Revista Mexicana de Agroecosistemas
Vol. 6 (Suplemento 2), 2019 16-18 de octubre ISSN:2007-9559
Memoria de artículos en extenso y resúmenes
"XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A. C."

PRODUCCIÓN DE METANO Y DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE ACCESIONES DE LEUCAENA DE DISTINTAS PROCEDENCIAS AGROCLIMÁTICAS DE MÉXICO

[*In vitro* METHANE PRODUCTION AND DIGESTIBILITY OF LEUCAENA ACCESSIONS FROM DIFFERENT AGROCLIMATIC PROVENANCES IN MEXICO]

Claudio Vite-Cristóbal[1,2§], Pedro Arturo Martínez-Hernández[1], Enrique Cortés-Díaz[1], Ponciano Pérez-Hernández[3], José Manuel Palma-García[4], Luis Alberto Miranda-Romero[1]

[1]Posgrado en Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, C. P. 56230, Texcoco, Estado de México, México. [2]Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. Desv. Lindero-Tametate S/N, Col. La Morita, C. P. 92100, Tantoyuca, Veracruz, México. [3]Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Km. 88.5 Carretera Federal Xalapa-Veracruz, Predio Tepetates, C. P. 91690, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México. [4]Colegio Mexicano de Agroforestería Pecuaria A. C., Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario, Universidad de Colima, C. P. 28040, Colima, Colima, México. [§]Autor para correspondencia:(cvitec81@hotmail.com).

RESUMEN

Con el objetivo de caracterizar la producción de metano *in vitro* de follaje de accesiones de Leucaena de distintos sitios y procedencias agroclimáticas de México, se realizó un experimento *in vitro* de producción de gas en el que se incluyeron dos sitios de plantación: Morelos y Veracruz, y cinco procedencias de la semilla: Colima, Cunningham, Morelos, Nuevo León y Veracruz. El forraje se recolectó a los seis meses de rebrote en ambos sitios de plantación. Los volúmenes totales de gas y de CO_2 fueron 41 y 5.6 % superiores ($p < 0.05$), en tanto la producción de metano fue 18.3 % inferior ($p < 0.05$), para el sitio Morelos en comparación con Veracruz. La desaparición de la MS y MO a las 24 h promediaron 23 y 29 %, respectivamente, con y sin diferencias significativas entre procedencias y sitios. Las procedencias que produjeron más CH_4 mostraron menor producción de CO_2 y digestibilidad de la MO ($p < 0.05$), situación que fue más contrastante entre las procedencias de Colima y Nuevo León. Se concluye que las accesiones de Leucaenas establecidas en Morelos se asoció a disminuciones en la producción de metano, con producciones mayores de gas total y bióxido de carbono, con variabilidad en las calidades de las materias seca y orgánica sólo a nivel de procedencias, características que pueden asociarse a un follaje que mejoraría la productividad y eficiencia en la ganadería con rumiantes sin originar mayor contaminación del ambiente.

Palabras clave: Gases con efecto invernadero, germoplasma vegetal autóctono, *Leucaena leucocephala*.

ABSTRACT

In order to characterize the in vitro methane production of foliage of Leucaena accessions from different sites and agroclimatic provenances of Mexico, an *in vitro* gas production experiment was carried out in which two plantation sites were included: Morelos and Veracruz, and five provenances of the seed: Colima, Cunningham, Morelos, Nuevo León and Veracruz. The forage

was collected after six months of regrowth at both planting sites. Total gas and CO_2 volumes were 41 and 5.6% higher ($p < 0.05$), while methane production was 18.3% lower ($p < 0.05$), for the Morelos site compared to Veracruz. The disappearance of MS and MO at 24 h averaged 23 and 29%, respectively, with and without significant differences between provenances and sites. The provenances that produced more CH_4 showed lower CO_2 production and OM digestibility ($p < 0.05$), a situation that was more contrast between the provenances of Colima and Nuevo León. It is concluded that the accessions of Leucaenas established in Morelos was associated with decreases in the production of methane, with higher productions of total gas and carbon dioxide, with variability in the qualities of the dry and organic materials only at the level of provenances, characteristics that can be associated with foliage that would improve productivity and efficiency in livestock with ruminants without causing greater environmental pollution.

Index words: Greenhouse gases, *Leucaena leucocephala*, indigenous plant germplasm.

INTRODUCCIÓN

La emisión de gas metano (CH_4) es el mayor impacto negativo sobre el ambiente que tiene la ganadería con rumiantes en pastoreo o alimentados con forrajes toscos, muy en particular en condiciones de ambientes tropicales (Martínez-Hernández *et al*., 2019). En este sentido, la sostenibilidad de la ganadería pastoril con rumiantes alimentados con praderas monófitas a base de gramíneas está fuertemente amenazada por señalarse que es emisora de hasta 37 % del CH_4, 9% del CO_2, 65% del óxido nitroso (N_2O) y 64% del amoníaco, todos ellos gases de efecto invernadero (FAO, 2006; Steinfeld *et al*., 2006; Knapp *et al*., 2014).

Éste gas metano en la ganadería con rumiantes proviene de la fermentación ruminal (mal llamada fermentación entérica) y de la descomposición anaerobia de las excretas (Johnson y Johnson, 1995; Eckard *et al*., 2010; Knapp *et al*., 2014). El CH_4 ruminal es un subproducto de la fermentación de la materia orgánica (almidón, celulosa, hemicelulosas, proteínas y otros materiales menores) por bacterias anaeróbicas, protozoarios y hongos en el rumen, y secundariamente en intestinos (Johnson y Johnson, 1995). La celulosa y la hemicelulosa son las responsables de la elevada producción de CH_4 por unidad de sustrato digerido, debido a que estas se fermentan a tasas más bajas que los carbohidratos no estructurales (Eckard *et al*., 2010).

Los sistemas silvopastoriles (SSP) con Leucaena han demostrado mejorar la producción animal sin aumento y a veces con reducción en la liberación de CH_4 ruminal (Shelton y Dalzell, 2007; Molina *et al*., 2013; 2016; Barahona *et al*., 2014). Bovinos con acceso a follaje de Lucaena muestran una liberación menor de CH_4 por kilogramo de producto animal y una mayor digestibilidad del forraje consumido en comparación a bovinos pastoreando gramíneas tropicales, esto debido a que las hojas de Leucaena presentan mayor contenido celular y menor de pared celular en comparación a gramíneas tropicales (Shelton y Dalzell, 2007). Bovinos pastoreando un SSP con hasta 20% de oferta de follaje de Leucaena mostraron 21% menor pérdida calculada de energía bruta en forma de CH_4 ruminal en comparación a los que pastorearon gramíneas tropicales (Martínez-Hernández *et al*., 2019). Eckard *et al*. (2010) concluyen que del 6-10% de la energía

bruta total consumida por la vaca lechera se convierte en CH_4 ruminal y se libera a través de la respiración.

Los rumiantes en pastoreo que basan su alimentación exclusiva en forrajes producen mayor cantidad de CH_4 por animal en comparación con rumiantes en confinamiento que basan su alimentación con granos, atribuido también a mayores tallas que exigen mayor consumo de alimento. Por tanto, al considerar la propiedad calorífica del CH_4 (12 Kcal g^{-1}) y un consumo de alimento con 2.6 Mcal kg^{-1} MS del 3 % de la materia seca en base a PV para una vaca lechera de 550 kg de PV, se producen al menos 104 kg $animal^{-1}$ $año^{-1}$ de CH_4 ruminal.

Ante la preocupación de lograr una ganadería bovina regenerativa y sostenible sin originar mayor contaminación del ambiente y debido a la disponibilidad de Leucaena como recurso autóctono en el trópico mexicano (Palma, 2006; Cortez *et al*., 2016) y para fomentar el aprovechamiento del follaje de la misma en la ganadería, se propone estudiar la calidad fermentativa en comparación con variedades mejoradas. El presente estudio tiene como propósito determinar el efecto sobre las emisiones de metano del follaje de accesiones de *L. leucocephala*, recolectados y establecidos en distintas procedencias agroclimáticas de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos de campo para el desarrollo de los modelos provinieron de dos sitios en los que se contó con parcelas experimentales plantadas con Leucaenas de diferente procedencia (Colima, Cunningham, Morelos, Nuevo León y Veracruz). Uno de los sitios fue Tepalcingo, Morelos y el otro Tantoyuca, Veracruz. Tepalcingo se localiza a 18°31'18.5"LN y 98°56'25.2"LO y 1,179 msnm, y tiene clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano, precipitación anual de 879 mm y temperatura media de 21.8 °C (García, 2005). Tantoyuca se localiza a 21°19'56.3"LN y 98°13'22.3"LO y 136 msnm, y tiene clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, precipitación anual de 1,228 mm y temperatura media de 23.9 °C (García, 2005). El tipo de suelo en ambos ambientes de crecimiento fue vertisol, de acuerdo con la clasificación del sistema FAO/UNESCO 2010 obtenido del continuo nacional a escala 1: 1,000,000 del INEGI.

El sitio de Tepalcingo se conformó con 11 accesiones y el de Tantoyuca con 14. Para ambos sitios todas las Leucaenas plantadas fueron originalmente crecidas en vivero en la Universidad Autónoma Chapingo y trasplantadas entre cuatro y seis meses de crecimiento. Las distancias entre hileras y plantas fueron 3 y 2 m, de forma que cada accesión tuvo una parcela con 16 plantas. Cada parcela experimental fue establecida en condiciones de temporal, sin fertilización y en un diseño de bloques al azar con dos y tres repeticiones.

Para el inicio de la toma de datos en ambos sitios se dio previamente un corte de homogeneización que consistió en podar a las plantas a 50 cm de altura a partir de la base del suelo, entre los tres y seis meses después del trasplante. Las diferencias en tiempos de establecimiento fueron compensadas con la siembra de plantas de mayor tamaño, corte de homogeneización tres meses más tarde y mayor disponibilidad de agua durante el establecimiento en Veracruz.

El follaje en estudio provino de una muestra compuesta de hojas más tallos de diámetro no mayor a 3 mm realizada en cuatro plantas de cada parcela al inicio de la época lluviosa en el año 2018, con una edad aproximada de seis meses de rebrote a partir del corte de homogeneización, trasladada en termo con gel congelante al laboratorio de forrajes de la Universidad Autónoma Chapingo (UACh), en donde se secó en estufa a aire forzado a 55 ºC hasta peso constante. Una submuestra de follaje seco fue triturada en molino de martillos tipo Wiley con malla de 1 mm y procesada en el laboratorio de Microbilogía Pecuaria de la UACh. La medición de las emisiones de metano se basó en la técnica *in vitro* de producción de gases (Theodorou *et al*., 1994; Bhatta *et al*., 2007), a partir del cual se estimaron los volúmenes totales (VT), de bióxido de carbono (VCO_2) y metano más gases menores (VCH_4+GM), expresados en mL kg^{-1} de sustrato. El procedimiento consistió en conectar una aguja hipodérmica a un transductor de presión digital que se inserta manualmente a través del tapón de goma de la botella de volumen conocido para medir y liberar la presión de gas acumulada (Theodorou *et al*., 1994). Las digestibilidades *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO) se obtuvieron mediante la técnica de Tilley y Terry (1963).

Las variables fueron sometidas a un análisis de varianza mediante un modelo que incluyó los efectos fijos de accesión, sitio y procedencia, la interacción sitio x procedencia y el efecto aleatorio de accesión anidado en sitio, mediante el procedimiento MIXED (SAS® 9.4, SAS Inst. Inc., Cary, NC., USA). Cuando fue necesario, las medias de las variables fueron estimadas y comparadas con la prueba de Tukey mediante la instrucción LSMEANS (SAS® 9.4, SAS Inst. Inc., Cary, NC., USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto del sitio de plantación y la procedencia del material genético en la producción de CH_4 y la digestibilidad aparente de la materia seca y orgánica para el follaje de Leucaena se muestra en el Cuadro 1. La técnica *in vitro* de producción de gases permitió determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo de 24 h, a partir del cual se dedujo que el sitio Morelos produjo follaje de Leucaena con mayores volúmenes de gas acumulado (p = 0.0224) y bióxido de carbono (p = 0.0384) y menor producción de metano más gases menores (p = 0.0371), sin mostrar efecto (p > 0.05) en las digestibilidades de la materia seca y orgánica. La procedencia del material genético mostró efecto sobre los volúmenes total (p = 0.0148), de bióxido de carbono (p = 0.0050), metano más gases menores (p = 0.0060), así como en las digestibilidades de la materia seca (p = 0.0164) y orgánica (p = 0.0226). En general, los sitios de plantación y las procedencias que produjeron más CH_4 mostraron menor producción de CO_2 y volumen total de gas, y para el caso de las procedencias también menores digestibilidades de la MS y MO, situación que es más contrastante entre las procedencias de Colima y Nuevo León.

Singh *et al*. (2012) concluyeron que las variaciones en la producción total de gas y CH_4 entre forraje de leguminosas y gramíneas se deben a variaciones en sus componentes químicos. Gaviria *et al*. (2015) encontraron que la mayor producción de gas se obtuvo en los forrajes con menor cantidad de FDN, ya que, posiblemente, la producción de gas se relacione de forma lineal con la degradación de la FDN. Además, Machado *et al*. (2012) reportaron que los sustratos con menor contenido de

FDN presentan tasas más altas de producción de gas, y esta sucede más rápido. Molina *et al*. (2013) no encontraron diferencias en la producción de metano (7.7 a 12.5 g kg^{-1} de sustrato) con incrementos graduales de Leucaena en la dieta. Soltan *et al*. (2012) reportaron producciones 8.5 y 131 mL g^{-1} de MO incubada para metano y gas total en el follaje de Leucaena, dicho valor de metano es inferior y el de volumen total de gas mayor a los observados en este estudio. El promedio de 24 % para metano obtenido a las 24 h de incubación fue superior al valor obtenido *in situ* (8 %) para las 24 h de fermentación en ovinos y bovinos alimentados con 24 a 27 % de inclusión de follaje de Leucaena en la dieta (Molina *et al*., 2013; 2016) y similar al 20 % de metano para follaje de Leucaena obtenida a las 24 h de incubación por Singh *et al*. (2012).

Martínez-Hernández *et al*. (2019) concluyeron que las DIVMS y DIVMO en el follaje de Leucaena fueron de alta a muy alta (ambos superiores a 54 %) en comparación con gramíneas tropicales fermentadas a las 96 h. Delgado *et al*. (2013) y Molina *et al*. (2013) reportaron en promedio 48 % de DIVMS a las 24 h de incubación, mientras Delgado *et al*. (2013) para el mismo tiempo de incubación encontró un promedio de 54 % en DIVMO, valores que son superiores a los promedios de DIVMS (23 %) y DIVMO (29 %) observados en este estudio. García *et al*. (2009) indican que la importancia del follaje de Leucaena como fuente de forraje, es que además de mayores concentraciones de nutrimentos éstos muestran una mayor digestibilidad. Por tanto, se sugiere la estimación de los parámetros relacionados con las fracciones fermentables y las digestibilidadades de la MS y MO con periodos de incubación más prolongados (48 a 96 h). Los resultados del presente estudio demuestran que existe material genético distribuido en el país que podría generar follaje de Leucaena de mejor calidad que el recurso forrajero local, con degradabilidad de la MO superior a 29 %.

Cuadro 1. Efecto de la accesión, sitio de plantación y procedencia del material genético en las fracciones fermentables y la digestibilidad aparente de la materia seca y orgánica ($\bar{x}$±EE) en follaje de *Leucaena leucocephala*.

Efecto	Fracciones fermentables			Digestibilidad	
	VT	VCO_2	VCH_4+GM	MS	MO
Accesión					
1	86.2±3.6^{a}	76.3±0.7^{a}	23.9±0.7^{a}	25.8±1.1^{a}	31.6±1.1^{a}
2	80.8±4.3^{a}	75.6±0.8^{a}	24.4±0.8^{a}	19.3±1.3^{a}	25.4±1.3^{a}
3	97.6±3.9^{a}	74.9±0.7^{a}	25.0±0.7^{a}	24.4±1.2^{a}	29.8±1.2^{a}
Sitio					
Morelos	103.2±3.6^{a}	77.6±0.7^{a}	22.4±0.7^{b}	23.4±1.1^{a}	30.0±1.0^{a}
Veracruz	73.2±2.8^{b}	73.5±0.5^{b}	26.5±0.5^{a}	22.9±0.9^{a}	27.9±0.9^{a}
Procedencia					
Colima	81.1±4.9^{b}	73.5±0.9^{b}	26.5±0.9^{a}	20.6±1.2^{b}	26.0±1.2^{b}
Cunningham	85.0±4.9^{ab}	76.2±0.9^{ab}	23.8±0.9^{ab}	23.6±1.2^{ab}	29.0±1.2^{ab}
Morelos	88.3±6.3^{ab}	74.0±1.2^{b}	25.9±1.1^{ab}	23.5±1.6^{ab}	30.3±1.6^{ab}
Nuevo León	102.6±4.3^{a}	78.3±0.8^{a}	22.0±0.8^{b}	26.1±1.1^{a}	31.1±1.1^{a}
Veracruz	84.0±5.3^{ab}	76.0±1.0^{ab}	24.1±1.0^{ab}	22.0±1.3^{ab}	28.3±1.3^{ab}

^{a,b,c,d} Medias con al menos una literal igual en la misma columna por factor no presentan diferencias significativas ($p < 0.05$; Tukey). VT = volumen total (mL g^{-1} de sustrato), VCO_2 = volumen de bióxido de carbono (%), VCH_4+GM = metano más gases menores (%), MS = materia seca (%) y MO = materia orgánica (%).

CONCLUSIONES

La menor producción de metano ocurrió en el follaje de *Leucaena leucocephala* establecida en Morelos y mayor en Veracruz, sin diferencias entre ambos sitios en la desaparición de la materia seca y orgánica, con volúmenes elevados de gas total y de CO_2. En las distintas procedencias estudiadas fue asociada la baja emisión de metano con altas producciones de CO_2 y volumen total de gas y desaparición de la materia seca y orgánica elevadas. Estos resultados se asocian a un follaje que mejoraría la productividad y eficiencia en la ganadería con rumiantes sin originar mayor contaminación del ambiente por emisión de metano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen el financiamiento y apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), el Instituto de Investigación y Posgrado en Ciencia Animal (IIPCA), al Posgrado en Producción Animal (PPA) y a la Dirección General de Investigación y Posgrado (DGIP) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACh), y al Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca (ITSTa) para el desarrollo de la Disertación Doctoral del primer autor. El agradecimiento también es extensivo a los Sres. Claudio y Cleotilde Benítez Cardozo por el espacio facilitado para el desarrollo del trabajo de campo en el ejido Limón, Tepalcingo, Morelos, y al área de Microbiología de Alimentos del Departamento de Zootecnia de la UACh por el apoyo con la instrumentación y técnicas para la obtención de las variables en estudio.

LITERATURA CITADA

Barahona, R., M. S. Sánchez, E. Murgueitio y J. Chará. 2014. Contribución de la *Leucaena leucocephala* Lam (de Wit) a la oferta y digestibilidad de nutrientes y las emisiones de metano entérico en bovinos pastoreando en sistemas silvopastoriles intensivos. Carta Fedegán. 140: 66-69.

Bhatta, R., O. Enishi and M. Kurihara. 2007. Measurement of methane production from ruminants. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 20:1305-18. doi:10.5713/ajas.2007.1049

Cortez, E. J. G., G. M. Uribe, L. A. Cruz, B. A. Lara y L. J. L. Romo. 2016. Árboles nativos para el diseño de tecnologías silvopastoriles en la Sierra de Huautla, Morelos. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 16: 3371-3380.

Delgado, D. C., J. Galindo, J. Cairo, I. Orta, M. Domínguez y N. Dorta. 2013. Suplementación con follaje de *L. leucocephala*. Su efecto en la digestibilidad aparente de nutrientes y producción de metano en ovinos. Rev. Cub. Cienc. Agr. 47: 267-271.

Eckard, R. J., C. Grainger and C. A. M. Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. Livest Sci 130: 47-56.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2006. Livestock report 2006. FAO. Rome, Italy. URL: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0255e/a0255e.pdf. Acceso Septiembre 2017.

García, E. 2005. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 4a Edición. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México. 217 pp.

García, D. E., H. B. Wencomo, M. G. Medina, P. Moratinos y L. J. Cova. 2009. Caracterización de la calidad nutritiva de 53 accesiones del género *Leucaena* en condiciones tropicales. Pastos y Forrajes 32: 1-16.

Gaviria, X., J. F. Naranjo y R. Barahona. 2015. Cinética de fermentación *in vitro* de *Leucaena leucocephala* y *Megathyrsus maximus* y sus mezclas, con o sin suplementación energética. Pastos y Forrajes 38: 55-63.

Johnson, K. A. and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73: 2483-2492.

Knapp, J. R., G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss and J. M. Tricarico. 2014. Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. J. Dairy Sci. 97: 3231-3261. doi: 10.3168/jds.2013-7234

Machado, P. A. S., S. C. Valadares Filho, R. F. D. Valadares, M. F. Paulino, P. V. R. Paulino and M. I. Marcondes. 2012. Desempenho e exigências de energia e proteína de bovinos de corte em pasto suplementados. Arq. Brasileiro Med. Vet. Zoot. 64: 683-692.

Martínez-Hernández, P. A., E. Cortés-Díaz, R. Purroy-Vásquez, J. M. Palma-García, P. P. Del Pozo-Rodríguez y C. Vite-Cristóbal. 2019. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit especie clave para una producción bovina sostenible en el trópico. Tropic. Subtropic. Agroecosyst. (En prensa).

Molina, B. I. C., J. M. Cantet, S. Montoya, L. G. A. Correa y R. R. Barahona. 2013. Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. Rev. CES Med. Vet. Zoot. 8: 15-31.

Molina, I. C., E. A. Angarita, O. L. Mayorga, J. Chará and R. R. Barahona. 2016. Effect of *Leucaena leucocephala* on methane production of Lucerna heifers fed a diet based on *Cynodon plectostachyus*. Liv. Sci. 185: 24-29. doi: doi.org/10.1016/j.livsci.2016.01.009

Palma, J. M. 2006. Los sistemas silvopastoriles en el trópico seco mexicano. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 14: 95-104.

Shelton, M. and S. Dalzell. 2007. Production, economic and environmental benefits of leucaena pastures. Trop. Grassl. 41: 174-190.

Singh, S., B. P. Kushwaha, S. K. Nag, A. K. Mishra, A. Singh and U. Y. Anele. 2012. *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. Anim. Feed Sci. Technol. 178: 2-11.

Soltan, Y. A., A. S. Morsy, S. M. A. Sallam, H. Louvandini and A. L. Abdalla. 2012. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (*Prosopis*, *Acacia*, *Atriplex*, and *Leucaena*) on ruminal fermentation and methanogenesis. J. Anim. Feed Sci. 21: 753-766.

Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. Dhanoa, A. B. McAllan and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 48: 185-197.

Tilley, J. M. A. and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forages crops. Grass Forage Sci.18: 104-111.