

TG 146

Variacion en la comp



FV/28365

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“VARIACIÓN EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*
DE PASTURAS DE ACUERDO AL HORARIO DE CORTE”**

por

**Marcelo ANTÚNEZ FROS
Alexandra CARAMELLI UMPIERREZ**



**TESIS DE GRADO presentada como uno de los
requisitos para obtener el título
de Doctor en Ciencias Veterinarias.
(Orientación Producción Animal, Bloque Ruminantes)**


MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2009**



PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:


Ing. Agr. Ramiro Zanoniani

Segundo Miembro (Tutor):

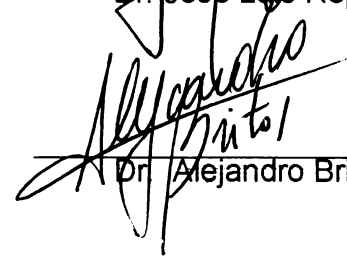

Dra. Cecilia Cajarville

Tercer Miembro:


Dr. Roberto Kremer

Co-tutores



Dr. José Luis Repetto


Dr. Alejandro Britos

Fecha:

21 de diciembre de 2009

Autores:


Marcelo Fabián Antúnez Fros


Alexandra Carolina Caramelli Umpiérrez

AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres y hermanos, por el cariño, el apoyo y la paciencia a lo largo de todos estos años. Muchas gracias por todo.

Un agradecimiento especial a mi mamá (Blanca), por el amor que siempre recibimos de ella y tanto deseó este momento.

A los abuelos, por el apoyo y el cariño brindado a lo largo de la carrera.

A los Dres. Cecilia Cajarville, José L. Repetto y Alejandro Britos por la tutoría y co-tutoría en la conducción de este trabajo.

A Fernando Donnini, por su ayuda en el comienzo de este trabajo.

A nuestros colegas y amigos del Dpto. de Nutrición Animal, Dres. Analía Pérez y Sebastián Brambillasca y del Dpto. de Bovinos, Ing. Agrónomo Alejandro Mendoza y al Dr. Martín Aguerre.

A la Facultad de Veterinaria, Montevideo – Uruguay.

Al Departamento de Producción Animal y pasturas de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC).

TABLA DE CONTENIDO

V.A. 2017
Página

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	2
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	5
4.1. ALGUNOS ASPECTOS RELACIONADOS AL VALOR NUTRITIVO DE LOS FORRAJES.....	5
4.1.1. <u>Comparación entre Gramíneas y Leguminosas</u>	5
4.1.2. <u>¿Cómo influye el tipo de metabolismo fotosintético en el valor nutritivo de las plantas?</u>	6
4.1.3. <u>¿Cómo influye el horario de corte sobre la composición química de las plantas?</u>	7
4.2. IMPORTANCIA DEL CONTENIDO DE AZÚCARES SOLUBLES EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y EL DESEMPEÑO ANIMAL.....	8
4.3. ESTUDIO DE LA FERMENTESCIBILIDAD RUMINAL.....	9
4.3.1. <u>Técnica de producción de gas <i>in vitro</i></u>	10
4.3.2. <u>Modelos matemáticos para predecir la producción de gas <i>in vitro</i></u>	11
5. <u>HIPÓTESIS</u>	13
6. <u>OBJETIVOS</u>	14
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
7. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	14
7.1. MUESTREO.....	14
7.2. PROCEDIMIENTO Y DETERMINACIONES.....	16
7.2.1. <u>Análisis químicos</u>	16
7.2.2. <u>Producción de gas <i>in vitro</i></u>	16
7.2.3. <u>Análisis estadísticos</u>	19
8. <u>RESULTADOS</u>	20
8.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PASTURAS.....	20
8.2. PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i>	23
8.2.1. <u>Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia</u>	23

8.2.2. <u>Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo logístico bifásico</u>	24
8.3. <u>CORRELACIONES</u>	26
8.3.1. <u>Correlaciones entre componentes químicos</u>	26
8.3.2. <u>Correlaciones y regresiones entre componentes químicos y parámetros de producción de gas obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia</u> ..	26
8.3.3. <u>Correlaciones y regresiones entre componentes químicos y parámetros de producción de gas obtenidos por el modelo logístico bifásico</u>	28
8.3.4. <u>Correlaciones entre los modelos de producción de gas <i>in vitro</i>, logístico bifásico y exponencial simple con latencia</u>	31
9. <u>DISCUSIÓN</u>	33
10. <u>CONCLUSIONES</u>	37
11. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	38

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro I. Características de las especies forrajeras muestreadas.....	15
Cuadro II. Composición de las soluciones utilizadas para la incubación de gas <i>in vitro</i>	17
Cuadro III. Composición química de los forrajes según horario de corte y familia y tipo de metabolismo fotosintético (base seca).....	20
Cuadro IV. Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia según horario de corte y familia y tipo de metabolismo fotosintético.....	23
Cuadro V. Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo logístico bifásico según horario de corte y familia y tipo de metabolismo fotosintético.....	24
Cuadro VI. Coeficientes de correlación entre los componentes químicos de los forrajes (n=88) (base seca).....	26
Cuadro VII. Coeficientes de correlación entre componentes químicos (base seca) y parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia. (n=85).....	27
Cuadro VIII. Ecuaciones de regresión de los parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia, en función de los componentes químicos de los forrajes (base seca).....	28
Cuadro IX. Coeficientes de correlación entre componentes químicos (base seca) y producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo logístico bifásico (n=85).....	29
Cuadro X. Ecuaciones de regresión de los parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo logístico bifásico en función de los componentes químicos (base seca) de los forrajes.....	30
Cuadro XI. Coeficientes de correlación entre parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo logístico bifásico y el modelo exponencial simple con latencia. (n=85).....	31
Cuadro XII. Ecuaciones de regresión de los parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo logístico bifásico en función de los parámetros de gas obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia.....	32

Figura 1. Volumen de gas producido (V) (ml/g MSi) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia. lag = tiempo de retardo en la producción de gas (h); Vf = volumen de gas a un tiempo t (ml/g MSi); V = volumen total de gas producido (ml/g MSi); kd = tasa de producción de gas (%/h); t = tiempo de incubación (h).....	12
Figura 2. Volumen total de gas producido (Vt) (ml/g MSi) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo logístico bifásico. L = tiempo de retardo en la producción de gas (h); Vr = volumen de rápida producción de gas (ml/g MSi); kdr = tasa de producción de gas del volumen rápido (h^{-1}); VI = volumen de lenta producción de gas (ml/g MSi); kdl = tasa de producción de gas del volumen lento (h^{-1}); t = tiempo de incubación (h).....	12
Figura 3. Evolución diaria de la concentración de azúcares solubles (AS%) en función del tiempo (h).....	21
Figura 4. Concentración de Materia Seca (MS%), Azúcares Solubles (AS%), Fibra Ácido Detergente (FAD%), Nitrógeno (N%), Fibra Neutro Detergente (FND%), y relación Azúcares/N (AS/N%), según horario (tiempo) de cada familia y tipo de metabolismo fotosintético.....	22
Figura 5. Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo logístico bifásico, según horario (tiempo), de cada familia y tipo de metabolismo fotosintético. Vr y VI = volúmenes de rápida y lenta producción de gas respectivamente, L = tiempo de retardo en la producción de gas, Vt = volumen total de gas producido (Vr+VI), kdr y kdl = tasas de producción de gas de los volúmenes rápido y lento respectivamente.....	25
Figura 6. Relación entre el porcentaje de fibra neutro detergente (FND%) y tasa de producción de gas del volumen rápido (kdr).....	29
Figura 7. Relación entre el porcentaje de N y volumen de lenta producción de gas (VI).....	30
Figura 8. Relación entre el volumen total de gas producido (V) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia y el volumen total de gas producido (Vt) obtenido por el modelo logístico bifásico.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AS: Azúcares Solubles

AS/N: relación Azúcares/N

C3: forrajes cuyos productos iniciales de la fotosíntesis son azúcares de 3 carbonos

C4: gramíneas cuyos productos iniciales de la fotosíntesis son azúcares de 4 carbonos

ESM: error estandar de la media

FAD: Fibra Ácido Detergente

FND: Fibra Neutro Detergente

FTM: familia y tipo de metabolismo fotosintético

kd: tasa de producción de gas

kdl: tasa de producción de gas del volumen lento

kdr: tasa de producción de gas del volumen rápido

L: tiempo de retardo en la producción de gas

lag: tiempo de retardo en la producción de gas

ml/gMSi: ml de gas/g Materia Seca incubada

MO: Materia Orgánica

MS: Materia Seca

N: Nitrógeno

ns: no significativo

P: probabilidad

PV: peso vivo

DER: desvío estándar residual

R²: coeficiente de determinación

t: tiempo de incubación

V: volumen total de gas producido

Vf: volumen de gas a un tiempo t

VI: volumen de lenta producción de gas

Vr: volumen de rápida producción de gas

Vt: volumen total de gas producido (Vr+VI)

1. RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del horario de corte sobre la composición química y la producción de gas *in vitro* de distintas especies forrajeras en estado vegetativo. Al mismo tiempo, se estudió si el efecto del horario de corte varía de acuerdo a la familia y tipo de metabolismo fotosintético de las pasturas. Se cortaron muestras de 30 forrajes, correspondientes a 18 especies diferentes, en 3 horarios diferentes del día: 9:00, 13:00 y 17:00 h. A cada muestra se le determinó el contenido de materia seca (MS), materia orgánica (MO), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD), nitrógeno (N), azúcares solubles (AS) y la relación AS/N. La fermentabilidad ruminal se estimó a través de la técnica de producción de gas *in vitro*, con líquido ruminal fresco en anaerobiosis a 39°C durante 96 h. Se utilizaron dos modelos matemáticos para la predicción del volumen y la cinética de producción del gas. Los resultados se compararon entre horarios de corte y tipo de metabolismo fotosintético (FTM), utilizando el PROC GLM de SAS®. La concentración de AS fue aumentando en el correr del día, alcanzando los máximos aumentos entre el corte de las 9:00 h y las 13:00+17:00 h. El incremento global del contenido en azúcares fue de un 53%. Las plantas compuestas presentaron los más altos contenidos de AS. Las gramíneas con metabolismo tipo C4 presentaron mayores contenidos de MS, FAD, FND y relación AS/N. A su vez, las gramíneas C4 mostraron los menores contenidos de N. Al comparar el horario de corte sobre los parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico, se observó que las tasas de producción de gas (kdr y kdl) y el volumen de lenta producción de gas (VI) fueron mayores en los forrajes cortados a las 13+17 h respecto a las 9 h. En relación a las FTM, se pudieron observar diferencias significativas entre el volumen total de gas producido (Vt) entre las gramíneas C4 y las leguminosas, siendo las C4 las que presentaron la mayor producción de gas. Los dos modelos utilizados, mostraron un buen ajuste para predecir los parámetros de gas obtenidos *in vitro*, presentando altos coeficientes de determinación (logístico bifásico: R^2 0,999; exponencial simple con latencia: R^2 0,998). La MS presentó correlaciones positivas medias a altas con la mayoría de los parámetros químicos estudiados, a excepción del N, con el que presentó correlación alta y negativa. La FND y la FAD presentaron una alta correlación positiva entre sí. La FND y FAD se correlacionaron positivamente con el tiempo de retardo en la producción de gas (lag), pero negativamente con la tasa de producción de gas (kd).

Palabras clave: forrajes, composición química, producción de gas *in vitro*, azúcares solubles.

2. SUMMARY

The aim of this work was to determine the effect of the timing of cut on chemical composition, and on the *in vitro* gas production of a variety of pastures in a vegetative stage. Also it was studied if the effect of the time of day on the pastures was different according to the family and the photosintetic metabolism. Samples of 30 forages (18 different species) were cut at 09:00, 13:00 and 17:00 h. For each sample the content of dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), N, water-soluble carbohydrates (WSC), WSC/nitrogen (WSC/N) relationship were determined. Ruminal fermentability was estimated using the *in vitro* gas production technique, incubating the samples on anaerobiosis at 39°C for 96 hrs. Two mathematical models were used to predict the volume and the kinetic of gas production. The results were compared between times of cut and photosynthetic metabolism type (FTM), using PROC GLM of SAS®. The WSC concentration increased between 09:00 and 17:00 h, but the highest increase was between 09:00 and 13:00+17:00 h. The global increment in the WSC content was at about 53%. Composite plants presented the highest content of WSC. On photosynthetic metabolism type, higher percentages of DM, NDF, ADF and WSC/N relationship were observed for the C4 grasses. This forages also presented the lowest content of N. The dual-pool logistic model showed that the moment of the day affect the rate of *in vitro* gas production, fast and slowly rates (fgr and sgr) and volume of slowly rate of gas production (Vs), being higher on forages cut at 13+17 h than forages cut at 9h. In relation to FTM, there were significant differences on the total gas volume of *in vitro* gas produced (Vt), C4 produced more gas than legumes. The two mathematical model used, adjusted well to predict the parameters of gas obtained *in vitro*, presenting high coefficients of determination (dual-pool logistic: R² 0.999; simple exponential with latency: R² 0.998). DM showed positive relation medium to high on the majority of the chemical parameters studied, except of N, that presented relation high and negative. NDF and ADF showed positive and high relation between them. NDF and ADF correlated positively with the time of latency on gas production (lag), but in negative with the rate of *in vitro* gas production (rg).

Keywords: forages, chemical composition, *in vitro* gas production, water soluble carbohydrates.

3. INTRODUCCIÓN

(FACU)

La mayoría de los sistemas de producción ganadera del Uruguay están basados en el pastoreo de forrajes, tanto de pasturas naturales o implantadas, como praderas y verdes. En rumiantes, el 90% de las paredes celulares de las pasturas, se digieren a nivel de rumen (Sauvant *et al.*, 1995), por lo que la respuesta productiva del animal dependerá en gran medida de lo que ocurra a este nivel. Para un óptimo aprovechamiento digestivo de los nutrientes en rumen es necesaria la presencia de una población de microorganismos activa, lo que requiere del aporte de cantidades adecuadas de energía, como por ejemplo los azúcares solubles, y nitrógeno, como la proteína verdadera o el nitrógeno no proteico. Además, importa que exista un correcto grado de sincronización entre el aporte de energía y nitrógeno (Van Soest, 1994).

Si bien las pasturas de alta calidad en general realizan un aporte importante de proteína, muchas veces el aporte de energía fermentescible en rumen, bajo la forma de carbohidratos solubles, es baja o está desbalanceada en relación al aporte de proteína. Por ejemplo, se ha reportado que la composición química de las pasturas varía con el transcurso del día, incrementándose en la tarde el contenido de Materia Seca (MS), Azúcares Solubles (AS) y la relación Azúcares/N (AS/N) (Ciavarella *et al.*, 2000; Repetto *et al.*, 2003). En este sentido es de suponer que animales que pastorean en las horas de la tarde aumentarían el consumo de MS y obtendrían un forraje de mejor valor nutritivo con respecto al pastoreado en la mañana (Moorby *et al.*, 2006; Ciavarella *et al.*, 2000), lo que podría tener un efecto positivo sobre el uso de nutrientes a nivel de rumen y/o la performance del animal.

El estudio de la variación de la composición química de las pasturas permitiría estimar su valor nutritivo cuando son ofrecidas a rumiantes, por lo que su estudio contribuiría a identificar alguna de las posibles causas que limitan el nivel de producción de los animales y delinear estrategias de manejo que resulten en un aumento de la misma (Mendoza *et al.*, 2000). El uso de estudios *in vivo* para evaluar el valor nutritivo de un alimento están limitados por la necesidad de manejar un número representativo de animales y de alimento suficiente como para mantenerlos (Fondevila y Barrios, 2001). Para superar estos inconvenientes, se emplean técnicas *in vitro* que simulan los procesos digestivos, como la técnica de producción de gas *in vitro*. Dicha técnica consiste en la medición del volumen de gas producido durante la fermentación de alimentos que son incubados con líquido ruminal fresco (Menke y Steingass, 1988). Su utilización, en conjunto con la información proveniente de los datos de composición química, permitiría aportar información sobre el valor nutritivo de un forraje, y eventualmente predecir la performance animal.

A nivel de nuestro país es muy escasa la información sobre la variación diurna de la composición química de las especies forrajeras usadas en los predios ganaderos y lecheros, en particular en lo que hace a la concentración de azúcares solubles, y sobre cómo las posibles variaciones podrían afectar el potencial de fermentación de estas especies en el rumen. El conocimiento de esta información permitiría el diseño de estrategias de pastoreo más eficaces, con el objetivo de optimizar la utilización del recurso forrajero. Adicionalmente, la determinación de la fermentescibilidad ruminal a través de la técnica de producción de gas *in vitro*, conjuntamente con la

información referida a la composición química de las pasturas, permitiría estimar el valor nutritivo de las mismas de forma más detallada y potencialmente predecir el desempeño de los animales.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. ALGUNOS ASPECTOS RELACIONADOS AL VALOR NUTRITIVO DE LOS FORRAJES

Existen varios factores que afectan la composición del forraje y su valor nutritivo. Tal vez, el más importante es el estado de maduración de la planta, que afecta la proporción y el valor nutritivo de cada uno de los órganos que la componen. Además, otros factores que también afectan el valor nutritivo de los forrajes, son: la especie forrajera, el material genético, factores climáticos como la temperatura, la humedad y la radiación solar, factores edáficos como el tipo de suelo, factores relacionados al manejo, como el aporte de agua y la fertilización, así como las variaciones que naturalmente ocurren dentro de un mismo día (Jarrige et al., 1995).

A continuación, se describirán con mayor detalle algunos factores que pueden afectar el valor nutritivo de los forrajes vinculados a este trabajo.

4.1.1. Comparación entre Gramíneas y Leguminosas

En nuestra región, se utilizan como fuente de alimentación para rumiantes, principalmente pasturas compuestas por gramíneas y leguminosas. Estas pasturas pueden ser nativas (con especies propias del lugar), o implantadas, donde las especies utilizadas son foráneas.

En el Uruguay las pasturas nativas ocupan un 71% de la superficie útil, y están constituidas por especies de gramíneas y leguminosas (Censo General Agropecuario, 2000). Las gramíneas nativas pertenecen a una de las familias forrajeras más numerosas, de las que se supone que ocupan un 20% de la superficie vegetal mundial. Son el principal recurso fitogenético, dentro de los cuales se encuentran varios géneros, como el *Paspalum*, *Bromus*, *Coelorhachis*, *Poa*, *Axonopus*, *Eustachys*, *Setaria*, *Bothriochloa*, *Calamagrostis*, *Ischemum*, y *Stipa*. Las leguminosas forrajeras ocupan una proporción mucho menor del tapiz vegetal que las gramíneas, siendo las más conocidas las pertenecientes a los géneros *Adesmia*, *Desmanthus*, *Desmodium*, *Lupinus*, *Mimosa* y *Rhynchosia* (Millot et al., 1987). Por otra parte, dentro de las gramíneas foráneas, las más utilizadas en el país corresponden a los géneros *Lolium*, *Avena*, *Festuca*, *Dactylis* y *Sorghum*, mientras que las leguminosas más usadas se encuentran dentro de los géneros *Trifolium*, *Medicago* y *Lotus*.

Las gramíneas forrajeras aportan la mayor parte de los nutrientes consumidos por el animal. Debido a su morfología, en general presentan una menor captación de luz en comparación con las leguminosas (Van Soest, 1994). Las gramíneas tropicales son muy eficientes en el proceso fotosintético, acumulando rápidamente grandes cantidades de materia seca (MS). Esto viene acompañado de una rápida maduración con disminución del valor nutritivo (Van Soest, 1994).

Las gramíneas, en su estado vegetativo presentan una relación lámina/vaina muy elevada, la cuál disminuye rápidamente a medida que la planta madura y florece. La proporción de constituyentes intra-celulares (N, ácidos orgánicos y azúcares) con relación a los componentes fibrosos también varían con la edad, sobretodo en las gramíneas; a medida que la planta avanza en su estado de maduración, disminuyen los componentes intra-celulares y aumentan aquellos de la pared celular, lo que resulta en una disminución en la calidad del forraje.

El aspecto más importante de las leguminosas, en comparación con las gramíneas, es el mayor contenido de N que presentan, el cual disminuye más lentamente a medida que avanza el estado de madurez de la pastura. Al mismo tiempo, las leguminosas presentan una mayor concentración de energía, lo que está asociado a que poseen, generalmente, una mayor proporción de contenido celular que las gramíneas (Van Soest, 1994).

No obstante, las leguminosas presentan la ventaja de poder fijar N atmosférico a través de la asociación con bacterias específicas, que se establecen en nódulos a nivel de la raíz. Esto le permite poseer una mayor independencia respecto al aporte de nitrógeno que las gramíneas (Lascano, 2002). Una vez envejecida, o muertas las raíces, el N es aportado al suelo y fácilmente aprovechado por otras especies forrajeras. La particularidad de fijar N, le otorga a las leguminosas la facultad de habitar en suelos con pobre fertilidad.

Por ende, es importante conocer las características de las pasturas debido a que los animales seleccionan el alimento entre las distintas especies forrajeras de acuerdo a su valor nutritivo (Millot *et al.*, 1987).

4.1.2. ¿Cómo influye el tipo de metabolismo fotosintético en el valor nutritivo de las plantas?

Las pasturas poseen diferentes tipos de metabolismo fotosintético según la ruta metabólica de fijación de Carbono que utilicen. De este modo, las pasturas se pueden clasificar en dos grandes grupos: C3 y C4.

Las plantas de ciclo fotosintético C3 o de Calvin-Benson, son aquellas en el cual el primer producto de la fotosíntesis es un azúcar de 3 carbonos. Estas especies ocupan con frecuencia hábitats sombreados y húmedos, con una temperatura óptima entre 15 a 30 °C, y la eficiencia de su proceso fotosintético aumenta al disminuir la temperatura (Starr, 2004). En general, presentan una lenta tasa de maduración, con lo cual su calidad disminuye lentamente. Pertenecen al grupo de las C3, gramíneas de los géneros *Poa*, *Triticum*, *Avena*, *Hordeum*, *Festuca*, *Lolium* y *Bromus*, y todas las leguminosas.

Las especies pertenecientes a regiones tropicales tienen ciclo fotosintético del tipo C4 o de Hatch-Slack, en el cual el primer producto de la fotosíntesis es un compuesto de 4 carbonos. Estas especies ocupan hábitats soleados y áridos, crecen activamente durante el verano, y tienen una tasa fotosintética neta mayor que las plantas C3, así como una mayor eficiencia fotosintética (es decir, energía química

producida en relación a la radiación absorbida) (Van Soest, 1994). También son muy eficientes en el uso del agua (es decir, usan menos agua por cada molécula de CO₂ fijada) y en el uso del nitrógeno del suelo (Ehleringer *et al.*, 1997). De este modo, bajo condiciones de estrés térmico (30 a 45°C) e hídrico la fotosíntesis puede ocurrir, y como resultado se obtiene una gran producción de MS, pero que generalmente se acompaña con un bajo valor nutritivo. Este grupo incluye especies gramíneas de alto rendimiento, como las pertenecientes al género *Sorghum* y *Zea*.

Por otra parte, existen especies vegetales que presentan una mezcla de ambas rutas metabólicas (C3 y C4), como las crasuláceas. Estas presentan fijación nocturna de CO₂ atmosférico, lo cual es ventajoso en hábitats áridos, con condiciones hídricas desfavorables, lo que asegura la supervivencia de las plantas (Mauseth, 2009).

4.1.3. ¿Cómo influye el horario de corte sobre la composición química de las plantas?

Los vegetales obtienen la energía a partir del sol a través del proceso llamado fotosíntesis. Como producto de dicho proceso se obtienen los azúcares solubles (AS) que se almacenan en la planta y constituyen la reserva energética de la misma. Un mayor incremento lumínico promueve un aumento en la acumulación de AS, concomitante a una reducción en la proporción de los componentes de la pared celular, así como del N. De tal modo, las pasturas presentan variaciones en la composición química en el correr del día, en especial en su contenido de AS. Los AS se acumulan a lo largo del día dado que la tasa de fotosíntesis excede el ritmo de respiración y de fijación de carbono (Smith, 1973). En este sentido, Repetto *et al.* (2003), trabajando con festuca y alfalfa durante el otoño, reportaron contenidos en AS que se duplicaron por la tarde respecto a la mañana, así como un importante incremento en la relación AS/N a medida que transcurrió el día.

El conocimiento de la variación diurna en el contenido de AS de las pasturas puede ser útil para tomar decisiones de manejo con el fin de mejorar la performance animal, como por ejemplo, el horario de corte de una pastura para su henificación. En este sentido, se observó que henos elaborados a partir de raigrás cortado por la tarde presentaban más AS que los realizados con forraje cortado por la mañana. Se encontró a su vez, que las vacas lecheras mostraron una marcada preferencia por los henos que habían sido cosechados por la tarde comparados con los de la mañana (Mayland *et al.*, 2005). De forma similar, en ovejas y cabras se han reportado tasas de consumo mayores para los henos cortados por la tarde, con una correlación positiva entre la preferencia y el contenido de AS del forraje (Fisher *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2005). Estos resultados son consistentes con lo mencionado por Orr *et al.* (1997), quienes señalaron que los rumiantes seleccionan la pastura que van a consumir según su contenido de AS, entre otros factores. Finalmente, Kim *et al.* (1995), trabajando con vacas lecheras consumiendo una ración totalmente mezclada, mostraron un consumo 8% más alto con una dieta que contenía alfalfa henificada cortada de tarde, comparando con una ración similar pero con alfalfa cortada en la mañana, lo que se tradujo en una mayor producción de leche de las primeras.

Berthiaume *et al.* (2006) estudiaron el impacto de la longitud del período de luz solar previo al corte una pastura sobre su fermentación ruminal *in vitro*. Estos autores observaron que con períodos más largos, los forrajes presentaron mayores acumulaciones de AS, y produjeron mayor cantidad de gas al ser inoculados con líquido ruminal. Esto coincide con lo reportado por Britos *et al.* (2006) y Repetto *et al.* (2006), quienes concluyeron que la composición química del forraje modifica la fermentabilidad ruminal, principalmente a través de la variación en el contenido de AS.

4.2. IMPORTANCIA DEL CONTENIDO DE AZÚCARES SOLUBLES EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y EL DESEMPEÑO ANIMAL

Los carbohidratos son extremadamente importantes desde el punto de vista nutricional, siendo la principal fuente de energía en la dieta de los rumiantes. Los carbohidratos pueden clasificarse de acuerdo al rol que tienen, en carbohidratos estructurales o no estructurales. Los primeros generalmente se encuentran formando parte de la pared de las células vegetales, mientras que los últimos, también denominados de reserva, se encuentran en el contenido intra-celular de raíces, bulbos, tallos y hojas.

Los principales carbohidratos no estructurales de las plantas son monosacáridos como glucosa y fructosa, disacáridos como sucrosa y maltosa y polisacáridos como almidones y fructosanos. Bajo el término carbohidratos o azúcares solubles (AS), se engloban a todos los compuestos mencionados anteriormente, a excepción del almidón.

Los AS, al ser ingeridos son rápidamente fermentados por los microorganismos ruminales y pueden representar una cantidad sustancial de la energía obtenida por los animales al consumir forrajes. Los AS constituyen, por lo tanto, la más inmediata fuente de energía de la que puede disponer la microbiota ruminal para sintetizar su propia proteína, y una de las más importantes en términos cuantitativos. Por lo tanto, a medida que se incrementa el contenido de AS en el forraje, generalmente aumenta el crecimiento microbiano y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal. A su vez, el mayor crecimiento microbiano contribuye a que la digestión de la materia orgánica (MO) a nivel de rumen se vea incrementada (Lee *et al.*, 2003). Esto es particularmente importante en las pasturas de clima templado de alta calidad, que frecuentemente presentan niveles adecuados de N pero bajos de AS para una óptima fermentación ruminal, lo que lleva a una baja eficiencia en la utilización de N por parte de los microorganismos ruminales, con eliminación del mismo al medio ambiente (Rearte y Santini, 1989).

En cuanto a las diferentes partes de la planta, Cajarville *et al.* (2003), investigando la composición química en festuca y alfalfa, concluyeron que no hubo diferencias en los contenidos de AS entre tallos y hojas y que, además, este resultado es independiente de la especie, de la planta y de la hora del día. Sin embargo la relación AS/N fue más alta en tallos que en las hojas de alfalfa debido a una baja concentración de N en tallos.

Los AS pueden afectar el desempeño animal de múltiples maneras. Por ejemplo, se ha constatado que el nivel de consumo de pastura por los rumiantes está determinado en gran parte por los niveles de AS de la misma (Orr *et al.*, 1997). De esta manera, tienden a seleccionar aquellos forrajes con mayores contenidos en AS. Leury *et al.* (1999) y Ciavarella *et al.* (2000), trabajando con ovinos en pasturas con distinto nivel de AS, mostraron una selección a favor de las pasturas con elevados contenidos de AS, respecto a aquellas con bajo contenido. Al mismo tiempo se observó una fuerte correlación positiva entre la ganancia de peso vivo (PV) y la producción de lana con el contenido de AS de la planta, lo que pudo estar mediado por el mayor consumo detectado en los ovinos alimentados con pasturas ricas en AS.

Con respecto al consumo, Lee *et al.* (2001) observaron en corderos que el mismo no se vio afectado cuando los forrajes tuvieron altos contenidos de AS, aunque los animales presentaron mayores ganancias de PV que los que consumían pastura con bajo contenido de AS. Sin embargo, los mismos autores reportaron posteriormente, que novillos alimentados con un forraje con alto contenido de AS tuvieron un mayor consumo de MS que animales alimentados con forraje con bajo contenido en AS (Lee *et al.*, 2002).

A su vez, se ha reportado que en animales consumiendo pasturas con altos niveles de AS, la proporción de N dietario excretado en orina fue menor, respecto a pasturas con bajo contenido de AS (Moorby *et al.*, 2006). Esto se explicaría por una mayor utilización del N por parte de los microorganismos ruminales (Miller *et al.*, 2001), por lo que el uso de dietas con altas concentraciones en AS podría ayudar a reducir la excreción de N a través de las heces y orina, y así minimizar posibles impactos ambientales.

Por otra parte, Moorby *et al.* (2006) observaron un aumento en el consumo de MS en vacas lecheras cuando el forraje presentaba mayor concentración de AS. A su vez, Miller *et al.* (2001) determinaron que vacas alimentadas con pasturas ricas en AS tuvieron una mayor digestibilidad de la MS, y una mayor producción de leche y proteína láctea, y una mayor eficiencia de utilización de N que animales alimentados con pastura con bajo contenido en AS. Por el contrario, Taweel *et al.*, (2005, 2006) no encontraron efecto del contenido de AS de la pastura sobre el consumo de MS o la producción de leche de vacas.

4.3. ESTUDIO DE LA FERMENTESCIBILIDAD RUMINAL

El estudio de la fermentescibilidad ruminal de los alimentos es de suma importancia para entender su digestión y aprovechamiento por los animales. Para alcanzar este fin, existen tanto métodos *in vivo* como *in vitro*. Un ejemplo de los primeros, es la determinación de la capacidad de un alimento de degradarse o fermentar a nivel de rumen, mediante la técnica de degradabilidad *in situ* (Ørskov y Mc Donald, 1979). Los estudios *in vivo* del alimento están limitados por la necesidad de manejar un número representativo de animales y de alimento suficiente como para mantenerlos, además de despertar cuestionamientos relacionados con el bienestar de los animales usados en experimentación (Fondevila y Barrios, 2001). Para superar

estos inconvenientes, se emplean técnicas *in vitro* que simulan los procesos digestivos, como por ejemplo, la técnica de producción de gas *in vitro*.

4.3.1. Técnica de producción de gas *in vitro*

La técnica de producción de gas es un método *in vitro* que ha sido desarrollada para estimar la dinámica de la fermentación ruminal de los alimentos (Schofield y Pell, 1995). La técnica de gas *in vitro* permite valorar la producción de gas acumulada principalmente de metano, dióxido de carbono e hidrógeno (Van Soest, 1994), obtenida por fermentación del alimento al incubarlo con microorganismos ruminales en un medio de cultivo y bajo determinadas condiciones de temperatura y anaerobiosis (McBee, 1953; Hungate, 1966; Menke y Steingass, 1988).

El gas producido es dependiente de la composición química del sustrato y de la población microbiana presente en el medio. La anaerobiosis, el pH, la temperatura y las sustancias tampón empleadas son de suma importancia e influyen directamente en el crecimiento microbiano, y éste en la producción de gas. Otros factores que pueden repercutir son la especie donadora, el tipo de inóculo (heces, líquido ruminal) y la alimentación del animal donante (Schofield y Pell, 1995).

Para la determinación del gas es necesario considerar los factores que afectan a los sistemas *in vitro*, los que alteran la actividad microbiana en forma directa, así como al gas generado durante la fermentación. Al igual que otras técnicas *in vitro*, esta técnica utiliza sustratos secos y molidos, medio anaerobio, temperatura de 39,5 °C y un inóculo ruminal.

La medición de la producción de gas *in vitro* para estimar la fermentación ruminal data de mucho tiempo. McBee (1953) describió un método manométrico para medir el gas generado utilizando bacterias ruminales, el cual posteriormente ha sido modificado. Se han utilizado históricamente diferentes aproximaciones para medir la producción de gas: medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, medir la presión de gas en un volumen fijo, o una combinación de ambos métodos mediante la medición del incremento de volumen necesario para causar un cambio definido de presión. Los métodos manométricos iniciales (McBee, 1953) son ejemplos de la primera aproximación, donde se medía la cantidad de agua desplazada debido a la acumulación del gas. Otro ejemplo es el desarrollado por Menke *et al.* (1979) y Menke y Steingass (1988), en el cual se utilizan jeringas de vidrio, en las que el émbolo se desplaza a medida que se incrementa la producción de gas. Actualmente se cuenta con métodos computarizados para la medición del gas (Schofield y Pell, 1995; Theodorou *et al.*, 1994; Cone *et al.*, 1994; Mauricio *et al.*, 1999).

El desarrollo de métodos que utilizan tanto transductores de presión que registran la presión de gas manualmente (Theodorou *et al.*, 1994) como de forma automatizada (Pell y Schofield, 1993), han desplazado a los métodos manométricos. Los transductores de presión ofrecen una vía sencilla y precisa para medir la producción de gas, miden las diferencias de presión que se genera en el espacio que queda libre dentro del frasco de incubación.

Entre los distintos métodos descritos, una de las diferencias existentes es la eliminación del gas producido luego de cada medición (Schofield y Pell, 1995) o la no eliminación del mismo (Theodorou *et al.*, 1994). De tal modo, en el método reportado por Theodorou *et al.* (1994 y 1995), se han descrito alteraciones en el crecimiento microbiano por no eliminar el gas producido.

Los patrones de producción de gas obtenidos por esta técnica pueden ajustarse a diferentes ecuaciones para analizar la información registrada, permitiendo así comparar sustratos, evaluar diferentes ambientes de fermentación, y obtener tasas de fermentación de los constituyentes del alimento.

4.3.2. Modelos matemáticos para predecir la producción de gas *in vitro*

Las curvas de producción de gas pueden ser ajustadas a diversos modelos matemáticos. Entre los más empleados, se encuentra el modelo exponencial simple con latencia (lag) descrito por Ørskov y Mc Donald (1979), y el modelo logístico bifásico propuesto por Schofield *et al.* (1994). Para la selección del modelo se toma en cuenta la capacidad de ajuste de los datos obtenidos al mismo, la cual es evaluada a través de diferentes herramientas estadísticas.

Los modelos matemáticos han ido evolucionando de acuerdo al desarrollo de las distintas técnicas de producción de gas. Las primeras técnicas utilizadas, medían la cantidad de agua desplazada por el gas producido, generando pocos datos de la cinética de producción de gas. Las técnicas automatizadas como la de Mauricio *et al.* (1999) generan perfiles de producción de gas que permiten la utilización de modelos más flexibles, obteniendo varias fracciones de la fermentación del sustrato.

El modelo exponencial simple con latencia (figura 1), supone que la tasa de producción de gas es constante y que depende del sustrato disponible una vez alcanzado el tiempo de colonización. El modelo logístico bifásico (figura 2), asume que la tasa de producción de gas es proporcional al tamaño de la población microbiana y al sustrato digerible disponible para la fermentación. Dentro de este se distingue una fracción rápidamente fermentescible (constituida por AS, pectinas, almidón, fructosanos, entre otros) y otra lentamente fermentable (constituida por celulosa y hemicelulosa).

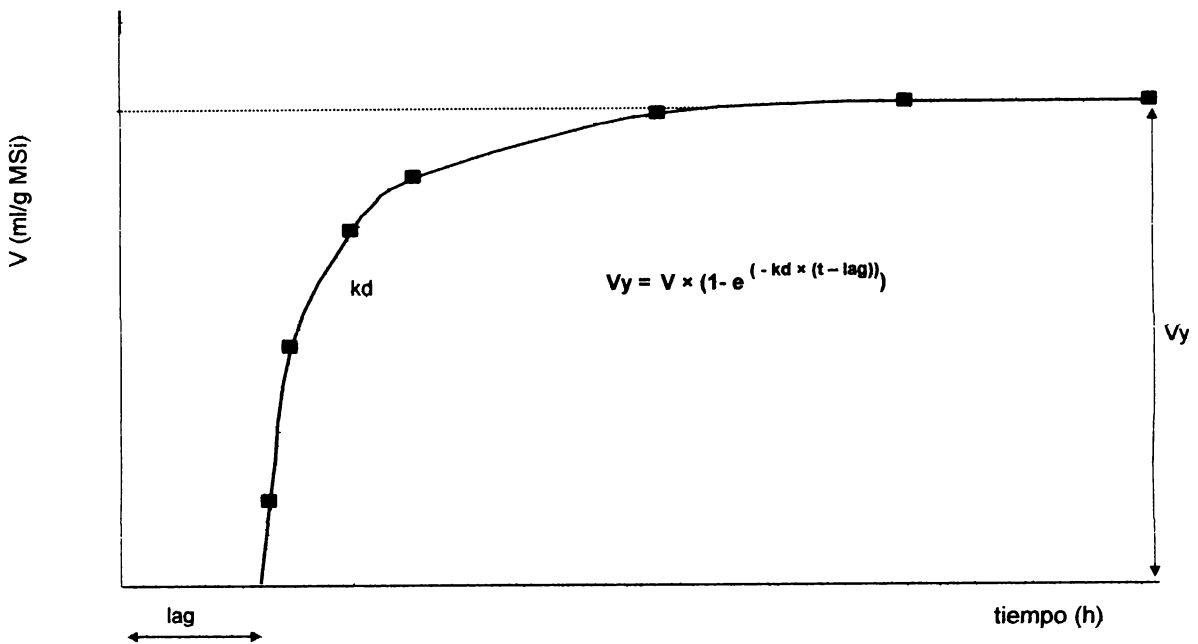


Figura 1. Volumen total de gas producido (V ml/g MSi) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia. lag = tiempo de retardo en la producción de gas (h); V_f = volumen de gas a un tiempo t (ml/g MSi); k_d = tasa de producción de gas (%/h); t = tiempo de incubación (h).

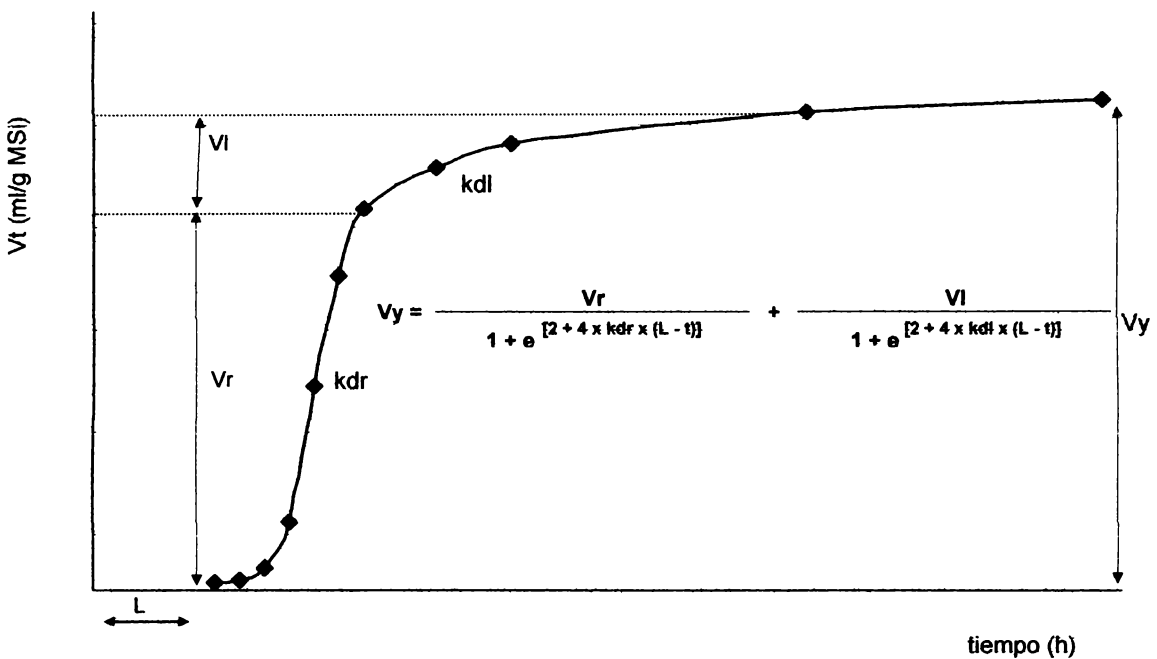


Figura 2. Volumen total de gas producido (V_t ml/g MSi) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo logístico bifásico. L = tiempo de retardo en la producción de gas (h); V_r = volumen de rápida producción de gas (ml/g MSi); k_{dr} = tasa de producción de gas del volumen rápido (h^{-1}); V_I = volumen de lenta producción de gas (ml/g MSi); k_{dl} = tasa de producción de gas del volumen lento (h^{-1}); t = tiempo de incubación (h).

En las curvas de producción de gas se pueden distinguir tres fases: la 1ª fase, llamada fase de latencia, en la cuál no existe producción de gas o es muy lenta; la 2ª fase, llamada fase exponencial, donde se produce la mayor cantidad de gas y la 3ª fase, en la cuál la tasa de producción de gas es lenta y donde se alcanza una asíntota. En la fase de latencia, se produce el ataque y la colonización del sustrato insoluble por parte de los microorganismos ruminales. Una vez saturado el sustrato se pasa a la fase exponencial de la producción del gas, en la cual la mayor parte del aquél es fermentado. Posteriormente comienza la fase de lenta producción de gas, en la cuál la fracción restante del sustrato insoluble es fermentada. Finalmente la producción de gas es nula cuando solamente queda sustrato no fermentable (Posada y Noguera, 2007).

5. HIPÓTESIS

Las pasturas presentan cambios en la composición química y en la producción de gas *in vitro* a lo largo del día.

Esos cambios en la composición química y producción de gas *in vitro* serán distintos según familia y tipo de metabolismo fotosintético de las pasturas.

Existe una asociación entre la producción de gas *in vitro* de las pasturas y distintos parámetros de su composición química, por lo que la primera puede ser predicha a partir de información de la composición química.

Es posible estimar adecuadamente la producción de gas *in vitro* de pasturas de distintas familias y tipo de metabolismo fotosintético y cortadas a distinta horas, mediante el uso de distintos modelos matemáticos, como el exponencial simple con latencia y el logístico bifásico.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del horario de corte sobre la composición química y la producción de gas *in vitro* de distintas especies forrajeras.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar el efecto del horario de corte sobre la composición química de distintas especies forrajeras.

Determinar el efecto del horario de corte sobre la producción de gas *in vitro* de distintas especies forrajeras.

Estudiar si el efecto del horario de corte sobre la composición química y la producción de gas *in vitro* varía de acuerdo a la familia y tipo de metabolismo fotosintético (FTM).

Estudiar la relación existente entre los parámetros de composición química y producción de gas *in vitro*.

Determinar la relación entre los parámetros de la producción de gas estimados por dos modelos matemáticos distintos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo de las pasturas fue realizado entre el año 2004 y el 2005. Consistió en un muestreo amplio de forrajes, que se cortaron en tres horarios del día. Las muestras se tomaron en el Departamento de San José (34°S, 56°O), en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, y en establecimientos particulares ubicados en el paraje "Costas del tigre" y "Paso del Rey". Además, se muestrearon especies forrajeras en el Departamento de Paysandú (32°S, 57°O), en la Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni".

7.1. MUESTREO

Fueron muestreadas 30 pasturas, en tres horarios del día, a las 9:00, a las 13:00 y a las 17:00 h. Las muestras estuvieron compuestas por 18 especies diferentes, las cuales se detallan en el Cuadro I. Las pasturas se clasificaron según su FTM en: Gramíneas templadas (C3), Gramíneas tropicales (C4), Leguminosas y Compuestas.

Cuadro I. Características de las especies forrajeras muestreadas.

Especie	Nombre común	FTM	Fecha de corte	Característica del cultivo	Departamento	Disp. (kgMS/há)
<i>Lotus corniculatus</i>	Lotus	Leguminosa	mayo 2004	1	San José	1304
<i>Lotus pedunculatus</i>	Lotus maku	Leguminosa	noviembre 2005	2	Paysandú	1418
<i>Lotus tenuis</i>	Lotus tenuis	Leguminosa	diciembre 2004	2	Paysandú	1764
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Leguminosa	mayo 2004	1	San José	4011
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Leguminosa	mayo 2004	2	San José	2478
<i>Trifolium alexandrinum</i>	Trébol alejandrino	Leguminosa	setiembre 2005	1	San José	2475
<i>Trifolium pratense</i>	Trébol rojo	Leguminosa	mayo 2004	1	San José	1304
<i>Trifolium pratense</i>	Trébol rojo	Leguminosa	mayo 2004	2	San José	2915
<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco	Leguminosa	mayo 2004	2	San José	1677
<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco	Leguminosa	setiembre 2005	2	San José	1849
<i>Avena sativa</i>	Avena	Gramínea C3	mayo 2004	2	San José	4321
<i>Avena sativa</i>	Avena	Gramínea C3	mayo 2004	2	San José	1556
<i>Avena sativa</i>	Avena	Gramínea C3	setiembre 2005	1	San José	2475
<i>Bromus auleticus</i>	Bromus	Gramínea C3	agosto 2004	2	Paysandú	1689
<i>Bromus auleticus</i>	Bromus	Gramínea C3	agosto 2004	2	Paysandú	1684
<i>Bromus auleticus</i>	Bromus	Gramínea C3	agosto 2004	2	Paysandú	1715
<i>Bromus auleticus</i>	Bromus	Gramínea C3	agosto 2004	2	Paysandú	1285
<i>Bromus auleticus</i>	Bromus	Gramínea C3	agosto 2004	2	Paysandú	1814
<i>Lolium híbrido (m x p)</i>	Raigrás	Gramínea C3	agosto 2004	2	Paysandú	2060
<i>Lolium multiflorum</i>	Raigrás	Gramínea C3	mayo 2004	2	San José	2915
<i>Lolium multiflorum</i>	Raigrás	Gramínea C3	mayo 2004	2	San José	1476
<i>Lolium multiflorum</i>	Raigrás	Gramínea C3	agosto 2004	2	Paysandú	1960
<i>Lolium multiflorum</i>	Raigrás	Gramínea C3	setiembre 2005	1	San José	2475
<i>Lolium perenne</i>	Raigrás	Gramínea C3	agosto 2004	2	Paysandú	2010
<i>Paspalum dilatatum</i>	Pasto miel	Gramínea C4	noviembre 2005	2	Paysandú	1780
<i>Paspalum notatum</i>	Pasto horqueta	Gramínea C4	noviembre 2005	2	Paysandú	1193
<i>Paspalum plicatulum</i>	Pasto cadena	Gramínea C4	noviembre 2005	2	Paysandú	2213
<i>Sorghum sudanense</i>	Sorgo	Gramínea C4	mayo 2004	2	San José	2307
<i>Cichorium intybus</i>	Achicoria	Compuesta	mayo 2004	1	San José	4011
<i>Plantago lanceolata</i>	Llantén	Compuesta	noviembre 2005	2	Paysandú	1004

Gramíneas C₃ cuyos productos iniciales de la fotosíntesis son azúcares de 3 carbonos. Gramíneas C₄ que producen compuestos de 4 carbonos. 1= pasturas en combinación con otras especies forrajeras; 2= pasturas en cultivo puro; m x p= multiflorum por perenne.

Los cortes de las pasturas se efectuaron a 1 cm del suelo. Los forrajes se muestrearon en diferentes momentos del año y en todos los casos las muestras fueron extraídas en estado vegetativo.

7.2. PROCEDIMIENTO Y DETERMINACIONES

Los análisis de composición química se realizaron en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria, en Montevideo. La determinación de la producción de gas *in vitro* se realizó en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal del Departamento de Nutrición Animal, en la Estación Experimental de Libertad, San José, Uruguay (34°41'S, 56°32'O).

7.2.1. Análisis químicos

Para todas las pasturas se determinó MS por secado en estufa de aire forzado a 60 °C hasta peso constante. Todas las muestras fueron molidas hasta un tamaño de 1 mm para realizar los análisis químicos correspondientes.

El porcentaje de MO se obtuvo por incineración de la muestra en mufla a 550 °C por 4 h (A.O.A.C). Se determinó N según A.O.A.C, (1984). Los porcentajes de Fibra Neutro Detergente (FND) y Fibra Ácido Detergente (FAD) se determinaron según la técnica descrita por Robertson y Van Soest, (1981) y el contenido en AS de acuerdo a la técnica de Yemm y Willis, (1954). Las muestras para MO, N, FND y FAD se analizaron por duplicado y para AS por triplicado, se aceptaron coeficientes de variación menor al 5%.

7.2.2. Producción de gas *in vitro*

Para determinar la producción de gas *in vitro* de las pasturas se utilizó la técnica descrita por Mauricio *et al.*, (1999). Se utilizaron frascos de fermentación de vidrio de 125 ml de capacidad, sellados con tapón de goma y precinto de aluminio. Para realizar la incubación de los frascos se utilizó un baño termostatzado (39°C) de acero inoxidable con tapa. Las mediciones de presión se realizaron con un manómetro digital (Cole Parmer Instrument Co.), al que se le adaptó una jeringa con aguja hipodérmica 21 G.

El medio de incubación fue preparado con una solución basal libre de N, con el agregado de 10 ml de solución minerales traza y 10 ml de solución hemina, enrazando a un litro con agua destilada. Además se utilizó una solución buffer y una solución reductora (Cuadro II) (Williams *et al.*, 2005).

Cuadro II. Composición de las soluciones utilizadas para la incubación de gas *in vitro*.

Solución basal libre de N (<i>g/l de agua destilada</i>)	
KCl	0,60
NaCl	0,60
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50
KH ₂ PO ₄	1,46
Na ₂ HPO ₄	3,55
Solución buffer (<i>g/l de agua destilada</i>)	
Na ₂ CO ₃	82,0
Solución reductora (<i>g/l de agua destilada</i>)	
Na ₂ S·9H ₂ O	20,5
Solución hemina (<i>g/l de agua destilada</i>)	
Hemina	0,10
Solución minerales traza (<i>g/l de HCl 0,02 molar</i>)	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,03
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
ZnCl ₂	0,03
CuCl ₂ ·H ₂ O	0,03
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,05
SeO ₂	5,00
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
NaVO ₃	0,03
H ₃ BO ₃	0,25

Previamente a la inoculación, se adicionó a cada frasco de fermentación 0,5 g de MS de la muestra (sustrato), 38 ml de solución basal libre de N, 2 ml de solución buffer y 0,5 ml de solución reductora (sulfuro de sodio). Inmediatamente después, los frascos fueron gaseados con CO₂, tapados con tapón de goma y almacenados durante toda la noche a 4 °C.

A la mañana siguiente, los frascos fueron precalentados en baño María a temperatura de incubación de 39 °C. Para la inoculación se utilizó líquido ruminal fresco extraído de una vaca Holstein de 550 kg de PV, en lactancia, provista de una cánula ruminal, alimentada con una pradera mezcla (consumida por pastoreo directo), ensilaje de planta entera de maíz y ensilaje de pradera. Para obtener el inóculo, se extrajo contenido ruminal de forma manual a través de la cánula y se filtró por 4 capas de paño de quesería, en un recipiente térmico precalentado a 39,5 °C. Inmediatamente el líquido ruminal fue transportado al laboratorio y sometido a un

gaseado permanente con CO₂ mientras se inoculó cada uno de los frascos de fermentación. Durante la inoculación se les agregó a cada frasco 10 ml de líquido ruminal, fueron gaseados con CO₂, tapados con tapón de goma y finalmente cerrados herméticamente con precinto de aluminio. Posteriormente fueron llevados al baño María donde permanecieron durante el período de incubación. Se utilizaron 3 frascos sin sustrato conteniendo el medio de incubación y líquido ruminal como blanco. Cada muestra se incubó por triplicado.

Las lecturas de presión fueron realizadas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h. La aguja fue insertada a través del tapón de goma de los frascos y la presión en psi (libras por pulgada cuadrada) registrada en el manómetro. Luego de cada medición se procedió a vaciar la presión del interior de los frascos y fueron agitados. Al gas generado por cada frasco se le restó el gas producido por los frascos blancos.

Los datos de presión fueron transformados en volumen mediante la ecuación de predicción obtenida por Britos *et al.*, (2008):

$$V \text{ (ml)} = 4,40 P \text{ (psi)} + 0,09 P^2 \text{ (psi)}$$

V = volumen (ml) observado en la jeringa

P = presión en el interior de los frascos de fermentación (psi)

Los resultados de producción de gas de cada frasco se ajustaron a dos modelos matemáticos.

1)- Modelo exponencial simple con latencia propuesto por Ørskov y Mc Donald, (1979):

$$V_y = V \times (1 - e^{-kd \times (t - \text{lag})})$$

V_y = volumen de gas producido a un tiempo t (ml/g MSi)

V = volumen total de gas producido (ml/g MSi)

kd = tasa de producción de gas (%/h)

lag = tiempo de retardo en la producción de gas (h)

t = tiempo de incubación (h)

2)- **Modelo logístico bifásico** propuesto por Schofield *et al.*, (1994):

$$V_t = \frac{V_r}{1 + e^{[2 + 4 \times k_{dr} \times (L - t)]}} + \frac{V_l}{1 + e^{[2 + 4 \times k_{dl} \times (L - t)]}}$$

V_y = volumen total de gas producido a un tiempo t (V_r+V_l) (ml/g MSi)

V_r y **V_l** = volúmenes de rápida y lenta producción de gas respectivamente (ml/g MSi)

k_{dr} y **k_{dl}** = tasas de producción de gas de los volúmenes de rápido y lento respectivamente (h⁻¹)

L = tiempo de retardo en la producción de gas (h)

t = tiempo de incubación (h)

7.2.3. Análisis estadísticos

Se utilizó el PROC GLM de SAS[®]. El modelo incluyó los efectos hora, FTM e interacción FTM x hora y se describe a continuación: $y = (\text{Media general} + \text{hora} + \text{FTM} + (\text{FTM} \times \text{hora}) + \text{error})$. Las medias del efecto hora se separaron usando contrastes ortogonales. Los valores medios para las FTM fueron comparados usando el test de Tukey. Se establecieron correlaciones lineales simples entre variables de composición química y parámetros de producción de gas *in vitro*. Se diseñaron ecuaciones de regresión múltiple para predecir los parámetros de producción de gas *in vitro* a partir de la composición química, para cada modelo a través del procedimiento STEPWISE de SAS[®] y se determinó el peso relativo y simultáneo de las variables de composición química para explicar los valores de los parámetros de producción en gas *in vitro* de cada modelo. Se consideró una diferencia significativa de $P < 0,05$. Todos los resultados de composición química de las pasturas se presentan en base seca.

8. RESULTADOS

En general no se encontraron interacciones significativas entre horario de corte y FTM para las variables de composición química o de producción de gas *in vitro* analizadas, por lo que de aquí en más solo se hará referencia a los efectos individuales de horario de corte y FTM, salvo cuando haya dado significativo el efecto de interacción.

8.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PASTURAS

En la cuadro III, se presentan los parámetros de composición química de los forrajes.

Cuadro III. Composición química de los forrajes según horario de corte y familia y tipo de metabolismo fotosintético (base seca).

		MS	MO	FND	FAD	AS	N	AS/N
horario	9:00 (n=30)	18,99	89,15	45,38	25,77	6,907	3,073	2,594
	13:00 (n=30)	19,09	89,10	41,75	24,21	9,097	3,078	3,350
	17:00 (n=30)	20,78	89,32	42,65	24,32	10,58	2,791	4,538
	ESM	1,495	0,219	1,131	0,694	0,533	0,127	0,309
Contraste (h)								
	9 vs (13+17)	ns	ns	ns	ns	<0,001	ns	0,001
	13 vs 17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
FTM	Gramíneas C3 (n=48)	18,05 ^b	88,24 ^b	47,51 ^b	25,63 ^b	8,296 ^b	3,089 ^a	2,979 ^{cb}
	Gramíneas C4 (n=10)	29,50 ^a	90,51 ^a	66,20 ^a	32,89 ^a	9,724 ^b	1,571 ^b	6,964 ^a
	Leguminosas (n=24)	19,19 ^b	90,69 ^a	32,41 ^c	22,16 ^{cb}	8,115 ^b	3,302 ^a	2,625 ^c
	Compuestas (n=6)	15,86 ^b	86,36 ^b	31,20 ^c	18,95 ^c	13,50 ^a	2,912 ^a	4,662 ^b
	ESM	1,727	0,254	1,458	0,801	0,615	0,147	0,357
	P	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

horario: hora de corte 9:00, 13:00 y 17:00 h; MS: Materia Seca (%); MO: Materia Orgánica (%); FND: Fibra Neutra detergente (%); FAD: Fibra Ácido Detergente (%); AS: Azúcares solubles (%); N: Nitrógeno (%); AS/N: relación Azúcares/Nitrógeno (%); FTM: familia y tipo de metabolismo fotosintético; FTM*h: interacción entre familia y tipo de metabolismo fotosintético y horario de corte; 9 vs 13+17: contraste entre hora 9 y horas 13 y 17; 13 vs 17: contraste entre hora 13 y hora 17; ESM: error estándar de la media; P: probabilidad; ns: no significativo ($P>0,05$). ^{a,b,c} Valores con distinto superíndice dentro de columnas difieren por test de Tukey.

Puede apreciarse que los contenidos de MS, MO, FAD, FND y N no presentaron diferencias significativas entre los distintos horarios de corte, pero sí se registraron cambios en los contenidos de AS y en la relación AS/N entre las 9 y las 13+17 h. No se observaron diferencias para ningún parámetro entre las 13 y las 17 horas.

Como se observa en el cuadro III y en la figura 4, los forrajes con metabolismo tipo C4 presentaron, respecto a las otras FTM, mayores contenidos de MS, FAD, FND y relación AS/N, y los menores contenidos de N. No existió diferencia en los contenidos de MS para el resto de los forrajes. Con respecto al contenido de N, no hubo diferencias entre gramíneas C3, leguminosas y compuestas. Las gramíneas C3 mostraron valores intermedios de FAD y FND, mientras que los valores más bajos se observaron en las plantas compuestas. Además, las leguminosas y compuestas presentaron los contenidos más bajos de FND dentro de las FTM evaluadas.

Por otra parte, las pasturas compuestas mostraron los porcentajes más altos de azúcares, no registrándose diferencias significativas entre gramíneas C3, C4 y leguminosas. La relación AS/N más baja se encontró en las leguminosas respecto a las restantes FTM.

En la figura 3, se presenta la evolución diaria de la concentración de AS en función del tiempo (h) de cada una de las pasturas. En la misma, se observa un incremento en los contenidos de AS a medida que transcurre el día, registrándose los mayores porcentajes en las pasturas cosechadas por la tarde. No se observaron diferencias significativas para los AS entre las distintas especies forrajeras.

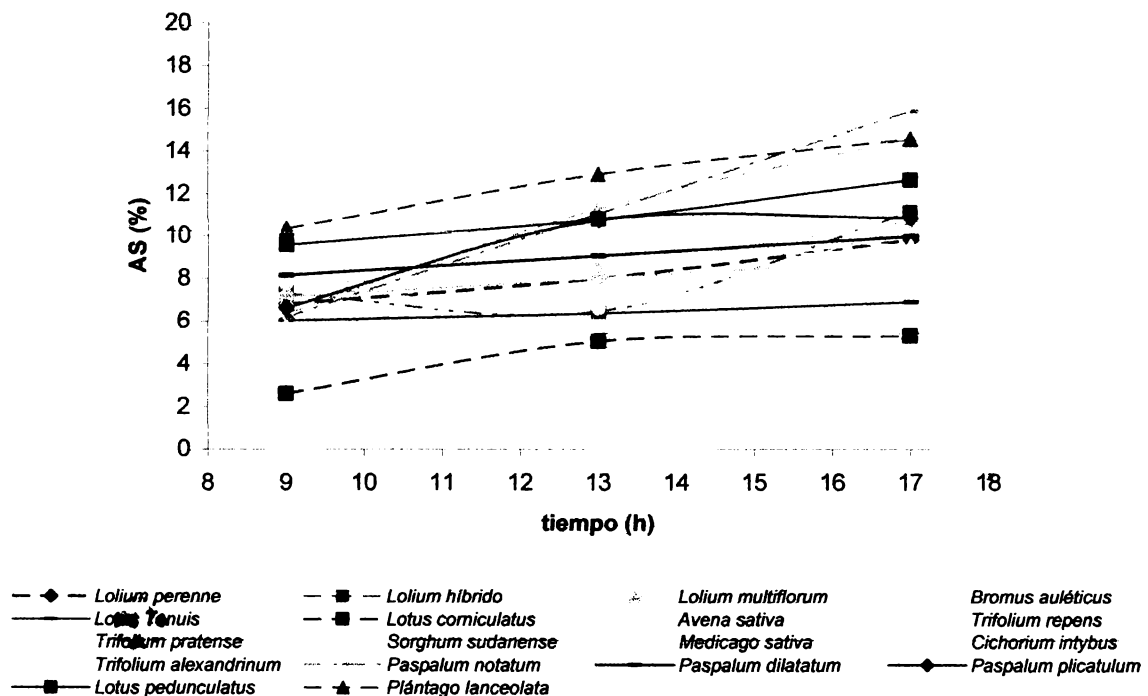


Figura 3. Evolución diaria de la concentración de azúcares solubles (AS%) en función del tiempo (h).

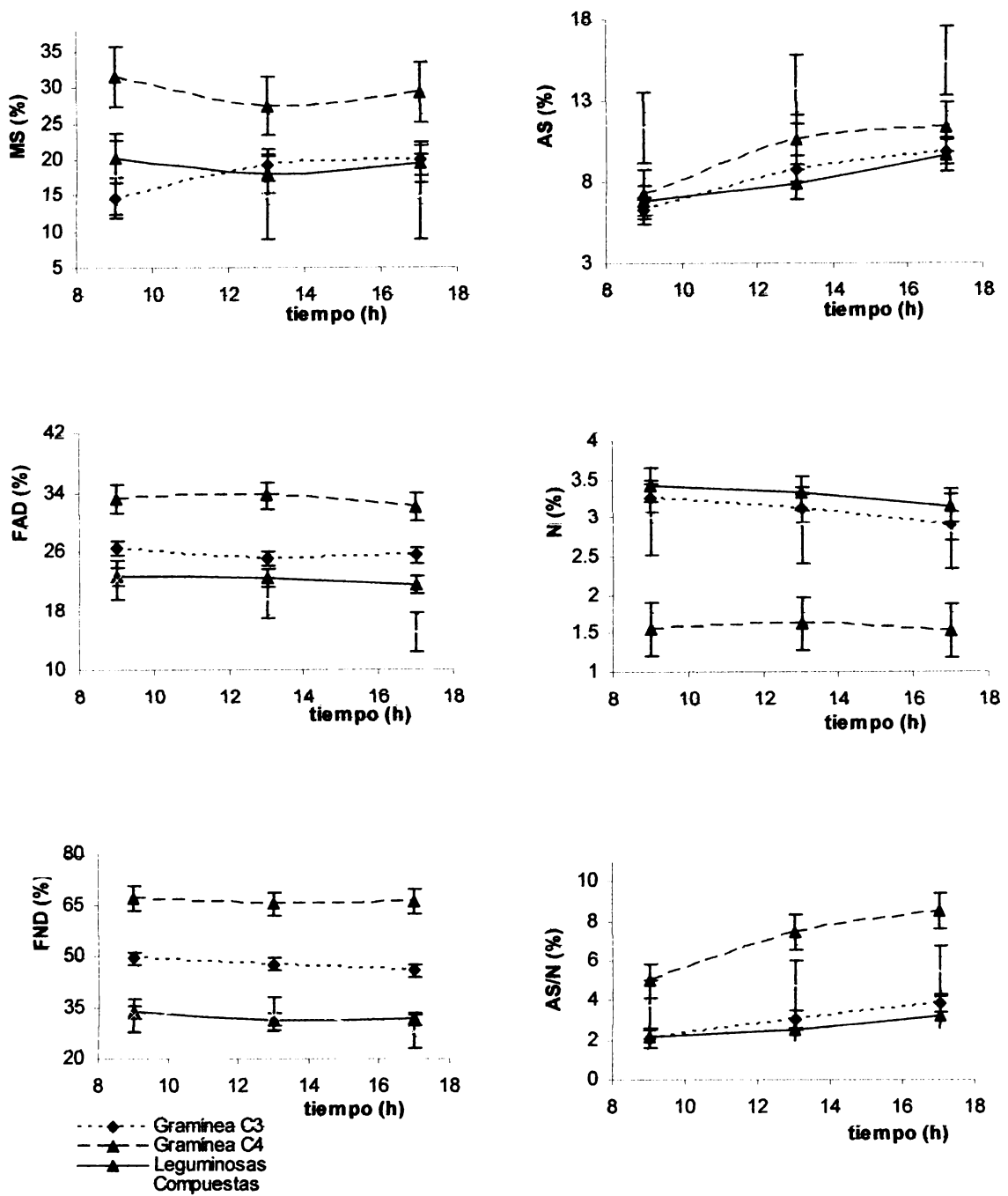


Figura 4. Concentración de Materia Seca (MS%), Azúcares Solubles (AS%), Fibra Ácido Detergente (FAD%), Nitrógeno (N%), Fibra Neutro Detergente (FND%), y relación Azúcares/N (AS/N%), según horario (tiempo) de cada familia y tipo de metabolismo fotosintético.

8.2. PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

A continuación se presentaran por separado, los parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia y el modelo logístico bifásico.

8.2.1. Parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia

Los resultados de producción de gas *in vitro* de la MS obtenidos a través del modelo exponencial simple con latencia se presentan en el Cuadro IV.

Cuadro IV. Parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia según horario de corte y familia y tipo de metabolismo fotosintético.

		lag	kd	V
horario	9:00 (n=30)	0,644	0,081	187,8
	13:00 (n=30)	0,533	0,122	191,4
	17:00 (n=30)	0,384	0,083	199,4
	ESM	0,087	0,021	3,149
	Contraste (h) 9 vs (13+17)	ns	ns	ns
	13 vs 17	ns	ns	ns
FTM	Gramíneas C3 (n=48)	0,672 ^{ab}	0,098 ^a	196,2 ^{ba}
	Gramíneas C4 (n=10)	0,711 ^a	0,051 ^a	207,1 ^a
	Leguminosas (n=24)	0,293 ^c	0,106 ^a	184,4 ^b
	Compuestas (n=6)	0,312 ^{bc}	0,095 ^a	189,5 ^{ba}
	ESM	0,100	0,025	3,636
	P	0,014	ns	0,006

horario: hora de corte 9:00, 13:00 y 17:00 h; lag: tiempo de retardo en la producción de gas (h); kd: tasa de producción de gas (h); V: volumen total de gas producido (ml/g MSi); FTM: familia y tipo de metabolismo fotosintético; FTM*h: interacción entre familia y tipo de metabolismo fotosintético y horario de corte; 9 vs 13+17: contraste entre hora 9 y horas 13 y 17; 13 vs 17: contraste entre hora 13 y hora 17; ESM: error estándar de la media; P: probabilidad; ns: no significativo ($P > 0,05$); ^{a,b,c} Valores con distinto superíndice dentro de columnas difieren por test de Tukey.

Como se observa en el cuadro IV, al comparar el horario de corte, no se observaron diferencias significativas en el volumen total de gas producido, la duración de la fase lag, o tasa de producción de gas.

En relación a las FTM, se pudieron observar diferencias significativas entre el volumen total de gas producido entre las gramíneas C4 y las leguminosas, siendo las C4 las que presentaron la mayor producción de gas. No existió diferencia en la producción de gas entre las gramíneas C3, gramíneas C4 y las compuestas, como tampoco entre leguminosas, C3 y compuestas. Las gramíneas C4 presentaron el mayor lag, mientras que las leguminosas el menor. No se encontraron diferencias entre las distintas FTM para la kd.

8.2.2. Parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico

En el Cuadro V, se presentan las medias de los parámetros de producción de gas obtenidos por el modelo logístico bifásico.

Cuadro V. Parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico según horario de corte y familia y tipo de metabolismo fotosintético.

		L	Vr	Kdr	VI	kdl	Vt
horario	9:00 (n=30)	1,542	123,5	0,084	69,07	0,017	192,6
	13:00 (n=30)	1,313	122,6	0,092	73,54	0,019	196,1
	17:00 (n=30)	1,082	126,6	0,086	76,57	0,019	203,1
	ESM	0,182	3,676	0,003	2,884	0,001	3,163
Contraste (h)	9 vs (13+17)	ns	ns	0,024	0,040	0,002	ns
	13 vs 17	ns	ns	ns	ns	ns	ns
FTM	Gramíneas C3 (n=48)	1,654 ^b	126,3 ^a	0,082 ^{bc}	73,13 ^b	0,017 ^b	199,4 ^{ab}
	Gramíneas C4 (n=10)	2,865 ^a	106,2 ^b	0,069 ^c	101,0 ^a	0,016 ^b	207,3 ^a
	Leguminosas (n=24)	0,474 ^c	127,6 ^a	0,100 ^{ba}	62,51 ^b	0,019 ^b	190,1 ^b
	Compuestas (n=6)	0,582 ^c	115,5 ^{ab}	0,105 ^a	76,71 ^b	0,026 ^a	192,2 ^{ab}
	ESM	0,211	4,245	0,003	3,330	0,001	3,653
	P	<0,001	0,031	<0,001	<0,001	<0,001	0,040
FTM*h	P	ns	ns	ns	ns	0,016	ns

horario: hora de corte 9:00, 13:00 y 17:00 h; L: tiempo de retardo en la producción de gas (h); Vr y VI: volúmenes de rápida y lenta producción de gas respectivamente (ml/g MSi); kdr y kdl: tasas de producción de gas de los volúmenes de rápido y lento respectivamente (h^{-1}); Vt: volumen total de gas producido (Vr+VI) (ml/gMSi) (h); FTM: familia y tipo de metabolismo fotosintético; FTM*h: interacción entre familia y tipo de metabolismo fotosintético y horario de corte; 9 vs 13+17: contraste entre hora 9 y horas 13 y 17; 13 vs 17: contraste entre hora 13 y hora 17; ESM: error estandar de las medias; P: probabilidad; ns: no significativo ($P > 0,05$). ^{a,b,c} Valores con distinto superíndice dentro de columnas difieren por test de Tukey.

Como se observa en el cuadro V, al comparar el horario de corte sobre los parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico, se observó que las tasas de producción de gas (kdr y kdl) y VI fueron mayores en los forrajes cortados a las 13+17 h respecto a las 9 h. Para el contraste 13 vs 17 h no se encontraron diferencias significativas para ningún parámetro de gas evaluado por este modelo. Cómo se aprecia en el mismo cuadro, existió interacción FTM con la hora, para el parámetro kdl.

En cuanto a las distintas FTM, las mismas afectaron de forma significativa a todos los parámetros de producción de gas *in vitro*. Como se observa en el cuadro V y la figura 5, las gramíneas C4 presentaron el mayor VI, el mayor Vt, así como el mayor tiempo de retardo en la producción de gas. Las gramíneas C3 así como las leguminosas presentaron el mayor Vr. Las pasturas compuestas presentaron las mayores tasas de producción de gas, así como el menor L.

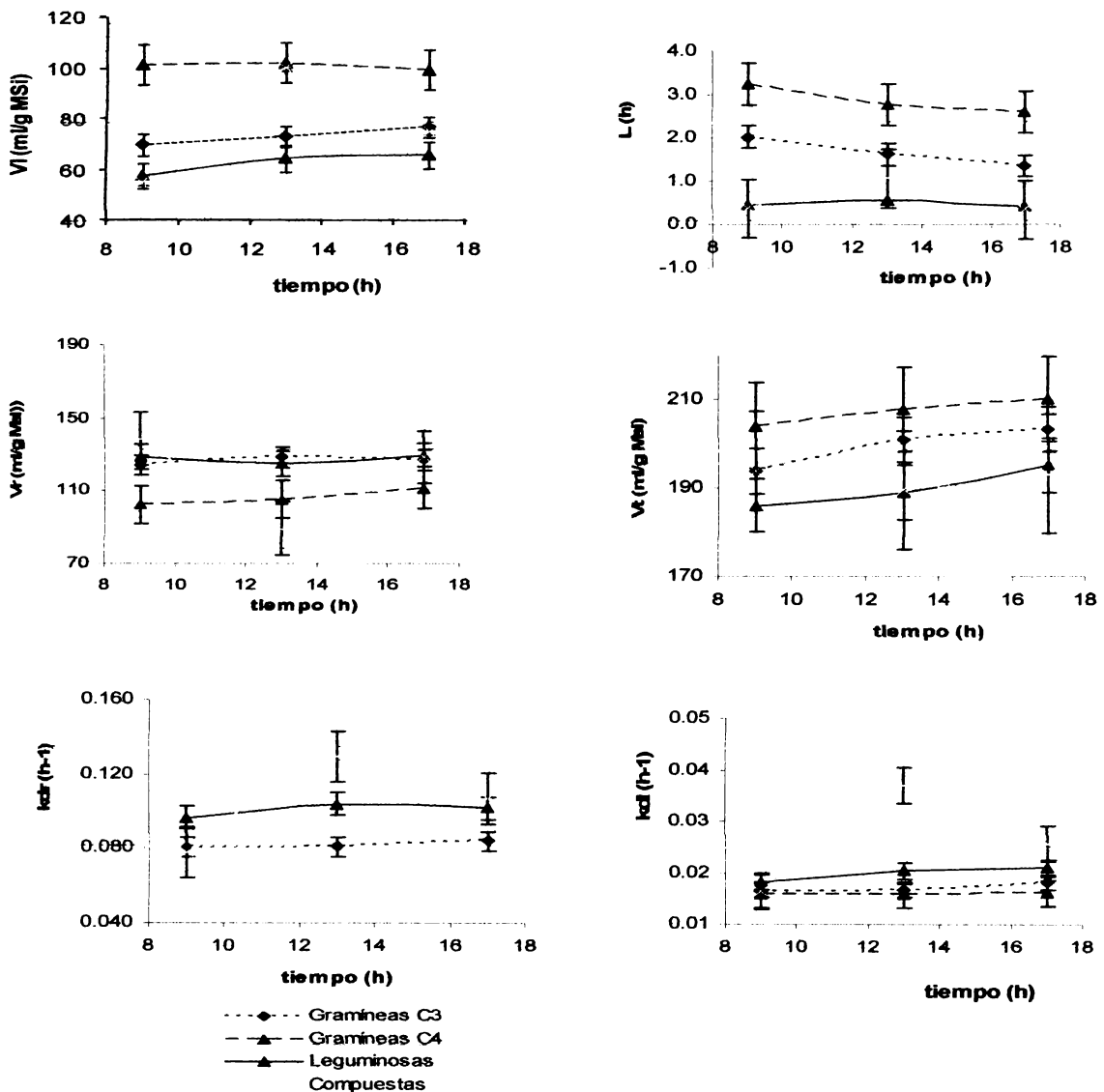


Figura 5. Parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico, según horario (tiempo), de cada familia y tipo de metabolismo fotosintético. Vr y VI = volúmenes de rápida y lenta producción respectivamente, L = tiempo de retardo en la producción de gas, Vt = volumen total de gas producido (Vr+VI), kdr y kdl = tasas de producción de gas de los volúmenes de rápida y lento respectivamente.

8.3. CORRELACIONES

8.3.1. Correlaciones entre componentes químicos

En el Cuadro VI, se presentan los coeficientes de correlación y su nivel de significación entre los componentes químicos de los forrajes.

Cuadro VI. Coeficientes de correlación entre los componentes químicos de los forrajes (n=88) (base seca).

	MS	MO	FND	FAD	AS	N	AS/N
MS	1,00	0,303 ^A (0,004) ^B	0,493 (<0,001)	0,535 (<0,001)	ns	-0,608 (<0,001)	0,408 (<0,001)
MO		1,00	ns	ns	ns	-0,214 (0,045)	ns
FND			1,00	0,759 (<0,001)	ns	-0,616 (<0,001)	0,361 (<0,001)
FAD				1,00	ns	-0,622 (<0,001)	0,347 (<0,001)
AS					1,00	-0,324 (0,003)	0,709 (<0,001)
N						1,00	-0,769 (<0,001)
AS/N							1,00

MS: Materia Seca (%); MO: Materia Orgánica (%); FND: Fibra Neutro Detergente (%); FAD: Fibra Ácido Detergente (%); AS: Azúcares Solubles (%); N: Nitrógeno (%); AS/N: relación Azúcares/Nitrógeno (%); ^A Coeficiente de correlación (r); ^B Probabilidad; ns: no significativo (P>0,05).

Cómo se observa, la MS presentó correlaciones positivas medias a altas con la mayoría de los parámetros químicos estudiados, a excepción del N, con el que presentó correlación alta y negativa. La FND y la FAD presentaron una alta correlación positiva entre sí, y ambas fibras mostraron correlación negativa y alta con el N. Por otra parte, los AS mostraron una correlación negativa media con el N.

8.3.2. Correlaciones y regresiones entre componentes químicos y parámetros de producción de gas obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia

Los coeficientes de correlación entre los componentes químicos de las pasturas y los parámetros de producción de gas obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia se presentan en el Cuadro VII.

Cuadro VII. Coeficientes de correlación entre componentes químicos (base seca) y parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia. (n=85).

	lag	kd	V
MS	-0,231 ^A (0,034) ^B	ns	ns
MO	-0,438 (<0,001)	ns	ns
FND	0,235 (0,031)	-0,267 (0,013)	0,421 (<0,001)
FAD	0,249 (0,021)	-0,354 (<0,001)	ns
N	ns	0,329 (0,002)	-0,570 (<0,001)
AS	-0,428 (<0,001)	0,215 (0,047)	0,404 (<0,001)
AS/N	-0,235 (0,030)	ns	0,504 (<0,001)

MS: Materia Seca (%); MO: Materia Orgánica (%); FND: Fibra Neutro Detergente (%); FAD: Fibra Ácido Detergente (%); N: Nitrógeno (%); AS: Azúcares Solubles (%); AS/N: relación Azúcares/Nitrógeno (%); lag: tiempo de retardo en la producción de gas (h); kd: tasa de producción de gas (%/h); V: volumen total de gas producido (ml/g MSi); ^A Coeficiente de correlación (r); ^B Probabilidad; ns: no significativo (P > 0,05).

Como se aprecia en el cuadro VII, los contenidos de MS y MO se correlacionaron de manera negativa con el lag. La FND y FAD se correlacionaron positivamente con el lag, pero negativamente con la tasa de producción de gas. Al mismo tiempo la FND se correlacionó positivamente con el V. El N presentó correlación positiva con la kd, pero negativa con el V. Los AS y la relación AS/N mostraron correlación negativa con lag, y positiva con el V, siendo la correlación entre AS y kd también positiva.

En el cuadro VIII se presentan ecuaciones de regresión de los parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia, en función de los componentes químicos.

Cuadro VIII. Ecuaciones de regresión de los parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia, en función de los componentes químicos de los forrajes (base seca).

Ecuaciones	DER	R ²	P
V = 213,4 – 10,98 N + 1,322 AS	14,71	0,379	<0,001
kd = 0,289 – 0,008 FAD	0,107	0,125	<0,001
kd = -0,191 + 0,061 N + 0,012 AS	0,101	0,225	<0,001
lag = 1,074 - 0,063 AS	0,453	0,183	<0,001

V: volumen total de gas producido (ml/g MSi); kd: tasa de producción de gas (%/h); lag: tiempo de retardo en la producción de gas (h); FAD: Fibra Ácido Detergente (%); AS: Azúcares Solubles (%); N: Nitrógeno (%); DER: desvío estándar residual; R²: coeficiente de determinación; P: probabilidad.

Como se aprecia en el cuadro anterior, las variables de composición química que permiten predecir la dinámica de la producción de gas *in vitro*, descrita por el modelo exponencial simple con latencia, y de acuerdo al análisis estadístico realizado, fueron el contenido de N, AS y FAD. De acuerdo a estos resultados, el V depende positivamente del contenido de AS y negativamente de N, mientras que kd depende positivamente de ambas variables. También, la kd y lag dependen negativamente de FAD y AS, respectivamente. Hay que señalar que en todos los casos, los coeficientes de determinación fueron bajos o medios.

8.3.3. Correlaciones y regresiones entre componentes químicos y parámetros de producción de gas obtenidos por el modelo logístico bifásico

En el Cuadro IX, se presentan los coeficientes de correlación entre composición química y parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico.

Cuadro IX. Coeficientes de correlación entre componentes químicos (base seca) y producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico (n=85).

	L	Vr	kdr	VI	kdl	Vt
MS	ns	-0,284 ^A (0,008) ^B	-0,354 (<0,001)	0,407 (<0,001)	ns	ns
MO	-0,316 (0,003)	ns	ns	ns	ns	ns
FND	0,566 (<0,001)	-0,257 (0,018)	-0,663 (<0,001)	0,578 (<0,001)	-0,281 (0,009)	0,319 (0,003)
FAD	0,568 (<0,001)	-0,449 (<0,001)	-0,496 (<0,001)	0,530 (<0,001)	ns	ns
N	ns	0,313 (0,003)	0,543 (<0,001)	-0,741 (<0,001)	ns	-0,429 (<0,001)
AS	-0,287 (0,008)	ns	ns	0,375 (<0,001)	0,284 (0,008)	0,372 (<0,001)
AS/N	ns	-0,289 (0,007)	-0,352 (<0,001)	0,691 (<0,001)	ns	0,402 (<0,001)

MS: Materia Seca (%); MO: Materia Orgánica (%); FND: Fibra Neutro Detergente (%); FAD: Fibra Ácido Detergente (%); AS: Azúcares Solubles (%); N: Nitrógeno (%); AS/N: relación Azúcares/Nitrógeno (%); L: tiempo de retardo en la producción del gas (h); Vr y VI: volúmenes de rápida y lenta producción de gas respectivamente (ml/g MSi); kdr y kdl: tasas de producción de gas de los volúmenes rápido y lento respectivamente (h^{-1}); Vt: volumen de gas producido (Vr+VI) (ml/g MSi); ^A Coeficiente de correlación (r); ^B Probabilidad; ns: no significativo (>0,05).

Como puede apreciarse, tanto la FAD como la FND se correlacionaron negativamente con el Vr, pero positivamente con el VI y con el tiempo de retardo en la producción de gas (L). El contenido de FND se correlacionó inversamente con la tasa de producción del volumen rápido (figura 6) y lento, observándose que mayores contenidos de FND están asociados a una menor kdr y kdl.

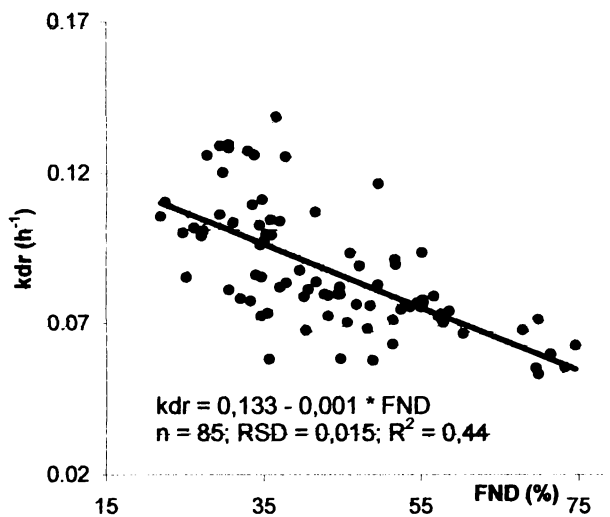


Figura 6. Relación entre el porcentaje de fibra neutro detergente (FND%) y tasa de producción de gas del volumen rápido ($kdr\ h^{-1}$).

El N se correlacionó de forma positiva con el Vr, pero negativamente con el Vi, lo que se ejemplifica en la figura 7, donde se observa que mayores contenidos de N están asociados con menores valores de Vi.

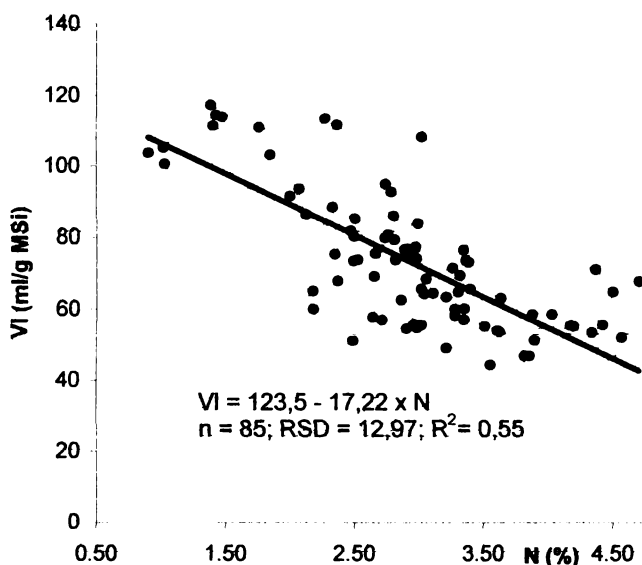


Figura 7. Relación entre el porcentaje de nitrógeno (N%) y volumen de lenta producción de gas (Vi ml/g MSi).

Los AS se correlacionaron negativamente con el L y positivamente con los Vi y Vt, y kdl.

Además de los estudios de correlación se realizaron estudios de regresión entre los parámetros de gas obtenidos por el modelo logístico bifásico y los componentes químicos de los forrajes. Las ecuaciones obtenidas se presentan en el Cuadro X.

Cuadro X. Ecuaciones de regresión de los parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico en función de los componentes químicos (base seca) de los forrajes.

Ecuaciones	DER	R ²	P
$V_r = 169,7 - 1,834 \text{ FAD}$	18,81	0,202	<0,001
$k_{dr} = 0,107 - 0,001 \text{ FND} + 0,005 \text{ N}$	0,015	0,470	<0,001
$L = 20,73 - 0,258 \text{ MO} + 0,146 \text{ FAD}$	0,921	0,462	<0,001
$V_l = 60,38 + 0,575 \text{ FND} - 9,468 \text{ N} + 1,737 \text{ AS}$	11,74	0,639	<0,001
$k_{dl} = 0,019 - 0,0001 \text{ FND} + 0,0004 \text{ AS}$	0,005	0,136	0,003
$V_t = 152,7 + 0,553 \text{ FND} + 2,304 \text{ AS}$	15,24	0,290	<0,001

V_t: volumen total de gas producido (V_r+V_l) (ml/g MSi); *V_r* y *V_l*: volúmenes de rápida y lenta producción de gas respectivamente (ml/g MSi); *k_{dr}* y *k_{dl}*: tasas de producción de gas de los volúmenes rápido y lento respectivamente (h^{-1}); *L*: tiempo de retardo en la producción de gas (h); *MO*: Materia Orgánica (%); *FAD*: Fibra Ácido Detergente (%); *FND*: Fibra Neutro Detergente (%); *AS*: Azúcares Solubles (%); *N*: Nitrógeno (%); *DER*: desvío estándar residual; *R²*: coeficiente de determinación; *P*: probabilidad.

Como se desprende del cuadro anterior, las variables de composición química que permiten predecir la dinámica de la producción de gas *in vitro* descrita por el modelo logístico bifásico, y de acuerdo al análisis estadístico realizado, fueron el contenido de MO, N, AS, FAD y FND. En términos generales, las fibras afectan negativamente las tasas de producción de gas y el *V_r*, pero positivamente el *V_l* y *V_t*. Tanto el *V_l* como *V_t*, y la *k_{dl}*, dependen positivamente del contenido de AS. Finalmente, el N afecta positivamente la *k_{dr}* pero negativamente el *V_l*. Los coeficientes de determinación fueron medios a altos para las ecuaciones de predicción de *k_{dr}*, *L* y *V_l*, y bajos a medios para las restantes.

8.3.4. Correlaciones entre los modelos de producción de gas *in vitro*, logístico bifásico y exponencial simple con latencia

En el Cuadro XI se presentan los resultados obtenidos para los parámetros de producción de gas *in vitro* entre los dos modelos utilizados para predecir la cinética de fermentación.

Cuadro XI. Coeficientes de correlación entre parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico y el modelo exponencial simple con latencia. (n=85).

	L	Vr	kdr	VI	kdl	Vt
V	-0,196 ^A (0,072) ^B	0,375 (<0,001)	-0,496 (<0,001)	0,503 (<0,001)	ns	0,979 (<0,001)
kd	ns	ns	0,273 (0,012)	ns	ns	ns
lag	0,875 (<0,001)	-0,298 (0,006)	ns	ns	-0,285 (0,008)	-0,444 (<0,001)

V: volumen total de gas producido (ml/g MSi); kd: tasa de producción de gas (%/h); lag: tiempo de retardo en la producción de gas (h); L: tiempo de retardo en la producción de gas (h); Vr y VI: volúmenes de rápida y lenta producción de gas respectivamente (ml/g MSi); kdr y kdl tasas de producción de gas de los volúmenes rápido y lento (h^{-1}); Vt: volumen total de gas producido (Vr+VI) (ml/g MSi); ^A Coeficiente de correlación (r); ^B Probabilidad; ns: no significativo ($P > 0,05$).

Como se observa, ambos modelos matemáticos presentaron una alta correlación positiva entre los volúmenes totales de gas producidos. La correlación entre los valores predichos para el tiempo de retardo en el comienzo de la producción de gas entre los modelos matemáticos también fue alta y positiva. A su vez la correlación entre las tasas de producción de gas (kd, kdr y kdl) fue muy baja o nula.

En la Figura 8, se observa la relación entre el volumen de gas (V) obtenido por el modelo exponencial simple y el volumen total de gas (Vt) obtenido por el modelo logístico bifásico.

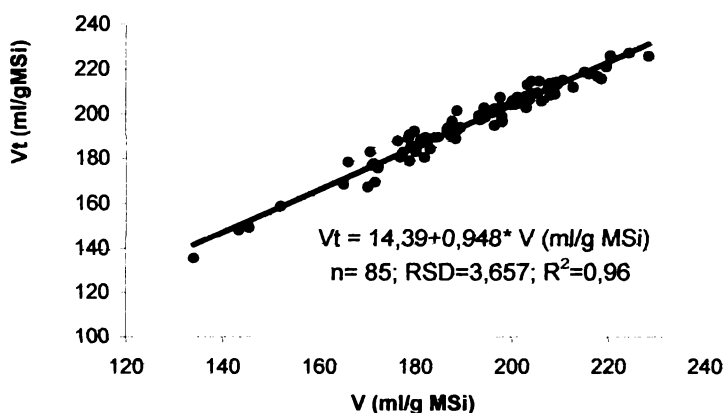


Figura 8. Relación entre el volumen total de gas producido (V ml/g MSi) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia y el volumen total de gas producido (Vt ml/g MSi) obtenido por el modelo logístico bifásico.

También se realizaron estudios de regresión de los parámetros de producción de gas ajustados al modelo logístico bifásico y al modelo exponencial simple con latencia. Las ecuaciones obtenidas se presentan en el Cuadro XII.

Cuadro XII. Ecuaciones de regresión de los parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo logístico bifásico en función de los parámetros de gas obtenidos por el método exponencial simple con latencia.

Ecuaciones	DER	R ²	P
$L = -2,609 + 0,014 V + 2,389 \text{ lag}$	0,561	0,800	<0,001
$V_t = 14,39 + 0,948 V$	3,657	0,959	<0,001

V_t: volumen de gas producido (*V_r*+*V_i*) (ml/g MSi); *V*: volumen total de gas producido (ml/g MSi); *lag*: tiempo de retardo en la producción de gas (h); *L*: tiempo de retardo en la producción de gas (h); *DER*: desvío estándar residual; *R*²: coeficiente de determinación; *P*: probabilidad.

9. DISCUSIÓN

Todos los componentes químicos analizados en este trabajo presentaron diferencias significativas entre las FTM estudiadas. Los más altos contenidos de MS, FND y FAD se observaron en las gramíneas con tipo de metabolismo C4, lo cual coincide con lo reportado por Van Soest (1994). Este mayor contenido de paredes celulares es consecuencia de la estructura celular característica de estas especies, así como del hecho que las gramíneas C4 poseen mayor cantidad de tejidos de sostén que otras especies forrajeras, lo que es necesario para que puedan soportar la mayor producción de biomasa aérea (Crush y Rowarth, 2007).

Por otra parte, los menores contenidos de N en las especies de tipo C4 están asociados a su mayor eficiencia fotosintética, que hace que requieran menores cantidades de la enzima Rubisco, respecto a los de tipo C3 (Crush y Rowarth, 2007). El porcentaje de N promedio observado en las especies gramíneas C4 en este trabajo se encuentra en el límite (1,76 g/100gMS) de lo que algunos autores consideran como el mínimo indispensable para un aporte adecuado de N para los microorganismos ruminales (Van Soest, 1994). En conjunto, los mayores contenidos de FND y FAD y el menor contenido de N sugerirían un menor valor nutritivo de las gramíneas C4, lo que coincide con lo reportado por la bibliografía (Jarrige *et al.*, 1995).

De los diferentes tipos de pasturas estudiadas, las plantas compuestas presentaron los mayores contenidos de AS de todos los grupos estudiados. Este resultado coincide con Li y Kemp (2005), quienes encontraron un mayor contenido de AS en achicoria respecto a gramíneas como raigrás perenne. Van Soest (1994), en pasturas en similar estado fisiológico, menciona una baja concentración de azúcares para gramíneas del tipo C4, asociado tal vez a su mayor tasa metabólica.

Se conoce que un adecuado crecimiento microbiano dependerá no solo de la disponibilidad de energía y proteína a nivel de rumen, sino también de las proporciones entre ambos, y de cuán simultáneo es el aporte de estos nutrientes para los microorganismos ruminales. A partir de la relación AS/N observada para las gramíneas C4, mayor que en las otras especies forrajeras evaluadas, se plantea que la mayor limitante para el crecimiento de los microorganismos en rumiantes consumiendo estas especies sería una provisión insuficiente de N, y no una baja cantidad de carbohidratos de rápida fermentación.

Por otra parte, las leguminosas se caracterizaron por tener la más baja relación AS/N de todas las FTM estudiadas. Esto sugiere que en rumiantes consumiendo estas especies forrajeras, la mayor limitante para el crecimiento de los microorganismos del rumen sería una deficiencia relativa de carbohidratos de rápida fermentación respecto al aporte de N, el cual se encuentra por encima del mínimo sugerido (Van Soest, 1994). Esto es consistente con lo reportado por Repetto *et al.* (2005) y Cajarville *et al.* (2006), quienes sugirieron que para forrajes C3, la baja relación AS/N es la mayor limitante para el crecimiento microbiano.

En promedio, todas las pasturas presentaron una relación inversa entre la fracción fibra (FAD y FND) y los contenidos de N. Este dato es esperable dado que al aumentar los componentes fibrosos de las pasturas, se reduce la proporción de nutrientes potencialmente fermentables (AS, N, minerales y vitaminas) (Reis *et al.*, 2005). Sin embargo, Repetto *et al.* (2003) investigaron la relación entre la degradabilidad ruminal y la composición química de alfalfa deshidratada, y encontraron contrariamente a este estudio, una alta correlación negativa entre la MS y los contenidos de FAD y FND.

La variación más importante en los contenidos de AS se registró entre las 9 y las 13 horas, alcanzando su máxima concentración por la tarde. Hay que señalar que dicha evolución fue similar para todas las FTM evaluadas. Este resultado es esperable debido a que a medida que transcurre el día se incrementan los niveles de AS debido al proceso de fotosíntesis que ocurre en las plantas (Van Soest, 1994). Distintos autores también han reportado un mayor contenido de AS durante la tarde respecto a la mañana en distintas especies forrajeras, como por ejemplo alfalfa y festuca (Repetto *et al.*, 2003), falaris (Ciavarella *et al.*, 2000), trébol rojo (Owens *et al.*, 1999) y *dactylis* (Griggs *et al.*, 2005). Además, se ha observado que cuando las pasturas son cortadas de tarde en vez de en la mañana para realizar reservas forrajeras, los heno producidos presentan un mayor contenido de AS, tanto cuando se usa raigrás (Mayland *et al.*, 2005) como festuca (Fisher *et al.*, 1999).

Esta evolución diaria de los AS en las especies evaluadas, permitiría seleccionar el mejor momento del día para realizar pastoreos o para realizar los cortes de pastura para henificación. Por ejemplo, existen estudios realizados en ovinos y caprinos donde se observó un mayor consumo voluntario de heno que habían sido cosechados por la tarde en comparación con los cosechados por la mañana (Fisher *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2005), hecho que los autores lo asocian al mayor contenido en azúcares de los primeros. Según Orr *et al.* (1997), uno de los criterios por los que los rumiantes seleccionan el forraje que van a consumir es por su contenido de AS.

Por otra parte, la relación AS/N para las distintas especies forrajeras también presentó variaciones entre las 9 y 13 h, aumentando entre ambos momentos, resultado que coincide con lo reportado por Repetto *et al.* (2003). Esto demuestra que las pasturas presentan una composición química más desequilibrada desde el punto de vista del aporte simultáneo de energía fermentescible y nitrógeno para los microorganismos del rumen.

El incremento promedio del contenido en azúcares fue de 53% entre el corte de las 9 y las 17 h. Este resultado es diferente al reportado por Repetto *et al.* (2003) para festuca y alfalfa, donde encontraron que los contenidos de AS se duplicaban entre los horarios de muestreo en la mañana y la tarde.

La falta de efecto del horario de corte sobre la producción total de gas (estimada por los dos modelos) probablemente se debió a que la diferencia observada en los contenidos de AS entre la mañana y tarde en este experimento no fue suficiente como para producir un incremento observable en dicha producción. Sin embargo Berthiaume *et al.* (2006), trabajando con leguminosas cortadas en distintos momentos del día, determinaron un aumento en la producción de gas a partir de los

materiales cortados en la tarde, lo que atribuyeron al mayor contenido de AS en este momento. Del mismo modo, Repetto *et al.* (2006) y Britos *et al.* (2006) reportaron en alfalfa y festuca, mayores volúmenes y tasas de producción de gas en las pasturas cortadas en los horarios de la tarde, las cuales habían presentado una mayor concentración de azúcares.

Las mayores k_{dr} y k_{dl} estimadas a partir del modelo logístico bifásico para los horarios de corte de las 13+17 h respecto a las 9 h se deben probablemente a las diferencias en las concentraciones de AS entre estos horarios. Sin embargo, la falta de significancia en la k_d estimada con el modelo exponencial simple con latencia, es llamativa, y contrasta con lo encontrado por Repetto *et al.* (2006), quienes trabajando en festuca y alfalfa muestreadas en otoño, y ajustando los datos al modelo exponencial simple con latencia, reportaron mayores valores de k_d en las pasturas cortadas en la tarde respecto a la mañana.

La mayor producción de gas total de las especies gramíneas C4 respecto a las leguminosas podría deberse al mayor contenido de MS y/o relación AS/N de las primeras. Sin embargo, su elevado contenido de paredes celulares, que supondría una mayor dificultad para los microorganismos de fermentarlas, explicaría el mayor tiempo de retardo observado en cualquiera de los modelos empleados.

Dentro de las distintas FTM, las plantas compuestas presentaron la mayor k_{dr} , coincidiendo con el menor contenido en FND y FAD que contienen, así como su mayor contenido de AS. Al respecto, Giraldo *et al.* (2006) y Sánchez *et al.* (2005) determinaron que los forrajes con menor contenido de FND presentaron tasas de producción de gas más altas y obtenidas en menor tiempo de fermentación. Ello se debería a que los forrajes con mayor valor nutritivo muestran mejores condiciones para la colonización y degradación por parte de los microorganismos ruminales.

Se observó que las gramíneas C4 presentaron el mayor tiempo de retardo en la producción de gas y el mayor volumen final lento (logístico bifásico), probablemente debido al mayor contenido de FND que contienen, coincidiendo con Sánchez *et al.*, (2005), los que observaron un retardo en la producción de gas durante la fermentación de la fracción FND. En este sentido, Ciavarella *et al.* (2000) relacionaron el menor tiempo de latencia con el incremento de los compuestos de rápida fermentación, hecho indicativo de un comienzo más rápido en la producción de gas. Esto coincide con los datos obtenidos en este estudio, donde las pasturas compuestas presentaron el mayor contenido de AS, a la misma vez que presentaron el menor tiempo de retardo en la producción de gas.

Al comparar los parámetros de producción de gas obtenidos a través del modelo exponencial simple con latencia, según las distintas FTM, se evidenciaron diferencias para el volumen total de gas producido, siendo mayor para las gramíneas C4. Seguramente este resultado esté asociado al mayor contenido en FND que presentaron estas pasturas. Al respecto, Doane *et al.* (1997) encontraron una relación lineal entre la producción de gas y el contenido de FND, por lo que hay una tendencia al aumento de la producción de gas en aquellos forrajes donde el contenido de FND es mayor. Giraldo *et al.*, (2006), observó también mayor producción de gas en una pastura que contenía altos porcentajes de FND.

Por otra parte, se obtuvieron valores muy semejantes de los volúmenes totales de gas producido para las distintas FTM, por ambos modelos estudiados. De esta manera los dos modelos serían capaces de predecir en forma similar el volumen total de gas. Sin embargo, a diferencia del modelo exponencial simple, el modelo logístico bifásico puede estimar los volúmenes (V_r y V_l) y las tasas (k_{dr} y k_{dl}) de las distintas fracciones fermentables de los forrajes (Schofield *et al.*, 1994). De tal modo, en este trabajo se observó en promedio para las distintas FTM, volúmenes de rápida producción de gas mayor para las cuatro FTM, en relación al volumen de lenta producción. Este hecho estaría indicando una contribución importante de la fracción soluble del forraje a la producción de gas, lo que sugiere un probable aumento de la concentración de ácidos grasos volátiles, que son la principal fuente de energía para los rumiantes (Campos *et al.*, 2004). Esto sugeriría que estas pasturas podrían realizar un rápido aporte de energía que pudiera ser utilizable por los microorganismos del rumen.

Finalmente, los dos modelos matemáticos utilizados para predecir los parámetros de producción de gas *in vitro*, mostraron un buen ajuste de los datos obtenidos, presentando altos coeficientes de determinación (R^2) (logístico bifásico: $R^2 = 0,999$; exponencial simple con latencia: $R^2 = 0,998$). Presentando además una alta correlación entre los dos modelos matemáticos para el volumen total de gas producido ($r = 0,979$) como para el tiempo de retardo en la producción de gas ($r = 0,875$).

10. CONCLUSIONES

El horario de corte afecta la composición química de las pasturas, los forrajes cortados por la tarde presentan más AS y mayor relación AS/N que los cortados por la mañana. Esto permitiría determinar horas de corte para realizar reservas forrajeras como henos, henolajes y ensilajes así como fijar horarios de pastoreo en horas de la tarde.

Las gramíneas con metabolismo fotosintético C4, presentaron los mayores contenidos de MS, FAD, FND y los menores de N, asociado a un mayor volumen de gas de lenta producción. Las pasturas compuestas mostraron los mayores contenidos de AS, con las mayores tasas de producción de gas.

Existió una importante correlación entre algunos de los parámetros que definen la dinámica de producción de gas *in vitro* de especies forrajeras, y distintos parámetros de la composición química de las mismas, como el contenido de AS, N, FND y FAD.

Se observó una importante correspondencia en la predicción del volumen total de gas *in vitro* de los modelos matemáticos utilizados. A nivel práctico sería recomendable el uso del modelo exponencial simple con latencia por ser más sencillo y de fácil aplicación, sin embargo en la investigación y con fines académicos sería recomendable el uso del modelo logístico bifásico ya que éste permite distinguir las distintas fracciones de los forrajes.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Association of Official Analytical Chemists. (1984). Official Methods of Análisis. 14a. ed. Washington D.C. 1141 p.
- 2) Berthiaume, R, Tremblay, G, Castonguay, Y, Bertrand, A, Bélanger, G, Lafrenière, C, Michaud, R. (2006). Length of the daylight period before cutting improves rumen fermentation of alfalfa assessed by *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science* 84: 102.
- 3) Britos, A, Curbelo, A, Pomiés, N, Caramelli, A, Antúnez, M, Cajarville, C. (2008). Implementación de la técnica de producción de gas *in vitro* semiautomatizada en Uruguay: predicción del volumen de gas. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú. p. 273-275.
- 4) Britos, A, Repetto, J.L, Errandonea, N, Garciarena, D, Cajarville, C. (2006). Efecto del momento de corte y del proceso de ensilaje sobre la fermentescibilidad de forrajes templados: producción de gas *in vitro*. Caderno de resumos do XIV Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM: Empreendedorismo, Inovação Tecnológica e Desenvolvimento Regional. Campinas, Brasil. 534 p.
- 5) Burns, J.C, Mayland, H.F, Fisher, D.S. (2005). Dry matter intake and digestion of alfalfa harvested at sunset and sunrise. *Journal of Animal Science* 83: 262-270.
- 6) Cajarville, C, Aguerre, M, Repetto, J.L. (2006). Rumen pH, NH₃-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Animal Research* 55: 511-520.
- 7) Cajarville, C, Errandonea, N, Britos, A, Cozzolino, D, Topolansky, M, Repetto, J.L. (2003). Nutritive value of Lucerne and Fescue during autumn II: Chemical composition of different parts of the plant. Proceedings of the IX World Conference on Animal Production, Porto Alegre, Brasil. p. 26.
- 8) Campos, F, Sampaio, A, Bose, M, Vieira, P, Sarmiento, P. (2004). Evaluation of *in vitro* gas production of roughages and their mixtures using the curves subtraction method. *Animal Feed Science and Technology* 116: 161-172.
- 9) Ciavarella, T.A, Simpson, R.J, Dove, H, Leury, B.J, Sims, I.M. (2000). Diurnal changes in the concentration of water-soluble carbohydrates in *Phalaris aquatica* L. pasture in spring, and the effect of short-term shading. *Australian Journal of Agricultural Research* 51: 749-756.
- 10) Cone, J.W, Beuvink, J.M, Rodrigues, M. (1994). Use and applications of an automated time related gas production test for the *in vitro* study of fermentation kinetics in the rumen. *Revista Portuguesa de Zootecnia* 1: 25-37.

- 11) Crush, J.R., Rowarth, J.S. (2007). The role of C4 grasses in New Zealand pastoral systems. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 50: 125–137.
- 12) Doane, P.H., Schofield, P., Pell, A. (1997). Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the in vitro fermentation of six forages. *Journal of Animal Science* 75: 3342-3352.
- 13) Ehleringer, J.R., Cerling, T.E., Helliker, B.R. (1997). C4 photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. *Oecologia* 112: 285-299.
- 14) Fisher, D.S., Mayland, H.F., Burns, J.C. (2002). Variation in ruminant preference for alfalfa hays cut at sunup and sundown. *Crop Science*. 42: 231-237.
- 15) Fisher, D.S., Mayland, H.F., Burns, J.C. (1999). Variation in ruminants preference for tall fescue hays cut either at sundown or at sunup. *Journal of Animal Science* 77: 762-768.
- 16) Fondevila, M., Barrios, A. (2001). The gas production technique and its application to the study of the nutritive value of forages. *Cuban Journal of Agricultural Science* 35: 187-196.
- 17) Giraldo, L., Gutiérrez, L., Sánchez, J., Bolívar, P. (2006). Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *in vitro* de producción de gases en Colombia. *Livestock Research for Rural Development*. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd18/6/gira18075.htm> (Fecha de consulta: 23/09/09)
- 18) Griggs, T.C., MacAdam, J.W., Mayland, H.F., Burns, J.C. (2005). Nonstructural carbohydrate and digestibility patterns in orchardgrass swards during daily defoliation sequences initiated in evening and morning. *Crop Science* 45: 1295–1304.
- 19) Hungate, R. E (1966). *The Rumen and Its Microbes*. New York, Academic Press. 533 p.
- 20) Jarrige, R., Grenet, E., Demarquilly, C., Besle, J.M. (1995). Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. En: Jarrige, R., Ruckebush, Y., Demarquilly, C., Farce, M.H., Journet, M. *Nutrition des ruminants domestiques*. Paris. Ed: INRA, p. 25-81.
- 21) Kim, D., Mayland, H.F., Arambel, M.J., Kent, B. (1995). Morning or Afternoon Harvested Alfalfa Hay Affects Intake, Digestibility, and Milk Production by Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 78: 363-369.
- 22) Lascano, C.E. (2002). Caracterización de las pasturas para maximizar producción animal. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 10: 126-132.
- 23) Lee, M.R.F., Merry, R.J., Davies, D.R., Moorby, J.M., Humphreys, M.O., Theodorou, M.K., MacRae J.C., Scollan, N.D. (2003). Effect of increasing availability of water-soluble carbohydrates on in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 104: 59-70.

- 24) Lee, M.R.F, Harris L.J, Humphreys M.O, Moorby, J.M, Theodorou, M.K, MacRae J.C, Scollan, N.D. (2002). Rumen metabolism and nitrogen flow to the small intestine in steers offered *Lolium perenne* containing different levels of water-soluble carbohydrate. *Journal of Animal Science* 74: 587-596.
- 25) Lee, M.R.F, Jones, E.L, Moorby, J.M, Humphreys, M.O, Theodorou, M.K, MacRae, J.C, Scollan, N.D. (2001). Production responses from lambs grazed on *Lolium perenne* selected for an elevated water-soluble carbohydrates concentration. *Animal Research* 50: 441-449.
- 26) Leury, B.J, Siever-Kelly C, Gattford, K.L, Simpson, R.J, Dove, H. (1999). Spray-topping annual grass pasture with glyphosate to delay loss of feeding value during summer IV. Diet composition, herbage intake and performance in grazing sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 487-495.
- 27) Li, G., Kemp. P.D. (2005). Forage chicory (*Cichorium intybus* L.): A review of its agronomy and animal production. *Advances in Agronomy* 88: 187-222.
- 28) Mauricio, R.M, Mould, F.L, Dhanoa, M.S, Owen, E, Channa, K.S, Theodorou M.K. (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology* 79: 321-330.
- 29) Mauseth, J.D. (2009). Botany: An introduction to plant biology. 4a. ed. Texas. Jones and Bartlett. 672p.
- 30) Mayland, H, Gregorini, P, Mertens, D.R, Taylor, J.B, Burns, J.C, Fisher, D.S, Ciavarella, T, Smith, K, Shewmaker, G, Griggs, T. (2005). Diurnal changes in forage quality and their effects on animal preference, intake, and performance. Proceedings of the 35th California Alfalfa & Forage Symposium. Visalia, California. U.S.A. p. 223-230.
- 31) McBee, R.H. (1953). Manometric method for the evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Journal of Applied Microbiology* 1: 106-110.
- 32) Mendonça, R.A, Pereira, J.C, Muniz, P.A, Queiroz, A.C, Gonçalves, A.L. (2000). Fracionamento e Cinética de Degradação *In Vitro* dos Compostos Nitrogenados da Extrusa de Bovinos a Pasto. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29: 880-888.
- 33) 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.
- 34) Menke, K.H, Raab, L, Salewski, A, Steingass, H, Fritz, D, Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant metabolizable energy content of ruminant feed stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agricultural Science* 93: 217-222.

- 35) Miller, L.A, Moorby, J.M, Davies, D.R, Humphreys, M.O.; Scollan, N.D, MacRae, J.C, Theodorou, M.K. (2001). Increased concentration of water-soluble carbohydrate in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L): milk production from late-lactation dairy cows. *Grass and Forage Science* 56: 383-394.
- 36) Millot, J.C, Methol, R, Risso, D. (1987). Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. Montevideo. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Comisión Honoraria del Plan Agropecuario. 195p.
- 37) Moorby, J.M, Evans, R.T, Scollan, N.D, MacRae, J.C., Theodorou, M.K. (2006). Increased concentration of water-soluble carbohydrate in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Evaluation in dairy cows in early lactation. *Grass and Forage Science* 61: 52-59.
- 38) Orr, R.J, Penning, P.D, Harvey, A, Champion R.A. (1997). Diurnal Patterns of intake rate by sheep grazing monocultures of ryegrass or white clover. *Animal Behaviour Science* 52: 65-77
- 39) Ørskov, E.R y Mc Donald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 92: 499-503.
- 40) Owens, V.N. Albrecht, K.A., Muck, R., Duke, S.H. (1999). Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total nonstructural carbohydrates. *Crop Science* 39: 1873-1880.
- 41) Pell, A, Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science* 76: 1063-73.
- 42) Posada, S.L y Noguera R.R. (2007). Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 20: 141-148.
- 43) Rearte, D.H, Santini, F.J. (1989). Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Revista Argentina de Producción Animal* 9: 93-105.
- 44) Reis, R, Melo, G, Bertipaglia, L, Oliveira, A. (2005). Otimização da utilização da forragem disponível através da suplementação estratégica. En: Reis, R, Ciqueira, G, Oliveira, A, Melo, G, Bernandes, T. *Volumosos na produção de ruminantes*. Jaboticabal. Ed: Funep, p. 187-238.
- 45) Repetto, J.L, Britos, A, Errandonea, N, Cozzolino, D, Cajarville, C. (2006). Effect of harvest schedule and plant part on in vitro gas production of temperate forages. *Journal of Animal Science* 84 (1): 102 / *Journal of Dairy Science* 89 (1): 102. (Abstract).

- 46) Repetto, J.L, Cajarville, C, D'Alessandro, J, Curbelo, A, Soto, C, Garín D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixture. *Animal Research* 54: 1-8.
- 47) Repetto, J.L, Britos, A, Cozzolino, D, Errandonea, N, Cajarville, C. (2003). Nutritive value of lucern and fescue during autumn I: Relationship between soluble carbohydrates and nitrogen contents throughout the day. Proceedings of the IX World Conference on Animal Production, Porto Alegre, Brasil, p. 26.
- 48) Robertson, J.B y Van Soest, P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. En: James, W.P y Theander, O. The analysis of dietary fiber in foods. New York. Ed: Marcel Dekker. p.123-158.
- 49) Sánchez, D, Arreaza, L, Abadía, B. (2005). Estudio de la cinética de degradación in Vitro de cuatro forrajes tropicales y una leguminosa de clima templado. *Corpoica* 6: 58-68.
- 50) Sauvant, D, Grenet, E, Michalet-Doreau, B. (1995). Dégradation chimique des aliments dans le réticulo-rumen: cinétique et importance. En: Jarrige, R, Ruckebush, Y, Demarquilly, C, Farce, M.H, Journet, M. Nutrition des ruminants domestiques. Paris. Ed. INRA. p. 383-406.
- 51) Schofield, P, Pell, A. (1995). Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate of legumes and grasses. *Journal of Animal Science* 73: 3455-3463.
- 52) Schofield, P, Pitt, R.E, Pell, A.N. (1994). Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science* 72: 2980-2991.
- 53) Smith, D. (1973). The non-structural carbohydrates. En: Butler, G.W and Bailey, R.W. Chemistry and Biochemistry of herbage. New Cork. Ed: Academic Press. p. 105-155.
- 54) Starr, C, Taggart, R. (2004). ¿Cómo obtienen energía las células? En: Starr, C, Taggart, R. La unidad y diversidad de la vida. 10ª. ed. International Thompson, México. p 2-20.
- 55) Taweel, H.Z, Tas, B.M, Smith, H.J, Elgersma, A, Dijkstra, J, Tamminga, S. (2006). Grazing behaviour, intake, rumen function and milk production of dairy cows offered *Lolium perenne* containing different levels of water soluble carbohydrates. *Livestock Science* 102: 33-41.
- 56) Taweel, H.Z, Tas, B.M, Smith, H.J, Elgersma, A, Dijkstra, J, Tamminga S. (2005). Effects of feeding perennial ryegrass with an elevated concentration of water-soluble carbohydrates on intake, rumen function and performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 121: 243-256.
- 57) Theodorou, M.K, Davies, D, Nielsen, B, Lawrance, M, Trinci, A. (1995). Determination of growth of anaerobic fungi on soluble and cellulose substrate using a pressure transducer. *Journal of General Microbiology* 141: 671-678.

- 58)Theodorou, M.K, Williams, B.A, Dhanoa, M.S, Mc Allan, 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: 185-197.
- 59)Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, (2000). Censo General Agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DIEA/CENSOVOL2/indice.htm>. (Fecha de consulta: 05/03/2009).
- 60)Van Soest, P.J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. New York. 2a. ed. Cornell University. 476 p.
- 61)Williams, B, Bosch, M, Boer, H, Verstegen, M, Tamminga S. (2005). An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology* 123–124: 445–462.
- 62)Yemm, E.W, Willis, A.J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry Journal* 57: 508-514.