

Rendimiento de materia seca y valor nutritivo de cuatro leguminosas herbáceas en la zona tropical de Hueytamalco, Puebla, México



Sergio Alberto Lagunes Rivera ^a

Juan de Dios Guerrero-Rodríguez a*

Josafath Omar Hernández-Vélez ^b

José de Jesús Mario Ramírez-González b

Dulce Violeta García-Bonilla a

Antonio Alatorre-Hernández a

Resumen:

El objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento de materia seca (MS), concentraciones de fibra detergente neutro y ácido (FDN y FDA), proteína cruda (PC) y digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) de las leguminosas forrajeras *Stylosanthes guianensis* (SG), *Centrosema macrocarpum* (CM), *Pueraria phaseoloides* (PP) y *Arachis pintoi* (AP). Durante 11 meses se realizaron seis cortes a intervalos de 56 días. La siembra de las especies se realizó en parcelas experimentales de 3 x 7 m bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La acumulación de MS total fue mayor ($P \le 0.05$) en SG y CM con 19,410 y 17,462 kg MS ha⁻¹, respectivamente, en comparación a PP (14,704 kg) y AP (12,466 kg). La especie con menor cantidad ($P \le 0.05$) de FDN y FDA fue AP con 60 y 35 %, respectivamente. Esta misma especie tuvo mayor digestibilidad (74 %) seguido de SG con 62 %, PP con 57 % y CM con 55 %. Las especies con mayor ($P \le 0.05$) contenido de PC fueron AP y CM con 21 % seguido de SG con 19 % y PP con 17.8 %. Las especies SG y CM fueron las leguminosas con mayor producción de MS; mientras que AP fue la especie con mayor digestibilidad y proteína.

^a Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla, No. 205 Santiago Momoxpan, 72760 San Pedro Cholula, Puebla, México.

^b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. México.

^{*} Autor de correspondencia: rjuan@colpos.mx

No obstante, de acuerdo a su valor nutritivo y producción de MS, las cuatro leguminosas pueden ser utilizadas como fuente de proteína para rumiantes en dietas de bajo valor nutritivo.

Palabras clave: Calidad nutritiva, Comportamiento productivo, Leguminosas herbáceas.

Recibido: 10/10/2017

Aceptado: 09/08/2018

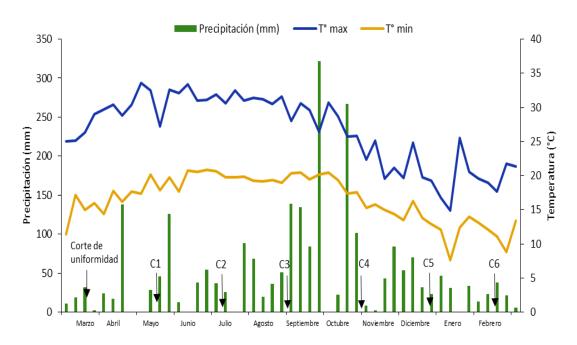
En las regiones tropicales de México, la producción del ganado rumiante se obtiene principalmente del pastoreo de gramas nativas e introducidas. Estas, generalmente se caracterizan por tener una alta dependencia a la fertilización nitrogenada y presentar una disminución sustancial en proteína y digestibilidad a medida que alcanzan la madure $z^{(1,2)}$. En algunos casos y dependiendo de la edad, el contenido de proteína en las gramíneas puede ser menor a 7 % lo cual puede ser restrictivo para la producción de rumiantes⁽³⁾. Una opción para mejorar la alimentación es el uso de leguminosas forrajeras herbáceas, las cuales se caracterizan por mantener un alto valor nutritivo durante su ciclo biológico en comparación a las gramíneas^(1,4). Dependiendo de la especie, las leguminosas herbáceas tropicales pueden alcanzar contenidos de proteína cruda entre 19 a 22 % (5) y una digestibilidad de la materia seca de 58 a 72 % (6). Además, por su capacidad de fijación de nitrógeno en el suelo, en su asociación con pastos, éstas pueden aumentar el rendimiento de materia seca y calidad nutritiva de las gramíneas^(7,8); aunque también pueden ser utilizadas en monocultivo o como bancos de proteína. Ejemplo de ellas son Stylosanthes guianensis, Centrosema macrocarpum, Pueraria phaseoloides y Arachis pintoi las cuales han demostrado ser recursos forrajeros importantes para el desarrollo de sistemas de producción ganadera en regiones tropicales húmedas y secas^(9,10,11). Stylosanthes guianensis es una leguminosa herbácea perenne de crecimiento semierecto⁽⁹⁾ similar a *Centrosema macrocarpum*, aunque esta última es menos leñosa que la primera. Por el contario Pueraria phaseoloides y Arachis pintoi son leguminosas enredaderas de tallos largos y con hábito de crecimiento postrado^(12,13). Estas leguminosas se adaptan a un amplio rango de suelos que van desde los arcillosos a los arenosos, generalmente con un contenido de materia orgánica mayor a 3 % (12,14)

No obstante, la introducción de estas especies a una región determinada, requiere de un conocimiento previo en cuanto a su comportamiento productivo, así como de los posibles factores ambientales que pudieran influir en el rendimiento de materia seca y valor nutritivo. Existe información productiva por especie, pero comparaciones entre ellas bajo las mismas condiciones edafoclimáticas son escasas, datos que son importantes para la toma de decisiones en el momento de elección de qué especie sembrar. Así mismo, la evaluación del rendimiento de materia seca y valor nutritivo de las especies, es una de las

técnicas básicas requeridas para el desarrollo de estrategias de suplementación y optimización del uso de forrajes disponibles⁽⁴⁾. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el rendimiento de materia seca y el valor nutritivo de cuatro leguminosas forrajeas herbáceas en una zona tropical del estado de Puebla.

El experimento se estableció en el Sitio Experimental "Las Margaritas" del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, ubicado en el Municipio de Hueytamalco, Puebla, en condiciones de temporal. El sitio experimental se ubica en 20° 00′ N y 97°18′ O a una altitud de 450 m. El clima que presenta es Af (c), con una temperatura media anual de 21 °C, una precipitación pluvial promedio de 3,000 mm anuales y una humedad relativa de 90 %⁽¹⁵⁾. El suelo posee textura arcillosa con un pH de 4.4, CE de 0.26 mmhos cm⁻¹ y materia orgánica de 5.2 %. El contenido nutrimental fue pobre en N (0.004 %) y P (4.06 ppm), rico en K (150 ppm), Ca (570 ppm) y Cu (520 ppm), con niveles medios de Mg (73.33 pm) y muy pobre en B (0.166 ppm) y Zn (4.66 ppm). El periodo de evaluación fue durante 11 meses (marzo de 2009 a febrero de 2010), que comprendió la realización de seis cortes cada 56 días (Figura 1). Previamente se realizó un corte de uniformización a los 45 días de establecidas las parcelas. Las fechas de corte correspondieron a mayo 16, julio 12, septiembre 6, noviembre 2, diciembre 28 de 2009 y febrero 24 de 2010.

Figura 1: Temperatura y precipitación pluvial registrada en el periodo experimental (marzo de 2009 a febrero de 2010). Las flechas indican los cortes de las cuatro leguminosas



La preparación del terreno fue con arado y rastra. Se realizó una sola aplicación de fertilizante en el momento de la siembra con la fórmula 00-80-60 de N-P-K ha⁻¹, utilizando superfosfato de calcio triple y cloruro de potasio. La semilla de las leguminosas *Styloshanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (cv Ubon), *Centrosema macrocarpum* Benth (CIAT 5713) y *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth (cv Jarocha), fue escarificada con agua a 75 °C durante 3 min. La siembra fue al voleo en unidades experimentales de 21 m² (3 x 7 m) a una densidad de 35 kg de semilla ha⁻¹ considerando que la semilla tenía latencia física y era de tres años atrás. La especie *Arachis pintoi* Krapov. y W. C. Greg. (CIAT 17434) se estableció con material vegetativo (tallos con raíz de 2 a 4 nudos) a 10 cm entre plantas.

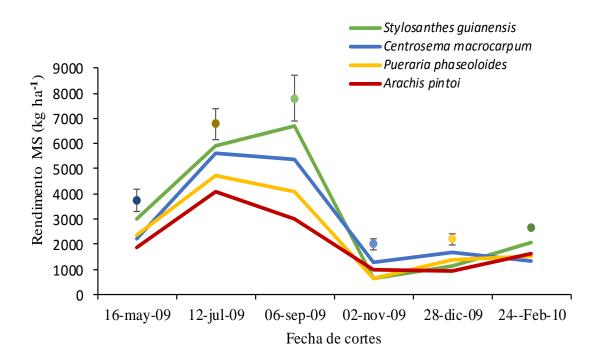
Dentro de cada unidad experimental se colocó de manera aleatoria (cada 56 días) un cuadro metálico de 0.25 x 0.25 m, cosechando la biomasa aérea de cada especie⁽¹¹⁾ a una altura de 10 cm por encima del suelo para *Arachis pintoi* y 15 cm para el resto de las leguminosas. El forraje cortado fue pesado y colocado en una bolsa de papel debidamente identificada. Posteriormente, se determinó la relación hoja-tallo de cada especie pesando por separado cada fracción de la planta y dividiendo la cantidad de hoja entre la cantidad de tallo. Todas las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 55 °C hasta alcanzar un peso constante.

Las muestras secas, se molieron con un molino ciclónico con malla de 1 mm. Se determinó la fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de manera secuencial y por duplicado en un analizador de fibras ANKOM 200/220, utilizando los protocolos de ANKOM Technology⁽¹⁶⁾. La proteína cruda (PC) se determinó por duplicado mediante el método Kjeldahl multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 6.25⁽¹⁷⁾. La digestibilidad *in vitro* de la materia seca se determinó por duplicado y se realizó por el método enzimático pepsina-celulasa^(18,19).

Por haber pendiente en el terreno, el diseño utilizado fue bloques completos al azar con cuatro repeticiones, siendo los tratamientos las leguminosas. Los datos se analizaron con un arreglo de parcelas divididas donde la parcela mayor fue cada especie de leguminosa y la parcela menor fue cada corte. Se realizó un análisis de varianza, y las medias se compararon con la prueba de Tukey con α = 0.05 mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0⁽²⁰⁾.

La Figura 1 muestra la precipitación pluvial, así como, las temeperaturas máximas y mínimas del sitio experimental. Se acumularon 1200.7 mm de precipitación, no se presentó canícula, las temperaturas máximas variaron entre 14.9 y 33.6 °C y las mínimas entre 7.6 y 21 °C. En producción de MS y en los diversos cortes, las especies fueron diferentes (*P*≤0.05). En la mayoría de los cortes AP tuvo una tendencia en mantener los rendimientos más bajos; sin embargo, fue similar al comportamiento de PP. En general, las cuatro leguminosas tendieron a aumentar su producción del corte 2 al corte 3 (Figura 2). A partir del corte 4 la producción de las cuatro especies disminuyó sustancialmente, manteniéndose así hasta el corte 6. La acumulación total de MS fue mayor en SG con 19,410 kg MS ha⁻¹ y CM con 17,462 kg en comparación a PP y AP con 14,704 y 12,466 kg respectivamente.

Figura 2: Rendimiento de MS (kg ha⁻¹) de las leguminosas herbáceas *Stylosanthes guianensis*, *Centrosema macrocarpum*, *Arachis pintoi* y *Pueraria phaseoloides* evaluadas en Hueytamalco, Puebla



En producción de hoja, SG, CM y PP fueron las especies que mostraron mayor cantidad promedio en comparación a AP ($P \le 0.05$); mientras que en tallo, SG tuvo mayor producción ($P \le 0.05$). La relación hoja-tallo, fue más alta en PP seguida de CM ($P \le 0.05$); mientras que SG fue la que tuvo menor relación en todo el experimento. El Cuadro 1 muestra los promedios totales de producción de MS, hoja, tallo y relación hoja-tallo de las cuatro leguminosas evaluadas.

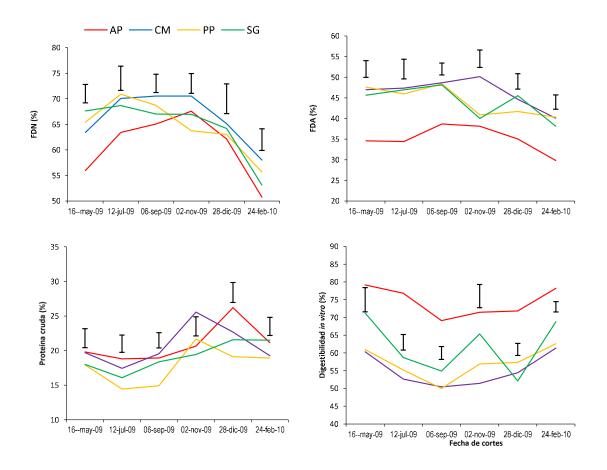
Cuadro 1: Rendimiento promedio de materia seca (MS) por corte, hoja, tallo y relación hoja-tallo de *Stylosanthes guianensis* (SG), *Centrosema macrocarpum* (CM), *Pueraria phaseoloides* (PP) y *Arachis pintoi* (AP)

Variable	SG	CM	PP	AP	EEM
MS, kg ha ⁻¹	3235.3a	2910.3a	2450.6b	2077.8c	196.0
Hoja, kg ha ⁻¹	1601.5a	1641.2a	1467.5a	1171.5b	99.4
Tallo, kg ha ⁻¹	1633.6a	1269.1b	983.2c	906.1c	95.5
Relación hoja-tallo	1.07c	1.38ab	1.57a	1.45b	0.048

a,b,c Medias con la misma letra entre hileras no son significativamente diferentes ($P \ge 0.05$).

En concentración de FDN y FDA las especies fueron diferentes ($P \le 0.05$), encontrándose variaciones en su promedio de 61 a 66 % y de 35 a 46 %, respectivamente. La especie AP tuvo menor contenido de fibras en todos los cortes contrastando con las demás (Figura 3).

Figura 3: Fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), proteína cruda y digestibilidad *in vitro* de *Stylosanthes guianensis* (SG), *Centrosema macrocarpum* (CM), *Pueraria phaseoloides* (PP) y *Arachis pintoi* (AP)



En PC las especies también fueron diferentes ($P \le 0.05$). Se encontró un rango promedio de 18 a 21 %, donde AP y CM fueron las especies de mayor concentración ($P \le 0.05$) en la mayoría de los cortes (Figura 3; Cuadro 2). La DIVMS también fue diferente ($P \le 0.05$) entre especies, encontrándose en promedio de cortes un intervalo de 55 a 74 %, sobresaliendo AP ($P \le 0.05$) en toda la fase de medición.

Cuadro 2. Porcentajes promedio (n=24) de FDN, FDA, PC y DIVMS de *Stylosanthes guianensis* (SG), *Centrosema macrocarpum* (CM), *Pueraria phaseoloides* (PP) y *Arachis pintoi* (AP)

Variable	SG	CM	PP	AP	EEM
FDN	65a	66a	65a	61b	0.591
FDA	44b	46a	44b	35c	0.575
PC	19b	21a	18c	21a	0.300
DIVMS	62b	55d	57c	74a	0.945

EEM= error estándar de la media; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; PC= proteína cruda; DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

El rendimiento de MS de las cuatro especies en los seis cortes, tuvo un patrón diferencial influenciado por la temperatura y humedad del ambiente. Cuando hubo temperaturas mínimas mayores a los 18° y humedad disponible, se tuvieron los mayores rendimientos; cuando estas dos variables ambientales disminuyeron, la acumulación de MS también disminuyó. En otro estudio⁽⁹⁾ con Stylosanthes guianenesis, Arachis pintoi, Pueraria phaseoloides y Clitoria ternatea se obtuvieron resultados similares. Dicho estudio reporta durante un periodo de rebrote de 21 a 84 días, mayor incremento de MS en las cuatro especies (1.17 a 6.52 t ha⁻¹) en los meses de mayor precipitación pluvial (época de lluvias) en comparación a los meses de menor disponibilidad de humedad (0.749 a 4.37 t ha⁻¹). De acuerdo con estos autores, los resultados del presente estudio muestran que el alto potencial forrajero de las cuatro leguminosas, depende de condiciones favorables de humedad y temperatura ambiental. Por otra parte, el menor rendimiento de las leguminosas durante los meses de noviembre-febrero, posiblemente se debe a una inhabilidad de las especies para adaptarse a la estación fría. Durante estos meses (noviembre-febrero) se obtuvo la temperatura promedio más baja del estudio (12.9 °C) coincidiendo con los tres últimos cortes en donde las cuatro leguminosas mostraron menor acumulación de materia seca. Aun así, el promedio del rendimiento de MS por corte de las leguminosas del actual estudio, es similar al informado en Stylosanthes macrocephala (2,701 kg MS ha⁻¹), Pueraria phaseoloides (2,404 kg), Arachis pintoi (1,470 kg) y Centroscema pubescens (2,172 kg) por otros estudios^(9,11,21).

Las especies SG, CM y PP mostraron cantidades similares de hoja; no obstante, las primeras dos especies tuvieron mayor producción de tallos. De este modo, resultó en mayor producción de MS acumulada en las leguminosas de crecimiento semi-erecto (SG y CM) en comparación a las de crecimiento postrado (AP y PP). La leguminosa *Pueraria phaseoloides* fue la especie con mayor relación hoja-tallo, resultado que fue similar al encontrado por otro estudio⁽¹¹⁾ en *Pueraria phaseoloides* en comparación a *Stylosanthes macrocephala* y *Macrotyloma axillare*. De acuerdo a estos autores, la mayor relación hoja-tallo de PP, evidencia mayor participación de las hojas en la producción de MS de esta leguminosa, lo cual, probablemente pueda tener influencia directa en una mejor

 $^{^{}a,b,c}$ Medias con la misma letra entre hileras no son significativamente diferentes ($P \ge 0.05$).

composición bromatológica de la especie. Por el contario, SG fue la especie con el valor más bajo en esta variable (relación hoja-tallo). De acuerdo con otros autores autores (9) Stylosanthes guianensis es una especie con un hábito de crecimiento semi-erecto, semi-leñoso y con ramificaciones cortas, teniendo menor proporción de hojas en la biomasa aérea en comparación a otras especies como Arachis pintoi, Pueraria phaseoloides y Clitoria ternatea.

El menor contenido de FDN y FDA en AP en comparación a las otras especies posiblemente se deba a las diferencias en hábitos de crecimiento. Las leguminosas de crecimiento erecto como CM y SG generalmente acumulan mayor cantidad de carbohidratos estructurales en los tallos para apoyar el follaje de la planta en comparación a una especie de crecimiento postrado como AP⁽²²⁾. *Pueraria phaseoloides* tuvo el mismo hábito de crecimiento que AP; sin embargo, tuvo una cantidad similar de FDN y FDA que SG y CM. Esto indica que PP a pesar de tener un hábito de crecimiento postrado y presentar mayor relación hoja-tallo, está compuesta de una mayor cantidad de componentes fibrosos (FDN y FDA) en comparación a AP. Los valores de FDN y FDA de las especies SG y CM son comparables a aquellos reportados en otro estudio⁽¹⁰⁾ en las leguminosas *Stylosanthes scabra* y *Centrosema pubescens*. En estas especies tal estudio reportó un contenido de FDN de 50 y 53 % y un contenido de FDA de 40 y 48 %, respectivamente.

El alto contenido de PC en AP coincide con su menor proporción de FDN y FDA presente en la mayoría de los cortes. Este resultado también fue encontrado en otro estudio⁽⁹⁾ señalando que esto es debido a que AP es una especie que mantiene una proporción de hoja estable durante todo su crecimiento y por tanto mayor contenido celular. De acuerdo con algunos autores⁽²³⁾ es en las hojas que se acumula una mayor proporción de N derivado de las reservas de raíces y tallos maduros. Esto ayuda a explicar la similitud en contenido de PC entre AP y CM, ya que esta última especie mostró incluso mayor cantidad de hojas que AP, mientras que fueron similares en relación hoja tallo. Por otra parte, PP aunque tuvo mayor cantidad de hojas y mayor relación hoja-tallo que AP, fue la especie que mostró menor contenido de PC; incluso SG, que presentó más cantidad de tallos, en esta variable (PC) superó a PP. Hay evidencias (9) de que esta especie presenta un bajo contenido de PC aun cuando presenta una gran cantidad de follaje durante todo su crecimiento. A pesar de las diferencias (en proteína) que hubo entre las especies evaluadas en el actual estudio, el contenido de PC de las cuatro leguminosas estuvo por encima de los requerimientos mínimos de mantenimiento de rumiantes, el cual se ha estimado en 7 %⁽³⁾.

La especie *Arachis pintoi* en todos los cortes mantuvo la mayor digestibilidad *in vitro*, la cual se relaciona directamente con su menor contenido de FDN y FDA durante su crecimiento. Por el contrario, las especies PP y CM mantuvieron los valores más bajos de digestibilidad, lo cual a la inversa de AP, se debe a su alto contenido de fibras que estas

especies presentaron durante los cortes. Es posible también que la baja digestibilidad de estas especies (PP, CM) se deba a una alta concentración de lignina (no evaluada en este estudio) en estas leguminosas, ya que ésta reduce considerablemente la digestibilidad de la MS de los forrajes⁽³⁾. Al respecto, en otro estudio⁽¹⁰⁾ se encontró que la baja digestibilidad de *Centrosema pubescens* y *Stylosanthes scabra* fue debido a un alto contenido de FDN y FDA, pero principalmente debido a la alta concentración de lignina (17 y 18 %, respectivamente) presente en dichas especies. No obstante, como se señala en otro estudio⁽²⁴⁾, el valor nutritivo de una planta forrajera puede variar de acuerdo a la especie, condiciones climáticas, sitio de muestreo y etapa vegetativa de las plantas.

La producción de MS de las cuatro leguminosas fue variable y afectada principalmente por la precipitación pluvial y temperaturas del sitio experimental, mientras que la composición química de las especies fue determinada principalmente por la diferencia entre especies. *Stylosanthes guianensis* y *Centrosema macrocarpum* mostraron la mayor producción de MS. Sin embargo, en términos de calidad nutritiva, AP fue la mejor especie principalmente por su alto contenido de PC y digestibilidad. A pesar de las diferencias entre especies, las cuatro leguminosas presentaron un alto valor nutritivo, por lo que se presentan como fuentes forrajeras alternativas para complementar las dietas de rumiantes de baja calidad nutritiva en la región de estudio.

Literatura citada:

- 1. Dewhurst RJ, Delaby RJ, Moloney A, Boland T, Lewis E. Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. Irish J Agric Food Res 2009;48:167-187.
- Enriquez-Hidalgo D, Hennessy D, Gilliland T, Egan M, Mee JF, Lewis E. Effect of rotationally grazing perennial ryegrass white clover or perennial ryegrass only swards on dairy cow feeding behavior, rumen characteristics and sward depletion patterns. Livest Sci 2014;169:48-62.
- 3. Nunes ATD, Cabral LV, Amorim ELC, dos Santos MVF, Albuquerque UP. Plants used to feed ruminants in semi-arid Brazil: a study of nutritional composition guided by local ecological knowledge. J Arid Environ 2016;135:96-103.
- 4. Geleti D, Hailemariam M, Mengistu A, Tolera A. Nutritive value of selected browse and herbaceous forage legumes adapted to medium altitude subhumid areas of western Oromia, Ethiopia. Glob Vet 2013;11(6):809-816.
- 5. Phengsavanh P, Frankow-Linberg BE. Effect of harvesting interval on biomass yield and nutritive value of five tropical forage legumes (*Aeschynomene histrix* 'BRA 9690', *Canavalia brasiliensis* 'CIAT 17009', *Stylosanthes guianensis* 'CIAT 184' and 'Composite' and *Vigna unguiculata* 'CIAT 1088-4') in Lao PDR. Grassl Sci 2013;59(2):80-26.

- 6. Muamba IT, Ignatius VN, Mangeye HK, Hornick JL. Nutritive value of *Adenodolichos rhomboideus* leaves compared with *Leucaena leucocephala* and *Stylosanthes guianensis* forages in indigenous goats in Lubumbashi (DR Congo). Biotechnol, Agrono, Soc Environ 2014;18(2):165-173.
- 7. Njoka-Njiru EN, Njarui MG, Abdulrazak SA, Mureithi JG. Effect of intercropping herbaceous legumes with Napier grass on dry matter yield and nutritive value of the feedstuffs in semi-arid region of eastern Kenya. Agric Trop Subtrop 2006;39(4):255-267.
- 8. Njarui DMG, Njoka EN, Abdulrazak SA, Mureithi JG. Effect of planting patterns of two herbaceous forage legumes in fodder grasses on productivity of grass/legume mixture in semi-arid tropical Kenya. Trop Subtrop Agroecosyst 2007;7(2):73-85.
- 9. García-Ferrer L, Bolaños-Aguilar ED, Ramos-Juárez J, Osorio-Arce M, Lagunes-Espinoza LC. Yield and nutritive value of forage legumes in two seasons and four regrowth stages. Rev Mex Cienc Pecu 2015;6(4):453-468.
- 10. Musco N, Koura IB, Tudisco R, Awadjihè G, Adjolohoun S, Cutrignelli MI, Mollica MP, Houinato M, Infascelli F, Calabró S. Nutritional characteristics of forage grown in south of Benin. Asian-Austr J Anim Sci 2016;29:51-61.
- 11. Araújo SAC, da Silva TO, Rocha NS, Ortêncio MO. Growing tropical forage legumes in full sun and silvopastoral system. Act Scient Anim Sci 2017;39:27-34.
- 12. Di Palma MVL, Méndez AC. Leguminosa forrajera Maní mejorador *Arachis pintoi* CIAT 17434. Una alternativa para la ganadería. Costa Rica. Boletín divulgativo 1994;1-18.
- 13. Pozo LA, Alvarado AA, Carrera MB, Pilalola DW. Evaluación de distintas densidades de siembra de Kudzú tropical (*Pueraria phaseoloides*) como alternativa de cobertura vegetal en plantaciones de cacao en la zona agrícola del cantón El Triunfo, provincia del Guayas. Mis Agro 2016;(11):1-20.
- 14. Ramírez-Bahena MH, Chahbohune R, Velázquez E, Gómez-Moriano A, Mora E, Peix A, Toro M. *Centrosema* is a promiscuous legume nodulated by several new putative species and symbiovars of *Bradyrhizobium* in various American countries. Syst Appl Microbiol 2013;392-400.
- 15. COTECOCA, Comisión técnico consultiva para la determinación regional de los coeficientes de agostadero, SAGARPA, Delegación en el Estado de Puebla, Subdelegación Agropecuaria. 2001:1-2.
- 16. Ankom Technology. Operator's manual. Ankom Technology, Macedon, New York 2006.
- 17. AOAC. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 17th. ed. Washington, USA. 2000.

- 18. Jones DIH, Hayward MV. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. J Sci Food Agric 1975;26:711-718.
- 19. Clarke T, Flinn PC, Mcgowan AA. Low-cost pepsin-cellulase assays for prediction of digestibility of herbage. Grass Forage Sci 1982;37:147-150.
- 20. SAS (Statistical Analysis System). User's Guide: Statistics, version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, North Caroline, USA; 2002.
- 21. Adjolohoun S, Buldgen A, Adandedjan C, Decruyenaere V, Dardenne P. Yield and nutritive value of herbaceous and browse forage legumes in the Borgou region of Benin. Trop Grassl 2008;42(2):104-111.
- 22. Mupangwa JF, Ngongoni NT, Hamudikuwanda H. The effect of stage of growth and method of drying fresh herbage on chemical composition of three tropical herbaceous forage legumes. Trop Subtrop Agroecosyst 2006;6:23-30.
- 23. Black AD, Laidlaw AS, Moot DJ, O'Kiely P. Comparative growth and management of white and red clovers. Irish J Agric Food Res 2009;48:149-166.
- 24. Adjolohoun S, Mahamadou D, Claude A, Soumanou TS, Valentin K, Brice S. Evaluation of biomass production and nutritive value of *Panicum maximum* ecotypes in Central region of Benin. Afr J Agric Res 2013;8:1661-1668.