



VARIABILIDAD GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE *TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSL.) A. GRAY. EN COLOMBIA

GENETIC AND PHENOTYPIC VARIABILITY OF *TITHONIA DIVERSIFOLIA* (HEMSL.) A. GRAY. IN COLOMBIA

J.E. RIVERA^{1*}, J. CHARÁ¹, J.F. GÓMEZ-LEYVA², T.E. RUÍZ³, E. MURGUEITIO¹, R. BARAHONA⁴

¹Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria - CIPAV, Carrera 25 # 6 - 62 Cali, Colombia

²Laboratorio de Biología Molecular, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco, México

³Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

⁴Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia

*Email: jerivera@fun.cipav.org.co

La inclusión de *T. diversifolia* en dietas basadas en gramíneas tropicales ha demostrado su potencial para mejorar la disponibilidad de nutrientes en estas dietas y aumentar la producción animal en diferentes condiciones de producción. Sin embargo, investigaciones recientes han evidenciado que existen genotipos superiores que se podrían seleccionar para mejorar el aprovechamiento de dicha especie. Este trabajo muestra los principales resultados obtenidos en la determinación de la variabilidad genética y fenotípica de *T. diversifolia* en materiales colectados en Colombia. Inicialmente, se presenta una evaluación genética que permitió identificar siete genotipos destacados para la alimentación animal y con gran diversidad genética. Estos materiales se han propagado para desarrollar estudios orientados a determinar la interacción genotipo ambiente de la producción de biomasa, comportamiento fermentativo, composición química y propagación sexual. Los resultados evidencian que se pueden identificar y seleccionar materiales de *T. diversifolia* con mejor adaptación a condiciones específicas que otros, mejor crecimiento, mayor oferta de nutrientes y capacidad de modificar la dinámica de fermentación en el rumen.

Palabras clave: adaptación, botón de oro, composición química, diversidad genética, interacción genotipo ambiente, producción de biomasa, sistemas silvopastoriles

The inclusion of *T. diversifolia* in diets based on tropical grasses has proven potential to improve nutrient availability in these diets, as well as enhance animal production in different productive conditions. However, recent studies have evidenced that there are better genotypes that could be selected to enhance the use of this species. This paper shows the principal results obtained in the determination of the genetic and phenotypic variability of *T. diversifolia* in materials collected in Colombia. Initially, a genetic assessment is presented permitting to identify seven outstanding genotypes as animal feed and with great genetic diversity. These materials have been spread to conduct studies for determining genotype-environment interaction in biomass yield, fermentative performance, chemical composition, and sexual propagation. The results evidence that *T. diversifolia* materials can be identified and selected for having better adaptation to specific conditions than others, better growth, higher offer of nutrients, and capacity of modifying the dynamic of fermentation in the rumen.

Key words: adaptation, Mexican sunflower, chemical composition, genetic diversity, genotype-environment interaction, biomass yield, silvopastoral systems

Introducción

A nivel poblacional como de especie, la variabilidad genética y fenotípica concede a plantas y animales la capacidad de responder a retos y amenazas (Govindaraj *et al.* 2015). La evaluación e identificación de genotipos de especies vegetales orientadas a la producción animal es de gran importancia para seleccionar aquellos que gozan de características deseadas, como la resistencia al ramoneo, el rápido crecimiento, la buena oferta nutricional, la adaptación

a condiciones ambientales específicas, entre otras (Ruiz *et al.* 2013, Holguín *et al.* 2015 y Rivera *et al.* 2021a).

Se conoce que *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. se encuentra desde hace varios años en África, Asia y América del Sur. Esta condición ha favorecido su desarrollo en un sinnúmero de ambientes, lo que beneficia gran diversidad en sus propiedades agronómicas, químicas y de adaptación (Ruiz *et al.* 2013, Miranda *et al.* 2015, Holguín *et al.* 2015 y Luo *et al.* 2016). Colombia no es ajena a esta condición, por lo que existe la posibilidad de identificar y seleccionar

Recibido: 10 de febrero de 2022

Aceptado: 18 de abril de 2022

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



genotipos superiores para lograr mayor aprovechamiento de esta especie en la alimentación animal bovina.

T. diversifolia, comúnmente conocida como botón de oro, falso girasol o girasol mexicano, es una arbustiva que, por su facultad de adaptación a múltiples condiciones ambientales, edáficas y de manejo, capacidad de rebrote, rápido crecimiento y gran valor y aporte nutricional, ha demostrado potencial para la alimentación animal (Olabode et al. 2007, Ribeiro et al. 2016 y Mauricio et al. 2017). Sin embargo, Holguín et al. (2015) y Rivera et al. (2021a) mencionan que no todas las poblaciones son apropiadas para todos los ambientes y, por tanto, identificar las de mayor potencial forrajero es fundamental para su mejor utilización.

Este estudio tiene como propósito presentar los resultados más destacados, en lo que respecta a la determinación de la variabilidad genética y fenotípica de *T. diversifolia* en materiales colectados en Colombia y algunos en México. Desde esta perspectiva, se ha buscado identificar genotipos u orígenes destacados que se adapten a condiciones específicas de producción ganadera. Se realizó una evaluación genética que permitió identificar siete genotipos, propagados y analizados, en cuanto a su interacción genotipo ambiente (GxA), comportamiento fermentativo y propagación mediante el desarrollo de experimentos que se describen brevemente en cuatro secciones.

I. Diversidad genética de materiales de *T. diversifolia* en Colombia y México

Actualmente en Colombia y en otros países donde se usa *T. diversifolia* para la alimentación animal, los análisis de su diversidad genética son escasos y limitados, lo que dificulta planificar y diseñar estrategias de conservación y manejo, así como la selección de líneas de germoplasma y el mejoramiento genético de esta especie (Ruiz et al. 2013 y Luo et al. 2016). A continuación, se describen algunos análisis de diversidad genética de materiales colectados en Colombia y México, orientados a la alimentación de rumiantes, para posteriormente adelantar estudios de desempeño agronómico en parcelas experimentales que se describen más adelante.

Materiales y Métodos

Se colectaron ejemplares de *T. diversifolia* en 31 sitios, distribuidos en Colombia y México. En Colombia, las colectas se realizaron en seis ecorregiones: Eje Cafetero (EEC), Valle del Río Cesar (EVRC), Piedemonte orinocense (EPO), Bajo Magdalena (EBM), Caquetá (CAQ), y Santander y Boyacá (ESB). En México, en los estados de Michoacán (MICH) y Jalisco (JAL).

Para la extracción de ADN se usó el kit comercial DNeasy Plant mini Kit (Qiagen®). Las amplificaciones de

PCR se realizaron de acuerdo con los protocolos desarrollados en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco (México). Para la amplificación de los fragmentos, se evaluaron 45 iniciadores, de los que se seleccionaron 11 (siete oligos ISSR *Inter Simple Sequence Repeats* y cuatro para el gen citocromo P450) (Yamanaka et al. 2003).

La información generada se analizó por medio de un agrupamiento, utilizando el método UPGMA (unweighted pair-group method) y se generó un dendrograma mediante el paquete estadístico NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión 2.02 PC), que sirvió para establecer distancias genéticas. Para cada oligo, se calculó el número de alelos observados y efectivos (Na, Ne), número de bandas polimórficas (P), índice de diversidad genética de Nei (H) e índice de Shannon (I) con la utilización del software POPGENE, versión 3.2 (Yeh et al. 1999).

Resultados y Discusión

De un total de 105 fragmentos amplificados, 5 % fueron monomórficos y 95 % polimórficos. El tamaño de los fragmentos de ADN, producto de la PCR, varió desde los 300 hasta 2,500 pb. Las medidas de variación genética se muestran en la tabla 1. La cantidad de alelos efectivos en los ISSR estudiados varió de 1.0 a 1.9. Los valores de diversidad (H) dejaron ver un total de 6.0 % a 48.8 % de heterocigosidad. Los índices de información de Shannon (I) fueron de 0.13 a 0.67, lo que representa una medida de diversidad genética con un promedio de 0.432 ± 0.227 (tabla 1) e indica el alto polimorfismo en *T. diversifolia*.

El conglomerado tuvo correlación cofenética alta (0.874) y coeficiente de aglomeración de 0.8, lo que significó alta correspondencia entre grupos y diferencias entre ellos (figura 1). El dendrograma sirvió para separar los genotipos, y así generar información para su selección en cada grupo.

En la figura 2 se muestra la estructura genética de las 31 colectas de *T. diversifolia* evaluadas. El análisis basado en la proporción del genoma de cada población mostró cinco grupos bien definidos, que coinciden con el agrupamiento obtenido en el análisis de conglomerados (figura 1).

La estructura genética mostró claramente la existencia de grupos homogéneos que se pueden emplear como un criterio de selección de materiales con fines de mejoramiento y adaptación a cada condición edafoclimática. Estudios anteriores han mostrado que *T. diversifolia* cuenta con gran diversidad fenotípica, variabilidad que ha favorecido su productividad, composición nutricional y adaptabilidad a diferentes condiciones de producción (Yang et al. 2012 y Luo et al. 2016). Estos aspectos se han evaluado por Ruiz et al. (2010) y Holguín et al. (2015), quienes identificaron que esta especie puede variar considerablemente en su capacidad de rebrote, desempeño agronómico y composición química.

Table 1. Parameters of genetic diversity used in the analysis

Oligos	Number of samples	Na*	Ne*	H*	I*	P
(GA)8YT	32	2	1.8824	0.4688	0.6616	10
(AG)8C	32	2	1.7534	0.4297	0.6211	9
(GA)8C	32	2	1.2047	0.1699	0.3111	9
(AG)8YC	32	2	1.9321	0.4824	0.6755	8
(CT)8AGA	32	2	1.3581	0.2637	0.4334	9
T(CT)7CC	32	2	1.8824	0.4688	0.6616	6
(CT)8RG	32	2	1.0644	0.0605	0.1391	10
CYP1A1F/CYP2B6R	32	2	1.5193	0.3418	0.5253	8
CYP1A1F/heme2B6	32	2	1.0644	0.0605	0.1391	10
CY2C19F/CYP21A1R	32	2	1.1327	0.1172	0.2338	13
CY2C19F/heme2B6	32	2	1.8221	0.4512	0.6435	13
Average	32	2	1.4734	0.2812	0.432	
SD		0	0.3631	0.1787	0.2267	

* Na: number of observed alleles, Ne: number of effective alleles (Kimura and Crow 1964), H: genetic diversity of Nei (1973); I: index of Shannon (Lewontin 1972); P: number of polymorphic loci

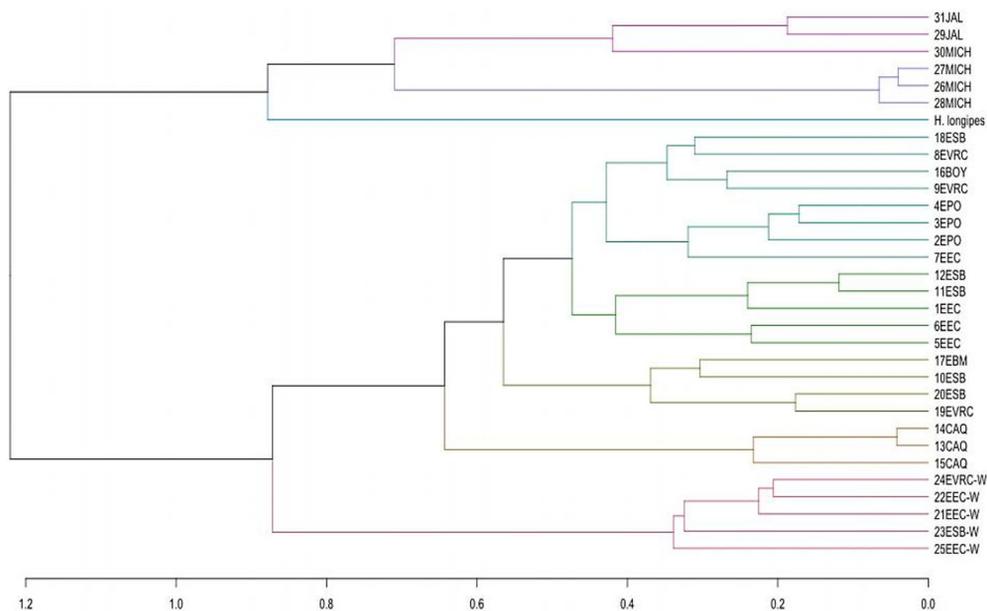


Figure 1. Dendrogram generated by the method of UPGMA for the 31 collections of *T. diversifolia* from Mexico and Colombia, using the index of dissimilarity of Dice

II. Interacción genotipo ambiente y comportamiento agronómico de materiales destacados de *T. diversifolia* en Colombia

En la selección de forrajeras, la determinación de la influencia de factores ambientales en la calidad y posibles interacciones con los genotipos de interés debe ser la base para identificar fuentes nutricionales más eficientes y económicas que fortalezcan los sistemas agropecuarios (Schultze-Kraft *et al.* 2018). Durante los últimos años, los

modelos AMMI (Additive main effects and multiplicative interaction) (Mandel 1971) y SREG (Biplot method using sites regression) (Yan *et al.* 2000) han sido herramientas útiles para determinar la interacción genotipo ambiente en cultivos agrícolas (Bhartiya *et al.* 2017 y Carter *et al.* 2018). Estos modelos incluyen un análisis de varianza y otro de componentes principales (ACP). El análisis de varianza permite estudiar los efectos principales de los genotipos y ambientes y el de CP la interacción GxA, que se trata de forma multivariada para su interpretación gráfica (Alejos *et*

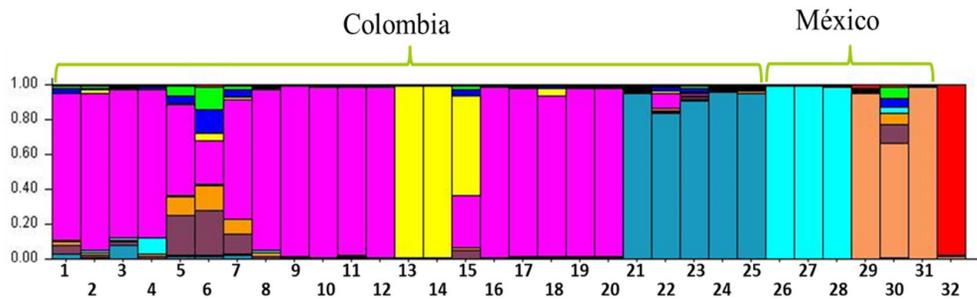


Figure 2. Genetic structure of the collections conducted in Colombia and Mexico

al. 2006). Se muestran seguidamente los resultados de la interacción GxA de siete materiales destacados que se identificaron en Colombia, previamente descritos en el análisis de diversidad genética. La ampliación de los análisis se puede consultar en Rivera et al. (2021a).

Materiales y Métodos

Las evaluaciones de diversidad genética se complementaron con algunas medidas de crecimiento en campo para seleccionar los genotipos a estudiar en parcelas experimentales. Se utilizó el índice de potencial forrajero ponderado (IPFP) en cada conglomerado (Holguín et al. 2015) construido en el análisis genético para comparar e identificar los materiales con mayor potencial agronómico, que fueron los de mayor valoración. Los materiales identificados (7) se propagaron clonalmente en laboratorio y se establecieron tres parcelas dispuestas en un diseño de bloques completos al azar con todos los materiales y en dos localidades: Ambiente 1) trópico bajo sin fertilización - REG1; Ambiente 2) trópico bajo con fertilización - REG1Fert; Ambiente 3) trópico alto sin fertilización - REG2). Para la selección de los sitios, se utilizaron los criterios de representatividad edafoclimática del lugar y potencialidad de crecimiento de *T. diversifolia* (precipitación, temperatura, radiación solar, suelo y vocación ganadera).

Las parcelas experimentales correspondientes a los ambientes 1 y 2 se establecieron en el municipio de San Luis de Cubarral (Meta, Colombia) a 530 m s.n.m., con precipitación media anual de 4100 mm, temperatura promedio de 24.8 °C, clasificado como bosque húmedo tropical (bh-T) (Holdridge 1986) (3°47'21.43"N, 73°49'15.93"O). Las parcelas del ambiente 3 se establecieron en el municipio de Villamaría (Caldas, Colombia) (5°0'44.92"N, 75°25'47.28"O), a una altitud de 2300 m s.n.m., con temperatura media de 15 °C y precipitación anual de 2850 mm año, lo que se corresponde con un bosque húmedo montano bajo (bmh-MB) (Holdridge 1986).

Para el análisis de la interacción GxA de la producción de biomasa, se utilizaron dos métodos no paramétricos: el

análisis tipo AMMI y el análisis SREG. Se hicieron dos muestreos en época de lluvias y dos en época seca, cada 40 y 60 d respectivamente en cada localidad.

Resultados y Discusión

En los ambientes REG1 y REG1Fert, los materiales con mayor rendimiento fueron el Gen7 (106.51 g) y el Gen5 (85.92 g). Los de menor rendimiento de MS fueron el Gen1, Gen4 y Gen3, con promedio de 65.85, 68.67 y 73.54 g de MS cada 40 d. La figura 3 muestra la representación de cada uno de los materiales en cada ambiente, de acuerdo con su rendimiento de MS.

Como promedio, la producción de MS en la época de lluvias fue de 1.4 veces superior con respecto a lo encontrado en la época de bajas precipitaciones. El uso de fertilizantes incrementó la MS/planta en 98.6 % como promedio en las dos épocas, con mayor influencia en la época de lluvias (2.3 veces). Los materiales con mayor respuesta a la fertilización fueron los genotipos 2, 4 y 6, y los de menor respuesta, el 7 y 3. Los genotipos con mejor respuesta en la época seca, representada por menor disminución de la producción de biomasa con respecto a la época de lluvias, fueron los genotipos 3, 1 y 2, aunque ninguno estuvo en el grupo de genotipos con mejor desempeño en estas condiciones. Los genotipos 4 y 1 resultaron los que más aportaron a la variabilidad, al estar más alejados de los ejes representados por cada uno de los ambientes en REG1.

Para la zona REG2 (figura 3), los materiales con mayor producción fueron el Gen4 y el Gen7, con rendimientos de MS por planta de 152.63 y 128.87 g, respectivamente, a pesar de presentar mayor variabilidad. Los materiales con menor rendimiento fueron Gen1, Gen3 y Gen6, con 63.58, 82.73 y 94.42 g de MS/planta cada 60 d, respectivamente. En esta zona, los materiales disminuyeron su rendimiento en 13.5 % como promedio, con respecto a la época de lluvias y la de sequía. Los materiales con menor efecto de la época fueron el Gen5 y Gen6.

En el análisis de varianza del modelo AMMI (tabla 2), los genotipos como los ambientes y la interacción GxA presentaron diferencias significativas para el rendimiento de

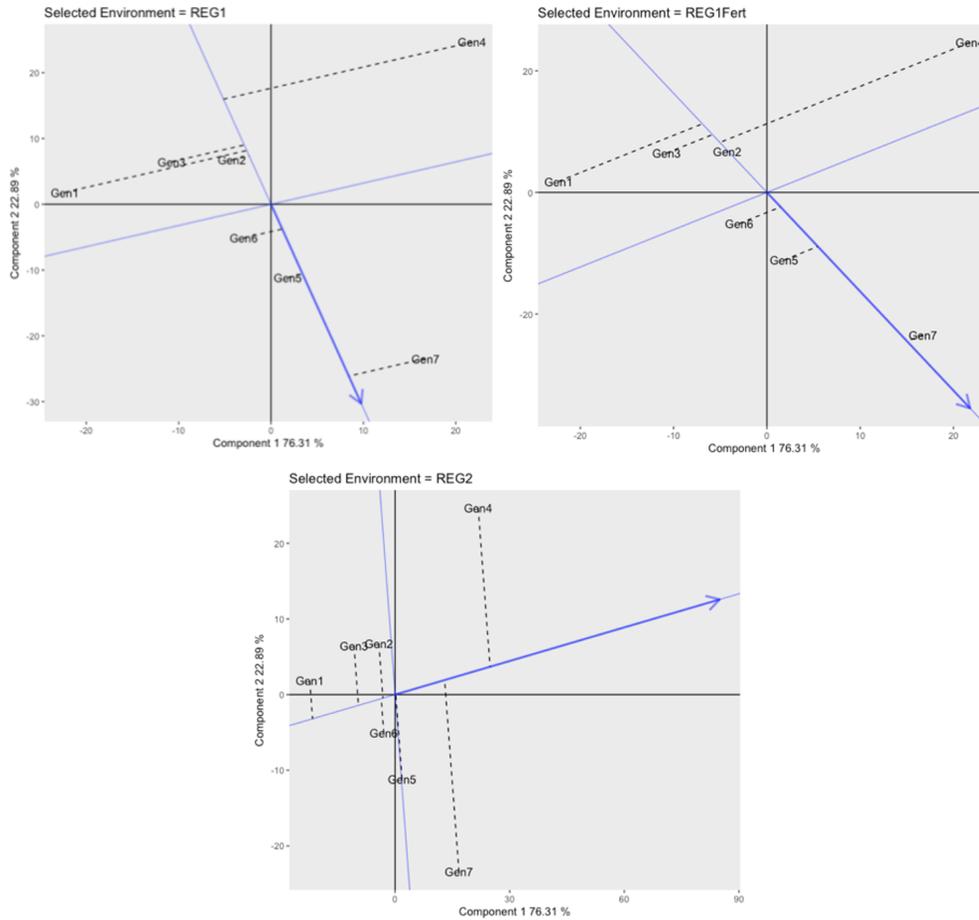


Figure 3. Representation GGEplot of DM yield in *T. diversifolia* genotypes under study in each locality

Table 2. Analysis of variance of the AMMI model for GxE interaction in DM yield

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Variation, %	Pr(>F)	
Environment	2	72305	36152	98.55	53.26	0.000026	***
REP (environment)	6	2201	367	1.237	1.621	0.294	
Genotype	6	32820	5470	18.44	24.17	2.77E-14	***
Environment:genotype	12	28418	2368	7.98	20.93	2.97E-10	***
Residues	99	29360	297				

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 Coefficient of var: 19.45; DM average: 88.50

MS por planta ($p < 0.05$). Esta condición se presenta gráficamente en la [figura 4](#). Los materiales Gen7 y Gen5 se asocian a mejores rendimientos en las zonas REG1 y REG1Fert, y Gen4 en REG2. Como genotipos ideales se identificaron Gen7 y Gen5 porque se encontraban más cercanos al origen de las circunferencias presentadas en la [figura 5](#).

Finalmente, según el índice de Shukla, los Gen7 y Gen5 fueron los más estables. Esto se debe a su relativo alto rendimiento productivo, que se determinó a través de los tres ambientes estudiados y baja variabilidad.

III. Comportamiento fermentativo de diferentes materiales de *T. diversifolia*

Se ha demostrado que algunos compuestos fitoquímicos, como los taninos, saponinas y aceites esenciales, contribuyen a disminuir la producción entérica de metano y a modificar las tasas de producción de gases a nivel ruminal, debido a sus efectos inhibidores en ciertos grupos de microorganismos en el rumen ([Delgado et al. 2012](#), [Barahona et al. 2013](#), [Banik et al. 2013](#) y [Bhatta et al. 2013](#)). *T. diversifolia*, por sus características químicas,

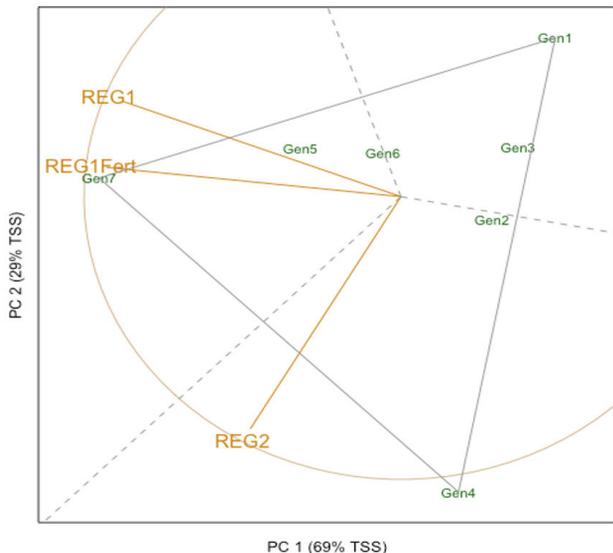


Figure 4. GGEplot of DM yield of *T. diversifolia* genotypes in three environments

puede modificar el comportamiento fermentativo de dietas basadas en pasturas tropicales y puede presentar diferencias entre genotipos (Rivera et al. 2021a). Seguidamente, se muestran los principales resultados en el comportamiento de fermentativo de siete genotipos destacados de Colombia. Para más información se puede consultar Rivera et al. (2021b).

Materiales y Métodos

Se evaluaron los siete genotipos destacados de *T. diversifolia*, identificados en parcelas experimentales en condiciones de trópico de altura (5°0'44.92"N, 75°25'47.28"O - 2300 m s.n.m.) como de trópico bajo (3°47'21.43"N, 73°49'15.93"O - 530 m s.n.m.), de acuerdo con las descripciones anteriormente presentadas en los trabajos de interacción GxA. Los genotipos se mezclaron con pasturas utilizadas tradicionalmente en cada localidad, de acuerdo con Donneys et al. (2015) y Molina et al. (2015). Según estos autores, el consumo en sistemas de *T. diversifolia* en alta densidad asociada con *Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov.) es de 80 % de pastura y 20 % de arbustiva (trópico de altura) de la MS total de la dieta. Para la asociación con pasturas de género *Urochloa*, como *Urochloa brizantha* cv Marandú, el consumo es de 75 % para la pastura y 25 % de *T. diversifolia* (trópico bajo) (MS de la dieta).

El comportamiento fermentativo, la producción de metano (CH₄), la generación de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV) y la degradabilidad de la MS de los diferentes materiales se estudiaron por medio de la técnica *in vitro* de producción de gases (Theodorou et al. 1994), con

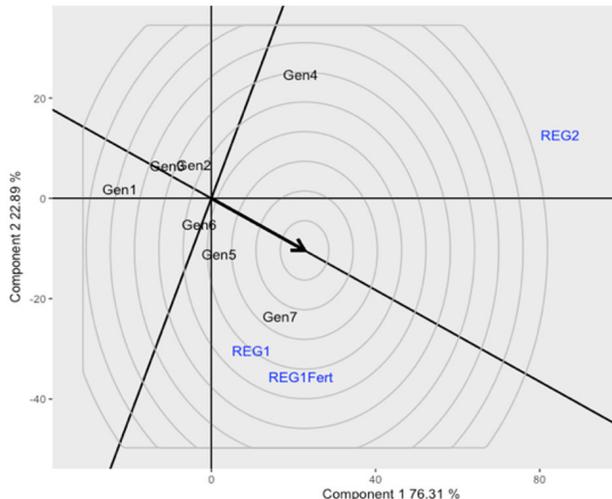


Figure 5. Ranking of genotypes in respect to the ideal genotype

la utilización de un diseño de bloques completos al azar (Rivera et al. 2021b).

Resultados y Discusión

Para las condiciones de trópico bajo, la inclusión de *T. diversifolia* resultó en diferencias significativas en todas las variables medidas a excepción del extracto etéreo y la energía bruta ($p < 0.05$) ante la dieta base de *U. brizantha*, pero no hubo diferencias entre las dietas que incluyeron *T. diversifolia*. En general, la inclusión de *T. diversifolia* disminuyó el contenido de MS y de fibra de la dieta, pero incrementó la oferta de minerales y extracto libre de nitrógeno, además de mejorar la degradabilidad de la MS ($p < 0.05$). También se destaca que el uso de fertilización en *T. diversifolia* resulta en aumento de PC, Ca, P y Enl y degradabilidad con respecto a dietas de *T. diversifolia*, sin fertilizar.

La inclusión de *T. diversifolia* en dietas basadas en *U. brizantha* modificó algunos parámetros de fermentación ruminal *in vitro*. Su uso tuvo efectos significativos en las variables de tasa máxima de producción de gas (TMPG) y fase lag (FL, tiempo que demora la colonización de microorganismos del rumen al alimento e inicia su fermentación) ($p < 0.05$), pero no en la hora al punto de inflexión (HPI) y gas al punto de inflexión (GPI). La fertilización de *T. diversifolia* representó incremento significativo en la tasa máxima de producción de gases con respecto a las dietas sin fertilizar ($p < 0.05$). Entre las mezclas, los genotipos 1, 3 y 7 presentaron menores valores de TMPG. La mezcla de los genotipos 2 y 3 mostraron mayores valores de FL ($p = 0.007$). De acuerdo con las características químicas de los genotipos de *T. diversifolia* y de *C. clandestinus* (trópico alto) y según porcentaje de inclusión, para ninguno de los parámetros estudiados la

utilización de la arbustiva tuvo efectos significativos ($p > 0.05$) con esta gramínea.

En la degradación de la MS, las mezclas de *T. diversifolia* y *U. brizantha* no tuvieron diferencias en el horario de las 24 h, pero a las 72 h de fermentación las dietas que incluyeron *T. diversifolia* presentaron, como promedio, 4.72 % más de degradación de la MS que la dieta con 100 % gramínea ($p < 0.05$), pero sin diferencias entre las que incluyeron *T. diversifolia*. Los materiales fertilizados presentaron diferencias significativas con respecto a las dietas con los genotipos de *T. diversifolia* sin fertilizar ($p < 0.05$). En lo que respecta a las dietas de trópico alto, la inclusión de los diferentes genotipos de *T. diversifolia* en dietas basadas solo en *C. clandestinus*, disminuyó en 4.6 % de forma significativa la degradación en ambos horarios. Sin embargo, entre las mezclas que tuvieron *T. diversifolia* no hubo diferencias.

En cuanto a la producción de AGV, a las 24 h de incubación *U. brizantha* tuvo menor producción de ácido propiónico (mol/100 mol) con diferencias ante las mezclas que incluyeron los genotipos 5, 6 y 7 de *T. diversifolia* ($p = 0.0321$). Los genotipos 2 y 4 fueron los que generaron mayores cantidades de ácido acético y la dieta Gen6 fue la que produjo menores valores de AGV totales entre las mezclas con *T. diversifolia* (mol/100 mol). La relación A:P también presentó diferencias significativas con los mayores valores en la dieta 100 % *U. brizantha* ($p = 0.004$), condición igualmente encontrada para la producción de ácido acético ($p = 0.012$). En el horario de 72 h, la producción de ácido acético, propiónico, butírico, producción total de AGV totales y la relación A:P tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) para los valores en mol/100 mol, como para Mmol/L. La inclusión de *T. diversifolia* generó menores cantidades de ácido acético y mayor producción de propiónico, además, la relación A:P fue menor en todas las dietas con *T. diversifolia*. La mezcla de Gen4, Gen7 y *U. brizantha* 100 % fueron los tratamientos con menor producción de ácido butírico. En tanto, las dietas con Gen4 y 100 % *U. brizantha* fueron las que mayor producción de AGV totales generaron, con diferencias significativas con respecto a la mezcla Gen1, Gen5 y Gen6. El uso de fertilizante presentó diferencias significativas en las variables de ácido acético, propiónico y butírico, así como en la relación A:P.

En cuanto a la producción de metano en las dietas de trópico bajo, la inclusión de *T. diversifolia* disminuyó significativamente la producción de CH_4 con respecto a la dieta con 100 % de *U. brizantha*, especialmente en las emisiones por mg de CH_4/g de MSD a las 72 h. Como promedio, al horario de 72 h, el uso de la arbustiva disminuyó en 1.2, 2.42 y 5.79 unidades de Ym, mg de CH_4/g de MSI y mg de CH_4/g de MSD, respectivamente. Además, entre las mezclas con *T. diversifolia*, Gen2, Gen4 y Gen7

tuvieron las emisiones más bajas en términos de mg de CH_4/g de MSI ($p = 0.006$), y el Ym más alto fue el de *U. brizantha* 100 % y la dieta con Gen6. Para las dietas evaluadas, la fertilización no tuvo efecto significativo ni diferencias entre las mezclas que incluyeron *T. diversifolia* (Rivera et al. 2021), y en las dietas de trópico alto la inclusión de *T. diversifolia* no tuvo diferencias significativas para las unidades de medición evaluadas ni en los horarios trabajados ($p > 0.05$).

IV. Propagación y desarrollo de diferentes materiales destacados de *T. diversifolia* en Colombia

T. diversifolia se puede reproducir por semilla gámica como por asexual, lo que le confiere gran capacidad de reproducción y colonización de nuevos hábitats (Ruiz et al. 2009 y Obukohwo y Umar 2014). Esta especie florece y produce semillas durante todo el año, especialmente en octubre y noviembre, aunque por condiciones ambientales puede ser de floración anual (Pérez et al. 2009 y Chagas-Paula et al. 2012). Las plantas típicamente maduras producen entre 80.000 y 160.000 semillas por metro cuadrado anualmente, de las cuales 70 % se desarrollan completamente. Sin embargo, De Guerra (1996) y Obukohwo y Umar (2014) informaron porcentajes de germinación por debajo del 30 % en condiciones naturales.

Aunque observaciones de campo indican que *T. diversifolia* tiene gran capacidad para crecer clonalmente (Ruiz et al. 2009), en la actualidad se sabe que el material proveniente de semilla sexual puede favorecer el desarrollo de sistemas radiculares más extensos, plantas más vigorosas, mayor persistencia de los cultivos y recuperación más rápida después del corte o pastoreo. Sin embargo, aún es difícil alcanzar material seminal de buena calidad (Romero et al. 2014), y adicionalmente, en esta especie existen genotipos con diferente capacidad de germinación (Ruiz et al. 2018). Se presentan seguidamente los principales resultados del estudio de los siete genotipos destacados en Colombia, en términos de propagación y de reproducción, para más información consultar Rivera et al. (2021c).

Materiales y Métodos

Se evaluaron los siete genotipos destacados de *T. diversifolia*, identificados en los trabajos de diversidad genética y estudiados en los demás experimentos antes presentados.

Se midieron las variables duración de la fase vegetativa (d), duración de la fase reproductiva (d), duración del secado de aquenios (d), fase de floración (d), cabezuelas por plantas (#), semillas por cabezuela (#), semillas por planta (#), semillas llenas (%), semillas vacías (%) y semillas rudimentarias (%). Además, se evaluaron dos tratamientos pregerminativos y un tratamiento sin proceso previo para la

germinación de la semilla sexual. Los tratamientos pregerminativos fueron: agua a 80 °C durante 10 min, según Akinola et al. (2000), Agboola et al. (2005) y Nasreen et al. (2015), y ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 50 % durante 5 min. (Muoghalu y Chuba 2005). La semilla se almacenó durante cuatro meses después de colectada, con el objetivo de disminuir la latencia fisiológica (Agboola et al. 2005 y Santos-Gally et al. 2020). La germinación se evaluó en macetas experimentales en laboratorio durante 20 d.

Resultados y Discusión

Los genotipos evaluados tuvieron diferencias significativas en todas las variables de desarrollo, a excepción del tiempo de secado de achenios y del porcentaje de semillas rudimentarias (p<0.05). El genotipo 1 (140.1 d) fue el material que tomó mayor tiempo en la sumatoria de las etapas de crecimiento y desarrollo (fase de floración). El genotipo 4 (127.2 d) fue el que presentó menores tiempos con diferencias significativas (p<0.05).

En relación con la producción de semilla sexual, la fertilización tuvo efecto significativo, al generar 2.14 veces más semillas (p<0.05) y, en general, incrementó el tiempo de las fases evaluadas en aproximadamente cinco días. Los genotipos 5 y 7 fueron los materiales con mayor producción de cabezuelas por plantas, mayor porcentaje de semillas llenas y mayor número de semillas por planta, lo que se asocia a su mayor número de ramas. De igual forma, se destaca el porcentaje de semillas vacías en todos los genotipos, así como de semillas rudimentarias, lo que conduce a que más de 30 % de las semillas no tengan viabilidad física.

En cuanto a la germinación (tabla 3), hubo diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (p=0.000118). Como promedio, los porcentajes de germinación fueron 46.87, 53.53 y 25.97 % para el tratamiento testigo, uso de agua a 80 °C y ácido sulfúrico, respectivamente, y este proceso inició a los tres días después de la siembra. La germinación de las semillas sin tratamiento fue significativamente menor en el genotipo 1 que en los otros seis genotipos (p<0.0001). Además, este mismo genotipo tuvo los valores más bajos, cuando se usó el tratamiento con agua y el de ácido sulfúrico, aunque no mostró diferencias significativas con los genotipos 2 y 7. La fertilización

incrementó como promedio 9.2 % la germinación de los diferentes genotipos. El tratamiento que logró mayor germinación fue el uso de agua a 80 °C, y el de menor germinación fue el que utilizó ácido sulfúrico. En general, los genotipos 3 y 6 fueron los que presentaron mayor porcentaje de germinación, pero solo tuvieron diferencias significativas ante el genotipo 1.

Conclusiones

Según los experimentos realizados, se concluyó que *T. diversifolia* es una especie que se puede utilizar como arbustiva forrajera en diferentes condiciones edafoclimáticas, gracias a su alta diversidad genética. A pesar de que se identificó una alta calidad nutricional en todos los genotipos evaluados, basada en altos contenido de PC (>25 %), energía y minerales como Ca y P, además, de brindar bajos valores de FDN y FDA (49 y 46 %, respectivamente) y alta degradabilidad *in vitro*, existe la posibilidad de seleccionar materiales superiores para aumentar su crecimiento y producción de biomasa en condiciones específicas de producción.

Se identificaron los genotipos 5 y 7 como de mayor desempeño agronómico en las condiciones de suelos ácidos y de baja calidad en zonas cálidas, y el genotipo 4 se mostró como el que posee mayor desarrollo en condiciones de trópico de altura, debido a la interacción GxA de esta especie.

Por sus características químicas, esta arbustiva modifica los parámetros de fermentación, al incrementar la generación de ácido propiónico, la eficiencia general del proceso fermentativo y disminuir la proporción A:P. También *T. diversifolia* en dietas de baja calidad tiene el potencial de disminuir las emisiones de CH₄ en condiciones *in vitro*. Sin embargo, se encontraron diferencias entre algunos genotipos evaluados, en cuanto a su potencial de modificar la dinámica de fermentación y la producción de CH₄.

Finalmente, *T. diversifolia* cuenta con genotipos capaces de tener fases de crecimiento y desarrollo significativamente diferentes entre ellos, modificando su momento reproductivo y de producción de semilla sexual. Además, gracias al crecimiento diferenciado, existen genotipos con

Table 3. Germination percentage in sexual seeds for different *Tithonia diversifolia* genotypes

Trial	Genotypes							Fertilization		Genotype	Fertilization	SEM
	Gen1	Gen2	Gen3	Gen4	Gen5	Gen6	Gen7	No	Si			
Trial 1	32.62 ^b	45.36 ^a	54.02 ^a	45.82 ^a	47.69 ^a	53.99 ^a	48.62 ^a	42.65	51.11	<0.001	0.002	1.53
Trial 2	39.54 ^b	51.64 ^a	58.18 ^a	54.01 ^a	52.89 ^a	62.23 ^a	56.88 ^a	46.94	59.46	0.001	<0.001	1.89
Trial 3	17.53 ^c	22.31 ^{abc}	31.97 ^a	30.34 ^{ab}	19.68 ^a	31.83 ^a	26.59 ^{abc}	23.36	30.15	0.001	0.025	1.31

Trial 1: without previous treatment; Trial 2: water at 80 °C for 10 min; Trial 3: Sulfuric acid immersion

*Different letters in the same row denote statistical difference according to the test of Tukey (p<0.05).

mayor producción de semilla sexual viable, asociada al número de tallos y flores por planta, como los genotipos 5 y 7. La información generada en estos estudios puede ser la base para establecer programas de selección, caracterización, mejoramiento y conservación de genotipos superiores de esta especie, orientados a la producción animal.

Referencias

- Agboola, D.A., Idowu, W.F. & Kadiri, M. 2006. "Seed germination and seedling growth of the Mexican sunflower *Tithonia diversifolia* (Compositae) in Nigeria, Africa". *Revista de Biología Tropical*, 54 (2): 395-402, ISSN: 0034-7744.
- Akinola, J.O., Larbi, A., Farinu, G. O. & Odunsi, A.A. 2000. "Seed treatment methods and duration effects on germination of wild sunflower". *Experimental Agriculture*, 36(1): 63 - 69, ISSN: 1469-4441. <https://doi.org/10.1017/S0014479700361075>.
- Alejos, G., Monasterio, P. & Rea, R. 2006. "Análisis de la interacción genotipo ambiente para rendimiento de maíz en la región maicera del estado Yaracuy, Venezuela". *Agronomía Tropical*, 56 (3): 369-384, ISSN: 0002-192X.
- Banik, B.K., Durmic, Z., Erskine, W., Ghamkhar, K. & Revell, C. 2013. "In vitro ruminal fermentation characteristics and methane production differ in selected key pasture species in Australia". *Crop & Pasture Science*, 64: 935-942, ISSN: 1836-5795. <http://dx.doi.org/10.1071/CP13149>.
- Barahona, R., Lascano, C. E., Narvaez, N., Owen, E., Morris, P. & Theodorou, M. K. 2003. "In vitro degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12): 1256-1266, ISSN: 0022-5142. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1534>.
- Bhartiya, A., Aditya, J.P., Singh, K., Pushpendra, Purwar, J.P. & Agarwal, A. 2017. "AMMI & GGE biplot analysis of multi environment yield trial of soybean in North Western Himalayan state Uttarakhand of India". *Legume Research*, 40 (2): 306-312, ISSN: 0976-0571. <http://dx.doi.org/10.18805/lr.v0iOF.3548>.
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., Sampath, K.T. & Prasad, C.S. 2013. "Effect of plant secondary compounds on in vitro methane, ammonia production and ruminal protozoa population". *Journal of Applied Microbiology*, 115(2): 455-465, ISSN: 1365-2672. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12238>.
- Carter, A., Rajcan, I., Woodrow, L., Navabi, A. & Eskandari, M. 2018. "Genotype, environment, and genotype by environment interaction for seed isoflavone concentration in soybean grown in soybean cyst nematode infested and non-Infested environments". *Field Crops Research*, 216: 189-196, ISSN: 0378-4290. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2017.11.021>.
- Chagas-Paula, D. A., Oliveira, R. B., Rocha, B. A. & Da Costa, F. B. 2012. "Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae)". *Chemistry & Biodiversity*, 9(2): 210-235, ISSN: 1612-1880. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201100019>.
- De Guerra, N., Lárez, A. & Mayz, J. 2007. "Adiciones al conocimiento citogenético de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray (Asteraceae)". *Acta Botanica Venezuelica*, 30(2): 267 - 275, ISSN: 0084-5906.
- Delgado, D.C., Galindo, J., González, R., González, N., Scull, I., Dihigo, L., Cairo, J., Aldama, A.I. & Moreira, O. 2012. "Feeding of tropical trees and shrub foliage as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba". *Tropical Animal Health and Production*, 44(5): 1097-1104, ISSN: 1573-7438. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0045-5>.
- Donneys, G., Molina, I.C., Rivera, J.E., Villegas, G., Chará, J. & Barahona, R. 2015. Producción in vitro de metano de dietas ofrecidas en sistemas silvopastoriles intensivos con *Tithonia diversifolia* y sistemas tradicionales. 3er Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles y VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, 672-677 pp.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M. & Srinivasan, M. 2015. "Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives". *Genetics Research International*, 2015: 431487, ISSN: 2090-3162. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/431487>.
- Holdridge, L. R. 1986. *Ecología basada en zonas de vida*. Leslie Holdridge. IICA. San José, Costa Rica.
- Holguín, V.A., Ortiz, S., Velasco, A. & Mora, J. 2015. "Evaluación multicriterio de 44 introducciones de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en Candelaria, Valle del Cauca". *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62(2): 57-72, ISSN: 0120-2952. <http://dx.doi.org/10.15446/rfmvz.v62n2.51995>
- Kimura, M. & Crow, J.F. 1964. "The number of alleles that can be maintained in a finite population". *Genetics*, 49(4): 725-738, ISSN: 1943-2631. <http://doi.org/10.1093/genetics/49.4.725>.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. In: Dobzhansky, T., Hecht, M.K., Steere, W.C. (eds) *Evolutionary Biology*. Springer, New York, NY. http://doi.org/10.1007/978-1-4684-9063-3_14.
- Luo, L., Zhang, P., Ou, X. & Geng, Y. 2016. "Development of EST-SSR markers for the invasive plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)". *Applications in Plant Sciences*, 4 (7): 1600011, ISSN: 2168-0450. <http://doi.org/10.3732/apps.1600011>.

- Mandel, J. 1971. "A new analysis of variance model for non-additive data". *Technometrics*, 13: 1-18, ISSN: 1537-2723.
- Mauricio, R.M., Calsavara, L.H.F., Ribeiro, R.S., Pereira, L.G.R., de Freitas, D.S., Paciullo, D.S., Barahona, R., Rivera, J.E., Chará, J. & Murgueitio, E. 2017. "Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage". *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(4): 00146, ISSN: 2377-4312. <http://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00146>.
- Miranda, M.A.F.M., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G., Gualtieri, S.C.J. & Macias, F.A. 2015. "Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*". *Journal of Natural Products*, 78: 1083 -1092, ISSN: 1520-6025. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00040>.
- Molina, I.C., Donneys, G., Montoya, S., Villegas, G., Rivera, J.E., Chará, J., Lopera, J.J. & Barahona, R. 2015. Emisiones in vivo de metano en sistemas de producción con y sin inclusión de *Tithonia diversifolia*. 3er Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles y VIII Congreso Internacional de Sistemas Agroforestales. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, 678-682 pp.
- Muoghalu, J.I. & Chuba, D.K. 2005. "Seed germination and reproductive strategies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and *Tithonia rotundifolia* (P.M.) Blake". *Applied Ecology and Environmental Research*, 3(1): 39 - 46, ISSN: 1589-1623.
- Nasreen, S., Khan, M.A. & Uddin, S. 2015. "Response of sunflower to various pre-germination techniques for breaking seed dormancy". *Pakistan Journal of Botany*, 47(2): 413-416, ISSN: 0556-3321.
- Nei, M. 1973. Analysis of gen diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12): 3321-3323, ISSN: 0027-8424. <http://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>.
- Obukohwo, E. & Umar, B. 2014. "Seed Production, Germination, Emergence and Growth of *Tithonia diversifolia* (HEMSL) A. Gray as Influenced by Different Sowing Depths and Soil Types". *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 14(5): 440-444, ISSN: 1990-4053.
- Olabode O.S., Sola O., Akanbi W.B., Adesina G.O. & Babajide P.A. 2007. "Evaluation of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray for Soil Improvement". *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(4): 503-507, ISSN: 1817-5082.
- Pérez, A., Montejó, I., Iglesias, J., López, O., Martín, G.J., García, D.E., Milián, I. & Hernández, A. 2009. "*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray". *Pastos y Forrajes*, 32(1): 1 - 15, ISSN: 2078-8452.
- Ribeiro, R.S., Terry, S.A., Sacramento, J.P., Rocha e Silveira, S., Bento, C.B., Silva, E.F., Montovani, H.C., Gama, M.A.S., Pereira, L.G., Tomich, T.R., Mauricio, R.M. & Chaves, A. 2016. "*Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows". *PLoS ONE*, 11: e0165751, ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165751>.
- Rivera-Herrera, J., Chará, J., Arango, J. & Barahona-Rosales, R. 2021b. "Effect of different genotypes of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. on fermentation of feed mixtures with *Urochloa brizantha* cv. Marandú". *Crop and Pasture Science*, 72(10): 850 - 859, ISSN: 1836-5795. <https://doi.org/10.1071/CP211102>
- Rivera, J.E., Ruiz, T.E., Chará, J., Gómez-Leyva, J.F. & Barahona, R. 2021a. "Biomass production and nutritional properties of promising genotypes of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray under different environments". *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 9(3): 280-291, ISSN: 2346-3775. [https://doi.org/10.17138/tgft\(9\)280-291](https://doi.org/10.17138/tgft(9)280-291)
- Rivera-Herrera, J.E., Ruíz-Vásquez, T., Chará-Orozco, J., Gómez-Leyva, J.F. & Barahona-Rosales, R. 2021c. "Fases de desarrollo y propagación de ecotipos destacados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray". *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarías*, 12(3): 811-827, ISSN: 2448-6698. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i3.5720>.
- Romero, O., Galindo, A., Murgueitio, E. & Calle, Z. 2014. "Primeras experiencias en la propagación de botón de oro (*Tithonia diversifolia*, Hemsl. Gray) a partir de semillas para la siembra de sistemas silvopastoriles intensivos en Colombia". *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17: 524 - 528, ISSN: 1870-0462.
- Ruiz, T.E., Febles, G., Díaz, H. & Achan, G. 2009. "Efecto de la sección y el método de plantación del tallo en el establecimiento de *Tithonia diversifolia*". *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43(1): 91-96, ISSN: 0034-7485.
- Ruiz, T. E., Febles, G., Torres, V., González, J., Achan, G., Sarduy, L. & Díaz, H. 2010. "Evaluación de materiales recolectados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la zona centro-occidental de Cuba". *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44(3): 291-296, ISSN: 0034-7485.
- Ruiz, T.E., Torres, V., Febles, G., Díaz, H. & González, J. 2013. "Estudio del comportamiento de genotipos destacados de *Tithonia diversifolia* en relación con algunos componentes morfológicos". *Livestock Research for Rural Development*, 25(9), Article #154, ISSN: 2521-9952. <http://www.lrrd.org/lrrd25/9/ruiz25154.htm>.
- Ruiz, T.E., Febles, G., Achan, G., Díaz, H. & González, J. 2018. "Capacidad germinativa de semilla gámica de materiales colectados de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray en la zona centro-occidental de Cuba". *Livestock Research for Rural Development*, 30(5), Article #81, ISSN: 2521-9952. <http://www.lrrd.org/lrrd30/5/ruiz30081.html>.

- Santos-Gally, R., Muñoz, M. & Franco, G. 2020. "Fruit heteromorphism and germination success in the perennial shrub *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)". *Flora*, 271: 151686, ISSN: 1618-0585. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151686>.
- Schultze-Kraft, R., Rao, I.M., Peters, M., Clements, R.J., Bai, C. & Liu, G. 2018. "Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview". *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 6(1): 1-14, ISSN: 2346-3775. [https://doi.org/10.17138/tgft\(6\)1-14](https://doi.org/10.17138/tgft(6)1-14).
- 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 (3-4): 185-197, ISSN: 0377-8401. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Yamanaka, S., Suzuki, E., Tanaka, M., Takeda, Y., Watanabe, J.A. & Watanabe, K.N 2003. "Assessment of cytochrome P450 sequences offers a useful tool for determining genetic diversity in higher plant species". *Theoretical Applied Genetics*, 108(1):1-9, ISSN: 1432-2242. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1403-0>.
- Yan, W., Hunt, L.A., Sheng, Q. & Szlavnic, Z., 2000. "Cultivar evaluation and mega environment investigation based on the GGE biplot". *Crop Science*, 40(3): 597-605, ISSN: 1435-0653. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.403597x>.
- Yang, J., Tang, L., Guan, Y. & Sun, W. 2012. "Genetic Diversity of an Alien Invasive Plant Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China". *Weed Science*, 60: 552-557, ISSN: 1550-2759. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00175.1>.
- Yeh, F.C., Yang, R.C. & Boyle, T. 1999. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology center, University of Alberta, Canada.