

## ***In vitro* gas production of two new varieties of sugar cane (*Saccharum* spp. C97-366 and C99-374), selected for forage**

### **Producción de gas *in vitro* de dos nuevos cultivares de caña de azúcar (*Saccharum* spp. C97-366 y C99-374) seleccionados para forraje**

R.M. Pedraza<sup>1</sup>, Y. Fernández<sup>2</sup>, Ailsa Llánes<sup>2</sup>, Cecilia E. González<sup>1</sup> and Marlene León<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz", Camagüey 74650, Cuba

<sup>2</sup>Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA). Florida, Camagüey, Cuba  
E-mail: redimio.pedraza@reduc.edu.cu

This paper presents dynamics and parameters of *in vitro* gas production of integral forage of two new cultivars of sugarcane (*Saccharum* spp., C97-366 and C99-374.), selected for forage, and compared with a control (My5514 commercial variety). Integral forage samples were analyzed, according to a completely randomized design, at eleven months of regrowth with the use of the technique of *in vitro* gas production. New varieties showed higher gas production ( $P < 0.05$ ) than My5514 at 48, 72 and 96 h of incubation, without significant differences among them. Gas production parameters, lag phase and gas production potential (b) ranged from 2.48 to 3.27 h and 32.7 to 36.6 mL, respectively. Gas production speed (c) ranged from 0.023–0.024 h<sup>-1</sup>. The two new cultivars had generally better *in vitro* digestibility than the control.

Key words: *cultivar selection, sugarcane, digestibility*

Traditionally, selection of sugarcane cultivars for forage begins with the evaluation of phenological and nutritional characteristics, mainly *in vitro* and *in situ*, of cultivars selected for sugar production. However, the sugarcane selection procedure for sugar industry discards candidates who do not show a prominent development of stems in relation to the number of leaves. The Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) in Florida, and the University of Camagüey, both in the province of Camaguey, Cuba, developed a joint study with two new sugarcane cultivars for forage. The study began with the selection procedure established for obtaining sugarcane commercial cultivars for sugar production (Jorge *et al.* 2011), with the main difference that, after hybridization, those individuals with more potential to produce leaf-shaped forage, and no sugar, were rejected.

As part of the experiments, 106 candidates were evaluated, of which two showed the best phenological characteristics, lower content of total solids, leaf:stem relation and resistance to pests, diseases and water stress. Later, other indicators were studied in the field (Fernández 2015, Llanes 2015) like their phenological characteristics and biomass production, acceptance by the animals and *in vitro* digestibility using gas production technique, proposed by Menke and Steingass (1988), widely recognized as a useful tool to provide nutritional

Se presenta la dinámica y parámetros de producción de gas *in vitro* del forraje integral de dos nuevos cultivares de caña de azúcar (*Saccharum* spp., C97-366 y C99-374), seleccionados para forraje y comparados con un control: el cultivar comercial My5514. Se analizaron, según un diseño completamente al azar, muestras del forraje integral a los once meses de rebrote con utilización de la técnica de producción de gas *in vitro*. Los nuevos cultivares mostraron mayor producción de gas ( $P < 0.05$ ) que My5514 a las 48, 72 y 96 h de incubación, sin diferencias significativas entre ellos. Los parámetros de producción de gas, fase lag y potencial de producción de gas (b), oscilaron entre 2.48–3.27 h y 32.7–36.6 mL, respectivamente. La velocidad de producción de gas (c) fluctuó entre 0.023–0.024 h<sup>-1</sup>. Los dos nuevos cultivares tuvieron, en general, mejor digestibilidad *in vitro* que el control.

Palabras clave: *selección de cultivares, caña de azúcar, digestibilidad*

Tradicionalmente, la selección de cultivares de caña para forraje parte de la evaluación de las características fenológicas y de valor nutritivo, fundamentalmente *in vitro* e *in situ*, de cultivares seleccionados para la producción de azúcar. Sin embargo, el esquema de selección de caña para la industria azucarera desecha, lógicamente, los candidatos que no muestran un prominente desarrollo de tallos en relación con la cantidad de hojas. La Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) en Florida, y la Universidad de Camagüey, ambas en la provincia de Camaguey, Cuba, desarrollaron un trabajo conjunto con dos nuevos cultivares de caña para forraje. El estudio partió del esquema de selección establecido para la obtención de cultivares comerciales de caña destinados a la producción de azúcar (Jorge *et al.* 2011), con la diferencia fundamental de que después de la hibridación no se desecharon aquellos individuos que se destacaban por su potencial para producir forraje en forma de hojas, y no azúcar.

Como parte de los experimentos, se evaluaron 106 candidatos, de los cuales dos mostraron las mejores características fenológicas, menor contenido de sólidos totales, relación hoja: tallo y resistencia a plagas, enfermedades y estrés hídrico. Posteriormente, se estudiaron en campo (Fernández 2015, Llanes 2015) sus características fenológicas y de producción de biomasa, la aceptación por los animales y la digestibilidad *in vitro* con la utilización de la técnica de producción de gases, propuesta por

criteria for ruminants. This technique, like other methods of *in vitro* and *in situ* digestibility, is a complement to agronomic studies for selection of grass and forage plants for cattle.

This study shows the dynamics and parameters of gas production, at eleven months of growth, of integral forage from two new cultivars of sugarcane (*Saccharum spp.*, C97-366 and C99-374), compared to My5514 commercial cultivar.

The agronomic experiment that provided samples for this study was conducted in the Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) in Florida, and the study of *in vitro* gas production was performed in the University of Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, both in Camagüey province, Cuba.

Three cultivars under study (*Saccharum spp.*, C97-366 and C99-374, and My5514 as control) were sown in a brown soil with carbonates (Hernández *et al.* 1999), in November, 2009, with a plantation of 0.40 m x 1.60 m, according to a random block design with three replications, in plots of 5.5 m long and 5 m wide. The only fertilization was carried out with a complete formula (NPK) at the moment of sowing and 45 d later, with a total of 180 kg/ha of N, 100 kg/ha of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and 240 kg/ha of K<sub>2</sub>O. Establishment cut was carried out at 11 months, in October, 2010. All the field experiment was conducted under dry conditions.

At 11 months of growth, three samples of each cultivar were taken as replication, composed by a stem with leaves and buds cut at soil level, and cut with machetes. Representative samples of both were dried at 65° C in a forced air oven for 48 h. Later, these samples were ground with a hammer mill up to go through a sieve of 1 mm.

*In vitro* gas production was evaluated with the use of a technique proposed by Menke and Steingass (1988), modified to use bovine feces, recently excreted, as inoculum, according to the description of Martínez (2008). Crystal syringes, calibrated with 100 mL of capacity, were used (FORTUNA®, HäberleLabortechnik Germany). Samples were analyzed according to a completely random design with three replications.

Solver program of Microsoft Excel® was used to determine parameters from Ørskov and McDonald (1979) model, cited by Martínez (2008), modified to consider adaptation or lag phase (Correa 2004):

$$\text{for } t \leq L \quad V = 0$$

$$\text{for } t > L \quad V = b \cdot (1 - \text{EXP}(-c \cdot t))$$

where:

V – accumulated volume in mL/200 mg of dry sample

t – time in hours

b – volume when  $t \rightarrow \infty$ .

b – specific growth speed of gas volume in the exponential phase

Menke y Steingass (1988), ampliamente reconocida como herramienta útil para ofrecer criterios del valor nutritivo para rumiantes. Esta técnica, al igual que otros métodos de digestibilidad *in vitro* e *in situ*, constituye un complemento a los estudios agronómicos destinados a la selección de plantas pratenses y forrajeras destinadas al ganado.

En este trabajo se muestra la dinámica y parámetros de producción de gases, a los once meses de crecimiento, del forraje integral de dos nuevos cultivares de caña de azúcar (*Saccharum spp.*, C97-366 y C99-374), comparados con el cultivar comercial My5514.

El experimento agronómico que aportó las muestras para este trabajo se realizó en la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) en Florida y el estudio de la producción de gas *in vitro* en la Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz”, ambos en la provincia de Camagüey, Cuba.

Los tres cultivares en estudio (*Saccharum spp.*, C97-366, C99-374 y el control My5514) se plantaron en un suelo pardo con carbonatos (Hernández *et al.* 1999), en noviembre de 2009, con marco de plantación de 0.40 m x 1.60 m, según diseño de bloques al azar con tres réplicas, en parcelas de 5.5 m de largo y 5 m de ancho. La única fertilización se realizó con fórmula completa (NPK), en el momento de la plantación y 45 d después, para totalizar 180 kg/ha de N, 100 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 240 kg/ha de K<sub>2</sub>O. El corte de establecimiento se realizó a los 11 meses, en octubre de 2010. Todo el experimento de campo se realizó en condiciones de secano.

A los once meses de rebrote, se tomaron por réplica tres muestras de cada cultivar, compuestas por un tallo con hojas y cogollo cortado a ras del suelo, que se troceó con machetes. Las muestras representativas de ambos se secaron a 65° C en estufa con circulación forzada de aire durante 48 h. Posteriormente, se molieron en molino de martillo hasta pasar por un tamiz de 1 mm.

La producción de gas *in vitro* se evaluó con el uso de la técnica propuesta por Menke y Steingass (1988), modificada para utilizar como inóculo heces bovinas recién depuestas, según lo descrito por Martínez (2008). Se usaron jeringuillas de cristal calibradas de 100 mL de capacidad (FORTUNA®, HäberleLabortechnik Alemania). Las muestras se analizaron de acuerdo con un diseño completamente al azar con tres replicas.

Se utilizó el programa Solver de Microsoft Excel® para determinar los parámetros del modelo de Ørskov y McDonald (1979), citado por Martínez (2008), modificado para considerar la fase lag o de adaptación (Correa 2004):

$$\text{para } t \leq L \quad V = 0$$

$$\text{para } t > L \quad V = b \cdot (1 - \text{EXP}(-c \cdot t))$$

donde:

V – volumen acumulado en mL/200 mg de muestra seca

t – tiempo en horas.

b – volumen cuando  $t \rightarrow \infty$ .

b – velocidad específica de crecimiento de volumen de gas en la fase exponencial.

Se determinaron estadígrafos descriptivos. Se analizó

Descriptive indicators were determined. Normality of data of gas volume was analyzed by Shapiro-Wilk test (Shapiro and Wilk 1965), and analysis of variance were conducted every hour of incubation. Differences among means were determined by Tukey test, at  $P < 0.05$  (Tukey 1958). All statistic processing was carried out with the SPSS statistical package for Windows, 15.0.1 version (IBM Corporation 2006).

Lee *et al.* (2014) stated different criteria to select sugar cane cultivars for forage and for its use in grazing. One of the main principles to select sugarcane for forage is the ability to transform sun energy into biomass, mainly as leaves for ruminant feeding, which is the least lignified fraction and with best content of nitrogen. Biomass quality is an important element to consider differences among cultivars to be recommended. This depends on the cultivar, soil, sowing areas, regrowth age, sowing cares (Fabris *et al.* 2014) and season and time of harvest (Lee *et al.* 2015).

Figure 1 shows *in vitro* gas production, at 24, 48, 72 and 96 h of incubation, of samples from integral sugarcane of three cultivars with 11 months of growth. As it is observed, there were significant statistical differences ( $P < 0.05$ ) at 24, 48, 72 and 96 h of incubation. New cultivars (C99-374 and C97-366) reached the highest values of *in vitro* gas production at 24 h of incubation. Only C97-366 showed no significant statistical differences regarding the control (My5514).

Results demonstrated that these two new cultivars produce similar gas volumes at 24 h, and superior to control (My5514), mainly at a higher time of incubation. Studies conducted with these two cultivars state that C97-366 variety reached the best yields of dry matter at 11 months of growth, and all cultivars were well accepted by ovines under taste test (Fernández 2015, Llanes 2015).

Results reached during lag phase (figure 2) were inferior to those reported by Martínez (2008) in a study of 13 tropical forages (two families and 11 genera). These suggest a proper presence of available sugars for microbial growth in those three cultivars. Likewise, potential values of gas production were superior and those of gas production speed were similar to that reported by Martínez (2008). Differences with My5514 cultivar may be determined by lower proportion of stems and higher proportion of leaves that characterize these new cultivars. Lee *et al.* (2014) state that it is important to improve leaf content because this fraction is the most digestible and with the highest density of nutrients.

Results of dynamics and parameters of *in vitro* gas production showed that these two new cultivars (C97-366 and C99-374) had better *in vitro* digestibility than control (My5514).

la normalidad de los datos de los volúmenes de gas por la Prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk 1965) y se realizaron análisis de varianza en cada hora de incubación. Las diferencias entre medias se determinaron por la Prueba de Tukey, para  $P < 0.05$  (Tukey 1958). Todo el procesamiento estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 15.0.1 (IBM Corporation 2006).

Lee *et al.* (2014) señalaron diversos criterios para seleccionar cultivares de caña para forraje y también para su uso en pastoreo. Uno de los principios fundamentales para seleccionar caña de azúcar para forraje es la habilidad para convertir la energía del sol en biomasa, principalmente en forma de hojas destinadas a la alimentación de rumiantes, fracción de la planta menos lignificada y con mejor contenido de nitrógeno. La calidad de esta biomasa es un elemento importante para considerar las diferencias de los cultivares que se desean recomendar. Esto depende, además del cultivar, del suelo, los marcos de plantación, la edad de rebrote, las atenciones culturales (Fabris *et al.* 2014) e incluso, de la época y hora de la cosecha (Lee *et al.* 2015).

En la figura 1 se muestra la producción de gas *in vitro*, a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación, de las muestras de caña integral de los tres cultivares con once meses de crecimiento. Como se observa, hubo diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) a las 24, 48, 72 y 96 h de incubación. Los nuevos cultivares C99-374 y C97-366 alcanzaron los mayores valores de producción de gas *in vitro*, a las 24 h de incubación. Solo el cultivar C97-366 no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo My5514.

Los resultados muestran que los dos nuevos cultivares producen volúmenes de gas similares a las 24 h, y superiores al cultivar testigo My5514, fundamentalmente a mayor tiempo de incubación. Trabajos realizados con estos dos nuevos cultivares refieren que la variedad C97-366 alcanzó los mejores rendimientos de materia seca a los 11 meses de crecimiento, y que todos los cultivares fueron bien aceptados por ovinos en pruebas de cafetería (Fernández 2015, Llanes 2015).

Los resultados alcanzados en la fase lag (figura 2) fueron inferiores a los informados por Martínez (2008) en un estudio de 13 forrajes tropicales (dos familias y 11 géneros). Esto sugiere la presencia adecuada de azúcares disponibles para el crecimiento microbiano en los tres cultivares. A su vez, los valores del potencial de producción de gas fueron superiores y los de la velocidad de producción de gas, similares a los informados por Martínez (2008). Las diferencias con el cultivar My5514 pueden estar determinadas por la menor proporción de tallos y mayor proporción de hojas que caracterizan a estos dos nuevos cultivares. Lee *et al.* (2014) se refieren a lo deseable de mejorar el contenido de hojas, ya que esta fracción es la más digerible y de mayor densidad de nutrientes.

Los resultados de la dinámica y parámetros de producción de gas *in vitro* manifestaron que los dos nuevos cultivares (C97-366 y C99-374) tuvieron digestibilidad *in vitro* mejor que el control (My5514).

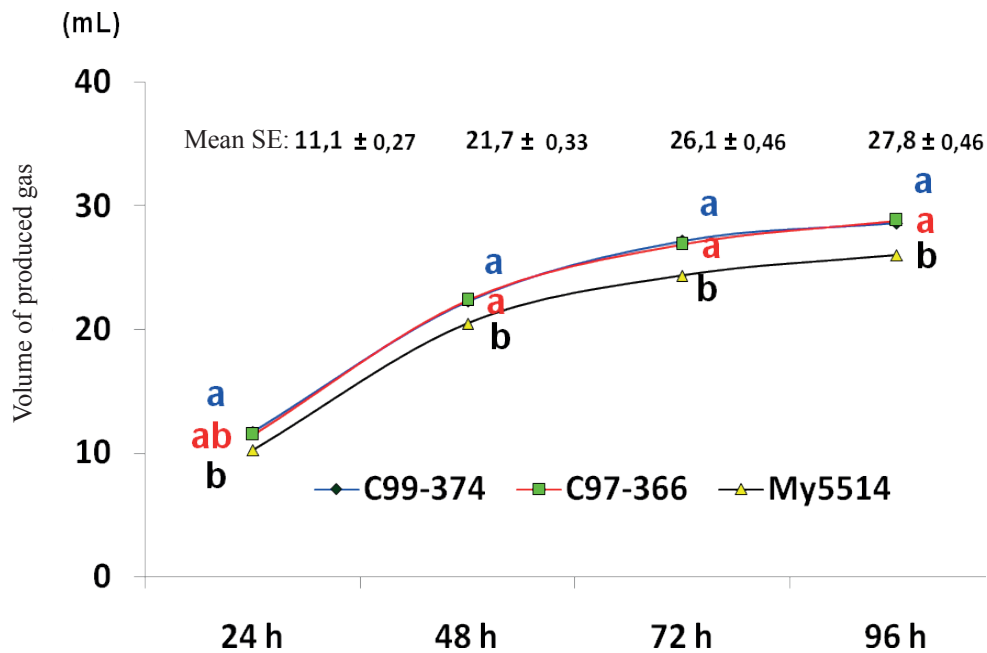


Figure 1. Dynamics of *in vitro* gas production of integral forage from three cultivars at 11 months of growth (statistical differences with  $P < 0.05$ )

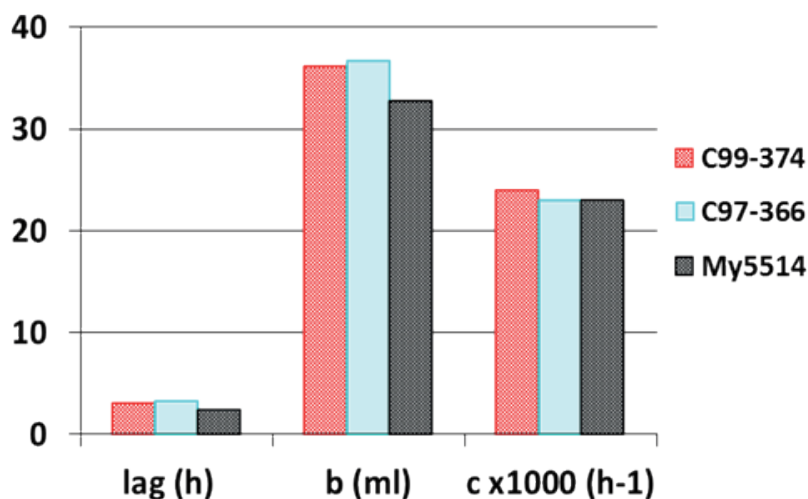


Figure 2. Parameters of *in vitro* gas production (adaptation or lag phase, b potential of gas production, c gas production speed)

### References

- Correa, H. J. 2004. "RUMENAL: procedimiento para estimar los parámetros de cinética ruminal mediante la función Solver de Microsoft Excel®". Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 17(3): 250–254, ISSN: 2256-2958.
- Fabris, L. B., Simoneti, F. J. S., Santos, D. H., Calonego, J. C., Silva, P. C. G. & Brancalhão, S. R. 2014. "Production and quality of forage cane based on variety, row spacing and time of harvest". Global Advanced Research Journal of Agricultural Science, 3(1): 16–23, ISSN: 2315-5094.
- Fernández, Y. 2015. Indicadores del valor nutritivo *in vitro* de dos nuevos cultivares de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) para forraje. M.Sc. Thesis, Universidad de Camagüey, Camagüey, Cuba, 87 p.
- Hernández, J. A., Pérez, J. M., Bosch, D., Rivero, L., Camacho, E., Ruíz, J., Salgado, E. J., Marsán, R., Obregón, A., Torres, J. M., Gonzáles, J. E., Orellana, R., Paneque, J., Ruiz, J. M., Mesa, A., Fuentes, E., Durán, J. L., Pena, J., Cid, G., Ponce de León, D., Hernández, M., Frómata, E., Fernández, L., Garcés, N., Morales, M., Suárez, E. & Martínez, E. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana, Cuba: AGROINFOR, 64 p., ISBN: 959-246-022-1.
- IBM Corporation 2006. IBM SPSS Statistics. version 15.0.1, [Windows], Multiplataforma, U.S: IBM Corporation, Available: <<http://www.ibm.com>>.
- Jorge, H., González, R., Casas, M. A. & Jorge, I. 2011. "Normas y procedimientos del programa de mejora genética de la caña de azúcar en Cuba". Cuba & Caña, 32: 115–146, ISSN: 1028-6527.
- Lee, C. N., Fukumoto, G. K., Nakahata, M. & Ogoshi, R. M. 2014. Sugarcane Crosses as Potential Forages for Ruminants:

- Selection Criteria. (ser. Pasture and Range Management, no. ser. PRM-6), Honolulu, Hawaii: College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR), University of Hawaii at Mānoa, 7 p., Available: <<http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PRM-6.pdf>>, [Consulted: August 4, 2016].
- Lee, C. N., Fukumoto, G. K., Thorne, M. S., Stevenson, M. H., Kim, Y. S., Nakahata, M. & Ogoshi, R. M. 2015. Sugarcane Crosses as Potential Forages for Ruminants: Nutrient Compositions Were Influenced by Season and Time of Harvest. (ser. Pasture and Range Management, no. ser. PRM-8), Honolulu, Hawaii: College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR), University of Hawaii at Mānoa, 9 p., Available: <<http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PRM-8.pdf>>, [Consulted: August 4, 2016].
- Llanes, A. 2015. Comportamiento fenológico y aceptabilidad por ovinos de dos nuevos cultivares de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) para forraje. M.Sc. Thesis, Universidad de Camagüey, Camagüey, Cuba, 99 p.
- Martínez, S. J. 2008. Heces vacunas depuestas como inóculo en la técnica de producción de gases para la valoración nutritiva *in vitro* de forrajes. Ph.D. Thesis, Universidad de Camagüey, Camagüey, Cuba, 119 p.
- Menke, K. H. & Steingass, H. 1988. "Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid". *Animal Research and Development*, 28(1): 7–55, ISSN: 0340-3165.
- Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. 1965. "An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)". *Biometrika*, 52(3–4): 591, ISSN: 0006-3444, DOI: 10.2307/2333709.
- Tukey, J. W. 1958. "Bias and confidence in not quite large samples". *The Annals of Mathematical Statistics*, 29(2): 614–623, ISSN: 0003-4851, DOI: 10.1214/aoms/1177706647.

**Received: February 22, 2016**