

Evaluation of the inclusion of *Moringa oleifera* in the nutritional value of silage of *Cenchrus purpureum* cv. Cuba CT-169

Evaluación de la inclusión de *Moringa oleifera* en el valor nutritivo de ensilajes de *Cenchrus purpureum* vc. Cuba CT-169

R. Rodríguez¹, E. Borges², D. Gutiérrez¹, A. Elías¹, S. Gómez¹ and O. Moreira¹

¹Instituto de Ciencia Animal, Carretera Central, km 47 1/2, San José de las Lajas, A. Postal 24

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Holguín, Avenida XX Aniversario, Vía Guardalavaca, Piedra Blanca, Holguín
Email: rrodriguez@ica.co.cu

The effect of the inclusion of *Moringa oleifera* in the nutritional value of silages of *C. purpureus* cv. Cuba CT-169 was evaluated mixed in five proportions (100:0, 80:20, 60:40, 40:60 and 20:80, humid base). The chemical composition of the silage improved in terms of a higher crude protein and lower neutral detergent fibre when *M. oleifera* was included ($P < 0.00$). The analysis of the *in vitro* gas production showed an interaction between the two factors in the three phases of the fermentation ($P < 0.05$). In the initial and in the intermediate phase the highest gas production was in the treatments with *Moringa oleifera* respect to the silage of *C. purpureus*. Nevertheless, in the final phase the silage gas production of *C. purpureus* was higher respect to the others at 96 and 120 hours. Kinetic parameters indicated that 100 % of *C. purpureus* tended to show the highest fermentative potential (113.3 mLg⁻¹ OM inc). The highest V_{max} was obtained with the silage of 60 % of *M. oleifera* (0.739 mL.g⁻¹ OM inc h⁻¹), although the lowest TV_{max} was reached with 40 % of *M. oleifera*. Silage with 40 % of *M. oleifera* showed the highest MBS in relation to the other treatments, except in silage with 20 % of the tree plant ($P < 0.05$). It is concluded that the inclusion of the *M. oleifera* in mixed silage improved the nutritive quality of the products obtained when levels of proteins are increased and those of NDF are reduced respect to the grass used. Silage with 40 % of inclusion of *M. oleifera* was the best combination due to the adequate levels of CP and lower NDF and also its fermentation indicated higher V_{max}, lower TV_{max} and higher microbial efficiency in comparison to other treatments.

Key words: *mixed silage, quality, fermentation, gas production.*

Grasses and forages are the main and the most economic source of nutrients for ruminants in the tropics (Ramos-Trejo *et al.* 2013). However, the production of these plants varies through the year, and in the dry season the availability of biomass is not enough to satisfy the animal requirements, but in the rainy season forage biomass surpluses are produced, which may be lost if no conservation procedures are implemented. Hay and silage production are the only option available for farmers that conserve forage at a large scale for its use in dry season. Silages have advantages respect to hay production because a higher amount of forage can be conserved in less time, are less influenced by climate, are easier to manage and reduce substantially deterioration due to rainfall and losses in the field although a decrease of nutritive value is observed (CharmLey 2001).

Se evaluó el efecto de la inclusión de *M. oleifera* en el valor nutritivo de ensilajes de *C. purpureus* vc. Cuba CT-169 y *M. oleifera*, mezclados en cinco proporciones (100:0, 80:20, 60:40, 40:60 y 20:80, base húmeda). Al incluir *M. oleifera*, la composición química de los ensilados mejoró ($P < 0.001$), en términos de mayor proteína bruta y menor fibra detergente neutra. El análisis de la producción de gas *in vitro* mostró que hubo interacción entre los dos factores en las tres fases de la fermentación ($P < 0.05$). En las fases inicial e intermedia, la mayor producción de gas correspondió a los tratamientos con *M. oleifera* respecto al ensilaje de *C. purpureus*. Sin embargo, en la fase final la producción de gas del ensilaje de *C. purpureus* fue mayor respecto al resto, a las 96 y 120 h. Los parámetros cinéticos mostraron que 100 % de *C. purpureus* tendió a mostrar el mayor potencial fermentativo (113.43 mL.g⁻¹ MOinc). La mayor V_{max} correspondió al ensilaje con 60 % de *M. oleifera* (0.739 mL.g⁻¹MOinc.h⁻¹), aunque el menor TV_{max} se alcanzó con 40 % de *M. oleifera*. El ensilaje con 40 % de *M. oleifera* mostró mayor eficiencia de síntesis de biomasa microbiana y factor de partición que el resto de los tratamientos, excepto el ensilaje con 20 % de la arbustiva ($P < 0.05$). Se concluye que la inclusión de *M. oleifera* en ensilajes mixtos mejoró la calidad nutritiva de los productos obtenidos al incrementar los niveles de proteína y reducir los de fibra detergente neutro, respecto al de gramínea. El ensilaje con 40 % de inclusión de *M. oleifera* fue la mejor combinación, por sus adecuados niveles de proteína bruta, menor fibra detergente neutro y a que su fermentación mostró alta V_{max}, bajo TV_{max} y mayor eficiencia microbiana.

Palabras clave: *ensilajes mixtos, calidad, fermentación, producción de gas*

Los pastos y forrajes constituyen la principal y más económica fuente de nutrientes para los rumiantes en el trópico (Ramos-Trejo *et al.* 2013). Sin embargo, su producción varía durante el año y, en la época menos lluviosa, la disponibilidad de biomasa no satisface los requerimientos de los animales, mientras que en la lluviosa se producen excedentes de biomasa forrajera que se pierden si no se conservan de forma eficiente. La producción de heno y de ensilaje son las únicas opciones de las que disponen los ganaderos que desean conservar forrajes a gran escala para el período poco lluvioso. El ensilaje tiene como ventajas con respecto a la producción de heno que se puede conservar mayor cantidad de forraje en un menor tiempo, es menos dependiente del clima, es más fácil de manejar y reduce substancialmente el deterioro por las lluvias y las pérdidas en campo, aunque hay una pérdida del valor nutritivo del forraje (CharmLey 2001).

In the tropic, silages are generally elaborated using grasses with low content of protein and high fibre and this result in a material of low quality. *C. purpureus* is a forage species highly utilized in Cuba due to higher biomass production, good leaves production, rusticity and adaptation to a great diversity of soils and adverse climate conditions (García *et al.* 2014). Among the clones obtained and utilized in Cuba as forage, the cultivar CT-169 is one of the highest height, fastest growth and highest dry matter yield (Martínez *et al.* 2010).

Forage tree legumes, other legumes and plants can be used in tropical silages to increase protein content. *Moringa oleifera* is a shrub with high nutritional quality and good green biomass production (Nouman *et al.* 2014). The high protein content is utilized to improved nitrogen balance in mixed silage elaborated with the excess of forage biomass obtained in the rainy season (Roa and Galeano 2015).

The objective of the present experiment was to evaluate the effect of inclusions of *M. oleifera* forage in the nutritive valued of silage of *C. purpureus* cv. Cuba CT-169, considering the chemical composition and gas production.

Material and Methods

Obtained the evaluated silage. Treatments consist in the evaluation of five silages obtained by the mixture of five proportion of *C. purpureus* and *M. oleifera* (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 on a humid base respectively). Forage of *C. purpureus* cv. Cuba CT-169 and *M. oleifera* were of 60 and 50 days of age respectively and collected in areas of the Instituto de Ciencia Animal (ICA) in Cuba previously established in red ferralitic soil (Hernández *et al.* 1999) without fertilization or irrigation. When both forages were harvested, they were milled and dried in the sun to increase dry matter content (DM) at 30 % (Reyes *et al.* 2008).

Different proportions of forage were mixed and compacted in microsilos elaborated in PVC tubes (24 cm x 10cm) with a capacity of 450 g of fresh forage (Gutiérrez *et al.* 2015). Finally, they were hermetically closed and allocated in a protected and dry placed for 62 days. Ten microsilos per treatment were prepared.

At the end of the ensilage process they were opened and a sample of nearly 100 g was taken from each treatment and mixed until homogeneously. A pool of ensilage fresh material per treatment was stored in bags hermetically sealed and put in refrigeration (-4 °C) for the *in vitro* evaluation.

In vitro experimental procedure. The *in vitro* technique of gas production in glass bottles, described by Theodorou *et al.* (1994), was used. An amount of 1.0 g of fresh matter of each treatment was incubated in bottles of 100 mL in a culture medium (Menke and Steingass

En el trópico, los ensilajes se elaboran generalmente con gramíneas que presentan bajos contenidos de proteínas y altos de fibra, lo que da como resultado un material de baja calidad. *C. purpureus* es una especie forrajera muy utilizada en Cuba, debido a su alta producción de biomasa, buena proporción de hojas, rusticidad y adaptación a gran diversidad de suelos y condiciones climáticas adversas (García *et al.* 2014). Entre los clones de *C. purpureus* obtenidos y utilizados en Cuba como forrajes, la variedad CT-169 es uno de los de más alta talla, rápido crecimiento y rendimiento de materia seca (Martínez *et al.* 2010).

El follaje de especies arbóreas, leguminosas y no leguminosas, se puede utilizar en ensilajes tropicales para incrementar su contenido de proteínas. *Moringa oleifera* es una arbustiva forrajera con alta calidad nutricional y buena producción de biomasa verde en el campo (Nouman *et al.* 2014). Su alto contenido proteico se puede aprovechar para mejorar el balance de nitrógeno en ensilajes mixtos elaborados con los excedentes de biomasa forrajera que se obtienen durante la época lluviosa (Roa y Galeano 2015). Por ello, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inclusión del follaje de *M. oleifera* en el valor nutritivo de ensilajes de *C. purpureus* (vc. Cuba CT-169) mediante el análisis de su composición química y producción de gas *in vitro*.

Materiales y Métodos

Obtención de los ensilajes evaluados. Como tratamientos se evaluaron cinco ensilajes que se obtuvieron por la mezcla de cinco proporciones de *C. purpureus* y *M. oleifera* (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, peso en base húmeda, respectivamente). Los forrajes de *C. purpureus* (vc. Cuba CT-169) y *M. oleifera* contaban con 60 y 50 d de edad, respectivamente. Se recolectaron en las áreas forrajeras del Instituto de Ciencia Animal (ICA), de cultivos establecidos en suelo ferralítico rojo típico (Hernández *et al.* 1999), sin fertilización ni riego. Ambos forrajes, una vez cosechados y frescos, se molieron y secaron al sol para incrementar su materia seca (MS) hasta aproximadamente 30 % (Reyes *et al.* 2008).

Las diferentes proporciones de forrajes se mezclaron y compactaron en microsilos, elaborados en tubos de PVC (24 cm x 10 cm), con capacidad para 450 g de forraje fresco (Gutiérrez *et al.* 2015). Finalmente, los microsilos se cerraron herméticamente y se ubicaron por 62 d en un local protegido y seco. Se prepararon diez microsilos por tratamiento.

Al finalizar el proceso de ensilaje, se abrieron los microsilos y se tomó una muestra de aproximadamente 100 g de cada microsilo de un mismo tratamiento y se mezclaron homogéneamente. El pool de material ensilado fresco por tratamiento se almacenó en bolsas herméticamente selladas y en refrigeración (-4 °C) hasta su evaluación *in vitro*.

Procedimiento experimental in vitro. Se utilizó la técnica *in vitro* de producción de gas en botellas de

1988) and an inoculum of ruminant microorganism in the proportion of 0.20 of the total inoculation volume (80 mL).

The inoculum of the ruminal content of three Nubia adult goats (*Capra hircus*) was utilized. They were fed *ad libitum* with grass forage and free access to water and mineral salts. The ruminal content of each animal was orally collected before feed offering in the morning and then conserved in independent closed thermos until the arrival to the laboratory when were filtered through several layers of gauze and the three inoculum were mixed in equal proportion.

During the process inoculum were maintained at 39 ± 1 °C, and the anaerobiosis conditions using a continue flow of CO₂. Bottles were sealed and incubated in bath at controlled temperature of incubation (39 °C). This moment was considered as zero time of incubation.

Gas production was measured at 2, 4, 6, 8, 12, 21, 24, 30, 48, 72, 96 y 120 h by mean of a manometer HD 8804, coupled to a pressure calibration TP804 (DELTA OHM, Italy). After each measurement gas was liberated until equalize external and internal pressure in the bottle. The volume of gas was estimated from data pressure by mean of a linear regression equation pre-established (Rodríguez *et al.* 2013).

Gas (mL) = (pressure [103 Pa] + 4.95)/2.5858, n=132; r=0.991)

Gas volume was expressed in gram of organic matter (OM) incubated (OM inc). For estimating gas production kinetics, the monophasic model of Gompertz was applied:

$$Y = A * \text{Exp}(-B * \text{Exp}(-C * t))$$

Where:

Y_ gas production at t time (mL g⁻¹ OM inc)

A_ potential of gas production (asymptote) when t= ∞; mL g⁻¹ OM inc)

B_ relative rate of gas production

C- is a constant factor of the microbial efficiency (h⁻¹)

t- incubation time

It was estimated the incubation time needed to reach the maximum velocity (TV_{max}) of gas production starting from the second derivative of the Gompertz model evaluated in zero (inflexion point in the sigmoidal model). In addition, the maximum velocity of gas production (V_{max}; mL g⁻¹ ON inc h⁻¹) was studied substituting TV_{max} in the first derivate of the model (Rodríguez *et al.* 2013).

Estimation of microbial biomass synthesis. At the end of incubation, bottles were opened and the content filtered through nylon bags, previously weighed, with a porosity of 50 μm and a surface of 28 cm². The bags with the fermentation residue were dried in a forced air oven with a temperature regulated at 60 °C during 72 h. Microbial biomass synthesis (MBS, mg) was estimated by gravimetry, as the difference between DM and the content of neutral detergent fiber (NDF)

vidrio, descrita por Theodorou *et al.* (1994). Se incubó 1.0 g de materia fresca de cada tratamiento en botellas de 100 mL, en medio de cultivo (Menke y Steingass 1988) y un inóculo de microorganismos ruminales, en proporción de 0.20 del volumen total de incubación (80 mL).

Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de tres cabras adultas estabuladas (*Capra hircus*), de la raza Nubia, alimentadas *ad libitum* con forraje de gramíneas y con libre acceso al agua y a las sales minerales. El contenido ruminal de cada animal se recolectó por vía oral, antes de ofrecer el alimento en la mañana, y se conservaron independientes en termos cerrados hasta llegar al laboratorio, donde se filtraron mediante varias capas de gasa y los tres inóculos se mezclaron en proporciones iguales. Durante el proceso, se mantuvo la temperatura de los inóculos a 39 ± 1 °C, y las condiciones de anaerobiosis mediante flujo continuo de CO₂. Las botellas se sellaron y se incubaron en baño, a temperatura controlada (39 °C). Se tomó ese momento como la hora cero de la incubación.

La producción de gas se midió a las 2, 4, 6, 8, 12, 21, 24, 30, 48, 72, 96 y 120 h por medio de un manómetro HD8804 acoplado a un calibrador de presión TP804 (DELTA OHM, Italy). Después de cada medición, se liberó el gas hasta igualar las presiones externa e interna de las botellas. Se estimó el volumen de gas a partir de los datos de presión mediante una ecuación de regresión lineal pre-establecida (Rodríguez *et al.* 2013).

Gas (mL) = (presión [103 Pa] + 4.95)/2.5858, n= 132; r= 0.991)

El volumen de gas se expresó por gramo de materia orgánica (MO) incubada (MOinc). Para estimar la cinética de producción de gas, se utilizó el modelo monofásico de Gompertz:

$$Y = A * \text{Exp}(-B * \text{Exp}(-C * t))$$

Donde:

Y- es la producción de gas al tiempo t (mL g⁻¹ MOinc)

A- es el potencial de producción de gas (asíntota cuando t= ∞; mL g⁻¹ MOinc).

B- es la tasa relativa de producción de gas

C- es un factor constante de la eficiencia microbiana (h⁻¹)

t- es el tiempo de incubación (h)

Además, se estimó el tiempo de incubación al que se alcanzó la velocidad máxima (TV_{máx}) de producción de gas, a partir de la segunda derivada del modelo de Gompertz evaluada en cero (punto de inflexión de este tipo de modelo sigmoidal). También se estimó la velocidad máxima de producción de gas (V_{máx}; mL g⁻¹ MOinc h⁻¹), al sustituir TV_{máx} en la primera derivada del modelo (Rodríguez *et al.* 2013).

Estimación de la síntesis de biomasa microbiana. Al finalizar la incubación, se abrieron las botellas y su contenido se filtró mediante bolsas de nailon, taradas previamente, con porosidad de 50 μm y superficie de 28 cm². Las bolsas con los residuos de la fermentación se secaron en una estufa de aire forzado con temperatura regulada a 60 °C, durante 72 h. La síntesis de biomasa microbiana (SBM, mg) se estimó, por gravimetría,

in the solid residue of the fermentation (Blümmel *et al.* 1997).

On the other hand, efficiency of microbial biomass synthesis (EMBS, g g⁻¹ fermented DM) was estimated as the rate between MBS and fermented DM. Fermented DM was estimated as the differences between incubated DM and the content of NDF from the solid residue of fermentation. As another alternative for estimating microbial efficiency, the partition factor (PF) was also determined as the relation between fermented DM and gas volume produced in the *in vitro* system (Blümmel *et al.* 1997).

Chemical analysis. In the samples of the different ensilage treatment and solid residue from the fermentation, DM, OM and crude protein was determined (AOAC 2016). NDF was obtained from the procedure described by Van Soest *et al.* (1991).

Statistical analysis. A completely randomized experimental design was employed considering the silage as treatment (5) and each bottle as an experimental unit (5).

The results of gas production were repeated measures in the same experimental unit and, therefore, analyzed according to MANOVA to know if an interaction between treatments and sampling hours was present. To relate the number of times in which gas production was measured, the analysis of the fermentation was divided *a priori*, in the three phases and four sampling times according to the concepts of MANOVA. The initial phase was defined since the beginning of fermentation until 8 hours, the intermediate from that moment up to 30h and the final phase from that instant up to 120 h. When the interaction was evident between treatments and times, an analysis of variance of split plot was carried out for interaction means. On the other hand, estimates of synthesis and efficiency were analyzed by ANOVA.

In both cases, when differences were evident ($P < 0.05$), means of treatments were compared using the Duncan (1955) test. The response of indicators, at the level of inclusion of *M. oleifera*, was studied by means of regressions and the use of Pearson coefficient to determine the degree of correlation between the two variables of efficiency of microbial synthesis (MBS and PF) that was studied in the experiment. In all cases, the use of InfoStat was applied (Di Rienzo *et al.* 2010).

Results and Discussion

Table 1 shows the chemical composition of the ensiled products that were evaluated in this study. *M. oleifera* decreased DM content regarding silage with 100 % of *C. purpureus* ($P < 0.001$). Cardenas *et al.* (2013) appreciated that the inclusion level of protein shrubs did not affect DM content of mixed silages with *C. purpureus* (variety Taiwan 144 A), but in these experiment the effect of pre-dried process, applied in both plant materials, could affect the results. On the other

como la diferencia entre la MS y el contenido de fibra detergente neutra (FDN) en el residuo sólido de la fermentación (Blümmel *et al.* 1997).

La eficiencia de síntesis de biomasa microbiana (ESBM, g g⁻¹ MS fermentada) se estimó como la razón entre la SBM y la MS fermentada. La MS fermentada se estimó como la diferencia entre la MS incubada y el contenido de FDN del residuo sólido de la fermentación.

Como otra manera de estimar la eficiencia microbiana, también se determinó el factor de partición (FP) como la relación entre la MS fermentada y el volumen de gas producido en el sistema *in vitro* (Blümmel *et al.* 1997).

Análisis químico. A las muestras de los diferentes tratamientos ensilados y residuos sólidos de la fermentación se les determinó MS, MO y proteína bruta (PB) (AOAC 2016). La FDN se obtuvo mediante el procedimiento descrito por Van Soest *et al.* (1991).

Análisis estadístico. Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado, donde se consideraron los ensilados como tratamientos (5) y cada botella como una unidad experimental (5).

Los resultados de producción de gas, al ser medidas repetidas en la misma unidad experimental, se analizaron por MANOVA para probar si existía interacción entre tratamientos y horario de muestreo. Para conciliar el número de horarios en que se midió la producción de gas con los preceptos del MANOVA, se dividió *a priori* el análisis de la fermentación en tres fases con cuatro horarios de muestreo contemplados en cada una. La fase inicial se definió desde el comienzo de la fermentación hasta las 8 h, la fase intermedia desde ese momento hasta las 30 h y la fase final desde ese instante hasta las 120 h. Cuando se comprobó que hubo interacción entre tratamientos y horarios, se realizó un análisis de varianza de parcelas divididas para las medias de las interacciones. Por su parte, los estimados de síntesis y eficiencia de síntesis se analizaron por un ANOVA.

En ambos casos, cuando se encontraron diferencias ($P < 0.05$), las medias de los tratamientos se compararon por la dócima de rangos múltiple de Duncan (1955). Además, se analizó mediante regresiones la respuesta de indicadores al nivel de inclusión de *M. oleifera* y se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar el grado de correlación entre las dos variables de eficiencia de síntesis microbiana que se estudiaron (ESBM y FP). Se empleó en todos los casos el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2010).

Resultados y Discusión

En la tabla 1 se muestra la composición química de los productos ensilados que se evaluaron en este estudio. Al incluir *M. oleifera*, disminuyó el contenido de MS respecto al ensilaje con 100 % de *C. purpureus* ($P < 0.001$). Aunque Cárdenas *et al.* (2003) informaron que el nivel de inclusión de arbustivas proteicas no afectó el contenido de MS de ensilajes mixtos con *C. purpureus* (variedad Taiwán 144 A), en este caso pudo influir

hand, the content of organic matter increased when the inclusion level of protein shrub was increased ($P < 0.001$). However, the treatment with 40 % of *M. oleifera* showed an unexpected performance because the OM content was lower than the other treatments.

When the content of *M. oleifera* augmented,

el proceso de presecado al que se sometieron ambos materiales vegetales. El contenido de MO aumentó al incrementarse el nivel de inclusión de la arbustiva proteica ($P < 0.001$). Sin embargo, el tratamiento con 40 % de *M. oleifera* tuvo un comportamiento inesperado, al mostrar contenido de MO menor respecto al resto de los

Table 1. Chemical composition of the evaluated mixed silage.

| Treatment proportion C. <i>purpureus</i> : <i>M. oleifera</i> | DM (%) | OM (%) | CP (%) | NDF (%) |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 100:00 | 31.98 ^b | 78.61 ^b | 13.83 ^a | 68.95 ^c |
| 80:20 | 27.70 ^a | 78.79 ^c | 17.42 ^b | 60.49 ^d |
| 60:40 | 27.28 ^a | 78.02 ^a | 18.83 ^c | 55.02 ^b |
| 40:60 | 27.29 ^a | 80.10 ^d | 19.82 ^d | 55.76 ^c |
| 20:80 | 26.63 ^a | 82.26 ^e | 20.78 ^e | 52.81 ^a |
| ± SE | 0.92 | 0.01 | 0.11 | 0.01 |
| Sig. | p<0.001 | p<0.001 | p<0.001 | p<0.001 |

^{abcde} Values with different letter per column differ at $P < 0.05$ (Duncan 1955)

an increase of CP level in the silage was produced ($P < 0.001$). Other authors also reported linear increments in the CP content in mixed silage when inclusion level of protein shrubs is increased (Cárdenas *et al.* 2013). CP content of studied silages was superior considering the range of values reported for this indicator (9-14 % of CP) and by McDonald *et al.* (1987), and also higher to the protein content considered when ensiling maize with 4 different shrub legumes (50:50 humid base) (Phiri *et al.* 2007).

The inclusion of *M. oleifera* also linearly diminished NDF content ($P < 0.001$) although the treatment with 40 % of *M. oleifera* showed the same unexpected performance obtained for OM at this inclusion level. The increase appreciated in CP content and decrease of crude fiber content of silages as a response to the inclusion of Moringa in ensiled mixtures was in correspondence with the chemical composition of used forage, because this protein shrub showed a protein content 2.5 times higher than that of the grass but its NDF content was 15 % lower (Gutiérrez *et al.* 2015). Similar results were found with the inclusion of growing levels of *Tithonia diversifolia* in mixed silages based on *C. purpureus* (Morales *et al.* 2016).

Table 2, shows the nonlinear regression equations obtained when evaluating the effect of inclusion levels of *M. oleifera* on the studied indicators of chemical composition. All the equation point out that the inclusion level of *M. oleifera* had a quadratic effect on the performance of all analyzed variables, with an elevated coefficient of determination ($R^2 > 0.8860$), superior to that obtained when equations of linear regressions were used. The above discussion indicates that the addition of growing levels of *M. oleifera* improve the quality of silages obtained since there is a tendency of CP content increase and fiber decrease.

tratamientos.

Al aumentar el contenido de *M. oleifera* se incrementó el nivel de PB de los ensilajes obtenidos ($P < 0.001$). Otros autores también informan de incrementos lineales en el contenido de PB de ensilajes mixtos al incrementar el nivel de inclusión de arbóreas proteicas (Cárdenas *et al.* 2003). El contenido de PB de los ensilajes fue superior al rango de valores de PB de ensilados (9-14 % PB) informado por McDonald *et al.* (1987), e incluso fue mayor a los contenidos proteicos informados al ensilar maíz con cuatro leguminosas arbustivas diferentes (50:50 base húmeda) (Phiri *et al.* 2007).

La inclusión de *M. oleifera* disminuyó el contenido de FDN también de forma lineal ($P < 0.001$), aunque el tratamiento con 40 % de moringa mostró el mismo comportamiento inesperado que se obtuvo para MO a este nivel de inclusión. El incremento observado en el contenido de PB y la disminución del contenido de fibra de los ensilajes como respuesta a la inclusión de moringa en las mezclas ensiladas estuvo en correspondencia con la composición química de los forrajes utilizados, ya que esta arbustiva proteica presentó contenido proteico 2.5 veces mayor que el de la gramínea, mientras que su contenido de FDN fue 15 % menor (Gutiérrez *et al.* 2015). Resultados similares hallaron Morales *et al.* (2016) al incluir niveles crecientes de *Tithonia diversifolia* en ensilados mixtos a base de *C. purpureus*.

La tabla 2 muestra las ecuaciones de regresión no lineal que se obtuvieron al evaluar el efecto de los niveles de *M. oleifera* en los indicadores de la composición química estudiados. Todas las ecuaciones mostraron que el nivel de inclusión de *M. oleifera* tuvo un efecto cuadrático en el comportamiento de todas las variables analizadas, con elevado coeficiente de determinación ($R^2 > 0.8860$), superior al obtenido al probar ecuaciones de regresión lineal. Todo parece indicar que al incluir niveles crecientes

Table 2. Non linear regression between level of used *M. oleifera* (independent variable) and indicators of chemical composition in the evaluated mixed silages

| Indicator | Equation | R ² | SE |
|-----------|-----------------------------------|----------------|--------|
| DM % | $Y=0.001 x^2 - 0.136 x + 30.457$ | 0.8860 | 1.1460 |
| OM % | $Y=0.001 x^2 - 0.036 x + 78.0.57$ | 0.9821 | 0.3381 |
| CP % | $Y=0.001 x^2 + 1.657 x + 13.343$ | 0.9648 | 0.7171 |
| NPF % | $Y=0.003 x^2 - 0.399 x + 67.543$ | 0.9682 | 1.5856 |

Castañó and Villa (2015) concluded that varieties of *C. purpureus* like Cuba OM-22 can be easily conserved. Nevertheless, from a practical point of view mixed silage production, including protein shrubs, allow to improve the nutritional value of silage because tropical grasses contain a low nutritional quality, even though they do not undergo an anaerobic fermentation process for their conservation.

However, the inclusion of high levels of CP could have a negative influence (in practical terms) on the quality of the obtained silage because it is known that with a higher CP content in fresh forage, its buffer capacity or resistance to pH change will be higher during the fermentation process (Otero and Esperance 1994). Singh *et al.* (1996) indicated that the highest values of ammonia N and pH are associated to high values of populations of proteolytic anaerobic bacteria. Likewise, Bolsen (1999) stated that this buffer effect, due to high levels of nitrogen, influence on fermentation process because it requires the production of extra quantities of lactic acid to lower the pH value, needed for a good preservation of silage, which increase DM losses. Therefore, probably under production conditions, it is recommended to include only between 20 and 40 % of the shrub because the experience show that, practically, it is easier to guarantee availability of grass forage compared to *M. oleifera*.

The analysis of MANOVA of *in vitro* gas production of (mL g⁻¹ OM inc) illustrates that there was an interaction between treatments and times in which the gas was measured (P<0.05) for the different fermentation phases (initial, intermediate and final) (table 3).

In the initial phase of fermentation, at 2 h of incubation, all inclusion levels of *M. oleifera* increased gas production in comparison with silage without moringa which was the treatment with the lowest gas production up to 8 h of incubation (P<0.001), although, during this time, this treatment showed no differences regarding silage with 60 % of the protein shrub. The treatment with 80 % of *M. oleifera* shows the highest gas productions up to 8h, but not differing from the treatment with 40 % at 4 h, or the treatment with 20 % at 6 h or in the treatment with 40 % at 8 h.

In the intermediate phase of fermentation, it could be also observed that the lowest gas production in all times

de *M. oleifera* se mejora la calidad del ensilaje obtenido, pues se observa una tendencia al incremento del contenido de PB y disminución del contenido de fibra.

Castañó y Villa (2017) concluyeron que variedades de *C. purpureus* como el Cuba OM-22 se pueden conservar fácilmente. Sin embargo, en la práctica, la producción de ensilajes mixtos, en los que se incluyen arbustivas proteicas permite mejorar el valor nutritivo del alimento ensilado, ya que las gramíneas tropicales tienen de por sí baja calidad nutricional, aún sin someterse al proceso de fermentación anaeróbica para su conservación.

La inclusión de altos niveles de PB podría en la práctica influir negativamente en la calidad del ensilaje, pues se conoce que a mayor contenido de proteína presente en el forraje fresco, mayor será su capacidad buffer o resistencia al cambio de pH durante el proceso fermentativo (Otero y Esperance 1994). Singh *et al.* (1996) indicaron que valores más altos de pH y de N amoniacal se asociaban con valores mayores de poblaciones de bacterias proteolíticas anaeróbicas. Bolsen (1999) planteó que este efecto tampón, producto de altos niveles de nitrógeno, influye en el proceso de fermentación, pues se requiere la producción de cantidades extras de ácido láctico para lograr bajar el valor de pH necesario para una buena preservación del ensilaje, lo que aumenta las pérdidas de MS. Por ello, en condiciones de producción, probablemente sea recomendable incluir solo entre 20 y 40 % de la arbustiva. Además, la experiencia muestra que en la práctica es más fácil garantizar disponibilidad de forraje de la gramínea que de *M. oleifera*.

El análisis de MANOVA de la producción de gas *in vitro* (mL.g⁻¹ MOinc) muestra que hubo interacción entre los tratamientos y los horarios en que se midió el gas (P < 0.05), para las diferentes fases de la fermentación (inicial, intermedia y final) (tabla 3).

En la fase inicial de la fermentación, a las 2 h de incubación todos los niveles de inclusión de *M. oleifera* incrementaron la producción de gas respecto al ensilaje sin moringa, que fue el tratamiento que menos gas produjo hasta las 8 h de incubación (P < 0.001), aunque en ese horario este tratamiento no mostró diferencias respecto al ensilaje con 60 % de la arbustiva proteica. El tratamiento con 80 % de *M. oleifera* manifestó las mayores producciones de gas hasta las 8 h, pero no difirió del tratamiento con 40 % a las 4 h, ni del tratamiento con 20 % a las 6 h, así como tampoco del tratamiento

Table 3. Effect of the level of inclusion of *M. oleifera* in the profile of *in vitro* gas production in the mixed silage evaluated (mL g⁻¹ OMinc).

Initial phase

| Treatment proportion <i>C. purpureus</i> : <i>M. oleifera</i> | Time | | | | Sign |
|--|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------|
| | 2 | 4 | 6 | 8 | |
| 100:00 | 7.92 ^a | 13.52 ^c | 18.34 ^f | 22.88 ⁱ | P<0.001 |
| 80:20 | 9.06 ^b | 15.16 ^d | 20.44 ^h | 24.52 ^k | |
| 60:40 | 9.28 ^b | 15.60 ^{de} | 21.84 ⁱ | 25.62 ^l | |
| 40:60 | 9.44 ^b | 14.74 ^d | 19.40 ^g | 23.24 ^j | |
| 20:80 | 8.90 ^b | 16.30 ^e | 20.74 ^h | 25.72 ^l | |

SE of time at the same level of the treatments: ± 0.20

SE of treatments at the same or different level of time: ± 0.45

abdefghijkl Different letters differ significantly at p<0.05 (Duncan 1955)

Intermediate phase

| Treatment proportion <i>C. purpureus</i> : <i>M. oleifera</i> | Time | | | | Sign |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------|
| | 12 | 21 | 24 | 30 | |
| 100:00 | 25.96 ^a | 28.86 ^{bc} | 31.36 ^{ef} | 34.46 ^{hi} | P<0.001 |
| 80:20 | 28.02 ^b | 30.44 ^{de} | 32.70 ^g | 35.26 ^{ijk} | |
| 60:40 | 29.76 ^{cd} | 32.36 ^{fg} | 34.86 ^{ij} | 37.46 ^l | |
| 40:60 | 28.86 ^{bc} | 33.34 ^{gh} | 36.02 ^{jk} | 39.00 ^m | |
| 20:80 | 29.14 ^{bc} | 31.36 ^{ef} | 33.56 ^{gh} | 36.32 ^k | |

SE of time at the same level of the treatments: ±0.24

SE of treatments at the same or different levels of time: ±0.81

abdefghijklm Different letters differ significantly at P<0.05 (Duncan 1955)

Final phase

| Treatment proportion <i>C. purpureus</i> : <i>M. oleifera</i> | Time | | | | Sign |
|--|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------|
| | 48 | 72 | 96 | 120 | |
| 100:00 | 41.18 ^b | 55.36 ^e | 71.14 ^{ij} | 83.74 ^k | P<0.001 |
| 80:20 | 38.44 ^a | 44.94 ^c | 53.78 ^e | 61.90 ^g | |
| 60:40 | 39.62 ^{ab} | 44.26 ^c | 51.70 ^d | 59.22 ^f | |
| 40:60 | 44.18 ^c | 55.36 ^e | 65.86 ^h | 73.90 ^j | |
| 20:80 | 38.52 ^a | 44.12 ^c | 55.12 ^e | 66.98 ^h | |

SE of time at the same level of the treatments: ±0.76

SE of treatments at the same or different levels of time: ±1.62

abdefghij Different letters differ significantly at P <0.05 (Duncan 1955)

corresponded to the silage with 100 % of *C. purpureus* (P< 0.001) except at 30 h, which did not differ from the treatment with 20 % of *M. oleifera*. This treatment was followed by the treatment with 20 % of the shrub plant while no high differences were estimated among the silages with *M. oleifera*.

The highest gas production was found in the treatment with *M. oleifera* regarding silage with 100 % of *C. purpureus* in the initial and intermediate fermentation phases. This could be attributed to the chemical composition in both forages. It is known that *M. oleifera* has high values of soluble and easily fermentable carbohydrates (Rodríguez *et al.* 2017).

However, in the final fermentation phase, it was appreciated how gas production of treatment with 100 % of *C. purpureus* increased regarding the other treatments

con 40 % a las 8 h.

En la fase intermedia de la fermentación también se pudo observar que la menor producción de gas en todos los horarios correspondió al ensilaje con 100 % de *C. purpureus* (P < 0.001), excepto a las 30 h que no difirió del tratamiento con 20 % de *M. oleifera*. En magnitud le siguió el tratamiento con 20 % de *M. oleifera*, mientras que no hubo grandes diferencias entre los diferentes ensilajes con *M. oleifera*.

La mayor producción de gas que se observó en los tratamientos con *M. oleifera* respecto al ensilaje con 100 % de *C. purpureus*, en las fases inicial e intermedia de la fermentación, pudo estar dada por la composición química de ambos forrajes. Se conoce que *M. oleifera* tiene elevados valores de carbohidratos solubles y fácilmente fermentables (Rodríguez *et al.* 2017). Sin embargo, en la

and was higher at 96 and at 120 h. This could be explained because the most fermentable materials of this shrub (the remains from the silage process) were degraded in the first phases and the fact that treatments with different protein contents are being compared, because it is known that gas contribution of carbohydrates is superior to those of proteins (Makkar 2002).

Kinetic parameters of *in vitro* fermentation of evaluated silages are shown in table 4. It is important to point out that the applied model showed a high coefficient of determination for all treatments ($R^2 > 0.9077$). This consideration allows stating that it was able to explain a high percentage of variability of the obtained experimental data.

The treatment with 100 % of *C. purpureus* tended

fase final de la fermentación se observó que la producción de gas del tratamiento con 100 % de *C. purpureus* se incrementó con respecto al resto de los tratamientos, y fue mayor a las 96 y 120 h. Esto pudo estar dado porque los materiales más fermentables de la arbustiva (los que quedarán del proceso de ensilaje) se degradaron en las primeras fases. Además, se trata de una comparación entre tratamientos con diferentes contenidos proteicos, pues se conoce que el aporte en gas de los carbohidratos es superior al que realizan las proteínas (Makkar 2002).

Los parámetros cinéticos de la fermentación *in vitro* de los ensilajes evaluados se presentan en la tabla 4. Es importante señalar que el modelo aplicado mostró elevado coeficiente de determinación para todos los tratamientos ($R^2 > 0.9077$). Esto permite afirmar que fue

Table 4. Kinetic parameters according to Gompertz model of the *in vitro* fermentation in the evaluated mixed silages.

| Treatment proportion <i>C. purpureus</i> : <i>M. oleifera</i> | Parameter A (±SE) | Parameter B (±SE) | Parameter C (±SE) | SE ¹ | R ² | V _{max} | TV _{max} |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|
| 100:00 | 113.43 (±23.39) | 2.00 (±0.16) | 0.015 (±0.005) | 4.122 | 0.9739 | 0.634 | 45.60 |
| 80:20 | 61.85 (±7.09) | 1.33 (±0.13) | 0.025 (±0.008) | 4.564 | 0.9278 | 0.571 | 11.36 |
| 60:40 | 53.95 (±4.08) | 1.23 (±0.17) | 0.038 (±0.011) | 4.839 | 0.9077 | 0.756 | 5.46 |
| 40:60 | 75.65 (±6.66) | 1.57 (±0.12) | 0.026 (±0.006) | 4.320 | 0.9620 | 0.793 | 17.21 |
| 20:80 | 74.38 (±17.612) | 1.40 (±0.20) | 0.018 (0.008) | 5.431 | 0.9078 | 0.482 | 19.12 |

SE of the parameters were significant different at $P < 0.0001$

¹ SE of the curve

to show the highest potential of gas production. The maximum velocity was obtained in the mixed silage with 60% of *M. oleifera*, while the inflexion point of the curve (TV_{max}), corresponding to the moment in which the maximum velocity is reached, was achieved, first, in the treatment with 40 % of *M. oleifera* and later in the ensilage with 100 % of *C. purpureus*. The lower TV_{max} when using 40 % of *M. oleifera* could be due to a higher microbial efficiency, as it is noticed in the value reached in the parameters C, which tended to be the highest of the rest of silages. These results indicated that, as the extension of gas production is higher when grass is ensiled alone, this result could be related to the conditions mentioned above, regarding the highest contribution of gas from the fermentation of carbohydrates, in contrast to that of protein and it should not be assumed as an indicator of better quality, because when 40 % of *M. oleifera* is included, better indicators are appreciated related to the microbial actions as TV_{max} and parameters C.

On the other hand, no differences were observed between treatments in MBS ($P=0.5383$). However, differences were achieved regarding the EMBS (figure 1)

Mixed silage with 40 % of *M. oleifera* showed a better efficiency of synthesis compared to the other studied treatments, except in the silage with 20 % of the shrub ($P < 0.05$). The rest of the treatments did not differ among them. The EMBS showed a quadratic performance and the equation is given below.

capaz de explicar el alto por ciento de la variabilidad de los datos experimentales obtenidos.

El tratamiento con 100% de *C. purpureus* tendió a mostrar el mayor potencial de producción de gas. La mayor velocidad máxima correspondió al ensilaje mixto con 60 % de *M. oleifera*; mientras que el punto de inflexión de la curva (TV_{max}), momento en que se alcanza la velocidad máxima, se alcanzó primero en el tratamiento con 40 % de *M. oleifera* y más tardíamente, en el ensilaje con 100 % de *C. purpureus*. El menor TV_{max} al utilizar 40 % de *M. oleifera* se pudo deber a mayor eficiencia microbiana, como se aprecia en el valor alcanzado por el Parámetro C, que tendió a ser mayor que para el resto de los ensilajes. Estos resultados indican que si bien la extensión de la producción de gas es mayor cuando se ensila la gramínea sola, esto puede estar dado, como se refería anteriormente, por el mayor aporte en gas de la fermentación de los carbohidratos con respecto a la de las proteínas. Esto no se puede asumir como un indicador de mejor calidad, pues al incluir 40 % de *M. oleifera* se constatan mejores indicadores relacionados con la acción microbiana, como TV_{max} y el parámetro C.

Respecto a la SBM, no se observaron diferencias entre tratamientos ($P=0.5383$). Sin embargo, sí hubo diferencias en cuanto a la ESBM (figura 1).

El ensilaje mixto con 40 % de *M. oleifera* mostró mayor eficiencia de síntesis que el resto de los tratamientos evaluados, excepto respecto al ensilaje con 20 % de la arbustiva ($P < 0.05$). El resto de los tratamientos no

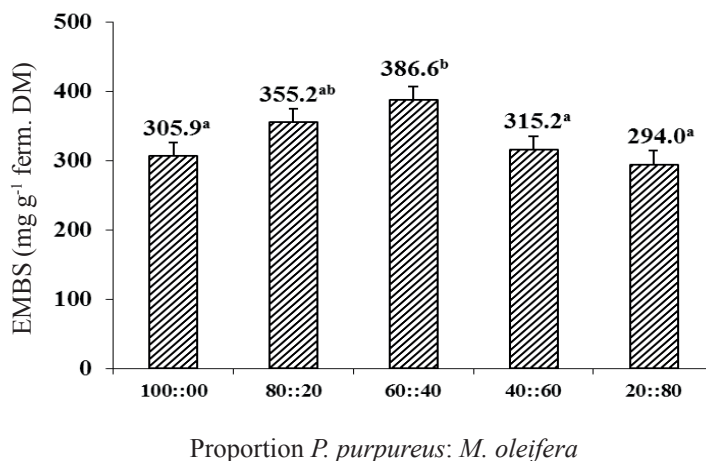


Figure 1. Effect of the inclusion level of *M. oleifera* on the EMBS (mg g⁻¹ fermented DM) in the evaluated mixed silages

$Y = 0.044 x^2 + 3.164 x + 309.31$ ($R^2 = 0.7853$; $SE = 25.2446$)

In figure 2, the effect of inclusion level of *M. oleifera* on PF increased when the inclusion level of the shrub was augmented, also in a quadratic direction ($y = 0.001 x^2 + 0.051 x + 3.375$; $R^2 = 0.9196$; $SE = 0.2138$), reaching a maximum with the inclusion of 40 % ($P < 0.001$), although this treatment did not differ from the silage with 20 % of *M. oleifera*.

PF is an indicator representing the fermented

substratum distribution between the microbial biomass and the final products of the fermentation. Variation of this relation demonstrates changes in the microbial yield per unit of produced volatile fatty acids. A high PF indicates that a high amount of the fermented substratum was transformed into microbial cells and viceversa. However, it should be point out that the value of PF obtained for mixed silages with 40 % of *M. oleifera* surpasses lightly the theoretical parameter defined

diffirieron entre sí. La ESBM tuvo un comportamiento cuadrático, descrito en la siguiente ecuación:

$Y = -0.044 x^2 + 3.164 x + 309.31$ ($R^2 = 0.7853$; $EE = 25.2446$)

En la figura 2 se muestra el efecto del nivel de inclusión de *M. oleifera* en el FP, el cual se incrementó al aumentar el nivel de inclusión de la arbustiva, también de manera cuadrática ($y = -0.001 x^2 + 0.051 x + 3.375$; $R^2 = 0.9196$; $EE = 0.2138$). Este alcanzó un máximo al 40 % de inclusión ($P < 0.001$), aunque el tratamiento no

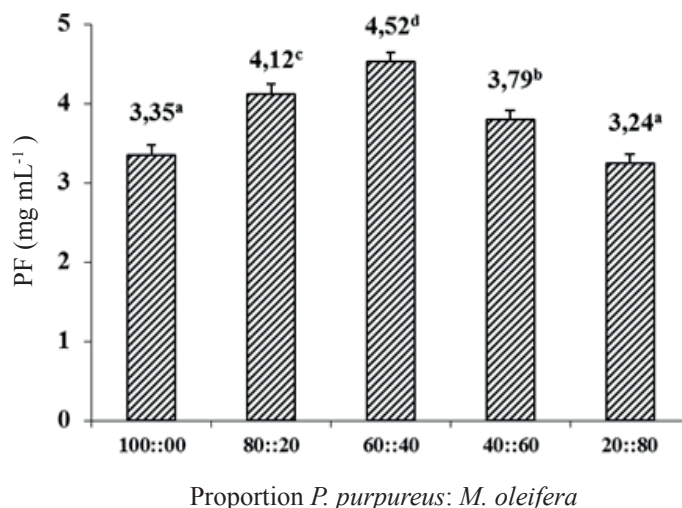


Figure 2. Effect of the inclusion level of *M. oleifera* on PF (mg mL⁻¹) of the mixture of evaluated silages.

diffirió del ensilaje con 20 % de *M. oleifera*.

El FP es un indicador de la distribución del sustrato fermentado entre la biomasa microbiana y los productos finales de la fermentación. Las variaciones en esta relación reflejan cambios en el rendimiento microbiano por unidad de ácidos grasos volátiles producidos. Un alto FP indica que una alta proporción del sustrato fermentado se transformó en células microbianas y viceversa. Sin embargo, hay que señalar que el valor de FP obtenido

diffirió del ensilaje con 20 % de *M. oleifera*.

El FP es un indicador de la distribución del sustrato fermentado entre la biomasa microbiana y los productos finales de la fermentación. Las variaciones en esta relación reflejan cambios en el rendimiento microbiano por unidad de ácidos grasos volátiles producidos. Un alto FP indica que una alta proporción del sustrato fermentado se transformó en células microbianas y viceversa. Sin embargo, hay que señalar que el valor de FP obtenido

by Blümmel *et al.* (1997). In this respect, there are evidences indicating that the presence of anti-nutritional substances may provoke values above the theoretical parameter (Baba *et al.* 2002). It is also considered that determination at 120 h of incubation influence on the results due to possible processes of microbial recycling in the *in vitro* system. Nevertheless, it should be stressed that the coefficient of Pearson between EMBS and PF was high (0.9740; $P < 0.01$) allowing to consider that increases in the efficiency of microbial synthesis are reached when between 20 % and 40 % of *M. oleifera* is included on mixed silages.

It is concluded that the inclusion of *M. oleifera* on mixed silages improved the nutritional quality of the products obtained when levels of protein are increased and NDF are reduced regarding silage of 100% of grasses.

Silage with 40 % of inclusion of *M. oleifera* was the best combination of the studied levels due to adequate levels of CP, lower NDF values and the fermentation showed high V_{\max} , low TV_{\max} and the highest efficiency of microbial synthesis.

para el ensilaje mixto con 40 % de *M. oleifera* sobrepasa ligeramente el máximo teórico definido por Blümmel *et al.* (1997). Al respecto, existen evidencias de que la presencia de sustancias antinutricionales pueden provocar valores por encima del máximo teórico (Baba *et al.* 2002). Además, se considera que las determinaciones a las 120 h de incubación influyen en los resultados obtenidos, debido a posibles procesos de reciclado microbiano en el sistema *in vitro*. Sin embargo, es de destacar que el coeficiente de correlación de Pearson entre la ESBM y el FP fue elevado (0.9740; $P < 0.01$). Esto permite aseverar que se logran incrementos en la eficiencia de síntesis microbiana, cuando se incluye entre 20 y 40 % de *M. oleifera* en la mezcla de forrajes a ensilar.

Se concluye que la inclusión de *M. oleifera* en ensilajes mixtos mejoró la calidad nutritiva de los productos obtenidos, al incrementar los niveles de proteína y reducir los de FDN, respecto al ensilaje con 100 % de gramínea. El ensilaje con 40 % de inclusión de *M. oleifera* fue la mejor combinación entre los niveles estudiados, debido a sus adecuados niveles de PB, menores valores de FDN y su fermentación con alta V_{\max} , bajo TV_{\max} y mayor eficiencia de síntesis microbiana.

References

- AOAC. 2016. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed., Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5, Available: <<http://www.directtextbook.com/isbn/9780935584875>>, [Consulted: September 22, 2016].
- Baba, A. S. H., Castro, F. B. & Ørskov, E. R. 2002. "Partitioning of energy and degradability of browse plants *in vitro* and the implications of blocking the effects of tannin by the addition of polyethylene glycol". *Animal Feed Science and Technology*, 95(1): 93–104, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/S0377-8401(01)00283-8.
- Blümmel, M., Steingäß, H. & Becker, K. 1997. "The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages". *British Journal of Nutrition*, 77(6): 911–921, ISSN: 1475-2662, 0007-1145, DOI: 10.1079/BJN19970089.
- Bolsen, K. K. 1999. "Silage Management in North America in the 1990s". In: Lyons, T. P. & Jacques, K. A. (eds.), *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of the 15th Annual Symposium*, Nottingham: Nottingham University Press, pp. 233–244, Available: <[http://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkpozje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1150299](http://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkpozje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1150299)>, [Consulted: November 21, 2017].
- Cárdenas, J., Sandoval, C. & Solorio, F. 2003. "Chemical composition of grass and forage trees mixed silages". *Técnica Pecuaria de México*, 41: 283–294, ISSN: 0040-1889.
- Castaño, G. A. & Villa, L. M. 2017. "Use of whey and molasses as additive for producing silage of Cuba OM-22 (*Cenchrus purpureus* x *Cenchrus glaucum*)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(1): 61–70, ISSN: 2079-3480.
- CharmLey, E. 2001. "Towards improved silage quality – A review". *Canadian Journal of Animal Science*, 81(2): 157–168, ISSN: 0008-3984, DOI: 10.4141/A00-066.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2010. InfoStat. version 2010, [Windows], Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". *Biometrics*, 11(1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- García, L. M., Mesa, A. R. & Hernández, M. 2014. "Potencial forrajero de cuatro cultivares de *Cenchrus purpureum* en un suelo Pardo de Las Tunas". *Pastos y Forrajes*, 37(4): 413–419, ISSN: 0864-0394.
- Gutiérrez, D., Borjas-Rojas, E., Rodríguez-Hernández, R., Rodríguez, Z., Stuart, R. & Sarduy, L. 2015. "Evaluación de la composición química y degradabilidad ruminal *in situ* de ensilaje mixto con *Cenchrus purpureum* cv. Cuba CT-169: *Moringa oleifera*". *Avances en Investigación Agropecuaria*, 19(3): 7–16, ISSN: 0188-7890.
- 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., Ruíz, 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.
- Makkar, H. P. S. 2002. "Applications of the *in vitro* gas method in the evaluation of feed resources, and enhancement of nutritional value of tannin-rich tree/browse leaves and agro-industrial by-products". *International Atomic Energy Agency Technical Documents (IAEA-TECDOCs)*, (1294): 23–40, ISSN: 1011-4289.
- Martínez, R. O., Tuero, R., Torres, V. & Herrera, R. S. 2010. "Models of biomass accumulation and quality in varieties of elephant grass, Cuba CT-169, OM-22, and king grass during the rainy season in the western part of Cuba". *Cuban Journal*

- of Agricultural Science, 44(2): 185–188, ISSN: 2079-3480.
- McDonald, P., Edwards, R. A. & Greenhalgh, J. F. D. 1987. Animal nutrition. United Kingdom: Longman Scientific & Technical, 512 p., ISBN: 978-0-582-40903-3.
- 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: 7–55, ISSN: 0340-3165.
- Morales, A., Rodríguez, R., Gutiérrez, D., Elías, A., Gómez, S. & Sarduy, L. 2016. “Evaluation of the VITAFERT inclusion in the nutritive value of *Tithonia diversifolia* and *Cenchrus purpureum* silages”. Cuban Journal of Agricultural Science, 50(4): 619–630, ISSN: 2079-3480.
- Nouman, W., Basra, S. M. A., Siddiqui, M. T., Yasmeen, A., Gull, T. & Alcayde, M. A. C. 2014. “Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: a review”. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38(1): 1–14, ISSN: 1300-011X.
- Otero, M. & Esperance, M. 1994. “Estudio de la sensibilidad de la Guinea Likoni (*Panicum maximum* Jacq) según el índice de azúcar/capacidad tampón”. Pastos y Forrajes, 17(3): 277–281, ISSN: 2078-8452.
- Phiri, M. S., Ngongoni, N. T., Maasdorp, B. V., Titterton, M., Mupangwa, J. F. & Sebata, A. 2007. “Ensiling characteristics and feeding value of silage made from browse tree legume-maize mixtures”. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 7(3): 149–156, ISSN: 1870-0462.
- Ramos-Trejo, T., Canul-Solis, J. R. & Duarte-Vera, F. J. 2013. “Producción de tres variedades de *Cenchrus purpureum* fertilizadas con dos fuentes nitrogenadas en Yucatán, México”. Biociencias, 2(2): 60–68, ISSN: 2007-3380, DOI: 10.15741/revbio.ciencias.v2i2.35.
- Reyes, S. N., Mendieta, A., Fariñas, T. & Mena, M. 2008. “Elaboración de microsilos para los ejercicios de descubrimiento y experimentación en fincas”. In: Guía de suplementación alimenticia estratégica para bovinos en época seca, Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria, pp. 26–27, Available: <<http://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2417>>, [Consulted: November 21, 2017].
- Roa, M. L. & Galeano, J. R. 2015. “Calidad nutricional y digestibilidad *in situ* de ensilajes de cuatro leñosas forrajeras”. Pastos y Forrajes, 38(4): 431–440, ISSN: 0864-0394.
- Rodríguez, R., Lores, J., Gutiérrez, D., Ramírez, A., Gómez, S., Elías, A., Aldana, A. I., Moreira, O., Sarduy, L. & Jay, O. 2013. “Inclusion of the microbial additive Vitafert in the *in vitro* ruminal fermentation of a goat diet”. Cuban Journal of Agricultural Science, 47(2): 171–178, ISSN: 2079-3480.
- Rodríguez, R., Scull, I. & Montejo, I. L. 2017. “Nutritional value of *Moringa oleifera* (moringa) for animal feeding”. In: Savon, L., Gutiérrez, O. & Febles, G., Mulberry, moringa and tithonia in animal feed, and other uses. Results in Latin America and the Caribbean, Mayabeque, Cuba: FAO - EDICA, pp. 125–140, ISBN: 978-959-7171-72-0.
- Singh, A., Edward, J. C., Mor, S. & Singh, K. 1996. “Effect of inoculation of lactic acid bacteria and additives on ensiling M P chari (*Sorghum bicolor*)”. Indian Journal of Animal Sciences, 66: 1159–1165, ISSN: 0367-8318.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. 1994. “A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds”. Animal Feed Science and Technology, 48(3): 185–197, ISSN: 0377-8401, DOI: 10.1016/0377-8401(94)90171-6.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. “Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition”. Journal of Dairy Science, 74(10): 3583–3597, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

Received: November 24, 2016