



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y

PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**ANÁLISIS DE HOJAS DE *Gmelina arborea* Y
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE BACTERIAS RUMINALES
ADHERIDAS A PARTÍCULAS DE ALIMENTO**

BRAULIO BADILLO ORTIZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **BRAULIO BADILLO ORTIZ**, alumno de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas, académicas o ambas, de procedencia nacional e internacional que se deriven del trabajo de investigación que realicé bajo la dirección del Profesor **DR. SERGIO SEGUNDO GONZALEZ MUÑOZ**, por lo que otorgo los derechos de mi tesis **Análisis de hojas de *Gmelina arborea* y actividad enzimática de bacterias ruminales adheridas a partículas de alimento** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan 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

Montecillo, Municipio de Texcoco, Estado de México a 11 de sep de 2018.



Braulio Badillo Ortiz



Vo. Bo. Ph. D. Sergio S. González Muñoz
Profesor Investigador Titular
IREGEP-GANADERÍA.

La presente tesis titulada: **Análisis de hojas de *Gmelina arborea* y actividad enzimática de bacterias ruminales adheridas a partículas de alimento** realizada por el alumno: **Braulio Badillo Ortiz** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Ph. D. Sergio Segundo González Muñoz

ASESOR



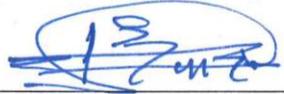
Ph. D. Mario Antonio Cobos Peralta

ASESORA



Ph. D. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

ASESOR



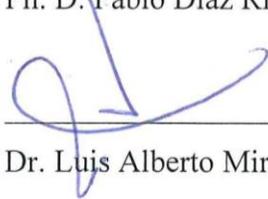
Ph. D. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR



Ph. D. Pablo Díaz Rivera

ASESOR



Dr. Luis Alberto Miranda Romero

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2018.

ANÁLISIS DE HOJAS DE *Gmelina arborea* Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE BACTERIAS RUMINALES ADHERIDAS A PARTÍCULAS DE ALIMENTO.

BRAULIO BADILLO ORTIZ, Dr. en C.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2018.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar algunas características de hojas de *Gmelina arborea* para su uso en la alimentación de rumiantes. La cantidad de lignina en la nervadura central, composición química, degradación *in vitro*, producción de biogás, CO₂, CH₄, variables fermentativas y adherencia de bacterias ruminales en tres tamaño de hojas: chicas (Hc; menos de 210.67 cm²), medianas (Hm; de 210.67 a 302.93 cm²) y grandes (Hg; más de 302.93 cm²) fueron evaluadas. Los experimentos realizados fueron: **Experimento 1.** Medición histoquímica del área relativa lignificada en un corte transversal en la nervadura y en la lámina foliar. El diseño experimental fue complemente al azar con arreglo factorial y mediciones repetidas, el efecto fijo fue el tamaño de la hoja y el efecto aleatorio fue el árbol; los factores fueron tamaño de hoja (chica, mediana, grande) y época (lluvia y seca), y los datos se analizaron con el procedimiento GLIMMIX. El efecto de la interacción tamaño de hoja por época fue significativo en el área de la nervadura total, área relativa de tejido lignificado en la nervadura, ancho de la nervadura y margen ($P \leq 0.05$), pero no fue significativo para el porcentaje del área con lignina ($P > 0.05$). **Experimento 2.** La variables determinadas fueron materia seca (MS), materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) extracto etéreo (EE), lignina, proteína, celulosa y hemicelulosa y su correlacion con la temperatura y precipitación pluvial. El diseño experimental fue factorial, los factores fueron la época y el tamaño de hoja, y los datos se analizaron con los procedimientos GLM y CORR. La época afectó el contenido de MS, FDN, lignina y celulosa ($P \leq 0.0001$), y la concentración de proteína cambió debido a la época y el tamaño de hoja ($P \leq 0.001$); la interacción época por tamaño de hoja modificó sólo el contenido de hemicelulosa ($P \leq 0.05$). Los resultados del análisis para los coeficientes de correlación y la significancia de la precipitación pluvial con cada componente químico fueron: MS ($r = 0.38$, $P = 0.0002$); FDN ($r = -0.57$, $P \leq 0.0001$); FDA ($r = -0.034$, $P = 0.747$); lignina ($r = 0.29$, $P = 0.005$); MO ($r = 0.11$, $P = 0.3141$); cenizas ($r = 0.13$, P

= 0.23); proteína ($r = -0.82$, $P < 0.0001$); EE ($r = -0.05$, $P = 0.66$); hemicelulosa ($r = -0.68$, $P < 0.0001$) y celulosa ($r = -0.38$, $P = 0.002$). Los coeficientes de correlación y significancia de la temperatura con cada componente químico fueron: MS ($r = -0.38$, $P = 0.002$); cenizas ($r = -0.13$, $P = 0.23$); FDN ($r = 0.57$, $P < 0.0001$); FDA ($r = -0.034$, $P = 0.747$); lignina ($r = -0.29$, $P = 0.0051$); MO ($r = -0.11$, $P = 0.314$); proteína ($r = 0.82$, $P < 0.0001$); EE ($r = 0.05$, $P = 0.66$); hemicelulosa ($r = 0.68$, $P < 0.0001$) y celulosa ($r = 0.38$, $P = 0.0002$).

Experimento 3. Las variables fueron degradación *in vitro* de la MS (DIVMS), variables fermentativas (ácidos grasos volátiles, AGV, y nitrógeno amoniacal, N-NH₃), producción de biogás, CO₂ y CH₄. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial, el análisis de las variables se realizó con los procedimientos GLM y CORR. La época tuvo un efecto en los porcentajes de degradación de las hojas (Seca: Hc 55.88, Hm 61.55, Hg 63.26 vs Lluvia: Hc 45.72, Hm 48.95, Hg 50.24; $P \leq 0.0001$) y en el tamaño de hoja ($P \leq 0.001$). El contenido menor de N-NH₃ fue 24.34 mg dL⁻¹ en las hojas medianas y el mayor fue para las hojas grandes (29.67 mg dL⁻¹), pero no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre los tres tamaños de hojas. En el porcentaje total de AGV no hubo efecto de la época, hoja ni por la interacción de los factores ($P > 0.05$). El efecto de la interacción época x hoja fue significativo para acético y butírico ($P \leq 0.05$), no para propiónico ($P > 0.05$), pero sí para la producción de metano *in vitro* (mL g MS⁻¹) de hojas (Seca: Hc 2.47, Hm 3.41, Hg 4.53 vs Lluvias: Hc 4.35, Hm 2.29, Hg 1.38; $P \leq 0.0001$).

Experimento 4. Cuantificación de la adherencia de bacterias ruminales a xilema, floema, epidermis de haz y del envés de lámina y la nervadura. El diseño experimental fue un arreglo factorial 4 x 3 con el tiempo de incubación (0, 3, 24 y 72 h) y el tamaño de hoja como factores, y los datos se analizaron con el procedimiento GLINMIX. En este experimento se observó la adherencia de bacterias y la degradación floema, mesófilo empalizado, mesófilo esponjoso, haz y envés de la nervadura, pero el xilema no se degradó en ningún tamaño de hoja. Las conclusiones de estos experimentos son: 1) la temperatura y precipitación influyen en el contenido de lignina dentro de la nervadura central; 2) la composición química de las hojas se modifica por la precipitación y temperatura; 3) la degradación *in vitro* de la materia seca, nitrógeno amoniacal, ácidos grasos volátiles, producción de biogás, CO₂ y CH₄ indican que hubo fermentación de las hojas dentro de los biodigestores; 4) la observación de

microorganismos adheridos en las hojas de *G. arborea* muestra un efecto positivo en el crecimiento de bacterias ruminales. Lo anterior podría ser avalado por la presencia o ausencia de tejidos y bacterias adheridas en la nervadura o lamina de las hojas después de un período de degradación. Las hojas grandes y medianas tuvieron mayor presencia de bacterias que las hojas chicas. El floema fue, probablemente, la causa principal de las diferencias en la degradación *in vitro* de la MS entre los tamaños de hojas evaluadas.

Palabras clave: *Gmelina arborea*, composición química, adherencia bacteriana, metano.

ANALYSIS OF *Gmelina arborea* LEAVES AND ENZYMATIC ACTIVITY OF RUMIAL BACTERIA ADHERED TO FOOD PARTICLES.

BRAULIO BADILLO ORTIZ, Dr. en C.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2018.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate some characteristics of leaves of *Gmelina arborea* for their potential utilization in feeds for ruminants. The amount of lignin in the central rib, chemical composition, *in vitro* degradation, gas production, CO₂, CH₄, fermentative variables and adherence of ruminal bacteria in three leaf sizes: small leaves (Hc, less than 210.67 cm²), medium (Hm) from 210.67 to 302.93 cm²) and large (Hg; more than 302.93 cm²) were determined. The experiments carried out were four: **Experiment 1.** Histochemical measurement of the relative area lignified in a cross section in the rib and in the leaf blade. The experimental design was completely randomized with factorial arrangement and repeated measurements, fixed effect was the leaf size and random effect was the tree; factors were leaf size (small, medium, large) and season (rain and dry), and GLIMMIX procedure was used to analyze the data. The effect of leaf size interaction per epoch was significant in the area of the total rib, relative area of lignified tissue in the rib, width of the rib and margin ($P \leq 0.05$), but it was not significant for the percentage of the area with lignin ($P > 0.05$). **Experiment 2.** The variables determined were dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), ether extract (EE), lignin, protein, cellulose and hemicellulose. The experimental design was factorial, factors were the season and the leaf size, and data were analyzed with the GLM and CORR procedures. The season affected the content of DM, NDF, lignin and cellulose ($P \leq 0.0001$) and the protein concentration was affected by the time and the leaf size ($P \leq 0.001$); the epoch by leaf size interaction changed only the hemicellulose content ($P \leq 0.05$). The results of the analysis for the correlation coefficients and the significance of rainfall with each chemical component were: DM ($r = 0.38$, $P = 0.0002$); NDF ($r = -0.57$, $P < 0.0001$); ADF ($r = -0.034$, $P = 0.747$); lignin ($r = 0.29$, $P = 0.005$); OM ($r = 0.11$, $P = 0.3141$); ashes ($r = 0.13$, $P = 0.23$); protein ($r = -0.82$, $P < 0.0001$); EE ($r = -0.05$, $P = 0.66$); hemicellulose ($r = -0.68$, $P < 0.0001$) and cellulose ($r = -0.38$, $P = 0.0002$). The coefficients of correlation

and significance of the temperature with each chemical component evaluated were: DM ($r = -0.38$, $P = 0.0002$); ashes ($r = -0.13$, $P = 0.23$); NDF (0.57 , $P < 0.0001$); ADF ($r = -0.034$, $P = 0.747$); lignin ($r = -0.29$, $P = 0.005$); OM (-0.11 , $P = 0.314$); protein ($r = 0.82$, $P < 0.0001$); EE ($r = 0.05$, $P = 0.66$); hemicellulose ($r = 0.68$, $P < 0.0001$) and cellulose ($r = 0.38$, $P = 0.0002$). **Experiment 3.** The variables were DM *in vitro* degradation (DIVMS), fermentative variables (volatile fatty acids, VFA, and ammoniacal nitrogen, $\text{NH}_3\text{-N}$), production of biogas, CO_2 and CH_4 . The experimental design was factorial, factors were season and leaf size, and data were analyzed with the GLM and CORR procedures. Season had an effect on percent of leaves degradation (Dry: Hc 55.88, Hg 63.26, Hm 61.55 vs Rain: Hc 45.72, Hg 50.24, Hm 48.95; $P \leq 0.0001$) and on leaf size ($P \leq 0.0001$). The lowest content of N-NH_3 was 24.34 mg dL^{-1} for medium leaves and the highest (29.67 mg dL^{-1}) was for large leaves, but there were no differences ($P > 0.05$) among the three leaves sizes. For total VFA there were no effects of season, leaves nor by the factors interaction ($P > 0.05$). The effect of the epoch-by-leaf interaction was significant for acetic and butyric ($P \leq 0.05$), not for propionic ($P > 0.05$), but it was significant for methane *in vitro* production (mL g DM^{-1}) of leaves (Dry: Hc 2.47, Hm 3.41, Hg 4.53 vs. Rains: Hc 4.35, Hm 2.29, Hg 1.38; $P \leq 0.0001$). **Experiment 4.** Quantification of ruminal bacteria adherence to xylem, phloem, beam epidermis and the underside of the lamina and the rib. The experimental design was a 4x3 factorial arrangement with incubation time (0, 3, 24 and 72 h) and leaf size as factors, and data were analyzed with the GLINMIX procedure. The adherence of bacteria and degradation of tissues such as phloem, mesophilic palisade, spongy mesophyll, beam and underside of the rib was observed, but the xylem did not degrade in any leaf size. The conclusions of these four experiments are: 1) Temperature and precipitation influence the lignin content inside the midrib; 2) the chemical composition of the leaves is modified by precipitation and temperature; 3) *in vitro* dry matter degradation, ammonia nitrogen, volatile fatty acids, production of biogas, CO_2 and CH_4 indicate that there was fermentation of the leaves within the biodigesters; 4) the observation of microorganisms attached to the leaves of *G. arborea* shows a positive effect on the growth of ruminal bacteria. This could be supported by the presence or absence of tissues and bacteria adhered to the leaf rib or leaf after a period of degradation. The large and medium

leaves had a greater presence of bacteria than the small leaves. The phloem was probably the main cause of the differences for the *in vitro* degradation of the DM between the sizes of leaves evaluated.

Key words: *Gmelina arborea*, chemical composition, chemical composition, bacterial adhesion.

DEDICATORIA

A Isaac

A mi madre Santa Verónica y mi padre Brauliot

A mis hermanos Karla y Francisco

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por haber financiado mis estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados por brindado la oportunidad de seguirme formando como profesionista.

Al Dr. Sergio Segundo González Muñoz por guiar de la mejor manera mis estudios en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Mario Antonio Cobos Peralta por las sugerencias en los análisis microbiológicos y en el planteamiento experimental.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera por las facilidades otorgadas en los análisis dentro de los laboratorios de Histoquímica y Anatomía Vegetal y en la Unidad de Microscopía Electrónica. Además de su tiempo en la enseñanza de las técnicas utilizadas en esta tesis.

Al Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca por las sugerencias en el diseño experimental y en el análisis de los resultados.

Al Dr. Pablo Díaz Rivera por sus comentarios para la mejor realización de esta tesis.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero por sus contribuciones en la realización de esta tesis.

Al Dr. Josafhat Salinas Ruiz por la ayuda brindada en el análisis estadístico de los experimentos.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván por su apoyo en la realización de los análisis en el laboratorio de Nutrición Animal.

A los laboratoristas Don Agustín, Jorge, Braulio, Oscar, Adán, Simón, Estela por la ayuda que me brindaron en la preparación de muestras y reactivos.

Gracias.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vii
DEDICATORIA.....	x
AGRADECIMIENTOS.....	xi
LISTA DE CUADROS.....	xvii
LISTA DE IMÁGENES.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
2.1. FAO y seguridad alimentaria.....	1
2.1.1. Problemática actual.....	1
2.2. Rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos) y cambio climático.....	2
2.3. La emisión de GEI y CH ₄ por rumiantes.....	2
2.4. Efectos del cambio climático en los sistemas de producción de rumiantes.....	3
2.4.1. Estrategias para contrarrestar la producción de metano por rumiantes.....	3
2.4.2. Manejo de la fermentación ruminal para reducir las emisiones de CH ₄	3
2.4.3. Método <i>in vitro</i> para la medición de metano.....	5
2.5. Sistemas de producción de rumiantes y caprinos con la inclusión de <i>Gmelina arborea</i>	5
2.5.1. Beneficios ambientales de <i>G. arborea</i> en los sistemas de producción animal.....	5
2.5.2. Producción de biomasa aérea de la <i>G. arborea</i>	6
2.5.3. Aumento en la producción de forrajes con <i>G. arborea</i>	6
2.5.4. Ingreso por producción de madera.....	6
2.6. Uso de <i>Gmelina arborea</i> en la alimentación de rumiantes (Bovinos, ovinos y caprinos).....	7
2.6.1. Composición química de hojas de <i>G. arborea</i>	7
2.6.2. Uso en la alimentación de bovinos.....	8
2.6.3. Uso en la alimentación de ovinos.....	8
2.6.4. Uso en la alimentación de caprinos.....	9
2.7. Composición química de alimentos y su relación con la degradación de la materia seca.....	9

2.7.1.	Materia seca (MS)	9
2.7.2.	Fibra detergente neutro (FDN)	9
2.7.3.	Fibra detergente ácido (FDA)	10
2.7.4.	Proteína	10
2.8.	Síntesis, degradación y efectos de lignina en la alimentación de rumiantes	10
2.8.1.	Contenido de lignina.....	11
2.8.2.	Degradación aeróbica de la lignina.....	12
2.8.3.	Actividades de <i>Gmelina arborea</i>	12
2.9.	Tejidos vegetales y degradación <i>in vitro</i>	12
2.9.1.	Gramíneas	13
2.9.2.	Leguminosas	14
2.9.3.	Localización de la lignina y degradación	14
2.10.	<i>Gmelina arborea</i> , degradación y variables fermentativas.....	14
2.10.1.	Degradación de materia seca de hojas de <i>G. arborea</i>	14
2.10.2.	Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)	15
2.10.3.	Nitrógeno amoniacal	15
2.10.4.	Producción de biogás.....	15
2.11.	Adherencia de microorganismos ruminales a partículas de forraje.....	15
2.11.1.	Transporte de bacterias al sustrato	16
2.11.2.	Adhesión inicial no específica.....	16
2.11.3.	Adhesión específica	16
2.11.4.	Proliferación y colonización en los tejidos vegetales.	16
2.11.5.	Factores relacionados con las bacterias.....	17
2.11.6.	Factores relacionados con el sustrato.....	17
2.11.7.	Cuatro factores ambientales relacionados con el proceso de adhesión.....	18
2.11.8.	Tejidos y adherencia microbiana.	18
2.11.9.	Adherencia y microscopia barrido de electrones.....	19
2.11.10.	Tamaño de bacterias ruminales relacionadas con la degradación de <i>G. arborea</i> . 19	
3.	LITERATURA CITADA	20
CAPÍTULO I. ANATOMÍA DE LA HOJA DE <i>GMELINA ARBOREA</i> Y ESTUDIO HISTOQUÍMICO DE LIGNINA Y TANINOS EN LOS TEJIDOS DE LA NERVADURA CENTRAL Y LÁMINA FOLIAR.		28

RESUMEN.....	28
ABSTRACT.....	29
INTRODUCCIÓN.....	29
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Localización de la plantación.....	31
Diseño experimental y modelo estadístico.....	31
Precipitación y temperatura	31
Caracterización de los tamaños de hoja.....	32
Proporción por tamaño por época del año	32
Histoquímica de lignina y área relativa de tejido lignificado en la nervadura central y lámina foliar	33
Histoquímica de taninos en la nervadura central y lamina foliar.....	35
Anatomía de la hoja de <i>G. arborea</i>	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	42
LITERATURA CITADA	42
CAPÍTULO II. COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE TRES TAMAÑOS DE HOJAS DE <i>GMELINA ARBOREA</i> EN DOS ÉPOCAS DEL AÑO.	46
RESUMEN.....	46
ABSTRACT.....	47
INTRODUCCIÓN.....	47
OBJETIVO	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
Obtención de muestras para la determinación de la composición química	48
Datos climatológicos en el lugar de muestreo	49
Análisis químico y determinación de FDN, FDA y lignina	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	54
LITERATURA CITADA	54
CAPÍTULO III. DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> Y VARIABLES FERMENTATIVAS HOJAS DE <i>GMELINA ARBOREA</i>	56

RESUMEN.....	56
ABSTRACT.....	56
INTRODUCCIÓN.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
Obtención y preparación de muestras compuestas.....	58
Medio de cultivo.....	58
Preparación de los reactivos utilizados en el medio de cultivo.....	59
Obtención del inóculo ruminal.....	59
Variables evaluadas.....	60
Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS).....	60
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃).....	60
Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV).....	61
Medición de la producción de biogás, CO ₂ y CH ₄	61
Análisis estadístico.....	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS).....	62
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃).....	62
Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV).....	62
Medición de la producción de biogás, CO ₂ y CH ₄	63
Biogás.....	63
CH ₄ y CO ₂	63
CONCLUSION.....	67
LITERATURA CITADA.....	67
CAPITULO IV. ADHERENCIA DE BACTERIAS RUMINALES A LA PARED CELULAR Y DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS DE <i>GMELINA ARBOREA</i> EN DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN.....	70
RESUMEN.....	70
ABSTRACT.....	70
INTRODUCCIÓN.....	71
OBJETIVO.....	72
MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
Obtención de muestras vegetales.....	72

Componentes del medio de cultivo.....	73
Preparacion del inóculo	74
Inoculación e incubación de fragmentos de la lámina y nervadura central.....	75
Características físicas, químicas y microbiológicas del medio de cultivo utilizado.....	75
Corte y fijación de las muestras	76
Microscopia electrónica de Barrido (MEB)	76
Toma de fotografías MEB de la nervadura central y de ambos lados de la misma.....	76
Modelo y análisis estadístico	77
Variables de respuesta	77
I) Cualitativas.....	77
Hora 0.....	79
II) Cuantitativas	79
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
I) Cualitativas.....	80
II) Cuantitativas	88
a) Número de bacterias adheridas y colonias por mm ²	88
CONCLUSIÓN	93
LITERATURA CITADA	93
4. Anexos.....	95
Anexo 1. Cuadros del conteo de bacterias y colonias adheridas a tejidos vegetales.....	95

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Edad, altura, volumen y diámetro de una plantación de <i>Gmelina arborea</i>	6
Cuadro 2. Precios en pesos mexicanos por trimestres de trozas y madera aserrada de <i>Gmelina arborea</i>	7
Cuadro 3. Comparación del contenido mineral por época del año.	8
Cuadro 4. Contenido de lignina en la especie <i>Gmelina arborea</i> por procedencia y edad de la plantación.	11
Cuadro 5. Pérdidas de MS de dos pastos a 48 h de incubación de cultivos puros de bacterias ruminales.	13
Cuadro 6. Condiciones climáticas promedios \pm desviación estándar en las épocas de muestreo en los meses de enero y julio hasta el día del muestreo en el año 2015.....	32
Cuadro 7. Porcentaje de árboles con tamaños de hojas presentes o ausentes por época del año en <i>Gmelina arborea</i>	36
Cuadro 8. Efecto del tamaño de hoja y época de muestreo en el área relativa de tejido lignificado y el ancho de la nervadura central y lámina foliar de <i>Gmelina arborea</i>	37
Cuadro 9. Valores de probabilidad para cada factor e interacción considerados en el modelo de análisis.....	38
Cuadro 10. Valores de temperatura y precipitación en los días de muestreo de mayo y julio en el 2015.	49
Cuadro 11. Composición química de hojas de <i>Gmelina arborea</i> por época y tamaño de hoja (medias \pm desviación estándar).	52
Cuadro 12. Efectos y significancia por tamaño de hoja, época e interacción.....	52
Cuadro 13. Coeficientes de correlación y efectos de las fuentes de variación para las variables determinadas con temperatura y precipitación.....	53
Cuadro 14. Composición del medio de cultivo anaerobio para bacterias celulolíticas... ..	58
Cuadro 15. DIVMS y variables fermentativas considerando tamaño de hoja y época. .	65
Cuadro 16. Valores de probabilidad de los efectos fijos e interacciones por cada variable.....	66
Cuadro 17. Componentes del medio de cultivo para bacterias celulolíticas.	73
Cuadro 18. Composición química de las soluciones I y II del medio de cultivo.....	74

Cuadro 19. Características fisicoquímicas y microbiológicas del medio cultivo antes y después de cada periodo de incubación.	75
Cuadro 20. Abundancia de consorcios bacterianos y formas de cocos, bacilos, y espirilos por tejido vegetal en los tejidos foliares por tamaños de hojas considerados a 72 h de incubación.	91
Cuadro 21. Significancia de la prueba de efectos principales.	92
Cuadro 22. Medias y desviación estandar en las colonias de bacterias por mm ² en los tejidos evaluados.	96
Cuadro 23. Medias y desviación estándar del número de bacterias adheridas a los tejidos por mm ²	97
Cuadro 24. Medias del número de cocos por mm ² adheridos a los tejidos evaluados. .	98
Cuadro 25. Medias del número de bacilos por mm ² adheridos a los tejidos evaluados.	99
Cuadro 26. Medias del número de espirilos por mm ² adheridos a los tejidos evaluados.	101

LISTA DE IMÁGENES

- Imagen 1. Uso de GIMP 2.8.14 para obtener la imagen en dos colores. Azul representa el área total de la nervadura y rojo el área con lignina dentro de la nervadura central.. 34
- Imagen 2. Uso de Image Tool para medir la área total y la área con lignina de la nervadura central. El azul representa el área total y el rojo el área lignificada. Los puntos en rojo en la imagen negro y rojo indican las áreas que integran la superficie con lignina. 34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Histoquímica de lignina. Área de tejido lignificado en la nervadura en color rojo con respecto al área total de la nervadura central en color azul. Imágenes A: Hc Hoja chica y B: Fragmentación de la imagen en rojo tejido lignificado y en azul área total de la nervadura central; hoja chica (Hc); C: hoja mediana (Hm); D: Hoja grande (Hg); ad cara adaxial; ph floema; x, xilema, ab cara abaxial. (Barra 500 μ m). 39
- Figura 2. Anatomía en corte transversal de la nervadura central y lámina de *Gmelina arborea*. pm mesófilo en empalizada; sm mesófilo esponjoso; ad adaxial; ep epidermis; x xilema; ad adaxial; ab abaxial; Hc hoja chica; Hm hoja mediana; Hg hoja grande. 41
- Figura 3. Microestructura de la hoja de *Gmelina arborea* previa al periodo de incubación (0 h). A, corte transversal de la lámina foliar; B, epidermis adaxial de la lámina con tricomas globosos; C, epidermis abaxial de la lámina; D, corte transversal de la nervadura central; E, xilema; F, floema; G, epidermis adaxial de la nervadura; H, epidermis abaxial de la nervadura. pm, mesófilo en empalizada; sm, mesófilo esponjoso; x, xilema; ph, floema; ad, adaxial; ab, abaxial; t, tricomas globosos. 78
- Figura 4. Microscopía Electrónica de Barrido del corte transversal de la nervadura central. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. ad adaxial; ab abaxial; ph floema; x xilema; ep epidermis..... 83
- Figura 5. Microscopía Electrónica de Barrido del corte transversal del xilema. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. Los microorganismos adheridos están indicados por flechas. 84
- Figura 6. Microscopía Electrónica de Barrido del corte transversal del floema. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. En la hoja chica se observa parte del floema en las hojas medianas y grandes, y las bacterias lo degradaron. 85
- Figura 7. Microscopía Electrónica de Barrido de la epidermis abaxial de las hojas. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. Los microorganismos adheridos están indicados por flechas. 86

Figura 8. Microscopia Electrónica de Barrido de la epidermis adaxial de la hoja. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. Los microorganismos están señalados por flechas..... 87

Figura 9. Microscopia Electrónica de Barrido del mesófilo. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. ep epidermis; pm mesófilo en empalizada; sm mesófilo esponjoso; Hc hoja chica; Hm Hoja mediana; Hg Hoja grande. 88

1. INTRODUCCIÓN

La variedad de árboles utilizados para la producción pecuaria permite considerar el cambio en los actuales sistemas productivos por los beneficios que de ellos se pueden obtener. Los árboles proporcionan nutrimentos, mejoran las características fisicoquímicas del suelo y el ambiente para las especies pecuarias y algunas especies de animales no domesticados. Uno de estos árboles es la *Gmelina arborea* con un rápido crecimiento, menos de 15 años a la cosecha, producción alta de biomasa y rebrote rápido después de cortar el árbol a un diámetro de 20 cm. Las hojas de *G. arborea* son una fuente de forraje en Australia, India, China y Nigeria, y se usan para la alimentación de bovinos, ovinos, caprinos y otras especies en el período seco del año. La degradación *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, la forma en que se proporciona a los ovinos, bovinos y caprinos, los nutrientes, las bacterias que degradan las hojas, las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antihelmínticas, el contenido mineral y la producción de biogás son algunas de las investigaciones realizadas. En la literatura revisada no se encontraron estudios acerca de la adhesión de bacterias a las partículas de las hojas ni de los tejidos degradados. La adherencia de bacterias a partículas de alimento es importante para explicar la degradación de la materia seca y el conocimiento de la adhesión permite proponer estrategias para aumentar la desaparición de la pared celular. El aumento en la degradación de la materia seca en el rumen permite mejorar la ganancia de peso u otros objetivos de producción.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. FAO y seguridad alimentaria

2.1.1. Problemática actual

Los problemas principales de países en vías de desarrollo son pobreza, desnutrición y desabasto de alimentos. La FAO propone metas para la reducción de la pobreza, mejoramiento de la nutrición, promoción de la seguridad alimentaria y protección del ambiente para el año 2025. Pero los problemas causados por el cambio climático afectarían el cumplimiento de estas metas (FAO, 2016a). La deforestación está relacionada con el cambio climático y, en México, la deforestación anual del periodo

1976 a 2007 fue 0.76 % en las selvas y 0.25 % para otros tipos de bosques; del 2005 al 2010 las tasas bajaron con un promedio anual de 0.25 % para todos los bosques, lo que representa 155,000 ha año⁻¹ y la desaparición de 127 especies endémicas (CONAFOR-SEMARNAT, 2011; Rosete-Vergés, 2014). El cambio en el uso del suelo y la silvicultura contribuyeron con 66,674 y 86,188 Gg de CO₂, con un promedio de 80,162 Gg CO₂ de 1990 a 2006 (CONAFOR- SEMARNAT, 2011). El Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) menciona los efectos de la producción de gases de efecto invernadero (GEI) en los ecosistemas y en la producción de alimentos, y casi todos ellos son negativos (IPCC, 2007).

2.2. Rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos) y cambio climático

El cambio climático es la modificación de las condiciones ambientales causadas por las actividades humanas, como la cría de rumiantes, más las modificaciones ocurridas de forma natural en el clima. En México, la Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión promulgó la Ley General de Cambio Climático, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de enero del 2018, la reforma más reciente, en la cual se establecen los objetivos, como garantizar el derecho a un ambiente sano, establecimiento de políticas públicas para la adaptación al cambio climático, mitigación de gases efecto invernadero, uno de ellos es el metano producido en el rumen, fomento de la educación, desarrollo de investigación, transferencia de tecnología e innovación y difusión en materia de adaptación y mitigación del cambio climático.

2.3. La emisión de GEI y CH₄ por rumiantes

El metano (CH₄) producido por los rumiantes es uno de los gases causantes del cambio climático. Los rumiantes contribuyen con 16 a 25 % de las emisiones de CH₄ generado por las actividades antrópicas, y cerca del 33 % de las emisiones totales son causadas por la agricultura, industria y ganadería. Los bovinos lecheros generan 21.9 kg de CO₂-eq kg⁻¹ en sistemas de pastoreo, 17.4 kg de CO₂-eq kg⁻¹ carne en un sistema mixto, 2.9 kg de CO₂-eq kg⁻¹ leche en producción de leche en sistemas pastoreo y 2.6 kg de CO₂-eq kg⁻¹ leche en sistemas mixtos. La producción de carne en pastoreo genera 102.2 9 kg de CO₂-eq kg⁻¹ carne y en sistemas mixtos 56.2 kg de CO₂-eq kg⁻¹ carne (Gerber *et al.*, 2013). En México en el 2014, la producción de metano fue 45,492.19 Gg

de CH₄, y para el 2050 será 57,490.75 Gg (FAO, 2016b). En los rumiantes las pérdidas de energía por la eliminación del metano pueden ser de 2 a 12 % (Hill, 2016), lo que reduce la rentabilidad financiera de las explotaciones ganaderas.

2.4. Efectos del cambio climático en los sistemas de producción de rumiantes.

Los efectos del cambio climático pueden ser directos o indirectos para la salud de los organismos biológicos (Marino *et al.*, 2016). Algunos efectos directos de dicho cambio son la disminución en la precipitación, reducción en el período de lluvias, y aumentos en sequía, olas de calor y temperatura extremas. Los efectos indirectos están relacionados con la disminución en la producción de alimentos y presencia de enfermedades (SEMARNAT, 2009).

2.4.1. Estrategias para contrarrestar la producción de metano por rumiantes

Las estrategias implementadas para el contrarrestar los efectos del cambio climático, se pueden clasificar en: 1) reducción de las emisiones de GEI: a) nutrimentales, como el manejo de los efectos de los nutrientes en una reducción de hasta 40 % de la producción de metano; b) mejoramiento genético de plantas y animales (Smith *et al.*, 2008); y c) uso de herramientas genómicas y transcriptómicas para identificar estrategias y reducir la metanogénesis (McAllister *et al.*, 2015); y 2) adaptación de los sistemas de producción: a) planteamiento de mejores sistemas de producción de rumiantes; b) el incremento en la acumulación de carbono; c) aumento en la precisión del abasto y utilización del N por los cultivos; d) labranza mínima de conservación; y e) agroforestería para mejorar la eficiencia en la utilización de la tierra y aumentar la acumulación de carbono en los árboles cuando estos se incluyen en la explotación. (Smith *et al.*, 2008).

2.4.2. Manejo de la fermentación ruminal para reducir las emisiones de CH₄

La fermentación ruminal (FR) es un proceso natural. Uno de los problemas de la FR es la producción de metano liberado con el eructo, por lo cual el proceso digestivo no es 100 % eficiente y las pérdidas de energía varían de 2 a 15 % de la energía en la dieta (Johnson y Johnson 1995). La reducción en la emisión de metano en los rumiantes

tiene dos objetivos: 1) aumentar la eficiencia alimenticia y 2) reducir el impacto negativo en el ambiente.

a) La manipulación de la dieta de rumiantes

La manipulación de la dieta de rumiantes comprende mejorar la tasa de pasaje, aumentar la relación acético: propiónico, reducir el pH, la cantidad de protozoarios y el uso de aditivos como xilanasas para aumentar la degradación de la pared celular (Hernández *et al.*, 2017). El uso de dietas con ensilado de maíz reduce el metano que eructan los rumiantes porque aumenta la producción de ácido propiónico y disminuye el nitrógeno excretado (Benchaar *et al.*, 2013).

b) El control de la fermentación ruminal.

Los aceites esenciales (AE) son compuestos producidos por las plantas para defenderse de agentes externos como depredadores, parásitos, condiciones de estrés ambiental o enfermedades. Los AE se usan como aditivos para la reducción del CH₄ y pueden contener 20 a 60 compuestos en cada uno, como alcoholes, aldehídos, hidrocarburos, cetonas, ésteres y otros con propiedades antioxidantes o antihelmínticas (Tager y Krause, 2011; Kamra *et al.*, 2015; Cobellis *et al.*, 2016). La mayoría de estos compuestos son terpenos o fenilpropanoides. Otros compuestos para reducir la producción de metano son el nitrato de calcio, amonio (Olijhoek *et al.*, 2016), bromo clorometano (BCM; Johnson *et al.*, 1972; Sawyer *et al.*, 1974; Tomkins *et al.*, 2009), fumarato (Pat *et al.*, 2015), saponinas de *Quillaja saponaria* y ácido propiónico (Patra y Yu, 2013). Las concentraciones de *Ruminococcus flavefaciens* y *Fribrobacter succinogenes* aumentaron con la utilización de saponinas o nitratos solos; en borregos Chokla (2 a 3 años de edad) alimentados con nitrato, fumarato, hojas de *Ailanthus excelsa* y *Prosopis cinenaria*, el nitrato (0.6 % de la dieta) afectó la fermentación ruminal, pero no el fumarato (2 % de la dieta; Pal *et al.*, 2015).

c) El mejoramiento genético de bovinos, ovinos y caprinos para disminuir la producción de metano.

El mejoramiento genético de rumiantes es una actividad dirigida a una región determinada con la utilización de alimentos de alta disponibilidad. Este mejoramiento es apoyado con biotecnología y estrategias de comercialización (Gartland y Gartland, 2016; Wilkes *et al.*, 2017)

d) La gestión de los terrenos de cultivo

Esta propuesta se relaciona con la utilización de variedades mejoradas, rotación de cultivos, adopción de sistemas menos intensivos con la reducción del uso de pesticidas, y cambiar el uso de la tierra. Los sistemas agroforestales se usan para reducir las emisiones CO₂ y N₂O (Smith *et al.*, 2008).

2.4.3. Método *in vitro* para la medición de metano

El método de medición *in vitro* de la producción de CH₄ simula las condiciones del rumen en el que los alimentos son fermentados en un tiempo determinado en condiciones controladas (Patra, 2016). Este método tiene una aceptación amplia debido a su facilidad de adopción, repetibilidad, disminución en el uso de animales y reducción del financiamiento (Gatachew *et al.*, 2005).

2.5. Sistemas de producción de rumiantes y caprinos con la inclusión de *Gmelina arborea*

Gmelina arborea tiene muchas cualidades en los programas de reforestación por su versatilidad en los usos de la madera, utilización de diferentes partes de la planta como alimento y rápido crecimiento en plantaciones mixtas (López, 2010). En sistemas silvopastoriles, *G. arborea* se usa en la alimentación de cerdos, bovinos, ovinos, cabras, conejos, cerdos y fauna silvestre. Los experimentos realizados por Melaku *et al.* (2004) y Omokanye *et al.*, (2001) mencionan los aspectos favorables de la planta en sistemas de producción de rumiantes, y que las hojas de *G. arborea* se deben ofrecer recién cortadas.

2.5.1. Beneficios ambientales de *G. arborea* en los sistemas de producción animal

Los beneficios generados con la inclusión de *G. arborea* son: 1) reciclaje de nutrientes (Ramachandran, 2013), 2) producción de madera como ingreso a largo plazo y principal almacén de carbono, 3) mejora las condiciones de temperatura en el ambiente para los animales, 4) producción de biomasa usada como forraje, mejora la calidad del aire y sombra para el ganado (Gordon, 2015). La concentración de CO₂ (460 µmol mol⁻¹) en la atmósfera es una condición que aumenta el crecimiento de la especie,

producción de biomasa sobre el suelo y almacenamiento de carbono (2100 g árbol⁻¹ en 120 d; Rasineni *et al.*, 2011). La concentración de CO₂ aumenta la división, expansión y diferenciación celular (Reddy *et al.*, 2010; Rasineni *et al.*, 2011).

2.5.2. Producción de biomasa aérea de la *G. arborea*

La producción de biomasa es una característica importante en el uso de esta planta en sistemas de producción ganaderos y llega hasta 264,762 kg ha⁻¹ (Fuwapé *et al.*, 2001). La biomasa varió de 10.89 a 3.65 t ha⁻¹ y de hoja fue 0.35 t ha⁻¹, al considerar la que estaba arriba y abajo del suelo con densidades de siembra de 2x2, 2x3, 2x4 y 2x5 m (Swamy *et al.*, 2003).

2.5.3. Aumento en la producción de forrajes con *G. arborea*

El forraje de *G. arborea* es un recurso barato y disponible en condiciones de sequía (Eye, 2016), y la eficiencia en el uso de suelo es otra característica que proporciona *G. arborea* cuando se asocia con un pasto. Así, en un estudio realizado por Kaleeswari (2015) con diferentes árboles y gramíneas se encontró que la *G. arborea* asociada con *Panicum spp* mejoró la eficiencia en la utilización del suelo, la producción de MS de *P. maximum* asociado con *G. arborea* fue 129.28 t ha⁻¹ y en monocultivo 111.95 t ha⁻¹.

2.5.4. Ingreso por producción de madera

La utilización de *G. arborea* en sistemas de producción pecuaria es una alternativa para el almacenamiento de carbono en forma de madera. En el Cuadro 1 se muestra el crecimiento de los árboles en una plantación comercial.

Cuadro 1. Edad, altura, volumen y diámetro de una plantación de *Gmelina arborea*.

Edad (años)	Altura dominante (m)	Número de árboles (ha ⁻¹)	Área basal (m ² ha ⁻¹)	Volumen (m ³ ha ⁻¹)	Diámetro (cm)
1	2.2	1100	3.8	0.6	0
5	11.3	1100	11.4	65.7	10.8
10	17.9	1015	16.2	117.4	14.3

Fuente: CONAFOR (2012)

El ingreso por la producción de madera es adicional a los beneficios de la *G. arborea* cuando se utiliza en sistemas de producción pecuaria. En el Cuadro 2 se enlistan los precios por trimestre de maderas tropicales, que no sean cedro y caoba, del primer trimestre al segundo trimestre del 2016 (CONAFOR, Gerencia de Fomento a la Producción Forestal Sustentable; (<http://www.cnf.gob.mx:8090/snif/portal/economica/sipre>).

Cuadro 2. Precios en pesos mexicanos por trimestres de trozas y madera aserrada de *Gmelina arborea*.

Año	Trimestre	Precios libre a bordo para trocería por metro cúbico			Precios libre a bordo en aserradero para madera aserrada por pie tabla		
		Aserradero		Predios	Largas dimensiones*		Cortas dimensiones
		Libre a bordo en brecha	Libre a bordo en aserradero	Libre a bordo en brecha	Selecta	Millrun	
2016	1	1389.5	2220.69	1293.4	16.73	14.48	9
2016	2	1426.1	2257.28	1702.6	22.37	17.14	11.37

*Largas dimensiones son trozas de 8 a 24 pies de largo (2.44 a 7.31 m) y cortas dimensiones de 2 a 6 pies de largo (0.61 a 1.82 m).

2.6. Uso de *Gmelina arborea* en la alimentación de rumiantes (Bovinos, ovinos y caprinos)

2.6.1. Composición química de hojas de *G. arborea*.

Las investigaciones realizadas para determinar la composición química de hojas de melina son varias en Australia, Gana, India, Nigeria y Pakistan. La composición química

de hojas de *G. arborea* fue: materia seca (MS) 78.49 %, materia orgánica (MO) 68.59 %, proteína (PC) 15.92 a 26.7 %, fibra 3.10 a 20.5 %, cenizas 9.77 a 10.0 %, extracto libre de N 59.38 %, fibra detergente neutro (FDN) 36.85 a 45.00 %, fibra detergente ácido (FDA) 19.76 a 34.7 %, proteína digestible 12.10 % (Omokanye *et al.*, 2001; Sosa *et al.*, 2004; Ahamefule *et al.*, 2006 y Adbub *et al.*, 2012).

El contenido de aminoácidos en hojas es 2.74, 3.91, 2.67, 5.60, 4.11, 5.25, 2.84, 4.61 g 100 g⁻¹ para isoleucina, leucina, cisteína, tirosina, metionina, treonina, triptófano y fenilalanina, respectivamente. El contenido para compuestos antinutricionales es 0.127, 0.313, 0.695, 0.122 y 0.333 mg 100 g⁻¹ para taninos, saponinas, alcaloides, oxalatos e inhibidor de tripsina (Amata y Lebari, 2011). En el Cuadro 3 se muestran los resultados de Avellán-Zumbado *et al.* (2015) al comparar los minerales presentes en época de lluvia y seca.

Cuadro 3. Comparación del contenido mineral por época del año.

Época	Micronutrientos (%)						Micronutrientos (mg kg ⁻¹)					
	N	Ca	K	Mg	P	S	Fe	Mn	Zn	Al	B	Cu
Lluviosa	2.99	1.2	1.14	0.34	0.23	0.16	91	63	57	53	41	11
Seca	2.69	1.4	0.77	0.35	0.19	0.14	52	95	50	26	40	9

2.6.2. Uso en la alimentación de bovinos

Las hojas caídas de árboles de melina se usan como complemento de la alimentación de bovinos en épocas de sequía (Kennedy y Lowry, 2002). Los criterios para el desarrollo de sistemas de producción en el estado de Asaba Delta en Nigeria, según Udeh *et al.* (2013), fueron el promedio de plantas por unidad de área, número de bocados por segundo de varios forrajes por ganado cebú y Muturu, tiempo de pastoreo en cada especie forrajera, tiempo de descanso sin rumia, juego y toreándose, tiempo de cortejo, acicalándose su cuerpo, y daño al suelo. Udeh *et al.* (2013) consideraron la especie *G. arborea* como una buena alternativa para su inclusión en sistemas de producción de bovinos.

2.6.3. Uso en la alimentación de ovinos

Las hojas frescas de *G. arborea* en la alimentación de ovinos promovieron el consumo de *Eragrostis spp.*, y esta es la mayor forma de consumo. El porcentaje

máximo de inclusión en las dietas para no afectar el consumo fue 25 %. Los ovinos prefieren consumir hojas frescas sin picar (Omokanye *et al.*, 2001) y el uso de las hojas en bloques multinutricionales no es muy conveniente (Aye 2016). El índice de preferencia de la *G. arborea* con un estado de madurez que incluía hojas verdes, flores y vainas por borregos Yacansa, en Nigeria, fue más alto para la planta fresca y bajo para la planta seca.

2.6.4. Uso en la alimentación de caprinos

Las investigaciones con *G. arborea* en cabras son más numerosas que en bovinos y ovinos. Osakwe y Udeogu (2007), Moemeka *et al.* (2014) y Okafor *et al.* (2012) describen efectos positivos en la alimentación de cabritos cuando se combinan con otros ingredientes como 50 % *P. purpureum* y 50 % heno de *Digitaria smutsii*.

2.7. Composición química de alimentos y su relación con la degradación de la materia seca

2.7.1. Materia seca (MS)

La mayoría de las explotaciones de rumiantes en pastoreo usan una sola especie vegetal y se desconoce en algunas especies vegetales cual es su respuesta al cambio climático. Chao Feng *et al.* (2015) encontraron que la diversidad de plantas en un potrero puede mejorar las características productivas de las plantas y de los rumiantes, ya que proporciona una mayor variedad de plantas y nutrimentos que se pueden consumir, además de que puede reducirse el efecto del cambio climático con la utilización de más especies en un área determinada por aumentar la resiliencia de las plantas.

2.7.2. Fibra detergente neutro (FDN)

Los componentes de FDN relacionados con el consumo son celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina. El contenido de FDN tiene un efecto negativo en la digestibilidad de los bovinos, mientras que en cabras y en ovinos es más difícil obtener resultados consistentes (Riaz *et al.*, 2014). La celulosa está formada por moléculas de glucosa unidas en un complejo de microfibrillas. Las hemicelulosas son polisacáridos de la

pared celular que incluyen xiloglucanos, xilanas, mananos, glucomananos y β -(1-3,1-4) glucomananos. Las hemicelulosas son sintetizadas por glicosiltransferasas localizadas en membrana de Golgi, y tienen importancia en el fortalecimiento de la pared celular con la interacción de la celulosa y en algunas paredes con lignina (Madana *et al.*, 2011). Las pectinas están en la laminilla media y son un grupo de polímeros de galacturonanas con sustituciones de azúcares neutros, como la fucosa ($C_6H_{12}O_5$), arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa.

2.7.3. Fibra detergente ácido (FDA)

La FDA está integrada por hemicelulosa y lignina, y representa la fracción de la fibra más indigestible de los forrajes. La FDA tiene un efecto negativo en el consumo de forraje en pastoreo, el efecto es más alto en vacas, luego ovinos y caprinos, aunque las cabras utilizan mejor los forrajes más fibrosos. La FDA baja la digestibilidad en bovinos, ovinos y caprinos (Riaz *et al.*, 2014).

2.7.4. Proteína

Respecto a la cantidad optima requerida por los rumiantes, algunos autores mencionan 3 g N kg^{-1} de peso vivo, otros indican 11 g kg^{-1} MS para mantenimiento hasta 32 g kg^{-1} para lactación y crecimiento. El contenido mínimo de proteína en praderas para evitar daños en los rumiantes es 24 g N kg^{-1} PV, y menos de 11.2 g N kg^{-1} PV reduce el consumo y afecta la producción (Hoekstra *et al.*, 2007).

2.8. Síntesis, degradación y efectos de lignina en la alimentación de rumiantes

La lignina es un polímero aromático derivado del agrupamiento oxidativo combinatorio de los 4-hidroxifenilpropanoides (Vanholme *et al.*, 2010). Estos compuestos se depositan en las paredes gruesas de las células de las plantas, principalmente secundarias, las cuales se vuelven rígidas e impermeables. La tensión ejercida por la lignina dentro de la planta favorece el transporte de agua en ella y, además, es importante en la defensa del contenido celular contra el ataque de patógenos (Hatfield y Varmerris, 2001). La lignificación es un proceso de los estados finales de la diferenciación del xilema, y principalmente ocurre durante el segundo engrosamiento de la pared celular, que inicia en la laminilla media y procede hacia el

lumen llenando los poros de los polisacáridos ya depositados (Donalson, 2001).

La síntesis de lignina comienza con la degradación de carbohidratos a fenilpiruvato. La fenilalanina se origina después por dos vías: metabolito primario, es para la síntesis de proteína en una vía; metabolito secundario, es para la producción de ácido cinámico por acción de la enzima liasa fenilalanina amonio. Una enzima análoga es la liasa tirosina amonio que produce *p*-ácido cinámico el cual se localiza solo en pastos. Después de la producción del ácido cinámico se generan los ácidos *p*-coumarico, cafeico, ferulico, 5-hidroxiferulico y sinápico. Los compuestos *p*-cumaril-CoA, Cafeoil-CoA, Feruloil-CoA, 5 hidroxiferuloil –CoA y Sinapoil-CoA se forman después. Desde ellos se generan *p*-coumaraldehido, coniferaldehido, 5 hidroxiconiferaldehido y sinapaldehido. En la última etapa todos ellos forman alcoholes como *p*-alcohol coumaril, alcohol coniferil, alcohol 5- hidroxiconiferil y alcohol sinapil; entonces las peroxidasa y lacasas participan para formar la lignina (Baucher *et al.*, 1998). El principal efecto en el rumen es la disminución de la degradación de la MS y disminuye el crecimiento bacteriano.

2.8.1. Contenido de lignina

El contenido de la lignina varía de acuerdo con la especie, tejido vegetal, célula, procedencia y edad. El contenido de lignina en *G. arborea* es afectado por el lugar de procedencia y edad de la plantación (Rojas *et al.*, 2004; Cuadro 4).

Cuadro 4. Contenido de lignina en la especie *Gmelina arborea* por procedencia y edad de la plantación.

Procedencia	Edad (años)	Lignina en madera (%)
Fiji	8	24.2
Islas Salomón	4, 6, 8	26, 26.5, 26.5
Belice	8	24.7
Costa Rica	4, 6, 8	29.5, 26.4, 30.0
Costa Rica	15	22.4

2.8.2. Degradación aeróbica de la lignina

La lignina es degradada por bacterias y hongos de raíz blanca en presencia de oxígeno. En las condiciones del rumen la cantidad de oxígeno es muy baja (0.6 %) por lo que la lignina solo se solubiliza y siempre está presente. La lignina es solubilizada en condiciones anaeróbicas y hay una cantidad de compuestos fenólicos en el rumen, los cuales son liberados de la pared celular de las plantas. La presencia de estos compuestos no está relacionada con la producción de biogás (Akin y Benner, 1988). Los hongos de raíz blanca como *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolus versicolor* producen enzimas oxidasas como las ligninasas (Palmer y Evans, 1983). Pero, el desarrollo de gran cantidad de esporangios sobre la fibra en cultivos *in vitro* y anaerobios no es un indicador de su función en la digestión de forraje (Windham y Akin, 1984).

2.8.3. Actividades de *Gmelina arborea*

Las actividades hasta ahora reconocidas son antimicrobianas, antioxidantes y antihelmínticas en rumiantes. La harina de hojas de *G. arborea* en ovinos mejora el desarrollo de las características fisiológicas y hematológicas cuando se usó con *Panicum maximum* y *Manihot esculenta* en la dieta (Aye y Tawose, 2016).

2.8.3.1. Actividad antimicrobiana, antioxidante y antihelmíntica

Los compuestos alcaloides, saponinas, antraquinonas, terpenoides, flavonoides, lignina y glucósidos cardíacos extraídos con agua destilada, etanol, éter de petróleo, diclorometano, hexano, acetona o cloroformo de las hojas de *G. arborea* se usan como agentes antimicrobianos contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhi* (El-Mahmood *et al.*, 2010; Raj y Pemiah, 2014). Las hojas se usan para el control de diversos tipos de enfermedades en humanos, y las sustancias de las hojas provienen de diferentes extractos con metanol (Shoeb *et al.*, 2014).

2.9. Tejidos vegetales y degradación *in vitro*

Las diferencias en la composición de los tejidos vegetales afectan su degradación por bacterias ruminales. Las fibras del floema desarrollan una pared celular con menos lignina que las paredes secundarias del xilema, que son ricas en celulosa, hemicelulosa

y lignina. Los distintos tejidos afectan el desarrollo de bacterias fibrolíticas como *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* (Akin y Rigsby, 1985; Jun *et al.*, 2004).

El contenido de lignina aumenta con la edad de la planta y se forman la pared primaria y la secundaria. La pared primaria inicia su formación en la etapa inicial del crecimiento con menor cantidad de lignina, hay hemicelulosa, celulosa, xilanos y una pequeña cantidad de lignina. La pared secundaria inicia su engrosamiento cuando la pared primaria terminó su crecimiento y ha completado su elongación, la cantidad de lignina es mayor que en las paredes primarias y está depositada en la lámina media de la pared celular. Los enlaces cruzados inician entre la lignina y los polisacáridos en la fase secundaria del crecimiento de las plantas (Jung *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2013).

Las bacterias ruminales producen enzimas para degradar los compuestos de los tejidos vegetales. Las bacterias *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *Prevotella ruminicola* *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Lachnospira multiparus* degradan los compuestos de la pared celular, cada una de ellas rompe los enlaces del compuesto al cual se adhiere con las enzimas que produce. Pero el xilema no es degradado por las bacterias anaerobias en el rumen (Jung *et al.*, 2004).

2.9.1. Gramíneas

La lignificación de pastos de clima templado y cálido es diferente. La diferencia en el contenido de lignina de los tejidos vegetales influye en el porcentaje de degradación de los mismos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Pérdidas de MS de dos pastos a 48 h de incubación de cultivos puros de bacterias ruminales.

Bacteria ruminal	% de MS pérdida	
	<i>Cynodon dactylon</i> L	<i>Dactylis glomerata</i> L.
Ninguno (solo amortiguador)	20.6 ± 3.0	19.2 ± 2.4
<i>R. flavefaciens</i>	28.8 ± 1.2 ^a	74.5 ± 0.9 ^a
<i>R. albus</i>	24.3 ± 1.8	30.6 ± 2.7 ^a
<i>B. fibrisolvens</i>	26.6 ± 1.0 ^a	34.1 ± 1.9 ^a

Fuente: Akin y Risgby 1985.

2.9.2. Leguminosas

Los tallos tienen varios tejidos que lignifican más que otros, y esta diferencia también está relacionada con la acumulación de polisacáridos (Jung *et al.*, 2004). Los tejidos presentes en la alfalfa tienen diferentes tasas y extensiones de la digestión por la variación en las unidades fenólicas, como en otras plantas (Akin, 1988).

2.9.3. Localización de la lignina y degradación

La localización de la lignina en las partes de las plantas influye en la degradación de la MS, y es menor en tejidos con mayor cantidad de lignina. En los resultados de la microscopia de barrido de electrones se observa que los tejidos negativos a la prueba de lignina son más degradados (Akin y Benner, 1988). Los productos sulfito de clorina (CS) y ácido floroglucinol (AP) se usan para localizar los tejidos lignificados en los tejidos vegetales. Los tejidos que se tiñen en las hojas son esclerénquima, vaina del haz vascular, xilema y mesófilode la vaina del haz. Los tejidos en los tallos son epidermis, anillos de esclerénquima, tejido vascular y mesófilo (Akin, 1988). La reacción positiva con AP implica que los tejidos vegetales no se digieren en el rumen, mientras que en los de CS la degradación es lenta y parcial. El mesófilo en plantas jóvenes o arriba de los entrenudos no tiene reacción y son totalmente degradadas.

2.10. *Gemelina arborea*, degradación y variables fermentativas

2.10.1. Degradación de materia seca de hojas de *G. arborea*

Las investigaciones realizadas en la degradación de la MS de diferentes estados de la hoja y con diferentes rumiantes muestran que las degradaciones *in vivo* e *in situ* son más altas que las *in vitro*. Omokanye (2014), Datt (2008), Lowry (1999), Abdu (2012), Okafor (2012), Moemeka (2014) y Burte (2006) determinaron que la degradación fue 58.6 a 86.67 % *in vivo* y 85.9 % *in situ* en hojas de *G. arborea*. Según Datt (2008), la degradación *in vitro* a 24 h de incubación fue 41.8 %.

2.10.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)

La producción de AGV en el rumen es una fuente de energía para los rumiantes, y depende de los ingredientes y de su composición. Los ácidos propiónico, acético y butírico son productos principales en la nutrición de rumiantes. Una alta producción de H₂ en el rumen puede disminuir la producción de AGV porque se reduce la actividad de la microbiota que fermenta los alimentos (Buddle *et al.*, 2011).

2.10.3. Nitrógeno amoniacal

Los microorganismos del rumen producen amonio a partir de la degradación de compuestos nitrogenados de la dieta, el cual es necesario para la síntesis de proteína microbiana. Los bovinos y ovinos pueden desechar 30 a 40 % del N proteínico debido a la fermentación rápida de las proteínas de las plantas a aminoácidos y amonio (Theodorou *et al.*, 2006). La concentración de N-NH₃ se usa para medir la eficiencia de la conversión del nitrógeno dietario a nitrógeno microbiano, pero esta conversión disminuye cuando los niveles de N-NH₃ son menores a 5 mg dL⁻¹.

2.10.4. Producción de biogás

Las investigaciones en nutrición de rumiantes están enfocadas a la disminución del biogás (CH₄ y CO₂) producido en el rumen por dos razones: contribuyen al calentamiento global y causan pérdidas de energía en los rumiantes. Aderinboye *et al.* (2016) evaluaron la fuente del inóculo y especies forrajeras hasta las 48 h de incubación en la producción de biogás, y encontraron que la especie vegetal influye más que la fuente del inóculo.

2.11. Adherencia de microorganismos ruminales a partículas de forraje

Las bacterias en el rumen se clasifican en cinco grupos por el ambiente en el cual se encuentran: 1) bacterias libres asociadas con la fase líquida; 2) bacterias asociadas con las partículas de alimento en forma débil; 3) bacterias adheridas a partículas de alimento en forma fuerte; 4) bacterias asociadas con el epitelio ruminal y; 5) bacterias unidas a los protozoarios y hongos. La degradación de los forrajes está relacionada con la adherencia de bacterias a partículas de alimento; así, las bacterias adheridas producen 88 a 91 % de las endoglucanasas y xilanasas, tienen 70 % de la actividad

amilolítica y 75 % proteolítica. Las bacterias que no están adheridas a partículas de alimento tienen poca actividad en la degradación (Miron *et al.*, 2001). Las fases en el proceso de adhesión se describen a continuación

2.11.1. Transporte de bacterias al sustrato

La unión de bacterias celulolíticas no adheridas a partículas suspendidas de alimento es un proceso en el cual producen compuestos como celodextrinas hacia glucosa, celobiosa o celulosa. Este mecanismo permite que obtengan nutrientes y puedan crecer y sobrevivir en la fase líquida del rumen para su posterior adhesión a partículas de alimento (Miron *et al.*, 2001)

2.11.2. Adhesión inicial no específica

Los mecanismos de adherencia no específica son las fuerzas de atracción de van der Waals (>50 nm), interacciones electrostáticas repulsivas (10 a 20 nm), interacciones electrostáticas y localmente atractivas y fuerzas de van der Waals (2-10 nm); el agua interfacial afecta las interacciones locales y es removida por grupos hidrofóbicos, (0.5-2 nm) y aquellas interacciones específicas (iónicas, H, y enlaces químicos) < 0.5 nm (Miron *et al.*, 2001).

2.11.3. Adhesión específica

En la adhesión específica las bacterias producen adhesinas o ligaduras para unirse a receptores en el sustrato. Las bacterias *R. albus*, *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* producen protuberancias sobre la capa del glucocalix y la formación de adhesinas con sitios de la pared celular, y después de horas de incubación se forman los celulosomas (Miron *et al.*, 2001). Los forrajes con poco contenido de xilosa en la pared secundaria se degradan más rápido que aquellos con alto contenido; los tallos tienen alto contenido de lignina por lo que se degradan menos que aquellos con menor contenido (Kenneth y Jung, 2001).

2.11.4. Proliferación y colonización en los tejidos vegetales.

Las estructuras que usan las bacterias para adherirse a las partículas de alimento son: 1) complejos enzimáticos grandes, 2) polisacáridos externos y, 3) dominio de unión

a la celulosa. La revisión realizada por Miron *et al.* (2001) describe los mecanismos de adhesión de tres bacterias fibrolíticas.

Fibrobacter succinogenes

Los mecanismos de adhesión son la utilización de adhesivos, tiene gluconasas, celodextrinasas, xilanasas, y un dominio que se adhiere a la celulosa, como las endocluganas. Produce celulosomas y fimbrias, tiene 7 proteínas de 40 hasta 240 kDa.

Ruminococcus flavefaciens

La adhesión es más rápida que en otras bacterias ruminales. Las bacterias forman adhesivos para unirse con el sustrato celulolítico. La tasa de dilución de la celulosa cristalina es 0.1 h^{-1} . Tiene celodextrina, xilanasas, esterases. Las diferencias en peso están relacionadas con la cantidad de endoglucanasas: el complejo más pesado tiene 13 endoglucanasas diferentes, y el menor solo 5. Dos mecanismos están incluidos en la adhesión de la bacteria; uno es el complejo parecido al celulosoma y el otro son los epítomos de carbohidratos de la capa del glicocálix.

Ruminococcus albus

La bacteria produce celulasas, xilanasas, y al menos 9 familias de celulasas. Para adherirse tiene estructuras parecidas a fimbrias. Los dominios proveen mecanismos adicionales a la adhesión de la bacteria a la celulosa; también produce celulosomas.

2.11.5. Factores relacionados con las bacterias

Los factores que influyen en el crecimiento de algunas bacterias ruminales fibrolíticas son la edad, las condiciones de cultivo y la competencia microbiana. En *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* el mayor crecimiento fue a la mitad de la curva exponencial. La tripsina, proteinasa K, termolisina, proteasas, lipasas y la fijación de proteínas con glutaldehído disminuyen la adhesión a la celulosa. Las especies de *Ruminococcus* se adhieren más rápido a las partículas de alimento que las de *Fibrobacter*. Las bacterias *B. fibrisolvens* y *Prevotella ruminicola* no compiten en la adhesión y degradación, actúan como especies complementarias (Miron *et al.*, 2001).

2.11.6. Factores relacionados con el sustrato

Fibrobacter succinogenes se adhiere mejor a éteres de celulosa cristalina comparada con celulosa cristalina neutra, y su adhesión a éteres de celulosa aniónica

es reducida. El molido de los sustratos con alto contenido de celulosa aumenta la adhesión a partículas de alimento.

2.11.7. Cuatro factores ambientales relacionados con el proceso de adhesión

1) La temperatura influye en el proceso de adhesión de las bacterias; a adhesión a la celulosa de *R. albus* y *F. succinogenes* es mejor cuando la temperatura es de 30 a 38 °C, se inhibe a 4 °C y disminuye con más de 50 °C. 2) El pH causa diferencia en la adhesión de bacterias a partículas de alimento; con *F. succinogenes* es mayor cuando el pH es 4.5 a 6 y cae si es 7.5; en *R. flavefaciens* la adhesión se mantiene estable si el pH es 3.3 a 7.5, pero disminuye con un pH 8. 3) Los cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ actúan como sitios de unión de la adhesión de bacterias a partículas de alimento; así, la adhesión de *F. succinogenes* es mayor con Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ , y en *R. flavefaciens* Ca^{2+} y Mg^{2+} son los cationes principales para su adhesión. 4) Los carbohidratos solubles como la glucosa, manosa, xilosa, maltosa celodextrina y almidón soluble en una concentración de 1 % no afectan la adhesión. La celobiosa en 1 % sí afecta la adhesión de *F. succinogenes*, pero no la de especies de *Ruminococcus* (Miron *et al.*, 2012).

2.11.8. Tejidos y adherencia microbiana.

La adherencia de los microorganismos ruminales a partículas de alimento comienza después de 30 min de ser ingerido, y la masticación facilita este proceso por la disminución del tamaño de partícula, lo cual aumenta la superficie de contacto. Las bacterias tienen mayor participación en la degradación de la fibra de los alimentos. Las etapas del proceso de adherencia para *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y *R. albus* son transporte de la bacteria al sustrato lo cual es complicado por la carencia de flajelos o cilios, y también el mezclado en el rumen es bajo. Akin y Rigsby (1985) y Akin y Benner (1988) usaron cortes de 1 cm de longitud en *Dactylis glomerata* L., *Cynodon dactylon* L., *Spartina alterniflora* para evaluar la adherencia bacteriana.

Akin y Rigsby (1985) mencionan que existen diferencias en la degradación por las bacterias consideradas de los tejidos vegetales atribuibles a la composición de los mismos. La degradación de los tejidos vegetales como el floema, mesófilo, mesófilode la vaina del haz, esclerénquima y tejido vascular con lignina, es diferente para las

bacterias contenidas en líquido ruminal como *R. flavefaciens*, *R. albus*, *B. fibrisolvens* y *Lachnospira multiparus* a 48 h de incubación. Los tejidos no degradados son el esclerénquima y el tejido vascular lignificado en los pastos *C. dactylon* y *D. glomerata*. Las bacterias fibrolíticas degradan en diferente porcentaje la MS de pastos tropicales y templados (Cuadro 5).

2.11.9. Adherencia y microscopia barrido de electrones

Algunos aspectos importantes para explicar el valor nutricional son: 1) el análisis bromatológico; 2) las características anatómicas de la pared celular de hojas y tallos, que influyen en la adherencia de las bacterias, y; 3) los mecanismos de adherencia y degradación.

Las microscopias óptica, electrónica de barrido o de transmisión se usan para estudiar los mecanismos de adherencia: 1) la óptica permite la identificación y medición de componentes, como cantidad de lignina; 2) la microscopia electrónica de barrido (MEB) permite conocer las pérdidas de tejido después de la degradación y proporciona información de la forma de unión entre los microorganismos y las paredes celulares, así como el orden de desaparición de los diferentes tejidos vegetales y; 3) la microscopia electrónica de transmisión (MET) proporciona imágenes de la estructura de las paredes celulares y el modo de degradación por los microorganismos del rumen (Akin, 1980; Grenet, 1991).

2.11.10. Tamaño de bacterias ruminales relacionadas con la degradación de *G. arborea*.

Omoniyi *et al.* (2014b) determinaron las bacterias relacionadas con la degradación de hojas de *G. arborea*, así como su porcentaje. Los principales géneros y fueron *Prevotella* (16.67 %), *Eubacterium* (11.69 %), *Ruminococcus* (9.52 %), *Butyrivibrio* y *Coprococcus* con (7.14 % cada uno), *Oribacterium* (4.76) %, *Clostridium* (4.75 %). La forma de estas bacterias se relaciona con la adhesión de las mismas a las paredes celulares. El 70 % de la forma fueron cocos encapsulados e irregulares para *C. dactylon* y *D. glomerata*; de éstas, las de forma irregular incrementan con la digestibilidad; los cocos encapsulados se adhieren más al esclerénquima en el pasto bermuda, pero son menos frecuentes en el esclerénquima del pasto festuca (Akin, 1980).

El tamaño de las bacterias en el rumen es importante para la degradación de la pared celular. Algunos de estas bacterias son: *Prevotella ruminicola* es proteolítica con forma de varilla y mide 0.8-1.0 μm ancho y 0.8 -8 μm de longitud. *Eubacterium uniforme* forma colonias de 2 a 8 mm, cocoides, degrada taninos, glucosa, celobiosa y fructosa. Otra especie con forma de barras rectas y cadenas cortas es *E. xilanophilum* de 0.4 a 0.6 μm de ancho y 0.5 a 2.0 μm delargo degrada celobiosa, xilobiosa, no degrada glucosa y ni xilosa. *Ruminococcus flavefaciens* forma cadenas de cocos, miden de 0.7 y 1.6 μm de diámetro degrada celulosa y celobiosa. *Ruminococcus albus* son cocos y diplococos de 0.8– 2.0 μm de diámetro degrada celulosa y celobiosa; no degrada glucosa (Gylswyk, van y Toorn van der, 1985; Omoniyi *et al.*, 2014b; Kumar *et al.*, 2015).

3. LITERATURA CITADA

- Abdu, S. B., Hasan, M. R., Adamu, H. Y., Yashimi, S. M., and Abdullahi, M. J. 2012. Intake, nutrient digestibility and nitrogen balance of *Acacia Auriculata*, *Gmelina arborea*, *Albizia lebbek* and *Butryospermun parkii* by Yakansa bucks. Iranian Journal of Applied Animal Science. 2(2):121-125.
- Adbud, S. B. Hassan M. R., Jokthan G. E., Adamu H. Y., Yashim A. M. and Yusuf K. 2012. Effect of varied inclusion levels of (*Gmelina arborea*) leaf meal on intake, digestibility and nitrogen in Red Sokoto bucks fed on sorghum glume based complete diets. Advances in Agriculture, Sciences and Engineering Research. 2:79-84.
- Aderinboye, R. Y., Akinlolu, A. O., Adeleke, M. A., Najeem, G. O., Ojo, V. O. A., O. A. Isah and Babayemi O. J. 2016. *In vitro* gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inoculum. Slovak Journal of Animal Sciences. 49 (1):32-43.
- Ahamefule, F. O., Obua, B. E., J. A. Ibeawuchi, J. A. and Udosen, N. R. 2006. The nutritive value of some plants browsed by cattle in Umudike, Southeastern Nigeria. Pakistan Journal of Nutrition. 5:404-409.
- Amata, L. A. and Lebari, T. A. 2011. Comparative evaluation of the aminoacid profile and antinutritional content of the leaves of four selected browse plants in the tropics. International Journal of Plant, Animal and Enviromental Sciences. 2(1):107-

111.

- Akin, D. E. 1980. Evaluation by electron microscopy and anaerobic culture of types of rumen bacteria associated with digestion of forage cell walls. *Applied Environmental Microbiology*. 39: 242-252.
- Akin, D. E., and Rigsby, L. L. 1985. Degradation of bermuda and orchard grass by species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(4):825-830.
- Akin, D. E. 1988. Biological structure of lignocellulose and its degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 21:295-310.
- Akin, D.E. and Benner R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacterial and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(5):1117-1125.
- Avellán-Zumbao, M. A., Murillo-Cruz, R, Alvarado-Hernández, A. and Avila-Arias C. 2015. Variación del contenido foliar de nutrimentos de *Gmelina arborea* en los cantones de Osa, Golfito y Corredores, Costa Rica. *Tropical Journal of Environmental Sciences*. 49(1):1-15.
- Aye, P.A, 2016. Feed intake, performance and nutrient utilization of West African Dwarf (WAD) sheep fed *Panicum maximum* and cassava peels supplemented with *Moringa oleifera*, *Gmelina arborea* and *Tithonia diversifolia*-based multinutrient bloccks. *Scholars Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*. 3(2):147-154.
- Aye, P. A., and Tawose, O. M. 2016. Physiological responses of west african Dwarf sheep fed graded levels of *Gmelina arborea* leaves and cassava peel concentrates under different management systems. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 7(4):185-195.
- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M. Van., and Boerjan, W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 17 (2):125-197.
- Brute, R. G., Raut, S. S. M. Y., Jadhav, S. S., Wadekar, V. V. and Yadav, D. N. 2006. Nutritive value of Shivan (*Gmelina arborea*) tree leaves for goats. *Indian Journal of Small Ruminants*. 12(1):110-112.
- Chavarría, M. y Valerio, R.. 1993. Guía preliminar de parámetros silviculturales para apoyar los proyectos de reforestación en Costa Rica. MINAE, San José. 202 pp.
- Chander Datt, Datta, M and Singh, N.P. 2008. Assessment of fodder quality of leaves of

- multipurpose trees in subtropical humid climate of India. *Journal of Forestry Research*. 19(3):209-214.
- Chao Feng., Shiwen Ding, Tianyuan Zhang., Zhiquian Li., Deli Wang, Ling Wang., Chen Liu, Jinyan Sun and Fugang Peng. 2015. High plant diversity stimulates foraging motivation in grazing herbivores. *Basic and Applied Ecology*. 17:43-51.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., and Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*. 545-546: 556-568.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) SEMARNAT. 2011. Programa de Inversión Forestal. Plan de Inversión México. 52 pág.
- Donalson, L. A. 2001. Lignification and lignin topochemistry-an ultrastructural view. *Phytochemistry*. 57:859-73.
- El-Mahmood, A. M., Doughari, J. H. and Kiman, H. S. 2010. *In vitro* antimicrobial activity of crude leaf and stem bark extract of *Gmelina arborea* (Roxb) against some pathogenic species of *Enterobacteriaceae*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4(6):355-361.
- Eye, P. A. 2016. Comparative nutritive value of *Moringa oleífera*, *Tithonia diversifolia* and *Gmelina arborea* leaf meals. *American Journal of Food and Nutrition*. 6(1):23-32.
- FAO. 2016a. Los países de América Latina y el Caribe reiteran recisión de lucha contra el hambre. Comunicado de Prensa. <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/385813/>.
- FAO. 2016b. FAOSTAT Emissions Database, Agriculture, Manure Management. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/GM>.
- Fuwape, J. A., Onyekwelu, J. C. and Adekunle, V. A. J. 2001. Biomass equations and estimation for *Gmelina arborea* and *Nauclea diderrichii* stands in Akure forest reserve. *Biomass and Bioenergy*. 21:401-405.
- Getachew, G., Depeter, E J., Robison, P. H., and Fadel, J.G. 2005. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124:547-559.

- Grenet, E. 1991. Electron microscopy as a method for investigating cell wall degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 32:27-33.
- Gordon, A. M., Naresh, R. P. F. and Thevathasan, V. 2015. How much carbon can be stores in Canadian agroecosystems using a silvopastoral approach? *In: Silvopastoralism and Sustainable Management*. Editores: M.R. Mosquera-Losanda, A. Rigueiro-Rodriguez and J. McAdam. pp: 210-218.
- Gylswyk, N. O. van and Toorn, J. J. T. K. 1985. *Eubacterium uniforme* sp. nov. and *Eubacterium xylanophilum* sp. nov., fiber-digesting bacteria from the rumina of sheep fed corn stover. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 35:323-326.
- Hernandez, A., Kholif, A. E., Elghandour, M. M. Y. Camacho, L. M., Cipriano, M. M., Salem, A. Z. M., Cruz H., and Ugbogu, E. A. 2017. Effectiveness of xylanases and *Saccharomyces cerevisiae* as feed additives on gas emissions from agricultural calf farms. *Journal of Cleaner Production*. 148:616-623.
- Hill, J., McSweendy, C., Wright, A.D. G., Bishop-Hurley, G. B. and Kalantar-zade, K. 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends in Biotechnology*. 34(1):26-35.
- Hoekstra, N. J. , Shuelte, R. P. O., Struik, P. C., and Latinga, E. A. 2007. Pathways to improving the N efficiency of grazing bovines. *European Journal of Agronomy*. 26:363-374.
- IPCC. 2007. *Climate Change. Fourth Assesment Report*, Cambrige University Press, London. http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/syr/es/spms3.html.
- Johnson, K. A. and Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73:2483-2492.
- Johnson, E. D., Wood, A. S., Stone, J. B. y Moran Jr., E. T. 1972. Some effects of methane inhibition in ruminants (steers). *Canadian Journal of Animal Science*. 52:703–712.
- Jung, H. G., Engels, F. M., and Weimer, P. J. 2004. Degradation of lucerne stem cell walls by five rumen bacterial species. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*. 52(1):11-28.
- Kaleeswari, R. K. 2015. Assessment of biological efficiency of silvipasture systems. *The*

- Madras Agricultural Journal. 102(10-12):380-389.
- Kamra, D. N., Neeta, Agarwal, and Chaudhary, L.C.2015. Manipulation of rumen microbial ecosystem for reducing enteric methane emission in livestock. *In: Climate change impact on livestock: Adaptation and mitigation.* pp:255-272.
- Kennedy, P. M., and Lowry, J. B. 2002. Do tree leaves promote digestion of grass by cattle?. *Animal Production Australia.* 24:121-124.
- Kanneth, J. M. and Jung, H. J. G. 2001. Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management.* 54:420-430.
- Kumar, P. C., Mohamed, S. A. Z., Jena R., Kumar, S., Singh, R and Anil Kumar, P. 2015. Rumen microbiology: An Overview. *In: Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution.* Kumar P.A., Singh R., and Nendan K. D. Eds. pp:6.
- López, A. J. L., Sanchez, M. V. y Hernández, M. E. 2010. Crecimiento inicial de una plantación mixta de especies tropicales en Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales.* 1(2):53-64.
- Madana, M. R. A., Arjun, K., Kurniawan, R. T. and Pereira, A. 2011.Coordinated activation of cellulose and repression of lignin biosynthesis pathways in rice. *Plant Physiology.* 155:916-933.
- Malaku, S. Kurt, J. P. and Azage, T. 2004. Effects of supplementation with foliages of selected multipurpose trees, their mixtures or wheat bran on feed intake, plasma enzyme activities, live weight and scrotal circumference gains in Menz sheep. *Livestock Production Science.* 89(2):253-264.
- Marin, C., Morgavi, D. P. and Doreu, M. 2009. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4(3):351-365.
- McAllister, T. A., Meale, S. J., Valle, E., Guan, L. L., Zhou, M., Kelly W. J., Henderson, G., Attwood, G. T., and Janssen, P.H. 20015. Ruminant nutrition symposium: Use of genomics and transcriptomics to identify strategies to lower ruminal methanogenesis. *Journal of Animal Science.* 93(4):1431-1449.
- Moemeka, M. A., Okagbare, G. O., and Sorhue, G. U. 2014. The optimum feeding level of *Gmelina arborea* leaves supplemented with *Pennisetum purpureum* to West Afrucan Dwarf (WAD) goats. *Animal Biology and Animal Husbandry. International Journal of the Bioflux Society.* 6(2):134-139.

- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., and Morrison, M. 2001. Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*. 84:1294-1309.
- Obregón, C. 2006. *Gmelina arborea*: Versatilidad, renovación y productividad sostenible para el futuro. *Revista el Mueble y la Madera (M & M)*. 50:14-20.
- Okafor, E. C., Lakpini, C. A. M., and Fayomi, A. 2012. Dried *Gmelina arborea* Roxb) leaves as replacement forage to groundnut haulms in the diet of fattening Red Sokoto buks. *International Journal of Agriculture Biosciences*. 1(1):5-10.
- Olijhoek, D. W., Hellwing, A. L. A., Brask, M., M. R. Wesbjerg, M. R., Hejberg, O., Larsen, M. K., Dijkstra, J., Erlandsen, E.J., and Lund, P. 2016. Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 99(8):6191-6205.
- Omokanye, A. T., Balogun, R. O., Onifade, O. S., R. A. Afolayan, R. A. and Olayemi, M. E. 2001. Assessment of preference and intake of browse species by Yankasa sheep at Shika, Nigeria. *Small Ruminant Research* 42:203-210.
- Omokanye, A. T., Lamidi, O. S. and Oyeleke, L. S. 2014. *Gmelina arborea* at Shika, Nigeria: Nutritive indices, preferences and intake of plant parts by Yankasa Sheep. *International Journal of Research in Agriculture and Forestry*. 1(2):31-36.
- Osakwe, I. I y Udeogu, N. R. 2007. Feed intake and nutrient digestibility of West African Dwarf goat fed *Pennisetum purpureum* supplemented with *Gmelina arborea*. *Animal Research International*. 4(3):724-727.
- Pal, K., Patra, A. K., Sahoo, A, N. M. Soren,. 2015. Effects of nitrate and fumarate in tree leaves based diets on nutrient utilization, rumen fermentation, microbial protein supply and blood profiles in sheep. *Livestock Science* 172:5-15.
- Palm, C. A., Gachengo, N. C., Delve, R. J., Cadish, G., and Giller, K. E. 2001. Organic inputs for soil fertility management in tropical agroecosystems of an organic resource database. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 83:27-42.
- Palmer, J. M. and Evans, C. S. 1983. The enzymatic degradation of lignin by white-rot fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*. 300(1100):293-303.
- Patra, A. K. 2016. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric

- methane emissions in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*. 3(39):1-17.
- Patra, A. K. and Yu, Zhongtang. 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.
- Raj, C. D. and Pemiah, B. 2014. Pharmacognostical phytochemical and *in vivo* gastroprotective investigation of *Gmelina arborea*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(4):153-157.
- Rasineni, G. K., Guha, A., and Reddy, A. R. 2011. Responses of *Gmelina arborea* a tropical deciduous tree species, to elevated atmospheric CO₂: Growth, biomass productivity and carbon sequestration efficacy. *Plant Science*. 181:428-438.
- Reddy, A. R., Rasineni, G. K. and Raghavendra, A. S. 2010. The impact of global elevated CO₂ concentration on photosynthesis and plant productivity. *Current Science*. 99(1):46-57.
- Róger, M. R. 2003. La madera de melina (*Gmelina arborea*) en Costa Rica. XII World Forestry Congress. Québec City, Canada. <http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/WFC/XII/0591-B4.HTM>.
- Rojas, R. F., Arias, A. D., Moya, R. R., Meza, M A., Murillo, G. O., y Arguedas, G. M. 2004. Manual de productores de melina *Gmelina arborea* en Costa Rica. Cartago. 314 pag.
- Rosete-Vergés, F. A., Pérez-Damián, J. L., Villalobos-Delgadillo, M., Navarro-Salas, E. N., Salinas-Chávez, y Remond-Noa, R. 2014. El avance de la deforestación en México 1976-2007. 20(1):2135.
- Riaz, M. Q., Südekum, K.-H., Clauss, M. and Jayanegara, A. 2014. Voluntary feed intake and digestibility of four domestic ruminant species as influenced by dietary constituents: A meta-analysis. *Livestock Science*. 162:76-85.
- Sawyer, M.S., Hoover, W.J. y Sniffen, C.J. 1974. Effects of a ruminal methane inhibitor on growth and energy metabolism in the ovine. *Journal Animal Science*. 38:908–914.
- Semarnat. 2009. Cambio climático. Ciencia, evidencia y acciones. México. 93 pág. www.gobiernofederal.gob.mx. y www.semarnat.gob.mx.

- Smith, P., Martino D., Cai Z., Gwary D., Janzen H., Kumar P., McCarl B., Ogle S., O'Mara F., Rice C., Scholes B., Sirotenko O., Howden M., McAllister M, Pan G., Romanenkov V., Schneider U, Towprayoon S. , Wattenbach M and Smith J. 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. Philosophical Transactions of The Royal Society B. 363:789-813.
- Singhvi, M., and Gokhale, D. 2013. Biomass to biodegradable polymer (PLA). Royal Society of Chemistry Advances. 3:13558-13568.
- Sosa-Rubio, E. E., Pérez, R. D., Ortega, R. L. y Zapata, B. G. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. Técnica Pecuaria México. 42(2):129-144.
- Swamy, S. L., Mishra, A. and Puri, S. 2003. Biomass production and root distribution of *Gmelina arborea* under and agrisilviculture system in suhumid tropics of Central India. New Forests 26:167-186.
- Tager, L. R. and Krause, K. M. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 94:2455-2464.
- Theodorou, M. K., Kingston-Smith, A. H., Winters, A. L. Lee, M. R. F., Minchin, F. R., Morris, P. and MacRae, J. 2006. Polyphenols and their influence on gut function and health in ruminants: a review. Environmental Chemistry Letter. 4:121-126.
- Tomkins, N. W., Colegate, S. M. y Hunter, R. A. 2009. A bromochloromethane formulation reduces enteric methanogenesis in cattle fed grain-based diets. Animal Production Science. 49: 1053–1058.
- Udeh, I., Isikwenu, J. O. and Obika, G. C. 2013. Forage species availability, preference and grazing behaviour of Muturu and Zebu cattle in Asaba, Delta state, Nigeria. Online Journal of Animal and Feed Research. 3(5):197-201.
- Varhney, V. K., Gupta, P. K., Naithani, S., Khullar, P. Bhatt, A., and Soni, P.L. 2006. Carboxymethylation of α -cellulose isolated from lantana camara with respect to degree of substitution and rheological behavior. Carbohydrate Polymers. 63:40-45.
- Vanholme, R., Brecht, D. K. M., Ralph, J. and Boerjan, W. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. Plant Physiology. 53:895-905.
- Waters, K. M., DiLorenzo, N., and Lamn, G. C. 2013. Understanding the effects of

forage composition and structure in ruminant nutrition. Department of Animal Sciences, Florida Cooperative Service. Institute of food and Agricultural Science. University of Florida. pp:1-3. <http://edis.ifas.ufl.edu>.

Wilkes, A., Barnes, A. P., Batkhisig, B., Clare, A. Namkhainyan, B., Tserenbandi, Chuluunbaatar, N., and Namkhainyam, T. 2017. Is cross-breeding with indigenous sheep breeds and option for climate-smart agriculture?. *Small Ruminant Research*. 147:83-88.

CAPÍTULO I. ANATOMÍA DE LA HOJA DE *GMELINA ARBOREA* Y ESTUDIO HISTOQUÍMICO DE LIGNINA Y TANINOS EN LOS TEJIDOS DE LA NERVADURA CENTRAL Y LÁMINA FOLIAR.

RESUMEN

La hoja de *G. arborea* presenta una anatomía típica de dicotiledónea. La epidermis adaxial esta formada por un estrato de células del parénquima, cubiertas por una cutícula. La epidermis adaxial es glabra en contraste con la abaxial que tiene tricomas no glandulares y glandulares. El mesófilo presenta mesófilo empalizado y esponjoso. El mesófilo en empalizada está formado por un estrato de células debajo de la epidermis y ocupa 70.5 % del ancho de la lámina. El mesófilo esponjoso consta de células irregulares que ocupan 29.5 % del ancho de la lámina. La nervadura central presenta colénquima subepidérmico adaxial y abaxial, el haz central es concéntrico anficribal, con xilema en el centro y el floema en los extremos. El área total de la nervadura central con corte transversal y el área relativa (%) del tejido lignificado (teñido para lignina con fluoroglucinol y HCl) se calculó en cortes transversales de hojas cosechadas en dos épocas (seca y lluvias). El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial: los factores fueron el tamaño de las hojas; chicas (Hc; menos de 210.67 cm²), medianas (HM; más de 210.67 a 302.93 cm²) y grandes (Hg; más de 302.93 cm²) y la época climática, y el factor árbol fue considerado como efecto aleatorio. El efecto de la interacción tamaño de hoja x época fue significativo en el área de la nervadura total, área relativa de tejido lignificado en la nervadura, ancho de la nervadura y de la lámina foliar ($P < 0.05$), pero no fue significativo para el área relativa (%) que que ocupa el tejido lignificado del área total ($P > 0.05$). Las diferencias en la

precipitación y temperatura entre las épocas del año pudieron causar la diferencia detectada en las variables evaluadas.

ABSTRACT

The leaf of *G. arborea* presents a typical dicotyledonous anatomy. The adaxial epidermis is formed by a stratum of parenchyma cells, covered by a cuticle. The adaxial epidermis is glabrous in contrast to the abaxial which has non-glandular and glandular trichomes. The mesophyll has mesophylic palisade and spongy. The palisaded mesophyll is formed by a stratum of cells below the epidermis and occupies 70.5% of the width of the lamina. The spongy mesophyll consists of irregular cells that occupy 29.5% of the width of the lamina. The central vein presents subepidermal adaxial and abaxial collenchyma, the central bundle is concentric anficribal, with xylem in the center and the phloem at the ends. The total area of the central rib with cross section and the relative area (%) of the lignified tissue (dyed for lignin with fluoroglucinol and HCl) were calculated in cross sections of leaves harvested in two seasons (dry and rainy). The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement: the factors were the size of the leaves, small (Hc, less than 210.67 cm²), medium (HM, more than 210.67 to 302.93 cm²) and large (Hg, more than 302.93 cm²) and the climatic epoch, and the tree factor was considered as a random effect. The effect of the leaf size x epoch interaction was significant in the the total rib area, relative area of lignified tissue in the rib, width of the rib and leaf blade ($P < 0.05$), but was not significant for the relative area (%) that occupies the lignified tissue of the total area ($P > 0.05$). The differences in precipitation and temperature between the seasons could cause the difference detected in the variables evaluated.

INTRODUCCIÓN

La lignina reduce la degradación de los forrajes utilizados en la alimentación de rumiantes (Raffrenato *et al.*, 2009). Los monómeros de la lignina como los ácidos cumárico y ferúlico, *p*-hidrosibenzaldehído y vainillina se localizan en diferentes partes de las estructuras en las plantas (Zuhainis Saad *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012), y dentro de cada estructura se encuentran en la paredes secundarias de las células. Los

monómeros modifican la adhesión de las bacterias ruminales a las partículas sólidas en el rumen (Akin 1980; Akin y Rigsby, 1985; Akin y Benner 1988). Las bacterias, hongos y protozoarios son parte de la microbiota ruminal que interviene en la degradación de los alimentos. Los hongos ruminales disuelven la matriz lignina-xilano y rompen la estructura de la pared celular (McSweeney *et al.*, 1994); así, las bacterias *R. albus*, *R. flavefaciens*, *B. fibrisolvans*, *B. succinogenes* degradan compuestos de los materiales lignocelulolíticos (Chen, 2014) para lo cual usan proteasas, esterases y celulasas (Nagpal *et al.*, 2011). Las bacterias degradan en diferente proporción las partes de hojas y tallos de gramíneas, leguminosas y otras familias (Miron *et al.*, 2001). La lignina es convertida a CO₂ o CH₄ por las bacterias con más eficiencia que los hongos, pero esta conversión está relacionada con los monómeros en los tallos u hojas (Akin y Benner, 1988). La determinación histológica de la lignina es un factor en la caracterización de cualquier planta usada como alimento para rumiantes (Lowry, 1995; Datta and Singh 2007; Datt *et al.*, 2008; Moemeka *et al.*, 2014). Las hojas de *G. arborea* se usan en la alimentación de rumiantes, conejos, y cerdos; en época de sequía se utilizan hojas verdes o secas y se obtienen mejores resultados en borregos alimentados con hojas verdes recién cortadas y picadas. Los estudios histoquímicos de las hojas explican su inicio, maduración y caída (Rao y Dave, 1983), y también se puede caracterizar la localización de la lignina en las hojas, lo cual es útil en la desarrollo de estrategias que permitan mejorar la degradación de los forrajes en el rumen (Huws *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

1. Estudiar la anatomía de las hojas de *G. arborea* para identificar los componentes histológicos en corte transversal.
2. Evaluar el área relativa con tejido lignificado en corte transversal de la nervadura central y lámina foliar de *G. arborea*, detectada mediante histoquímica.
3. Identificar por un procedimiento histoquímico la presencia de taninos en la nervadura central y lámina foliar de *G. arborea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la plantación

La plantación de *G. arborea* se encuentra en la comunidad de Ignacio Muñoz “Zapotal”, Municipio de Gutiérrez Zamora, Veracruz. Los árboles tenían una edad de 5 años y se plantaron a una distancia de 6 m entre surcos y 2 m entre árboles. Las coordenadas son 20°27' 0.936" N, 97°10'36.48" O. El clima es Aw (García, 2004); cálido-húmedo con luvias en verano (96 %) y calido subhúmedo con luvias en verano (4 %), con una temperatura promedio de 25.5 °C y una precipitación anual de 1400 a 1600 mm.

Diseño experimental y modelo estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, con un arreglo factorial: la época y el tamaño de la hoja son los efectos fijos y el árbol es el efecto aleatorios. Para el análisis de los datos se utilizó el procedimiento GLIMMIX de SAS.

El modelo estadístico para el análisis de las variables respuesta es:

$$Y_{ijk} = \mu + E_i + A_j + S_k + EA_{ij} + ES_{ik} + (AS)_{jk} + EAS_{ijk} + \xi_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde μ = a la media poblacional; E es el efecto de la época ($i \dots 1$ a 2); A es el efecto del árbol (efecto aleatorio $j \dots 1$ a 9); S es el tamaño ((efecto fijo) $k \dots$ chica (1) , mediana (2) y grande (3)); $(EA)_{ij}$, $(ES)_{ik}$, $(EAS)_{ijk}$ son los efecto de las interacciones; ξ_{jk} es el error asociado al muestreo de la hoja en el árbol; y ε_{ijk} es el error aleatorio o error de medición

Precipitación y temperatura

Los datos de precipitación y temperatura considerados para el experimento se obtuvieron de la estación meteorológica de Tecolutla, Veracruz, y fueron proporcionados por la Comisión Nacional del Agua (CNA; Cuadro 6) para el año 2015.

Cuadro 6. Condiciones climáticas promedios \pm desviación estándar en las épocas de muestreo en los meses de enero y julio hasta el día del muestreo en el año 2015.

Muestreo	Precipitación (mm d ⁻¹)	Temperatura (°C d ⁻¹)
Enero 27/01/2015	3.47 \pm 7.5	14.87 \pm 14.8
Julio 15/07/2015	6.46 \pm 10.05	24.73 \pm 24.78

Este experimento se realizó en el Laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Caracterización de los tamaños de hoja

El tamaño de la hoja se consideró debido a la complejidad para realizar un muestro con base en la madurez de la hoja, ya que en los árboles hay distintos tamaños en un tiempo determinado; y el supuesto fue que las hojas chicas (Hc) eran más jóvenes y las grandes (Hg) eran más viejas. Para el muestreo se recolectaron cinco hojas por cada tamaño: chicas (Hc), medianas (Hm) y grandes (Hg) de cinco árboles, se sacó una fotocopia con una reducción al 75 % de cada hoja, se usó una regla para calibrar el programa Image Tool 3 y con ella se midió el área de la lámina de la hoja.

Proporción por tamaño por época del año

Para conocer la presencia o ausencia de los tamaños de hojas por época del año en la explotación, se observaron las hojas de 84 árboles. En cada árbol se cotejó la presencia o ausencia de cada uno de los tres tamaños de hojas y se calculó el porcentaje de los árboles con respecto al total de los observados; la cantidad de árboles con presencia o ausencia de cada tamaño de hoja se dividió entre el número de árboles totales.

Histoquímica de lignina y área relativa de tejido lignificado en la nervadura central y lámina foliar

De la parte central de la hoja (Imagen 3) se obtuvieron fragmentos de 2 cm² de 4 hojas por cada tamaño de 3 árboles en la época seca (27/01/2015) y 2 hojas de cada tamaño de 3 árboles en la época de lluvias (15/07/2015). Los fragmentos se fijaron en solución FAA (10 mL de formaldehído 37- 40 % + 5 mL de ácido acético glacial + 50 mL de etanol 96 %, agua destilada 35 mL) (Sandoval, 2005), durante 48 h. Después los tejidos se enjuagaron tres veces en agua y se colocaron en etanol 50 %. Con un micrótopo (Jung Alemania) se realizaron cortes transversales de la nervadura central y lámina de la hoja de 80 a 100 µm para determinar la presencia de lignina con fluorogruicinol 2 % en etanol y HCl 50 % (Pomar *et al.*, 2002). El color rojo indica la presencia de lignina en la nervadura central (Imagen 1). Las variables fueron: área total de la nervadura central, área de tejido lignificado, ancho de la nervadura central y ancho de la lámina. Las fotografías se obtuvieron a aumentos de 30x y 50x con un microscopio óptico (Axioestar Plus, Carl Zeiss, Alemania) y con una cámara Moticam 5MP (Motic Asia, Hong Kong) se fotografió la imagen. El cálculo del área relativa, en corte transversal, ocupada por el tejido lignificado en la nervadura central se hizo mediante análisis de imágenes con los programas computacionales GIMP 2.8.14 e Image Tool 3.0. 100. El GIMP 2.8.14 se utilizó para generar una imagen de la nervadura en dos colores, azul el área total y en color rojo el área teñida con la solución de fluorogruicinol. Después se utilizó el Image Tool 3.0.100 para generar una imagen en escala de grises y obtener las áreas de la nervadura central y el área con lignina (Imagen 2), y al final se calculó el área relativa con tejido lignificado.

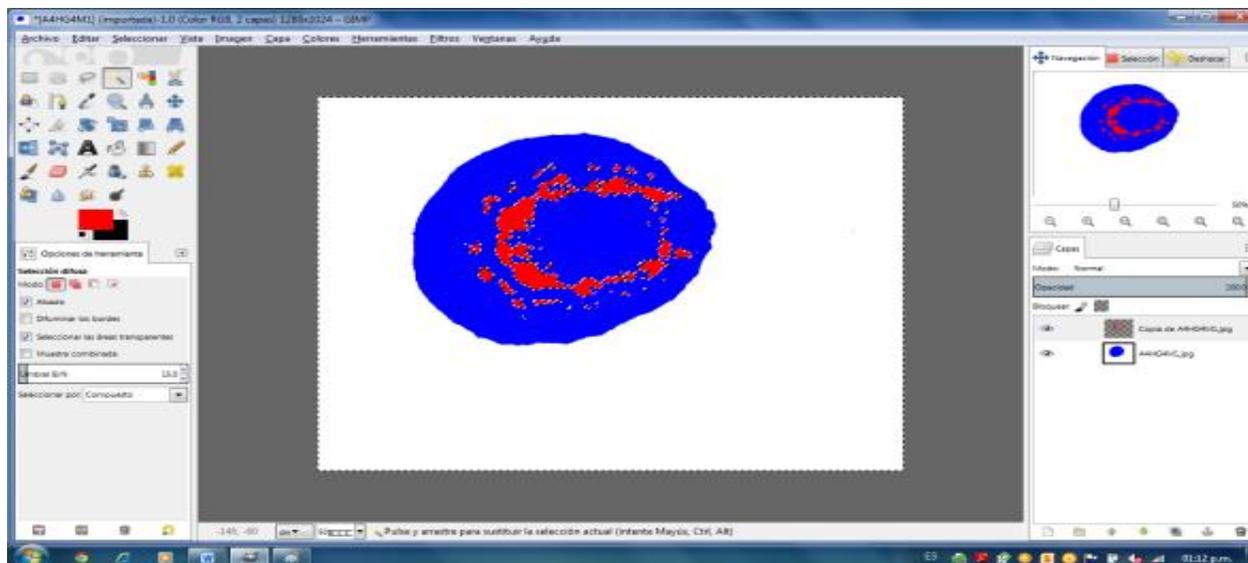


Imagen 1. Uso de GIMP 2.8.14 para obtener la imagen en dos colores. Azul representa el área total de la nervadura y rojo el área con lignina dentro de la nervadura central.

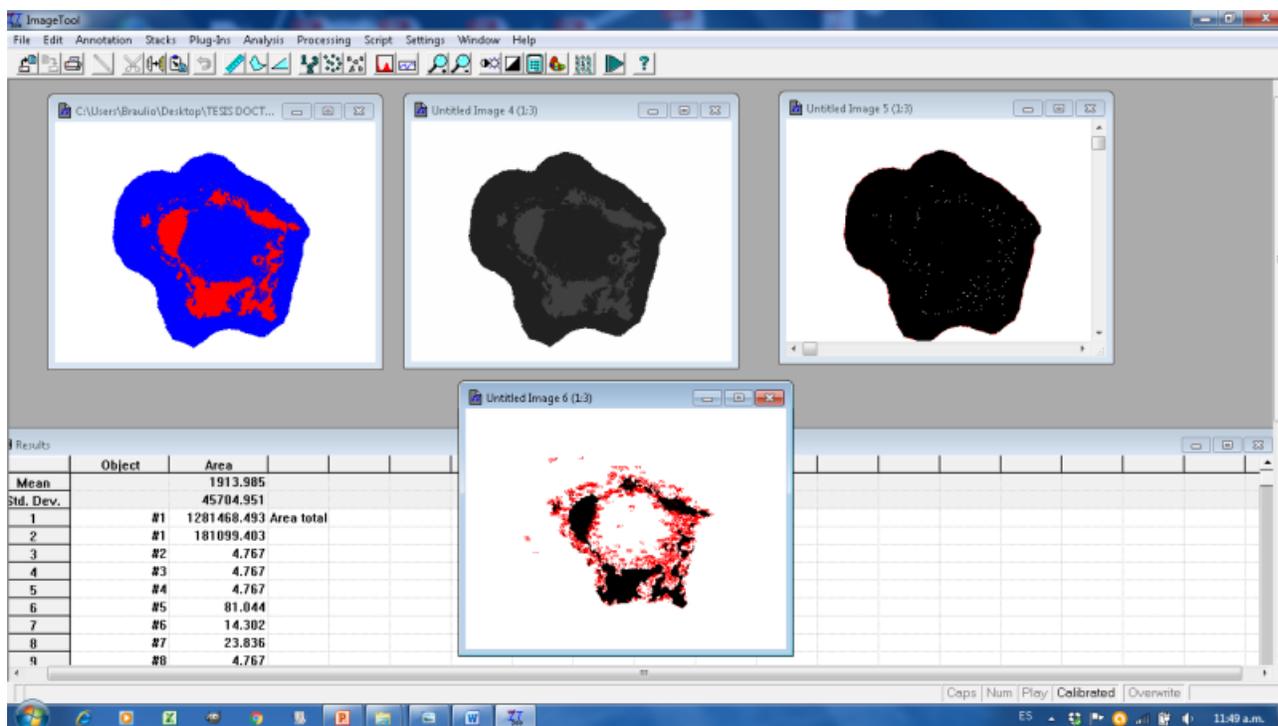


Imagen 2. Uso de Image Tool para medir la área total y la área con lignina de la nervadura central. El azul representa el área total y el rojo el área lignificada. Los

puntos en rojo en la imagen negro y rojo indican las áreas que integran la superficie con lignina.

Histoquímica de taninos en la nervadura central y lamina foliar

La detección de taninos se realizó en cortes de hojas frescas no sometidas a fijación y los cortes se tiñeron directamente después de ser cortados, sin pasar por ninguna solución. La detección de taninos en la nervadura central y en la lámina de la hoja se realizó usando vainillina al 10 % en etanol 96 % y HCl al 50 % en tejido fresco (Broadhurst y Jones, 1978). De cada tamaño se analizaron 4 hojas frescas. Como control de la técnica se realizó una prueba con la planta *Salix spp.*, la cual es positiva por el contenido de taninos presente en sus hojas.

Anatomía de la hoja de *G. arborea*

Fragmentos (1 cm²) se fijaron en FAA a temperatura ambiente por 48 h. Luego se realizaron dos lavados con agua desionizada para eliminar el fijador y se deshidrataron en alcoholes graduales de 30 % hasta 100 %, y después en soluciones de etanol: xileno 3:1, alcohol xileno 1:1, 1:3, xileno absoluto 1 y xileno absoluto 2; cada cambio duró 40 min. Las muestras se colocaron en canastillas histológicas para la inclusión en parafina 1 a una temperatura de 60 °C durante 4 h, y luego en parafina 2 a 60 °C por al menos 4 h. Después se elaboraron bloques de la muestra orientada para corte transversal y se adhirieron a bloques de madera de 1.5 x 1 x 2.5 cm. Los cortes de 12 a 15 µm se realizaron en un micrótopo rotatorio (Spencer 820 Rotary Microtome, Bethlenhem, Pennsylvania, USA) para ser adheridos a un porta objetos con adhesivo de cromo para su tinción con safranina O y verde fijo FCF, según Zavaleta-Mancera y Engleman (1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas muestreadas de los arboles se agruparon en tres tamaños: las chicas (Hc) hasta 210.67 cm², las medianas (Hm) más de 210.67 a 302.93 cm² y las grandes (Hg) más de 302.93 cm². Los resultados de la observación de los arboles con presencia o ausencia de los tres tamaños de hojas se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Porcentaje de árboles con tamaños de hojas presentes o ausentes por época del año en *Gmelina arborea*.

Época	Total de árboles	Hoja chica		Hoja mediana		Hoja grande	
		Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia
Seca 27/01/2015	84	100.00	0.00	85.67	14.33	50.00	50.00
Lluvia 15/07/2015	84	100.00	0.00	55.00	45.00	45.00	55.00

De acuerdo con la prueba de histoquímica de lignina, los tejidos lignificados que están en la nervadura central fueron los vasos del xilema y el floema (Figura 1).

Los porcentajes del área relativa lignificada en la nervadura central se observan en el Cuadro 8. Las nervaduras centrales de las Hm y Hg presentaron las áreas relativas de tejido lignificado más altas. La interacción tamaño de hoja x época fue significativa en el área de la nervadura total, área con lignina y ancho de la nervadura y margen ($P < 0.05$), pero no fue significativa ($P > 0.05$) para el área relativa de tejido lignificado en la nervadura con respecto al área total de la nervadura. La nervadura central de las Hg mostraron un área mayor de tejido lignificado en la época seca ($P < 0.05$; Cuadro 8). El área de la lámina foliar se utiliza para predecir el rendimiento en biomasa de las plantas y es un factor que explica su crecimiento (Patel *et al.*, 2014). La producción de biomasa está relacionada con la xilogénesis y lignificación. El desarrollo del xilema es diferente en las épocas del año, causa las diferencias en la lignificación de la pared celular en los tejidos de las plantas, y está definida por un estado de dormancia y otro de actividad cambial (Funada *et al.*, 2016). La sequía es uno de los factores que modifica la estacionalidad de la dormancia cambial (Mendivelso *et al.*, 2016). Cuando disminuyen las lluvias, el abasto de agua se reduce y aumenta la vulnerabilidad del sistema (Liang *et al.*, 2016), lo cual afecta el crecimiento del xilema en calidad y cantidad. Las plantas responden en forma diferente a la cantidad de precipitación pluvial anual (Pumijumngong and Buajan, 2013), lo que afecta el crecimiento del xilema y la división celular (Patel *et al.*, 2014); así, en la época de seca las plantas crecen menos. Además, durante la

época de seca la *G. arborea* empezó a tirar las hojas y después inició su floración, y es cuando necesita una mayor cantidad de nutrimentos en los brotes florales, flores y, después, producción de semilla. La lignificación es un proceso dinámico y flexible (Wang *et al.*, 2013) que influye en la xilogénesis conforme a la precipitación (Balducci *et al.*, 2013) y no puede ser evitado porque dañaría la estructura de las plantas (Valente *et al.*, 2016). Durante el crecimiento del xilema la lignina aumenta en la lámina media de la pared secundaria y se une a otros componentes de la pared celular, lo cual causa que las paredes celulares engruesen y den estabilidad al xilema para el transporte de nutrientes (Frei, 2013).

Cuadro 8. Efecto del tamaño de hoja y época de muestreo en el área relativa de tejido lignificado y el ancho de la nervadura central y lámina foliar de *Gmelina arborea*.

Tamaño de hoja	Época	Área total de la nervadura central (mm ²)	Área de tejido lignificado en la nervadura central (mm ²)	Área relativa de tejido lignificado en la nervadura central (%)	Ancho de la nervadura (mm)	Ancho de la lámina (mm)
Chica		1.23c	0.24cd	19.09ab	1.43b	0.18 ^a
Mediana	Seca	1.93b	0.39b	20.3a	1.79a	0.14b
Grande	27/01/2015	2.79a	0.59a	20.8a	1.59ab	0.12c
Chica		1.12c	0.19d	16.6b	1.22c	0.12c
Mediana	Lluvia	1.83b	0.33bc	16.9b	1.59ba	0.15b
Grande	15/07/2015	1.92b	0.39b	19.3ab	1.73a	0.12c
EEM		0.07	0.02	0.003	0.03	0.002

Letras diferentes después de medias indican diferencia estadística; EEM: Error estándar de la media; n=156.

Los valores de significancia se pueden observar en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Valores de probabilidad para cada factor e interacción considerados en el modelo de análisis.

Factor	Área total de la nervadura central	Área de tejido lignificado en la nervadura central	Área relativa de tejido lignificado en la nervadura central	Ancho de la nervadura	Ancho de la lámina
Tamaño de hoja	***	***	**	***	***
Época	**	**	**	NS	***
Tamaño de hoja * época	*	*	NS	*	***
-2 Res Log Likelihood	332.96	-84.55	-519.63	155.68	-617.99

Significancia: NS no significativo; *P < 0.05; **P < 0.001; ***P < 0.0001.

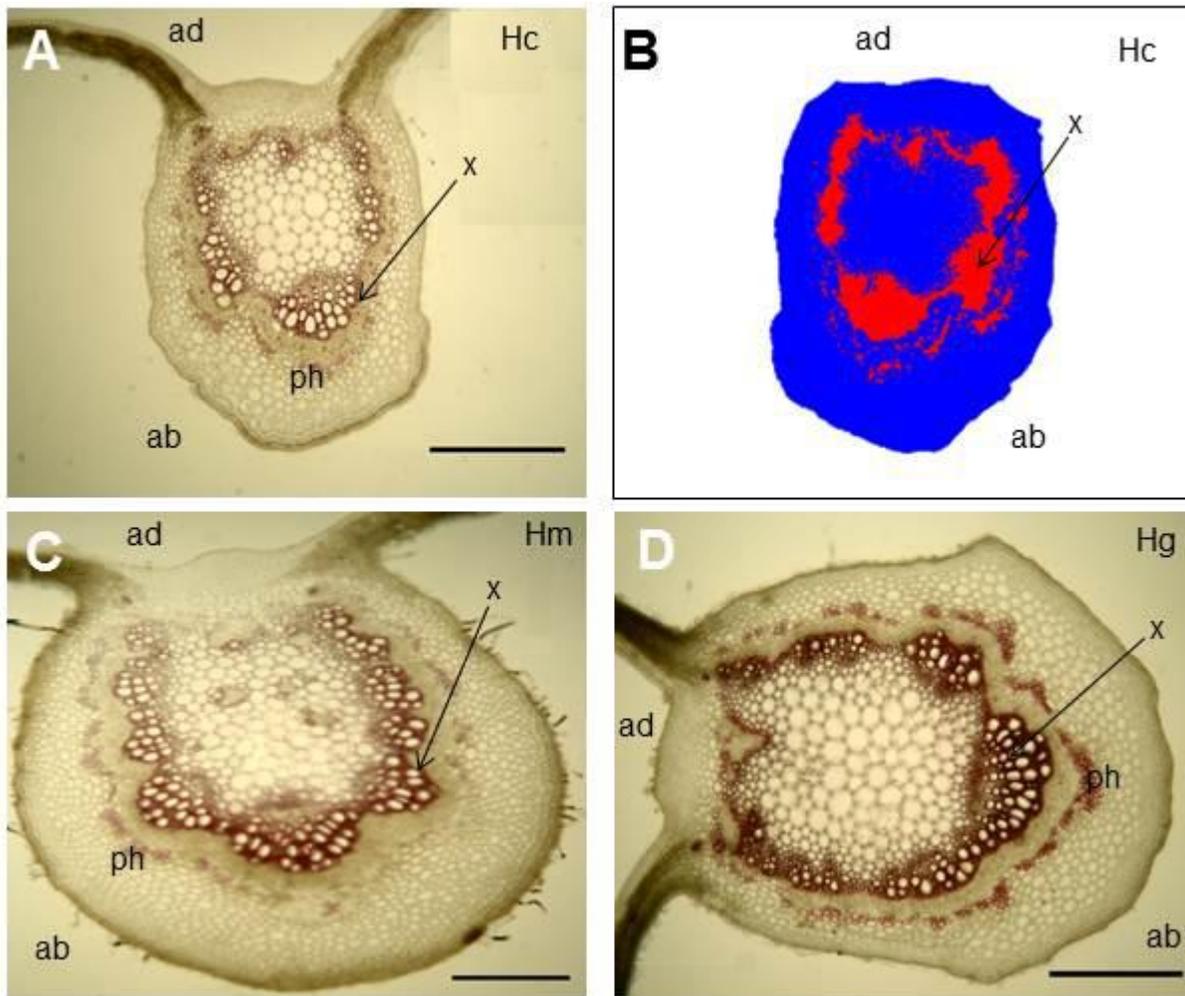


Figura 1. Histoquímica de lignina. Área de tejido lignificado en la nervadura en color rojo con respecto al área total de la nervadura central en color azul. Imágenes A: Hc Hoja chica y B: Fragmentación de la imagen en rojo tejido lignificado y en azul área total de la nervadura central; hoja chica (Hc); C: hoja mediana (Hm); D: Hoja grande (Hg); ad cara adaxial; ph floema; x, xilema, ab cara abaxial. (Barra 500 μ m).

El verde FCF tiñe las paredes primarias sin lignina de color verde, mientras que safranina tiñe las paredes secundarias de color rojo (Zavaleta-Mancera y Engleman 1994). En las hojas de *G. arborea* el xilema y las fibras del floema se tiñeron de color rojo lo cual coincidió con la tinción para lignina con fluoroglucinol y HCl. El mesófilo en empalizada y mesófilo esponjoso se tiñeron de color verde. (Figura 2).

La anatomía de la hoja de *G. arborea* fue descrita por Chothani y Patel (2012) y se presentan las medidas de las hojas, los tejidos en la nervadura, el mesófilo, los cuales son similares a las imágenes obtenidas en el presente experimento. La presencia taninos en las Hc, Hm u Hg fue negativa, al igual que en la investigación realizada por Chothani y Patel (2012), quienes determinaron en forma cualitativa la presencia de taninos mediante mediciones con éter de petróleo, tolueno y cloroformo. Los resultados de Chothani y Patel (2012) fueron positivos con el empleo de acetato de etilo, metanol y agua.

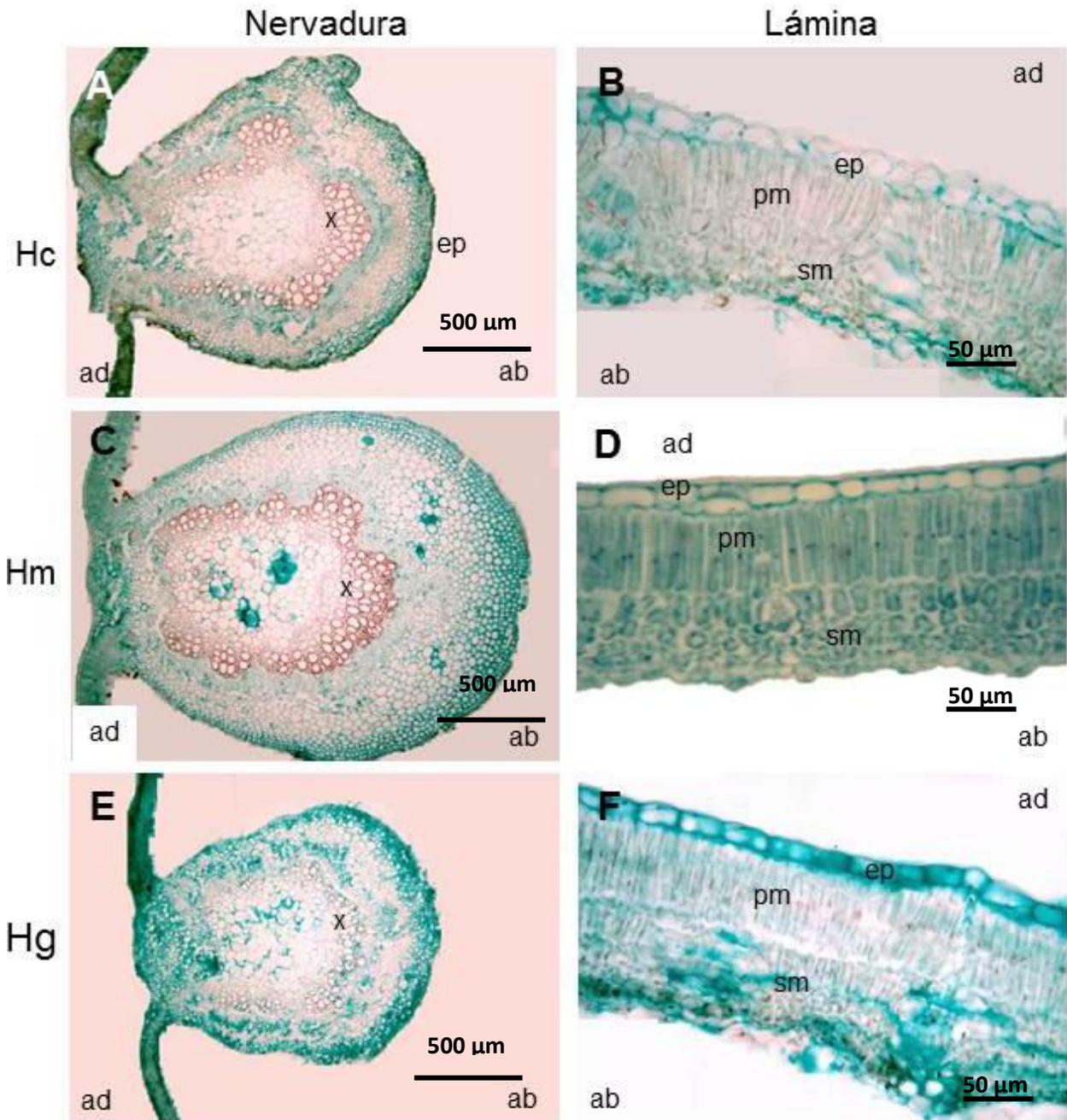


Figura 2. Anatomía en corte transversal de la nervadura central y lámina de *Gmelina arborea*. pm mesófilo en empalizada; sm mesófilo esponjoso; ad adaxial; ep epidermis; x xilema; ad adaxial; ab abaxial; Hc hoja chica; Hm hoja mediana; Hg hoja grande.

CONCLUSIONES

El área relativa con tejido lignificado fue mayor en la nervadura central de las hojas grandes y medianas. El contenido de lignina es diferente en las hojas y estas diferencias son causadas por la interacción de época y el tamaño de las mismas. Las diferencias en precipitación y temperatura en las épocas estudiadas pueden provocar cambios en la acumulación de lignina en las hojas. El área relativa de lignina fue mayor en la nervadura central de las Hg y Hm.

LITERATURA CITADA

- Akin, D. E. 1980. Attack on lignified grass cell walls by a facultatively anaerobic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 40(4):809–820.
- Akin, D. E. and Benner, R., 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(5):1117–1125.
- Akin, D.E. and Rigsby, L. L., 1985. Degradation of bermuda and orchard grass by species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(4):825–830.
- Broadhurst, R. B. and Jones, W. T. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 29:788-794.
- Balducci, L., Deslauris, A., Giovannelli, A., Rossi, S., and Ratgeber, C.B.K. 2013. Effects of temperature and water deficit on cambial activity and woody ring features in *Picea mariana* saplings. *Tree Physiology*. 33:1006-1017.
- Chothani, D. L. and Patel, N. M. 2012. Preliminary phytochemical screening, pharmacognostic physicochemical evaluation of leaf of *Gmelina arborea*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S1333-S1337.
- Chen, 2014. *Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice*. Chemical Industry and Springer Science. Chemical Industry Press, Beijing and Springer Science. pp: 73-141
- Datt, C., Datta, M. and Singh, N.P. 2008. Assessment of fodder quality of leaves of multipurpose trees in subtropical humid climate of India. *Journal of Forestry Research*. 19(3):209–214.
- Datta, M. and Singh, N. P. 2007. Growth characteristics of multipurpose tree species,

- crop productivity and soil properties in agroforestry systems under subtropical humid climate in India. *Journal of Forestry Research*. 18(4):261–270.
- Frei, M., 2013. Lignin: Characterization of a multifaceted crop component. *The Scientific World Journal*. 2013:1-25.
- Funada, R., Yamagishi, Y., Begum, S., Kudo, K., Nabeshima, E., Nugroho, W. D., 2016. “Xylogenesis in trees: from cambial cell division to cell death,” *In: Secondary Xylem Biology—Origins, Functions, and Applications*, eds S. Y. Kim, R. Funada, and A. P. Singh (Boston: Academic Press). pp:25–43.
- Garcia A. E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Quinta edición. Instituto de Geografía UNAM. 98 p.
- Huws, S. A., Mayorga, O. L., Theodorou, M. K., Kim E. J., Cookson, A. H., Newbold, J. C., and Kingston-Smith, A. 2014. Differential colonization of plant parts by rumen microbiota is likely to be to different forage chemistries. *Journal Microbial and Biochemical Technology*. 6(2):080-086.
- Johansen, D. A., 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Liang, E., Balducci, L., Ping, R., and Rossi, S. 2016. Xylogenesis and Moisture Stress. *In: Secondary Xylem Biology*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802185-9.00003-6>.
- Lowry, J. B., 1999. Deciduous trees: a dry season feed resource in Australian tropical woodlands?. *Tropical Grasslands*. 29:13–17.
- Mendivelso, H. A., Camarero, J.J., Gutiérrez, E., and Castaño-Naranjo, A. 2016. Climatic influences on leaf phenology, xylogenesis and radial stem changes at hourly to monthly scales in two tropical dry forests. *Agricultural and Forest Meteorology*. 216:20-36.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D. and Morrison, M. 2001. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(6):1294–1309.
- Moemeka, M. A., Okagbare, G. O. and Sorhue, G. U. 2014. The optimum feeding level of *Gmelina arborea* leaves supplemented with *Pennisetum purpureum* to West African Dwarf (WAD) goats. *Animal Biology and Animal Husbandry International*

- Journal of the Bioflux Society. 6(2):134–139.
- Nagpal, R., Kumar P. A., Paul S. J., and Singh K. 2011. *In vitro* fibrolytic potential of anaerobic rumen fungi from ruminants and non-ruminant herbivores. *Mycoscience*. 52(1):31–38.
- Patel, V., Pramod S., and Rao, K. S. 2014. Cambial activity, annual rhythm of xylem production in relation to phenology and climate factors and lignification pattern during xylogenesis in drumstick tree (*Moringa oleifera*). *Flora*.209:556-566.
- Pomar, E., Merino, F. and R. Barcelo, A. 2002. O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*. 220:17-28.
- Pumijumnong, N. and Buajan, S. 2013. Seasonal cambial activity of five tropical tree species in central Thailand. *Trees*. 27(2):409-417.
- Raffrenato, E., van Soest, P.J. and van Amburgh, M.E. 2009. Effect of lignin type on extent and rate of neutral detergent fibre digestion and potential energy yield. *South African Journal of Animal Sciences*. 39(SUPPL. 1):153–156.
- Rao, K.S. and Dave, Y.S. 1983. Seasonal histochemical changes in the cambium of *Tectona grandis* L.F. and *Gmelina arborea* Roxb. *Biologia Plantarum*. 25(4):241-245.
- Sandoval, Z. E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. UNAM. Instituto de Biología. Serie Cuadernos del Instituto de Biología. pp: 278.
- Valente, T. N. P., da Siva E.L., Gomes D. I., Barbacena W, R. dos Santos., Santos C. A., and de Castro S. S. 2016. Anatomical differences among forages with respect to nutrient availability for ruminants in the tropics: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 11(18):1585-1592. .
- Wang, K., Yang H., Yao X., Xu F., Sun R. 2012. Structural transformation of hemicelluloses and lignin from triploid poplar during acid-pretreatment based biorefinery process. *Bioresource Technology*. 116:99–106.
- Zavaleta-Mancera, H. A. and Mark Engleman E. 1994. Anatomy of the ovule and seed of *Manilkara zapota* (L.) van royen (*Sapotaceae*). *Phytomorphology*. 44(3 and 4):169-175.
- Zuhainis, S. W., Abdullah, N., Razak, A. A., Yin Wan, H. 2008. Effects of phenolic

monomers on the enzymes activities and volatile fatty acids production of *Neocallimastix frontalis* B9. *Anaerobe*. 14(2):118–122.

CAPÍTULO II. COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE TRES TAMAÑOS DE HOJAS DE *GMELINA ARBOREA* EN DOS ÉPOCAS DEL AÑO.

RESUMEN

En este experimento se determinó la composición química de hojas de *G. arborea* en dos épocas del año, lluvias y secas. Las variables fueron materia seca (MS), materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), cenizas, extracto etéreo (EE), lignina, proteína, celulosa y hemicelulosa. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial, el primer factor fue la época (seca y lluvia) y el segundo fue el tamaño de hoja (Hc: chicas, Hm: medianas y Hg: grandes), y se compararon las medias. Un segundo análisis se realizó para determinar la correlación de la temperatura y la precipitación pluvial. Los datos se analizaron con los procedimientos GLM y CORR de SAS. De acuerdo con los resultados, la época afectó el contenido de MS, FDN, lignina ($P < 0.001$) y celulosa ($P < 0.0001$); la proteína fue modificada por la época y el tamaño de hoja ($P < 0.001$); la interacción época por tamaño de hoja impactó el contenido de hemicelulosa ($P < 0.05$), pero no hubo efecto en cenizas, FDA, MO y EE. Los coeficientes de correlación y significancia de la precipitación pluvial con cada componente químico fueron: MS ($r = 0.38$, $P = 0.0002$), FDN ($r = -0.57$, $P < 0.0001$), FDA ($r = -0.034$, $P = 0.747$), lignina ($r = 0.29$, $P = 0.005$), MO ($r = 0.11$, $P = 0.314$), cenizas ($r = 0.13$, $P = 0.23$), proteína ($r = -0.82$, $P < 0.0001$), EE ($r = -0.05$, $P = 0.66$), hemicelulosa ($r = -0.68$, $P < 0.0001$) y celulosa ($r = -0.38$, $P = 0.0002$). Los coeficientes de correlación y significancia de la temperatura con cada componente químico fueron: MS ($r = -0.38$, $P = 0.0002$), FDN ($r = 0.57$, $P < 0.0001$), FDA ($r = 0.034$, $P = 0.747$), lignina ($r = -0.29$, $P = 0.0051$), cenizas ($r = -0.13$, $P = 0.23$), MO ($r = -0.11$, $P = 0.314$), proteína ($r = 0.82$, $P < 0.0001$), EE ($r = 0.05$, $P = 0.66$), hemicelulosa ($r = 0.68$, $P < 0.0001$) y celulosa ($r = 0.38$, $P = 0.0002$). Por lo anterior, se concluye que la composición química de las hojas de *G. arborea* es afectada por la época y tamaño de hoja, mientras que los efectos de la temperatura y precipitación dentro de la época son diferentes para cada componente químico.

ABSTRACT

This experiment was carried out to determine the chemical composition of leaves of *G. arborea* in two seasons of the year, rainy and dry. The variables were dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), ash, ether extract (EE), lignin, protein, cellulose, hemicellulose. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement, the first factor was the season (dry and rainy) and the second was the leaf size (Hc: small, Hm: medium and Hg: large), and means were compared. A second analysis was performed to determine the correlation of temperature and rainfall. The data were analyzed with SAS GLM and CORR procedures. According to the results, time affected the content of DM, NDF, lignin ($P < 0.001$) and cellulose ($P < 0.0001$); protein was modified by time and leaf size ($P < 0.001$); the epoch interaction by leaf size changed hemicellulose content ($P < 0.05$), but there was no effect on ashes, ADF, OM and EE. The coefficients of correlation and significance of rainfall with each chemical component were: DM ($r = 0.38$, $P = 0.0002$), NDF ($r = -0.57$, $P < 0.0001$), ADF ($r = -0.034$, $P = 0.747$), lignin ($r = 0.29$, $P = 0.005$), OM ($r = 0.11$, $P = 0.314$), ashes ($r = 0.13$, $P = 0.23$), protein ($r = -0.82$, $P < 0.0001$), EE ($r = -0.05$, $P = 0.66$), hemicellulose ($r = -0.68$, $P < 0.0001$) and cellulose ($r = -0.38$, $P = 0.0002$). The coefficients of correlation and significance of temperature with each chemical component were: DM ($r = -0.38$, $P = 0.0002$), ashes ($r = -0.13$, $P = 0.23$), NDF ($r = 0.57$, $P < 0.0001$), ADF ($r = 0.034$, $P = 0.747$), lignin ($r = -0.29$, $P < 0.0051$), OM ($r = -0.11$, $P = 0.314$), protein ($r = 0.82$, $P \leq 0.0001$); EE ($r = 0.05$, $P = 0.66$), hemicellulose ($r = 0.68$, $P < 0.0001$) and cellulose ($r = 0.38$, $P < 0.05$). Therefore, it is concluded that the chemical composition of the leaves of *G. arborea* is affected by the time and size of the leaf, whereas the effects of temperature and precipitation, within time, are different for each chemical component.

INTRODUCCIÓN

Los componentes químicos de un ingrediente se utilizan en el balanceo de dietas para rumiantes y el análisis químico es una metodología para conocer la composición química de los ingredientes. Para complementar el análisis, una metodología adicional es la determinación de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina (Van

Soest, 1963). Los componentes de un alimento están relacionados con el consumo y la degradación de las dietas o de las diferentes partes de los forrajes. Los factores antinutricionales de los alimentos se determinan con otras metodologías y se usan como control del porcentaje de adición en las dietas para no provocar daños en los animales. Además, algunos se relacionan con la salud (Ayyachamy *et al.*, 2013) y la calidad de la carne (Vasta *et al.*, 2013). La composición química tiene relación con la producción de metano en sistemas de producción en pastoreo (Hook *et al.*, 2010); y la utilización en las dietas de alimentos energéticos, proteínicos o ambos, para aumentar la producción de ácido propiónico, puede modificar la producción de metano por las arqueas del rumen. La composición de partes de la planta de *G. arborea* fue determinada por Mahadkar *et al.* (2012), y Zumbado *et al.* (2015), así como el consumo y la degradación (Aban y Bestil, 2013; Omokanye *et al.* 2014). Los resultados de algunas investigaciones muestran respuestas favorables de la utilización de hojas de *G. arborea* en la alimentación de cabras (Moemeka *et al.*, 2014; Nwakpu, 2014), ovinos (Aye *et al.*, 2016) y bovinos (Udeh *et al.*, 2013).

OBJETIVO

Analizar el efecto de tamaño de hoja y época (precipitación y temperatura) en la composición química de hojas de *G. arborea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras para la determinación de la composición química

Dos muestreos de hojas se realizaron en una plantación comercial en la comunidad de Ignacio Muñoz Zapotal, Municipio de Gutiérrez Zamora, Veracruz. Cinco árboles se seleccionaron al azar y de ellos se tomaron hojas de tres tamaños; hoja chica (Hc), mediana (Hm) y grande (Hg). El primer muestreo fue del 9 al 10 de mayo y el segundo se realizó el 17 de julio del 2015. Las muestras se transportaron en bolsas de papel y se secaron 24 h a 55 °C. Durante el secado las muestras se manipularon para favorecer el proceso y obtener una mezcla homogénea. Después se molieron a 1.0 mm en un molino Willey y se almacenaron para su análisis químico. Los análisis de la composición

química de las hojas se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados.

Datos climatológicos en el lugar de muestreo

Los valores de temperatura y humedad en los días de muestreo se observan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Valores de temperatura y precipitación en los días de muestreo de mayo y julio en el 2015.

Muestreo	Precipitación (mm d ⁻¹)	Temperatura (°C d ⁻¹)
Mayo (época seca)	0	27.83
Julio (época lluviosa)	28	25.5.

Fuente: CNA 2015.

Análisis químico y determinación de FDN, FDA y lignina

Las variables de respuesta fueron materia seca (MS), materia orgánica (MO), cenizas, extracto etéreo (EE), proteína (AOAC, 2005); fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina (Van Soest *et al.*, 1981), celulosa y hemicelulosa. El diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial y los factores fueron la época y el tamaño de la hoja. El modelo estadístico fue:

$$Y = \mu + E_i + Z_j + EZ_{ij} + \xi_{ij}$$

Donde μ = media poblacional; E_i = época (*i*...1 a 2); Z_j = tamaño (chica (1), mediana (2) y grande (3)); e interacción EZ_{ij} ; con 5 repeticiones por cada tamaño. Para el análisis estadístico se utilizaron los procedimientos GLM para el análisis de varianza y CORR para el análisis de correlación de SAS versión 9.3 (Statistical Analysis System, Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ambiente causa las diferencias en la composición química de los forrajes (Morhino *et al.*, 2006). El análisis de hojas de *G. arborea* incluye MS, FDN, MO, cenizas, aminoácidos y se determina para incluirlas en la alimentación de rumiantes (Moemeka *et al.*, 2014; Zumbado *et al.*, 2015). La composición de las hojas de *G. arborea* es diferente entre las épocas en las cuales se realice el análisis (Cuadro 11).

Las variables que tienen una relación significativa con la precipitación pluvial son MS, FDN, lignina, proteína, hemicelulosa y celulosa. En esta investigación la MS, FDN, lignina, proteína y celulosa fueron afectadas por la época del año (Cuadro 12). En la época seca *G. arborea* tiene crecimiento lento e inició la floración con la caída de sus hojas; en lluvias, el crecimiento de la hoja es mayor lo que implica un aumento en el contenido de MS. Las temperaturas altas reducen la acumulación de carbono cuando aumenta la fotorespiración, y se incrementa la fotosíntesis al reducirse la fotorespiración (DaMatta *et al.*, 2010). Los efectos de la sequía en el peso fresco y el contenido de humedad son causados por la disminución en la disponibilidad y transporte de los nutrientes del suelo hacia la parte aérea de la planta (Prasad *et al.*, 2016). La cantidad de fibra aumenta después de una precipitación y hay pérdidas de componentes solubles (Amit y Stuart, 2017). El contenido de ceniza fue mayor en la época de lluvias con respecto a la de seca, y en otras especies hay aumento de ceniza cuando las precipitaciones se incrementan. La acumulación de FDN, FDA y lignina ácido detergente es diferente entre las épocas y entre especies y, además, aumenta en época de lluvias en *Acacia nilotica*, *Dichrostachys cinera*, *Scutia myrtina* y *Chromolaena odorata*, pero la concentración de celulosa no cambia en la época de lluvias con respecto a de seca (Basha *et al.*, 2013). Pero en otras especies los contenidos de FDN aumentan cuando la precipitación se incrementa, mientras que el contenido de FDA disminuye (Abebe *et al.*, 2012). Respecto a la lignina, la precipitación pluvial afecta el contenido de compuestos fenólicos en algunas plantas (de Sousa *et al.*, 2015).

Lo anterior se puede explicar porque la precipitación cambia la composición química de la savia que se conduce en el xilema; aumenta la cantidad de *p*-cumárico, disminuye el ácido ferúlico y se reduce la actividad de la aniónica peroxidasa, lo cual es un indicador de que la sequía disminuye la síntesis de lignina en las plantas (Moura *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2013). Los resultados de lignina en la presente investigación son más bajos en la época de seca comparada con la época de lluvias (Cuadro 11). Cuando las plantas producen compuestos fenólicos tienen estrés causado por baja temperatura o precipitación, corte de alguna estructura, ataques de patógenos, y baja disponibilidad de nitrógeno, fósforo o hierro (Dixon y Paiva, 1995). La síntesis de proteínas aumenta durante los períodos de sequía para controlar el déficit hídrico de la

planta (Zargar *et al.*, 2017), y este incremento ocurre en *Acacia nilotica*, *Dichrostachys cinera*, *Scutia myrtina*, *Chromolaena odorata* al inicio o final de las lluvias, comparado con la época seca (Basha *et al.*, 2013). En *G. arborea* el contenido de proteínas aumenta en la época lluviosa lo que explica la correlación negativa entre contenido de proteína y precipitación (Cuadro 13). Los efectos de la temperatura y precipitación afectan la humedad del suelo, lo que causa un déficit en agua para la planta y disminuye el potencial de agua del xilema y la fotosíntesis; así, cambia la asimilación de C por la planta para la síntesis de proteínas, carbohidratos, y otros compuestos que modifican la composición química de las hojas (Corlett, 2016). Los resultados del análisis de correlación, en el presente experimento, indican que la precipitación pluvial tiene una correlación positiva débil con el contenido de MS, cenizas, lignina y MO, negativa moderada con FDN y hemicelulosa, negativa fuerte con la proteína y negativa débil con extracto etéreo y celulosa. La temperatura tiene una correlación inversa al efecto de la precipitación pluvial; sin embargo, aunque exista un cambio en la precipitación o temperatura, no siempre causará un cambio en las variables medidas (Cuadro 13).

Cuadro 11. Composición química de hojas de *Gmelina arborea* por época y tamaño de hoja (medias \pm desviación estándar).

Tamaño de hoja	Época	MS	Cenizas	FDN	FDA	Lignina	MO	Proteína	EE	Hemicelulosa	Celulosa
Hc		93.45 \pm 0.6	8.58 \pm 0.7	45.47\pm7.5	30.87 \pm 3.4	15.85 \pm 2.2	84.86 \pm 1.2	17.33\pm1.4	2.32 \pm 0.4	14.59\pm4.7	15.01 \pm 2.1
Hm	Seca	93.62 \pm 0.6	9.00 \pm 0.9	45.48\pm6.4	31.67 \pm 2.7	16.68 \pm 2.3	84.62 \pm 1.2	20.25\pm2.4	2.50 \pm 0.7	13.80\pm4.8	14.98 \pm 1.9
Hg		93.48 \pm 1.0	9.23 \pm 1.6	44.89\pm5.7	31.98\pm2.8	17.07 \pm 2.5	84.24 \pm 2.3	20.40\pm2.2	2.40 \pm 0.5	12.91\pm4.5	14.91 \pm 2.0
Hc		94.02\pm0.6	9.33 \pm 1.2	37.35 \pm 3.1	31.20 \pm 2.8	17.26\pm4.3	84.68 \pm 1.2	11.72 \pm 2.0	2.36 \pm 0.6	6.15 \pm 1.2	13.93 \pm 3.0
Hm	Lluvias	94.15\pm0.6	9.20 \pm 1.1	38.31 \pm 2.0	31.50\pm2.5	19.80\pm4.0	84.95 \pm 1.3	13.40 \pm 1.7	2.30 \pm 0.4	6.81 \pm 1.6	11.69 \pm 2.0
Hg		94.17\pm0.6	9.13 \pm 1.0	39.07 \pm 3.8	31.24 \pm 2.7	18.27\pm2.3	85.04 \pm 1.1	13.53 \pm 1.9	2.39 \pm 0.6	7.82 \pm 3.1	12.96 \pm 1.9

MS: materia seca; MO: materia orgánica; EE: extracto etéreo; Hc: hoja chica; Hm: hoja mediana; Hg: hoja grande.

Cuadro 12. Efectos y significancia por tamaño de hoja, época e interacción.

	MS	Cenizas	FDN	FDA	Lignina	MO	Proteína	EE	Hemicelulosa	Celulosa
Tamaño de hoja	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS
Época	**	NS	**	NS	**	NS	**	NS	**	***
Tamaño de hoja *Época	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS

Significancia: NS no significativo; *P < 0.05; **P < 0.001; ***P < 0.0001.

Cuadro 13. Coeficientes de correlación y efectos de las fuentes de variación para las variables determinadas con temperatura y precipitación.

	Precipitación pluvial	Temperatura	MS	Cenizas	FDN	FDA	Lignina	MO	Proteína	EE	Hemicelulosa	Celulosa
Precipitación pluvial	1	-1	0.3	0.12	-	-	0.29	0.11	-0.82	-	-0.68	-0.38
					0.57	0.03				0.046		
		***	**	NS	***	NS	**	NS	***	NS	***	**
Temperatura		1	-	-0.12	0.57	0.03	-0.29	-	0.82	0.046	0.68	0.38
			0.3					0.11				
			**	NS	***	NS	**	NS	***	NS	***	**

MS: materia seca; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; MO: materia orgánica; EE: extracto etéreo.

Significancia: NS no significativo; *P < 0.05; **P < 0.001; ***P < 0.0001.

CONCLUSIONES

La época tiene efectos en el contenido de algunos compuestos químicos de la hoja como materia seca, lignina proteína y hemicelulosa. Las diferencias están relacionadas de manera débil con los cambios en la temperatura y precipitación. La fibra detergente neutro y la proteína fueron mayores en la época seca.

LITERATURA CITADA

- Aban, L. M. and Bestil, L. C. 2013. *In situ* ruminal degradation of foliage with varying pH levels from selected trees and shrubs. *Phillippine Journal Veterinary Animal Science*. 39 (2):173-182.
- Abebe, A., Tolera A., Holand Oestein, Adnøy, T., and Olav Eik, L. 2012. Seasonal variation in nutritive value of some browse and grass species in Borana Rangeland, Southern Ethiopia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15:261-271.
- AOAC.2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*.18th Edition. Edited by William Horwitz.
- Avellán-Zumbado, M.J., Murillo-Cruz, R., Alvarado-Hernáned, A., and Ávila-Arias, C. 2015. Variación del contenido foliar de nutrientes de *Gmelina arborea* en los cantones de Osa , Golfito y Corredores, Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*. 49(1):1–15.
- Aye, P. A., Tawose, O. M. and State, E. 2016. Physiological responses of West African Dwarf sheep fed graded levels of *Gmelina arborea* leaves and cassava peel concentrates under different management systems. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 7(4):185–195.
- Ayyachamy, M., Cliffe F. E., Coyne, J. M., Collier, J., and Tuohy, G. M. 2013. Lignin: Untapped biopolymers in biomass conversion technologies. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 3(3):255–269.
- Basha, N. A. D., Scogings, P. F. and Nsahlai, I. V. 2013. Effects of season, browse species and polyethylene glycol addition on gas production kinetics of forage in the subhumid subtropical savannah. *South Africa. Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(6):1338-1348.

- Borges, L. L., Alves F. S., Sampio, L. B., Edemilson, C. C., Bara, F. M. M., Paula, J. S. 2013. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23(2):230-238.
- DaMatta, F. M., Grandis, A., Arenque, B. C., and Buckeridge M. S. 2010. Impacts of climate change on crop physiology and food quality. *Food Research International*. 43:1814-1823.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*. 7:1085-1097.
- Khanchi, A., and Birrel, S. J. 2017. Effect of rainfall and swath density on dry matter and composition change during drying of switchgrass and corn stover. *Biosystems Engineering*. 153:42-51.
- Mahadkar, S., Valvi, S., and Rathod, V. 2012. Nutritional assessment of some selected wild edible plants as a good source of mineral. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2(4):.468–472.
- Moemeka, M. A., Okagbare, G. O. and Sorhue, G. U. 2014. The optimum feeding level of *Gmelina arborea* leaves supplemented with *Pennisetum purpureum* to West African Dwarf (WAD) goats. *Animal Biology and Animal Husbandry, Internacional Journal of the Bioflux Society*. 6(2):134–139.
- Morhino, S. E., Fonseca P. C., Carneiro, M. A. A., and Moreira, W. S. C. 2006. Seasonal variation in the chemicals composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology*. 97(18):2402-2406.
- Moura, J. C. M. S. , Bonine, C. A. V., Viana, J. O. F., Dornelas, M. C., Mazzafera, P. 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal Integrative Plant Biology*. 52(4):360–376.
- Udeh, I., Isikwenu, J. O. and Obika, G. C. 2013. Forage species availability, preference, and grazing behavior of mutur and zebu cattle in Asaba, Delta State, Nigeria. *Online Journal of Animal and Feed Research*. 3(5):197–201.
- Vasta, V., Aouadi, D., Brogna, D. M. R. Scerra, M., Luciano, G., Priolo, A., and Salem, H. B. 2013. Effect of the dietary supplementation of essential oils from rosemary and artemisia on muscle fatty acids and volatile compound profiles in Barbarie lambs. *Meat Science*. 95:235-241.

CAPÍTULO III. DEGRADACIÓN *IN VITRO* Y VARIABLES FERMENTATIVAS HOJAS DE *GMELINA ARBOREA*.

RESUMEN

Esta investigación se realizó con hojas de *Gmelia arborea* para evaluar el efecto del tamaño de la hoja y tiempo de incubación en la degradación *in vitro*, algunas variables fermentativas, y producción de biogás, CH₄ y CO₂. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial, 2 épocas (seca y lluvia) y 3 tamaños de hojas (chica Hc, mediana Hm, grande Hg), y con 5 repeticiones. Los datos se analizaron con los procedimientos GLM y CORR de SAS. Los resultados muestran que en la época seca la DIVMS fue mayor a la de la época de lluvias (P < 0.0001) en los tres tamaños de hoja. El porcentaje de metano fue menor en la época de lluvia (P < 0.0001), excepto para la Hc. La producción de biogás fue similar entre las dos épocas evaluadas, excepto para la Hc. La interacción de época por tamaño de hoja afectó la concentración de ácido acético y la más alta fue para la hoja chica en la época de lluvias (P < 0.0001). En la concentración de ácido butírico hubo efecto de la interacción época por tamaño de hoja y las Hc y Hm tuvieron las concentraciones más bajas en la época de seca (P < 0.0001). La producción de metano (mL⁻¹ MS) fue mayor para las Hg en la época de seca y Hc en la de lluvias, y la interacción de época por tamaño de hoja fue significativa (P < 0.0001). Para el total de AGV y de N-NH₃ no hubo diferencia estadística (P > 0.05). De acuerdo con estos resultados se puede concluir que la época, la hoja y la interacción época por hoja tienen efectos diferentes en las variables evaluadas en esta investigación.

ABSTRACT

This research was conducted with *Gmelia arborea* leaves to evaluate the effect of leaf size and incubation time on *in vitro* degradation, fermentative variables, and production of biogas, CH₄ and CO₂. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement, 2 seasons (dry and rain) and 3 leaf sizes (small Hc, medium H, large Hg), and with 5 replications. Data were analyzed with GLM and CORR procedures of SAS. The results show that IVDMD was higher in the dry season, as compared to rain season, for the three leaf sizes (P < 0.0001). Methane

percentage was lower during the rain season ($P < 0.0001$), except for Hc. Biogas production was similar between the two seasons, except for Hc. The season by leaf size affected acetic acid concentration and the highest was for small leaf during the rain season ($P < 0.0001$). Butyric acid concentration showed an effect of the season by leaf size interaction and Hc and Hm showed the lower concentrations during the dry season ($P < 0.0001$). Methane production ($\text{mL}^{-1} \text{DM}$) was higher for Hg during the dry season and Hc during the rain season, and the season by leaf size interaction was significant ($P < 0.0001$). There was no statistical difference for total VFA and $\text{NH}_3\text{-N}$ ($P > 0.05$). According to these results, it may be concluded that the season, the leaf and the interaction season by leaf have different effects on the variables evaluated in this research.

INTRODUCCIÓN

La sombra que proporcionan los arboles disminuye problemas de fotosensibilidad en el ganado causados por el consumo de *Brachiaria decumbens* (De Oliveira 2013), *Brachiaria brizantha* (Riet-Correa, 2011) y *Panicum virgatum* L. (Lee *et al.*, 2009) por los rumiantes. Los arboles mejoran el índice productivo del suelo cuando se combinan con *G. arborea* y *Panicum maximun* (Kaleeswari, 2015). La respuesta a las concentraciones de CO_2 ambiental es diferente entre especies y *G. arborea* tiene un rápido crecimiento con altas concentraciones ambientales de CO_2 (Rasineni *et al.*, 2011). Algunos de los compuestos químicos de las hojas de los árboles son degradados por la microbiota ruminal durante la fermentación anaerobia de la materia orgánica y proporcionan diferentes productos utilizables para la producción de carne, leche u otros subproductos de rumiantes en unidades de producción comerciales. Los ácidos grasos volátiles (AGV) son la principal fuente de energía para los rumiantes y en el rumen la proporción de los principales AGV y la producción de CH_4 entérico están relacionadas. La disminución en la producción de este gas se basa en obtener la máxima eficiencia en la utilización del alimento por los rumiantes en pastoreo. La producción de CH_4 entérico está relacionada con el consumo de alimento, tipo de carbohidratos y manipulación de la microbiota ruminal (Kumar *et al.*, 2014). El ácido propiónico genera la mayor eficiencia en la utilización del alimento y con la menor generación de CH_4 entérico; una eficiencia alta implica que las pérdidas de energía sean menos del 12 %. Las

tecnologías para disminuir la producción de CH₄ ruminal son varias (Marín *et al.*, 2015), y una de ellas es la modificación de la fermentación utilizando hojas de árboles con contenidos de aceites esenciales, saponinas o taninos. Las diferencias en la producción de metano están más relacionadas con el forraje que con el inóculo; algunas de las especies evaluadas son *Moringa oleifera*, *Millettia griffoniana*, *Enterolobium cyclocarpum* y *G. arborea* y los inóculos fueron de bovinos, ovinos y caprinos (Aderinboye *et al.*, 2016). Las hojas de *G. arborea* consumidas por bovinos, ovinos y caprinos tienen efectos positivos en la ganancia de peso, sin afectar los índices hematológicos en la sangre. Por lo tanto, el objetivo de este experimento fue evaluar la degradación *in vitro* de la materia seca y variables fermentativas de tres tamaños de hojas de *G. arborea* a 0 y 72 h, para una mejor utilización en la alimentación de rumiantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de muestras compuestas

Las muestras se obtuvieron de 15 árboles de una explotación comercial en la comunidad de Ignacio Muñoz Zapotal, Municipio de Gutiérrez Zamora, Veracruz. Las hojas se clasificaron en chicas (Hc), medianas (Hm) y grandes (Hg), se secaron 24 h a 55 °C, se molieron y se pasaron por un tamiz para un tamaño de partícula de 1 mm. Después se realizó una mezcla compuesta por época para cada tamaño de hoja, y al pesar 1.002 ± 0.002 g se obtuvieron en promedio 15.03 g de muestra compuesta para el análisis.

Medio de cultivo

El medio utilizado fue para bacterias celulolíticas sin fuente de energía, de acuerdo con el procedimiento descrito por Hungate (1969) y Cobos y Yokohama (1995). El contenido del medio se describe en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Composición del medio de cultivo anaerobio para bacterias celulolíticas.

Componente	Unidad	Concentración, 100 mL
Agua destilada	mL	52.6

Líquido ruminal clarificado (LRC) ^a	mL	30
Solución mineral I ^b	mL	5
Solución mineral II ^c	mL	5
Resarzurina 0.1 % solución	mL	0.1
Peptona de soya (Bioxon)	g	0.2
Extracto de levadura (Sigma Aldrich; Sigma Cell culture)	g	0.1
Carbonato de sodio 8 %	mL	5
Solución cisteína sulfido ^d	mL	2
Muestra	g	0.5

Preparación de los reactivos utilizados en el medio de cultivo

^a El líquido ruminal fresco se obtuvo de una vaca Jersey después de la alimentación a las 08:00 h, se centrifugó a 12880 g por 10 min a 4 °C y se esterilizó 20 min a 15 psi y 121 °C.

^b Contiene K₂HPO₄ 6 g en 1000 mL de agua destilada.

^c Contiene KH₂PO₄ 6 g, (NH₄)₂SO₄ 6 g, NaCl 12 g; MgSO₄ 2.45 g; CaCl-H₂O 1.6 en 1000 mL de agua destilada.

^d 2.5 g L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH), más 2.5 g de Na₂S-9H₂O. La mezcla se aforó a 100 mL con H₂O destilada.

Obtención del inóculo ruminal

El líquido ruminal se obtuvo de una vaca Jersey alimentada con una dieta de avena, alfalfa y concentrado, 3 h después de comer. Este líquido se almacenó en viales de 85 mL, se centrifugó y se evitó su oxigenación. Después, las muestras se colocaron en un termo a 39 °C, se llevaron al laboratorio, se pesaron (báscula model EQ-5/0) y centrifugaron a 1159.2 g por 3 min.

Variables evaluadas

Las variables fueron degradación *in vitro* de la MS (DIVMS), ácidos grasos volátiles (AGV) (Erwin *et al.*, 1969), nitrógeno amoniacal (N-NH₃; McCullough, 1967), y producción de biogás, CO₂ y CH₄ (Theodorou *et al.*, 1994).

Degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

La DIVMS de los tres tamaños de hoja se determinó a 72 h, las muestras se incubaron a 39 °C en un baño maría, el agua cubrió un poco más del nivel del medio de cultivo en el biodigestor durante el experimento, cada biodigestor contenía 45 mL de medio de cultivo, 5 mL de líquido ruminal centrifugado y 0.4 g de muestra; dentro de los biofermentadores hubo condiciones de anaerobiosis. Para calcular la degradación la MS se usaron crisoles Gooch de vidrio Pirex de 50 mL, los cuales se incineraron a 500 °C durante 20 min en una mufla Lindberg Blue M, para eliminar otros compuestos presentes en el crisol antes de filtrar el contenido de los biodigestores, después del periodo de incubación, y se pesaron vacíos. Al terminar la degradación los contenidos de los biodigestores se filtraron y secaron dentro de los crisoles a 100 °C durante 24 h y se obtuvo la MS no degradada más el peso de los crisoles. La diferencia de los crisoles con muestras no degradadas menos el crisol solo se consideró como el peso de la muestra sin degradar. Después se calculó el porcentaje de degradación de la muestra inicial.

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

Las muestras para la determinación de N-NH₃ después del período de incubación (72 h) de los tres tamaños de hoja, se obtuvieron de la parte líquida de los biodigestores con una relación de 4 mL de líquido del biodigestor y 1 mL de ácido metafosfórico. El N-NH₃ se cuantificó por colorimetría utilizando un espectrofotómetro modelo 8453 (marca Agilent Technologies), a una longitud de onda de 630 nm y se utilizó el procedimiento propuesto por McCullough (1967). El análisis se realizó por duplicado por cada tamaño y repetición de las hojas.

Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV)

La concentración de AGV (acético, propiónico y butírico) se determinó para los tres tamaños de hojas después de acidificar una muestra del biodigestor con ácido metafosfórico en una proporción de 4:1 (mL muestra: mL ácido metafosfórico) a las 72 h de incubación. La muestra se centrifugó a $18327 \times g$ por 5 min (centrifugadora EBA21 Hettich), se recolectó 1 mL de sobrenadante en viales eppendorff de 2 mL y se mantuvo congelado a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. Después se tomó la mayor cantidad del sobrenadante con una pipeta y se colocó en los viales para cromatografía. El contenido de AGV de las muestras se midió por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961), inyectando 300 μL en un cromatógrafo de gases (modelo Clarus 500 Perkin Elmer Instruments) en el canal A, con una temperatura de horno en etapas de $115 \text{ }^\circ\text{C}$ a 0.25 min, $125 \text{ }^\circ\text{C}$ a 0.5 min y $130 \text{ }^\circ\text{C}$ a 1 min, las presiones fueron 60 psi N, 60 psi H y 40 psi aire. El flujo de gas fue 15 mL min^{-1} y se usó una columna capilar y un detector de ionización de flama.

Medición de la producción de biogás, CO_2 y CH_4

Las muestras para el análisis de CO_2 y CH_4 se tomaron de la parte no líquida del biodigestor, 500 μL con una jeringa de 1 mL y se inyectaron 300 μL en un cromatógrafo de gases (modelo Clarus 500 Perkin Elmer Instruments) usando el canal B con las siguientes condiciones de temperatura: de horno $80 \text{ }^\circ\text{C}$, de la columna empacada $170 \text{ }^\circ\text{C}$ y del detector de conductividad térmica $130 \text{ }^\circ\text{C}$, con un flujo de gas de 23 mL min^{-1} .

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial y el análisis estadístico se realizó con el procedimiento GLIMMIX SAS versión 9.3 con el modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + (TA)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = variable de respuesta; μ = media poblacional; T_i = efecto de la época ($T:2$), A_j = efecto del tamaño de hoja ($A:3$); $i=1,2,\dots,3$ por cada época. (TA) = efecto de la interacción época por tamaño de hoja; ξ_{ijk} = error experimental. Con 5 repeticiones por combinación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

La DIVMS de hojas de *G. arborea* (Cuadro 15), en este experimento, es más alta que la reportada por Datt *et al.* (2008) (41.8 %), por Ahamefule *et al.* (2006) (49.46 %) y Sosa-Rubio *et al.* (2004) (43 %). La degradación *in vivo* o *in situ* es superior a la encontrada en experimentos *in vitro*: 85.9 % de degradación *in situ* en novillos y con hojas caídas (Lowry, 1995), 61.01% degradación *in vivo* en cabras y con hojas (Burte *et al.*, 2006), 86.67 % degradación *in vivo* en cabras y con hojas verdes y secas (Abdu *et al.*, (2012), 71.1 a 78.6 % degradación *in vivo* en cabras y con hojas (Moemeka *et al.*, 2014). En el presente experimento, la degradación de los tres tamaños de hoja fue afectada por la época ($P < 0.0001$) y por el tamaño de hoja ($P < 0.001$; Cuadro 16).

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

El N-NH₃ es un indicador de la cantidad de nitrógeno dietario convertido en proteína microbiana (Firkins *et al.*, 2007), la cual sale del rumen, entra al intestino delgado y proporciona 50 a 80 % de los requerimientos de proteína del rumiante (Bach *et al.*, 2005). Una concentración mayor a 5 mg dL⁻¹ de N-NH₃ en el rumen beneficia el crecimiento microbiano y sería la óptima para este proceso (Firkins *et al.*, 2007). El contenido menor de N-NH₃ en la presente investigación fue 24.34 mg dL⁻¹ en la hoja mediana en la época de lluvias y el mayor fue para las hojas grandes con 29.67 mg dL⁻¹ en la hoja grande en la época seca, lo cual es mayor a lo requerido para mantener el crecimiento microbiano (Cuadro 15). No hubo diferencias significativas ($P > 0.05$; Cuadro 16) entre los tres tamaños de hojas. Un objetivo importante en la nutrición de rumiantes es maximizar el crecimiento microbiano para una mayor captura de la proteína degradable en las células microbianas del rumen. La captura de proteína proporciona aminoácidos y reduce la pérdida de nitrógeno porque una mayor cantidad fluye hacia intestino delgado (Bach *et al.*, 2005).

Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV)

La fuente de energía para los rumiantes son los AGV y los resultados de esta investigación (Cuadro 15) son comparables con los reportados para una dieta con maíz

y concentrado (1:1), o una dieta de concentrado y ensilado de maíz (3:1), o una dieta con heno de ballico y concentrado (1:9) (France y Dijkstra 2005). Las concentraciones totales de AGV no fueron afectadas por la época, hoja o la interacción de éstas ($P > 0.05$; Cuadro 16). El efecto de la interacción época por hoja fue significativa para ácido acético y ácido butírico ($P < 0.05$), pero no para ácido propiónico, aunque la época sí afectó la concentración de ácido propiónico ($P < 0.05$). La modificación de la producción de AGV durante la fermentación ruminal es una estrategia para disminuir la producción de metano, para lo cual aumenta la producción de ácido propiónico y disminuye la del ácido acético (Wanapat *et al.*, 2015).

Medición de la producción de biogás, CO₂ y CH₄

Biogás

La producción de biogás implica hidrólisis, fermentación, acetogénesis y metanogénesis del sustrato, según sus características físicas y químicas (Liu *et al.*, 2017). La composición del biogás es CO₂ (55 a 80 %), CH₄ (20-45 %) y otros gases trazas. El biogás expulsado del rumen afecta el ambiente y genera pérdidas económicas en la producción de rumiantes. En el presente estudio la época afectó la producción de biogás (Cuadro 15; Cuadro 16, $P < 0.05$), pero no hubo efecto del tipo de hoja ni de la interacción época por tipo de hoja. La composición química y degradación de las hojas causa las diferencias en la producción de biogás.

CH₄ y CO₂

En el presente experimento las producciones mayores de metano fueron para las hojas menos digestibles (Cuadro 15), lo cual puede relacionarse con el contenido fermentable de las hojas (Hatew *et al.*, 2015); además, hubo un efecto de la interacción época por hoja (Cuadro 16; $P < 0.0001$). Según Bodas *et al.* (2012) y Zhong R-zhen *et al.* (2016), la composición de las dietas, el contenido de taninos, el procesamiento de los alimentos y la frecuencia de alimentación influyen en las emisiones de metano. Las hojas de algunos árboles se usan para reducir las emisiones de metano en los sistemas de producción de rumiantes en granjas pequeñas de países en vías de desarrollo (Pal *et al.*, 2015; Aderinboye *et al.*, 2016). Estas hojas tienen efectos en la disminución de la población de protozoarios, cambios en la producción de ácido propiónico o en la

degradación de la fibra (McAllister y Newbold, 2008). Hay pocos estudios acerca del metano producido durante la digestión de hojas de *G. arborea*; al respecto, Aderinboye *et al.* (2016) mencionan que la producción está relacionada más con las especie vegetal que con la fuente del inóculo ruminal.

Cuadro 15. DIVMS y variables fermentativas considerando tamaño de hoja y época.

Hoja	Época	DIVMS	Biogás	Metano	CO ₂	Metano	CO ₂	Total AGV	Acético	Propiónico	Butírico	Relación acético / propiónico	N-NH ₃
	a	%	mL	%		mLg ⁻¹	MS	mmol	mmol	100 ⁻¹	mmol		mg dL ⁻¹
Chica	1*	55.88b	33.48a	10.12b	89.88a	2.47b	31.00a	36.8	57.35a	33.58b	9.08c	1.73a	27.58
Mediana		61.55a	31.25a	10.11b	89.89a	3.1ab	28.09a	33.87	53.17b	37.64a	9.18c	1.42b	24.56
Grande		63.26a	43.46a	10.64b	89.35a	4.53a	38.93a	34.44	50.51c	38.19a	11.29a	1.32b	29.67
Chica	2*	45.72d	32.59a	17.48a	82.52b	4.35a	26.89b	33.26	50.19b	34.2b	15.61a	1.47b	25.46
Mediana		48.95d	12.88b	17.89a	82.11b	2.29c	10.58b	33.19	47.96c	36.05ba	15.98a	1.33b	24.34
Grande		50.24c	12.552b	10.64b	89.54a	1.38c	11.21b	37.26	51.11b	34.1b	14.79a	1.49b	24.84
EEM		1.26	2.94	0.67	0.67	0.3	2.65	0.8	0.7	0.51	0.58	0.04	0.85
-2 res log likelihood		122.71	199.6	88.03	85.94	89.58	193.74	149.3	125.35	118.82	97.66	-6.16	-148.47

*1 Seca; 2 Lluvias. Medias en la misma columna son diferente letra son diferentes (P < 0.05).

Cuadro 16. Valores de probabilidad de los efectos fijos e interacciones por cada variable.

Factor	Degradación	Biogás	Metano	CO ₂	Metano	CO ₂	Total AGV	Acético	Propiónico	Butírico	Acético/propiónico	N-N
	%	mL	%		mLg ⁻¹	MS	mmol	mmol 100 ⁻¹ mmol				mg d
Época	***	*	***	***	NS	*	NS	*	*	***	NS	NS
Hoja	**	NS	***	***	NS	NS	NS	*	NS	NS	*	NS
Época x hoja	NS	NS	***	***	*	NS	NS	*	NS	*	NS	NS

Significancia: NS no significativo; *P < 0.05; **P < 0.001; ***P < 0.0001.

CONCLUSION

Las bacterias ruminales utilizan la hoja de *Gmelina arborea* para su crecimiento dentro de los biodigestores. Los valores obtenidos de la degradación *in vitro* muestran que la producción de metano, nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles originados por las bacterias son condiciones favorables para avalar su crecimiento.

LITERATURA CITADA

- Aderinboye, R. Y., Akinlolu, A. O., Adeleke, M. A., Najeem, G. O., Ojo, V. O. A., O. A. Isah, and Babayemi, O. J. 2016. *In vitro* gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inoculum. Slovak Journal of Animal Science. 49 (1):32-43.
- Abdu, S. B., Hasan M. R., Adamu, H. Y., Yashim, S. M., Abdullahi, M. J. 2012. Intake, nutrient digestibility and nitrogen balance of *Acacia auriculata*, *Gmelina arborea*, *Albizia lebbek* and *Butryospermum parkii* by Yankasa bucks. Iranian Journal of Applied Animal Science. 2(2):121–125.
- Aderinboye, R.Y., Akinlolu, A. O., Adeleke, M. A., Nejeem, G. O., and Ojo, V.O.A. 2016. *In vitro* gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inoculum. Slovak Journal of Animal Science. 49(1): 32–43.
- Ahamefule, F. O., Obua, B. E., Ibeawuchi, J. A., and Udosen, N. R. 2006. The nutritive value of some plants browsed by cattle in Umudike, Southeastern Nigeria. Pakistan Journal of Nutrition. 5(5):404–409.
- Bach, A., Calsamiglia, S. and Stern, M. D., 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science. 88: E9–E21.
- Bodas, R., Prieto N., Gracia-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., and López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Animal Feed Science and Technology. 176:78-83.
- Burte, R.G., Raut, M. Y., Jadhav, S.S., Wadekar, V.V. and Yadav, D.N. 2006. Nutritive value of shivan (*Gmelina arborea*) tree leaves for goats. Indian Journal of Small Ruminants. 12(1):110-112.
- Cobos, P., M. A. and Yokohama, M. T. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *ruminatum*: Colonotation and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by

- scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning*. R.J. Wallace y A. Lahlou-Kassi (eds). International Livestock Research Institute (IRLI). pp: 151-161.
- Erwin, E. S. G. J. M., and Emery E. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. 44:1768-1771.
- France, J. and Dijkstra, J. 2005. Volatile fatty acid production. *In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. Edited by: J. Dijkstra, Forbes J.M. and France J. Second edition. CABI Publishing. pp: 157- 175.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation strict anaerobes. *In: Methods in Microbiology*. Norris, J.R. and D.W. Robins (Eds). Academic Press Inc. New York. Pp- 117-132.
- Kayode, J. and Kayode, G. M. 2008. Ethnomedicinal survey of botanicals used in treating sexually diseases in Ekiti State, Nigeria. *Ethnobotanical Leaflets* 12:44-55.
- Datt, C., Datta, M. and Singh, N. P. 2008. Assessment of fodder quality of leaves of multipurpose trees in subtropical humid climate of India. *Journal of Forestry Research*. 19(3):209–214.
- Firkins, J.L., Yu, Z., and Morrison, M. 2007. Ruminant nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. *Journal of Dairy Science*. 90(Suppl 1): E1–E16.
- Hatew, B., Cone J. W., Pellikan, W. F., Podesta, S. C., Bannink, A., Hendriks, W. H. and Dijkstra, J. 2015. Relationship between *in vitro* and *in vivo* methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 202:20-31.
- Kumar, S., Choudhury P. K., Carro, M. D., Griffith, G. W., Dagar, S. S., Puniya, M., Calabro, S., Rao R S., Dhewa T., Chandra U R., Kumar S. S., S K., Wanapat, M., and Kumar, P. A. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(1):31–44.
- Liu Tong, Li Sun., Muller, B., and Schnürer, A. 2017. Importance of inoculum source and initial community structure for biogas production from agricultural substrates. *Bioresource Technology*. 245: 768-777.
- Lowry, J.B., 1995. Deciduous trees: a dry season feed resource in Australian tropical woodlots? *Tropical Grasslands*. 29:13–17.

- Marín, A.L.M., Nuñez, S. N., Gaezón, S. A. I., Peña, B. F., Domenech, G. V., and Hernández, R. F. 2015. Metaanálisis del uso de semillas y aceites en la dieta de ovejas y cabras. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 50(9):821–828.
- McAllister, T. A. and Newbold, C. J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48(1–2):7–13.
- Moemeka, M. A., Okagbare, G. O. and Sorhue, G. U. 2014. The optimum feeding level of *Gmelina arborea* leaves supplemented with *Pennisetum purpureum* to West African Dwarf (WAD) goats. *Animal Biology and Animal Husbandry. Internacional Journal of the Bioflux Society*. 6(2):134–139.
- Pal, K., Patra A. K., Sahoo A., Soren N. M. 2015. Effects of nitrate and fumarate in tree leaves-based diets on nutrient utilization, rumen fermentation, microbial protein supply and blood profiles in sheep. *Livestock Science*. 172:5-15.
- Ramirez, L- A., Navarro, G. E., Pérez, O. A., Cetina A. V. M. 2011. Organization experience for a *Pinus Oaxacana* Mirov. reforestation in degraded soils of the oaxacan Mixteca. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 2(7):57-69.
- Rasineni, G. K., Guha, A., and Reddy, A. R. 2011. Responses of *Gmelina arborea*, a tropical deciduous tree species, to elevated atmospheric CO₂: growth, biomass productivity and carbon sequestration efficacy. *Plant Science*. 181:428.438.
- Rong-zhen, Z., Fang Yi, Sun Hai-xia, Wang Min, Zhou Dao-wei. 2016. Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an *in vitro* gas production technique. *Journal of Integrative Agriculture*. 16 (2):414-423.
- Sosa-Rubio, E.E., Pérez, R. D., Ortega, R. D., and Zapata, B. G. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. *Técnica Pecuaria México*. 42(2):129–144.
- Wanapat, M., Cherdthong A., Phesatcha K. and Kang S. 2015. Dietary sources and their effect on animal production and environmental sustainability. *Animal Nutrition*. 1:96-108.

CAPITULO IV. ADHERENCIA DE BACTERIAS RUMINALES A LA PARED CELULAR Y DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE TEJIDOS DE *GMELINA ARBOREA* EN DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN.

RESUMEN

El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de los tejidos foliares de *Gmelina arborea* en la adhesión de bacterias ruminales durante la degradación *in vitro* de la pared celular en un medio anaerobio celulolítico sin fuente de energía. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial, con cuatro tiempos de incubación (0, 3, 24 y 72 h) y tres tamaños de hojas: chicas (Hc), medianas (Hm) y grandes (Hg). El análisis de los datos se realizó con el procedimiento GLIMMIX. Los tejidos evaluados fueron xilema, floema, mesófilo en empalizada, mesófilo esponjoso, epidermis adaxial y abaxial de la nervadura y de la lámina, en los cuales se contaron las bacterias totales, consorcios bacterianos, cocos y espirilos adheridos. En las Hm y Hg existió una mayor cantidad de bacterias adheridas, con respecto a las Hc. El floema desapareció en la nervadura central a las 72 h en las Hg y Hm, pero no en las Hc. En el mesófilo en empalizada de las hojas grandes existió una mayor cantidad de bacterias totales, cocos, bacilos y espirilos, pero la cantidad de bacterias fue mayor en la epidermis adaxial de la lámina, respecto a las hojas medianas y chicas. Las conclusiones de este experimento son que las diferencias en la degradación de los tejidos se pueden explicar por la adhesión de las bacterias a esos tejidos. La degradación de floema en Hg y Hm puede ser la causa de las diferencias en la degradabilidad *in vitro* de la materia seca. La cuantificación de las bacterias adheridas a partículas de alimento permitió conocer estructuras de las hojas de *Gmelina arborea* degradadas por esas bacterias en diferentes tiempos de incubación. Algunos de los tejidos evaluados presentaron consorcios bacterianos adheridos a su estructura.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to study the effect of the *Gmelina arborea* leaf tissues on the adhesion of ruminal bacteria during the *in vitro* degradation of the cell wall in an anaerobic cellulolytic medium without energy source. The experimental design was completely randomized with a factorial arrangement, four incubation times (0, 3, 24 and

72 h) and three leaf sizes: small (Hc), medium (Hm) and large (Hg). The analysis of the data was performed with the GLIMMIX procedure. The tissues evaluated were xylem, phloem, palisaded mesophyll, spongy mesophyll, adaxial and abaxial epidermis of the rib and lamina, in which the total bacteria, bacterial consortia, cocci and spiroids were counted. In Hm and Hg leaves there were greater amounts of bacteria adhered, with respect to the small leaves. The phloem disappeared in the central vein at 72 h in the Hg and Hm, but not in the Hc. In the mesophyll in palisades of the large leaves there were larger amounts of total bacteria, cocci, bacilli and spirillae, but amounts of bacteria were greater in the adaxial epidermis of the lamina, as compared to the medium and small leaves. The conclusions of this experiment are that the differences in the degradation of the tissues can be explained by the adhesion of the bacteria to these tissues. The degradation of phloem in Hg and Hm may be the cause of the differences for the *in vitro* dry matter degradation. The quantification of the bacteria adhered to food particles allowed to know structures of the leaves of *Gmelina arborea* degraded by these bacteria in different incubation times. Some of the evaluated tissues showed bacterial consortium adhered to its structure.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ruminales se adhieren a diferentes partes de estructuras de los alimentos que tienen sitios activos, como dominios de proteína y minerales como Ca y Mg (Miron *et al.*, 2001). La observación de las bacterias adheridas a partículas de alimento es importante para explicar el proceso de degradación de la MS de alimentos. La Microscopía Electrónica de Barrido es una herramienta de alta resolución (3 nm) que permite observar y caracterizar con detalle como se adhieren las bacterias a partículas de alimento (Miron *et al.*, 2001). Los mecanismos de adhesión relacionados con la degradación de materiales lignocelulolíticos son diversos y dependen de la estructura de los ingredientes usados en la alimentación de rumiantes. Los estudios realizados para medir y observar la adherencia de bacterias ruminales a partículas de leguminosas y gramíneas mostraron diferencias en la degradación de tejidos celulares (Akin, 1988; Akin y Benner 1988; Akin y Borneman, 1990). Los resultados de las investigaciones para evaluar la degradación *in situ*, *in vitro* e *in vivo* con diferente madurez de la hoja, son diversos; sin embargo, no abordan la descripción de la adherencia de bacterias al

tejido y su relación con la degradación. Por lo anterior, la presente investigación pretende describir la adherencia bacteriana a hojas de *Gemelina arborea* de tres tamaños de hojas (Hg, Hm y Hc) y su degradación en dos épocas climáticas, de lluvia y seca.

OBJETIVO

Descripción de la adherencia de bacterias ruminales al tejido foliar de hojas chicas, medianas y grandes de *G. arborea* durante un periodo de degradación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras vegetales

Las hojas verdes se obtuvieron de una plantación comercial de *G. arborea* en la comunidad de Ignacio Muñoz Zapotal, Municipio de Gutiérrez Zamora, Veracruz, el 16 de abril de 2017. En esa plantación se obtuvieron 45 hojas verdes (15 chicas, 15 medianas y 15 grandes) y en el Laboratorio de Microbiología y Genética Microbiana del Colegio de Postgraduados se cortaron cuadros de aproximadamente 3 cm² de la parte central de la hoja (Imagen 3). La nervadura se separó de la lámina foliar y se incluyó también en el análisis de degradación. Las muestras de hojas se cortaron en fragmentos de 25 mm². Los fragmentos de cada hoja fueron de 5 mm x 5 mm, los cortes tenían un área de 25 mm²; los cortes de la lámina se prensaron y secaron durante 24 h a 50°C; los cortes de la nervadura se secaron sin prensar. La nervadura se cortó sin la lámina foliar con 0.5 cm de longitud.

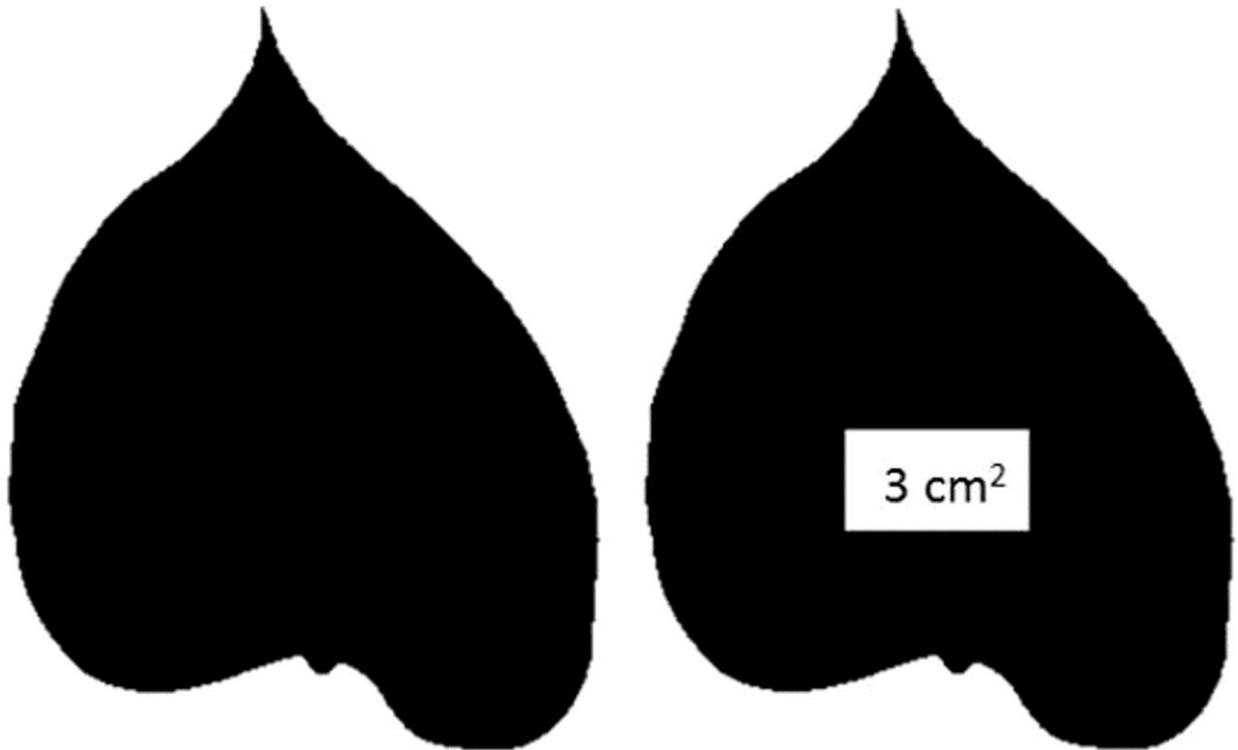


Imagen 3. Descripción del corte realizado en el centro de la hoja.

Componentes del medio de cultivo.

El medio de cultivo (Cuadro 17) se realizó considerando los procedimientos de Hungate (1969) y Cobos y Yokohama (1995).

Cuadro 17. Componentes del medio de cultivo para bacterias celulolíticas.

Componente	Unidad	Concentración en 100 mL
Agua destilada	mL	52.6
Líquido ruminal clarificado (LRC)*	mL	30
Solución mineral I	mL	5
Solución mineral II	mL	5
Resazurina 0.1% solución	mL	0.1
Peptona de soya (Bioxon)	g	0.2
Extracto de levadura (Sigma Aldrich; Sigma Cell culture)	g	0.1

Carbonato de sodio 8 %	mL	5
Solución cisteína sulfido*	mL	2
CO ₂		Flujo constante

Hungate (1969) y Cobos y Yokohama (1995). * a 12880 x g durante 10 min.

La composición de las soluciones minerales I y II del medio de cultivo se muestra en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Composición química de las soluciones I y II del medio de cultivo.

Componente	Solución	En 1000 mL
K ₂ HPO ₄	I	6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	II	6 g
NaCl	II	12 g
MgSO ₄	II	2.45 g
CaCl-2H ₂ O	II	1.6 g
L-Cisteína en 50 mL de H ₂ O. El pH se ajustó a 10 con NaOH (2N); se agregaron 2.5 g Na ₂ S. 9H ₂ O y se aforó a 200 mL con H ₂ O destilada; la solución estuvo en ebullición con flujo de N ₂ y se depositó en tubos con tapón de neopreno sólido.	Cisteína-sulfido	2 mL

Preparación del inóculo

En la preparación de inóculo se recolectaron 300 mL de líquido ruminal de una vaca Jersey el líquido fue distribuido en viales con 80 mL de líquido, y después los viales con el líquido se centrifugaron a 1159.2 g durante 3 min, para separar las bacterias de hongos y protozoarios. Los viales con el líquido se mantuvieron a 39 °C durante el proceso de inoculación de los cuatro viales para los tiempos 0, 3, 24 y 72 h.

Inoculación e incubación de fragmentos de la lámina y nervadura central

Un volumen de 25 mL del líquido ruminal centrifugado se usó como fuente de inóculo para los matraces Erlenmeyer de 500 mL con 225 mL de medio de cultivo, con 250 mL en cada matraz con cultivo. Los fragmentos de la nervadura y la lámina se colocaron en canastillas histológicas con seis compartimientos (Microcasette™ biopsy cassette) y se esterilizaron a 15 psi por 15 min y 121 °C en una autoclave Tuttnauer modelo 2540, en el interior de un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Cinco matraces, lavados y esterilizados, con 9 canastillas y 250 mL de medio de cultivo más inóculo se utilizaron en el proceso de incubación de los fragmentos. Las canastillas contenían fragmentos de la lámina y nervadura y se incubaron a 0, 3, 24 y 72 h.

Características físicas, químicas y microbiológicas del medio de cultivo utilizado.

El medio de cultivo con inóculo de líquido ruminal tuvo las características descritas en el Cuadro 19. Los valores iniciales corresponden al momento de inicio del período de incubación después de haber inoculado los cinco matraces Erlenmeyer (0 h). Los valores finales se obtuvieron a 72 h de incubación. Las bacterias se contaron a un aumento de 1000x en una cámara Petroff Houser® en un microscopio Olympus modelo BX51. El pH se midió con un potenciómetro Orion® calibrado a pH 4 y 7.

Cuadro 19. Características fisicoquímicas y microbiológicas del medio cultivo antes y después de cada periodo de incubación.

Variable	Valores iniciales			Valores finales		
	Media	Límite inferior	Límite superior	Media	Límite inferior	Límite superior
pH	6.87	6.74	6.98	6.775	6.73	6.93
Potencial de óxido reducción (mV)	-176.25	-206.70	-154.30	-308.15	-341.20	-272.80
Concentración de bacterias (bacterias mL-1)	4.40x10 ⁷	1.56x10 ⁷	1.19x10 ⁸	5.56x10 ⁷	2.44x10 ⁷	8.45x10 ⁷

Las condiciones del rumen relacionadas con el medio de cultivo son pH (5.5 a 6.9, media 6.4) y potencial de óxido reducción (de -400 a 350 mV) (Puniya *et al.*, 2015)

Corte y fijación de las muestras

Después de la digestión para los tiempos de incubación, se inició con la fijación de las muestras de 0.5 cm de longitud con glutaraldehído al 3 % en amortiguador de fosfato Sorensens por 24 h, molalidad 0.1, pH 7.2, para fijar las bacterias y los tejidos, y se lavaron tres veces con agua desionizada. Después se deshidrataron en alcohol (30 % al 100 %; 40 min en cada alcohol) y se secaron con CO₂ líquido a punto crítico en una secadora Samdri-780, Tousimis antes ser montadas y fotografiadas. Las muestras se fijaron en un porta muestra de latón con cinta doble de adhesiva de cobre y se recubrieron con oro-paladio (80:20) durante 10 min en una ionizadora Sputter JFC-1100 (Jeol, Fine Coat, Japón).

Microscopia electrónica de Barrido (MEB)

Para la toma de fotografías de los fragmentos de la lámina foliar y la nervadura, las hojas se cortaron en tres partes: cortes de la lamina foliar y nervadura. El procedimiento fue el siguiente: la lámina se cortó en tres partes para la observación de la epidermis abaxial y abaxial, y cortes transversales para la observación del mesófilo; y de la nervadura para la observación del xilema y floema, epidermis adaxial y abaxial. Los fragmentos utilizados en el proceso de degradación *in vitro* se obtuvieron de la nervadura y de la lámina foliar.

Toma de fotografías MEB de la nervadura central y de ambos lados de la misma.

Los fragmentos se cortaron a menos de 9 mm y fijados en porta muestras de latón de 9 mm de diámetro. Un microscopio electrónico de barrido (Jeol, JSM-6390, Japón, Scanning Electron Microscope) se usó para la observación y toma de fotografías de las estructuras de los fragmentos y la adhesión de bacterias a los tejidos de las hojas de *G. arborea* a 10 kV. Las magnificaciones para tomar las fotografías fueron X500 y X1000. Las regiones histológicas estudiadas fueron la nervadura central y la lámina foliar en los tiempos de incubación descritos. Las formas de los tipos de bacterias adheridas a los

tejidos de las hojas fueron vistas a una magnificación de X3000. La finalidad de la identificación de las formas bacterias es que la forma indica los posibles generos y su producción enzimática.

Modelo y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 4 x 3, con el tiempo de incubación (0, 3, 24 y 72 h) como primer factor y el tamaño de hoja (Hc, Hm y Hg) como segundo factor. El procedimiento GLINMIX se usó con el siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + T_i * H_j + \epsilon_{ij}$$

Donde Y_{ijk} = variables respuesta; μ = media poblacional; T = tamaño de hoja $i \dots 1$ a 3; H = hora de incubación $j \dots 1$ a 4; T*H = interacción tamaño de hoja * hora de incubación; ϵ_{ij} = error experimental

Variabes de respuesta

Las siguientes variabes se evaluaron en la cara treansversal de la nervadura y lamina foliar de los fragmentos incubados.

I) Cualitativas

Descripción de la degradación celular en los tejidos: 1) epidermis adaxial; 2) epidermis abaxial, de la lámina y la nervadura; 3) xilema; 4) floema; 5) mesófilo en empalizada; 6) mesófilo esponjoso; a 0, 3, 24 y 72 h de incubación.

Los tejidos evaluados se muestran en la Figura 4, y se considera como la hora 0 de incubación.

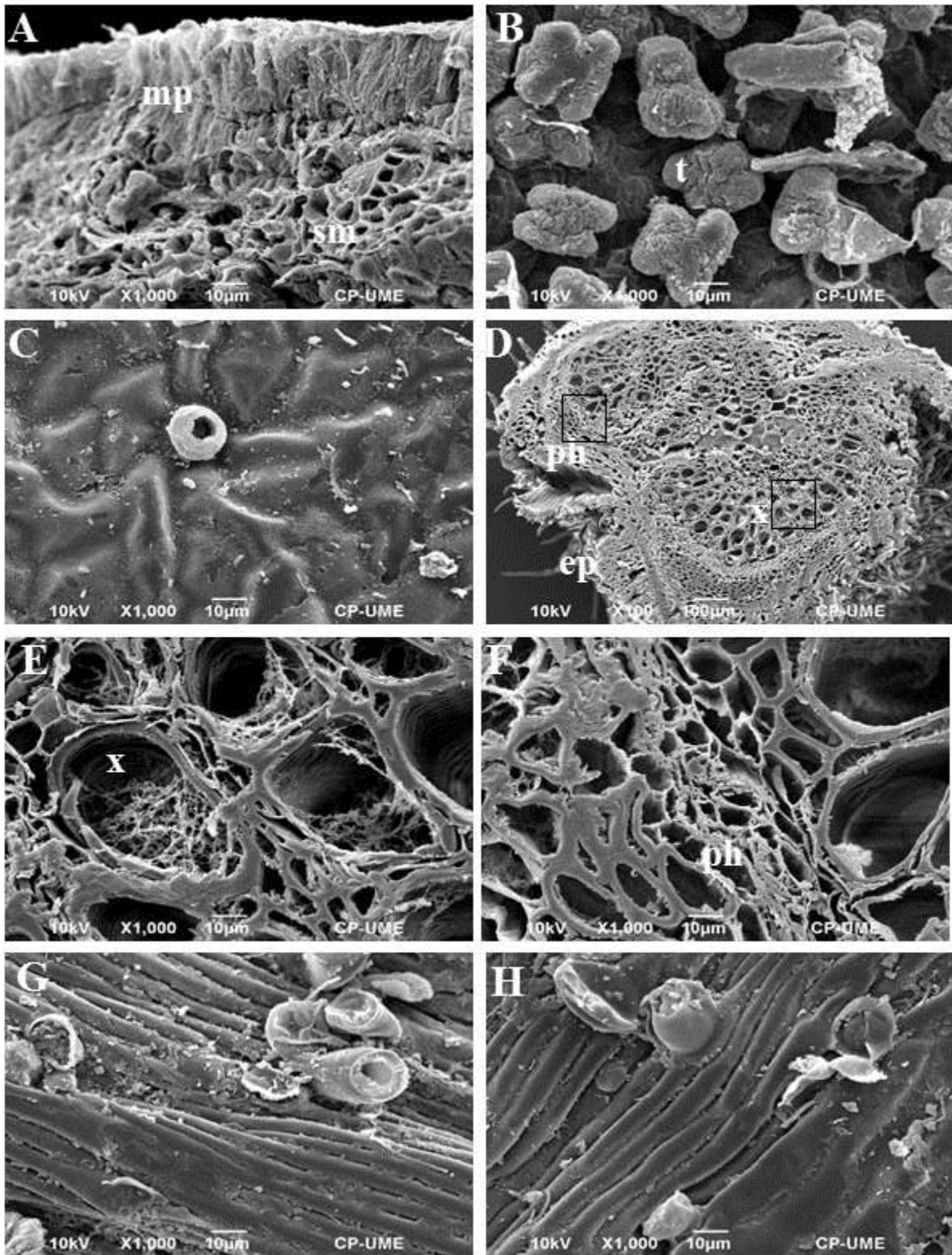


Figura 3. Microestructura de la hoja de *Gmelina arborea* previa al periodo de incubación (0 h). A, corte transversal de la lámina foliar; B, epidermis adaxial de la lámina con tricomas globosos; C, epidermis abaxial de la lámina; D, corte

transversal de la nervadura central; E, xilema; F, floema; G, epidermis adaxial de la nervadura; H, epidermis abaxial de la nervadura. pm, mesófilo en empalizada; sm, mesófilo esponjoso; x, xilema; ph, floema; ad, adaxial; ab, abaxial; t, tricomas globosos.

Hora 0

Hoja chica

La hora 0 se consideró al término de la inoculación de todos los matraces con el líquido ruminal centrifugado, aproximadamente 30 min después de iniciado el proceso de inoculación. Los tejidos encontrados fueron: cutícula, epidermis abaxial y epidermis adaxial, mesófilo en empalizada y esponjoso, xilema y floema, con poca cantidad de bacterias. Se observan bacterias adheridas al mesófilo en empalizada y esponjoso. No hay consorcios de bacterias en la epidermis abaxial, existen bacterias en la epidermis adaxial y en la epidermis abaxial de la lámina foliar tiene una cantidad mayor. No hay degradación de tejidos.

Hoja mediana

Los tejidos son cutícula, epidermis, mesófilo en empalizada, mesófilo esponjoso, epidermis adaxial, epidermis abaxial, envés xilema y floema, con poca cantidad de consorcios de bacterias y bacterias en la epidermis abaxial, epidermis adaxial y mesófilo empalizado. En la epidermis adaxial de la lámina no se observan consorcios de bacterias. Poca presencia de bacterias, con respecto a la epidermis adaxial. No hay degradación de tejidos.

Hoja grande

Se observa la cutícula, epidermis, mesófilo en empalizada y esponjoso, no se observan bacterias adheridas en estos tejidos. En la epidermis abaxial de la hoja se observan cocos; en la epidermis abaxial hay bacterias; en el floema se observan pocas bacterias y consorcios de bacterias. No hay degradación de tejidos.

II) Cuantitativas

a) Numero de bacterias adheridas y colonias por mm²

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I) Cualitativas

a) Descripción de los cambios estructurales durante el proceso de incubación por tamaño de hoja.

Los cambios estructurales de la lámina foliar y nervadura central para las Hc, Hm y Hg se describen a continuación.

Hoja chica

A las 3 h, la cutícula, epidermis, mesófilo en empalizada y esponjoso tienen pocas bacterias adheridas; en la epidermis abaxial y adaxial existió una mayor cantidad de bacterias. El xilema y el floema no tenían regiones degradadas. En la epidermis abaxial las bacterias predominantes fueron cocos, bacilos, espirilos.

A las 24 h, la cutícula, epidermis adaxial y nervadura central estaban rotas, lo cual indicó el inicio del proceso de degradación (Figura 4). El floema empezó a ser degradado por las bacterias (Figura 6). Las bacterias presentes fueron cocos, bacilos y consorcios de bacterias en la epidermis abaxial (Figura 7) y en el interior del xilema (Figura 5).

A las 72 h, la cutícula y epidermis adaxial de la lámina se degradaron o se separaron del mesófilo en empalizada (Figura 9). Algunas de las células del mesófilo en empalizada se encontraron separadas unas de otras y no tenían contenido celular; en este momento empezó la degradación del mesófilo esponjoso. En la epidermis abaxial de la lámina hubo una mayor cantidad de tricomas globosos que están degradados (Figura 7). La degradación de tejidos no lignificados comenzó a suceder en este tiempo. La nervadura central perdió su forma con respecto a la hora 0, se observó en el xilema que los engrosamientos de los elementos de vaso se separaron (Figura 4). En la epidermis adaxial, epidermis abaxial y paredes de los vasos del xilema hubo abundantes cocos, cadenas de cocos y consorcios de bacterias. La adhesión de bacterias al floema aumentó y comenzó con una degradación parcial del tejido. En la epidermis abaxial se observaron tricomas globulares colapsados (Figura 7).

Hoja mediana

A las 3 h, la cutícula, la epidermis adaxial y abaxial, el mesófilo en empalizada y el mesófilo esponjoso estuvieron presentes en la lámina foliar. El xilema (Figura 5) y el

floema (Figura 6) no presentaron degradación, hubo degradación en la epidermis abaxial, y en la epidermis abaxial existieron diplococos y espirilos. El mesófilo en empalizada presentó degradación (Figura 9) y en las periferias de los vasos del xilema se observaron bacterias adheridas (Figura 5). En el floema hubo bacilos, cocos, diplococos, y consorcios de bacterias (Figura 6). El mesófilo en empalizada comenzó a ser degradado en esta hora de incubación (Figura 9).

A la hora 24 de incubación la cutícula y la epidermis adaxial comenzaron a desprenderse. El mesófilo esponjoso se comenzó a separar y se inició la degradación del mesófilo en empalizada (Figura 9). La cutícula presentó rupturas y hubo bacterias adheridas a los tricomas globosos de la epidermis abaxial que degradaron el tejido y lo colapsaron (Figura 7). La degradación de las paredes primarias del xilema comenzó en este tiempo de incubación. Los espirilos fueron más abundantes en el floema (Figura 5).

En la hora 72 de incubación el floema no se encontró en la nervadura central (Figura 6), la cutícula y la epidermis abaxial desaparecieron (Figura 7) y las células del mesófilo no tienen el acomodo de la hora 0 y fueron separadas durante la degradación (Figura 9). Las células del mesófilo en empalizado se separaron y en su interior no tenían cloroplastos, y los tricomas globulares de la epidermis abaxial se degradaron. En las paredes del xilema se encontraron consorcios de bacterias que probablemente degradaron la estructura de los vasos (Figura 5). Se observan los cloroplastos (Figura 9). Los tricomas glandulares colapsaron en la epidermis abaxial (Figura 7).

Hoja grande

A la hora 3, la cutícula, epidermis, mesófilo en empalizada y esponjoso no fueron degradados (Figura 9), el xilema y el floema estuvieron presentes dentro de la nervadura central (Figura 4). En la epidermis adaxial (Figura 8) y abaxial de la lámina (Figura 7) se observaron consorcios de bacterias, bacilos y cocos. Las bacterias se adhirieron a la pared de los vasos del xilema (Figura 5) y al floema (Figura 6). Los bacilos eran más abundantes que otras formas.

A la hora 24, en la epidermis abaxial los tricomas globosos fueron colapsados (Figura 7) por la acción de las bacterias. En la epidermis adaxial de la hoja hubo muchas bacterias y rompimiento de la cutícula. La mayoría de los vasos del xilema presentaron degradación (Figura 5). Hubo presencia abundante de cocos, espirilos y

consorcios de bacterias en la epidermis adaxial, epidermis abaxial y paredes de los vasos del xilema. En este momento comenzó la degradación del floema (Figura 6).

A la hora 72, la cutícula y la epidermis desaparecieron y en las células del mesófilo hay bacterias adheridas a regiones con agujeros (Figura 9). Los agujeros también se observaron en la epidermis adaxial en las Hg. Estos agujeros no estuvieron presentes en los otros tamaños de hojas en este u otro tiempo de incubación. En la epidermis adaxial, los tricomas glandulares presentaron rompimiento o colapsaron (Figura 7). Las paredes del xilema tenían consorcios de bacterias y sus anillos estaban separados. No se distinguió el floema (Figura 6). La presencia de cocos y cadenas de cocos fue abundante en el xilema (Figura 5).

b) Descripción parcial mediante fotografías de los procesos de adhesión de las bacterias a partículas de alimento.

Las características de la presencia bacterias ruminales adheridas y de los tejidos se presentan a continuación.

A) Nervadura central

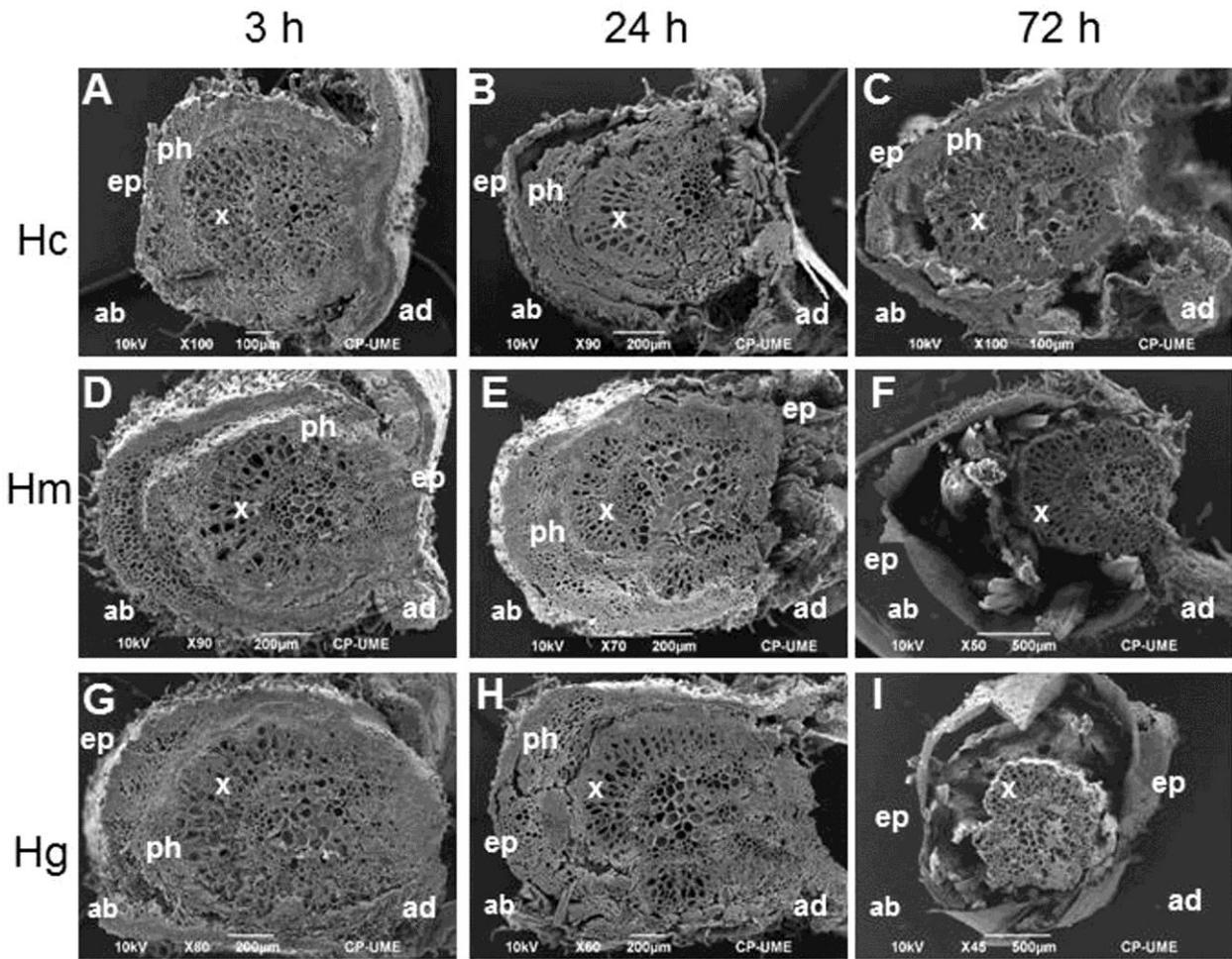


Figura 4. Microscopía Electrónica de Barrido del corte transversal de la nervadura central. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. ad adaxial; ab abaxial; ph floema; x xilema; ep epidermis.

B) Xilema

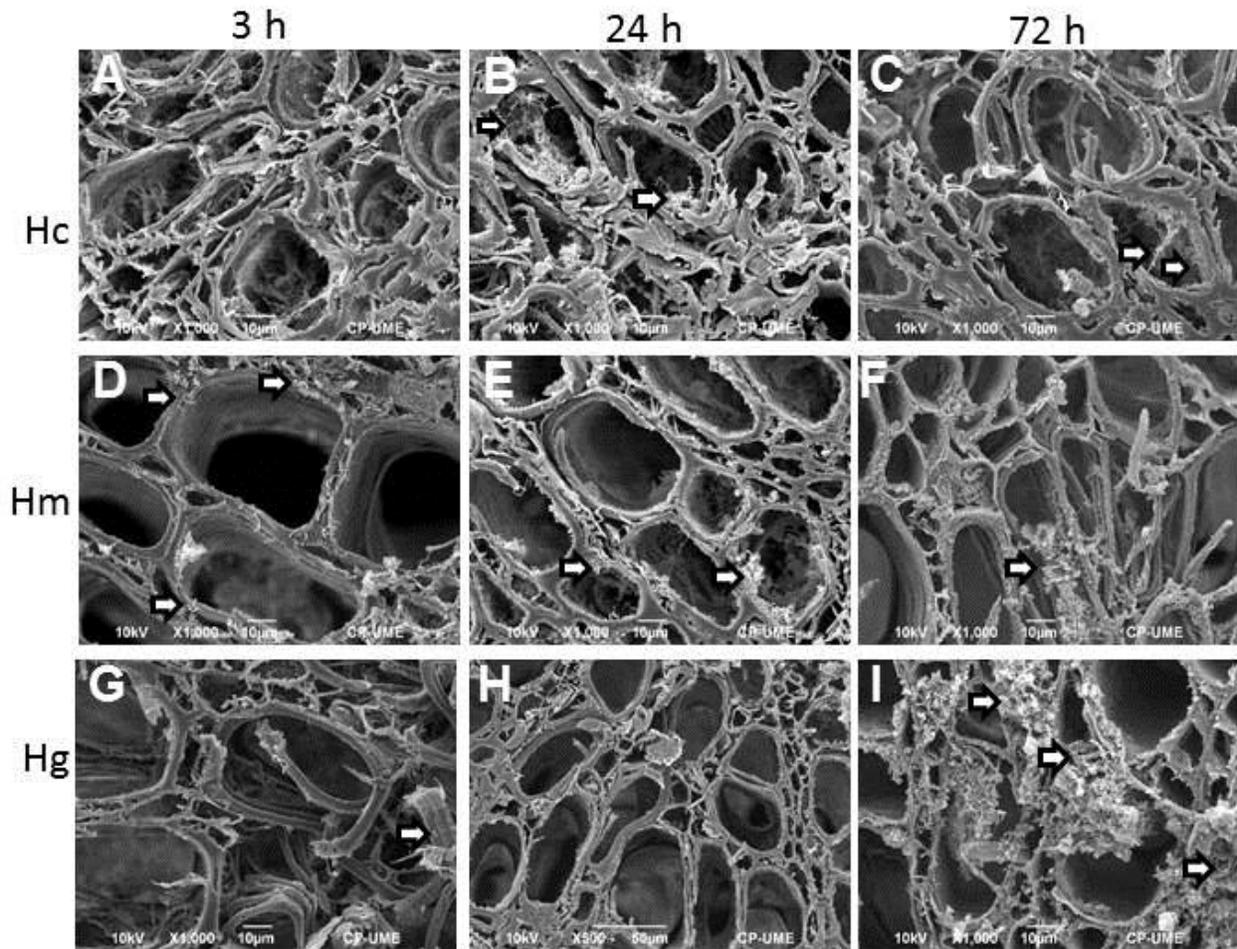


Figura 5. Microscopía Electrónica de Barrido del corte transversal del xilema. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. Los microorganismos adheridos están indicados por flechas.

C) Floema

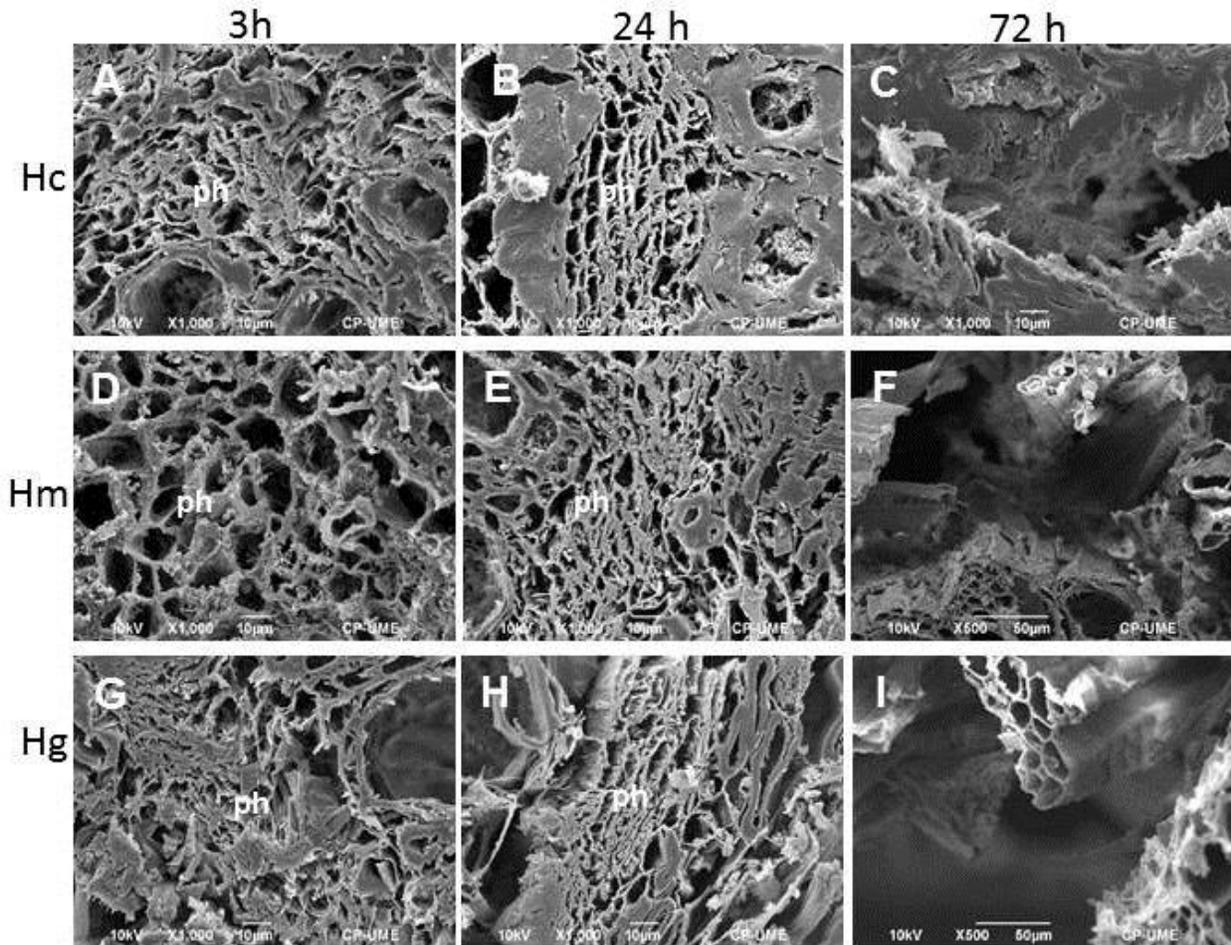


Figura 6. Microscopía Electrónica de Barrido del corte transversal del floema. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. En la hoja chica se observa parte del floema en las hojas medianas y grandes, y las bacterias lo degradaron.

D) Epidermis abaxial de la lámina

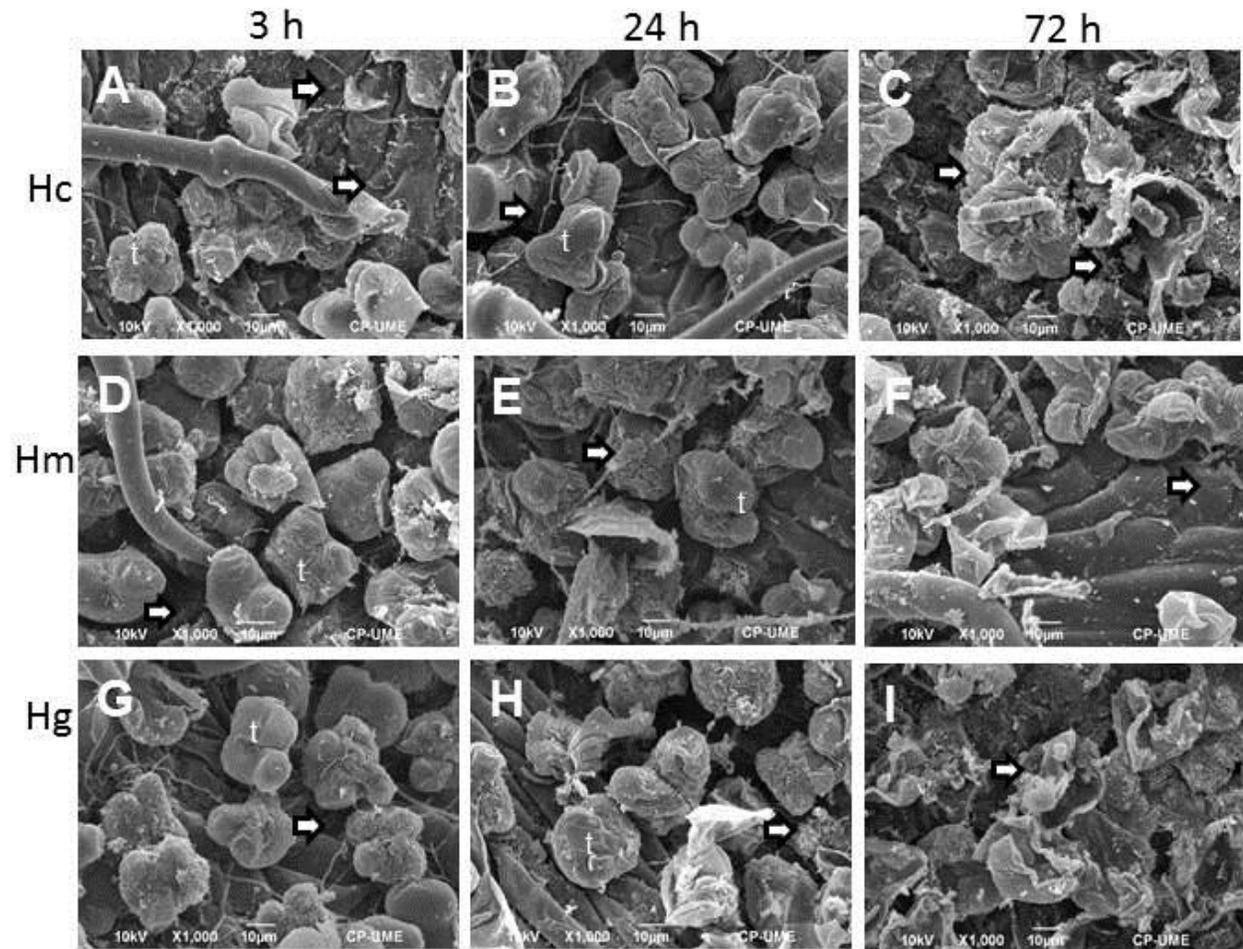


Figura 7. Microscopía Electrónica de Barrido de la epidermis abaxial de las hojas. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. Los microorganismos adheridos están indicados por flechas.

E) Epidermis adaxial de la lámina

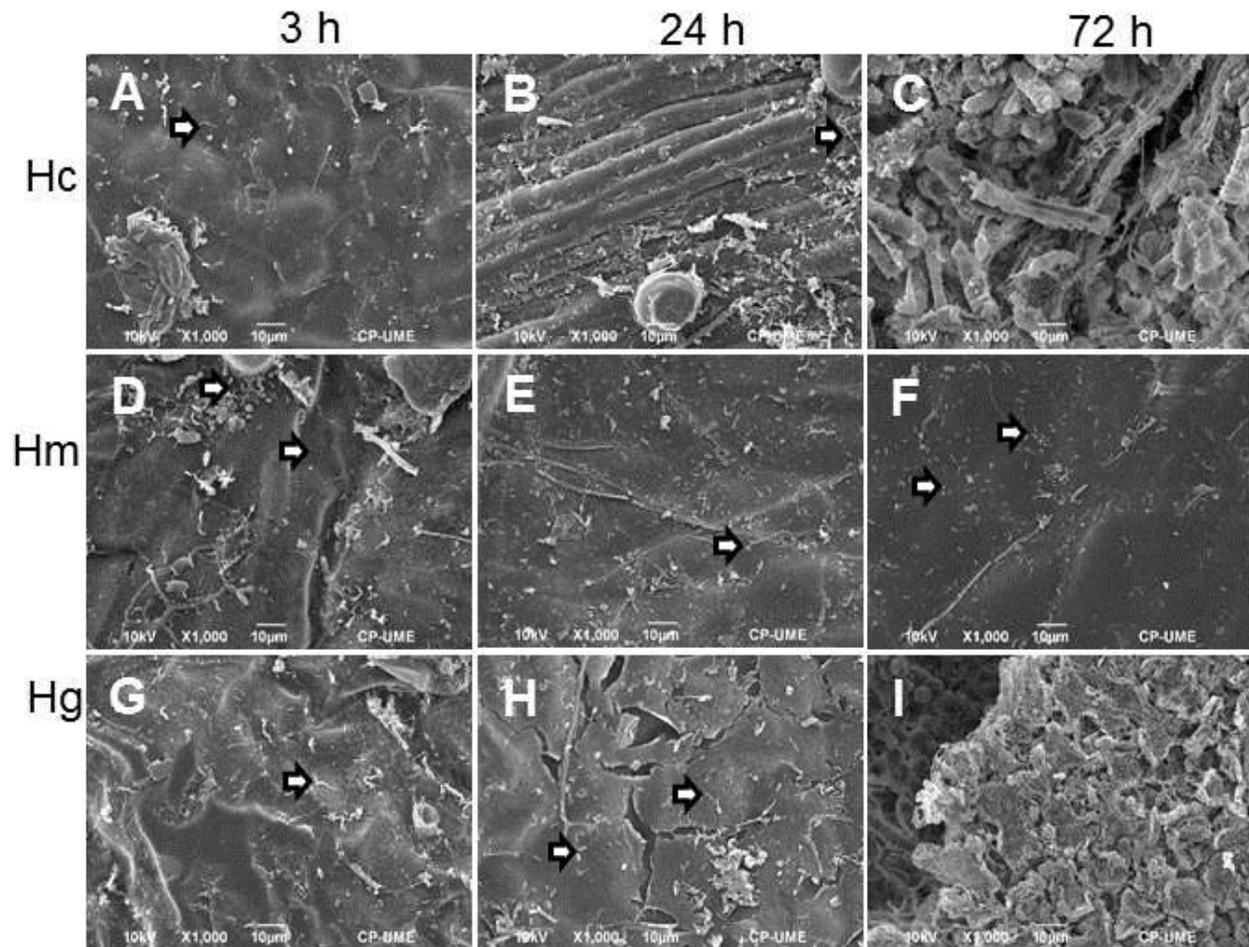


Figura 8. Microscopía Electrónica de Barrido de la epidermis adaxial de la hoja. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. Los microorganismos están señalados por flechas.

F) Mesófilo en empalizada y mesófilo esponjoso

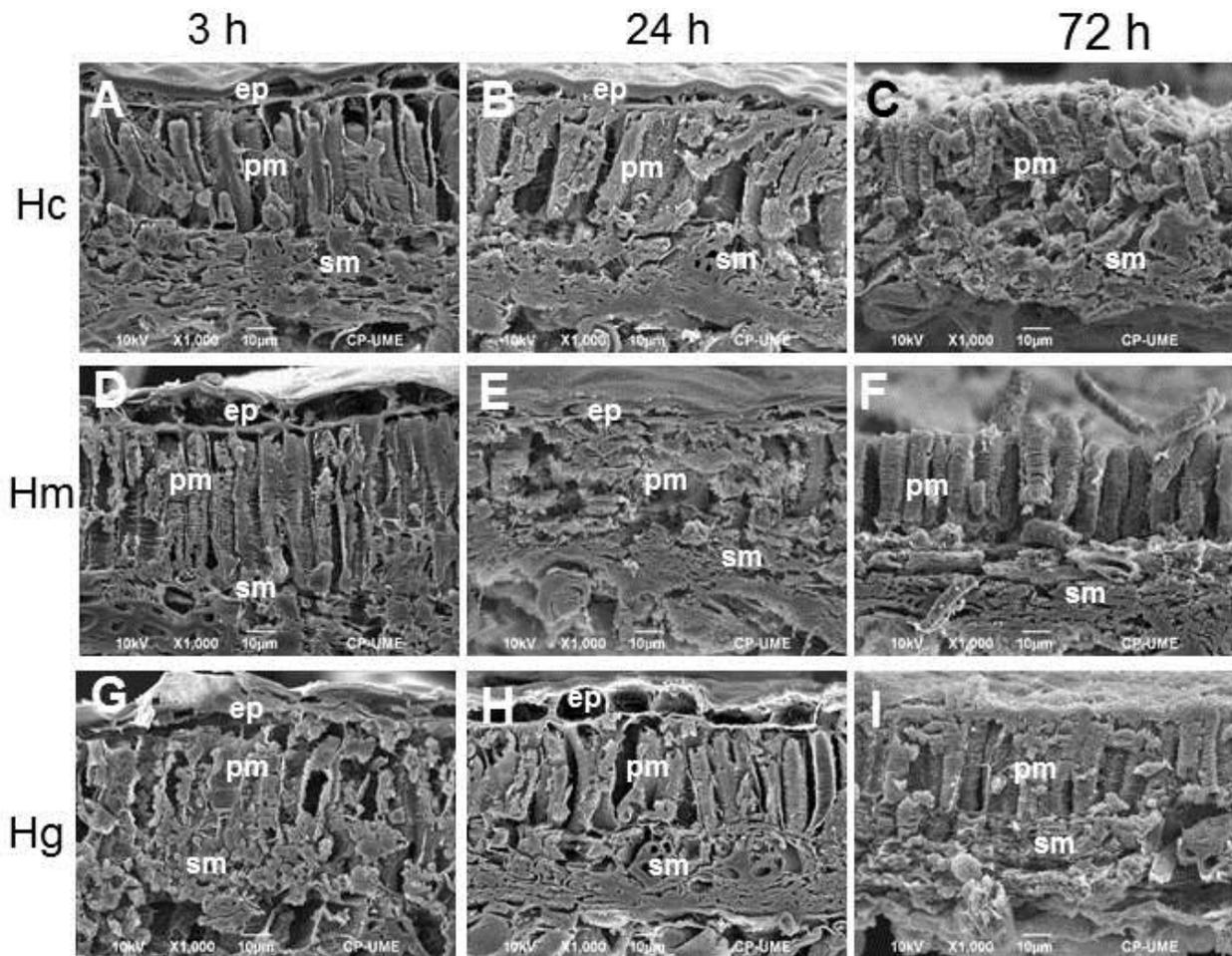


Figura 9. Microscopia Electrónica de Barrido del mesófilo. A, D y G a 3 h de incubación; B, E y H a 24 h de incubación; C, F e I a 72 h de incubación. ep epidermis; pm mesófilo en empalizada; sm mesófilo esponjoso; Hc hoja chica; Hm Hoja mediana; Hg Hoja grande.

II) Cuantitativas

a) Número de bacterias adheridas y colonias por mm²

Los consorcios bacterianos, bacterias totales, cocos, bacilos y espirilos se contaron en los tejidos de las hojas (Anexo 1). En la nervadura central las bacterias disminuyeron a las 72 h de incubación (Cuadro 20) y se debió a la desaparición del floema en las Hm y Hg, pero no fue así en las Hc (Figura 4).

Las Hg y Hm permitieron una mayor presencia de consorcios bacterianos y bacterias en el xilema, epidermis adaxial de la lámina y de la nervadura, mesófilo en empalizada, mesófilo esponjoso, con respecto a las Hc (Cuadro 21). En las Hc se encontró un mayor crecimiento bacteriano a la hora 72 en el floema (Cuadro 23 y Cuadro 24). La mayor cantidad de bacterias, consorcios bacterianos, cocos, bacilos y espirilos se encontró en los tejidos mesófilo en empalizada, mesófilo esponjoso, epidermis adaxial y epidermis abaxial de la nervadura y de la lámina de las Hg y Hm durante las primeras horas de incubación, lo cual podría estar relacionado con una mayor degradación de los tejidos no lignificados (Akin y Benner 1988; Cuadro 16). Los efectos del tamaño de hoja, hora de incubación e interacción en la adherencia son diferentes para el desarrollo de las formas encontradas en los tejidos evaluados (Cuadro 22). Hubo efecto de la interacción tamaño de hoja por hora en los consorcios bacterianos ($P < 0.01$) y bacilos adheridos al xilema ($P < 0.05$), en las bacterias totales en el floema ($P < 0.05$), bacterias totales y espirilos en el mesófilo en empalizada ($P < 0.05$), y cocos en el mesófilo esponjoso. No hubo efecto de la interacción en la presencia de bacterias en la epidermis adaxial de la lámina, mientras que en la epidermis abaxial de la lámina fue significativo el efecto en el total de bacterias, cocos y bacilos ($P < 0.05$). El tamaño de hoja por tiempo de incubación tuvo un efecto ($P < 0.001$) en la presencia de bacterias totales, cocos y espirilos en la epidermis adaxial de la nervadura. En la epidermis adaxial de la nervadura la interacción tamaño de hoja por tratamiento afectó la adherencia de cocos ($P < 0.001$). Los tejidos de las hojas tienen efecto diferente en adherencia de consorcios bacterianos (Cuadro 23), total de bacterias (Cuadro 24), cocos (Cuadro 25), bacilos (Cuadro 26) y espirilos (Cuadro 27) en los tiempos de incubación realizados. La adherencia fue diferente en cada tejido (Cuadro 22).

La composición de los tejidos dentro de la hoja es diferente e influye en la adherencia de la microbiota ruminal (Akin y Burdick, 1975; Jung y Allen, 1995; Jung *et al.*, 2004). El xilema en los pastos tropicales tiene mayor cantidad de lignina con respecto a los otros tejidos evaluados en el presente estudio y por esta razón la adherencia de las bacterias ruminales disminuye (Akin 1975; Akin 1988; Figura 4). En la nervadura central de la hoja de *G. arborea* hubo adherencia de cocos que degradaron parte de la estructura de los anillos del xilema. El floema y otros tejidos tienen la menor

concentración de lignina (Figura 2) dentro de las hojas, lo que permite una mayor adherencia con respecto al xilema en la nervadura central. Las Hg yHm presentaron mayor adherencia y degradación de tejidos con respecto a las Hc. En la prueba de DIVMS (Cuadro 16 y Cuadro 22) las Hc tuvieron menor digestibilidad con respecto a las Hm yHg ($P < 0.001$). Las formas de las especies de bacterias adheridas a los tejidos son diferentes en cada tejido en los tiempos evaluados. Por ejemplo, en el xilema los cocos abundaron en las últimas horas del período de incubación (Cuadro 21) y la hora tuvo un efecto altamente significativo (Cuadro 22), así, en las primeras horas de la incubación la cantidad de cocos fue menor, momentos en los cuales se rompen los anillos del mismo (Figura 5). En el floema hubo espirilos adheridos los cuales están relacionados con su degradación (Figura 6). En la Hc el floema fue menos degradado que en las Hg yHm ($P < 0.005$; Cuadro 16) y en estas últimas el floema desapareció (Figura 6), lo cual disminuyó el número de bacterias al final del período de incubación (Anexo 1: Cuadro 24). La desaparición del floema está relacionada con un menor contenido de lignina con respecto al xilema (Akin *et al.*, 1974; Akin y Burdick, 1975; Ransom-Jones *et al.*, 2012). Las diferencias en la adhesión se deben a la composición de los tejidos en las hojas, la cual puede afectar el desarrollo de bacterias ruminales (Huws *et al.*, 2014). De esta manera, la degradación de los tejidos de las hojas de *G. arborea* está relacionada con la presencia lignina en ellos; en los tejidos no lignificados la degradación es mayor como en el caso del mesófilo en empalizada, mesófilo esponjoso y el área degradable en la hoja es aquella en la cual no hay respuesta positiva a la tinción de lignina (Akin, 1988). Sin embargo, Akin (1980) menciona que algunas bacterias usan los compuestos fenólicos para su crecimiento, lo cual puede estar relacionado con el tipo de bacteria adherida a las paredes del xilema (Figura 5).

En el Cuadro 20 se describe la adherencia de tipos bacterias y consorcios bacterianos en cada tejido de la lámina foliar y nervadura central. La cantidad se refiere al tamaño de hoja que presentó una alta, media o poca abundancia de bacterias totales, cocos, bacilos y espirilos adheridos a cada tejido en que se realizó la prueba con respecto al tamaño de las hojas.

Cuadro 20. Abundancia de consorcios bacterianos y formas de cocos, bacilos, y espirilos por tejido vegetal en los tejidos foliares por tamaños de hojas considerados a 72 h de incubación.

Tejidos vegetales	Forma	Abundancia relativa entre tamaño de hojas
Xilema	Conorcios bacterianos, de bacterias, cocos, bacilos	Hg>Hc>Hm
	Espirilos	Hm>Hc
Floema	Conorcio bacterianos, total de bacterias, cocos, bacilos y espirilos	Hc
Mesófilo en empalizada	Conorcios bacterianos	Hc>Hm o Hg
	Total de bacterias y cocos	Hm>Hg>Hc
	Bacilos y espirilos	Hm>Hc>Hg
Mesófilo esponjoso	Conorcios bacterianos y espirilos	Hc>Hm o Hg
	Total de bacterias y cocos	Hm>Hg>Hc
	Bacilos	Hm>Hc>Hg
Epidermis adaxial de la lámina	Conorcios bacterianos, bacilos	Hg> Hm > Hc
	Total de bacterias	Hg>Hm>Hc
	Cocos	Hg>Hc>Hm
	Espirilos	Hg>Hm o Hc
Epidermis adaxial de la lámina	Conorcios bacterianos, total de bacterias y cocos	Hc>Hm>Hg
	Bacilos	Hm>Hg>Hc
	Espirilos	Hm>Hc>Hg
Epidermis adaxial de la nervadura	Conorcios bacterianos	Hg>Hm o Hc
	Total de bacterias y bacilos	Hg>Hm>Hc

	Cocos	Hm>Hc>Hg
	Espirilos	Hm>Hg>Hc
	Consortios bacterianos	Hm>Hg>Hc
Epidermis abaxial de la nervadura	Total de bacterias, cocos y bacilos	Hc>Hm>Hg
	Espirilos	Hg>Hm o Hc

Los valores de significancia de los efectos principales y su interacción se presentan en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Significancia de la prueba de efectos principales.

	Consortios bacterianos	Total de bacterias	Cocos	Bacilos	Espirilo
Xilema					
Hoja	*	ns	ns	*	ns
Hora	ns	***	***	***	ns
Hoja*hora	**	ns	ns	*	ns
Floema					
Hoja	ns	ns	ns	ns	ns
Hora	ns	*	ns	*	ns
Hoja*hora	ns	*	ns	ns	ns
Mesófilo en empalizada					
Hoja	ns	**	ns	*	*
Hora	ns	**	*	ns	***
Hoja*hora	ns	*	ns	ns	*
Mesófilo esponjoso					
Hoja	ns	**	ns	**	ns
Hora	ns	*	*	ns	ns
Hoja*hora	ns	ns	*	ns	ns
Epidermis adaxial de la lámina					
Hoja	ns	ns	ns	ns	ns
Hora	ns	*	ns	*	ns

Hoja*hora	ns	ns	ns	ns	.
Epidermis abaxial de la lámina					
Hoja	Ns	ns	ns	ns	ns
Hora	*	**	*	***	*
Hoja*hora	Ns	*	**	*	ns
Epidermis adaxial de la nervadura					
Hoja	ns	ns	ns	*	ns
Hora	**	**	**	ns	*
Hoja*hora	ns	**	**	**	ns
Epidermis abaxial de la nervadura					
Hoja	ns	ns	ns	**	.
Hora	ns	ns	***	**	.
Hoja*hora	ns	ns	**	ns	.

Significancia: ns no significativo; *P < 0.05; **P < 0.001; ***P < 0.0001.

CONCLUSIÓN

Los tejidos con respuesta positiva a la tinción de lignina afectan la adherencia de las bacterias y posterior degradación de los mismos; además influyen en la forma de las bacterias que se adhieren a éstos. El contenido de lignina en la nervadura central puede ser la causa de estas diferencias en la degradación, y la degradación del floema puede ser otra causa de estas diferencias relacionadas con el tamaño de las hojas. La adherencia de las bacterias ruminales en un medio de cultivo *in vitro* anaerobio con inóculo ruminal a hojas de *Gmelina arborea* y desaparición de los tejidos puede ser un indicador para considerar el uso de las hojas de esta planta en la alimentación de rumiantes.

LITERATURA CITADA

- Akin, D. E. 1980. Attack on lignified grass cell walls by a facultatively anaerobic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 40(4):809–820.
- Akin, D. E. 1988. Biological structure of lignocellulose and its degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. 21:295-310.

- Akin, D. E. and Burdick, D. 1975. Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. *Crop Science*. 15:661-666.
- Akin, D. E., Burdick, D. and Gene E. M. 1974. Rumen Bacterial interrelationships with plant tissue during degradation revealed by transmission electron microscopy. *Applied Microbiology*. 27(6):1149-1156.
- Akin, D.E. and Benner, R. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(5):1117–1125.
- Akin, D.E. and Borneman, W.S. 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science*. 114(10):3023–3032.
- Chao Feng., Shiwen Ding, Tianyuan Zhang., Zhiquian Li., Deli Wang, Ling Wang., Chen Liu, Jinyan Sun and Fugang Peng. 2015. High plant diversity stimulates foraging motivation in grazing herbivores. *Basic and Applied Ecology*. 17:43-51.
- Huws, S. A., Mayorga, O. L., Theodorou, M. K., Kim, E. J., Cooksoon, A. H., Newbold, C. J. and Kingston-Smith, A. H. 2014. Differential colonization of plant parts by the rumen microbiota is likely to be due differences forage chemistries. *Journal Microbial and Biochemical Technology*. 6: 080-086.
- Jung, H. G. and Allen, M. S. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of Animal Science*. 73:2774-2790.
- Jung, H. G., Engels, F. M. and Weimer, P. J. 2004. Degradation of lucerne stem cell walls by five rumen bacteria species. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*. 52:11-28.
- Miron, J., Ben, D., and Morrison, M. 2001. Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*. 84(6):1294–1309.
- Morris, E. J. G. 1988. Characteristics of the adhesion of *Ruminococcus albus* to cellulose. *FEMS Microbiology Letters* 51:113-118.
- Puniya, A. K., Singh, R. and Kamra, D. N. 2015. Rumen microbiology: From evolution to revolution. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. pp: 1–379.
- Ransom-Jones E., Jones, D. L., McCarthy, A. J., and McDonald, J. E. 2012. The fibrobacteres: an important *Phylum* of cellulose-degrading bacteria. *Microbial Ecology*. 63(2):267-281.

4. Anexos

Anexo 1. Cuadros del conteo de bacterias y colonias adheridas a tejidos vegetales.

Anexo 1.

Cuadro 22. Medias y desviación estandar en las colonias de bacterias por mm² en los tejidos evaluados.

Tejido	Hoja chica				Hoja mediana				Hoja grande				
	0	3	24	72	0	3	24	72	0	3	24	72	
Xilema			46235±	12253 ±			37323±	31478 ±	38422 ±		6199.86 ±	21653±	49520±
			10086	3096.4 7			139.06	6783.6 8	8399.5 9		3759.17	4758.28	10668
Floema			639.49±				1201.01 ±	217.11 ±			1244.72 ±	180.85	NSF
			168.14				224.99	40.17			230.24		
Mesófilo empalizada	152.05±	151.98 ±	596.02±	230.75 ±	589.36±		909.53 ±			261.93 ±		1151.85 ±	
	94.33	94.27	183.06	101.84	253.23		286.38			166.66		352.5	
Mesófilo esponjoso	355.56±	364.28 ±	1358.04 ±	555.24 ±	1228.42 ±	434.86±				399.57 ±		1688.10 ±	
	216.16	224.19	403.81	243.7	712.81	183.57				252.41		502.78	
Envés de la lámina	79.91±	203.69 ±	208.86±	466.39 ±	0	207.03±	705.27 ±	398.06 ±		73.00±	894.88±	390.96±	467.43 ±
	43.27	62.23	64.65	139.96		63.79	210.72	152.19		37.77	467.94	148.07	249.85
Haz de la lámina		157.57 ±		158.40 ±	0	96.85±	79.20±	94.43±		0	935.54±	118.80±	198.00 ±

		48.22		53.76		28.133	26.88	32.48		312.78	40.32	67.2
Envés de		453.62		302.06			150.56	228.26				
la		±		±		75.54±	±	±			151.95±	75.03±
nervadura		110.56		73.57		13.01	25.89	39.47			13.01	18.22
Haz de la	52.7649	265.03	80.3597				107.95					52.76.5
nervadura	±	±	±			185.28±	±			405.74±	65.65±	±
	24.81	91.04	27.73			56.8	51.04			118.38	22.58	24.81

Cuadro 23. Medias y desviación estándar del número de bacterias adheridas a los tejidos por mm².

10.5	Hoja chica				Hoja mediana				Hoja grande			
	0	3	24	72	0	3	24	72	0	3	24	72
Xilema	28604±	75528±	41921±	92991±	14290±	208182±	46685±	136895±	180079±	146594±	29688±	172480±
	23189	27385	13869	30702	8188.51	68796	15445	45240	103191	48477	10752	57068
Floema	1292.00±	927.01±	2828.93±	2100.39±	2932.58±	5118.36±	443.97±		1836.44±	4630.08±	422.28±	
	1351.15	398.36	1479.92	1553.54	2171.3	2189.84	189.71	NSF	1365.21	2156.12	198.52	NSF
Mesófilo empalizado	3396.37±	2437.95±	3513.20±	3726.67±	94.90±	323.12±	3724.33±	3116.39±		1634.11±	7121.65±	4604.25±
	2121.51	1393.04	1449.17	1430.7	80.27	208.87	1448.99	1205.17		695.63	2790.67	1775.81
Mesófilo esponjoso	9516.48±	6759.76±	8399.32±	8804.41±	659.60±	1485.52±	5006.99±	2155.89±		2721.29±	11518±	6980.13±
	5901.34	3700.26	3254.99	3154.84	554.86	595.86	1940.49	836.12		1100.49	4256.72	2502.55
Envés de la lámina	2255.72±	15943±	1707.46±	6530.94±	1529.04±	5689.66±	3294.70±	3115.55±	5053.09±	8420.5±	2994.40±	1476.01±
	1087.02	4429.31	475.49	1856.97	743	1600.9	921.78	854.57	2431.51	2342.66	834.76	413.81
Haz de la	9237.23±	6347.52±	1451.59±	2872.63±	6597.07±	5001.72±	2585.82±	2779.56±	4798.74±	11656±	4915.03±	3156.10±

lámina	5792.12	2465.57	564.25	1115.95	4136.41	1919.09	1011.51	1107.51	3009.04	4514.48	1882.54	1210.1
Envés de la nervadura	1131.22±	3374.32±	1586.79±	15097±	3205.48±	4267.45±	2397.76±	6492.05±	1128.41±	3523.56±	956.56±	1088.01±
	683.17	1177.54	553.76	5275.21	1947.46	1491.29	837.72	2256.06	680.62	1229.3	333.76	380.6
Haz de la nervadura	289.65±	5143.87±	6454.38±	1851.00±	3685.49±	8615.91±	2060.52±	6251.76±	3416.35±	6798.73±	1076.11±	4896.77±
	188.59	1881.16	2330.28	688.65	2397.22	3502.53	750.08	2450.79	2228.69	2475.22	412.77	1853.17

Cuadro 24. Medias del número de cocos por mm² adheridos a los tejidos evaluados.

Tejido	Hoja chica				Hoja mediana				Hoja grande			
	0	3	24	72	0	3	24	72	0	3	24	72
Xilema	23057±	11706±	15657±	92878±	13499±	50246±	8391.24 ±	92594±	39881±	14544±	6139.27 ±	150060 ±
	19722	7031.7	7214.84	41039	8251.5 5	20985	3549.52	36610	24486	5604.54	5107.78	52912
Floema	1280.29 ±	533.49±	980.22±	1120.26 ±	263.53 ±	636.79±	87.8419 ±	NSF	630.27±	486.18±	NSF	NSF
	784.68	188.78	588.51	485.5	161.51	195.13	53.83		273.15	133.26		
Mesófilo empalzado	3123.26 ±	186.62±	1213.75 ±	2507.42 ±		413.67±	910.70±	1704.73 ±		470.56±	526.25±	2788.93 ±
	2156.13	170.35	570.26	932.17		389.53	384.42	644.45		250.1	280.95	1048.81
Mesófilo esponjoso	9322.45 ±	360.90±	3423.67 ±	6106.23 ±		609.35±	4061.69 ±	1530.25 ±		627.21±	734.20±	4297.58 ±
	5637.9	288.79	1748.01	2112.11		287.09	2152.55	515.52		307.84	318.22	1317.73

Envés de la lámina	746.14±		574.25±	4565.10	629.43	228.83±	1703.54	1752.31	297.36±	1252.67	523.53±	879.61±
	477.98		212.8	1714.61	414.09	85.56	641.92	632.91	190.14	464.99	193.86	331.84
Haz de la lámina	680.30±	1285.60	604.78±	2066.63	831.52	529.25±	629.98±	428.46±	1360.92	1407.91	831.68±	1941.08
	469.04	511.86	240.75	822.75	573.31	210.7	250.78	170.58	938.42	559.82	405.52	772.86
Envés de la nervadura	453.41±	226.74±	831.34±	14288±	529.37	529.18±	793.76±	4910.23	377.84±	629.84±	478.68±	831.56±
	279.54	80.71	362.44	5086.87	326.49	230.73	346.1	1747.49	232.95	224.21	170.4	296.05
Haz de la nervadura	231.15±	998.53±	2168.72	1107.14	374.71	2353.26	495.80±	5811.1±	891.67±	1659.59	195.40±	1548.37
	141.77	348.59	760.93	388.03	226.64	810.18	177.02	2518.96	537.06	590.61	67.48	545.06

Cuadro 25. Medias del número de bacilos por mm² adheridos a los tejidos evaluados.

Tejido	Hoja chica				Hoja mediana				Hoja grande			
--------	------------	--	--	--	--------------	--	--	--	-------------	--	--	--

	0	3	24	72	0	3	24	72	0	3	24	72
		60715±	22063±	24807±	7183.06±	165323±	39802±	57299±	151453±	126906±	30092±	24167±
Xilema	9771.44±	20587	6849.65	7686.26	5551.24	52431	13475	19441	83745	40205	11322	7576.16
	7313.62											
Floema		318.82±	2481.84±	640.68±		234.58±	420.95±			539.70±	414.17±	NSF
		260.3	1015.41	524.33		110.87	153.88			312.05	151.53	NSF
Mesófilo empalizado	729.29±	2129.85±	1155.58±	916.02±	78.36±		704.12±	1249.11±		1383.09±	4461.50±	2063.05±
	542.44	1609.85	620.3	438.93	72.91		341.52	55.84		728.01	2234.39	997.5
Mesófilo esponjoso	3557.23±	9545.59±	1804.97±	3143.96±	879.31±	924.08±	1339.74±	721.15±		3152.06±	11157±	2314.91±
	2094.1	5501.61	756.93	1173.11	722.93	348.35	555.05	268.47		1311.81	4159.01	864.66
Envés de la lámina	1511.62±	15949±	1083.32±	1939.91±	906.91±	5239.09±	1587.32±	1310.33±	4762.15±	7155.75±	2393.45±	604.59±
	821.65	5005.49	339.97	608.78	492.93	1643.94	498.15	411.25	2588.63	2245.73	751.12	189.72
Haz de la lámina	7634.81±	4491.11±	903.10±	1600.74±	4952.08±	4375.75±	2057.49±	2455.56±	2473.21±	10053±	4331.74±	1255.57±
	5942.09	1997.16	412.03	874.56	3857.43	1933.27	949.12	1159.89	1925.73	4531.86	1912.32	558.45
Envés de la nervadura	707.18±	3108.73±	1025.94±	759.78±	2657.77±	3920.61±	1788.71±	1604.84±	769.14±	2900.19±	411.45±	241.65±
	426.83	1059.7	353.76	256.76	1599.92	1351.24	602.91	547.12	459.24	995.9	142.06	80.9
Haz de la nervadura	72.13±	4150.09±	4111.41±	767.91±	3235.68±	5967.65±	1559.6±	2242.55±	2526.64±	5179.98±	837.93±	3169.45±
	63.01	2016.89	1907.96	356.42	2822.7	3009.3	717.99	1108.95	2208.21	2298.2	406.32	1822.1

Cuadro 26. Medias del número de espirilos por mm² adheridos a los tejidos evaluados.

Tejido	Hoja chica				Hoja mediana				Hoja grande			
	0	3	24	72	0	3	24	72	0	3	24	72
Xilema		9770.79±	8912.48±	6420.70±		7149.45±	9623.84±	6318.37±	14959±		7328.82±	
		2304.98	1861.58	1915.89		3004.48	1979.55	1842.03	4405.41		1721.48	
Floema		318.82±	2481.84±	640.68±		234.58±	420.95±			539.70±	414.17±	NSF
		260.3	1015.41	524.33		110.87	153.88	NSF		312.05	151.53	NSF
Mesófilo empalizado		2971.01±	1489.87±	572.70±		140.95±	2603.20±	264.37±		1142.99±	3055.74±	656.95±
		1941.74	475.25	199.94		91.64	846.43	91.14		743.13	967.2	229.7
Mesófilo esponjoso	0.001±	39.17±	5975.18±	399.68±	0.02±	1.63±	520.04±	0.57±	0.001±	19.14±	5111.35±	276.53±
	1.91	116.37	0	0	90.51	18.04	0	0	1.34	79.76	96530	2827.14
Envés de la lámina		232.43±	97.77±			112.58±	82.66±	65.77±		165.34±	90.22±	
		56.78	28.8			25.49	23.59	16.17		47.19	22.28	
Haz de la lámina	79.91±43.27	203.69±	208.86±	466.39±		207.03±	705.27±	398.06±	73±	894.88±	390.96±	467.43±
		62.23	64.65	139.96		63.79	210.72	152.19	37.77	467.94	148.07	249.85
Envés de la nervadura		95.82±	95.82±		47.91±	95.82±	95.82±	95.82±		95.82±	95.82±	
		21.4	21.4		10.7	21.4	21.4	21.4		21.4	21.4	
Haz de la nervadura		76.27±	148.38±		76.79±	73.41±	77.20±	561.71±		78.45±	164.3±	163.6±
		31.8	35.24		32.79	30.04	32.044	170.38		23.48	71.3	38.02