G., T.G., C. González R., S. López O., J.C. Ku V., C.J. Albor P., J.R. Sanginés G. 2017. Dominancia, composición química-nutritiva de especies forrajeras y fitomasa potencial en una selva secundaria. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*. 14:617-634
- García, D.E., Medina, M.G., Soca, M., Montejo, I.L. 2005. Toxicidad de las leguminosas forrajeras en la alimentación de los animales monogástricos. *Pastos y Forrajes* 28:279-289.
- García, E., 2004. Modificación del sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 5(6):11-90.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., González, J.S. 2008. Dose–response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 145:319–334.
- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.

- Gerber, P., Hristov, A., Henderson, B., Makkar, H., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J. 2013a. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. *Animal*, 7(s2):220-234.
- Gidlund, H., Hetta, M., Krizsan, S. J., Lemosquet, S., Huhtanen, P. 2015. Effects of soybean meal or canola meal on milk production and methane emissions in lactating dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 98:8093-8106.
- Goel, G., Makkar, H.P.S. Becker, K., 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal Applied Microbiology*, 105:770–777.
- Guglielmelli, A., S. Calabro, R. Primi, F. Carone, M. I. Cutrignelli, R. Tudisco, G. Piccolo, B. Ronchi, and P. P. Danieli. 2011. In vitro fermentation patterns and methane production of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hay with different condensed tannin contents. *Grass and Forage Science*, 66:488-500.
- Gurbuz, Y. 2009. Efectos del contenido de taninos condensados de algunas especies de leguminosas en la emisión de gas metano. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43(3):265-272.
- Hegarty RS, Gerdes R. 1998. Hydrogen production and transfer in the rumen. *Recent Advances in Animal Nutrition*, 12:37-44.
- Heinritz, S. N., Martens, S.D., Avila, P., Hoedtke, S. 2012. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Animal Feed Science and Technology*, 174:201-210.

- Hernández-Martínez, J., Rebollar Rebollar, S., González Razo, F.J., Guzmán Soria, E., Albarrán Portillo, B; García Martínez, A. 2011. La cadena productiva de ganado bovino en el sur del estado de México. *Quinta Época*, 2:672-680.
- Hernández-Morales, J., Sánchez-Santillán, P., Torres-Salado, N., Herrera-Pérez, J., Rojas-García, A.R., Reyes-Vázquez, I., Mendoza-Núñez, M.A. 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, Vol. 9 No. 1.
- Herrero, M., Grace, D., Njuki, J., Johnson, N., Enahoro, D., Silvestri, S., Rufino, M.C. 2013. The roles of livestock in developing countries. *Animal*, 7(1):3-18.
- Herrero, M., Thornton, P.K., Gerber, P., Reid, R.S. 2009. Livestock, livelihoods and the environment: understanding the trade-offs. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 1(2):111-120.
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Carulla, J.E., Lascano, C.E., Díaz, T.E., Kreuzer, M. 2002. *In vitro* evaluation of the effect of *Sapindus saponaria* on methane release and microbial populations, 14(1):1-28
- HLPE. 2016. Desarrollo agrícola sostenible para la seguridad alimentaria y la nutrición: ¿qué función desempeña la ganadería? Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición del Comité de Seguridad Alimentaria Mundial. Roma. Disponible en la página <http://www.fao.org/cfs/cfs-hlpe/informes/es/>.
- Hook, S.E., Wright, A.D.G., McBride, B.W. 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, 1-11.

- Hristov, A.N., Oh, C., Lee, J., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J., Oosting, S. 2013. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production. A review of technical options for non-CO2 emissions. FAO Animal Production and Health Paper No. 177 (Ed. P. J. Gerber, B. Henderson, and H. P. S. Makkar). FAO, Rome, Italy.
- Ibrahim, M., Harvey, C. 2003. Diseño y manejo de la cobertura arbórea en fincas ganaderas para mejorar las funciones productivas y brindar servicios ambientales. *Agroforestería en las Américas*, 10(39-40):4-5.
- Ibrahim, M., Villanueva, C.P., Casasola, F. 2007. Sistemas silvopastoriles como una herramienta para el mejoramiento de la productividad y rehabilitación ecológica de paisajes ganaderos en Centro América. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 15(1):73-87.
- IICA. 2013. Seguridad Alimentaria y Agricultura de Pequeña y Mediana Escala en América Latina y el Caribe. Contacto Global 1.
- Ilea, R.C. 2009. Intensive livestock farming: Global trends, increased environmental concerns, and ethical solutions. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 22:153–167.
- INECC. 2018. Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero 1990-2015. Capítulo: Agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra. Consultado en línea 16/04/2019. https://www.snieg.mx/DocumentacionPortal/iin/Acuerdo_5_II_2014/Sector_Agricultura_silvicultura_y_otros-f.pdf.
- INECOL. 2017. La ganadería y la pérdida de la biodiversidad. Consultado en línea 14/05/2019. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/845-la-ganaderia-y-la-perdida-de-la-biodiversidad>.

- INEGI. 2013. Carta de Uso del Suelo y Vegetación, Serie V (2011), escala 1: 250 000. México. Disponible en https://www.inegi.org.mx/contenidos/temas/mapas/usosuelo/metadatos/guia_interusosuelov.pdf.
- IPCC. 2014. Consultado en línea 25/11/2019. www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/ch2s2-10-2.html.
- Jayanegara, A., Leiber, F., Kreuzer, M. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(3):365-375.
- Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2009. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an in vitro rumen fermentation system. *Animal Feed Science and Technology*, 150:230–237.
- Jensen, L.T. 2012. Livestock Foraging Behavior in Response To Sequence and Interactions Among Alkaloids, Tannins, and Saponins. Doctoral thesis. Utah State University, pp 1-43.
- Jezierny, D., Mosenthin, R., Bauer, E. 2010. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 157:111-128.
- Johnson, K., Johnson, D. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73:2483-2492.
- Kaimowitz, D. 2001. Will livestock intensification help save Latin America's Tropical Forest? In: *Agricultural technologies and tropical deforestation*. (A. Angelsen and D. Kaimowitz, Eds.). *Journal of Sustainable Forestry*, 27(1):6-24.

- Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary, L.C. 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*, 1293:156–163.
- Kamra, D.N., Patra, A.K., Chatterjee, P.N., Kumar, R., Agarwal, N., Chaudhary, L.C. 2008. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: A brief overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48:175–178.
- Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Rodriguez, G.B., Olafadehan, O.A., Salem, A.Z.M. 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *Journal of Cleaner Production*. 142(4):2649-2655.
- Kim, B.H., Gadd, G.M. 2008. *Bacterial physiology and metabolism*. 1a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ku, V.J.C., Ayala B.A.J., Solorio S.F.J., Briceño P.E.G., Ruiz G.A., A.T. Piñeiro V.A.T., *et al.* 2013. Tropical tree foliage and shrubs as feed additives in ruminant rations. In: *Nutritional Strategies of Animal Feed Additives*. Salem, ed. New York. USA: Nova Science Publishers, Cap. 4, pp. 59-76.
- Ku, V.J.C., Briceño, E.G., Ruiz, A., Mayo, R., Ayala, A.J., Aguilar, C.F., Solorio, F.J., Ramírez, L. 2014. Manipulación del metabolismo energético de los rumiantes en los trópicos: opciones para mejorar la producción y la calidad de la carne y leche. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1):43-53
- Lamela, L., Castillo, E., Iglesias, J., Pérez, A. 2005. Principales avances de la introducción de los sistemas silvopastoriles en las condiciones de producción en Cuba. *Pastos y Forrajes. Cuba*, 28(1):47-58.
- Lee, J.H., Jeon, J.K., Kim, S.H., Chun, T., Imm, J.Y. 2011. Comparative analyses of total phenols, flavonoids, saponins and antioxidant activity in yellow soy beans and mung beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 46:2513-2519.

- López-Herrera, M. A., Rivera-Lorca, J. A., Ortega-Reyes, L., Escobedo-Mex, J.G., Magaña-Magaña, M.A., Sanginés-García, J.R., Sierra-Vázquez, A.C. 2008. Contenido nutritivo y factores antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Técnica Pecuaria en México*, 468(2):205-215.
- Makkar, H.P.S. 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. A Laboratory Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, ISBN: 978-94-017-0273-7.
- Martínez, J., Dabert, P., Barrington, S., Burton, C. 2009. Livestock waste treatment systems for environmental quality, food safety, and sustainability. *Bioresource Technology*, 10022:5527-5536.
- McAllister, T., Newbold, C.J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2):7-13.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct calorimetric method. *Clinical Chemistry*, 17:297-304.
- McNeely, J.A., Schroth, G. 2006. Agroforestry and biodiversity conservation – traditional practices, present dynamics, and lessons for the future. *Biodiversity and Conservation*, 15(2):549-554.
- Menke, H.K., Raab, L., Salewski, A., Steingass H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal Agricultural Science*, 93:217-222.
- Min, B.R., Attwood, G.T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J.S., Barry, T.N., McNabb, W.C. 2002. *Lotus corniculatus* condensed tannins decrease *in vivo* populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, 48:911–921

- Molina, C.I., Angarita, E., Mayorga, O.L. 2013. Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto de la inclusión de *Leucaena leucocephala* sobre la producción de metano de dietas para bovinos basadas en gramíneas tropicales. Memorias XII Encuentro Nacional y V Internacional de los Investigadores de las Ciencias Pecuarias (ENICIP), Medellín, Colombia, 26:442.
- Montaldo, H.H., Castillo-Juárez, H., Valencia-Posadas, M., Cienfuegos-Rivas, E.G., Ruiz-López, F.J. 2010. Genetic and environmental parameters for milk production, udder health, and fertility traits in Mexican Holstein cows. American Dairy Science Association, 93:2168-2175.
- Moreno-Calles, A.I., Toledo, V.M., Casas, A. 2013. Los sistemas agroforestales tradicionales de México: una aproximación biocultural. Botanical Sciences, 91(4):375-398.
- Mottet, A., de Haan, C., Falcucci, A., Tempio, G., Opio, C., Gerber, P. 2017. "Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate", Global Food Security, 14:1-8
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005a. *In vitro* microbial inoculum: a review of its function and properties. Animal Feed Science and Technology, 123–124:31–50
- Mould, F.L., Morgan, R., Kliem, K.E., Krystallidou, E., 2005b. A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. Anim. Feed Science Technol, 123:155–172.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unraveling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. Journal of Science of Food and Agriculture, 86:2010-2037.
- Müller, M. 1993. The hydrogenosome. Journal of General Microbiology, 139(12):2879-2889.

- Murgueitio, R.E., Chará, O.J., Barahona, R.R., Cuartas, C.C., Naranjo, R.J. 2014. Intensive silvopastoral systems (ISPS), mitigation and adaptation tool to climate change. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17:501-507.
- Murgueitio, E., Calle, Z., Uribe, F., Calle, A.I., Solorio, B. 2011. Native trees and shrubs for the productive rehabilitation of tropical cattle ranching lands. *Forestry Ecology and Management*, 261:1654-1663
- Nair, P.R. 1985. Classification of agroforestry systems. *Agroforestry systems*, 3(2):97-128.
- Naranjo, J. F., Cuartas, C.A., Murgueitio, E., Chará, J., Barahona, R. 2012. Balance de gases de efecto invernadero en sistemas silvopastoriles intensivos con *Leucaena leucocephala* en Colombia. *Livestock Research for Rural Development*, 24(8):1-7.
- Naranjo, J.F., Ceballos, O.A., Gaviria, X., Tarazona, A.M., Correa, G.A., Chará, J.D., Murgueitio, E., Barahona, R. 2016. Study of in vitro fermentation kinetics of mixtures forages from intensive silvopastoral systems (SSPI) with *Leucaena leucocephala* in Colombia. *Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 11(2):6-17.
- Newbold, C.J., Lassalas, B., Jouany, J.P. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett Appl Microbiol*, 21(4):230-23.
- NOM-062-ZOO-1999. 1999. Especificaciones Técnicas Para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. SENASICA.
- Núñez, D.R. 2015. La ganadería en América Latina y el Caribe: alternativas para la producción competitiva, sustentable e incluyente de alimentos de origen animal. No. 636.2130972 G3.

- OCDE-FAO. 2019. Perspectivas Agrícolas 2019-2028. ENFOQUE ESPECIAL: AMÉRICA LATINA. Consultado en línea 08/02/2019 <http://www.fao.org/3/ca4076es/CA4076ES.pdf>.
- OMM. 2019. Gases de efecto invernadero. Boletín No.15. Consultado en línea 24/01/2019 https://library.wmo.int/doc_num.php?explnum_id=10127.
- Onyeonagu, C.C., Eze, S.M. 2013. Proximate compositions of some forage grasses and legumes as influenced by season of harvest. African Journal of Agricultural Research, 8:4033-4037.
- Ortiz, D.M., Posada, S.L., Noguera, R.R. 2014. Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. Livestock Research for Rural Development, 26(11):1-11
- Ortiz, R.A. 2013. Evaluación del sistema de producción bovino de Zacazonapan desde un enfoque silvopastoril. Tesis doctoral. Universidad Autónoma del Estado de México. Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.
- Ortiz-Domínguez, G., Ventura-Cordero, J., González-Pech, P., Torres-Acosta, J.F.J., Capetillo-Leal, C.M., Sandoval-Castro, C.A. 2017. Nutritional value and *in vitro* digestibility of legume pods from seven trees species present in the tropical deciduous forest. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 20:505-510.
- Patra, A. K., Saxena, J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. Journal of Science of Food and Agriculture, 91:24-37.
- Patra, A., Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry, 71:1198–1222.

- Patra, A.K., Yu, Z. 2013. Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen. *Bioresource Technology*, 148:352–360.
- Pech, M.V., Satonto, F.J., Montes, P.R. 2002. Función de producción de la ganadería de doble propósito de la zona oriente del estado de Yucatán, México. *Técnica Pecuaria México*, 40:187-192.
- Pezo, A., Ibrahim, M. 1998. Sistemas silvopastoriles. CATIE, Costa Rica. 40(2).
- Pica-Ciamarra, U., Tasciotti, L., Otte, J., Zezza, A. 2011. Livestock assets, livestock income and rural households. FAO, Rome. Consultado en línea 20/08/2019. <http://www.fao.org/3/as294e/as294e.pdf>.
- Pinto-Ruiz, R., Gómez, H., Martínez, B., Hernández, A., Medina, F.J., Gutiérrez, R., Escobar, E., Vázquez, J. 2005. Árboles y arbustos forrajeros del sur de México. *Pastos y forrajes*. 28(2):87-97.
- Piñol, M.T., Palazón, J., Cusidó, R.M. 2008. Introducción al metabolismo secundario. En: J. Azcón-Bieto y M. Talón (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España, S.L. Madrid, España, pp. 323-348
- Posada-Ochoa, S.L., Ramírez-Agudelo, J.F., Noguera-Rosero, R. 2014. Producción de metano y digestibilidad de mezclas kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) - papa (*Solanum tuberosum*). *Agronomía Mesoamericana*, 25(1):141-150.
- Primavesi, O., Shiraishi, R.T., Dos Santos, M., Aparecida, M., Teresinha, T., Franklin, P. 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(3):277-283.

- Ramakrishna, A., Aswathanarayana, G. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plants Signaling & Behavior*, 6(11):1720-1731.
- Ramírez, J.F., Posada, O.S., Noguera, R. 2014. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *Revista CES Medicina Zootecnia*, 9(2):307-323.
- Ramírez, R., Pizzani, P., De Martino, G., García, D., Linares, Z., Colmenares, O., Domínguez, C. 2012. Estimación *in vitro* de gases con efecto invernadero en frutos y follaje de árboles de un bosque seco tropical de Venezuela. *Pastos y Forrajes*, 3581: 99-108.
- Rivera, J.E., Molina, I.C., Chara, J., Murgueitio, E., Barahona, 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):159-170
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69:299-322.
- Rodríguez, D.I., Anríquez, G., Riveros, J.L. 2016. Food security and livestock: The case of Latin America and the Caribbean. *Ciencia e Investigación Agraria*, 431:5-15.
- Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A., Givens, D.I. 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science Technol*, 123–124:9–30.
- Santra, A., Saikia, A., Baruah, K.K. 2012. Scope of rumen manipulation using medicinal plants to mitigate methane production. *Journal of Pharmacognosy*, 3(2):115-120.
- SAS Institute. 2010. Statistical Analysis Software SAS/STAT®. version 9.0.2, Cary, N.C., USA: SAS Institute Inc., ISBN: 978-1-60764-599-3.

- Saunois, M., Stavert, A.R., Poulter, B., *et al.* 2019: "The Global Methane Budget 2000–2017", en *Earth System Science Data*, 2(3): ESSD, 12, 1561–1623.
- Schink, B. 2006. Syntrophic associations in methanogenic degradation. In: Overmann J (ed.). *Molecular Basis of Symbiosis*. Berlin: Springer, p. 1-19.
- SEMARNAT. 2017. Biodiversidad. Capítulo 4. Consultado en línea 12/01/2019. https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe15/tema/pdf/Cap4_biodiversidad.pdf.
- Shibu, J. 2009. Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: an overview. *Agroforestry Systems*, 76:1–10.
- SIAP. 2019. Población ganadera 2010 – 2019. Consultado en línea 05/01/2019. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/564340/Inventario_2019_bovinos.pdf.
- Smith, J., Sones, K., Grace, D., MacMillan, S., Tarawali, S., Herrero, M. 2013. Beyond milk, meat, and eggs: Role of livestock in food and nutrition security. International Livestock Research Institute Nairobi, Kenya, 3(1):6-13.
- Somarriba, E., 1992. Revisiting the past: an essay on agroforestry definition. *Agroforestry Systems*, 19(3):233-240.
- Sosa-Montes, E., Alejos-de la Fuente, J., Pro-Martínez, A., González-Cerón, F., Enríquez-Quiroz, J., Torres-Cardona, M. 2020. Composición química y digestibilidad de cuatro leguminosas tropicales mexicanas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 24:211-220.
- Soto-Pinto, L., Anzueto, M., Mendoza, J., Jiménez-Ferrer, G., de Jong, B. 2009. Carbon sequestration through agroforestry in indigenous communities of Chiapas, México. *Agroforestry Systems*, 78(1):39-51.

- Staal, S., Poole, J., Baltenweck, I., Mwacharo, J., Notenbaert, A., Randolph, T., Thorpe, W., Nzuma, J., Herrero, M. 2009. Strategic investment in livestock development as a vehicle for rural livelihoods. ILRI Knowledge Generation Project Report. International Livestock Research Institute Nairobi, Kenya.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., de Haan, C. 2009. La larga sombra del ganado, problemas ambientales y opciones. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 431 p. United Nations Population Fund (UNFPA).
- Suárez, D.H., López, T.Q. 1996. La ganadería bovina productora de carne en México y su situación actual. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. Disponible en línea en <http://agrinet.tamu.edu/trade/papers/hermilo.pdf>.
- Thagaard, C. 2007. The abundance and diversity of methanogens and their association with ciliates. Tesis Doctoral. University of Western Australia, pp 17–20.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2 ed. S.I.: Cornell University Press, 476 p.
- Van Soest, P.J., Roberson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.
- Vargas, R., *et al.*, 2015. Atlas de suelos de América Latina y el Caribe, Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo.
- Velázquez-Martínez, M., López-Ortiz, S., Hernández-Mendo, O., Díaz-Rivera, P., Pérez-Elizalde, S., Gallegos-Sánchez, J. 2010. Foraging behavior of heifers with or without social models in an unfamiliar site containing high plant diversity. *Livestock Science*, 131:73-82.

- Vélez-Terranova, M., Campos-Gaona, R., Sánchez-Guerrero, H. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17:489-499.
- Vilaboa-Arroniz, J., Díaz-Rivera, P., Ruiz-Rosado, O., Platas-Rosado, D.E., González-Muñoz, S., Juárez-Lagunes, F. 2009. Caracterización socioeconómica y tecnológica de los agroecosistemas con bovinos de doble propósito de la región del Papaloapan, Veracruz, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, Yucatán, México, 10(1):53-62.
- Villanueva, C., Ibrahim, M., Casasola, F., Rios, N., Sepúlveda, C. 2010. Sistemas silvopastoriles: una herramienta para la adaptación al cambio climático de las fincas ganaderas en América Central, 6:103-125.
- Vivas-Arturo, W.F., Vera-Arteaga, D.E., Alpizar-Muni, J. 2017. Determinación in vitro de la calidad nutricional de tres leguminosas forrajeras. *Producción y salud animal. Revista Técnica*, 17:43–52.
- Vogels, G.D., Hoppe, W.F., Stumm, C.K. 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(3):608-612.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147:116–139
- Wallace, R.J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63:621-629.
- Wei-Lian, H., Yue-Ming, W., Jian-Xin, L., Yan-Giu, G., Jun-An, Y. 2005. Tea saponins affect in vitro fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Journal of Zhejiang University Science B*, 6:787–792.

- Wina, E., Muetzel, S., Becker, K. 2005. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Productions A Review. University of Hohenheim-Germany, Indonesian Research Institute for Animal Production – Indonesia, 53(21):8093-105.
- Yu, Z., Morrison, M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Bio Techniques*, 36(5):808-12.
- Zamora, C.P., Domínguez, C.M.R., Villegas, P., Gutiérrez, B.C., Manzanero, A. L.A., Ortega, H.J.J., Hernández, M.S., Puc, G.E.C., Puch, C.R. 2011. Composición florística y estructura de la vegetación secundaria en el norte del estado de Campeche, México. *Bol. Soc. Bót. Méx*, 89:27-35.
- Zhou, Y.Y., Maoa, H.L., Jianga, F., Wanga, J.K., Liua, J.X., McSweeney, C.S. 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167:93–100.

ANEXO I. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA RUMINAL *IN VITRO* POR PCR DIGITAL EN GOTAS

INTRODUCCIÓN

El rumen comprende un ecosistema complejo con características intrínsecas propias que en su conjunto tienen la capacidad de fermentar los alimentos consumidos por el animal. Este proceso fermentativo ocurre mediante la intervención de microorganismos que transforman el alimento ingerido en ácidos grasos volátiles, cuyo propósito es suministrar energía al rumiante (Weimer *et al.*, 2009).

El rumen es un ambiente anaeróbico reducido que permite el desarrollo de distintos grupos de microorganismos, constituidos principalmente por bacterias, protozoarios, hongos y arqueas (Russell, 2002). Para 1944 se habían logrado cultivar unas 200 especies de bacterias ruminales en condiciones de laboratorio (Russell, 2002). Informes recientes que utilizan la secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés Next Generation Sequencing) han revelado la presencia de los 13 principales filos en el rumen, que incluyen 40 órdenes bacterianos, alrededor de 80 clases de bacterias y por lo menos 180 familias bacterianas correspondientes a unos 320 géneros de bacterias y más de 2,000 unidades taxonómicas bacterianas operativas (OTU, del inglés Operation Taxonomic Unit) (Petri *et al.*, 2012; Castillo-López *et al.*, 2014). La densidad bacteriana en el rumen se encuentra en el rango de 10^7 a 10^{10} células/ml de líquido ruminal. Los filos bacterianos más abundantes son *Bacteroidetes* y *Firmicutes* que incluyen por lo menos el 75 % de la población bacteriana total. El género de bacterias ruminales más abundante es *Prevotella*, que representa aproximadamente el 20 % de la comunidad bacteriana (Castillo-López *et al.*, 2014; Danielsson *et al.*, 2017).

Nuevos reportes que utilizan la NGS han demostrado que los géneros de protozoarios predominantes son *Entodinium*, *Epidinium*, *Metadinium*, *Diploplastron*, *Polyplastron* y *Diplodinium* (Lima *et al.* 2015). Más del 90 % de la población de protozoarios en el rumen pertenece a la clase *Litostomatea*, que incluye dos grupos: *Haptoria* y *Trichostomatia*. La subclase *Trichostomatia* comprende al género *Entodinium*, uno de los más estudiados, que constituye entre el 89 y el 91 % de la población protozoaria (Lima *et al.* 2015).

Kumar *et al.* (2015) mediante estudios de NGS reveló la presencia de 5 principales filos fúngicos, que incluyen 55 géneros de hongos. Los géneros predominantes son *Ascomycota* (27%), *Basidiomycota* (3%) y *Neocallimastigomycota* (1%).

Por su parte Zhou *et al.* (2017), utilizando NGS reportó que el filo de arqueas más abundante en el rumen es *Euryarchaeota*, que constituye el 99 % de la población de arqueas ruminales. Se han detectado diez géneros de arqueas en el rumen y el género más abundante es *Methanobrevibacter* el cual representa aproximadamente el 91% del total.

Pocos descubrimientos del mundo científico pueden ser considerados realmente revolucionarios, como el desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) desarrollada por Kary Mullis, la cual se ha convertido en una técnica de trabajo elemental en los laboratorios del mundo (Rodríguez y Barrera 2004). Estos autores definen la PCR como un método *in vitro* de síntesis de DNA donde un segmento en particular de éste es amplificado al ser delimitado por un par de cebadores u oligonucleótidos, permitiendo producir un enorme número de copias de una secuencia específica de DNA (amplicón) sin recurrir a la clonación. Esta es una técnica de la biología molecular altamente específica, rápida y versátil en la cual se detectan cantidades pequeñas de un DNA específico, posibilitando su fácil identificación (Rodríguez y Barrera, 2004).

La PCR en tiempo real (q-PCR o PCR cuantitativa) es una herramienta que se utiliza para el análisis cuantitativo del ácido nucleico. La PCR en tiempo real es un refinamiento de la PCR desarrollado a mediados de los 1980 que permite la detección rápida del DNA microbiano, indicando así la presencia de un microorganismo o grupo de microorganismos (Kubista, 2006). En comparación con un método convencional de PCR que emplea dos cebadores, en los ensayos de PCR en tiempo real se requiere de una molécula fluorescente adicional, la cual da la señal en tiempo real de la síntesis de DNA. Por ello este método es altamente sensible y específico (Kubista, 2006).

Alrededor de poco más de una década se desarrolló un nuevo método de cuantificación de DNA por PCR denominado PCR digital o PR digital en gotas. La mejoría en sensibilidad y reproducibilidad de la técnica, así como ser menos susceptible a inhibidores que el q-PCR radica en que la reacción de PCR se divide en miles de gotas en las cuales la reacción se lleva a cabo de forma independiente y posteriormente estas gotas se cuantifican (Baker, 2012). Además de lo anterior, esta técnica permite llevar a cabo la amplificación en un termociclador ordinario y considerando un gran número de muestras es más económico por reacción que el q-PCR (Baker, 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de DNA de microorganismos ruminales de la fermentación *in vitro* de forrajes tropicales

Obtención de pastilla de microorganismos ruminales

Se colectaron muestras tanto de líquido ruminal recién extraído y filtrado (ver 5.4. fermentación *in vitro*), del blanco (líquido ruminal más el inóculo) a la hora cero, así como de éste y de todos los tratamientos de la fermentación ruminal *in vitro* a las 24 horas.

1. Se colocaron alícuotas de 1.4 mL de cada una de las fermentaciones en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugó a 200 g durante 2 minutos para

sedimentar los restos vegetales. Para el caso de los tratamientos a base de *D. glabra*, *B. divaricata* y *P. piscipula*, las muestras se centrifugaron a 300 g durante 4 minutos debido a que los residuos vegetales no se sedimentaron a 200 g.

2. El sobrenadante se recuperó por decantación en microtubos nuevos del mismo volumen; para el caso de los tratamientos a base de *D. glabra* y *P. piscipula*, el sobrenadante se recuperó por aspiración con micropipeta debido a que quedaron restos vegetales suspendidos. Los sobrenadantes recuperados se centrifugaron a 12,000 g durante un minuto a temperatura ambiente para sedimentar los microorganismos.
3. El sobrenadante de cada tubo se eliminó por decantación y la pastilla se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Se colectaron 6 replicados de cada una de las muestras y tratamientos.
4. Se repitieron los pasos 1 y 2 con la finalidad de obtener una pastilla de mayor tamaño.
5. Las pastillas se almacenaron en ultracongelación en un tanque con nitrógeno líquido.

Extracción de DNA

Se realizó con el protocolo de Phenol-Cloroform plus bead-beating (PCSA), modificado por Lueders *et al.* 2004. A continuación, se describe el procedimiento:

1. Las muestras se colocaron en hielo.
2. Inmediatamente se adicionaron 600 µl de solución TNS a la pastilla y se resuspendió con un vortex.
3. La muestra resuspendida se vertió en un microtubo de tapa de rosca de 2.0 mL conteniendo 200 mg de perlas de vidrio de 0.1 y 0.5 mm, se adicionaron 600 µl de fenol-cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1, pH 8) y se agitó durante 5 minutos en vortex.
4. Se dejó reposar en hielo por 5 min tras lo cual se centrifugó a 16,000 g durante 10 min a 4°C.
5. Se recuperó la fase acuosa en tubos de 2 mL.

6. Se adicionó un volumen de cloroformo y se mezcló por inversión 3-4 veces tras lo cual la muestra se centrifugó a 16,000 g durante 5 minutos a 4°C.
7. Se recuperó nuevamente la fase acuosa en microtubo nuevo de 1.5 mL.
8. Se adicionó un volumen de isopropanol y se mezcló por inversión.
9. La muestra dejó reposar en hielo durante 15 minutos para precipitar el DNA.
10. Posteriormente se centrifugó a 16,000 g durante 30 minutos a 4°C y al término se recuperó la pastilla eliminando el sobrenadante por decantación.
11. Se adicionó 1 mL de etanol al 70% para lavar la pastilla agitando por inversión.
12. Se centrifugó a 16,000 g durante 10 minutos a 4°C eliminando el sobrenadante por decantación.
13. Se procedió con un lavado adicional con etanol al 70% repitiendo los pasos 11 y 12.
14. Se eliminó el etanol por aspiración con micropipeta y el tubo se colocó en un thermoblock a 40°C durante 5 minutos para evaporar los remanentes de etanol evitando secar la pastilla.
15. La pastilla se resuspendió en agua ultra purificada y esterilizada libre de nucleasas.
16. El DNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm en un Nanodrop Lite.
17. El DNA se conservó en congelación a -20°C hasta su uso para PCR.

Electroforesis

Se prepararon geles de agarosa al 1% bajo las recomendaciones de Sambrook y Russell (2001). Para preparar el gel se usó 0.75 g de agarosa y 75 mL de TAE 1X, se calentó durante 2 minutos o hasta que la agarosa se disuelva perfectamente y se dejó enfriar a una temperatura aproximada de 45°C para posteriormente verter sobre el molde con un peine de 14 ó 20 pozos, dependiendo del número de muestras y se dejó gelificar. Se adicionó buffer TAE 1X hasta cubrir totalmente el gel. Como buffer de carga para las muestras de DNA se usó UVIEW™ 6x (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante. La corrida se realizó a 80 Volts durante 45 minutos.

Reacción de PCR punto final

El DNA extraído de cada tratamiento de la fermentación *in vitro* se usó como molde para la amplificación del gen 16S rRNA por PCR con los oligonucleótidos para bacteria universal 16S RT Fwd (5´GACTCCTACGGGAGGCAG 3´) y 16S RT Rev (5´GTATTACCGCGGCTGCTG 3´) (Petrova *et al.* 2017) y la DNA polimerasa ddPCR EvaGreen Supermix (BIORAD). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl conforme a las especificaciones del fabricante.

RESULTADOS

Prueba con diferentes métodos de extracción de DNA genómico a partir de muestras de líquido ruminal para determinar la eficiencia de cada uno ellos.

Se realizaron pruebas con los diferentes protocolos de extracción para determinar la calidad, cantidad e integridad de DNA genómico extraído de la microbiota ruminal proveniente de la fermentación *in vitro* (Cuadro 12).

Cuadro 12. Métodos de extracción de DNA genómico

Nombre	Abreviación	Referencia
Modified Phenol-Chloroform with bead beating	PCSA	Henderson y Janssen, 2013 (Modificado de Lueders <i>et al.</i> 2004).
Repeated Bead-Beating plus column method	RBBC	Yu y Morrison, 2004.
Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide	CTAB	Modificado por Durgadevi y Aarohi, 2018.
ZymoBIOMICS™ DNA Mini Kit, ZYMO RESEARCH (Catalogo No. D4300).		Kit para muestras ambientales de aislamiento de DNA bacteriano, fúngico, protozoarios, algas, virus, mitocondria, así como de la célula hospedera a partir de ≤ 200 mg heces de mamífero, ≤ 250 mg suelo, y 50 – 100 mg de células, biofilms o agua.

En el Cuadro 13 se muestran los rendimientos y pureza. En la Figura 6 se observa la integridad, para cada uno de los protocolos. Los resultados fueron similares para todos los parámetros evaluados de los protocolos de PCSA y CTAB; con base a facilidad y periodos de incubación más cortos que se observaron durante el proceso de extracción, se decidieron realizar las extracciones con el protocolo PCSA.

Cuadro 13. Calidad y cantidad de DNA de líquido ruminal de las fermentaciones *in vitro* con distintos protocolos de extracción

No	METODO	MUESTRA	A260/A280	ng/ μ L	μ g tot/pastilla
2	RBB+C	IA	1.93	183.4	6,419.0
3	RBB+C	LR	1.95	769.5	34,627.5
4	RBB+C (VORTEX)	LR	1.97	1122.8	50,526.0
5	PCSA	LR	1.94	1054.1	47,434.5
6	PCSA	LR	1.97	1179.4	53,073.0
7	COLUMNNA	IA	1.89	55.5	5,550.0
8	COLUMNNA	LR	1.84	152.8	15,280.0
9	CTAB	IA	1.94	593.7	20,779.5
10	CTAB	IA	1.94	533.9	18,686.5
11	CTAB (DISRUPTOR)	IA	1.97	545.2	19,082.0
12	CTAB (DISRUPTOR)	LR	1.98	1219.7	54,886.5

Las siglas corresponden al método (ver cuadro 12). I = Inóculo. LR = líquido ruminal

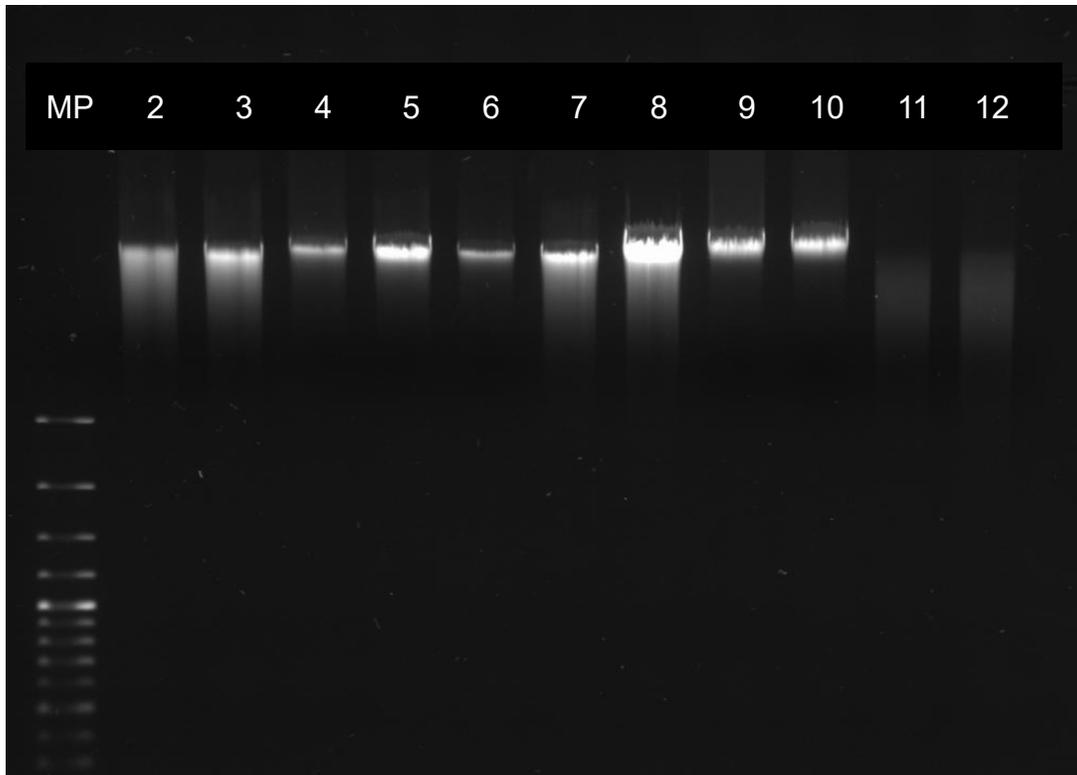


Figura 6. Integridad de DNA de líquido ruminal de las fermentaciones *in vitro* con distintos protocolos de extracción El número indica el pozo correspondiente del gel en la electroforesis (ver Cuadro 13). MP = marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Gel en agarosa al 1%. En cada pozo se cargaron 600 ng de DNA

Extracción de DNA genómico de los tratamientos con el protocolo PCSA

En el Cuadro 14 podemos observar que todos los tratamientos mostraron buen rendimiento del DNA genómico, pero en cuanto a la pureza, el tratamiento a base de *D. glabra* presentó la menor relación de absorbancia A260/A280 con un valor de 1.63 lo que nos podría indicar la presencia de residuos fenólicos u otros contaminantes. Lo anterior sugiere que la eficiencia del protocolo de extracción no es adecuada para la eliminación de estos compuestos. En la Figura 7 podemos observar que todos los tratamientos mostraron buena integridad del DNA genómico.

Cuadro 14. Resultados de calidad y cantidad de DNA genómico obtenido a partir de líquido ruminal de las fermentaciones *in vitro* con distintos forrajes tropicales.

Muestra	A260 (10mm)	A260/A280	ng/ μ L	μ g/pastilla
Pm	10.426	1.86	521.3	23,458.5
Cv	6.666	1.84	333.3	14,998.5
Dg	5.107	1.63	255.3	11,488.5
Bd	11.469	1.92	573.5	25,807.5
Pp	8.367	1.89	418.3	18,823.5
I24	4.303	1.89	215.1	9,679.5
I	11.109	1.95	555.5	24,997.5
LR	21.288	1.97	1,064.4	47,898.0

Las siglas corresponden a la especie de planta empleada en la fermentación ruminal. Pm *Panicum máximum*, Cv *Caesalpinea vesicaria*, Dg *Dalbergia glabra*, Bd *Bahuinia divaricata*, Pp *Piscidia piscipola*, I24: Inóculo 24 horas, I: Inóculo, LR: Líquido

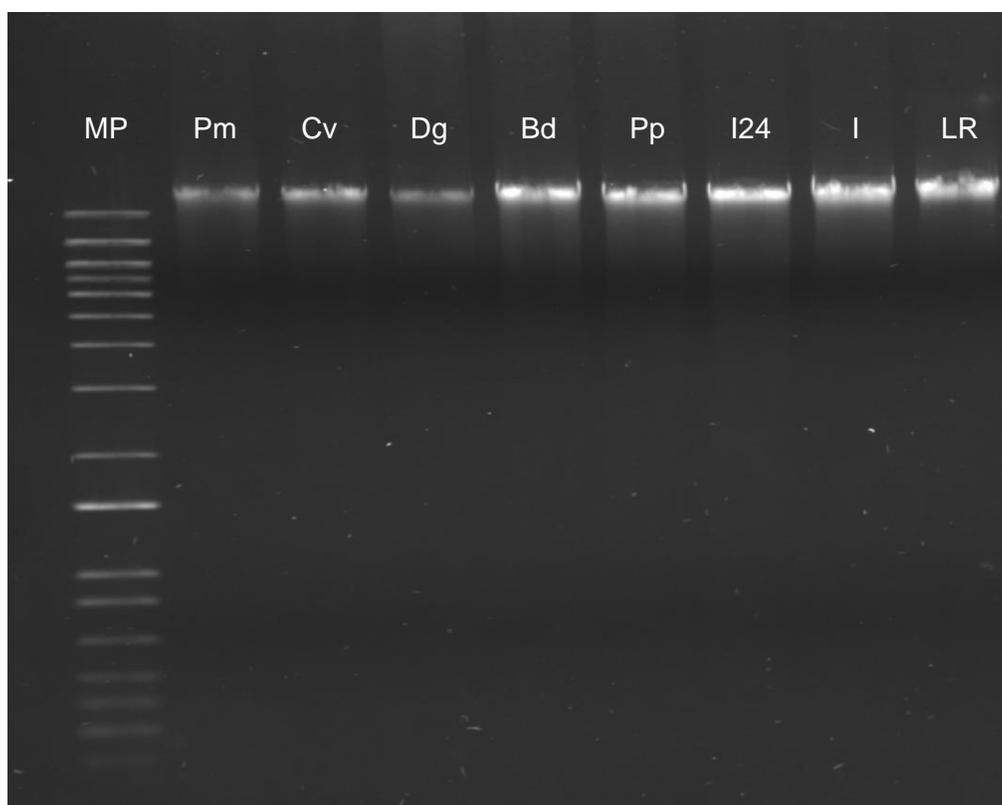


Figura 7. Resultados de integridad de DNA genómico obtenido a partir de líquido ruminal de las fermentaciones *in vitro* con distintos forrajes tropicales. Las siglas corresponden a la especie de planta empleada en la fermentación ruminal (ver Cuadro 14). MP = marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen). Gel en agarosa al 1%. En cada pozo se cargaron 300 ng de DNA

Reacción de PCR para la detección del gen correspondiente a la subunidad pequeña del RNA ribosomal (16S) bacteriano en DNA extraído de las fermentaciones *in vitro* de los diferentes tratamientos

En la Figura 8 se observa que los tratamientos con follaje de *D. glabra* y *P. piscipula* no presentaron ningún producto de PCR, lo mas probable debido a compuestos fenolicos; por lo tanto fue necesario purificar las muestras de DNA genómico previamente obtenidas.

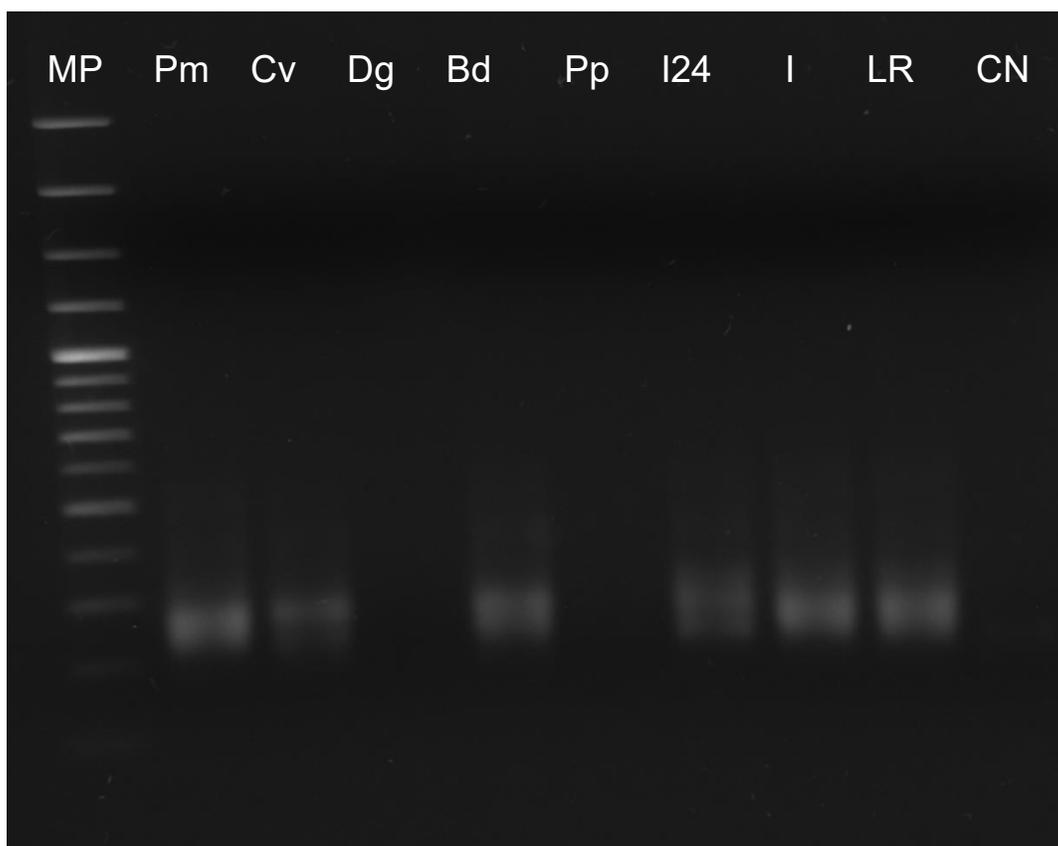


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% del producto de PCR para el gen 16S de bacteria. Las siglas indican la especie empleada en cada tratamiento. Se observa la ausencia de amplicón en el caso de *D. glabra* y *P. piscipula*. Tamaño de producto esperado de 175 a 200 pares de bases. CN control negativo. Componentes de la reacción, volumen y condiciones de PCR ver el Anexo 5.

Debido a la inhibición en la reacción de PCR observada (Figura 8), se empleó un kit para purificación y limpieza de DNA genómico. Se utilizó el kit One Step PCR

Inhibitor removal (ZymoResearch) conforme a las instrucciones del fabricante. En la Figura 9 se observan bandas bien delimitadas en el gel de agarosa, lo que nos sugiere buena integridad y pureza de los DNA genómicos purificados (comparar la nitidez de las bandas entre Figura 6 y Figura 9). Tras la limpieza la relación de absorbancia A260/A280 mejoró notablemente (ver Cuadro 15), en especial para los tratamientos que no presentaron productos en la reacción de PCR previamente. Por lo anterior se procedió a realizar una nueva reacción de PCR con los DNAs purificados.

Cuadro 15. Calidad y cantidad de DNA genómico de líquido ruminal de las fermentaciones *in vitro* tras su purificación con el kit ONE STEP PCR INHIBITOR REMOVAL.

Muestra	A260 (10mm)	A260/A280	ng/ μ L	μ g/pastilla
Pm	2.864	2.09	143.0	17,160.0
Cv	2.636	2.07	131.8	15,816.0
Dg	0.819	1.99	41.0	4,920.0
Bd	2.344	2.01	117.2	14,064.0
Pp	1.620	2.00	81.0	9,720.0
I24	1.070	2.00	53.5	6,420.0
I	3.080	1.99	154.0	18,480.0
LR	8.815	2.04	440.7	52,884.0

Las siglas corresponden a la especie de planta empleada en la fermentación ruminal. Pm *Panicum máximum*, Cv *Caesalpineia vesicaria*, Dg *Dalbergia glabra*, Bd *Bahuinia divaricata*, Pp *Piscidia piscipula*, I24 Inóculo 24 horas, I Inóculo, LR Líquido

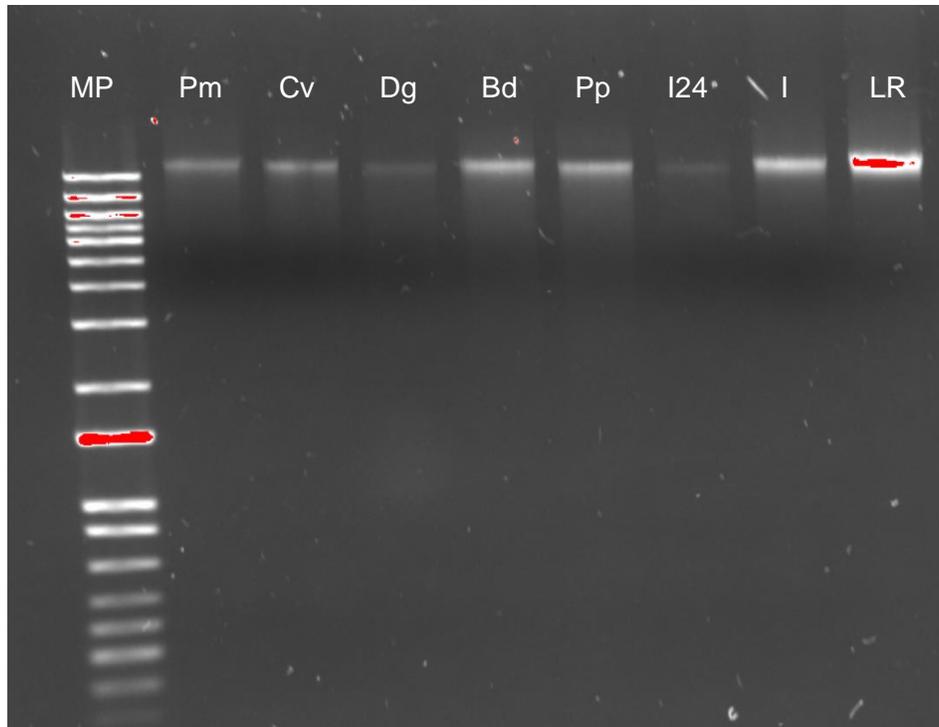


Figura 9. Integridad de DNA genómico de líquido ruminal de las fermentaciones *in vitro* tras su purificación con el kit ONE STEP PCR INHIBITOR REMOVAL. Nótese que los DNAs de todas las muestras se observan con mayor nitidez y sin barrido en comparación con los DNAs de la Figura 6. En cada pozo se colocaron 250 ng de DNA. Las siglas corresponden a la especie empleada en cada tratamiento

En la Figura 10 podemos observar que todos los tratamientos presentaron productos de la reacción de PCR para el gen 16S de bacterias, lo cuando indica que el kit de purificación fue eficiente en la eliminación de las substancias fenólicas y otras que inhibieron la reacción de PCR previamente.

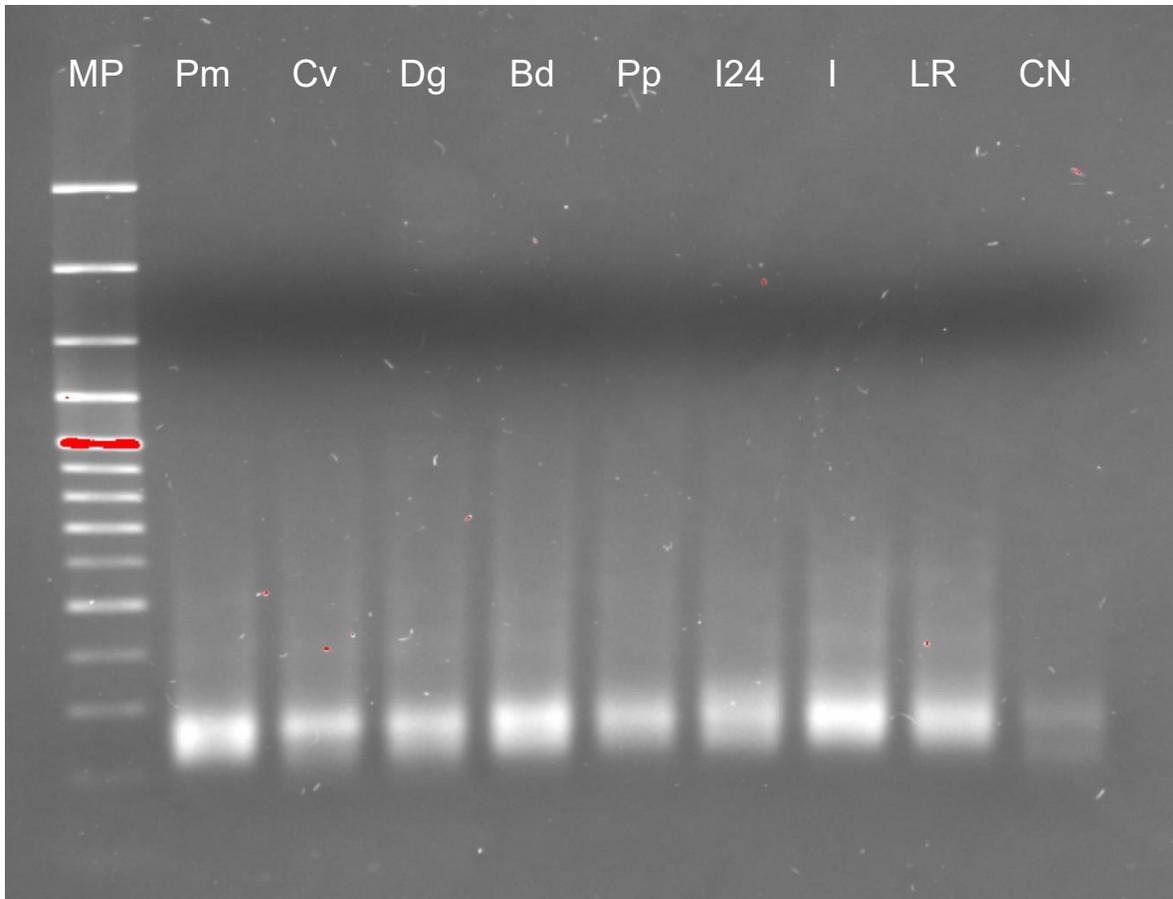


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% del producto de PCR para el gen 16S de bacteria empleando DNA purificado. Se colocaron 10 microL del producto de PCR por pozo. Las siglas indican la especie empleada en cada tratamiento. Tamaño de producto esperado de 175 a 200 pares de bases. CN control negativo. Componentes de la reacción, volumen y condiciones de PCR ver Anexo 5.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que se establecieron las condiciones óptimas para la extracción de DNA de calidad a partir de muestras de líquido ruminal provenientes de fermentaciones *in vitro* con distintos tipos de plantas forrajeras de la región de Campeche. Además de la optimización del protocolo de extracción de DNA, se demostró que el DNA sirve para detectar genes de interés mediante PCR. Al haber estandarizado el método con la enzima ddPCR EvaGreen Supermix para la reacción de PCR será posible escalar el proceso para su uso en la cuantificación de genes de interés mediante PCR digital.

BIBLIOGRAFÍA

- Baker, M. 2012. Digital PCR hits its stride. Nature America, Inc. All rights reserved, 9(6):541–544
- Castillo-Lopez, E., Klopfenstein, T.J., Fernando, S.C., Kononoff, P.J. 2014. Effect of dried distiller's grains and solubles when replacing corn or soybean meal on rumen microbial growth in vitro as measured using DNA as a microbial marker. Canadian Journal of Animal Science, 94(2):349-356.
- Castillo-Lopez, E., Ramirez-Ramirez, H.A., Klopfenstein, T.J., Anderson, C., Alughthge, N.D., Fernando, S.C., Kononoff, P.J. 2014. Effect of feeding dried distiller's grains with solubles on ruminal biohydrogenation, intestinal fatty acid profile, and gut microbial diversity evaluated through DNA pyrosequencing. Journal of Animal Science, 92:733–743.
- Danielsson, R., Dicksved, J., Sun, L., Gonda, H., Müller, B., Schnürer, A., *et al.* 2017. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic. Frontiers in Microbiology, 8:226.
- Durgadevi, A., Aarohi, K. 2018. Modifications and optimization of manual methods for polymerase chain reaction and 16S rRNA gene sequencing quality community DNA extraction from goat rumen digesta. Veterinary World, 11(7): 990-1000.
- Henderson, G., Janssen, P. 2013. A Global Census of Rumen Microbial Diversity. Project scope and protocols, version 5. AgResearch Ltd. pP. 10. Consultado en línea 01/06/19. www.globalrumencensus.org.nz
- Kubista, M., Andrade, J., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., *et al.* 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspect of Medicine, 27:95–125.

- Kumar, S., Indugu, N., Vecchiarelli, B., Pitta, D.W. 2015. Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 6:781.
- Lima, F.S., Oikonomou, G., Lima, S.F., Bicalho, M.L.S., Ganda, E.K., de Oliveira F.J.C., *et al.* 2015. Prepartum and postpartum rumen fluid microbiomes: characterization and correlation with production traits in dairy cows. *Applied Environmental Microbiology*, 81:1327–1337.
- Petri, R.M., Forster, R.J., Yang, W., McKinnon, J.J., McAllister, T.A. 2012. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6):1152–62.
- Petrova, O., Garcia-Alcalde, F., Zampaloni, C., *et al.* 2017. Comparative evaluation of rRNA depletion procedures for the improved analysis of bacterial biofilm and mixed pathogen culture transcriptomes. *Scientific Reports*, 7:41114
- Rodríguez, I., Barrera, H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a 2 décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 1405-9177.
- Russell, J. 2002. *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Ithaca, NY.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EUA.
- Weimer, P.J., Russell, J.B., Muck, R.E. 2009. Lessons from the cow: what the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. *Bioresources and Technology*, 100(21):5323-5331.
- Yu, Z., Morrison, M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal sample. *Bio Techniques*, 36(5).

Zhou, Z., Fang, L., Meng, Q., Li, S., Chai, S., Liu, S., Schonewille, J.T. 2017. Assessment of ruminal bacterial and archaeal community structure in yak (*Bos grunniens*). *Frontiers in Microbiol*, 8:179.

ANEXO 2. Reactivos usados para preparar la solución buffer de la fermentación ruminal *in vitro*

Buffer para preparar el inóculo de la fermentación ruminal *in vitro* de los follajes leguminosos.

1 litro de solución buffer			
80.0 g	Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Fermont, 12903
1 litro de Solución mineral 1			
6.0 g	Fosfato de sodio dibásico	Na ₂ HPO ₄	J.T. Baker, 3828-01
1 litro de solución mineral 2			
6.0 g	Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	J.T. Baker, 3246-01
6.0 g	Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	J.T. Baker, 0792-01
12.0 g	Cloruro de sodio	NaCl	J.T. Baker, 3625-01
2.45 g	Sulfato de magnesio	MgSO ₄	MEYER, 1604
1.0 g	Cloruro de calcio	CaCl ₂	QUIMICA MERCURIO, QMC0197
1 litro de Hidróxido de sodio (1N)			
40.0 g	Hidróxido de sodio	NaOH	J.T. Baker, 6697-01
50 mL de solución reductora (Calentar e inyectar CO₂)			
2.0 mL	Hidróxido de sodio 1N	NaOH	J.T. Baker, 6697-01
0.5 g	Sulfuro de sodio nonahidratado	Na ₂ S*9H ₂ O	SIGMA-ALDRICH, 208043
0.5 g	L-Cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S*HCl*H ₂ O	MEYER, 1040
1 gota	Resazurina	C ₁₂ H ₆ NNaO ₄	SIGMA,R7017

ANEXO 3. Materiales, equipos y reactivos usados para el análisis bromatológico

Materiales, equipos y reactivos usados para el análisis proximal de los follajes

Materiales

- Pinzas para crisol
- Crisoles de porcelana de capacidad de 10 mL, (marca Coorstek cat. 60109I).
- Desecador
- Tubos de cultivo Pyrex o Kimax cat.45048-25200 de 20 X 2.5cm
- Embudos Buchner de porcelana
- Papel filtro Wathman 541 cat.1541-125 diámetro de 125 mm.
- Porta cartuchos de vidrio 2.8 cm y 2.5 cm ID X 9cm
- Espátulas
- Pinzas para tubos
- Pipeta
- Probetas de vidrio de 250 y 500 mL
- Gradilla metálica
- Matraz Erlenmeyer de 50 mL
- Bureta de cristal de 25 mL ó 50 mL (en caso de que se tenga puede ser bureta digital).
- Matraces aforados de 50 mL, 1 L y 2 L (dependiendo del volumen a preparar)
- Matraces de bola con fondo plano de 10 L (para gran cantidad de muestras)
- Magnetos
- Soporte universal
- Vasos de extracción para grasa (KIMBLE CHASE), no.cat.7002-000 capacidad 85mm (KIMAX).
- Contenedores de vidrio para captar el éter después del proceso de extracción (2.8cm y 2.5cm ID X 10cm)

- Cartuchos de celulosa de 2.5 X 8 cm
- Porta cartuchos de vidrio 2.8 cm y 2.5 cm ID X 9cm

Equipos

- Estufa de secado
- Balanza analítica OHAUS
- Mufla
- Parrilla eléctrica con control de temperatura.
- Bomba de vacío
- Tren de vacío
- Parrilla eléctrica (para digestión de muestras) con control de temperatura.
- Microdestilador LABCONCO
- Aparato Goldfish para extracción de grasa marca LABCONCO

Reactivos para determinación de FDN y FDA

- Solución de detergente neutro concentrado ANKOM cat. FND20C (reactivo para 20 litros de solución).
- Solución de detergente ácido ANKOM cat. FAD20C (reactivo para 20 litros de solución).
- Acetona J.T Baker cat. 9006-03 (4 litros)

Reactivos para determinación de PT

- Ácido sulfúrico concentrado grado reactivo PM=98.08 g/mol J.T.Baker 2.5 l cat.9681-05; Meyer; Fermont
- Hidróxido de sodio en pellet PM=40.0 g/mol J.T. Baker; Fermont cat.36902 (500g)
- Ácido bórico PM= 61.84 g/mol J.T.Baker cat.0084-19 (1 Kg); Fermont ; Meyer.
- Ácido clorhídrico PM=36.46 g/mol J.T.Baker cat.9535-02 (1 l); Fermont ; Meyer.
- Indicador rojo de metilo (sal sódica) J.T.Baker R086-02
- Indicador verde de bromocresol PM= 698.04 g/mol Merck 1081210005(5g).

- Alcohol etílico al 96%
- Sulfato de sodio anhidro PM=142.04 g/mol J.T.Baker 3891-05 (2.5 kg)
- Sulfato de cobre pentahidratado PM= 249.68 g/mol J.T. Baker; Fermont; Merck o Meyer.
- Selenio negro PM=78.96 g/mol Merck cat. 1077140050; J.T. Baker; Fermont o Meyer.
- Carbonato de sodio anhidro

Reactivo para determinación de Extracto etéreo

- Éter de petróleo Meyer Cat.1290-4I; J.T.Baker; Fermont.

ANEXO 4. Materiales y reactivos usados en la determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Materiales usados en la determinación cualitativa de metabolitos secundarios de los follajes

- Matraz de fondo plano de 250 mL
- Mortero con pistilo
- Tubos de ensayo de 10-15 mL
- Gradilla para tubos de ensayo
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Baño María
- Varillas de vidrio
- Pipetas Pasteur
- Parrilla
- Soporte universal con anillo
- Viales con tapa
- Tubos capilares
- Pinzas de tres dedos
- Embudo de tallo corto
- Espátula

Reactivos usados en la determinación cualitativa de metabolitos secundarios de los follajes

- Cloruro férrico: Solución al 1%. 0.5 g de Cloruro férrico aforado a 50ml de agua destilada.
- Reactivo de Rosenthaler: 0.5 g de vainillina a 50 ml con etanol
- Hidróxido de potasio al 5%: 2.5 g de hidróxido de potasio a 50 ml de agua destilada.
- Ferrocianuro de potasio al 1%: 0.5 g de ferrocianuro de potasio en 50 ml de agua destilada.

- Reactivo de Sonneschain: Solución saturada de Molibdato de amonio en agua se añade lentamente a una solución saturada de fosfato disódico a 40°C. Se forma un precipitado, este precipitado se lava con agua y se pasa a un vaso donde se agrega una solución concentrada de carbonato de calcio (puede ser al 40%).

ANEXO 5. Materiales, equipos y reactivos usados en el ANEXO 1

Material para elaborar soluciones para biología molecular

- Vasos de precipitado de 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Barras de agitación
- Probetas de 50 mL y 100 mL
- Filtro milipore de 0.2 μm
- Jeringa de 20 mL
- Espátula

Materiales para la extracción de DNA de las muestras de la fermentación *in vitro*

- Puntas de 10 μL , 200 μL y 1000 μL
- Tubos microcentrifugo base cónica de 1.5 mL
- Tubos microcentrifugo de 2.0 mL
- Perlas de vidrio de 0.1 mm y 0.5 mm
- Micropipetas de volúmenes de 2 μL , 20 μL , 200 μL y 1000 μL

Materiales para electroforesis

- Tubos para PCR 100 μL
- Peine de 15 pozos de 14 cm x 0.75 mm (1704445 BIO-RAD)
- Placa para gel de electroforesis (BIO-RAD)

Equipos usados:

- Cámara de electroforesis (BIO-RAD)
- Balanza analítica (Ohaus)
- Parrilla con agitación magnética
- Microcentrifuga refrigerada (Heraeus Fresco 17 Thermo Scientific)
- Minicentrífuga (BIO-RAD)

- Vórtex (BR-2000. BIO-RAD)
- Thermoblock (SELECT HEAT, dry block water. Select Bioproducts)
- Fuente de poder (Power Pac Basic BIO-RAD)
- Termociclador T-100 (BIO-RAD).

Preparación de solución TNS para la extracción de DNA con el protocolo PCSA de las muestras producto de la fermentación ruminal *in vitro*:

Concentración final	Reactivo	Stock	Volumen empleado del stock para para 4 mL de buffer TNS
500 mM	Tris-HCl	1M	2 mL
100 mM	NaCl	5M	80 μ L
10%	SDS	10%	400 μ L
50 mM	EDTA	5M	400 μ L

Preparación de solución buffer para electroforesis TAE 50X (1 L):

242 g	Tris base
57.1 mL	Ácido acético glacial
100 mL	EDTA 0.5 M (pH 8.0)

Nota: la concentración final de TAE tanto en el gel como en el buffer de corrida es 1X

Reactivos para soluciones TNS y TAE 50X:

Tris base	$C_4H_{11}NO_3$	NORGEN, 28029
Ácido acético glacial	CH_3COOH	Fermont, 03011
EDTA	$C_{10}H^{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	J.T. Baker, 8993-01
Tris-HCl	$(HOCH_2)_3CNH_2 HCl$	PROMEGA, H5123
Cloruro de sodio	$NaCl$	T.J. Baker, 3624-01
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	PROMEGA, H5114

Reactivos para la extracción de DNA con el protocolo PCSA de las muestras producto de la fermentación ruminal *in vitro*:

Cloroformo	$CHCl_3$	SIGMA-ALDRICH, C2432
Etanol	$C_2H_6O_1$	SIGMA-ALDRICH, E7023
Isopropanol	C_3H_9O	SIGMA, 19516
Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)	$C_6H_6O / CHCl_3 / C_5H_{12}O$	Affymetrix, 75831

Componentes y volumen de la reacción de PCR:

Componente	Concentración	$\mu l / 1$ reacción	$\mu l / 10$ reacciones
Agua ultrapurificada		8.0	80.0
ddPCR EvaGreen Supermix	1X	10.0	100.0
Primer forward	5 mM	0.5	5.0
Primer revers	5 mM	0.5	5.0
Muestra DNA	50 ng/ μl	1.0	

Condiciones de PCR:

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Inicio	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	30
Alineamiento	60	30 seg	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	7 min	1
Conservación	12	∞	