



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**DIVISIÓN DEL TIEMPO DE PASTOREO, SEGADO DE LA  
PASTURA Y OREO DEL FORRAJE DE ALFALFA EN LA DIETA  
DE VACAS LECHERAS**

**Alvaro Santana Fernández**

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY  
2023**

**ESTA HOJA VA EN BLANCO**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**DIVISIÓN DEL TIEMPO DE PASTOREO, SEGADO DE LA  
PASTURA Y OREO DEL FORRAJE DE ALFALFA EN LA DIETA  
DE VACAS LECHERAS**

**Alvaro Santana Fernández**

---

**José Luis Repetto, Prof. PhD.**  
**Director de Tesis**

---

**Cecilia Cajarville, Prof. PhD.**  
**Co-directora de Tesis**

**2023**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Ronaldo Vibart; Dr, MS, PhD  
Farm Systems and Environment  
AgResearch, Nueva Zelanda**

**Henrique Mendonca Nunes Ribeiro Filho; Zoot, MS, PhD  
Departamento de produção animale e alimentos  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Brasil**

**Fernando Alfredo Lattanzi; Ing.Agr, MS, PhD  
Programa de Investigación en Pasturas y Forrajes  
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay**



### ACTA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACION: PRODUCCION ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: IPAV, Fvet, 8/5/2023

TRIBUNAL: Ronaldo Vibart, Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho, Fernando Alfredo Lattanzi

CI	NOMBRE	GALIFICACIÓN	NOTA
43b8034 - 4	SAN IANA FERNANDEZ, ALVARO	APROBADO (Excelente)	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

División del tiempo de pastoreo, segado de la pastura y oreo del forraje de alfalfa en la dieta de vacas lecheras

El trabajo de tesis, la presentación y la defensa fueron de altísimo nivel.

#### TRIBUNAL

Ronaldo Vibart

Henrique Mendonça Nunes Ribeiro Filho

Fernando Alfredo Lattanzi

#### FIRMA

Fernando  
2023-05-08  
202027-0108

## DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo y quiero agradecer a las personas o al decir de *Eduardo Galeano* “los fueguitos” que en sus diferentes formas alumbraron y calentaron mi vida.

A Ofelia y Leonel mis padres, dos inmensa hogueras que me encendieron agradecerles por haberme enseñado la cosa más importante de la vida y haberme dejado el tesoro de saber amar y ser amado.

A mis hijas Sofía y Agustina, agradecerles por calentar mi espíritu y pedirles disculpas por el tiempo que no estuve con ellas, pero quiero decirles que las llevo y están conmigo todo el tiempo.

A mi hermana Xaviera y hermanos Diego "el enano", Daniel "Cachu", Darío "el pelado" y Andrés “pancho”, les quiero agradecer por enseñarme las luces y las sombras de mi ser, por prestarme su propia llama cuando la mía es débil y mostrarme que solamente cuando los fuegos se juntan es posible iluminar el mundo y atravesar las noches.

A Marisa por haber iluminado en las noches más oscuras de escritura, y de a poco... con cuidado... brindándome su calor me ha permitido brillar o lo que es lo mismo reflejar su brillo cuando está a mi lado.

A mis tutores José Luis y Cecilia quienes iluminaron mi camino, decirles que no solo atizaron mi fuego siendo su estudiante, sino que además encontré en ellos dos fuegos que a su manera me abrigaron del frío y me alumbraron en momentos oscuros.

A mis estudiantes, los fuegos que he atizado, Eliana Ciancio, Eduardo Morales, Matías Abram, Micaela García, así como al resto de mis tesistas y también a Ricardo Biasiolo y Juan Dayuto, sin los cuales este trabajo no existiría. Compartir su alegre luz, intentando mejorar el brillo y el calor de nuestros fuegos, es sin duda el principal incentivo que encontrado en mi labor.

A Sebastián Brambillasca, Caro Fiol, Gonzalo Fernández, Eduardo Morales, Germán Antúnez, Analía Pérez, Ale Britos, Francisco Diéguez, Santiago Monteverde, Javier Román; los fuegos que alumbran y templan mis horas de trabajo en los experimentos, los análisis de laboratorio, la discusión de los datos y la redacción de los manuscritos y está propia tesis, gracias de verdad muchas gracias. A Walter y Yanella, Gustavo, Federico, Damián, Elena y Maxi agradecerles el tiempo que me dedicaron.

“Si planificas para un año, siembra trigo; si planificas para una década, planta árboles; si planificas para una vida, educa personas”.

Kwan Tzu, 300 a.c.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b> .....	<b>17</b>
División del tiempo diario de acceso al pastoreo .....	17
Segado de la pastura .....	18
Oreo del forraje pre pastoreo .....	20
Influencia del tipo de pastura sobre los procesos digestivos, y relevancia del cultivo de alfalfa .....	22
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>25</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>28</b>
Aspectos comunes a los tres experimentos .....	28
<b>EXPERIMENTO I (Publicación 1)</b> .....	<b>29</b>
Materiales y métodos.....	29
Animales, Diseño Experimental y Tratamientos .....	29
Consumo y digestibilidad aparente de la MS y los nutrientes.....	32
Comportamiento alimenticio .....	33
Fermentación ruminal.....	33
Flujo de nitrógeno microbiano al duodeno.....	34
Producción, composición y perfil lipídico de leche .....	34
Cálculo del BE y BN .....	35
Análisis químicos .....	36
Análisis estadístico .....	36
Resultados.....	37
Ingesta y digestión de nutrientes en el tracto digestivo y BE.....	37
Comportamiento alimenticio .....	38
Fermentación ruminal.....	41
Flujo de N microbiano y BN .....	44
Producción, composición y perfil de ácidos grasos de leche .....	45
<b>EXPERIMENTOS II y III (Publicación 2)</b> .....	<b>48</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>48</b>
Animales, Diseño Experimental y Tratamientos .....	48
Manejo de la alimentación.....	49
Consumo.....	51
Digestibilidad aparente .....	51
Comportamiento alimenticio .....	51
Tasa de pasaje.....	52
Producción y composición de leche (Experimento II- Vacas lecheras) .....	52
Fermentación ruminal (Experimento III – Vacas secas canuladas) .....	52
Contenido y tamaño de las partículas del rumen (Experimento III – Vacas secas canuladas) .....	53
Análisis químicos .....	53
Cálculo del BE y BN .....	54
Análisis estadístico .....	54
Resultados Experimento II.....	55

Comportamiento alimenticio .....	55
Consumo, digestibilidad, consumo de nutrientes digestibles y tasa de pasaje ...	55
Producción y composición de la leche .....	57
Balance de energía y BN .....	57
Resultados Experimento III.....	59
Comportamiento alimenticio, consumo y digestibilidad de los nutrientes.....	59
Fermentación en rumen .....	60
Contenido, tamaño de las partículas ruminales y tasa de pasaje por el tracto digestivo .....	60
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
Discusión Experimento I.....	62
Discusión Experimentos II.....	65
Discusión Experimento III.....	69
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>71</b>
Conclusión Experimento I.....	71
Conclusión Experimentos II y III.....	71
<b>IMPLICANCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro I.</b> Ingredientes y composición de nutrientes de la ración totalmente mezclada (RTM), la pastura de Alfalfa y los ingredientes utilizados en la RTM - Experimento I.....	25
<b>Cuadro II.</b> Consumo, digestibilidad aparente y balance energético – Experimento I.....	31
<b>Cuadro III.</b> Comportamiento alimenticio durante todo el día y únicamente en las horas de pastoreo – Experimento I.....	33
<b>Cuadro IV.</b> Fermentación en rumen – Experimento I.....	35
<b>Cuadro V.</b> Flujo de N microbiano al duodeno – Experimento I.....	38
<b>Cuadro VI.</b> Consumo, digestibilidad y balance de N – Experimento I.....	39
<b>Cuadro VII.</b> Producción y composición de la leche – Experimento I.....	40
<b>Cuadro VII.</b> Perfil de ácidos grasos de la leche – Experimento I.....	40
<b>Cuadro IX.</b> Proporción de ingredientes y composición química de la RTM parcial (pRTM), la pastura, el forraje fresco segado y el forraje oreado durante 24 h – Experimento II.....	44
<b>Cuadro X.</b> Comportamientos expresados como proporción del total de observaciones – Experimento II.....	49
<b>Cuadro XI.</b> Consumo y digestibilidad de los nutrientes, consumo de nutrientes digestibles y tasa de pasaje de las partículas de forraje – Experimento II.....	50
<b>Cuadro XII.</b> Producción y composición de la leche – Experimento II.....	51
<b>Cuadro XIII.</b> Balance de Energía y N – Experimento II.....	52
<b>Cuadro XIV.</b> Comportamiento alimenticio, consumo y digestibilidad de los nutrientes – Experimento III.....	53
<b>Cuadro XV.</b> Fermentación en rumen – Experimento III.....	54
<b>Cuadro XVI.</b> Contenido y distribución del tamaño de las partículas en el rumen, y tasa de pasaje de las partículas de forraje por el tracto digestivo – Experimento III.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del área utilizada para los experimentos.....	23
<b>Figura 2.</b> Proporción de comportamiento alimenticio del total de observaciones en vacas lecheras alimentadas exclusivamente con RTM (T0) o combinada con ocho horas de acceso al pastoreo de alfalfa en una (T8) o dos (T4+4) sesiones de pastoreo. Figuras A (comiendo) y B (rumiando) análisis de las observaciones durante 19h por día; Figuras C (comiendo) y D (rumiando) observaciones durante las horas de pastoreo. En cada hora, se indica con un asterisco (*) al menos una diferencia entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras de error representan EEM. Las barras solidas y sin relleno indican el período en que T4+4 y T8 tuvieron acceso al pastoreo de alfalfa, respectivamente. Las flechas sin relleno y solidas indican el momento de suministro de RTM en T0 o de pRTM en T8 y T4+4, respectivamente.....	34
<b>Figura 3.</b> pH ruminal (A) y concentraciones de N-amoniaco ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ; B) de vacas lecheras alimentadas exclusivamente con RTM (T0) o combinada con acceso de ocho horas a pastoreo de alfalfa en una (T8) o dos (T4 +4) sesiones de pastoreo. En cada hora, se indica con un asterisco (*) al menos una diferencia entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras de error representan EEM. Las barras sólidas y sin relleno indican el período en que T4+4 y T8 tuvieron acceso al pastoreo de alfalfa, respectivamente. Las flechas sin relleno y solidas indican el momento de suministro de RTM en T0 o de pRTM en T8 y T4+4, respectivamente.....	36
<b>Figura 4.</b> Ácido butírico como proporción molar del total de AGV (A) y concentración de ácido láctico (B) en el rumen de vacas lecheras exclusivamente con RTM (T0) o combinada con acceso de ocho horas a pastoreo de alfalfa en una (T8) o dos (T4 +4) sesiones de pastoreo. Las barras sólidas y sin relleno indican el período en que T4+4 y T8 tuvieron acceso al pastoreo de alfalfa, respectivamente.....	37

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue estudiar como la división del horario de pastoreo, el segado de la pastura y el oreo del forraje alfalfa afectan la performance productiva, el comportamiento alimenticio y los procesos digestivos en vacas lecheras alimentadas con dietas combinadas durante la lactancia tardía. Para ello se llevaron a cabo 3 experimentos. En el Experimento 1, se evaluaron 3 tratamientos: ración totalmente mezclada (RTM) *ad libitum* (T0), RTM parcial (pRTM, ofrecida al 60% del consumo *ad libitum*) más 8 h de pastoreo de alfalfa una vez al día (T8), o pRTM mas dos sesiones de 4 h de pastoreo de alfalfa al día (T4+4). El experimento se realizó con 12 vacas Holstein (vaca = unidad experimental; peso vivo [PV] =  $584 \pm 71$  kg; días en leche [DEL] =  $193 \pm 83$  d) todas equipadas con un catéter ruminal y con collares para registrar el tiempo de rumia, que se asignaron a una secuencia de tratamientos según un diseño experimental de cuadrado latino 3 x 3 replicado 4 veces. No se observaron diferencias entre los tratamientos para ninguna de las variables productivas, la eficiencia alimenticia (EA) ni excreción de derivados de purina. En T0 las vacas tuvieron mayor consumo y digestibilidad aparente de la materia seca (MS), materia orgánica (MO) y carbohidratos no fibrosos en comparación con T4+4 y T8. En comparación con T0, el pastoreo de alfalfa aumentó la concentración de C18:1 trans-11 y disminuyó las de C16:0 y C17:0 en la grasa de la leche. Las vacas en T4+4 consumieron 1.1 kg más de MS/d de alfalfa y el N proporcionado por la alfalfa en la dieta fue mayor en comparación con las vacas T8 (266 vs 229 g/d, respectivamente). Además, el rango diario de pH ruminal fue mayor en T4+4 que en T8 (0.73 vs 0.93), y las concentraciones más altas de NH<sub>3</sub>-N se registraron durante la sesión de pastoreo de la mañana en T4+4 mientras que en T8 ocurrió durante la noche. En conclusión, cuando las vacas tuvieron acceso al pastoreo de alfalfa durante 8 h, la pastura represento el 38,7% del consumo de MS (CMS) total, tuvieron 10% menos CMS total y una menor digestibilidad de nutrientes en comparación a cuando consumieron solo RTM *ad libitum*. La producción de sólidos lácteos y la EA fueron similares en todos los tratamientos, pero la concentración de C18:1 trans-11 de la grasa láctea fue mayor cuando las vacas consumieron pastura más pRTM. Dividir 1 sesión de 8h de acceso al pastoreo de alfalfa en 2 sesiones de 4 h aumento un 16% la proporción de energía y N aportados por la pastura en la dieta, pero se mantuvo la ingesta total de nutrientes y la producción de leche. Teniendo en cuenta la mayor mano de obra y el tiempo dedicado a una sesión de pastoreo duplicado, este manejo no se justifica en las condiciones del presente experimento. Los experimentos II y III se realizaron simultáneamente. La rutina de alimentación fue igual para todos los tratamientos, consistió en 5h de acceso a pRTM (ofrecida al 30% del consumo *ad libitum*) más 17h de acceso a una parcela de alfalfa con una asignación de 18 kg de MS por encima de 5 cm / vaca por día. Los tratamientos consistieron en cómo la pastura o el forraje se presentó a las vacas: 1) pastoreo directo de la pastura (PAS), 2) forraje fresco (FF) segado inmediatamente antes del acceso de las vacas a la parcela (SEG) o 3) forraje oreado al sol durante 24h (ORE) antes del acceso de las vacas a la parcela. En el Experimento II, se utilizaron nueve vacas Holstein (PV =  $641 \pm 44$  kg, DEL de  $232 \pm 48$  d) en un diseño experimental de cuadrado latino 3 x 3 replicado 3 veces. El Experimento III, se realizó con tres vacas secas (PV =  $682 \pm 18$  kg) equipadas con cánula ruminal con un diseño experimental de cuadrado latino de 3 x 3. En el Experimento II, el tratamiento ORE presento una menor proporción de observaciones comiendo, aumento el CMS de alfalfa y de todos los nutrientes respecto a SEG y PAS. El tiempo medio de retención en el tracto posterior de las partículas de forraje fue mayor en ORE respecto a PAS. La digestibilidad aparente

de la MS disminuyó y tendió a disminuir la de MO y el N en ORE respecto a PAS. El consumo de MO y de N digestible fue mayor en ORE comparado a PAS y SEG. A excepción de la producción de grasa que no difirió entre tratamientos, todas las variables productivas, la EA y la eficiencia de uso de energía y N para producción de leche disminuyeron en ORE respecto a PAS y SEG. En el Experimento III, la proporción en el rumen de partículas de forraje mayores a 4,75 mm fue menor en PAS comparado a SEG y ORE. No encontrándose diferencia entre los tratamientos para ninguna de las demás variables estudiadas. En conclusión ofrecer el forraje oreado aumentó el CMS de alfalfa respecto al pastoreo o al FF segado. Sin embargo disminuyó la producción de leche, la producción de proteína, la EA y la eficiencia de uso del N, comparado al pastoreo o el FF segado. Suministrar el FF segado no afectó el desempeño productivo, ni la EA comparado al pastoreo. La disminución del rendimiento productivo al suministrar el forraje oreado, no se debió a un menor consumo de nutrientes digestibles, ni modificaciones de la cinética de pasaje de las partículas de forraje por el tracto digestivo o el comportamiento alimenticio. Son necesarios más estudios para comprender la disminución en la eficiencia de uso de los nutrientes para la producción de leche con el forraje oreado.

## SUMMARY

The objective of this thesis was to study how division of grazing time, pre-graze mowing and forage wilted of alfalfa affect the productive performance, feeding behavior and digestive processes of dairy cows fed combined diets during late lactation. For this, 3 experiments were carried out. In Experiment 1, 3 treatments were evaluated: total mixed ration (TMR) *ad libitum* (**T0**), partial TMR (pTMR, offered at 60% *ad libitum* intake) plus 8 h of alfalfa grazing once a day (**T8**), or pTMR plus two 4-h alfalfa grazing sessions per day (**T4+4**). The experiment was carried out with 12 Holstein cows (cow = experimental unit; live weight [LW] =  $584 \pm 71$  kg; days in milk [DIM] =  $193 \pm 83$  d) all equipped with a rumen catheter and collars to record rumination time, which were assigned to treatments sequence according four 3 x 3 Latin square experimental design. No differences were observed between treatments for any productive variables, feed efficiency (FE) or purine derivatives excretion. Cows in T0 had higher consumption and apparent digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM) and non-fibrous carbohydrates compared to T4+4 and T8. Compared to T0, alfalfa grazing increased the concentration of C18:1 trans-11 and decreased those of C16:0 and C17:0 in milk fat. Cows in T4+4 intake 1.1 kg more DM/d of alfalfa and diet N provided by alfalfa was higher compared to T8 cows (266 vs 229 g/d, respectively). In addition, ruminal pH daily range was higher in T4+4 than T8 (0.73 vs 0.93), and highest NH<sub>3</sub>-N concentrations were recorded during the morning grazing session in T4+4 while in T8 it occurred overnight. In conclusion, when cows had access to alfalfa grazing for 8 h, the pasture represented 38.7% of the total DM intake (DMI), they had 10% less total DMI and lower nutrient digestibility compared to when they consumed only TMR *ad libitum*. Milk solids production and FE were similar in all treatments, but the C18:1 trans-11 concentration of milk fat was higher when cows ate pasture plus pTMR. Dividing one 8-h session alfalfa grazing into two 4-h sessions increased 16% of energy and N provide from pasture in the diet, but the total nutrient intake and milk production were maintained. Taking into account the greater labor force and the time devoted to a double grazing session, this management is not justified under the conditions of the present experiment. Experiments II and III were performed simultaneously. The feeding management was the same for all treatments; it consisted of 5h of access to pTMR (offered at 30% of *ad libitum* intake) plus 17h access to a plot with 18 kg alfalfa DM (above 5 cm) allocation per cow per day. The treatments consisted of how was presented to cows the pasture or forage: 1) direct grazing of the pasture (**PAS**), 2) fresh forage (FF) mowed immediately before of the cows access to plot (**SEG**) or 3 ) forage sun wilted for 24h (**ORE**) before cows access to the plot. In Experiment II, 9 Holstein cows (LW =  $641 \pm 44$  kg, DIM of  $232 \pm 48$  d) were assigned to the treatments according to a three 3 x 3 Latin squares design. Experiment III was carried out with 3 dry cows (LW =  $682 \pm 18$  kg) equipped with rumen cannula in a 3 x 3 Latin square experimental design. In Experiment II, ORE treatment presented a lower proportion of observations eating, increase alfalfa DMI and all nutrients intake, compared to SEG and PAS. Posterior tract mean retention time of forage particles was higher in ORE compared to PAS. Apparent DM and OM digestibility decreased and tended to decrease

for N in ORE respect to PAS. Digestible OM and N intake was higher in ORE respect to PAS and SEG. With milk fat exception that did not differ between treatments, in ORE decreased all productive variables, FE and efficiency use of the energy and N for milk production, respect to PAS and SEG. In Experiment III, forage particles larger than 4.75 mm proportion in the rumen was lower in PAS compared to SEG and ORE. No difference between treatments was found for any other studied variables. In conclusion, provide wilted forage increased alfalfa DMI, total DMI and nutrient intake, however decreased milk production, milk protein yield, FE and N use efficiency, compared to grazing or mowed FF. The productive performance decrease when wilted forage was provide not due to a lower digestible nutrients intake, nor to changes in passage kinetics of forage particles through digestive tract or feeding behavior. Supplying the mowed FF did not affect the productive performance, nor the FE compared to alfalfa grazing. To understand of decrease in efficiency nutrient use for milk production when wilted forage was provided more studies are needed.

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas de alimentación utilizados para vacas lecheras son muchos y muy diferentes entre regiones, países y dentro de cada país (FAO, 2014). Las dietas para vacas lecheras donde todos los componentes se mezclan y ofrecen juntos se denominan ración totalmente mezclada (**RTM**) y permiten controlar con precisión el suministro de nutrientes, maximizar el consumo de materia seca (**CMS**) y la producción de leche (Schingoethe, 2017). Por otro lado, cuando un componente de la dieta se suministra en forma separada (i.e. reservas de forrajes, forrajes frescos (**FF**) o suplementos concentrados) y el resto de los alimentos se mezclan y ofrecen en conjunto se les denomina RTM parcial (**pRTM**). El desarrollo de sistemas de alimentación para vacas lecheras que sean económicamente rentables, eficientes en el uso de los nutrientes y ambientalmente sustentables, ha dado lugar a dietas que combinan el pastoreo o FF con el suministro de una **pRTM** (“**dieta combinada**”, de aquí en adelante), tanto a nivel nacional como internacional. Este tipo de dietas puede contribuir a disminuir los costos de alimentación (Soriano et al. 2001; Tozer et al. 2003), mejorar el perfil lipídico lácteo para el consumo humano (Chaudhry, 2008) y la percepción de los consumidores sobre el sistemas de producción comparado a sistemas RTM (Joubran et al. 2021).

El incremento de la cosecha de forraje producido en el propio establecimiento es la estrategia de intensificación que resulta en un mejor resultado productivo y económico en los sistemas pastoriles a nivel internacional (Stirling, et al., 2021). Particularmente en Uruguay la utilización del forraje producido por las pasturas podría duplicarse a través de un aumento de la carga animal y mejorando el manejo del pastoreo, implicando un incremento en la producción de leche sin perder competitividad en el mercado internacional. Del forraje producido (12 ton de MS/ha/año) la utilización mediante el pastoreo directo y la cosecha mecánica en los tambos Uruguayos se estima que es menos de la mitad (5,3 ton de MS/ha) (Fariña et al., 2021). Se ha propuesto que la utilización de forraje se encuentra limitado por el diseño y manejo del pastoreo, más que por el clima o condiciones del suelo (Fariña y Chilbroste, 2019; Stirling, et al., 2021). En este contexto, estrategias como restringir el tiempo diario de pastoreo y priorizar las sesiones de pastoreo durante la tarde, han demostrado ser efectivas para mejorar la utilización de la pastura y su aporte de nutrientes a la dieta. Otra práctica proveniente de una época en que la dieta era predominantemente pastoril, es llevar las vacas al pastoreo 2 veces al día, esta estrategia, actualmente en sistemas que el consumo de forrajes pastoreados es solo una parte de la dieta, ¿contribuye mejorar el aporte de nutrientes de la pastura en la dieta?. Por otro lado, en el pastoreo de alfalfa, una práctica comúnmente utilizada para evitar el timpanismo (o meteorismo) es ofrecer la pastura segada (con o sin oreo), sin embargo esta estrategia no se utiliza con el objetivo de aumentar el consumo de pastura o su aporte de nutrientes a la dieta, debido en parte a la escasa información sobre su efecto en la producción y digestión de las vacas lecheras.

El consumo de alimento, generalmente expresado como kg de materia seca (MS) o materia orgánica (MO) consumida por día es (en forma individual) el principal factor

que determina la performance productiva de vacas lecheras (Roche et al. 2008). Existe una estrecha relación positiva entre la performance productiva de un animal y la MO digestible ingerida (MODI) (Tucker et al., 2001). En vacas lecheras alimentadas con pasturas, la cantidad y las características de las fracciones fibrosas, así como un elevado contenido de humedad son factores que limitan el consumo de nutrientes. A medida que aumenta el contenido de humedad en la pastura disminuye el contenido de nutrientes ingerido por bocado y la tasa de consumo (kg/h) que las vacas logran alcanzar (Dillon, 2006). Se ha propuesto que en pasturas con menos de 18% de MS, por cada 4 puntos porcentuales que disminuye el % de MS, el CMS se reduce en 1 kg (Vérité et al., 1970), por lo cual el oreo puede contribuir a aumentar el CMS. Además, considerando que existe un límite máximo de tiempo (próximo a 16 h/d) y movimientos mandibulares (próximo a 70 mil movimientos/d) que las vacas pueden desarrollar en 24h y deben distribuir entre comer y rumiar (Beauchemin, 1991; Beauchemin, 2018). La necesidad de rumiar la pastura (para liberar el agua intracelular y reducir el tamaño de las partículas) limita el tiempo y movimientos mandibulares utilizados para comer (Chilibroste, 1997, Cabrera Estrada et al., 2004). Galli et al. (2018) sugirieron que al pastorear la tasa de movimientos mandibulares es constante (57 movimientos/min) y las vacas regulan la tasa de consumo modificando la proporción de movimientos empleados para morder, masticar o masticar y morder simultáneamente, en función de la facilidad de prensión, de fractura (relación FDN/FDA) y deglución de la pastura ofrecida. Entonces, los cambios físicos y químicos provocados por el segado pre pastoreo o el oreo del forraje, pueden afectar el comportamiento alimenticio y los procesos digestivos de las vacas. En este sentido, el aumento del contenido de fibra o la disminución de la digestibilidad del forraje, puede enlentecer la tasa de pasaje (Allen et al. 2019), aumentar la distensión del retículo – rumen y limitar el consumo de nutrientes (Allen, 1996; Allen, 2014).

El uso de dietas combinadas para alimentar vacas lecheras y la generación de conocimiento sobre sus efectos en la producción, el comportamiento alimenticio y la digestión de los nutrientes, ha avanzado sustancialmente en los últimos 20 años, desde los reportes de Bargo et al, (2002 a y b). El problema central radica en que al aumentar la proporción de pastura en la dieta, llega un punto (variable según las características del animal, la pastura y la pRTM) donde limita el consumo de nutrientes y la producción de leche. Debido a ello, el desarrollo de estrategias para lograr altas producciones de leche (> 25kg / d) con altas proporciones ( $\geq 40\%$  del CMS) de pastura en la dieta, continua siendo objeto de investigación y desarrollo tecnológico. Con el objetivo de aumentar los nutrientes aportados la pastura en dietas combinadas para vacas lecheras de alta producción tres estrategias fueron objeto de estudio en esta tesis. Concretamente se estudiaron los efectos de la división del tiempo diario de pastoreo, el segado y el oreo (secado al sol) del forraje, sobre la producción, el comportamiento alimenticio y la performance digestiva de vacas alimentadas con dietas combinadas y produciendo más de 25 kg de leche diarios en la lactancia tardía durante fines de primavera y comienzo del verano.

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En esta sesión se revisa la literatura disponible acerca de cómo: la división del tiempo diario de pastoreo, el suministro de pastura segada o de forraje oreado, afectan la producción, el comportamiento alimenticio y la performance digestiva de vacas lecheras. El objetivo fue identificar los aspectos biológicos modificados por estas tres prácticas (división del pastoreo, segado y oreo de la pastura) para mejorar el aporte de nutrientes del forraje en dietas combinadas y que lleva al planteamiento del problema y la formulación de las hipótesis de esta tesis. Por último, se revisa la relevancia del cultivo de alfalfa y la influencia del tipo de pastura en los procesos digestivos de vacas lecheras.

### División del tiempo diario de acceso al pastoreo

El método de pastoreo comprende cómo, cuándo, qué y cuánto pastan los animales. Cuando se utiliza el pastoreo en franja diaria, esto implica definir el tiempo diario total, el número sesiones o turnos de acceso, la duración y el momento del día en que se realiza cada sesión de pastoreo (Allen et al. 2011). Subdividir en dos sesiones una cantidad igual de h/d de acceso al pastoreo puede afectar la performance productiva, debido a cambios del comportamiento alimenticio que modifiquen el consumo de nutrientes y/o la eficiencia de uso de los nutrientes, como consecuencia de los patrones de entrada de los sustratos al rumen. Para el pastoreo en franjas diarias existe información sobre el efecto la cantidad de h totales de acceso al pastoreo, la ubicación de iguales cantidades h en diferentes momentos del día (i.e. AM vs PM, Pulido et al. 2015; Pozo et al. 2022) o la frecuencia de asignación de una nueva porción de pastura pero con el mismo régimen de pastoreo (i.e. 1 vs 6, Dalley et al. 2001).

De los reportes específicos sobre el efecto de subdividir en diferente cantidad de sesiones un mismo tiempo diario de pastoreo, la mayoría utilizan la pastura como único alimento (Gregorini et al. 2009 y Clark et al. 2010), o bajos niveles de suplementación con concentrados durante el ordeño (Kennedy et al. 2009; Pérez-Ramírez et al. 2009; Abrahamse, 2009) y solamente un reporte estudia la división del tiempo de acceso al pastoreo en una dieta combinada (Dall-Orsoletta et al. 2016). La división del tiempo diario total en más de una sesión de pastoreo se ha reportado como un estímulo para modular el comportamiento de pastoreo y aumentar el consumo de pastura (Gregorini et al. 2012). La división de 8h de pastoreo en dos sesiones de 4h aumentó la proporción del tiempo efectivamente dedicado a comer y la tasa de bocados en dietas exclusivamente pastoriles (Gregorini et al. 2009). Sin embargo, los resultados de la división del tiempo de pastoreo sobre el CMS son contradictorios. Algunos trabajos reportan que el fraccionamiento del pastoreo aumento el CMS de pastura (Dall-Orsoletta et al. 2016), mientras que en otros el CMS de pastura fue similar al fraccionar o no el tiempo total de pastoreo (Gregorini et al. 2009). Por último en dietas combinadas para vacas lecheras modificar los momentos de acceso al pastoreo puede implicar cambios en el acceso a la pRTM, modificando los patrones de ingreso de sustratos al rumen. Estos cambios podrían resultar en efectos sincrónicos (Cabrita et al. 2006) y

asincrónicos (Reynolds y Kristensen, 2008) entre nutrientes para la síntesis de proteínas microbianas, modificando el metabolismo de N o la eficiencia alimenticia (**EA** = kg MS consumido / kg de leche corregida al 3,5% de grasa (**3,5%LCG**)).

#### Segado de la pastura

El segado de la pastura implica para las vacas lecheras disminuir su capacidad de selección (entre plantas y partes de una misma planta), la ingestión de partículas de mayor tamaño y la disminución del costo energético asociado al pastoreo (Dougherty et al. 1989; Dohme-Meier et al. 2014). En términos generales cuanto más homogénea (en especies, estados fenológicos, etc) y óptimo para el consumo el estado fenológico de la pastura segada, menor será el impacto de disminuir la capacidad de selección de las vacas. *En esta tesis se utilizó una pastura de alfalfa de alta calidad en monocultivo*, por lo tanto para entender las respuestas productiva y digestiva al segado de la pastura, es relevante el estudio del tamaño de las partículas y su tasa de pasaje por el tracto digestivo. Revisiones analíticas y específicas sobre el flujo de la digesta (Faichney, 2005), la dinámica de las partículas (Kennedy, 2005) y la relación de las características de la pastura con la performance animal (Chilibroste et al., 2005), han sido realizadas por estos autores. Además, recopilaciones sistemáticas de datos experimentales sobre la tasa de pasaje y los factores que influyen sobre la misma, han sido publicadas para bovinos (Sao et al., 2006) y específicamente en vacas lecheras (Krizsan et al., 2010). En esta sesión se presentan los principales dogmas sobre la relación entre el CMS, el tamaño de las partículas de forraje y su tasa de pasaje, así como los reportes específicos sobre el segado de pasturas en vacas lecheras.

#### *Efectos sobre el consumo, la producción de leche y el costo energético del pastoreo*

El efecto del segado de pastura sin oreo sobre la producción de vacas lecheras se ha estudiado en dietas únicamente pastoriles (Greenhalgh y Runcie, 1962; Bryant et al. 2016; Boudon et al. 2009) o suplementando entre 3.0 y 6.5 kg de MS/d de granos de cereales (Dohme-Meier et al. 2014; Mohammed et al. 2009; Kaufmann et al. 2011). No se encontraron reportes sobre el efecto del segado pre pastoreo en vacas lecheras alimentadas con dietas combinadas. Los resultados de segar la pastura sobre el CMS y la producción de leche difieren entre los reportes. Se ha comunicado el aumento de ambas variables (Boudon et al. 2009), aumento del consumo sin cambios a producción (Dohme-Meier et al. 2014), ausencia de efectos (Kaufmann et al. 2011), igual CMS pero menor producción (Mohammed et al. 2009) y la disminución de ambas variables (Bryant et al. 2016). Estas diferencias obedecen a las condiciones experimentales de cada reporte, como el nivel de requerimientos (o producción, o CMS) de las vacas, la proporción de forraje en la dieta (o nivel de suplementación) y la asignación de pastura (kg MS/animal/d) en el tratamiento a pastoreo.

En vacas alimentadas únicamente con raigrás (*Lolium perenne*) Boudon et al. (2009) reportó un incremento del CMS (18.6 vs 17.7 kg MS/d) y la producción (28.6 vs 26.5 l/d de LCG 4%). Estos autores atribuyen el incremento de consumo a episodios más cortos y más frecuentes de ingestión y rumia, como consecuencia de la oferta del FF

segado en 8 veces al día. Por otro lado Greenhalgh y Runicie (1962) utilizando vacas con producciones de leche de 14.5 l/d, comparo el pastoreo o suministrar FF segado de dactilis (*Dactylis glomerata*), ofrecido *ad libitum* y no encontraron diferencias en el CMS (12 kg MS/d), la digestibilidad del forraje, ni la producción de leche. Resultados similares reportaron Kaufmann et al. (2011) quienes no encontraron diferencias en el CMS total, ni la producción de leche entre el pastoreo o el FF segado. Kaufmann et al. (2011) trabajaron con vacas en inicio de lactancia (38 días de lactancia (**DEL**)), de alta producción (40 l/d), suplementadas con un 6.4 kg de MS de concentrado y forraje de una pradera (raigrás, trébol blanco [*Trifolium repens*] y achicoria [*Cichorium intybus*]).

Por otro lado, Mohammed et al. (2009) utilizando vacas en lactación temprana, alimentadas con una pastura de raigrás perenne más concentrado (3 kg MS/d), no observaron diferencias en el CMS de pastura (17 kg MS/d), ni el CMS total, pero sí una menor producción de leche con el segado (20,1 l/d vs 24,6 l/d). Estos autores atribuyen el incremento de la producción de las vacas en pastoreo, a una mayor posibilidad de selección debido a la alta asignación diaria de pastura (20 kg de MS/d, sobre 4cm del suelo). Por su parte Dohme-Meier et al. (2014) en vacas de alta producción (36.5 kg leche/d promedio en la lactancia), suplantadas con un concentrado energético (5kg MS/d) y utilizando una pastura mezcla (raigrás y trébol blanco) con alta asignación (25.5 kg MS/d) pero durante un tiempo de acceso limitado (11h/d). Reportaron que el segado aumento el CMS total y de forraje (16,8 vs 18,9 kg MS/d) sin modificar la digestibilidad de la MO, pero la producción de leche no difirió. Los autores especulan que la movilización de reservas corporales permitió a las vacas en pastoreo mantener la producción. Por ultimo Bryant et al. (2016) utilizando vacas en lactancia tardía (212 DEL) alimentadas con una pastura mezcla (raigrás y trébol blanco) asignada a 15 kg de MS/d sobre los 3cm del suelo, reportaron que el segado redujo el CMS (15.7 vs 15.2 kg MS/d) y la producción de leche (13.1 vs 12.0 l/d) respecto al pastoreo. Los autores atribuyen este resultado a una menor asignación de pastura en el segado, aunque no especifican los valores.

El efecto del segado sobre el balance de energía (**BE**), se ha estudiado desde la perspectiva del costo energético asociado a la actividad física del traslado hasta la parcela y durante el pastoreo, comparado a vacas en estabulación (Dohme-Meier et al. 2014; Kaufmann et al. 2011). Los resultados sobre el consumo y la producción, así como las características de estos dos reportes, fueron detallados anteriormente en esta sección. A diferencia de los reportes donde el FF segado es trasladado y ofrecido en comedero (Boudon et al. 2009; Mohammed et al. 2009; Dohme-Meier et al. 2014; Kaufmann et al. 2011), en nuestro trabajo el FF segado se ofrece hilerado (o engavillado) en la parcela, por lo que el costo energético asociado al traslado es igual en todos los tratamientos. Si no se considera el traslado, el segado elimina únicamente la fuerza necesaria para cosechar “cortar” el forraje, lo que representa aproximadamente ¼ del gasto energético total que implica el pastoreo, ya que la masticación demanda tres veces más energía, dependiendo de la fragilidad de fractura (relación FDN/**FDA** (fibra detergente acido)) del forraje (Wright y Illius, 1995).

*Efecto sobre el comportamiento alimenticio, la fermentación ruminal, el tamaño de partículas de forraje y su tasa de pasaje por el tracto digestivo*

En relación al comportamiento alimenticio, en vacas consumiendo de 22 a 24 kg MS/d, de dietas con 20% a 30% de concentrado (en MS), y con acceso al forraje restringido a 11h/d (Dohme-Meier et al. 2014) o 19h/d (Kaufmann et al., 2011), el suministro de FF segado aumento el tiempo diario de rumia comparado al pastoreo. Sin embargo, Boudon et al, (2009) en vacas con menor CMS total (15 a 17 kg MS/d), sin suplementación y 24h de acceso al forraje, no encontró diferencias en el tiempo de rumia diario total, pero si en el patrón de distribución del tiempo de rumia. Estos autores reportaron un aumento de la rumia en h diurnas al suministrar el FF segado respecto a las vacas en pastoreo, las cuales concentraron la rumia durante la noche. El aumento del tiempo diario rumiando y los cambios en los patrones de rumian, repercuten en el ambiente ruminal. En ese sentido, Mohammed et al. (2009) reportaron un aumento del pH ruminal con el segado respecto al pastoreo, y especulan que el incremento del porcentaje de fibra detergente neutro (FDN) en el FF segado (45.4 vs 41.5) aumento el flujo de saliva.

El segado aumenta el tamaño de partícula del forraje ingerido respecto al pastoreo, más pronunciadamente cuanto mayor sea el desarrollo vertical de la pastura (Minnee et al., 2018). En dietas RTM se ha reportado que el aumento del tamaño de partícula del forraje entre 5 mm y 10 mm, provoca incrementos decrecientes en el tiempo de rumia, el flujo de saliva y la capacidad buffer del rumen (Allen, 1996). Sin embargo, en dietas RTM el tamaño de las partículas del forraje entre 2.0 mm y 32.0 mm (promedio 9.6 mm) no afecto el CMS, la digestibilidad o la producción, de vacas produciendo entre 23 y 49 kg de leche/d (promedio 35 kg de leche/d) (Tafaj et al., 2007).

La tasa de pasaje del alimento por el tracto digestivo es importante en los animales rumiantes ya que está relacionada con el consumo voluntario de alimento, el grado de digestión de la dieta, la cantidad de proteína que escapa a la degradación en el rumen, la eficiencia del crecimiento microbiano, la producción de metano y susceptibilidad de los animales al meteorismo (Okine et al., 1998). Zebeli et al. (2007) reporto que aumentar el tamaño de las partículas del forraje ingerido de 6 a 30 mm en dietas RTM con diferente proporción de forraje (80% o 40% de la MS), incrementa el tiempo de rumia independientemente del nivel de forraje, pero la tasa de pasaje se incrementó únicamente en la dieta con menor proporción de forraje.

Oreo del forraje pre pastoreo

Para maximizar el CMS en dietas RTM para vacas lecheras, el porcentaje de MS debe estar entre el 45% y 60%, dependiendo de los insumos y las características de los animales (Schingoethe, 2017). Ahora, cuando se suministran pasturas o FF el alto contenido de agua puede limitar el CMS, por lo tanto el oreo podría contribuir a aumentar el CMS. Pero simultáneamente se ha reportado que en el forraje oreado aumenta la proporción de fracciones fibrosas, se incrementa la fracción de proteína

soluble y disminuye la digestibilidad *in vitro* de la MS y FDN, respecto a la pastura (Wilkinson et al. 2003; Repetto et al. 2003; Repetto et al. 2011).

A los efectos de esta tesis *se considera como forraje oreado aquel que incremento en más de tres puntos porcentuales el contenido de MS respecto a la pastura en pie*. Los reportes en vacas lecheras comparando el pastoreo o el suministro del forraje oreado, se realizaron con dietas exclusivamente pastoriles (Kolver et al. 1999; Cun et al. 2017; Kingsbury, 2014) o suplementando 1.5 kg de MS/d de un concentrado energético (Irvine et al. 2010), en ellos se da cuenta del consumo de nutrientes y la producción de sólidos lácteos. Únicamente Kingsbury (2014) reporto además el comportamiento alimenticio y la excreción de N. De los trabajos revisados el oreo de forraje de alfalfa se evaluó en vacas secas (Danelón et al. 2002) y en novillos Aberdeen Angus (Dougherty et al. 1989), pero no en vacas lactando. Con excepción de Dougherty et al. (1989) que incluyo un tratamiento donde el forraje fue segado pero no oreado, en los reportes disponibles los efectos del oreo y del segado son considerados juntos y probablemente se confunden.

#### *Efecto sobre el consumo y la producción de leche*

En vacas de baja producción, consumiendo pasturas donde predominaba el raigrás perene y el oreo no incremento más de 10 puntos porcentuales la concentración de MS, suministrar el forraje oreado disminuyo el CMS y la producción de leche respecto al pastoreo (Irvine et al. 2010; Kingsbury, 2014). La importancia de la concentración de la MS se evidencia claramente en el experimento realizado por Kolver et al. (1999), donde comparando el pastoreo y el oreo del forraje durante 7 meses (de setiembre a febrero), solamente en un mes (diciembre) que el oreo incremento 10 puntos porcentuales el % de MS (21.4 vs 31.5 % de MS en la pastura y el forraje oreado, respectivamente) constato un aumento del CMS (20,2 Kg/d vs 16,8 Kg/d), sin embargo no modifico la producción de leche (14 l/d). Por su parte Cun et al. (2017) utilizando una pastura mezcla (con 14% de trébol blanco y alfalfa) no encontró diferencia en el CMS (15.2 kg/d), ni la producción de leche (25 l/d) entre el pastoreo o suministrar el forraje oreado 5h. Aunque en el experimento de Cun et al. (2017) el incremento del % de MS fue modesto (5 puntos porcentuales, 17 vs 21% de MS), los autores citando a Rutter (2006) y a Horadagoda et al. (2009) atribuyen la ausencia de diferencias, al componente de leguminosas en la pastura y su menor pérdida de calidad respecto al raigrás.

#### *Efecto sobre el comportamiento alimenticio, la digestión y la eficiencia de uso del N*

El comportamiento alimenticio no se modificó por el oreo en vacas lecheras consumiendo dietas únicamente pastoriles sin restricción en el tiempo de acceso al forraje (Kingsbury, 2014). Por otro lado, en novillos consumiendo únicamente alfalfa Dougherty et al. (1989) reporto que aunque el peso de bocado se incrementó 5 veces debido al mayor % de MS en el forraje oreado (23 vs 33 % de MS), esto no fue suficiente para compensar la disminución en 7 veces en la tasa de bocados (28 vs 5 bocados / min), debido a la dificultad en la manipulación y armado del bolo alimenticio

del forraje oreado.

Estudiando los efectos del segado sobre sobre la tasa de pasaje, la fermentación ruminal y el tamaño de las partículas en el rumen de vacas secas alimentadas únicamente con forraje de alfalfa, Danelón et al. (2002) compararon el pastoreo (21 % MS) o suministrar el forraje oreado hasta alcanzar entre 35% y 40% de MS, sin encontrar diferencias para ninguna de las variables. El consumo de forraje oreado podría mejorar la eficiencia de uso del N para la producción de leche. Aunque utilizando una pastura de raigrás con 17 a 18 % de proteína cruda (PC) Kingsbury, (2014) no encontró diferencias en el uso del N, salvo una tendencia con el oreo a aumentar la excreción de N en las heces, que atribuyó a una menor disponibilidad de energía en rumen. Con una pastura de mayor contenido de PC como la alfalfa la pérdida de fracciones rápidamente degradables durante el oreo disminuye la tasa de degradación de la PC y liberación de N-NH<sub>3</sub> en el rumen, con el potencial de modificar la eficiencia de uso del N y energía para producir leche (Broderick, 1995). En dietas con ensilaje de alfalfa como único forraje, el impacto en la producción de leche de disminuir la degradabilidad de la PC fue mayor que la suplementación con granos de cereales, y las ventajas de disminuir la degradabilidad ruminal podrían ser mayor en dietas con alfalfa fresca o pastoreada (Broderick, 1995).

#### Influencia del tipo de pastura sobre los procesos digestivos, y relevancia del cultivo de alfalfa

Las diferencias en el contenido de nutrientes y las características morfológicas de las especies de plantas, así como la preferencia de los animales, afectan su ingestión, el comportamiento alimenticio y los procesos digestivos (Pembleton et al., 2016). En general, las vacas lecheras lactantes alimentadas con dietas a base de gramíneas tienen menor CMS y producción de leche que las vacas alimentadas con dietas a base de leguminosas (Oba y Allen, 1999).

En relación al valor nutricional, el forraje de alfalfa puede presentar una concentración de proteínas mayor que otras especies forrajeras (gramíneas o leguminosas), la degradabilidad ruminal de las fracciones nitrogenadas es alta al igual que la mayoría de las pasturas templadas, sin embargo presenta niveles variables de taninos condensados que pueden reducir su degradabilidad (Broderick, 1995). La fracción degradable de la FDN del forraje de alfalfa generalmente es menor que la de las gramíneas, pero presenta una mayor tasa de degradación (Tamminga, 1993). Por otra parte, la tasa de degradación de los Ch Solubles (mayormente azúcares libres en las leguminosas) suele ser mayor para las leguminosas respecto a las gramíneas. Comparando una pastura de alfalfa con una de dactilis suministradas como único alimento a vacas lecheras, la alfalfa disminuyó el tiempo de retención en rumen, indujo un menor llenado ruminal y tuvo mayor digestibilidad, lo que incrementó el CMS potencial (Kammes y Allen, 2012b). Además, a nivel ruminal la pastura de alfalfa aumentó el pH, la concentración de N-NH<sub>3</sub> y la producción de proteína microbiana, respecto al dactilis, en vacas lecheras (Kammes y Allen, 2012a). La preferencia por la pastura de alfalfa podría estimular el CMS voluntario de los animales. Las vacas lecheras mostraron mayor preferencia por una pastura de alfalfa respecto a una de raigrás, postulando estos autores que existió una asociación positiva entre la cantidad de

carbohidratos solubles y la preferencia del animal por la pastura (Horadagoda et al., 2009). Pérez-Ruchel et al. (2017), reportó en corderos alimentados con diferentes proporciones de FF de alfalfa y una pRTM, que el CMS total se incrementó a medida que aumentó la proporción de alfalfa en la dieta.

Respecto al comportamiento alimenticio, si bien la asociación positiva entre la altura de la pastura, el peso de bocado (g MS/ bocado) y la tasa de consumo (g MS/min) es un aspecto común a la mayoría de las especies forrajeras, es de mayor magnitud para la alfalfa que en festuca y otras gramíneas. Galli et al. (2018) reportaron que cuando la pastura mide 12 cm de altura la tasa de consumo de alfalfa o festuca es similar, pero en pasturas con 28 cm de altura la tasa de consumo es mayor pastoreando alfalfa que festuca. El segado reduce el trabajo de cosecha comparado al pastoreo en mayor proporción para la alfalfa respecto a otras pasturas. Minnee et al, (2018) reporto que se requiere más energía para macerar mecánicamente una planta entera de alfalfa comparado a una de raigrás o achicoria (0.13, 0.027 o 0.005 cal/g de materia fresca respectivamente). Según estos mismos autores, es debido a la dureza del tallo de alfalfa, ya que para fracturar las hojas de alfalfa se requiere un tercio de la fuerza necesaria para realizar el mismo trabajo en hojas de achicoria o raigrás, pero fracturar el tallo de la alfalfa se precisa 10 veces la fuerza que requieren las hojas. En vacas de raza carnífera, comparado con el pastoreo directo, el segado aumento el CMS de alfalfa pero no modifico el de trébol o dáctilis, y estos autores lo atribuyen al mayor desarrollo vertical de la pastura de alfalfa (Lofgreen y Strother, 1957; citados por Greenhalgh y Runicie, 1962). Contrariamente otros autores han reportado que para las vacas es más difícil construir un bocado cuando se siegan pasturas largas respecto a pasturas cortas y homogéneas (Dougherty et al., 1989 citado por: Boudon et al., 2009).

Desde el punto de vista agronómico la alfalfa se caracteriza por un alto potencial de producción de forraje, su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, mejorar el secuestro de carbono, todas características relevantes para contribuir al desarrollo de sistemas productivos sustentables ambientalmente (Meccage 2021). El cultivo de alfalfa tiene la potencialidad de mejorar la productividad de los sistemas pastoriles sin incrementar e incluso reduciendo el uso de insumos. En Argentina. Berone et al, (2020) cuantificaron que sería posible aumentar 30 % la ganancia de PV/ha, modificando el criterio clásico de defoliación (10% de floración o un rebrote basal de 3 a 5 cm, Undersander et al., 2011), por un criterio basado en la biomasa por encima de 5 cm de altura. Intentando durante la primavera-verano ingresar con 1.900–2.100 kg MS/ha de biomasa (30 cm de altura del dosel) y una remante deseado de 5 cm de altura sobre el suelo. Adicionalmente, el uso de alfalfa puede reducir el uso de fertilizantes químicos a través de la fijación biológica del N ambiental, por ejemplo en un clima templado puede aportar hasta 200 kg N/ha/año, (Sheaffer et al., 1992). El cultivo de alfalfa ocupa más de 32 millones de ha en todo el mundo y los principales países productores son Estados Unidos, Rusia, Canadá y Argentina. En América aproximadamente hay en Argentina 3,2 millones de ha, en Chile 170.000 ha, en Perú 120.000 ha, en Uruguay 70.000 ha y en Brasil 35.000 ha (Vilela y Juntolli, 2022). En Argentina la superficie total dedicada a la alfalfa se concentra mayoritariamente en la Región Pampeana (Argentina Central) y el 60% de la superficie son monocultivos para pastoreo y producción de heno en sistemas lecheros (Basigalup y Ustarroz, 2007). El Registro Nacional de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas de Argentina incluía en 2016 un total de 426 cultivares de alfalfa. De los cuales, 134 fueron desarrollados en Argentina, 244 en los Estados Unidos, 27 en Australia, 12 en Francia y 9 en otros países (Basigalup et al., 2022). El

área de alfalfa en Chile ha aumentado sostenidamente, de 20.000 ha en 2001 a unas 176.000 ha en 2016. El 70% de la superficie cultivada se concentra en las regiones de Valparaíso y Biobío, cultivándose también en las zonas altas de la región más austral. Su uso es fundamentalmente como heno en los sistemas intensivos de producción de leche del centro-sur. En Perú se cultiva sobre todo en la zona costera. Mientras que en Brasil se concentra en los estados de Paraná y Rio Grande do Sul, utilizándose principalmente variedades derivadas del cultivar Crioula.

En Uruguay la productividad de forraje promedio para 22 cultivares de alfalfa evaluados durante tres años en condiciones experimentales, fue de 12 toneladas de MS/ha/año con un CV del 6%. Aproximadamente la mitad del forraje se produce en verano, con tasas de crecimiento que varían entre 40 y 85 kg MS/ha/día (INIA-INASE, 2022). En 2022 de las 14.3 millones de ha de superficie de pastoreo del Uruguay, el 19.1% (2.7 millones de ha) son ocupadas por pasturas mejoradas y el 9.3 % (1.3 millones de ha) corresponden a praderas (DIEA, 2022). El área de alfalfa como monocultivo en Uruguay se estima en 70.000 mil ha cultivadas el 60% se utiliza bajo pastoreo directo en sistemas de producción de leche bovina y, en menor medida, en la producción intensiva de carne vacuna. El área restante se utiliza 30% para heno y 10% para ensilaje o semillas. De unos 100 cultivares de alfalfa registrados en el Instituto Nacional de Semillas los más utilizados son Estanzuela Chaná y Crioula, ambos de reposo intermedio, con producciones acumuladas (tres años) de 32 toneladas de MS/ha/año y un 65 a 75 % de la producción de forraje en primavera-verano (Basigalup et al., 2022). Comparada con otras leguminosas la pastura de alfalfa presenta alta persistencia, menor variabilidad inter anual y mayor producción de nutrientes por unidad de superficie, respecto a el trébol blanco, el trébol rojo (*Trifolium pratense*) o el lotus (*Lotus corniculatus*) (Díaz et al., 1996).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La intensificación de los sistemas de producción de leche está asociada generalmente a un aumento de la carga animal, la suplementación con alimentos concentrados y el uso de reservas forrajeras. Particularmente en la lechería Uruguaya el consumo aparente de alimentos concentrados (granos de cereales, raciones balanceadas y subproductos industriales) aumento un 41,4 % en los últimos 20 años, pasando de 486 mil toneladas en 2007 a 687 mil toneladas en 2021 (Methol, 2022). Simultáneamente en los sistemas lácteo exportadores ubicados en regiones de clima templado la alimentación del ganado con pasturas presenta ventajas económicas, medioambientales y nutraceuticas. En estos sistemas pastoriles, el uso de dietas que combinan el pastoreo directo o suministro de FF con una pRTM (conteniendo los alimentos concentrados y reservas de forraje mezcladas como un único alimento) es una estrategia de suplementación cada vez más utilizada (Wales y Kolver, 2017), y ha mostrado mejores resultados que el suministro de forraje y concentrados por separado, sobre todo cuando los niveles de suplementación superan los 10 kg de MS/vaca/d (Wales et al., 2013). Por lo cual, la utilización de dietas combinadas una estrategia de alimentación que puede contribuir al desarrollo de la lechería y es necesario investigar, para su aplicación en diferentes situaciones productivas. Esta tesis se enmarca dentro de una línea de investigación sobre dietas combinadas, desarrollada en el Instituto de Producción Animal Veterinaria (IPAV) desde el año 2010, con el propósito de identificar aspectos del comportamiento alimenticio y el aprovechamiento digestivo que permitan aumentar la ingestión y/o la eficiencia de uso de los nutrientes aportados por la pastura en dietas combinadas para rumiantes (Pérez-Ruchel et al. 2017; Santana et al. 2017) y específicamente para vacas lecheras (Mendoza et al. 2016a; Mendoza et al. 2016b; Pastorini et al. 2019; Capelesso et al. 2019; Pozo et al. 2022).

El problema central es que, a medida que aumenta la proporción de pastura en la dieta de vacas lecheras alimentadas con dietas combinadas, llega un punto (variable según las características del animal, la pastura y la pRTM) donde la pastura limita el consumo de nutrientes y la producción de leche. La pregunta central es ¿Cómo lograr altas producciones de leche ( $> 25\text{kg} / \text{d}$ ) con altas proporciones ( $\geq 40\%$  del CMS) de pastura en la dieta?. En este contexto, es necesario estudiar estrategias aplicables en los sistemas comerciales para aumentar el consumo de nutrientes aportados por la pastura en dietas combinadas para vacas lecheras de alta producción. En concreto, las variables (estrategias) estudiadas en esta tesis fueron: subdividir el tiempo diario de pastoreo, el segado de la pastura y el oreo (secado al sol) del forraje. Estas son prácticas relativamente sencillas y aplicadas actualmente por los productores lecheros, pero no con el objetivo de aumentar la proporción de nutrientes aportados por el forraje, sino con otros fines como evitar el motorismo y realizar reservas forrajeras. Se diseñó un experimento (Experimento I) para estudiar los efectos de incluir 8h continuas de acceso al pastoreo y de dividir este tiempo de pastoreo en dos turnos de 4h, sobre la performance productiva, el comportamiento alimenticio, la fermentación ruminal y la digestibilidad aparente de los nutrientes. Otros dos experimentos (Experimentos II y III)

se diseñaron para estudiar los efectos del segado y del oreo pre pastoreo sobre la performance productiva, el comportamiento alimenticio, la fermentación ruminal, el tamaño de las partículas de forraje, la tasa de pasaje de la digesta y la digestibilidad aparente de los nutrientes. Por último, el modelo animal utilizado en esta tesis vacas en la lactancia tardía durante fines de primavera y comienzo del verano, representa una aproximación a la situación productiva del 66% de las vacas lecheras en Uruguay que paren entre marzo y agosto (INALE 2020).

## **HIPÓTESIS**

### Hipótesis general

Dividir el tiempo de pastoreo o el oreo del forraje de alfalfa aumenta los nutrientes digestibles aportados por la pastura en dietas combinadas para vacas de alta producción, al modificar el comportamiento alimenticio, los procesos digestivos y el uso de la energía y el N.

### Hipótesis específicas

- 1) Dividir 1 sesión de 8h de acceso al pastoreo de alfalfa, en 2 sesiones de 4h aumentara la producción de leche y los nutrientes aportados por la pastura, mediante el aumento del tiempo comiendo, cambios en la fermentación ruminal y la utilización digestiva de los nutrientes, lo que también conduciría a un aumento en la leche de la concentración de ácidos grasos beneficiosos para el consumo humano respecto a suministrar exclusivamente una RTM (Experimento I).
- 2) El oreo del forraje de alfalfa aumentara el consumo de nutrientes digestibles y la producción de leche mediante la concentración de los nutrientes en el forraje, modificando el comportamiento alimenticio y la utilización digestiva de los nutrientes respecto a proporcionar el FF segado o el pastoreo directo. (Experimento II).
- 3) Comparado al pastoreo directo, ofrecer el forraje cortado (fresco u oreado) aumenta el tamaño de las partículas de forraje en el rumen y el suministro de forraje oreado genera una fermentación ruminal menos fluctuante respecto a ofrecer el FF segado o el pastoreo, en vacas secas alimentadas con una pRTM. (Experimento III).

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar como la división del tiempo de pastoreo, el segado de la pastura y el oreo del forraje de alfalfa afecta la performance productiva, el comportamiento alimenticio y los procesos digestivos en vacas lecheras alimentadas con dietas combinadas.

### Objetivos Específicos

- 1) En vacas lecheras alimentadas *ad libitum* con una RTM, evaluar los efectos de: 1) incluir 8h diarias de acceso al pastoreo de alfalfa, reduciendo al 60% del consumo *ad libitum* la asignación de una pRTM; y 2) proveer el acceso al pastoreo en dos sesiones de 4h luego de cada ordeño o 8h continuas luego del ordeño vespertino, sobre:
  - a) La producción, la composición, y el perfil de ácidos grasos de la leche
  - b) El comportamiento alimenticio
  - c) El consumo de nutrientes
  - d) La digestibilidad aparente de los nutrientes
  - e) La fermentación ruminal y el flujo de nitrógeno microbiano a duodeno
  - f) La EA, el BE y el (**BN**)
  
- 2) En vacas lecheras alimentadas con una pRTM asignada al 30% del consumo *ad libitum* y 17h de acceso a una parcela de alfalfa con una asignación de 18kg MS/d, evaluar los efectos de suministrar la alfalfa en pastoreo directo, segada sin oreo o segada con 24 h de oreo, sobre:
  - a) La producción y la composición de la leche
  - b) El comportamiento alimenticio
  - c) El consumo de nutrientes
  - d) La digestibilidad aparente de los nutrientes
  - e) La tasa de pasaje de forraje por el tracto digestivo
  - f) La EA, BE y BN
  
- 3) En vacas secas alimentadas con una pRTM asignada al 30% del consumo *ad libitum* y 17h de acceso a una parcela de alfalfa con una asignación de 18kg MS/d, evaluar los efectos de suministrar la alfalfa en pastoreo directo, segada sin oreo o segada con 24 h de oreo, sobre:
  - a) La fermentación ruminal
  - b) El contenido sólido y líquido en el rumen
  - c) El tamaño de las partículas del rumen
  - d) La tasa de pasaje de forraje por el tracto digestivo
  - e) El comportamiento alimenticio
  - f) El consumo de nutrientes
  - g) La digestibilidad aparente de los nutrientes

## ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para testear las hipótesis y alcanzar los objetivos planteados se desarrollaron tres experimentos (Experimento I, II y III), los experimentos II y III fueron realizados simultáneamente. El Experimento I se diseñó para responder el objetivo específico 1. Los resultados de este experimento fueron publicados en el siguiente artículo, que es presentado en los Anexos como Publicación I.

Santana A, C. Cajarville, A. Mendoza, JL. Repetto. (2023). Including 8 h of access to alfalfa in 1 or 2 grazing sessions in dairy cows fed a partial mixed ration: impacts on intake, behavior, digestion, and milk production and composition. *J Dairy Sci.* Manuscript ID: JDS.2022-22743.R4 (aceptado para su publicación).

Los Experimentos II y III se diseñaron para responder los objetivos específicos 2 y 3. Los resultados del experimento II serán enviados a publicar en el siguiente manuscrito que se presenta en los Anexo como Publicación II.

Santana A, C. Cajarville, JL. Repetto. (2023). Alfalfa pre-graze mowing with or without wilted, effect on productive performance, feeding behavior and digestive response of dairy cows fed a partial mixed ration. Para enviar al *J Dairy Sci.*

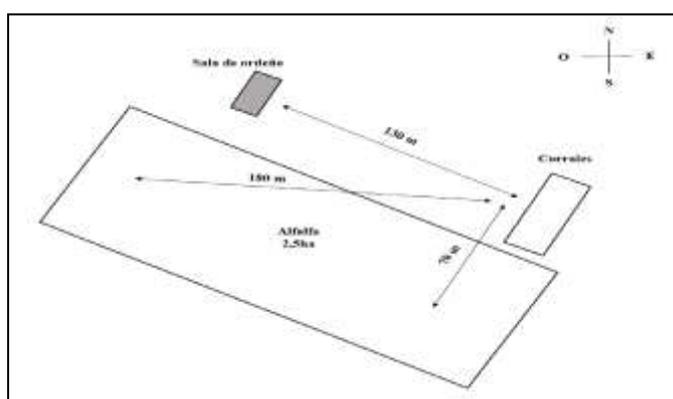
### Aspectos comunes a los tres experimentos

Los ensayo de campo y la mayoría de los análisis fueron realizados en las instalaciones y laboratorios del Instituto de Producción Animal de Facultad de Veterinaria (IPAV; Ruta 1, km 42.5, San José, Uruguay, S 34°40', W 56°32') de la Universidad de la República (UDELAR). Los análisis de composición de leche fueron realizados en el Laboratorio Agroindustrial COLAVECO (Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay). La concentración de cromo en las heces se analizo en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición de Rumiantes (LABRUMEN) de la Universidad Federal de Santa María (UFCM; Santa María, Rio Grande do Sul, Brasil).

El manejo de los animales y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos de la Comisión de Ética en Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Protocolo CEUAFVET - 351/16 (Experimento I) y Protocolo CEUAFVET - 743/18 (Experimentos II y III). No se realizó ninguna medición o muestreo con eventos de lluvia o vacas que estuvieran en celo.

Todos los cortes de pastura y en adelante todas las referencias a la masa de forraje en el texto son por encima de 5cm del suelo, a no ser que se indique algo diferente. La pastura utilizada en los tres experimentos se implanto en una parcela de 2,5 ha, situada a 130 m de los corrales y 180 m de las instalaciones de ordeño (Figura 1. Esquema del área utilizada para los experimentos). El tipo de suelo clasificado como Formación Libertad donde predomina los Brunosoles Eutricos (D.S.F – MGAP, 1979), previo a la

siembra presentaba 5,3 de pH, 4,3% de MO, fósforo 38 ppm, potasio 208 ppm, calcio 1628 ppm y magnesio 254 ppm determinados por el método Mehlich 3 (Mehlich, 1984). Dos meses previo a la siembra se aplicaron por hectárea 6000kg de carbonato de calcio y magnesio (cal) y se fertilizó con 400 kg de superfosfato de calcio (aportes: 20% P, 12% S, 20% Ca), 200 kg Hiperfos (aportes: 25% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 4% S, 27% Ca) más boro, 500 kg de cloruro de potasio (aportes: 60% K), 150 kg de trile 15 (aportes: 15% N, 16% P, 15% K). El 19 de septiembre de 2015 se sembró un cultivar comercialmente disponible de alfalfa (cv. Crioula) con latencia invernal intermedia (Grupo 6). Se re fertilizó anualmente en marzo con 400 kg de superfosfato de calcio y 400 de cloruro de potasio por hectárea. Los controles de insectos y malezas cuando fue necesario (nunca dentro de los 30 días previos, posteriores ni durante los experimentos), se realizaron con insecticida (Clorpirifós, Lorsban® 0,8 Lt/ha) y herbicida (éster butílico del ácido 2,4 diclorofenoxibutírico, Venceweed® 1 Lt/ha).



**Figura 1.** Esquema del área utilizada para los experimentos.

## EXPERIMENTO I (Publicación 1)

### Materiales y métodos

#### Animales, Diseño Experimental y Tratamientos

El experimento se realizó de octubre a diciembre de 2016. Doce vacas Holstein (vaca = unidad experimental) con una producción de leche durante la lactancia previa corregida a 305 d de 7876 kg (DS = 642). Al inicio del experimento, las vacas tenían un PV promedio de 584 kg (DS = 71), 193 DIM (DS = 83) y número de partos 3.2 (DS = 1.2). A todas las vacas se les colocó un catéter ruminal (K227 Koler, sondas de drenaje torácico, 150 cm de largo, 13,5 mm de diámetro exterior) y estaban equipadas con collares para registrar el tiempo de rumia HR Tag™ (SCR Engineering Ltd., Netanya, Israel). Las vacas fueron bloqueadas por PV, producción de leche en la lactancia previa, días de lactancia y número de partos, se distribuyeron en 4 cuadrados, y dentro de cada cuadrado se asignaron aleatoriamente a una secuencia de tratamiento de acuerdo con el diseño experimental de cuadrado latino 3 x 3 replicado 4 veces. Se evaluaron tres tratamientos: una RTM proporcionada *ad libitum* (T0); pRTM más 8 h de pastoreo de alfalfa una vez al día (T8); pRTM más dos sesiones de 4 h de pastoreo de alfalfa al día

(T4+4).

Cada período duró 19 días y consistió en 12 días para la adaptación seguidos de 7 días para la recolección de datos y muestras. Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día a las 07:00 y 18:00 h. El CMS potencial *ad libitum* se determinó individualmente 10 d antes del inicio del experimento, ofreciendo cantidades crecientes hasta obtener rechazos superiores al 5% durante 6 d consecutivos. La RTM (Cuadro I) fue formulada para cumplir con los requerimientos de vacas con 600 kg de peso corporal y producciones de 28 kg de leche por día según lo recomendado por NRC, (2001), excepto el contenido de PC que se calculó para igualar los valores de alfalfa, y fue preparada todos los días y ofrecida a las 10.00 h.

Cuando las vacas no estaban pastoreando, estaban en corrales individuales (2,0 x 4,0 m) a cielo abierto con comederos individuales y acceso *ad libitum* al agua. En T0, la cantidad diaria de RTM ofrecida fue equivalente al CMS *ad libitum* individual registrado, suministrándose la mitad a las 1000 h y el resto después del ordeño por la tarde (1800 h). Se suministró la misma RTM en los tratamientos T8 y T4+4 (pRTM) al 60% del CMS *ad libitum*, la cantidad diaria total de pRTM se suministró a las 1000 h. Debido a que las vacas no tenían acceso a la pRTM mientras pastoreaban, en el tratamiento T4+4 las vacas no tenían acceso a la pRTM hasta las 12:00 h después del pastoreo de la mañana.

La pastura utilizada presentó una composición botánica compuesta en MS por 83.1% ( $\pm 4.4\%$ ) alfalfa (*Medicago sativa*), 5.3% ( $\pm 1.2\%$ ) *Trifolium pratense*, 4.1% ( $\pm 1.9\%$ ) *Lolium multiflorum*, y 7.5% ( $\pm 1.7\%$ ) de material muerto (promedio de los tres períodos). Durante todo el experimento, las vacas ingresaron a la pastura en estado fenológico vegetativo (menos de 8 nudos para la alfalfa). La disponibilidad promedio para los tres períodos fue de  $1321 \pm 399$  kg MS/ha. En T8 las vacas pastorearon una vez al día después del ordeño de la tarde entre las 1800 y las 0200 h, y en T4+4 pastorearon dos veces al día en sesiones de 4 h después de cada ordeño (entre las 0800 y las 1200 h y entre las 1800 y las 2200 h). Las vacas pastoreaban en parcelas individuales delimitadas diariamente con cerca eléctrica y tenían acceso permanente al agua. El área de cada parcela individual se ajustó diariamente, para ofrecer 14 kg/d de MS de alfalfa por vaca, a más de 5 cm del suelo (ver más adelante: “Consumo y digestibilidad aparente de la MS y los nutrientes”). En T8 y T4+4 las vacas accedieron a una nueva parcela de pastura después del ordeño de la tarde (18:00 h). En el tratamiento T4+4, accedieron a toda el área asignada desde el inicio (18:00 h), no hubo subdivisiones ni asignaciones durante las siguientes 24 h, para la siguiente sesión de pastoreo matutino las vacas regresaron a la misma parcela. La distancia máxima diaria recorrida por las vacas entre la Alfalfa, los corrales y la sala de ordeño fue de 600 m.

Los datos meteorológicos se obtuvieron del sitio web del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (<http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>, último acceso 3 de marzo de 2022). Las temperaturas medias a una altura de 2 m en los

períodos 1, 2 y 3 fueron 20,5, 20,0 y 20,5 °C, respectivamente. La salida del sol se produjo a las 0539 h, y la puesta de sol se produjo a las 1917 h del primer día del período 1, y a las 0526 h y 1955 h, respectivamente, durante el último día del período 3.

**Cuadro I.** Ingredientes y composición de nutrientes (desvió estándar entre paréntesis) de la RTM, la pastura de Alfalfa y los diferentes ingredientes utilizados en la RTM (% de MS, salvo que se indique otra cosa)

Item	RTM	Alfalfa	SMPE	GM	HS
<b>Ingredientes de la RTM</b>					
Silo de maíz planta entera (MSPE)	58,48				
Grano de Maíz molido (GM)	14,62				
Harina de soja (HS)	24,37				
Urea	0,39				
Vitamina-mineral premix <sup>1</sup>	1,46				
Polisiloxano	0,19				
Magnesio oxido	0,24				
Sodio bicarbonato	0,24				
<b>Composición de nutriente</b>					
MS, % alimento tal cual ofrecido	46,7 (0,4)	18,4 (2,3)	36,1 (0,7)	88,1 (0,4)	88,8 (0,3)
OM	92,1 (0,2)	91,0 (0,3)	94,9 (0,8)	97,5 (0,2)	93,5 (0,1)
FDN	32,2 (0,8)	35,6 (1,7)	51,9 (1,5)	14,7 (0,1)	14,8 (0,3)
FDA	20,9 (0,4)	27,1 (0,8)	32,4 (0,8)	4,5 (0,1)	11,6 (0,1)
CNF <sup>2</sup>	38,1 (0,9)	32,1 (1,7)	31,7 (1,6)	70,2 (0,3)	30,6 (0,6)
Éter extracto	1,7 (0,1)	2,6 (0,0)	2,1 (0,0)	4,1 (0,0)	1,4 (0,0)
PC	20,0 (0,6)	20,6 (2,5)	9,0 (0,4)	8,5 (0,2)	46,7 (0,9)
NNP <sup>3</sup>	2,1 (0,3)	4,3 (0,2)	-	-	-
NPS <sup>4</sup>	4,2 (0,2)	9,8 (0,1)	-	-	-
NIDN	1,2 (0,2)	1,3 (0,1)	-	-	-
NIDA	0,8 (0,1)	0,9 (0,1)	-	-	-
EN <sub>L</sub> , Mcal/kg de MS	1,71	1,51	-	-	-
<b>Distribución del tamaño de partículas, % alimento fresco</b>					
19 mm	3,7 (0,7)				
8 a 19 mm	49,8 (0,4)				
1.8 a 8 mm	38,2 (1,8)				
1.8 mm	8,3 (0,2)				

<sup>1</sup> Aporta (por kg de MS): 0,85 g Cu; 2,6 g Zn; 0,9 g Se; 1,0 g manganeso; 23 mg I; 3 mg Co; 63.700 UI vitamina A; 12.700 UI de vitamina D; 250 UI de vitamina E.

<sup>2</sup> % carbohidratos no fibrosos (CMF) = 100 – (% FDN + % PC + % estrato a éter + % cenizas)

<sup>3</sup>Nitrógeno no proteico (NNP)

<sup>4</sup>Nitrógeno y proteína soluble (NPS)

## Consumo y digestibilidad aparente de la MS y los nutrientes

Se midió el consumo diario de RTM y pastura durante los días 13 a 17 de cada período. El consumo de RTM se determinó mediante el pesaje de lo ofrecido y rechazado (los rechazos se midieron del día 14 o 18). En todos los tratamientos la cantidad de RTM rechazada por cada vaca se pesó antes de las 1000 h y se tomó una muestra para análisis de composición. La muestra de RTM ofrecida se tomó inmediatamente después de 1000 h. En el tratamiento T8 y T4+4 se tomaron muestras separadas para cada vaca-parcela, de la pastura ofrecida 1000 h y la pastura remanente inmediatamente después de las 1200 h. Todas las muestras se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. El consumo diario de alfalfa para cada parcela - vaca individualmente se estimó por diferencia entre la masa de forraje (sobre 5 cm del suelo) antes y después del pastoreo (Meijs, 1981; Macoon et al., 2003). Para determinar la masa de forraje antes del pastoreo a las 10:00 h en una franja de  $5\text{ m}^2$  ( $0.5\text{ m} \times 10\text{ m}$ ) se cortó, recolectó y pesó la masa de forraje y se ajustó el área de cada parcela para ofrecer 14 kg de MS / vaca utilizando datos de % MS del día anterior. Para determinar la masa de pastura remanente después del pastoreo en cada parcela-vaca, a las 12:00 h del día siguiente en el 10% del área se cortó, recolectó y pesó toda la masa forrajera contenida, evitando lugares con estiércol. Todos los cortes se realizaron con una segadora (Toro CNB94, The Toro Company) a 5 cm del suelo. El consumo de MS, MO, PC, FDN, FDA y CNF se calculó utilizando los datos de la composición química del forraje previo al pastoreo, el forraje posterior al pastoreo y la pRTM.

La digestibilidad aparente de los nutrientes del tracto total se midió indirectamente siguiendo a Huhtanen et al. (1994) utilizando la FDN indigestible (**FDNi**) como marcador interno. En los días 14 y 15 de cada período, se recolectaron muestras de heces directamente del recto de todas las vacas a las 04:00 y 16:00 h, aproximadamente 6 h antes y después de la principal sesión de alimentación. Aproximadamente 200 g de las muestras fecales se secaron en un horno de aire forzado a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 h y se molieron para pasar a través de un tamiz de 1 mm. Se conformó una muestra compuesta a partes iguales para cada vaca y período, en la que se analizó la MS, cenizas, FDN, FDA y PC (según las técnicas detalladas más adelante en “análisis químicos”). Se determinó FDNi en las muestras de materia fecal, RTM y la pastura de alfalfa (de la oferta y rechazos) recolectadas como se describió anteriormente, también se analizaron para FDNi. Brevemente, las muestras secas se molieron con un tamiz de 2 mm, y de 6 g de cada muestra se colocaron en bolsas de nailon de 22 x 10,5 cm (Ankom Technology Corporation, Macedon, NY) con un tamaño de poro de  $50\text{ }\mu\text{m}$  y una relación entre el tamaño de muestra y el área de la bolsa de  $13\text{ mg}/\text{cm}^2$ . Las bolsas se incubaron durante 288 h consecutivas en el rumen de 2 vacas secas alimentadas con una dieta que consistía en (base MS) heno de gramínea (60 %), grano de maíz seco molido (25 %), harina de soja extraída por solvente (13%) y una mezcla de minerales y vitaminas (2%). Después de la incubación, las bolsas se enjuagaron con agua de la canilla durante 15 min y se secaron en una estufa de aire forzado a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 h, y los residuos se analizaron para FDN. La excreción diaria de heces se estimó para cada animal como el cociente de

la ingesta diaria de FDNi y la concentración de FDNi en las heces. Los coeficientes de digestibilidad aparentes para MS, OM, FDN, FDA, CNF, EE y N total se calcularon como:  $([\text{ingesta del nutriente (g/d)} - \text{la excreción fecal del nutriente (g/d)}] / \text{ingesta del nutriente (g/d)}) \times 100$ .

### Comportamiento alimenticio

En los días 13 y 16 de cada período, cuatro observadores capacitados registraron el comportamiento alimenticio durante 19 h (excepto de 03:00 h a 07:00 h, y durante cada ordeño) mediante observación directa cada 5 min “scan sampling” como lo sugieren Hirata et al. (2002). Los observadores fueron entrenados antes de comenzar el experimento para reconocer consistentemente los comportamientos de alimentación. Para el propósito de este experimento, los comportamientos de alimentación se definieron como 'comer' (recoger, agarrar, masticar o consumir RTM, pRTM o forraje), 'rumiar' (movimientos de masticación sin alimento en la boca, regurgitación del alimento o ambos) y otros (no mostrando alguna de las actividades anteriores). En cada momento, el comportamiento de alimentación fue registrado por 2 observadores simultáneamente, cada observador monitoreó seis vacas simultáneamente durante cuatro h consecutivas, lo que proporcionó 228 observaciones / vaca / d. La proporción de cada evento de comportamiento alimentario por h se calculó como una fracción del total de observaciones siguiendo a Mendoza et al. (2017). Adicionalmente, se analizaron por separado las observaciones de los tratamientos T8 y T4+4 solo durante las 8h de acceso al pastoreo, tomando como h 0 las 18:00h (que era el inicio del pastoreo de la tarde y se asignó una nueva parcela).

Los días 16 y 17 de cada período se midieron los minutos acumulados a intervalos de 2 h utilizando el sistema Heatime® HR (SCR Engineers Ltd., Netanya, Israel) a través del sonido de la masticación y la regurgitación de bolos durante la rumia (Schirmann et al. 2009). Se analizaron los minutos totales por día de rumia y los minutos promedio cada intervalos de 2 h acumulados para los tres tratamientos. Además, solo se analizaron las h de acceso al pastoreo para T4+4 y T8, los minutos totales y promedio cada 2 h acumulados durante el pastoreo.

### Fermentación ruminal

El día 18 de cada período se tomaron muestras de fluido ruminal cada h durante 12 h consecutivas (1000 h a 2200 h) y a las 0100 h, 0400 h y 0700 h. El pH del fluido ruminal se midió inmediatamente de colectado utilizando un medidor de pH digital (EW-05991-36, Cole Parmer, Vernon Hills, IL). El líquido ruminal se filtró a través de 2 capas de paño de quesería y una muestra de 10 ml de líquido ruminal se conservó con 0,2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6,6 M para el análisis de NH<sub>3</sub>-N. Se conservó otra muestra de 0,5 ml de líquido ruminal con 0,5 ml de HClO<sub>4</sub> 0,1 M para el análisis de AGVs; ambas muestras se almacenaron a -20°C hasta ser analizadas. Las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> se determinaron por colorimetría utilizando un espectrofotómetro (1200, UNICO®; United Products & Instruments Inc., Dayton, OH, EE. UU.) y una reacción de fenol e hipoclorito según Watherburn, (1976).

Para la determinación de AGVs y ácido láctico, se analizaron las muestras tomadas a las 07:00, 10:00, 14:00, 20:00 y 22:00 h. En el laboratorio las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron (10.000 g a 4 °C, durante 15 min) y se analizaron mediante HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA), según lo descrito por Adams et al. (1984), utilizando una columna Acclaim Rezex Organic Acid H+ (8%) de 7,8 x 300 mm, ajustada a 210 nm. La concentración total de AGVs se calculó como la suma de las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico.

#### Flujo de nitrógeno microbiano al duodeno

En los días 14 y 15 de cada período se estimó indirectamente el flujo de N microbiano mediante la determinación de la concentración de creatinina y la cuantificación de derivados de purinas (**DP**) en orina según Valadares et al. (1999). Se tomaron dos muestras de orina por día de cada vaca mediante estimulación manual de la zona perineal a las 04:00 h y 16:00 h. De cada muestra de orina se tomaron 15 ml, se mezclaron con 60 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.072 N para acidificar y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis (Broderick et al. 2009). En el laboratorio, las muestras de orina se descongelaron a temperatura ambiente y para obtener una muestra compuesta por animal y período, se mezclaron las 4 muestras en partes iguales. De la muestra compuesta, una parte se utilizó para determinar la concentración de creatinina (mmol/l) mediante un método colorimétrico utilizando un kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., MG, Brazil). El volumen total de orina se calculó dividiendo la excreción diaria de creatinina esperada (mmol/d) sobre la concentración de creatinina (mmol/l). La tasa de excreción de creatinina utilizada fue 21.9 mg/kg de BW (Pacheco et al., 2007). Otra parte de la muestra compuesta se centrifugó (10.000 g durante 15 min a 4 °C), para analizar las concentraciones de ácido úrico y la alantoína según lo descrito por Balcells et al. (1992) usando HPLC (Dionex Ultimate® 3000), equipado con una columna Acclaim C18 de 205 nm, 5 µm, 4,6 x 250 mm. La excreción total diaria de **PD** (mmol/d) se calculó a partir de la concentración (mmol/L) de PD en orina y el volumen total de orina excretada. El flujo de N microbiano (**FNM**) al duodeno se estimó de acuerdo con Chen y Gomes (1992), excepto por el factor 0.134 que se tomó de Valadares et al. (1999):

$$\text{FNM (g/d)} = (\text{PA} \times 70) / (0,134 \times 0,83 \times 1000),$$

donde PA es la absorción de purinas (mmol/d), 70 es el contenido de N de las purinas (mg de N/mmol), 0,134 es la relación N de las purinas/N total y 0,83 es la digestibilidad asumida de las purinas de origen microbiano. La eficiencia del uso de N para la síntesis de N microbiano se calculó como (flujo de N microbiano/ingesta total de N) x 100.

#### Producción, composición y perfil lipídico de leche

La producción de leche se determinó a los días 13 y 17 de cada periodo en los dos ordeños. Se recolectaron muestras individuales de leche en 4 ordeños consecutivos a los días 14 y 15 de cada período, utilizando bronopol como agente conservante; las muestras

se usaron para determinar grasas, proteínas y lactosa mediante análisis infrarrojo (modelo 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). La EA se calculó como la producción de 3,5%LCG (kg) / CMS (kg), donde la 3,5%LCG se calculó según Tyrrell y Reid (1965).

Se tomaron dos muestras de leche individuales adicionales sin conservantes el día 15 de cada ordeño y se almacenaron a -20 °C hasta que se analizó la composición de ácidos grasos. Para el análisis de ácidos grasos, las muestras de leche congelada se descongelaron a temperatura ambiente y los lípidos de la leche se separaron de acuerdo con Feng et al. (2004). Se disolvió una alícuota de 50 mg de grasa láctea en 100 µL de hexano, se esterificó con 100 µL de hidróxido de potasio 2 N en metanol para obtener los FAME, que se separaron y cuantificaron mediante un GC-MS (Agilent 7890A GC System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) equipado con una columna de 60 m (250 µm de d.i., 0,25 µm de espesor de película; Thermo Scientific Inc., Marietta, OH). Se utilizó helio como gas portador, con un caudal de 1,0 mL/min. La temperatura del inyector (relación de división de 100:1) se ajustó a 250°C. La temperatura inicial de la columna (40 °C) se mantuvo durante 0,5 min, se aumentó a 25 °C/min hasta 175 °C y se mantuvo durante 10 min, luego se aumentó a 5 °C/min hasta 210 °C y se mantuvo durante 5 min. . Por último, aumentó durante 5 °C/min hasta 230 °C y se mantuvo durante 5 min. Los ácidos grasos se identificaron comparando sus tiempos de retención con los siguientes estándares FAME: mezcla FAME de 37 componentes (47885, Supelco, Bellefonte, PA), éster metílico trans-11-octadienoico (46905-U, Supelco), éster metílico conjugado con ácido octadecadienoico (05632, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y los almacenados en el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (Biblioteca del Gobierno de EE. UU.). El índice de  $\Delta 9$ -desaturasa y el índice de aterogenicidad se calcularon según lo descrito por Kelsey et al. (2003) y Ulbricht y Southgate (1991), respectivamente.

#### Cálculo del BE y BN

El BE diario se estimó entre los días 13 y 17 de cada período como BE (Mcal de  $NE_L/d$ ) = consumo de energía (Mcal de  $NE_L/d$ ) – [requerimientos de mantenimiento (Mcal de  $NE_L/d$ ) + requerimientos de lactancia (Mcal de  $NE_L/d$ )]. La ingesta de energía se calculó como el CMS de cada alimento x la concentración de  $NE_L$  en los alimentos. La concentración de  $NE_L$  se calculó en base a la composición química de los alimentos utilizados según NRC (2001), y los requerimientos de mantenimiento se calcularon como  $0,08 \times PV^{0,75}$ . El peso corporal se midió con una balanza digital al comienzo y al final de cada período, y se utilizó el promedio de cada período en los cálculos de BE. El requerimiento de energía para producción láctea se calculó como: producción de leche x ( $0,0929 \times \% \text{grasa} + 0,0547 \times \% \text{PC} + 0,0395 \times \% \text{lactosa}$ ), utilizando la composición de leche promedio para cada período. No se consideraron requerimientos crecimiento y pastoreo. El BN diario se calculó durante los días 14 y 15 de cada período, como BN (g/d) = consumo de N (g/d) – [excreción de N en heces (g/d) + excreción de N en orina (g/d) + excreción de N en leche (g/d)]. El volumen total diario de orina se estimó indirectamente a partir de la concentración de creatinina en la orina como fue descrito

previamente (en “Flujo de N microbiano al duodeno”), y las concentraciones de N en orina se analizaron mediante el método de Kjeldhal (AOAC, 1990; método 955.04). La excreción total diaria de materia fecal se estimó indirectamente utilizando iFDN como marcador interno como se describió anteriormente (ver “Consumo y digestibilidad aparente de la MS y los nutrientes”). La cantidad de N en la materia fecal se realizó con el mismo método utilizado para determinar la concentración de N en orina. El N en el estiércol se calculó como la suma del N excretado en orina y el N excretado en la materia fecal. La secreción diaria de N en la leche se calculó como la PC de la leche (g/d) / 6,38 (NRC, 2001). La eficiencia de la utilización del N del alimento para la producción de leche se calculó como (secreción de N en la leche / consumo de N) × 100.

### Análisis químicos

Todas las muestras de alimento ofrecido y rechazado fueron secadas en estufa de aire forzado a 60 °C y luego fueron molidas con una malla de 1 mm en un Molino Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, EEUU). En las muestra se analizó el contenido de MS, cenizas y el extracto etéreo (EE) (AOAC, 1990; Método ID 942.05; ID 934.01 e ID 920.39, respectivamente). El contenido de materia orgánica (MO) fue estimado como la diferencia entre el contenido de MS y cenizas. La concentración de N total se determinó con el método Kjeldahl (Método ID 984.13; AOAC, 1990) y el contenido de PC fue estimado como N x 6,25. El nitrógeno no proteico (NNP), el nitrógeno y proteína soluble (NPS), NDIN y ADIN (Licitra et al., 1996). Las concentraciones de Fibra Detergente Neutro (FDN) con  $\alpha$ -amilasa termoestable y sulfito de sodio; Fibra Detergente Ácido (FDA) según Van Soest et al. (1991) y los valores presentados no incluyen cenizas residuales. La concentración de CNF se calculó como: 100 – (% FDN + % PC + % EE + % ceniza) (NRC, 2001). Para las muestras de RTM, las distribuciones de tamaño de partículas se evaluaron utilizando el separador de tamaño de partículas de Penn State modificado (Kononoff et al., 2003).

### Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron utilizando el software SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc.). Inicialmente, los datos se analizaron en busca de valores atípicos y la normalidad de los residuos se verificó utilizando procedimientos univariados (PROC UNIVARIATE). Los datos de ingesta, digestibilidad de nutrientes, ingesta de energía, producción de leche, BE, flujo de N microbiano, BN, producción y composición de leche, perfil de FA y FE se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED con el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + C_j(S_i) + P_k + T_1 + e_{ijkl}$$

donde  $Y_{ijkl}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media general,  $S_i$  es el efecto aleatorio del cuadrado ( $i = 1$  a 4),  $C_j(S_i)$  es el efecto aleatorio de las vacas anidadas dentro del cuadrado ( $j = 1$  a 4),  $P_k$  es el efecto aleatorio del período ( $k = 1$  a 3),  $T_1$  es el efecto fijo

del tratamiento (l = T0, T4+4 o T8) y  $e_{ijkl}$  es el error residual.

Los datos de las variables con mediciones repetidas en el tiempo en cada periodo como pH ruminal, N-NH<sub>3</sub>, AGV, Ácido láctico y comportamiento alimentario fueron analizados mediante el procedimiento PROC MIXED con el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + C_j(S_i) + P_k + T_l + H_m + T_l \times H_m + e_{ijklm},$$

donde  $Y_{ijklm}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media general,  $S_i$  es el efecto aleatorio del cuadrado ( $i = 1$  a 4),  $C_j(S_i)$  es el efecto aleatorio de las vacas anidadas en el cuadrado ( $j = 1$  a 4),  $P_k$  es el efecto aleatorio del período ( $k = 1$  a 3),  $T_l$  es el efecto fijo del tratamiento (l = T0, T4+4 o T8),  $H_m$  es el efecto fijo de la h de medición,  $T_l \times H_m$  es el efecto fijo de la interacción entre tratamiento y h de medición, y  $e_{ijklm}$  es el error residual. La interacción período  $\times$  vaca dentro de un cuadrado fue objeto de mediciones repetidas, y AR (1) fue la estructura de covarianza elegida para datos espaciados uniformemente (es decir, eventos de comportamiento; Littell et al., 1998), mientras que el poder espacial (SP (POW)) para datos espaciados irregularmente (es decir, pH ruminal, NH<sub>3</sub>-N, ácido láctico y AGV). El efecto tratamiento  $\times$  período se probó en ambos modelos, pero no fue significativo y, por lo tanto, se eliminó.

Mediante contrastes ortogonales se evaluó la inclusión de alfalfa en la dieta comparando el tratamiento T0 con el promedio de los tratamientos T4+4 y T8 (T0 vs. T4+4 + T8) y la subdivisión del tiempo de pastoreo comparando el Tratamiento T4+4 con el tratamiento T8 (T4+4 vs T8). Se declararon diferencias con un  $P \leq 0,05$ , y tendencias entre  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## Resultados

### Ingesta y digestión de nutrientes en el tracto digestivo y BE

El consumo y la digestibilidad de la MS, MO y CNF fueron más altas cuando las vacas consumieron exclusivamente RTM respecto a cuándo tuvieron acceso al pastoreo (Cuadro II). También la ingesta de energía y el EB fueron mayores cuando las vacas consumieron exclusivamente RTM respecto a los otros dos tratamientos. La división del tiempo de acceso al pastoreo aumentó el CMS de alfalfa, sin afectar el consumo ni la digestibilidad aparente de los nutrientes en comparación a 8 h continuas de pastoreo.

**Cuadro II.** Consumo, digestibilidad aparente y balance energético

Item	Tratamientos <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Valor de $P^3$	
	T0	T4+4	T8		T0 vs (T8 y T4+4)	T8 vs T4+4
CMS, kg/d						
RTM	23,0	13,2	13,0	2,20	<,001	0,870
Alfalfa	-	8,1	7,0	0,35	-	0,029
Total	23,0	21,3	20,0	2,03	0,024	0,252

Total (% PV)	4,0	3,7	3,5	0,29	0,020	0,196
Consumo de Nutriente, kg/d						
MO	21,2	19,5	18,3	1,88	0,020	0,256
FDN	7,4	7,1	6,7	0,65	0,125	0,218
FDA	4,8	4,9	4,6	0,42	0,910	0,169
EE	0,40	0,44	0,41	0,465	0,132	0,131
CNF	8,7	7,6	7,2	0,78	0,001	0,298
Digestibilidad, %						
MS	68,8	64,6	65,3	2,16	0,046	0,616
MO	68,9	64,6	65,6	2,16	0,038	0,731
FDN	51,1	50,8	50,4	3,73	0,368	0,261
FDA	45,9	46,6	46,7	4,05	0,426	0,320
CNF	80,2	77,2	74,7	1,84	0,028	0,244
EE	81,8	82,8	83,1	1,53	0,192	0,766
EN <sub>L</sub> consumo, Mcal/d						
RTM	39,3	22,6	22,3	3,76	<,001	0,866
Alfalfa	-	12,2	10,5	0,524	-	0,028
Total	39,3	34,8	32,8	3,51	0,003	0,296
Prod Leche EN <sub>L</sub> Mcal/d	21,7	22,0	21,6	2,04	0,935	0,800
EN <sub>L</sub> balance, Mcal/d	8,4	3,6	2,0	3,12	0,016	0,532

<sup>1</sup>Tratamientos: T0 = 100% RTM; T4+4 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño matutino y vespertino (de 0800 a 1200 h y de 1800 a 2200 h); T8 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño de la tarde (de 1800 a 0200 h).

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Trat = efecto principal del tratamiento; T0 vs (T8 y T4+4) = el contraste ortogonal comparó T0 vs el promedio de T8 y T4+4; T8 vs T4+4 = el contraste ortogonal comparó T8 vs T4+4.

### Comportamiento alimenticio

En los tratamientos con acceso al pastoreo la proporción promedio en 19 h del comportamiento “come” aumento y disminuyo el de “rumia” respecto a T0, además se observó interacción entre el tratamiento y la h para estos comportamientos (Cuadro III y Figura 2). Las vacas en T0 presentaron menos eventos “come” 21:00 y 22:00 h, más eventos “rumia” 21:00 h y menos “rumia” 14:00 respecto a los otros tratamientos. La división del tiempo de pastoreo aumento la proporción de eventos “come” de 08:00 h hasta 13:00 h (excepto 10:00 h que no hubo diferencia) y disminuyo los eventos “rumia” de 08:00 h hasta 14:00 h, 16:00h y 23:00 h respecto a los otros dos tratamientos. En el tratamiento T8 de 24:00h a 01:00h las vacas dedican más tiempo a comer que en los otros tratamientos.

Analizando únicamente las ocho h de pastoreo (h 0 = 1800 h), dividir el tiempo de pastoreo en dos sesiones, aumento la proporción de observaciones del comportamiento “come” y disminuyo el de “rumia” comparado a T8. Además se detectó interacción entre el tratamiento y la h para estos comportamientos (Cuadro III y Figura 2). Dividir

el tiempo de pastoreo aumento la proporción del comportamiento “come” a las 4, 6 y 7 h posteriores al comienzo del pastoreo y disminuyo el de “rumia” a las 6, 7 y 8 h.

El tiempo de rumia registrado 24h mediante el sistema HR Tag™ total (min / 24h) y el promedio cada intervalos de 2-h no difirieron entre los tratamientos. Analizando únicamente las h de pastoreo, el tiempo de rumia fue menor (min / 8h) en T4+4 comparado a T8, detectándose interacción entre el tratamiento y la h para esta variable (Cuadro III). El tiempo de rumia (min / cada 2-h) fue menor a las 6 y 8 h posteriores a comenzar el pastoreo en T4+4 comparado a T8.

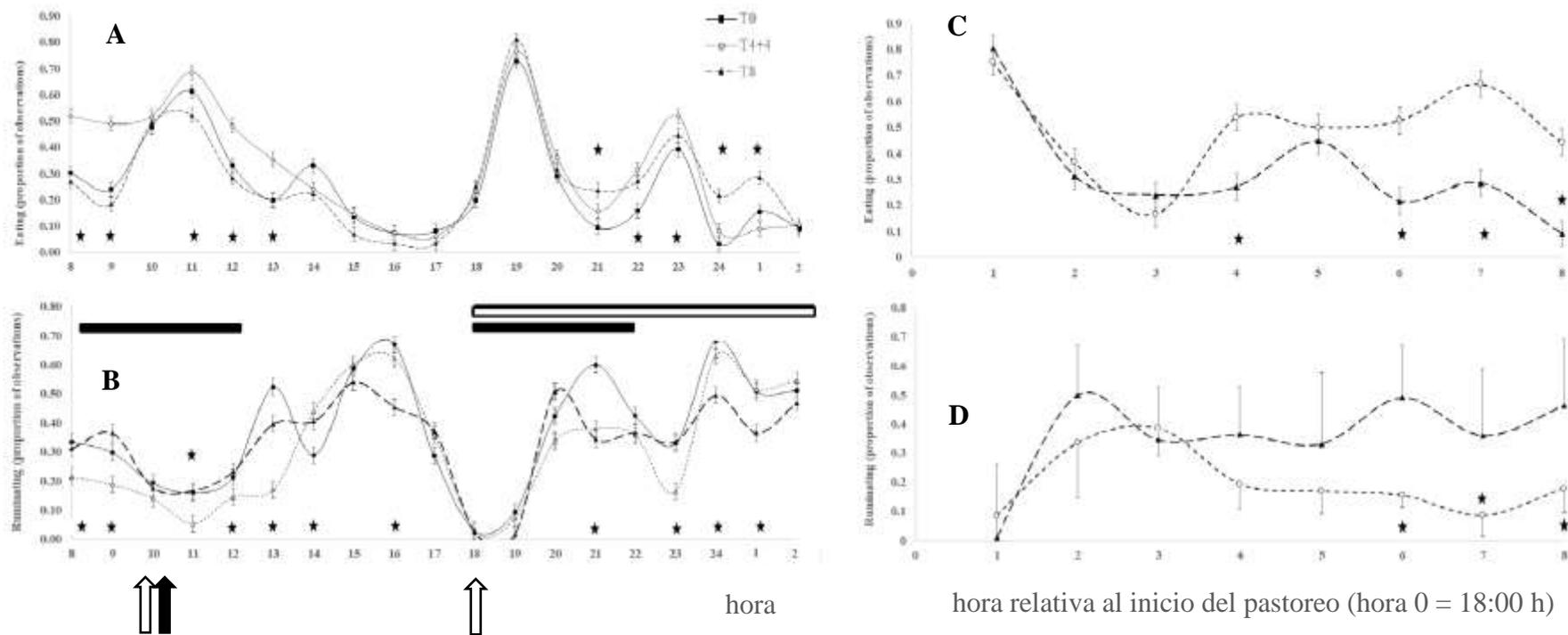
**Cuadro III.** Comportamientos (expresados como proporción del total de observaciones realizadas por animal), durante todo el día (excepto de 03:00 h a 07:00 h y los ordeños) y únicamente en las h de pastoreo

Item	Tratamiento <sup>1</sup>				EEM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>			Hora	Trat X Hora
	T0	T4+4	T8	Tratamiento		Contrastes				
						C1 (pRTM vs RTM)	C2 (4+4 vs 8h)			
Comportamientos (proporción del total de observaciones en 19h)										
Come	0,26	0,32	0,28	0,027	<0,001	0,020	0,011	<,001	0.003	
Rumia	0,37	0,32	0,33	0,023	0,049	0,015	0,733	<,001	<.001	
Otros	0,37	0,35	0,39	0,028	0,092	0,863	0,030	<,001	0.063	
Comportamientos durante el pastoreo ( proporción del total de observaciones en 8h)										
Come	-	0,46	0,32	0,090	<0,001	-	-	<,001	<,001	
Rumia	-	0,18	0,32	0,039	<0,001	-	-	<,001	<,001	
Otros	-	0,35	0,35	0,052	0,970	-	-	<,001	<,001	
Tiempo de rumia (HR Tag™ sistem)										
min / d	431	406	421	42,9	0,375	0,264	0,418	-	-	
min / 2-h intervalo										
Durante 24 h	36	34	35	3,6	0,341	0,242	0,438	0,001	0,187	
Durante el pastoreo (8h)	-	26	36	4,7	0,002	-	-	0,071	0,001	

<sup>1</sup>Tratamientos: T0 = 100% RTM; T4+4 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño matutino y vespertino (de 0800 a 1200 h y de 1800 a 2200 h); T8 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño de la tarde (de 1800 a 0200 h).

<sup>2</sup>Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Trat = efecto principal del tratamiento; T0 vs (T8 y T4+4) = el contraste ortogonal comparó T0 vs el promedio de T8 y T4+4; T8 vs T4+4 = el contraste ortogonal comparó T8 vs T4+4; Hora = efecto de la hora de muestreo; Tratar x Hora = interacción entre el tratamiento y la h de muestreo



**Figura 2.** Eventos comportamiento alimenticio expresados como proporción del total de observaciones en vacas lecheras alimentadas exclusivamente con RTM (T0) o pRTM combinada con 8 h de acceso al pastoreo de alfalfa en una (T8) o dos (T4+4) sesiones. Figuras A (comiendo) y B (rumiando) análisis de las observaciones durante 19h por día; Figuras C (comiendo) y D (rumiando) análisis de las observaciones durante el tiempo de pastoreo. En cada h, se indica con un asterisco (\*) al menos una diferencia entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras de error representan EEM. Las barras sólidas y sin relleno indican el período en que T4+4 y T8 tuvieron acceso al pastoreo de alfalfa, respectivamente. Las flechas sin relleno y solidas indican el momento de suministro de RTM en T0 o de pRTM en T8 y T4+4, respectivamente.

### Fermentación ruminal

El pH ruminal promedio, mínimo y máximo diario, fue mayor cuando las vacas consumieron exclusivamente RTM respecto a cuándo tuvieron acceso al pastoreo (Cuadro IV). La división del tiempo de acceso al pastoreo aumento el valor máximo y el rango de pH ruminal en comparación con 8h continuas. La inclusión de alfalfa en la dieta no modifico la concentración total de AGVs, ni la concentración individual y proporciones molares de ácido acético, propiónico y butírico respecto a T0. La división del tiempo de acceso al pastoreo tampoco modificó la concentración total de AGVs, pero disminuyo la proporción de ácido propionico, y tendió ( $p = 0.08$ ) a aumentar la proporción de ácido acético en el rumen respecto a un único turno diario de pastoreo. Se detectó interacción entre el tratamiento y la h para la proporción molar de ácido butírico (Figura 4, A) y la concentración de ácido láctico (Figura 4, B). La concentración media diaria de ácido láctico tendió ( $p = 0.07$ ) a disminuir cuando se dividió el tiempo de acceso al pastoreo en comparación con T8.

Cuando las vacas tuvieron acceso al pastoreo, aumento la concentración promedio de  $\text{NH}_3\text{-N}$  respecto a cuándo consumieron únicamente RTM, y la división de la sesión de pastoreo aumentó la concentración promedio de  $\text{NH}_3\text{-N}$  respecto a una única sesión, siendo significativa la interacción entre el tratamiento y la h (Figura 3). En T4+4 durante la sesión de pastoreo matutino se registraron las concentraciones más altas de  $\text{NH}_3\text{-N}$  y se mantuvieron por encima de los otros dos tratamientos hasta las 1500h, y de las 2100h a las 2200h.

**Cuadro IV.** Fermentación en rumen

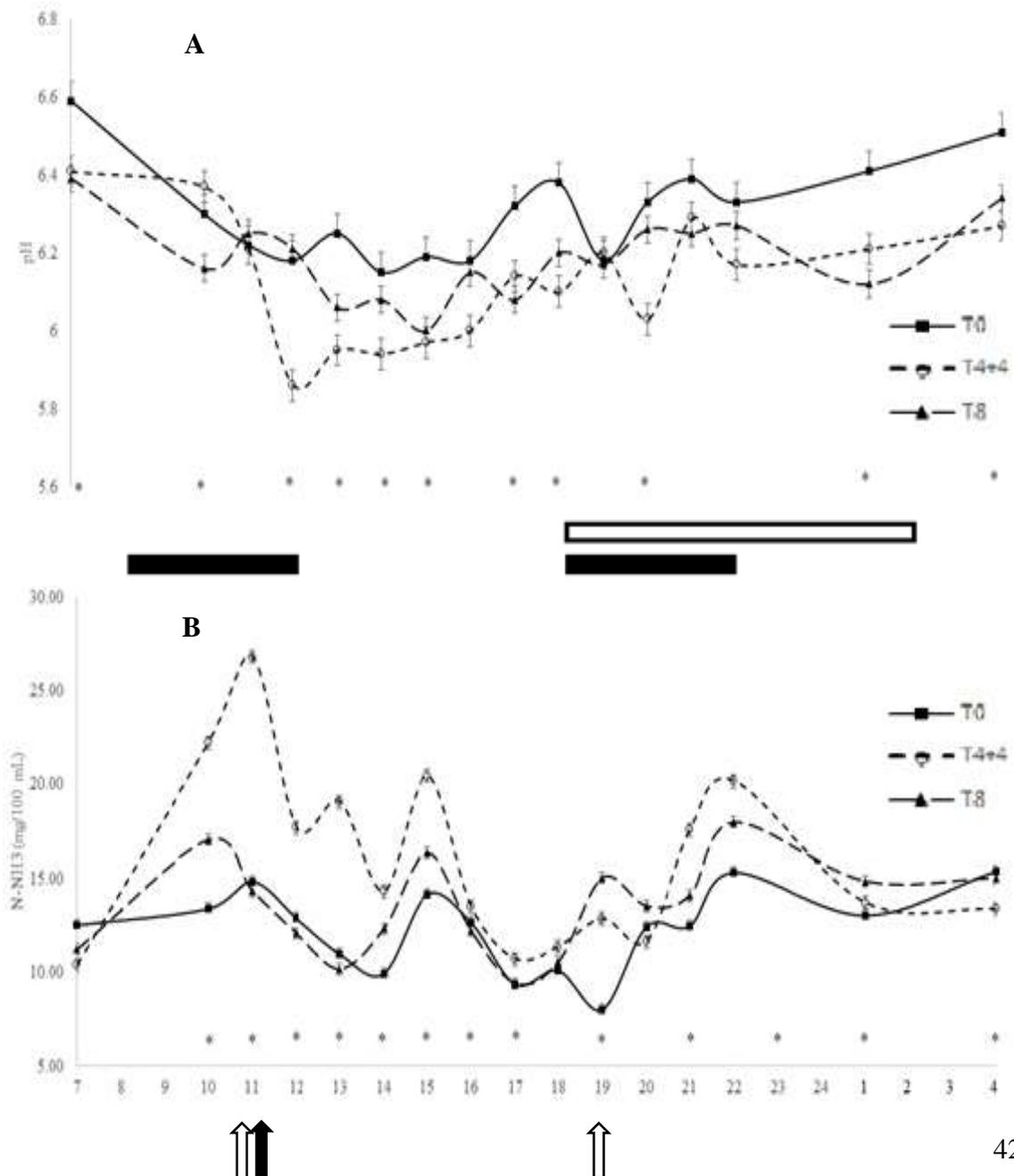
Item	Tratamiento <sup>1</sup>				EEM <sup>2</sup>	Treat	Valor de $P^3$			Treat X Hora
	T0	T4+4	T8	Contrastes			Hora			
				T0 vs (T8 y T4+4)				T8 vs T4+4		
<b>pH</b>										
Promedio	6,29	6,16	6,19	0,083	0,004	0,001	0,442	<,001	0,067	
Máximo	6,73	6,69	6,48	0,055	0,001	0,007	0,001	-	-	
Mínimo	5,91	5,76	5,76	0,100	0,050	0,016	0,998	-	-	
Rango	0,81	0,93	0,73	0,077	0,034	0,788	0,011	-	-	
<b>AGV (mM)</b>										
Acético	69,3	74,4	70,1	12,16	0,365	0,389	0,345	0,037	0,233	
Propionico	23,3	23,0	23,4	2,90	0,969	0,937	0,825	0,249	0,258	
Butírico	11,5	10,6	11,0	1,60	0,576	0,377	0,696	0,001	0,202	
Total	108,9	112,6	111,1	15,20	0,833	0,605	0,836	0,011	0,394	
Láctico acido	4,8	4,6	6,6	1,37	0,158	0,364	0,070	<,001	0,029	
<b>AGV (mol/100 mol)</b>										
Acético	66,8	68,2	65,5	3,26	0,209	0,971	0,083	0,001	0,204	
Propionico	22,0	21,2	23,5	1,05	0,137	0,716	0,047	0,014	0,227	
Butírico	11,2	10,5	11,2	2,56	0,191	0,397	0,149	<,001	0,005	
Acético:Propionico	3,6	3,4	3,1	0,58	0,689	0,412	0,697	0,447	0,636	
(Acético + butírico):propionico	4,2	3,9	3,6	0,56	0,608	0,356	0,618	0,548	0,590	
<b><math>\text{NH}_3\text{-N}^2</math>, mg/100mL</b>										

Promedio	12,6	15,7	13,5	1,26	<,001	0,001	0,003	<,001	0,013
Máximo	24,5	27,1	25,4	3,38	0,712	0,546	0,584	-	-
Mínimo	4,6	5,9	5,4	1,00	0,477	0,272	0,620	-	-
Rango	19,9	21,0	20,1	2,80	0,922	0,803	0,759	-	-

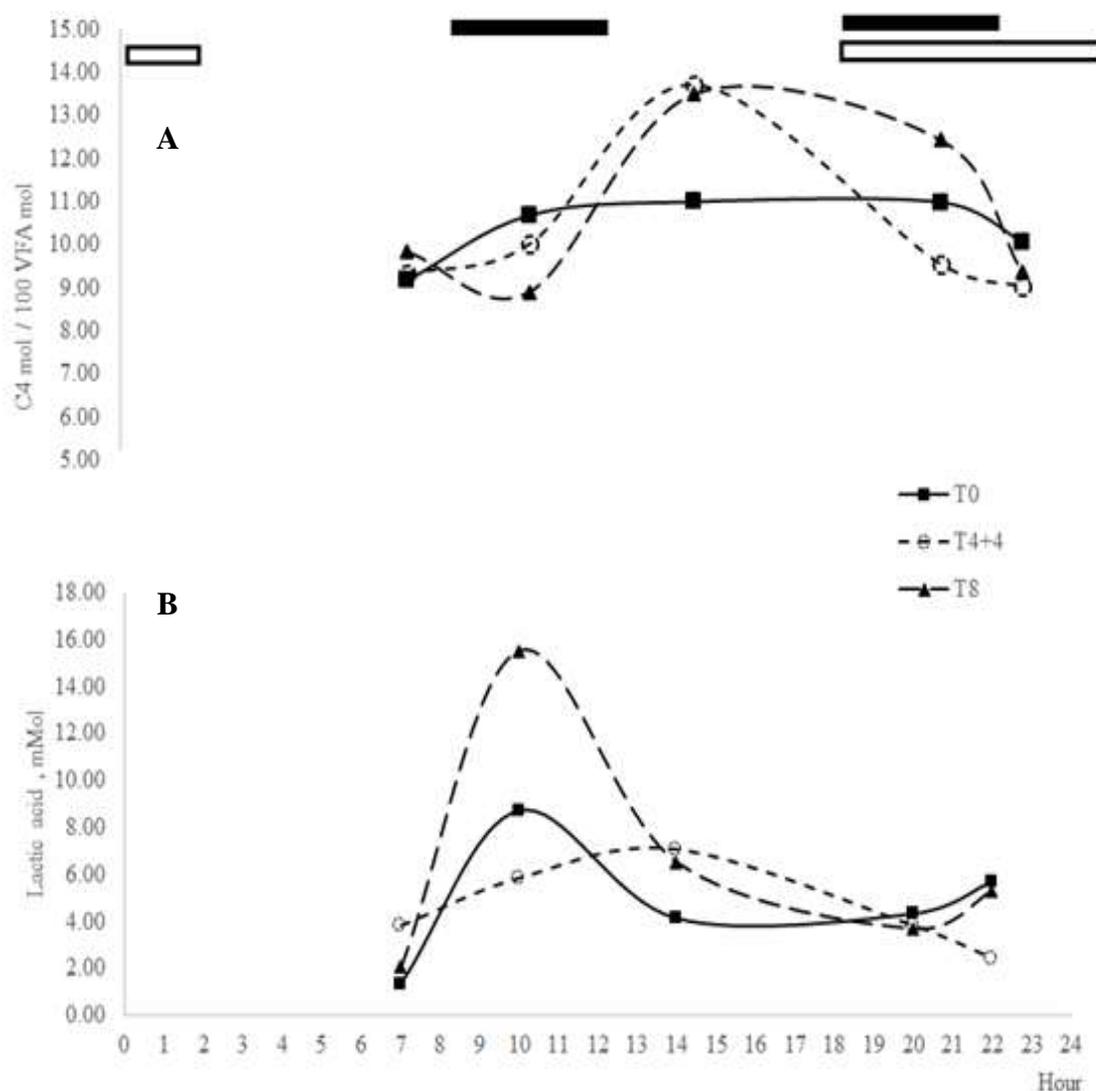
<sup>1</sup>Tratamientos: T0 = 100% RTM; T4+4 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño matutino y vespertino (de 0800 a 1200 h y de 1800 a 2200 h); T8 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño de la tarde (de 1800 a 0200 h).

<sup>2</sup>Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Trat = efecto principal del tratamiento; T0 vs (T8 y T4+4) = el contraste ortogonal comparó T0 vs el promedio de T8 y T4+4; T8 vs T4+4 = el contraste ortogonal comparó T8 vs T4+4; Hora = efecto de la hora de muestreo; Tratar x Hora = interacción entre el tratamiento y la h de muestreo



**Figura 3.** pH ruminal (A) y concentraciones de N-amoniácacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ; B) de vacas lecheras alimentadas exclusivamente con RTM (T0) o pRTM combinada con 8 h de acceso al pastoreo de alfalfa en una (T8) o dos (T4+4) sesiones. En cada h se indica con un asterisco (\*) al menos una diferencia entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Las barras de error representan EEM. Las barras sólidas y sin relleno indican el período en que T4+4 y T8 tuvieron acceso al pastoreo de alfalfa, respectivamente. Las flechas sin relleno y solidas indican el momento de suministro de RTM en T0 o de pRTM en T8 y T4+4, respectivamente.



**Figura 4.** Ácido butírico como proporción molar del total de AGV (A) y concentración de ácido láctico (B) en el rumen de vacas lecheras exclusivamente con RTM (T0) o pRTM combinada con 8 h de acceso al pastoreo de alfalfa en una (T8) o dos (T4+4) sesiones. Las barras sólidas y sin relleno indican el período en que T4+4 y T8 tuvieron acceso al pastoreo de alfalfa, respectivamente.

### Flujo de N microbiano y BN

En T0 la concentración de DP fue mayor y se observó una tendencia a aumentar la excreción diaria de DP y el flujo de N microbiano al duodeno respecto a T4+4 y T8 (Cuadro V). No se detectó efecto de los tratamientos sobre la eficacia del uso de N para la síntesis de N microbiano (Cuadro V). Respecto al uso del N (Cuadro VI), cuando las vacas consumieron únicamente RTM tuvieron mayor consumo total y digestibilidad aparente del N. Retuvieron una mayor proporción del N consumido respecto a los tratamientos que pastoreaban. La división del tiempo de pastoreo aumento el consumo de N proveniente de la alfalfa y la excreción de N fecal (g/d).

**Cuadro V.** Flujo de N microbiano al duodeno

Ítem	Tratamiento <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>	
	T0	T4+4	T8		T0 vs (T8 y T4+4)	T8 vs T4+4
Creatinina, mM	4,4	3,9	3,8	0,23	0,017	0,733
Alantoina, mM	9,3	7,1	6,9	0,89	0,005	0,827
Ácido úrico, mM	0,8	0,6	0,6	0,14	<,001	0,384
DP <sup>4</sup> , mM	10,1	7,7	7,4	0,91	0,003	0,780
DP: creatinina	2,3	2,0	2,0	0,15	0,069	0,852
DP, mmol/d	352,7	311,0	306,0	22,56	0,089	0,863
Flujo de N microbiano, g/d	251,4	215,2	218,9	16,83	0,074	0,860
Eficiencia de uso de N para síntesis de N microbiano, %	34,8	32,2	34,8	2,65	0,676	0,444

<sup>1</sup>Tratamientos: T0 = 100% RTM; T4+4 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño matutino y vespertino (de 0800 a 1200 h y de 1800 a 2200 h); T8 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño de la tarde (de 1800 a 0200 h).

<sup>2</sup>Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Trat = efecto principal del tratamiento; T0 vs (T8 y T4+4) = el contraste ortogonal comparó T0 vs el promedio de T8 y T4+4; T8 vs T4+4 = el contraste ortogonal comparó T8 vs T4+4.

<sup>4</sup>DP = Derivados Puricos

**Cuadro VI.** Consumo, digestibilidad y balance de N

Ítem	Tratamiento <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>	
	T0	T4+4	T8		T0 vs (T8 y T4+4)	T8 vs T4+4
N consumo, g/d						
RTM	735	423	417	70,3	<,001	0,866
Alfalfa	-	266	229	11,5	-	0,028
Total	735	689	646	65,0	0,039	0,242
PC Digestibilidad, %	74,7	69,9	71,0	1,48	0,011	0,505
Urinaria N excreción						
g/d	298	251	263	37,3	0,018	0,986
% del N consumido	39,7	36,4	40,7	2,88	0,105	0,264
Fecal N excreción						
g/d	186	204	163	1,9	0,872	0,029
% del N consumido	25,3	29,6	25,2	2,32	0,187	0,153
Estiercol N excreción						
g/d	484	455	425	41,8	0,051	0,182
% del N consumido	65,9	66,0	65,8	2,54	0,616	0,980
Leche N excreción						
g/d	210	213	203	22,7	0,825	0,423
% del N consumido	28,6	30,9	31,4	3,76	0,376	0,743
N balance						
g/d	41	21	17	19,05	0,067	0,527
% del N consumido	5,6	3,1	2,6	2,64	0,094	0,482

<sup>1</sup>Tratamientos: T0 = 100% RTM; T4+4 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño matutino y vespertino (de 0800 a 1200 h y de 1800 a 2200 h); T8 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño de la tarde (de 1800 a 0200 h).

<sup>2</sup>Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Trat = efecto principal del tratamiento; T0 vs (T8 y T4+4) = el contraste ortogonal comparó T0 vs el promedio de T8 y T4+4; T8 vs T4+4 = el contraste ortogonal comparó T8 vs T4+4

#### Producción, composición y perfil de ácidos grasos de leche

No se observaron diferencias entre los tratamientos para ninguna de las variables productivas, ni en la EA (Cuadro VII). En los tratamientos con acceso al pastoreo aumento la concentración de ácido trans vaccénico (TVA; C18:11 trans-11), tendieron a aumentar el ácido ruménico (C18:2 cis-9, trans-11) y ácido linoleico (C18:2), mientras que disminuyó la concentración de ácido palmítico (C16:0), ácido margárico (C17:0) de la Grasa láctea en relación T0 (Cuadro VIII).

**Cuadro VII.** Producción y composición de la leche

Ítem (kg/d, a menos que se indique)	Tratamiento <sup>1</sup>				Valor de P <sup>3</sup>	
	T0	T4+4	T8	EEM <sup>2</sup>	T0 vs (T8 y T4+4)	T8 vs T4+4
Leche,	24,2	26,3	24,8	2,00	0,445	0,459
3,5 % LCG <sup>4</sup>	27,3	28,7	27,6	2,30	0,644	0,593
Grasa, (%)	4,3	4,1	4,3	0,17	0,409	0,271
Grasa	1,0	1,1	1,0	0,09	0,836	0,721
Proteína, (%)	3,75	3,55	3,58	0,096	0,095	0,849
Proteína	0,9	0,9	0,9	0,08	0,810	0,541
Lactosa, (%)	4,8	4,8	4,8	0,05	0,648	0,526
Lactosa	1,2	1,3	1,2	0,10	0,455	0,501
Eficiencia alimenticia <sup>5</sup>	1,24	1,38	1,40	0,143	0,184	0,841

<sup>1</sup>Tratamientos: T0 = 100% RTM; T4+4 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño matutino y vespertino (de 0800 a 1200 h y de 1800 a 2200 h); T8 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño de la tarde (de 1800 a 0200 h).

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Trat = efecto principal del tratamiento; T0 vs (T8 y T4+4) = el contraste ortogonal comparó T0 vs el promedio de T8 y T4+4; T8 vs T4+4 = el contraste ortogonal comparó T8 vs T4+4.

<sup>4</sup> Leche corregida al 3,5% de Grasa (3,5 % LCG).

<sup>5</sup>3,5 % LCG producción (kg/d) / CMS (kg/d).

**Cuadro VIII.** Perfil de ácidos grasos (AG) de la leche

Ítem	Tratamiento <sup>1</sup>				Valor de P <sup>3</sup>	
	T0	T4+4	T8	EEM <sup>2</sup>	T0 vs (T8 y T4+4)	T8 vs T4+4
<i>Contenido de AG</i>						
<i>(g/100 g del total de AG)</i>						
C6:0	1,33	1,55	1,78	0,195	0,179	0,419
C8:0	1,05	1,27	1,32	0,151	0,142	0,791
C10:0	2,96	3,67	3,57	0,387	0,094	0,815
C10:1 trans	0,29	0,33	0,32	0,054	0,349	0,945
C11:0	0,057	0,07	0,45	0,232	0,458	0,255
C12:0	4,08	4,50	3,93	0,393	0,749	0,268
C13:0	0,11	0,11	1,34	0,718	0,487	0,238
C14:0	13,53	13,74	12,67	0,824	0,732	0,332
C14:1 cis-9	1,32	1,14	1,24	0,142	0,263	0,462
C15:0	1,42	1,34	1,13	0,119	0,107	0,115
C16:0	40,61	37,60	37,82	1,713	0,019	0,865
C16:1 cis-9	2,02	1,86	1,93	0,140	0,418	0,680
C17:0	0,51	0,45	0,45	0,025	0,038	0,868
C17:1 cis	0,14	0,13	0,14	0,011	0,684	0,477

C18:0	7,77	8,18	8,14	0,820	0,507	0,948
C18:1 trans	0,14	0,13	0,09	0,025	0,221	0,240
18:1 cis-9 <sup>2</sup>	17,94	18,47	18,42	1,059	0,605	0,963
C18:1 trans-11 (TVA) <sup>3</sup>	0,99	1,59	1,25	0,323	0,032	0,132
C18:2	1,57	1,31	1,35	0,124	0,092	0,817
C18:2 cis-9, trans-11 <sup>4</sup>	0,39	0,61	0,47	0,074	0,078	0,723
C18:3 cis-9, cis-12, cis-15 <sup>5</sup>	0,20	0,25	0,26	0,039	0,301	0,817
C20:0	0,14	0,23	0,09	0,061	0,830	0,146
<i>Origen de los AG</i>						
De novo (4:0–15:0)	27,49	29,12	29,54	2,007	0,334	0,848
Origen mixto (16:0+16:1)	42,636	39,46	39,76	1,780	0,016	0,825
Preformados (>17:0)	29,86	31,36	30,69	2,270	0,509	0,740
<i>Nivel de saturación</i>						
Saturados	74,92	74,13	74,48	1,460	0,620	0,805
Monoinsaturados	22,87	23,68	23,43	1,283	0,522	0,844
Poliinsaturados	2,20	2,14	2,07	0,205	0,636	0,762
Insaturados	25,07	25,83	25,51	1,458	0,632	0,828
Sumatoria AG trans	1,84	2,63	2,13	0,418	0,037	0,093
Saturados: insaturados n-6:n-3 relación	3,07	2,97	2,99	0,247	0,656	0,908
$\Delta 9$ -indise de saturacion <sup>6</sup>	0,27	0,28	0,28	0,014	0,386	0,736
Índice aterogenico <sup>7</sup>	4,06	3,91	3,72	0,403	0,441	0,606

<sup>1</sup>Tratamientos: T0 = 100% RTM; T4+4 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño matutino y vespertino (de 0800 a 1200 h y de 1800 a 2200 h); T8 = 60% pRTM más acceso a pastura de alfalfa después del ordeño de la tarde (de 1800 a 0200 h).

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Trat = efecto principal del tratamiento; T0 vs (T8 y T4+4) = el contraste ortogonal comparó T0 vs el promedio de T8 y T4+4; T8 vs T4+4 = el contraste ortogonal comparó T8 vs T4+4.

<sup>2</sup> Acido oleico.

<sup>3</sup> Acido vancenico.

<sup>4</sup> Acido rumenico.

<sup>5</sup> Acido linoleico.

<sup>6</sup>Calculado como:  $(14:1 \text{ cis-9} + 16:1 \text{ cis-9} + 18:1 \text{ cis-9} + 18:2 \text{ cis-9,trans-11}) / (14:0 + 16:0 + 18:0 + 18:1 \text{ trans-11} + 14:1 \text{ cis-9} + 16:1 \text{ cis-9} + 18:1 \text{ cis-9} + 18:2 \text{ cis-9,trans-11})$ .

<sup>7</sup>Calculado como  $(12:0 + 4 \times 14:0 + 16:0) / (\text{MUFA} + \text{PUFA})$

## EXPERIMENTOS II y III (Publicación 2)

### Materiales y métodos

#### Animales, Diseño Experimental y Tratamientos

Los experimentos II y III se realizaron simultáneamente del 6 de octubre al 1 de diciembre de 2018. En el Experimento II, se utilizaron nueve vacas Holstein, con una producción de leche durante la lactancia previa corregida a 305 días de 7247 kg (DE = 642) y que al inicio del experimento, tenían en promedio un PV de 641 kg (SD = 44), 232 días de lactancia (DE = 48) y número de partos 3.8 (DE = 1.6). Las vacas fueron bloqueadas por PV, producción de leche en la lactancia previa y número de partos, se distribuyeron en 4 cuadrados, y dentro de cada cuadrado se asignaron aleatoriamente a una secuencia de tratamiento de acuerdo con el diseño experimental de cuadrado latino 3 x 3 replicado 3 veces.

La rutina de alimentación fue igual para todos los tratamientos, consistió en 5h de acceso a pRTM (ofrecida al 30% del consumo *ad libitum*) más 17h de acceso a una parcela de alfalfa con una asignación de 18 kg de MS por encima de 5 cm / vaca por día. Los tratamientos consistieron en cómo la pastura o el forraje se presentó a las vacas: 1) pastoreo directo de la pastura (**PAS**), 2) FF segado inmediatamente antes del acceso de las vacas a la parcela (**SEG**) o 3) forraje oreado al sol durante 24h (**ORE**) antes del acceso de las vacas a la parcela.

En el Experimento III, tres vacas secas (promedio  $682 \pm 18$  kg PV) equipadas con cánula ruminal permanente (Ankom Technology Corporation, Macedon, NY) fueron asignadas a los mismos tratamientos descritos para el experimento II, en una secuencia de acuerdo al diseño experimental de cuadrado latino de 3 x 3.

La duración de ambos experimentos fue de 57 d en total, dividido en tres períodos de 19 d cada uno, que comprendían 12 d para adaptación a las dietas y luego 7 d para recolección de datos y muestras. Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día a las 06:30 y 17:00 h. Diariamente de 1200h hasta el ordeño vespertino (1700 h) los animales permanecieron alojados en corrales individuales (2,0 x 4,0 m) a cielo abierto con comederos individuales y acceso *ad libitum* al agua. La distancia máxima recorrida diariamente por las vacas entre las parcelas de Alfalfa, los corrales a cielo abierto y la sala de ordeño fue de 600 m. Los datos meteorológicos se obtuvieron del sitio web del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (<http://www.inia.uy/gras/Clima/Banco-datos-agroclimatico>, último acceso 3 de marzo de 2022). Del primer al último día de medición la temperatura media a una altura de 2 m varío en 1 °C y la duración del día aumento 2 h. Las temperaturas medias en los períodos 1, 2 y 3 fueron 18,8, 17,9 y 17,8 °C, respectivamente. Las temperaturas extremas para los periodos uno, dos y tres respectivamente fueron, las máximas 21.7, 24.8, 23.5 °C y las mínimas 11.3, 12.9, 13.8 °C. La salida del sol se produjo a las 0618 h, y la puesta de sol se produjo a las 1850 h del primer día del período 1, y a las 05:25 h y 19:52 h, respectivamente, durante el último día del período 3.

### Manejo de la alimentación

Previo al inicio de los experimentos todos los animales pastorearon en la parcela experimental y fueron acostumbrados a consumir pastura segada. Durante los experimentos, en todos los tratamientos los animales permanecieron 17 h por día en la parcela, luego del ordeño vespertino (17:00 h) accedieron a una parcela nueva y permanecieron hasta las 12:00 h del día siguiente (excepto durante el ordeño matutino). Las parcelas individuales se delimitaron con cerca eléctrica. El área de cada parcela se ajustó, para ofrecer 18 kg/d de MS de pastura, a más de 5 cm del suelo (como se describe más adelante). La disponibilidad promedio de la pastura para los tres períodos fue de  $1776 \pm 912$  kg MS/ha y estuvo compuesta en MS por 76,8% ( $\pm 0,7\%$ ) alfalfa (*Medicago Sativa*, ep. Crioula), 9,2% ( $\pm 2,1\%$ ) *Trifolium pratense*, 5,2% ( $\pm 2,6\%$ ) gramíneas spp., 2,8% ( $\pm 0,1\%$ ) de malezas de hoja ancha y 4,6% ( $\pm 1,1\%$ ) de material muerto (promedio de los tres períodos). Durante los experimentos la pastura o el forraje de alfalfa se ofreció con menos de 8 nudos de desarrollo. La composición química de la pastura, el forraje oreado y el FF segado se presenta en el Cuadro IX.

El objetivo buscado con el oreo fue duplicar la concentración de nutrientes. Utilizar el tiempo de oreo como medida de control obedeció a que este es el criterio utilizado comúnmente en los sistemas comerciales, mientras que el tiempo de oreo (24h) se definió tomando muestras a intervalos de 5 h durante 30 h, repitiendo este procedimiento en 7 días diferentes, previo a comenzar los experimentos. En los tratamientos SEG y ORE la pastura fue segada con una segadora de tambor (Minos Agricultural Machinery, T-TCBM 1650, Turquía) diariamente 16:30 h y se acondicionó inmediatamente en dos hileras (o gavillas). En el tratamiento ORE el forraje se oreo durante 24 h. En los tratamientos SEG y ORE diariamente 09:00 h del día siguiente se acondicionó nuevamente el forraje juntándolo en dos hileras (o gavillas). El hilerado del forraje se realizó mediante rastrillaje manual para extremar el cuidado y evitar el daño mecánico (i.e. desprendimiento de hojas).

El CMS *ad libitum* de RTM se determinó individualmente 10 d previo al inicio, ofreciendo cantidades crecientes hasta obtener rechazos mayores al 5% por 6 d consecutivos. La RTM se formuló para cubrir los requerimientos de vacas con 650 kg de PV y produciendo 28 kg de leche por día según lo recomendado por NRC (2001). Durante los experimentos, en todos los tratamientos la pRTM se asignó individualmente al 30% de CMS *ad libitum*. La pRTM se preparó diariamente y el total asignado a cada vaca se suministró en una única vez al día (1200 h), en los corrales donde permanecieron hasta el ordeño de la tarde (17:00h). La proporción de cada ingrediente y la composición química de la pRTM y de los principales ingredientes se presentan en la Cuadro IX.

**Cuadro IX.** Proporción de ingredientes y composición química (% MS, a menos que se indique otra cosa, y desvió estándar entre paréntesis) de la pRTM, la pastura (PAS), el forraje fresco segado (SEG) y el forraje oreado durante 24 h (ORE)

Ítem	pRTM	PAS	SEG	ORE	MSPE	GM	HS
Ingredientes de la RTM							
Silo de maíz planta entera (MSPE)	58,0						
Grano de Maíz molido (GM)	17,3						
Harina de soja (HS)	22,6						
Vitamina Premix - Mineral <sup>1</sup>	1,7						
Policilozano	0,07						
Magnesio oxide	0,10						
Sodio bicarbonato	0,15						
Composición de nutrientes							
MS, %							
alimento tal cual (fresco)	43,2 (2,9)	21,0 (1,1)	21,1 (0,7)	40,2 (9,8)	26,7 (0,4)	86,3 (0,2)	88,2 (0,4)
MO	91,1 (0,3)	87,7 (0,9)	87,8 (0,5)	88,3 (2,7)	94,5 (0,0)	98,6 (0,1)	93,1 (0,4)
FDN	32,6 (2,8)	32,2 (3,6)	31,7 (3,3)	27,8 (1,0)	60,0 (1,2)	14,8 (0,4)	12,6 (0,2)
FDA	15,7 (0,3)	22,1 (1,7)	23,3 (1,8)	21,8 (0,7)	30,5 (0,8)	2,8 (0,1)	8,3 (0,1)
CNF <sup>2</sup>	38,6 (1,4)	32,5 (1,2)	32,7 (1,1)	36,8 (1,7)	25,2 (0,5)	73 (0,7)	33,5 (0,9)
Éter extracto CHS <sup>3</sup>	1,4 (0,3)	1,6 (0,2)	1,8 (0,3)	2,1 (0,8)	-	3,4 (0,1)	1,3 (0,1)
PC	-	9,6 (1,1)	9,6 (1,1)	8,2 (1,1)	-	-	-
NIDN	18,4 (1,3)	21,4 (0,5)	21,6 (0,3)	21,4 (1,1)	7,3 (0,1)	7,3 (0,3)	45,8 (0,2)
NIDA	4,1 (1,0)	16,1 (0,8)	16,3 (1,2)	13,1 (1,2)	2,0 (0,2)	7,4 (0,03)	7,1 (1,0)
NPN <sup>4</sup>	8,0 (2,1)	7,6 (1,3)	7,1 (1,2)	7,3 (1,3)	1,8 (0,4)	14,1 (1,0)	16,2 (1,2)
NPS <sup>5</sup>							
ENL, Mcal/kg de MS	1,88	1,48	1,50	1,57	1,40	2,03	2,33
Tamaño de partículas distribución, % alimento fresco							
19 mm							
8 a 19 mm							
1.8 a 8 mm							
1.8 mm							

<sup>1</sup> Aporta (por kg de MS): 0,85 g Cu; 2,6 g Zn; 0,9 g Se; 1,0 g manganeso; 23 mg I; 3 mg Co; 63.700 UI vitamina A; 12.700 UI de vitamina D; 250 UI de vitamina E.

<sup>2</sup> % carbohidratos no fibrosos (CNF) = 100 - (% FDN + % PC + % estrato a éter + % cenizas)

<sup>3</sup> Carbohidratos solubles en agua (CHS)

<sup>4</sup> Nitrógeno no proteico (NPN)

<sup>5</sup> Nitrógeno y proteína soluble (NPS)

### Consumo

El consumo diario de pRTM y alfalfa se determinó para cada vaca-parcela, del 13d al 17d de cada periodo. El consumo de pRTM se calculó por diferencia entre los kg ofrecidos y rechazados. Los rechazos de pRTM se recogieron entre 1045 h y 1100 h diariamente, del 14d al 18d de cada periodo. El consumo de alfalfa se estimó por diferencia entre la masa de forraje previo al ingreso y posterior a la salida de las vacas de la parcela. Los cortes para determinar la masa de forraje y la toma de muestras se realizaron todos a 5cm del suelo con una segadora (Toro CNB94, Toro Company). Diariamente se ajustó el área de cada parcela para que la masa de forraje previo al ingreso fuera 18kg MS por parcela. Entre 09:30 h y 10:30 h se cortó, colectó y peso el forraje en 5 m<sup>2</sup> (0,5 m ancho × 10 m largo) de cada parcela, y se utilizó el % de MS del día anterior para calcular el área necesaria en cada parcela. El área por vaca/d La masa de forraje posterior a la salida de las vacas se determinó pesando el total de forraje remanente en cada parcela, entre 12:00h y 13:30h. En el tratamiento GRA se cortó, colectó y peso el forraje de toda el área en cada parcela. En los tratamientos SEG y ORE se colectó y peso el forraje remanente en cada parcela. Las heces se retiraron manualmente antes de colectar el forraje remanente.

El consumo de MS, MO, PC, FDN, FDA y CNF se calculó utilizando los datos de la composición química del forraje previo al pastoreo, el forraje posterior al pastoreo y la pRTM. Para el análisis de composición química se tomaron muestras (500 g aprox.) diariamente para cada vaca-parcela, de la oferta de alfalfa inmediatamente antes del ingreso de las vacas a la parcela (1700 h) y de la oferta de pRTM inmediatamente después de suministrarla (12:00 h) directamente de cada comedero. Las muestras de rechazo de pRTM se colectaron 11:00h y las muestras de alfalfa remanente se tomaron entre 12:00 y 13:30 h del total colectado. Todas las muestras se conservaron a -20°C para su posterior análisis.

### Digestibilidad aparente

Los 15d y 16d de cada periodo se determinó la digestibilidad aparente de los nutrientes indirectamente utilizando la FDNi como marcador interno (Huhtanen et al., 1994). El procedimiento fue igual al descrito para el Experimento I. Se utilizaron 3 vacas secas (671 ± 64,9 kg de PV) para la incubación en rumen durante 288h. Alimentadas con una dieta compuesta en base MS por (67%) heno de gramíneas spp, (24.7%) harina de soja extraída por solvente paletada y (8.3%) grano de maíz seco molido, más un núcleo vitamínico mineral, de acuerdo con los procedimientos estándar de NorFor (2007).

### Comportamiento alimenticio

El 17d y 18d de cada período, seis observadores entrenados registraron el comportamiento alimenticio durante 48 h (excepto durante el ordeño) cada 5 min (Hirata et al., 2002), lo que proporcionó 288 observaciones / vaca / d. Las categorías de comportamientos registrados, los procedimientos y el procesamiento de los datos fueron los descriptos previamente para el Experimento I.

### Tasa de pasaje

La tasa de pasaje de las partículas de forraje a través del tracto digestivo se estimó usando fibra marcada con dicromato de sodio ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) como mordente. La fibra marcada se preparó a partir de heno de alfalfa de la forma sugerida por Udén et al. (1980), resultando en un material con 4,6% de Cr (base seca). Las dietas experimentales no aportaban Cr adicional. En el día 15 de cada período, a las 08:00 h, 150 g de la fibra marcada se administraron de forma oral a cada animal en una única dosis, y se tomaron muestras de heces directamente del recto a las 0, 6, 9, 13, 21, 34, 38, 48, 50, 62, 74 y 98 h luego de la dosificación del marcador. Las muestras de heces fueron congeladas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Una vez descongeladas a temperatura ambiente, se secaron en estufa de aire forzado a  $60^\circ\text{C}$  y se molieron a 1 mm en un Molino Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, EEUU). Luego 2g de cada muestra se quemaron en una mufla a  $600^\circ\text{C}$  por 3 h y las cenizas se trataron con solución de molibdato de sodio (10 g), ácido sulfúrico ppa (150 ml), ácido perclórico al 70% (200 ml) y agua destilada (150 ml), para solubilizar el óxido de cromo. La concentración de cromo en la solución se determinó con un espectrofotómetro de absorción atómica (Thermo Scientific™ iCETM 3000), a 360 nm de absorbancia y usando agua destilada como blanco, según el método de Williams et al. (1962). Las curvas individuales de excreción de Cr se ajustaron a un modelo bi compartimental propuesto por Grovum y William, (1973):

$$Y = Ae^{-k_1(t-TT)} + Ae^{-k_2(t-TT)}$$

donde Y (mg/kg MS) es la concentración del marcador en heces al tiempo t; A es un parámetro de escala; TT (h) es el tiempo calculado para la primera aparición del marcador en las heces;  $k_1$  ( $\text{h}^{-1}$ ) es la tasa de pasaje del retículo-rumen;  $k_2$  ( $\text{h}^{-1}$ ) es la tasa de pasaje por el resto del tracto gastrointestinal; El tiempo medio de retención en retículo-rumen (TMRR) y el tiempo medio de retención en el tracto posterior (TMRP) fueron calculados como  $1/k_1$  y  $1/k_2$ , respectivamente. El tiempo medio de retención total (TMRT) fue calculado como  $\text{TMRT} = \text{TMRR} + \text{TMRP} + \text{TT}$  (Colucci et al., 1990).

### Producción y composición de leche (Experimento II- Vacas lecheras)

La producción de leche se determinó a los d 14 y 18 de cada período en los dos ordeños. Se recolectaron muestras individuales de leche en 4 ordeños consecutivos a los d 15 y 16 de cada periodo, utilizando bronopol como conservante; las muestras se usaron para determinar grasas, proteínas y lactosa mediante análisis infrarrojo (modelo 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). El rendimiento de FCM al 3,5 % se calculó según Tyrrell y Reid (1965), y la EA se calculó como el rendimiento de FCM al 3,5 %, kg/CMS, kg.

### Fermentación ruminal (Experimento III – Vacas secas canuladas)

El 13d de cada período a través de la canula se tomaron muestras (aproximadamente 50 ml) del contenido ruminal de cada vaca, a cada h durante 12 h (08:00 h a 20:00 h) y a las 00:00 h y 04:00 h. Los procedimientos para determinar

pH, N-NH<sub>3</sub> y AGVs fueron los descriptos para el Experimento I. Para la determinación de AGVs, se analizaron las muestras tomadas a las 04:00, 08:00, 14:00 y 20:00 h.

#### Contenido y tamaño de las partículas del rumen (Experimento III – Vacas secas canuladas)

El 19 d de cada periodo a las 21h se realizó el vaciado total del contenido ruminal simultáneamente a las tres vacas canuladas. El contenido sólido fue evacuado manualmente, luego el contenido líquido con un recipiente de plástico y por último el remante fue absorbido con paños de quesería. Todo el contenido se filtró a través de 4 capas de paño de quesería para separar las partículas sólidas del líquido, almacenándose por separado en contenedores de 60l. Cada fracción (sólido y líquido) fue pesada, homogeneizada mediante mezclador y se tomó una muestra de la fracción sólida (2.0 kg) y líquida (1.5 l) por separado. Posteriormente la fracción sólida y líquida se mezclaron, reconstituyendo el contenido original y se tomó una muestra del contenido ruminal reconstituido (2.0 kg). Todas las muestras se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis. Finalizado el procedimiento se reintrodujo el total del contenido ruminal. En el laboratorio las muestras se descongelaron durante una noche a temperatura ambiente. Del contenido reconstituido, la fracción sólida y la fracción líquida, una sub muestra se secó a 60°C y se analizó la MO, FDN y FDA .

Otra sub muestra de la fracción sólida se utilizó para determinar el tamaño de las partículas en el rumen por tamizado húmedo. El tamizado se realizó siguiendo la técnica descrita por Waghorn et al. (1986) con las modificaciones que se detallan. Brevemente, en 1 l de agua se remojo 50,0g de la fracción sólida y se agitó hasta que no hubieran grumos. La solución se tamizó durante 10 min, con ingreso de agua por la parte superior a un caudal aproximado de 10 l/min, y se repitió este procedimiento tres veces durante 5 min cada vez. Se utilizaron ocho tamices de malla de alambre (90 mm de diámetro) con orificios cuadrados de tamaños de apertura de 13,20; 9,50; 4,75; 3,35; 2,63; 1,18; 0,60; y 0,15 mm de lado, dispuestos verticalmente en orden descendente del mayor al menor tamaño de apertura. El material retenido en cada tamiz se recuperó en papel de filtro y se secó a 100 °C durante 24 h para determinar el peso seco de las partículas. El material retenido en los tamices con mallas mayor a 4,75 mm se consideró como “partículas grandes”, entre 4,75 y 1,18 mm “partículas medianas” y menor a 1,18 mm “partículas pequeñas”. La materia seca retenida en cada tamiz, se expresó como porcentaje de la MS total. La cantidad de material no retenido en los tamices se determinó por diferencia del peso húmedo del total de la toma de ensayo y la suma de las partículas retenidas en los tamices, la diferencia se denominó “fracción soluble”.

#### Análisis químicos

Las técnicas utilizadas fueron las mismas que se describieron para el Experimento I. Los azúcares solubles en agua fueron extraídos siguiendo el procedimiento sugerido por Thomas (1977) y medidos de acuerdo al método propuesto por Yemm y Willis (1954).

### Cálculo del BE y BN

El BE y BN se calcularon como se describió para el Experimento I, con la excepción que el BN se calculó durante los días 15 y 16 de cada período.

### Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron utilizando el software SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc.). Inicialmente, los datos se analizaron en busca de valores atípicos y la normalidad de los residuos se verificó utilizando procedimientos univariados (PROC UNIVARIATE). Los datos de ingesta, digestibilidad de nutrientes, tasa de pasaje de la digesta, contenido ruminal, tamaño de partículas en el rumen, ingesta de energía, producción de leche, BE, BN, producción y composición de leche y EA se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED con el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + C_j(S_i) + P_k + T_l + e_{ijkl},$$

donde  $Y_{ijkl}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media general,  $S_i$  es el efecto aleatorio del cuadrado ( $i = 1$  a  $3$ ),  $C_j(S_i)$  es el efecto aleatorio de las vacas anidadas dentro del cuadrado ( $j = 1$  a  $3$ ),  $P_k$  es el efecto aleatorio del período ( $k = 1$  a  $3$ ),  $T_l$  es el efecto fijo del tratamiento ( $l = \text{PAS, ORE o SEG}$ ) y  $e_{ijkl}$  es el error residual.

Los datos de las variables con mediciones repetidas en el tiempo en cada periodo como pH ruminal, N-NH<sub>3</sub>, AGV y comportamiento alimentario fueron analizados mediante el procedimiento PROC MIXED con el siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + S_i + C_j(S_i) + P_k + T_l + H_m + T_l \times H_m + e_{ijklm},$$

donde  $Y_{ijklm}$  es la variable dependiente,  $\mu$  es la media general,  $S_i$  es el efecto aleatorio del cuadrado ( $i = 1$  a  $3$ ),  $C_j(S_i)$  es el efecto aleatorio de las vacas anidadas en el cuadrado ( $j = 1$  a  $3$ ),  $P_k$  es el efecto aleatorio del período ( $k = 1$  a  $3$ ),  $T_l$  es el efecto fijo del tratamiento ( $l = \text{PAS, SEG o ORE}$ ),  $H_m$  es el efecto fijo de la Hora de medición,  $T_l \times H_m$  es el efecto fijo de la interacción entre tratamiento y Hora de medición, y  $e_{ijklm}$  es el error residual. La interacción período  $\times$  vaca dentro de un cuadrado fue objeto de mediciones repetidas, y AR (1) fue la estructura de covarianza elegida para datos espaciados uniformemente (es decir, eventos de comportamiento; Littell et al., 1998), mientras que el poder espacial (SP (POW)) para datos espaciados irregularmente (es decir, pH ruminal, NH<sub>3</sub>-N, ácido láctico y AGV). El efecto tratamiento  $\times$  período se probó en ambos modelos, pero no fue significativo y, por lo tanto, se eliminó. En el experimento III no se incluyó el efecto del cuadrado en el modelo por ser un único cuadrado latino. Las medias se compararon con una prueba de Tukey, y se declararon diferencias significativas en  $P \leq 0,05$ , y se discutieron las tendencias en  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## Resultados Experimento II

### Comportamiento alimenticio

La observación de los comportamientos come, rumia y otros expresados como proporción del total de observaciones en 24h para cada tratamiento se presenta en el Cuadro X. En el tratamiento ORE las vacas presentaron una menor proporción de observaciones comer respecto a los otros dos tratamientos, y mayor proporción de observaciones rumia respecto a PAS. Se detectó una tendencia ( $P = 0.0914$ ) del tratamiento SEG a presentar más eventos rumia respecto a PAS. No se detectaron interacciones entre el tratamiento y la h del día para ninguno de los comportamientos.

**Cuadro X.** Comportamientos (expresados como proporción del total de observaciones realizadas por animal)

Ítem	Tratamiento <sup>1</sup>				Valor de $-P^3$		
	PAS	SEG	ORE	EEM <sup>2</sup>	Tratamiento	Hora	Trat X Hora
Come	0,38 a	0,36 a	0,32 b	0,015	0,003	<,001	0,309
Rumia	0,30 by	0,33 abx	0,34 a	0,015	0,012	<,001	0,331
Otros	0,33	0,31	0,34	0,025	0,154	<,001	0,674

<sup>a,b</sup> Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>x,y</sup> Dentro de una fila, las medias con diferentes superíndices son diferentes ( $P < 0,10$ ).

<sup>1</sup>Tratamientos: (PAS) pastoreo directo, (SEG) pastura segada o (ORE) forraje oreado durante 24h. Todas las vacas recibieron además pRTM 30% del consumo ad libitum

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Tratamiento = efecto fijo del tratamiento; Hora = efecto fijo de la hora de muestreo; Tratar x Hora = interacción entre el tratamiento y la h de muestreo

### Consumo, digestibilidad, consumo de nutrientes digestibles y tasa de pasaje

La composición de la dieta, el consumo, la digestibilidad aparente, el consumo de nutrientes digestibles y la tasa de pasaje de las partículas de forraje para los tres tratamientos se presenta el Cuadro XI. En el tratamiento ORE las vacas presentaron un mayor CMS de alfalfa, CMS total y de todas las fracciones analizadas respecto a los otros dos tratamientos, con excepción del consumo de FDN que fue similar en los tratamientos ORE y SEG. El consumo de FDA tendió ( $P = 0.086$ ) aumentar en el tratamiento ORE respecto a SEG.

En el tratamiento ORE la digestibilidad aparente de la MS y FDN disminuyó y tendió a disminuir para la MO y FDA, respecto a PAS. En el tratamiento SEG la digestibilidad de todas las fracciones analizadas presentó valores intermedios que no difirieron respecto a los otros dos tratamientos, aunque tendió a reducir la digestibilidad de la FDN (Cuadro XI) y el N (Cuadro XIII) respecto a PAS.

Comparado al tratamiento PAS la k2 fue menor en ORE y tendió a disminuir en SEG. El TMRP fue menor en el tratamiento PAS respecto a ORE (Cuadro XI).

**Cuadro XI.** Composición de la dieta, consumo y digestibilidad de los nutrientes, consumo de nutrientes digestibles y tasa de pasaje de las partículas de forraje

Ítem	Tratamiento <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Valor de -P
	PAS	SEG	ORE		
Composición de la dieta					
MS, %	25,8 b	25,6 b	41,0 a	3,45	<,001
FDN, %	32,2 a	32,1 a	29,4 b	0,90	<,001
FAD, %	19,8	20,2	19,8	0,68	0,57
PC, %	20,3	20,6	20,6	0,27	0,76
CMS, kg/d					
Alfalfa	11,1 b	11,7 b	14,6 a	0,90	<,001
RTM	6,2	6,2	6,2	0,28	0,169
Total	17,3 b	17,9 b	20,8 a	1,12	<,001
Alfalfa del total MS, %	63,5 b	65,0 b	69,9 a	1,32	<,001
Consumo de nutrientes, kg/d					
MO	15,4 b	16,0 b	18,6 a	1,04	<,001
FDN	5,57 b	5,78 ab	6,1 a	0,43	0,022
FAD	3,44 b	3,72 aby	4,1 ax	0,27	0,005
EE	0,27 c	0,33 b	0,45 a	0,02	<,001
CNF	6,04 b	6,30 b	7,70 a	0,39	<,001
Digestibilidad, %					
MS	61,4 a	57,8 ab	54,6 b	2,68	0,044
MO	63,7 x	60,5 xy	57,5 y	2,38	0,053
FDN	43,4 ax	33,0 aby	32,0 b	4,34	0,039
FAD	40,7 x	31,8 xy	30,1 y	3,90	0,050
Consumo de nutrientes digestibles, kg/d					
MS	10,6 ab	9,8 b	12,0 a	0,67	0,014
MO	9,8 b	9,2 b	11,2 a	0,60	0,007
FDN	2,4	1,9	1,9	0,29	0,153
FDA	1,4	1,2	1,2	0,18	0,476
Tasa de pasaje <sup>3</sup>					
k1, h <sup>-1</sup>	0,047	0,051	0,052	0,0052	0,425
k2, h <sup>-1</sup>	0,140 a	0,101 aby	0,088 bx	0,0193	0,018
TT, h	7,4	7,9	8,2	1,01	0,830
TMRR, h	22,8	20,5	20,2	2,77	0,571
TMRP, h	8,4 b	12,0 ab	13,6 a	2,15	0,017
TMRT, h	38,55	40,19	50,36	8,30	0,317

<sup>a b</sup> Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>x,y</sup> Dentro de una fila, las medias con diferentes superíndices son diferentes ( $P < 0,10$ ).

<sup>1</sup>Tratamientos: (PAS) pastoreo directo, (SEG) pastura segada o (ORE) forraje oreado durante 24h. Todas las vacas recibieron además pRTM 30% del consumo ad libitum

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup> k1 es la tasa de pasaje por retículo-rumen; k2 tasa de pasaje del resto del tracto digestivo; TT = tiempo calculado para la primera aparición en heces; TMRR = tiempo medio de retención en el retículo-rumen; TMRP = tiempo medio de retención en el tracto posterior; TMRT = tiempo medio de retención total.

### Producción y composición de la leche

En la Cuadro XII se presentan los resultados de producción y composición de leche obtenidos en cada tratamiento. La producción diaria de leche, proteína y lactosa fue menor cuando se ofreció el forraje oreado respecto a los otros dos tratamientos. El pastoreo disminuyó el porcentaje de grasa láctea respecto a los otros dos tratamientos y aumento la concentración de proteína respecto a ORE. La EA fue menor en ORE comparado a los otros tratamientos.

**Cuadro XII.** Producción y composición de la leche

Item (kg/d, a menos que se indique)	Tratamiento <sup>1</sup>				Valor de -P
	PAS	SEG	ORE	EEM <sup>2</sup>	
Leche,	26,4 a	25,7 a	24,3 b	2,20	<,001
LCG 3,5 %	26,6 a	26,5 a	25,2 b	2,40	0,038
Grasa	0,94	0,95	0,92	0,089	0,248
Grasa, (%)	3,65 b	3,79 a	3,81 a	0,238	<,001
Proteína	0,90 a	0,87 a	0,82 b	0,047	<,0001
Proteína, (%)	3,44 ax	3,41 aby	3,39 b	0,119	<,001
Lactosa	1,23 a	1,19 a	1,13 b	0,118	<,001
Lactosa, (%)	4,63	4,62	4,63	0,077	0,666
Eficiencia alimenticia <sup>3</sup>	1,61 a	1,53 a	1,25 b	0,146	<,001

<sup>a b</sup> Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>x,y</sup> Dentro de una fila, las medias con diferentes superíndices son diferentes ( $P < 0,10$ ).

<sup>1</sup>Tratamientos: (PAS) pastoreo directo, (SEG) pastura segada o (ORE) forraje oreado durante 24h. Todas las vacas recibieron además pRTM 30% del consumo ad libitum

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup> LCG 3,5 % producción (kg/d)/CMS (kg/d).

### Balance de energía y BN

El consumo, balance y eficiencia de uso del N y la energía se presenta en la Cuadro XIII. El consumo total de energía y la energía aportada por el FF de alfalfa fue mayor en ORE respecto a los otros dos tratamientos. Los requerimientos de mantenimiento y producción d energía fueron similares entre tratamientos. El BE fue más positivo y la eficiencia de uso de la energía fue menor en el tratamiento ORE respecto a los otros dos tratamientos. El consumo total de N, de N digestible y el N aportado por el FF de alfalfa fue mayor en ORE respecto a los otros dos tratamientos. La digestibilidad aparente del N tendió a ser mayor en PAS respecto a SEG. La excreción de N en leche fue menor y el BN fue mayor en ORE respecto a los otros dos tratamientos.

**Cuadro XIII.** Balance de Energía y N

Item	Tratamiento <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Valor de -P
	PAS	SEG	ORE		
<i>EN<sub>L</sub> consumo, Mcal/d</i>					
RTM	11,70	11,73	11,76	0,536	0,053
Alfalfa	16,35 b	17,68 b	22,88 a	1,320	<,0001
Total	28,06 b	29,41 b	34,56 a	1,743	<,0001
<i>EN<sub>L</sub> requerimientos, Mcal/d</i>					
Mantenimiento	9,95	10,25	9,89	0,185	0,377
Producción de leche	19,33	19,73	18,62	1,370	0,121
Total	26,94	29,44	28,29	1,331	0,144
EN <sub>L</sub> balance	1,12 b	-0,14 b	6,41 a	1,370	<,001
EN <sub>L</sub> Producción de leche / EN <sub>L</sub> consumo	0,70 a	0,68 a	0,54 b	0,056	<,001
<i>N Consumo, g/d</i>					
RTM	183,3	183,7	184,5	0,05	0,050
Alfalfa	379,2 b	408,0 b	504,0 a	0,02	<,001
Total	562,6 b	591,7 b	688,5 a	0,37	<,001
N Digestibilidad, %	71,33 x	66,17 y	70,08 xy	2,998	0,079
Consumo de N digestible	401,3 b	391,5 b	476,5 a	36,80	0,001
<i>Orina N excreción</i>					
g/d	227,3	195,3	211,1	18,26	0,267
% del N consumido	40,6 x	33,8 xy	31,3 y	3,49	0,056
<i>Heces N excreción</i>					
g/d	160,74	198,95	206,9	19,79	0,015
% del N consumido	28,7 y	33,8 x	29,9 xy	2,99	0,082
<i>Estiércol N excreción</i>					
g/d	388,08	396,47	415,9	29,115	0,406
% del N consumido	69,2	67,4	61,4	4,93	0,150
<i>Leche N excreción</i>					
g/d	138,7	135,9	129,8	11,09	0,222
% del N consumido	25,3 a	23,3 a	19,3 b	2,910	0,001
<i>N balance</i>					
g/d	35,8 b	58,7 b	143,9 a	44,25	0,001
% del N consumido	5,4 b	9,2 b	19,3 a	6,37	0,013

*a b Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ( $P \leq 0,05$ ).*

*x,y Dentro de una fila, las medias con diferentes superíndices son diferentes ( $P < 0,10$ ).*

<sup>1</sup>*Tratamientos: (PAS) pastoreo directo, (SEG) pastura segada o (ORE) forraje oreado durante 24h. Todas las vacas recibieron además pRTM 30% del consumo ad libitum*

<sup>2</sup>*Error estándar de la media*

### Resultados Experimento III

#### Comportamiento alimenticio, consumo y digestibilidad de los nutrientes

En el Cuadro XIV se presentan los resultados del comportamiento alimenticio, el consumo y la digestibilidad para los tres tratamientos. No se detectaron diferencias entre los tratamientos para ninguna de las variables estudiadas del comportamiento alimenticio, con excepción de una tendencia a aumentar la proporción de observaciones de rumia en ORE respecto a SEG. En los tres tratamientos el consumo y digestibilidad de todas las fracciones estudiadas fue similar.

**Cuadro XIV.** Comportamiento alimenticio, consumo y digestibilidad de los nutrientes

Item	Tratamiento <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Valor de $-P^3$		
	PAS	SEG	ORE		Tratamiento	Hora	Trat X Hora
Comportamientos, proporción del total de observaciones en 24h							
Come	0,27	0,26	0,24	0,024	0,635	<,001	0,900
Rumia	0,27 xy	0,25 y	0,32 x	0,019	0,089	<,001	0,124
Otros	0,46	0,49	0,43	0,024	0,323	<,001	0,266
Consumo, kg MS/d							
Alfalfa	9,1	10,5	11,1	0,98	0,424	-	-
RTM	4,3	4,4	4,4	0,24	0,537	-	-
Total	13,4	15,1	15,3	1,07	0,489	-	-
Alfalfa del total MS, %	67,7	69,8	72,7	3,62	0,312	-	-
Consumo de nutrientes, kg/d							
MO	12,0	13,5	13,5	0,98	0,509	-	-
N	0,5	0,6	0,6	0,41	0,454	-	-
FDN	5,7	6,2	6,4	0,52	0,476	-	-
FDA	3,0	3,3	3,3	0,21	0,458	-	-
Digestibilidad, %							
MS	54,8	49,5	57,6	4,72	0,291	-	-
MO	59,0	54,5	61,6	3,94	0,197	-	-
N	73,5	72,8	75,6	3,33	0,704	-	-
FDN	50,8	43,8	50,5	5,10	0,293	-	-
FDA	42,5	30,2	37,9	6,10	0,340	-	-

<sup>x,y</sup> Dentro de una fila, las medias con diferentes superíndices son diferentes ( $P < 0.10$ ).

<sup>1</sup>Tratamientos: (PAS) pastoreo directo, (SEG) pastura segada o (ORE) forraje oreado durante 24h. Todas las vacas recibieron además pRTM 30% del consumo ad libitum

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Tratamiento = efecto fijo del tratamiento; Hora = efecto fijo de la hora de muestreo; Tratar x Hora = interacción entre el tratamiento y la h de muestreo

### Fermentación en rumen

En la Cuadro XV se presenta el promedio y rango diarios de pH, NH<sub>3</sub>-N y la concentración de AGVs para cada tratamiento. Todos los parámetros estudiados de la fermentación ruminal fueron similares para los tres tratamientos. El tratamiento PAS tendió a presentar un valor máximo de pH más alto que el tratamiento SEG.

**Cuadro XV.** Fermentación en rumen

Ítem	Tratamiento <sup>1</sup>				Valor de -P <sup>3</sup>		
	PAS	SEG	ORE	EEM <sup>2</sup>	Tratamiento	Hora	Trat X Hora
<b>pH</b>							
Media	6,77	6,67	6,75	0,114	0,579	0,010	0,874
Máximo	7,19 x	6,97 y	7,10 xy	0,176	0,080	-	-
Mínimo	6,34	6,20	6,23	0,090	0,599	-	-
Rango	0,85	0,78	0,86	0,158	0,812	-	-
<b>AGV, mM</b>							
Ácido acético	72,8	74,2	71,2	6,04	0,952	0,089	0,395
Ácido propionico	20,2	23,0	19,0	4,46	0,846	0,757	0,584
Ácido butírico	15,5	14,63	13,63	1,31	0,513	0,323	0,318
Total	108,5	111,8	103,8	7,80	0,889	0,120	0,630
acético:propionico	3,6	4,8	4,3	0,61	0,304	0,858	0,727
(acético+butírico):propionico	4,4	5,8	5,1	0,73	0,337	0,918	0,718
<b>NH<sub>3</sub>-N, mg/100mL</b>							
Media	11,5	11,0	11,9	2,62	0,865	<,001	0,877
Máximo	24,4	18,6	21,2	5,37	0,335	-	-
Mínimo	5,7	5,1	5,5	0,65	0,622	-	-
Rango	18,7	13,5	15,6	5,02	0,310	-	-

<sup>a b</sup> Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>x,y</sup> Dentro de una fila, las medias con diferentes superíndices son diferentes ( $P < 0,10$ ).

<sup>1</sup>Tratamientos: (PAS) pastoreo directo, (SEG) pastura segada o (ORE) forraje oreado durante 24h. Todas las vacas recibieron además pRTM 30% del consumo ad libitum

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup>Probabilidad de: Tratamiento = efecto fijo del tratamiento; Hora = efecto fijo de la hora de muestreo; Tratar x Hora = interacción entre el tratamiento y la h de muestreo

### Contenido, tamaño de las partículas ruminales y tasa de pasaje por el tracto digestivo

En el Cuadro XVI se presentan las características del contenido ruminal, el tamaño de las partículas ruminales y la tasa de pasaje del forraje por el tracto digestivo. Los kg de contenido ruminal fueron similares para los tres tratamientos. El tratamiento PAS tuvo una menor proporción de partículas  $> 4,75$  mm, y mayor proporción de partículas entre 4,75 y 1,18mm, respecto a los otros dos tratamientos.

**Cuadro XVI.** Contenido y distribución del tamaño de las partículas en el rumen, y tasa de pasaje de las partículas de forraje por el tracto digestivo.

Ítem	Tratamiento <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Valor de -P	
	PAS	SEG	ORE			

Contenido ruminal					
Sólido, kg MF	45,8	40,2	37,3	9,91	0,796
Líquido, kg MF	33,7	43,0	32,2	9,76	0,564
Total, kg MF	79,5	83,0	69,7	16,72	0,719
Sólido, % MS	22,4	22,3	22,5	0,75	0,982
Líquido, % MS	6,1	6,0	6,1	0,29	0,928
Reconstituido, % MS	11,9	12,7	11,4	0,50	0,366
Sólido, kg MS	10,7	8,9	8,0	2,14	0,551
Líquido, kg MS	2,0	2,5	2,0	0,63	0,642
Total, kg MS	12,7	11,4	10,1	2,50	0,661
Tamaños de las partículas, % de la MS total					
Acumulado					
> 4,75 mm	13,3 b	33,9 a	34,0 a	1,88	0,011
4,75 a 1,18 mm	74,8 a	57,0 b	57,1 b	1,72	0,027
< 1.18 mm	11,9	9,0	8,9	1,18	0,109
Por criba					
> 13,50, mm	3,76 b	17,5 a	16,8 a	0,98	0,006
9,50 a 13,50, mm	9,53 b	16,5 a	17,2 a	0,95	0,018
4,75 a 9,50, mm	24,0 x	21,4 y	20,9 y	1,32	0,053
3,35 a 4,75, mm	19,5 a	11,2 b	11,4 b	0,74	0,023
2,36 a 3,35, mm	16,4 a	10,8 b	10,9 b	0,62	0,036
1,18 a 2,36, mm	14,9	13,6	13,9	1,41	0,810
0,60 a 1,18, mm	6,9	5,7	5,0	0,93	0,436
0,15 a 0,60, mm	5,0	3,3	3,8	1,03	0,456
Tasa de pasaje <sup>3</sup>					
k1, h <sup>-1</sup>	0,06	0,06	0,06	0,006	0,623
k2, h <sup>-1</sup>	0,07	0,09	0,091	0,014	0,092
TT, h	11,3	8,1	11,7	2,87	0,654
TMRR, h	18,4	18,4	17,0	1,70	0,753
TMRP, h	14,5	10,2	12,3	2,02	0,160
TMRT, h	44,15	38,13	39,56	3,42	0,541

<sup>a,b</sup> Dentro de una fila, medias con distintas letras difieren ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>x,y</sup> Dentro de una fila, las medias con diferentes superíndices son diferentes ( $P < 0,10$ ).

<sup>1</sup>Tratamientos: (PAS) pastoreo directo, (SEG) pastura segada o (ORE) forraje oreado durante 24h. Todas las vacas recibieron además pRTM 30% del consumo ad libitum

<sup>2</sup> Error estándar de la media

<sup>3</sup> k1 es la tasa de pasaje por retículo-rumen; k2 tasa de pasaje del resto del tracto digestivo; TT = tiempo calculado para la primera aparición en heces; TMRR = tiempo medio de retención en el retículo-rumen; TMRP = tiempo medio de retención en el tracto posterior; TMRT = tiempo medio de retención total.

## DISCUSIÓN

En concordancia con la hipótesis general, en la presente tesis se demostró que tanto dividir el tiempo diario de pastoreo como el oreo del forraje de alfalfa, aumenta los nutrientes aportados por la pastura en dietas combinadas para vacas lecheras. La división del acceso al pastoreo en 2 sesiones de 4h aumento un 16% la ENL y el N provenientes de la alfalfa en la dieta, comparado con 1 sesión de 8h. Mientras que

suministrar el forraje oreado aumento el consumo de MO y PC digestible. Sin embargo, en el Experimento I la producción de sólidos lácteos no fue afectada por la división del tiempo de pastoreo en 2 sesiones de 4h, porque el consumo total de nutrientes, que no difirió comparado con 8h continuas de pastoreo. Mientras que suministrar el forraje oreado disminuyó la producción de sólidos

## **Discusión Experimento I**

En el experimento I, la inclusión de alfalfa en la dieta fue 35% y 38% del CMS total para vacas en T8 y T4+4, respectivamente, mientras que el CMS total fue 10,2% inferior al de las vacas T0. La reducción total del CMS con la inclusión de forraje concuerda con informes previos. Por ejemplo, Civiero et al. (2021), observaron una reducción del CMS del 25 % con la inclusión de una pastura C4 (*Pennisetum glaucum*), mientras que Bargo et al. (2002a) y Pastorini et al. (2019), observaron reducciones de CMS cercanas al 30% cuando incluyeron una pastura C3 (raigrás). El menor CMS observado cuando las vacas consumieron forraje más una pRTM puede estar relacionado con el contenido final de humedad de las dietas (Cabrera Estrada et al., 2004): la humedad en las dietas fue de 70 y 71% para T8 y T4+4, respectivamente, mientras que la humedad en T0 fue de 53%. En este sentido, según Kellems et al. (1991), cuando el contenido de humedad en la dieta es superior al 50%, un aumento de cada punto porcentual hace que disminuya un CMS equivalente al 0,02% del PC, lo que concuerda con los valores encontrados en el presente estudio (3 kg y 1,7 kg menor para T8 y T4+4, respectivamente, que T0). A su vez, el menor CMS puede estar relacionado con una menor tasa de consumo de las vacas en los tratamientos con pastoreo: las tasas de consumo estimadas fueron 3,7, 2,9 y 2,8 kg MS/h para T0, T8 y T4+4, respectivamente. Otra posible explicación para el menor CMS en las dietas con pastoreo más pRTM puede estar relacionada con la mayor digestibilidad de la MS y la MO en las vacas T0. La menor digestibilidad de la MO en las dietas con forraje de pastoreo, a su vez, puede ser consecuencia de una disminución de los CNF de alta digestibilidad consumidos (1,3 kg en promedio) en los tratamientos T4+4 y T8. Es necesario considerar, sin embargo, que después de Morris et al. (2018), los valores de digestibilidad podrían estar sobreestimados debido a las pocas muestras puntuales utilizadas. Si bien la distensión ruminal determinada por las fracciones de fibra se considera la principal causa del menor CMS voluntario en vacas en pastoreo (Allen et al., 2019), en este estudio, todas las dietas presentaron % FDN total, % FDN de forraje y relaciones FDA/FDN similares (que estaban de acuerdo con las recomendaciones de NASEM (2021)).

Las vacas con acceso a 2 sesiones de pastoreo consumieron 16% más MS de alfalfa, pero esto no condujo a un aumento en el CMS total comparado al tratamiento T8. Esto explica la similar producción de leche en los tratamientos T8 y T4+4, en forma similar a lo reportado previamente en vacas alimentadas con pastoreo más pRTM durante la lactancia media-tardía (Dall-Orsoletta et al., 2016). Aunque no se puede descartar que el consumo en pastoreo haya sido subestimado debido a imprecisiones en el método de medición, los 14 kg de MS/vaca/d (5 cm del suelo) de alfalfa ofrecidos en este estudio pudo haber limitado el CMS de pastura. Las vacas en pastoreo deben consumir un promedio de 9,2 kg MS de alfalfa/vaca/d para igualar el CMS de las vacas T0. En dietas con pastoreo más pRTM y niveles similares de pRTM como los utilizados en

este estudio, Ison et al. (2020a) informaron que el máximo CMS de alfalfa se logra con una asignación de forraje de 29 kg MS/vaca/d, valor muy superior al utilizado en nuestro experimento. Mientras que el CMS de alfalfa en nuestro experimento concuerda con lo reportado para vacas en lactación tardía, por Gallardo et al. (2005), quienes observaron un CMS de alfalfa de 7.7 kg/d y un CMS total de 22.2 kg/d, con una pRTM como la utilizada en nuestro experimento.

El hecho de que la mayor cantidad de nutrientes consumidos a favor de T0 no haya resultado en una mayor producción de leche, o cambios en la EA, puede estar relacionado con la etapa tardía de lactancia. Probablemente la mayor parte de la energía retenida en T0 fue utilizada en la recuperación del estado corporal. Aunque en este caso, la corta duración de los tratamientos no permitió evaluar diferencias en la deposición de tejido, las vacas aumentaron en promedio 53 kg de PV durante el experimento.

En nuestro experimento la proporción de tiempo que las vacas dedicaron a comer aumentó después de cada ordeño, como ya ha sido descrito para vacas lecheras (Orr et al., 2001). En ambos tratamientos con acceso a pastoreo, las vacas aumentaron el tiempo comiendo, para lograr un consumo de nutrientes acorde a sus requerimientos. Además, cuando las vacas tuvieron acceso al pastoreo dedicaron menos tiempo a rumiar que en el tratamiento T0, lo cual es de esperar ya que el tiempo comiendo aumentó en ambos tratamientos (Kilgour, 2012), y además el 37% y 87% del tiempo comiendo en T4+4 y T8 respectivamente fue durante la noche, cuando la rumia es más frecuente (Kilgour, 2012).

Cuando el tiempo de pastoreo se dividió en 2 sesiones, el consumo de ENL y N en la dieta de alfalfa aumentó en un 16% en comparación con las vacas T8. El aumento del CMS de alfalfa se debió en parte, a que las vacas pasaron más del 50 % del tiempo comiendo desde el final del ordeño de la mañana hasta las 13:00 h, estimuladas por el acceso a la pastura de alfalfa y a la pRTM luego al regresar al corral. Además, una mayor proporción del tiempo de acceso al pastoreo durante horas diurnas, pudo contribuir a incrementar el tiempo comiendo en el tratamiento T4+4, debido a que aproximadamente el 80% del tiempo dedicado al pastoreo ocurre durante el día (Rook et al., 1994). Cuando se dividió el tiempo de acceso al pastoreo, las vacas compensaron el menor tiempo de rumia durante el pastoreo, rumiando en otros momentos. La reducción del tiempo de rumia durante el pastoreo, cuando el acceso se divide en 2 sesiones, concuerda con lo informado por Dall-Orsoletta et al. (2016), al dividir 6 h de acceso al pastoreo en 2 sesiones. Sin embargo, también cabe señalar que estos autores utilizaron una pastura más fibrosa que la alfalfa utilizada en nuestro experimento (54% vs. 35% FDN como % MS).

Aunque los días transcurridos entre los muestreos del líquido ruminal de periodos consecutivos fueron relativamente cortos (18 d), los cambios particularmente en el pH ruminal y las concentraciones de NH<sub>3</sub>-N debido a los tratamientos parecen haber estado más ligados al comportamiento alimenticio que a la naturaleza de los alientos suministrados. En nuestro experimento se tuvo especial cuidado en que los tratamientos no difirieran en el consumo de nutrientes, a pesar del menor consumo de granos de las vacas alimentadas con pasto más pRTM. Calculando la concentración final de nutrientes para T0, T8 y

T4+4 los resultados son 38.0, 36.0 y 35.7 % de NFC; 32.0, 33.5 y 33.3 % de FDN; 20.0, 20.4 y 20.3 % de PC, respectivamente. El pH ruminal más bajo en vacas alimentadas con pastoreo más pRTM probablemente esté relacionado con la disminución del tiempo de rumia, lo que condujo a una menor producción de saliva y una reducción del flujo de la fracción líquida, en comparación con el tratamiento T0 (Welch y Smith., 1970; Rauch et al., 2012). Además, aunque la capacidad tampón de la alfalfa es mayor que la de otros forrajes como las gramíneas (Stepanova y Volovik, 2021), podría no haber sido suficiente en los tratamientos T8 y T4+4 para contrarrestar el menor aporte de bicarbonato de sodio y óxido de magnesio con la pRTM. El hecho de que las concentraciones totales de AGVs entre tratamientos fueron similares, puede reforzar esta idea de que un menor suministro de sustancias tampón y alcalinizantes condujo a un pH más bajo. Además, las diferentes características de la fibra en las dietas podrían afectar la dinámica de degradación de la fibra, la tasa de pasaje y el pH ruminal (White et al., 2017; Allen et al., 2019). Por ejemplo, la pastura de alfalfa y el ensilaje de maíz utilizado en la RTM (su principal fuente de fibra) tenían diferentes relaciones FDA/FDN (0,76 y 0,62, para la pastura de alfalfa y el ensilaje de maíz, respectivamente). Además, dividir el tiempo de pastoreo en 2 sesiones implicó una mayor fluctuación en el pH ruminal, con más tiempo diario por debajo de un pH de 6, en comparación con T8. Para la concentración de ácido láctico, la interacción entre tratamiento y h muestra un pico en el momento de la ingesta principal de pRTM (a las 1000 h).

Como se indicó en la sección de materiales y métodos, las concentraciones de N en la RTM y la alfalfa excedieron las recomendaciones de NRC (2001) y fueron similares. Por lo tanto, el mayor CMS de T0 condujo a un mayor consumo de N en este tratamiento que cuando las vacas tenían acceso al pastoreo. La tendencia a un mayor BN observado para T0 se explica por el mayor consumo de N y las excreciones de estiércol similares (expresadas como porcentaje de N ingerido) entre los tratamientos. La mayor excreción fecal en el tratamiento T4+4 a T8 se explica por su mayor ingesta de N ya que la digestibilidad de la PC fue similar. Aunque las concentraciones ruminales de NH<sub>3</sub>-N y % PDR (estimadas utilizando la composición y el consumo obtenidos en este experimento, con el software NRC 2001) fueron de 11 mg NH<sub>3</sub>-N/dL y 12 % PDR de MS, respectivamente, como se sugiere para maximizar el flujo de proteína microbiana (Reynal y Broderick, 2005), la excreción de PD fue menor a estudios previos (Mendoza et al., 2016b; Pastorini et al., 2019), en consonancia con el estado de lactancia de las vacas de este experimento. Podríamos considerar el hecho de que 2 muestras / d son pocas para predecir el volumen de excreción diario de orina según Lee et al. (2019). Sin embargo, tanto Mendoza et al. (2016b) y Pastorini et al. (2019) utilizaron el mismo método de muestreo que el presente experimento.

Las diferentes formas en que ingresaron los nutrientes debido al comportamiento alimentario llevaron a picos de NH<sub>3</sub>-N en el rumen. Se sabe que los rumiantes pueden aprovechar el exceso de N mediante el reciclaje de urea y las reservas de glucógeno microbiano. Otros autores informaron que este proceso no siempre es eficiente, particularmente en condiciones de niveles altos de N. Castillo et al. (2001) comunicaron que el suministro por encima de 400 g N/d, aumenta la excreción de N en la orina según la cantidad y la degradabilidad del N ingerido, lo que lleva a una baja eficiencia en el uso del N. Esto es

consistente con los resultados de nuestro estudio y otros (Mulligan et al., 2004; Colmenero y Broderick, 2006).

Aunque las vacas en T0 consumieron más MO y CNF de mayor digestibilidad, se encontró solo una tendencia a aumentar la excreción de DP, lo que podría relacionarse a la baja sensibilidad del método utilizado, o el hecho de que una parte de los CNF fuera digerida en el intestino, limitando así la cantidad de MO fermentable en el rumen. Por otro lado, se esperaba encontrar una mayor excreción fecal de N debido a una mayor excreción metabólica de N ligada al mayor CMS en T0 (30 g por kg de CMS; NASEM, 2021). Al igual que los resultados del pH ruminal, las concentraciones ruminales de NH<sub>3</sub>-N mostraron mayores fluctuaciones en T4+4 en comparación con T8, seguramente asociadas a los diferentes patrones de comportamiento alimenticio. En este sentido, para el tratamiento 4+4, habían pasado muchas h desde la ingesta de pRTM (que se ofreció 22 h antes) cuando las vacas ingresaron al pastoreo matutino (0800 h), por lo que la CNF disponible en el rumen fue la cantidad diaria más baja. Los picos de NH<sub>3</sub>-N registrados cuando las vacas pastaron en 2 sesiones podrían reflejar una alta disponibilidad de N de la pastura y una baja utilización debido a la escasa disponibilidad de CNF provenientes de la pRTM. Esto podría haber limitado la utilización de NH<sub>3</sub>-N por parte de los microorganismos ruminales. Sin embargo, la división del tiempo de pastoreo no modificó la excreción de DP, ni el BN, lo cual es consistente con la ausencia de diferencias en el consumo y la digestibilidad de la MO.

Estudios previos han informado que la inclusión de pastura en las dietas de vacas lecheras lactantes aumentó la proporción de ácidos grasos insaturados. Sin embargo, el impacto de incluir pastura de alfalfa en la dieta parece haber sido bajo en relación con otros estudios (Mendoza et al., 2016b, Pozo et al. 2022; Grille., et al. 2022), especialmente si se considera que la pastura de alfalfa representó más del 35% de la dieta, en nuestro experimento. El menor impacto del CMS de alfalfa en la concentración de C18:2 cis-9, trans-11 podría estar relacionado con una menor concentración de ácido C18:3 cis-9, cis-12, cis-15 en la alfalfa que en las gramíneas y hasta 20% menor respecto al raigrás anual (Glasser et al., 2013).

## **Discusión Experimentos II**

La composición química de la alfalfa pastoreada (PAS) y el FF segado (SEG) fue similar a la encontrada para el mismo cultivo en el Experimento I y los valores de MS, MO, PC, FDN y FDA concuerdan con los reportados para alfalfas (latencia grupo 6) en estado vegetativo (Clark et al., 2018; Berone et al., 2020; Ison et al., 2020), además el contenido de CHS y la relación CHS:N están en línea con los informados por Cajarville et al. (2015) para alfalfas del mismo cultivar, cortadas por la tarde en Uruguay (7,5 CHS como % MS y 2,7 CHS:N). El oreado en promedio aumento el % de MS del forraje en un punto porcentual por h, esta tasa de secado coincide con lo informado por Jahn et al. (2004) para alfalfa secada a 20°C y baja densidad, las condiciones de temperatura y h de luz en nuestro experimento se especifican en materiales y métodos. El oreo modifico levemente la composición química, incrementando la proporción de EE y CNE, esto coincide con lo reportado por Repetto et al. (2005) quienes no encontraron cambios en la composición química del forraje de pasturas oreadas durante 7h respecto al FF. Es llamativa e inesperada,

la reducción de 4 puntos porcentuales en la concentración de FDN respecto a la pastura y el FF segado, y justifica la menor proporción de NIDN en el forraje oreado comparado al FF. Aunque no se detectó efecto del periodo de experimental para ninguna de las variables de composición química en los alimentos utilizados, cabe mencionar que el oreo aumento la variabilidad del % de MS, MO y PC del forraje comparado con el FF segado o pastoreado. Esto era esperable debido a la utilización del tiempo para controlar el proceso de oreo realizado en el campo, al aire libre. De todas formas la variabilidad dentro de cada periodo fue similar, por ejemplo el % MS del forraje oreado para cada periodo fue  $38.7 \pm 8.1$ ,  $39.1 \pm 8.5$ ,  $39.4 \pm 9.9$  (% MS promedio  $\pm$  EEM, 7d / periodo) para el periodo uno, dos y tres respectivamente.

Las vacas del Experimento II únicamente en ORE alcanzaron el CMS que presentaron suministrándoles únicamente RTM (con la misma composición que la pRTM) previo a comenzar el experimento (CMS = 20.6 kg de MS/d, promedio para todas las vacas), reafirmando que un alto contenido de humedad impide a las vacas de alta producción alcanzar su CMS potencial, cuando se suministran pasturas templadas de alta calidad (Cabrera Estrada et al., 2004). En los tratamientos PAS y SEG la reducción del CMS total fue de 0,23 kg por cada punto porcentual que disminuyo el % de MS de la dieta comparado con el tratamiento ORE, en línea con la reducción del CMS en 0,25 kg por cada punto porcentual que disminuye el % de MS del forraje, reportada por Vérité et al. (1970). Cuando se reduce el contenido de MS en el forraje, la tasa de consumo disminuye y para mantener el CMS total, el mecanismo compensatorio de las vacas generalmente es aumentar el tiempo comiendo (Allden y Whittaker., 1970; Galli et al., 1996). Nuestros resultados sugieren que en PAS y SEG el tiempo total de masticación que ficológicamente las vacas pueden alcanzar (16 h/d aproximadamente, Beauchemin, 2018) limito su capacidad para compensar la menor concentración de MS del forraje y mantener el CMS total. En este sentido, el tiempo total de masticación fue de 16,1 h/d en PAS y 16,6 h/d en SEG e igualmente precisarían 2.8 h y 2.2 h más respectivamente para igualar el CMS de alfalfa de ORE, asumiendo que en nuestro experimento el tiempo diario dedicado a cada actividad fue igual a la proporción de observaciones presentada en el Cuadro X, y que la tasa de CMS de alfalfa (kg/h) se mantuviera constante en 1.2, 1.3 y 1.9 para PAS, SEG y ORE respectivamente.

El efecto de los tratamientos sobre el comportamiento alimenticio se relaciona tanto con los cambios en la composición química y como en la forma física del forraje ofrecido. Por un lado, la mayor proporción de tiempo dedicado a comer en PAS y SEG obedeció a la menor concentración de MS del forraje respecto a ORE, como se explicó anteriormente. Por otra parte, probablemente la ingestión de partículas de forraje de mayor tamaño aumento el tiempo rumiando en ORE (67 min/d) y SEG (48 min/d) comparado PAS. Este aumento del tiempo diario rumiando tiene características diferentes a lo reportado en dietas RTM, donde el tiempo de rumia diario aumenta pero el tiempo de rumia por kg de MS o FDN ingeridos no se modifica al incrementar el tamaño de las partículas del forraje de alfalfa de 6.0 a 30.0 mm (Zaebeli et al. 2007) o de 1.1 a 7.8 mm (Teimouri et al., 2004). Sin embargo en nuestro experimento, por cada kg de FDN consumido la rumia aumento 5,5 y 4,1 min en ORE y SEG respectivamente, respecto a PAS,

El mayor TMRP observado en ORE podría estar relacionado al incremento del CMS. Se ha reportado que a medida que el CMS aumenta, el tiempo de retención pos ruminal aumenta (Okine y Mathison, 1991). Los parámetros de transito digestivo del Experimento II son consistentes con los reportados para vacas lecheras

lactantes utilizando cromo mordente como marcador. En dietas RTM con 32% o 83% de forraje Colucci et al. (1982) reportó que  $k_1$  fue de  $0.043\text{h}^{-1}$  y  $0.048\text{h}^{-1}$  respectivamente. Mientras que Mendoza et al. (2016) reportó 18h de TMRR y 40h TMRT en una dieta combinada conteniendo 23% de la MS de raigrás de alta calidad para vacas con un CMS total de 22.6 kg/d. Sin embargo, el mayor CMS total y CMS de forraje en ORE no aumentó la  $k_1$  o el TMRR respecto a los otros dos tratamientos. En parte, debido a que el efecto del incremento del CMS sobre la tasa de pasaje depende del nivel de consumo, por ejemplo Colucci et al. (1990) informaron que al incrementar el CMS aumentó la tasa de pasaje en vacas secas, pero no en vacas lactando. Pero también, porque la tasa de pasaje a través del rumen es afectada por otros factores como la densidad y gravedad funcional de las partículas o la motilidad ruminal (Teimouri et al., 2004). Por otro lado, contrariamente a lo reportado en dietas RTM donde el aumento del tamaño de las partículas del forraje ingeridas aumentó el TMRR (Kononoff, 2003), en nuestro experimento la  $k_1$  y el TMRR no difirió entre tratamientos, aunque en base a los resultados del Experimento III puede suponerse que las vacas en SEG y ORE ingerieron partículas de forraje de mayor tamaño que en PAS.

Por último cabe considerar aspectos metodológicos, nosotros utilizamos un marcador para partículas de forraje, sin combinarlo con marcadores de la fase líquida y de las partículas pequeñas, por lo cual es posible que existieran cambios en estas fases que no detectamos. Las partículas de forraje son la fracción menos sensible al aumento del CMS, Seo et al. (2006) para dietas que variaron de 26.7% a 72.6% de forraje (promedio de 63.3%) encontró que al aumentar el CMS de 10 a 40 g/kg de PV, la  $k_1$  aumentó en 0,007, 0,015 y 0,021  $\text{h}^{-1}$  para forrajes, concentrados y líquidos respectivamente. Además, la cantidad de contenido celular vegetal, la ingesta de agua, secreción de saliva y entrada de líquido a través de la pared del rumen están estrechamente relacionados con la presión osmótica del rumen y la tasa de pasaje de la fracción líquida. Por último, cuando se utilizan marcadores externos existe la posibilidad de migración del marcador entre partículas, aunque este fenómeno es poco relevante para un mismo marcador, que cuando se comparan diferentes marcadores (Lira et al., 2006).

En general a medida que aumenta el CMS, se incrementa la tasa de pasaje y la digestibilidad se reduce, siendo más acentuada esta depresión cuanto mayor es el nivel de concentrados en la dieta (Colucci et al. 1982). En ORE la digestibilidad de la MS disminuyó debió principalmente a que se redujo (11 puntos porcentuales) la digestibilidad de la FDN, respecto a PAS. La disminución en la digestibilidad de la FDN puede vincularse al incremento en la dieta de la proporción de FDN aportada por la alfalfa, probablemente menos digestible que la FDN de la pRTM. Así como también a la mayor relación FDA/FDN en el forraje oreado (0.76 ORE vs 0.69 PAS), debido a la correlación negativa entre esta relación y la digestibilidad del forraje (Allen et al., 2019). Para los tres tratamientos los valores de digestibilidad de la FDN estuvieron dentro del rango (0.86 máximo y 0.25 mínimo) pero por debajo del promedio ( $0.59 \pm 0.12$ ) descrito en el metanálisis de Krizsan et al. (2010). La digestibilidad de la FDN observada en PAS y SEG coincide con la degradabilidad *in vitro* de la FDN para pasturas de alfalfa ( $40.0 \pm 3.0\%$ ) reportada por Berone et al. (2020). Sin embargo fue menor (aproximadamente la mitad) a la reportada para vacas de similares características alimentadas con dietas combinadas que contenían aproximadamente 50% de raigrás (Pastorini et al., 2018; Pozo et al. 2021), esto podrían deberse a la menor extensión de la digestión y concentración de FDN potencialmente digerible en las leguminosas respecto a las gramíneas invernales (Tamminga, 1993; Kammes y Allen, 2012b).

En resumen, los cambios en el consumo y la digestibilidad de los nutrientes con el suministro del forraje oreado, resultaron en un aumento del consumo de MO y N digestible respecto los otros tratamientos (Cuadro XI).

Si bien las vacas consumieron más MO y PC digestible al suministrarles el forraje oreado, la producción de LCG 3.5% disminuyó un 5% comparado a los otros dos tratamientos. Esta disociación entre los resultados productivos y el consumo de nutrientes impactó negativamente en la EA, reduciéndola un 22.4% respecto al pastoreo y un 18.6% respecto al segado. En el detrimento de la performance productiva, el metabolismo de las materias nitrogenadas y su utilización para la síntesis de proteínas lácteas, parecen ser un aspecto central. Múltiples factores están involucrados en la explicación de por qué, con el suministro de forraje oreado, aumento el consumo de N digestible (19,9 % y 20,9 %, PIE y SEG respectivamente, en kg de N digestible ingerido), pero al mismo tiempo disminuyó la producción diaria de proteína en leche (-8,9% y -5,7 %, PIE y SEG respectivamente, en kg proteína /d.).

Posiblemente con el suministro del forraje oreado, asociado a la disminución de la digestibilidad de la FDN y el mayor tiempo de retención pos ruminal del alimento, se haya reducido la degradabilidad de la FDN en el rumen. Sumado a la menor concentración de carbohidratos solubles (CHS) en el forraje oreado, probablemente redujeran la disponibilidad de sustratos a nivel ruminal y la formación de proteína microbiana, reduciendo el aporte de precursores para la síntesis láctea. Lo que podría explicar al menos en parte la menor producción de leche y la reducción del rendimiento (kg/d) y el % de proteína en la leche con el suministro del forraje oreado. Por otro lado, el oreo puede haber incrementado la proporción de N soluble del forraje, que asociado a la reducción en el rumen de los sustratos energéticos (mencionados anteriormente), podría disminuir el N retenido para la síntesis biomasa microbiana y aumentar las pérdidas como N amoniacal, disminuyendo así la eficiencia de utilización del N y explicando la menor proporción del N consumido excretado en la leche. La menor concentración de grasa cuando las vacas pastorearon podría deberse al menor consumo de FDN respecto a ORE. Pero también un efecto de dilución por el aumento de la producción de leche, ya que el rendimiento diario (kg de grasa/d) fue similar a los otros dos tratamientos.

Aunque los análisis químicos no mostraron diferencias importantes en la calidad del forraje entre los tratamientos, es posible que hubiera diferencias en el forraje consumido que el muestreo realizado a un horario fijo (17:00h) no haya capturado. Por ejemplo, modificaciones causadas por la conformación del bolo y la presión del forraje durante las 17 h que las vacas tuvieron acceso al mismo. Sin embargo, la composición química de las muestras de rechazo (remanentes) de forraje no mostró diferencias entre los tratamientos. Si bien no se realizaron determinaciones morfológicas en el forraje (i.e. cantidad de tallos, hojas, etc), el rastrillado se realizó en forma manual para asegurar una práctica cuidadosa, y no se observó una pérdida importante de hojas o cambio alguno en la morfología del forraje. Con la información obtenida de las determinaciones realizadas, los autores no logramos explicar completamente, por qué la producción de 3,5% LCG se redujo, aunque aumento el consumo de MO y N digestible. Se requiere de más estudios sobre la producción de biomasa microbiana en el rumen, el sitio de digestión y el metabolismo intermediario de los nutrientes, para comprender la disminución en la eficiencia del uso de los nutrientes para la producción de leche con el forraje oreado.

### Discusión Experimento III

En los tres tratamientos las vacas lograron consumos próximos al CMS potencial (14.6 kg MS/d, promedio para las tres vacas) establecido previo a comenzar el experimento para establecer la asignación diaria de pRTM. El CMS total alcanzado en pastoreo o con el FF segado fue suficiente para satisfacer el nivel de requerimientos de las vacas, y el contenido de humedad del FF no fue limitante, porque la tasas de CMS fue suficiente para lograr el CMS total con una proporción de comportamiento “come” menor a 1/3 del total de observaciones diarias (Cuadro XIII). El total de tiempo masticando (come y rumia) tampoco limito el CMS, y fue de 13.0h/d, 12.3h/d, 13.6h/d para PAS, SEG y ORE respectivamente, asumiendo que el tiempo dedicado a cada comportamiento alimenticio en 24h es igual a la proporción de observaciones. En condiciones similares a nuestro experimento pero sin suplementación, Danelon et al, (2002) reportaron un mayor CMS con el forraje de alfalfa oreado (con 40% de MS) respecto al pastoreo (con 20% de MS). La diferencia entre los resultados de ambos experimentos podría deberse, al menos en parte, a que la suplementación con pRTM facilita que los tratamientos con FF cubrir sus requerimientos, incrementa el % de MS total de la dieta y la tasa de consumo de MS (kg MS/h) en todos los tratamientos. La digestibilidad aparente de la FDN para las vacas secas utilizadas en este experimento fue mayor que la hallada para las vacas en producción del Experimento II, probablemente asociado a un menor CMS total. Los tiempo de retención hallados en nuestro experimento fueron menores a los reportados por Okine y Mathison, (1991), de 60h de TMRT y 40h de TMRR, probablemente debido en parte a la dieta compuesta únicamente por una mezcla de henos (40:40.20 de *Bromus inermis*, *Phleum pratense* y *Medicago sativa*) utilizada por estos autores.

El contenido de MS total en el rumen no difirió entre los tratamientos, expresado en términos de g de MS / kg de PV, fue 19.8, 17.8, 15.7 para PAS, SEG y ORE. Estos valores están acorde a los reportados por Chilibröste et al, (2005) para vacas consumiendo FF o pasturas. Estos autores, analizando los resultados de seis publicaciones (Chilibröste, 1998; Danelón et al., 2002; Van Vuuren et al., 1992; Bosch et al., 1992; Visser et al., 1992; Hartnell y Satter, 1979), informaron que el contenido ruminal de MS en promedio fue 15.7 g MS / kg PV (min 6.4 y max 25.5 g MS / kg PV). Esos mismos autores plantean que, independientemente de la concentración de MS en el alimento, el % de MS del contenido ruminal comúnmente no supera el 12% de MS, coincidiendo con el 12% de MS del contenido ruminal reconstituido en nuestro experimento para los tres tratamientos (Cuadro XVI). Por otro lado, reafirmando la idea que la tasa de pasaje ruminal no se correlaciona con el contenido ruminal (kg totales de MS o FND) o la composición química del contenido del rumen (Bosch, 1991; Chilibröste et al., 1997; Zebeli et al, 2007), en nuestro experimento los tratamientos no modificaron el contenido ruminal, ni la tasa de pasaje de la digesta.

La distribución del tamaño de las partículas ruminales halladas en nuestro experimento (Cuadro XVI), concuerda con Waghorn (1986) quien encontró que después de comer, aproximadamente el 32 y el 51% de la MS en la digesta ruminal fue retenida en los tamices de 4 y 2 mm, respectivamente, y que el 38% del material retenido en el tamiz de 4 mm era >10 mm de longitud. Las diferencias encontradas en el tamaño de las partículas en el rumen en nuestro experimento pueden estar relacionadas al horario en que se midió el tamaño de las partículas en el rumen.

Reportes previos demostraron la importancia del horario en que se mide el tamaño de las partículas y su relación con los momentos del pastoreo (que modifican la tasa de ingestión) y las sesiones de rumia que reducen el tamaño de las partículas en el rumen (Chlibroste., et al 1997; Boudon et al., 2009). En nuestro experimento el vaciado ruminal para los análisis del contenido ruminal y el tamaño de partículas en el rumen, se realizó 21:00h, aproximadamente 4h posterior a la principal sesión de ingesta, asociada a que las vacas ingresaban a una nueva parcela luego del ordeño de la tarde. Al momento del vaciado ruminal las vacas no habían tenido sesiones de rumia para reducir las partículas ingeridas, en los tratamientos que las vacas consumieron el forraje cortado (SEG y ORE). En este sentido Chilibroste et al. (1998) encontró que después de 1 h de pastoreo, la cantidad de partículas > 1,25 mm era el 75% de contenido ruminal, pero se redujo al 55% luego de un periodo de ayuno donde se concentraron los eventos de rumiado.

En nuestro experimento las diferencias en el tamaño de las partículas ruminales no se reflejó en tasas de pasaje diferentes, probablemente porque se sabe que la tasa de pasaje por el retículo-rumen ( $k_1$ ) depende del tamaño, pero también de otros factores como la gravedad funcional específica de las partículas, que intervienen en la estratificación de la digesta (Teimouri et al., 2004). Nuestros resultados concuerdan también con los comunicados por Okine y Mathison, (1991) en relación a que los cambios en la distribución del tamaño de las partículas no están necesariamente asociados con cambios en la actividad de masticación y la tasa de paso el retículo-rumen ( $k_1$ ).

Aunque esperábamos diferencias en la respuesta digestiva a los tratamientos entre las vacas en producción del Experimento II y las vacas secas utilizadas en este Experimento III, no esperábamos la ausencia de efectos (con excepción del tamaño de partículas del rumen) como sucedió. Además de los aspectos biológicos discutidos anteriormente, debe considerarse que la falta de efectos detectados podría estar relacionada con el bajo número de animales utilizado en este experimento ( $n = 3$ ) que limita la posibilidad de hallar diferencias significativas. Por ejemplo, el análisis de potencia y tamaño de muestra mediante el procedimiento “proc power” de SAS V9, para un alfa = 0,05, un power test de 80%, con los valores del CMS promedio y EEM obtenidos en este experimento indican un N mínimo de cuatro. En el mismo sentido, Por ejemplo para valores similares a los de nuestro experimento de CMS (media 12.2, EEM = 1.2) una aumento en el consumo de MS por disminuir el tamaño de las partículas de ensilaje de 25 mm a 5,5 mm en una RTM, fue significativo con un  $n = 10$  vacas, Sin embargo, no pudo ser cuando se analizaron únicamente los datos de cuatro vacas canaladas (Tajaf et al., 2007).

## CONCLUSIONES

### Conclusión Experimento I

En vacas lecheras de lactancia tardía alimentadas con una cantidad restringida de pRTM y pastoreo de alfalfa durante 8h, el CMS de pastura representó el 38,7% del total. En comparación a cuando consumieron una RTM *ad libitum*, la dieta combinada redujo el CMS total y la digestibilidad de los nutrientes, sin embargo no afectó la producción de sólidos lácteos, ni la EA y aumentó la concentración de C18:1 trans-11 en la grasa láctea. Dividir 1 sesión de 8h de acceso al pastoreo de alfalfa en 2 sesiones de 4 h aumentó un 16% la proporción de energía y N aportados por la pastura en la dieta, pero no modificó el consumo total de nutrientes, ni la producción de leche. Teniendo en cuenta la mayor mano de obra y el tiempo dedicado a una sesión de pastoreo duplicado, este manejo no se justifica en las condiciones del presente experimento.

### Conclusión Experimentos II y III

En vacas lecheras de lactancia tardía alimentadas con una cantidad restringida de pRTM y alfalfa ofrecida en diferentes presentaciones, proporcionar el forraje oreado aumentó el CMS de forraje, el CMS total y la ingesta de MO y N digestible, pero disminuyó la producción de leche, el rendimiento de proteína láctea, la EA y la eficiencia de uso del N comparado al pastoreo o suministrar el FF segado. Esta disminución del rendimiento productivo con el suministro del forraje oreado no se debió a una reducción del consumo de nutrientes digestibles, ni pudo explicarse en términos de diferencias en la tasa de pasaje o en el comportamiento alimenticio.

Proporcionar FF segado no afectó la performance productiva, ni la EA respecto al pastoreo, sin embargo el forraje cortado (con o sin oreo) aumentó la rumia y la concentración de grasa láctea en comparación con el pastoreo.

En vacas secas ofrecer el forraje cortado (con o sin oreo) aumentó el tamaño de partículas grandes en el rumen (Experimento III).

## IMPLICANCIAS

Esta tesis aporta información sobre los procesos digestivos subyacentes a los resultados productivos obtenidos al dividir el tiempo de pastoreo o con el segado pre pastoreo de la pastura. La información generada contribuye al diseño de estrategias de alimentación con dietas combinadas para vacas lecheras de alta producción, permitiendo utilizar estas estrategias de la forma más conveniente según los objetivos del sistema y la situación productiva, anticipando la respuesta productiva y digestiva. Los resultados de esta tesis indican que la división del tiempo de pastoreo no se justificaría en situaciones similares a la del Experimento I. Por otro lado en condiciones similares a la del Experimento II el suministro de forraje orado incrementa el consumo de forraje y su aporte de nutrientes, pero disminuye la producción de leche, respecto al pastoreo directo o suministrar el FF segado. Mientras que proporcionar el FF segado no modifica los procesos digestivos, ni el desempeño productivo respecto al pastoreo y puede contribuir a mejorar la calidad de la pastura de alfalfa en los siguientes pastoreos. Adicionalmente se considera importante promover la monitorización objetiva del proceso de oreo, a través del control del nivel de humedad y desalentar el uso del tiempo de exposición como criterio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrahamse S. (2009). Feeding and grazing management for dairy cattle: opportunities for improved production. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands.
2. Adams RF, Jones RL, Conway PL. (1984). High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *J. Chromatogr. B Biomed Appl* 336:125–137.
3. Allen MS, Sousa DO, VandeHaar MJ. (2019). Equation to predict feed intake response by lactating cows to factors related to the filling effect of rations. *J Dairy Sci* 102:7961–7969. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16166>.
4. Allen MS. (1996). Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *J Anim Sci* 74:3063-3075.
5. Allen MS. (2014). Drives and limits to feed intake in ruminant. *Anim. Prod. Sci.* 54:1513-1524
6. Allen VG, Batello C, Berretta EJ, Hodgson J, Kothmann M, Li X, McIvor J, Milne J, Morris C, Peeters A, Sanderson M. (2011). An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass Forage Sci* 66:2–28.
7. AOAC. (1990). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis. 15a ed. Arlington AOAC, 1030 p.
8. Bargo F, Muller LD, Delahoy JE, Cassidy TW. (2002a). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci* 85:2948-2963.
9. Bargo F, Muller LD, Varga GA, Delahoy JE, Cassidy TW. (2002b). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J Dairy Sci* 85:2964-2973
10. Basigalup D, Ustarroz E. (2007). Grazing alfalfa systems in the Argentinian pampas. 37th California alfalfa & forage symposium proceedings, 17 to 19 of december, Monterey, CA,. (See <http://alfalfa.ucdavis.edu> for this and other proceedings).
11. Basigalup DH, Odorizzi AS, Ferreira RP. (2022). Cultivares en América Latina. En: *Alfalfa: del cultivo a sus múltiples usos*. Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA), Brasilia, MAPA/AECS, 2022. 260p. ISBN: 978-85-7991-152-1
12. Beauchemin KA. (1991). Ingestion and mastication of feed by dairy cattle. In: *The Veterinary Clinics of North America: Dairy Nutrition Management*. C. J. Sniffen and T. H. Herdt, ed. Saunders, Philadelphia, Pages 439–463.
13. Beauchemin KA. (2018). Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *J Dairy Sci* 101:4762–4784. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13706>
14. Berone GD, Sardiña MC, Moot DJ. (2020). Animal and forage responses on lucerne (*Medicago sativa* L.) pastures under contrasting grazing managements in a temperate climate. *Grass Forage Sci.* 2020; 75:192–205. DOI: 10.1111/gfs.12479
15. Boudon A, Peyraud JL, Faverdin P, Delagarde R, Delaby L, Chave AV. (2009). Effect of rumen fill on intake of fresh perennial ryegrass in young and mature dairy cows grazing or zero-grazing fresh perennial ryegrass. *Animal* 3:1706-1720.
16. Broderick GA, Stevenson MJ, Patton RA. (2009). Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 92:2719–2728

17. Broderick GA. (1995). Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. *J Anim Sci* 1995. 73:2760-2773.
18. Bryant RH, Kingsbury LA, Edwards GR. (2016). Does mowing before grazing increase dry matter intake and milk yield?. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 76:73–77.
19. Cabrera Estrada JL, Delagarde R, Faverdin P, Peyraud JL. (2004). Dry matter intake and eating rate of grass by dairy cows is restricted by internal, but not external water. *Anim Feed Sci Technol* 114:59–74.
20. Cabrita ARJ, Dewhurst RJ, Abreu JMF, Fonseca AJM. (2006). Evaluation of the effects of synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows - a review. *Anim Res* 55:1–24.
21. Cajarville, C., A. Britos, N. Errandonea, L. Gutiérrez, D. Cozzolino, and J. L. Repetto. 2015. Diurnal changes in water-soluble carbohydrate concentration in lucerne and tall fescue in autumn and the effects on in vitro fermentation. *N. Z. J. Agric. Res.* 58:281–291. <https://doi.org/10.1080/00288233.2015.1018391>.
22. Capelesso A, Kozloski G, Mendoza A, Pla M, Repetto JL, Cajarville C. (2019). Reducing milking frequency in early lactation improved the energy status but reduced milk yield during the whole lactation of primiparous Holstein cows consuming a total mixed ration and pasture. *Int J Dairy Sci*, 102:8919-8930.
23. Chaudhry AS. (2008). Forage based animal production systems and sustainability, an invited keynote. *Rev Bras de Zootec* 37:78–84.
24. Chen XB, Gomes MJ. (1992). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - An overview of the technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, Scotland, UK.
25. Chilibraste P, Gibb M, Tamminga S. (2005). Pasture Characteristics and Animal Performance. In: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, 2nd edition, J. Dijkstra, J.M. Forbes and J. France. CAB INTERNATIONAL 2005.
26. Chilibraste P, Tamminga S, Boer H. (1997). Effect of length of grazing session, rumen fill and starvation time before grazing on dry matter intake, ingestive behavior and dry matter rumen pool sizes of grazing lactating dairy cows. *Grass Forage Sci* 52:249-257.
27. Chilibraste P, Tamminga S, Bruchem JV, Van der Togt PL. (1998). Efecto del tiempo de pastoreo permitido, el volumen del rumen inerte y la duración de la inanición antes del pastoreo sobre el peso, la composición y los productos finales degenerativos del contenido del rumen de las vacas lecheras lactantes. *Grass and Forage since*, 53 – 146 – 156. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.1998.5320146.x>
28. Civiero, M., R. Delagarde, A. Berndt, J. Rosseto, M. N. de Souza, L. H. Schaitz, and H. M. N. Ribeiro-Filho. 2021. Progressive inclusion of pearl millet herbage as a supplement for dairy cows fed mixed rations: Effects on methane emissions, dry matter intake, and milk production. *J. Dairy Sci.* 104:2956-2965. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18894>.
29. Clark CEF, McLeod KLM, Glassey CB, Gregorini P, Costall DA, Betteridge K, Jago JG. (2010). Capturing urine while maintaining pasture intake, milk production, and animal welfare of dairy cows in early and late lactation. *J Dairy Sci* 93:2280–2286.
30. Clark S.G., M.L. Mitchel, Z. Nie, V.F. Burnett, K.L. Butler, R.P. Zollinger, G.R. Seymour. 2018. Maximising lucerne (*Medicago sativa* L.) production with fixed-length recovery intervals after defoliation in mild winter environments. *J Agro Crop Sci.* 2019;205:88–98. DOI: 10.1111/jac.12300.

31. Colucci PE, Chase LE, Van Soest PJ. (1982). Feed Intake, Apparent Diet Digestibility, and Rate of Particulate Passage in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 65:1445-1456.
32. Colucci PE, Macleod GK, Grovum WL, McMillan I, Barney DJ. (1990). Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. *J Dairy Sci* 73:2143-2156.
33. Cun GS, Edwards GR, Bryant RH. (2017). The effect of pre-graze mowing on milk production of dairy cows grazing grass-herb-legume pastures managed under contrasting spring defoliation regimes. *Animal Production Science* 57:1414-1418.
34. Dalley DE, Roche JR, Moate PJ, Grainger C. (2001). More frequent allocation of herbage does not improve the milk production of dairy cows in early lactation. *Aust J Exp Agric* 41:593-599.
35. Dall-Orsoletta AC, Almeida JGR, Carvalho PC, Savian JV, Ribeiro-Filho HM. (2016). Ryegrass pasture combined with partial total mixed ration reduces enteric methane emissions and maintains the performance of dairy cows during mid to late lactation. *J Dairy Sci* 99:4374-4383.
36. Danelon JL, Locatelli ML, Gallardo M, Guaita S. (2002). Herbage intake and ruminal digestion of alfalfa: a comparison between strip and zero grazed dairy cows. *Livest Prod Sci* 74:79-91.
37. Díaz JE, García JA, Rebuffo M. (1996). Crecimiento de leguminosas en La Estanzuela. Serie Técnica N° 71, INIA. Eds, Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA, Montevideo, Uruguay. ISBN: 9974-38-054-5.
38. DIEA. (2022). Anuario estadístico agropecuario 2022. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Acceso: 21/12/22. [https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O\\_MGAP\\_Anuario\\_estadistico\\_2022-DIGITAL.pdf](https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O_MGAP_Anuario_estadistico_2022-DIGITAL.pdf)
39. Dillon P. (2006). Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. En: Elgersma A, Tamminga S. Fresh herbage for dairy cattle. Ed. Springer. Dordrecht, Cap. 1, pp.1-26
40. Dohme-Meier F, Kaufmann LD, Görs S, Junghans P, Metges CC, Van Dorland HA, Münger A. (2014). Comparison of energy expenditure, eating pattern and physical activity of grazing and zero-grazing dairy cows at different time points during lactation. *Livest Sci* 162:86-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2014.01.006>.
41. Dougherty CT, Bradley NWL, Cornelius P, Lauriault LM. (1989). Ingestive behaviour of beef cattle grazing different forms of Lucerne (*Medicago sativa* L). *Grass Forage Sci* 44:335-342. DOI:10.1111/j.1365-2494.1989.tb02171.x.
42. DSF-MGAP, 1979. Carta de reconocimientos de suelos del Uruguay escala 1:1.000.000, Dirección de Suelos y Fertilizantes (D.S.F.) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) de la República Oriental del Uruguay. <http://bibliotecadigital.bibna.gub.uy:8080/jspui/handle/123456789/5486>
43. FAO (Food and Agriculture Organization) of the United Nations, IDF (International Dairy Federation), IFCN Dairy Research Center. (2014). World mapping of animal feeding systems in the dairy sector. FAO, IDF and IFCN.
44. Fariña S, Baudracco J, Bargo F. (2021). Dairy Production in Diverse Regions: Latin America. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 3rd edition, Volume 2 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00052-0>
45. Fariña, S, Chilibroste, P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agric. Syst.* 176. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.05.001>

46. Feng S, Lock AL, Garnsworthy PC. (2004). A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *J Dairy Sci* 87:3785–3788.
47. Galli JR, Cangiano CA, Fernández HH. (1996). Comportamiento ingestivo y consumo de bovinos en pastoreo. *Rev Arg Prod Anim* 16:119-142.
48. Galli JR, Cangiano CA., Pece MA, Larripa MJ, Milone DH, Utsumi SA, Laca EA. (2018). Monitoring and assessment of ingestive chewing sounds for prediction of herbage intake rate in grazing cattle. *Animal* 12:973–982. DOI:10.1017/S1751731117002415
49. Greenhalgh JFD, Runicie KD. (1962). The herbage intake and milk production of strip- and zero-grazed dairy cows. *J Agric Sci* 59:95-103.
50. Gregorini P, Clark CEF, Jago JG, Glassey CB, McLeod KLM, Romera AJ. (2009). Restricting time at pasture: effects on dairy cow herbage intake, foraging behavior, hunger-related hormones, and metabolite concentration during the first grazing session. *J Dairy Sci* 92:4572–4580.
51. Gregorini P, DelaRue B, McLeod K, Clark CEF, Glassey CB, Jago J. (2012). Rumination behavior of grazing dairy cows in response to restricted time at pasture. *Livest Sci* 146:95–98.
52. Grovum W. L., V. J. William. 1973. Rate of passage of digesta in sheep. *BY. J. Nutr.* 30, 313.
53. Hirata M, Iwamoto T, Otozu W, Kiyota D. (2002). The effects of recording interval on the estimation of grazing behavior of cattle in a daytime grazing system. *Asian-australas J Anim Sci* 15:745-750.
54. Horadagoda A, Fulkerson WJ, Nandra KS, Barchia IM. (2009). Grazing preferences by dairy cows for 14 forage species. *Anim Prod Sci* 49:586–594.
55. Huhtanen P, Kaustell K, Jaakkola S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim Feed Sci Technol* 48:211–227.
56. INALE, (2020). Informes INALE N° 18. Situación y perspectivas de la lechería Uruguaya, periodo enero – diciembre 2019. SSN: 2301-055X
57. INIA-INASE. Cuitiño MJ, Stewart S, Morales X, Cardozo V. (2022). Resultados experimentales de la evaluación nacional de cultivares de especies forrajeras. *Anuales, Bianuales y Perennes Período 2022*. Pag. 65 – 77. Disponible en: [http://www.inia.org.uy/convenio\\_inase\\_inia/resultados/index\\_00.htm](http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/resultados/index_00.htm). Ultimo acceso 27/1/23
58. Irvine L, Freeman M, Rawnsley R. (2010). The effect of grazing residual control methods on cow intake and milk production in late spring. *Australasian Dairy Science Symposium*. 4:195–198.
59. Jahn BE, Avilés R., Barrales VL. (2004). Velocidad de secado de alfalfa bajo diferentes condiciones de secado artificial. *Agricultura Técnica*, 64(2), 163-171. doi.org/10.4067/S0365-28072004000200005
60. Joubran AM, Pierce KM, Garvey N, Shalloo L, O'Callaghan TF. (2021). Invited review: A 2020 perspective on pasture-based dairy systems and products. *J Dairy Sci* 104:7364–7382.
61. Kammes, K.L; Allen, M.S. 2012a. Nutrient demand interacts with forage family to affect digestion responses in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 95, Issue 6. Pages 3269-3287. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5021>.
62. Kammes, K.L; Allen, M.S. 2012b. Rates of particle size reduction and passage are faster for legume compared with cool-season grass, resulting in lower rumen fill and less effective fiber. *J.Dairy Sci.* 95:3288–3297. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5022>
63. Kaufmann LD, Münger A, Rérat M, Junghans P, Görs S, Metges CC, Dohme-Meier F. (2011). Energy expenditure of grazing cows and cows fed grass

- indoors as determined by the  $^{13}\text{C}$  bicarbonate dilution technique using an automatic blood sampling system. *Dairy Sci* 94 :1989–2000
64. Kelsey JA, Corl BA, Collier RJ, Bauman DE. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J Dairy Sci* 86:5288–2597.
65. Kennedy E, McEvoy M, Murphy JP, O'Donovan M. (2009). Effect of restricted access time to pasture on dairy cow milk production, grazing behavior, and dry matter intake. *J. Dairy Sci.* 92:168–176. doi:10.3168/jds.2008-1091.
66. Kingsbury L. (2014). The effect of pre-mowing pasture on milk, pasture, and nitrogen partitioning of dairy cows in the autumn. Tesis Doctoral, Lincoln University, Christchurch, New Zealand.
67. Kolver ES, Penno JK, MacDonald KA, McGrath, JM, Carter WA. (1999). Mowing pasture to improve milk production. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 61:139-145.
68. Kononoff PJ, Heinrichs AJ, Buckmaster DR. (2003). Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. *J Dairy Sci* 86:1858-1863
69. Krizsan S.J., S. Ahvenjärvi, P. Huhtanen. (2010). A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. *J. Dairy Sci.* 93 :5890–5901. doi: 10.3168/jds.2010-3457.
70. Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 57:347–358.
71. Lira VM, Pereira JC, Mendonça RA, Sampaio D, de Paula E. (2006). Avaliação de marcadores e modelos matemáticos para o estudo das cinéticas de trânsito e de degradação ruminal em novilhos mantidos em pastagem de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.). *R. Bras. Zootec.*, v.35, n.3, p.902-913, 2006.
72. Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. (1998). Statistical analysis of repeated measures using SAS procedures. *J Anim Sci* 76:1216-1231.
73. Macoon B, Sollenberger LE, Moore JE, Staples CR, Fike JH, Portier KM. (2003). Comparison of three techniques for estimating the forage intake of lactating dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 81:2357–2366.
74. Meccage E. 2021. Regeneration nation: alfafa's role in sustainable agriculture. In: *Proceedings, 2021 Western Alfalfa & Forage Symposium*, Reno, NV 16-18 November 2021. (<http://alfalfa.ucdavis.edu>).
75. Meijs JA. (1981). Herbage intake by grazing dairy cows. PhD thesis. Wageningen Agricultural University.
76. Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016a). Digestive response of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J Dairy Sci* 99:8778–8789.
77. Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016b). Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J Dairy Sci* 99:1938–1944.
78. Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2017). Behaviour of cows fed a total mixed ration with different access time to fresh forage. *New Zealand J Agric Res* 61:102–108.
79. Methol M. (2022). Oferta y demanda de productos concentrados para la alimentación animal por cadena productiva. Análisis sectorial y cadenas productivas. Oficina de Programación y Política Agropecuaria, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (OPYPA-MGAP). Consulta: 14/1/23. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/opyp>.

80. Minnee EMK, Waghorn GC, Gregorini P, Bryant RH, Chapman DF. (2018). Characteristics of boli formed by dairy cows upon ingestion of fresh ryegrass, lucerne or chicory. *Animal*, 1 -10. Doi:10.1017/S1751731118002938.
81. Mohammed R, Stanton CS, Kennelly JJ, Kramer JKG, Mee JF, Glimm DR, O'Donovan M, Murphy JJ. (2009). Grazing cows are more efficient than zero-grazed and grass silage-fed cows in milk rumenic acid production. *J Dairy Sci* 92:3874–3893
82. NASEM 2021. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2021. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25806>.
83. NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
84. Oba M., Allen MS. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:589–596
85. Okine EK, Mathison GW, Kaske M, Kennelly JJ, Christopherson RJ. (1998). Current understanding of the role of the reticulum and reticulo-omasal orifice in the control of digesta passage from the ruminoreticulum of sheep and cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 1998, 15-21.
86. Okine EK, Mathison GW. (1991). Effects of feed intake on particle distribution, passage of digesta, and extent of digestion in the gastrointestinal tract of cattle. *J Anim Sci.* 69(8):3435-45. doi: 10.2527/1991.6983435x. PMID: 1894578.
87. Orr RJ, Rutter SM, Penning PD, Rook AJ. (2001). Matching grass supply to grazing patterns for dairy cows. *Grass Forage Sci* 56:352–361.
88. Pastorini M, Pomiés N, Repetto JL, Mendoza A, Cajarville C. (2019). Productive performance and digestive response of dairy cows fed different diets combining a total mixed ration and fresh forage. *J Dairy Sci* 102:4118–4130.
89. Pembleton KG, Hills JL, Freeman MJ, McLaren DK, French M, Rawnsley RP. (2016). More milk from forage: Milk production, blood metabolites, and forage intake of dairy cows grazing pasture mixtures and spatially adjacent monocultures. *J. Dairy Sci.* 99:3512–3528
90. Pérez-Ramirez E, Peyraud JL, Delagarde R. (2009). Restricting daily time at pasture at low and high pasture allowance: Effects on pasture intake and behavioral adaptation of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 92:3331–3340.
91. Pérez-Ruchel A, Repetto JL, Cajarville C. (2017). Supplementing high-quality fresh forage to growing lambs fed a total mixed ration diet led to higher intake without altering nutrient utilization. *Animal*, 11:12, pp2175–2183. Doi:10.1017/S1751731117000933.
92. Pozo CA, Kozloski GV, Cuffia M, Repetto J L, Cajarville C. (2022). Changing the grazing session from morning to afternoon or including tannins in the diet was effective in decreasing the urinary nitrogen of dairy cows fed a total mixed ration and herbage. *J Dairy Sci* 105:4987-5003.
93. Pulido RG, Ruiz-Albarrán M, Balocchi OA, Nannig P, Wittwer F. (2015). Effect of timing of pasture allocation on production, behavior, rumen function, and metabolism of early lactating dairy cows during autumn. *Livest Sci* 177:43–51.
94. Repetto JL, Echarri V, Aguerre M, Cajarville C. (2011). Use of fresh cheese whey as an additive for Lucerne silages: Effects on chemical composition, conservation quality and ruminal degradation of cell walls. *Anim Feed Sci Technol* 170:160-164.
95. Repetto JL, González J, Cajarville C, Alvir MR, Rodríguez CA. (2003). Relationship between ruminal degradability and chemical composition of dehydrated lucerne. *Anim. Res.* 52:27-36.

96. 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 mixtures. *Animal Research*, 54(2), 73-80.
97. Reynolds CK, Kristensen NB. (2008). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. *J Anim Sci* 86:E293-E305.
98. Roche JR, Blache D, Kay JK, Miller DR, Sheahan AJ, Miller DW. (2008). Neuroendocrine and physiological regulation of intake with particular reference to domesticated ruminant animals. *Nutr Res Rev* 21:207-234.
99. Rutter SM (2006). Diet preference for grass and legumes in free-ranging domestic sheep and cattle: current theory and future application. *Appl Anim Behav Sci* 97:17–35.
100. Santana A, Cajarville C, Mendoza A, Repetto JL. (2017). Combination of legume-based herbage and total mixed ration (RTM) maintains intake and nutrient utilization of RTM and improves nitrogen utilization of herbage in heifers. *animal*, 11:616-624.
101. Schingoethe DJ. (2017). A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *J Dairy Sci* 100:10143–10150.
102. Schirmann K, von Keyserlingk MA, Weary DM, Veira DM, Heuwieser W. (2009). Technical note: Validation of a system for monitoring rumination in dairy cows. *J Dairy Sci* 92:6052–6055.
103. Seo S, Tedeschi LO, Lanzas C, Schwab CG, Fox DG. (2006). Development and evaluation of empirical equations to predict feed passage rate in cattle. *Animal Feed Science and Technology* 128 (2006) 67–83. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.09.014
104. Sheaffer CC, Barnes DK, Warnes DD, Lueschen WE, Ford HJ, Swanson DR. (1992). Seeding-year cutting affects winter survival and its association with fall growth score in alfalfa. *Crop Science*. 32-1:225-231. DOI: 10.2135/cropsci1992.0011183X003200010046x.
105. Soriano FD, Polan CE, Miller CN. (2001). Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. *J Dairy Sci* 84:2460–2468.
106. Stirling S, Delaby L, Mendoza A, Fariña S. (2021). Intensification strategies for temperate hot-summer grazing dairy systems in South America: Effects of feeding strategy and cow genotype. *Journal of Dairy Science* Vol. 104 No. 12, 2021. doi.org/10.3168/jds.2021-20507
107. Tafaj M, Zebeli Q, Baes C, Steingass H, Drochner W. (2007). A meta-analysis examining effects of particle size of total mixed rations on intake, rumen digestion and milk production in high-yielding dairy cows in early lactation. *Anim Feed Sci Technol* 138 (2007) 137–161.
108. Tamminga S. (1993). Influence of feeding management on ruminant fiber digestibility. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. and Ralph, J. (eds) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society Agronomy, Madison, USA, pp. 571–602.
109. Teimouri Yansari A, Valizadeh R, Naserian A, Christensen DA, Yu P, Eftekhari Shahroodi F. 2004. Effects of alfalfa particle size and specific gravity on chewing activity, digestibility, and performance of Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 87(11):3912-24. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73530-4. PMID: 15483175.
110. Thomas TA. (1977). An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage. *J Sci Food Agric* 28(7):639-642.
111. Tozer PR, Bargo F, Muller LD. (2003). Economic Analyses of Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Ration. *J Dairy Sci* 86:808–818

112. Tucker WB, Rude BJ, Wittayakun S. (2001). Case study: Performance and economics of dairy cows fed a corn silage-based total mixed ration or grazing annual ryegrass during mid to late lactation. *Prof Anim Sci* 17:195-201.
113. Tyrrell HF, Reid JT. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *J Dairy Sci* 48(9):1215-1223.
114. Udén P, Colucci PE, Van Soest PJ. (1980). Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J Sci Food Agric* 31:625-632.
115. Ulbricht TLV, Southgate DAT. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338:985-992.
116. Undersander D, Cosgrove D, Cullen E, Grau C, Rice M, Renz M, Sheaffer C, Shewmaker G. (2011). *Alfalfa Management Guide*. Published by: American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc. ISBN: 978-0-89118-179-8.
117. Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, Clayton MK. (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J Dairy Sci* 82:2686–2696.
118. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74:3583-3597. . [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
119. Vérité, R., Journet, M., Flechet, J. (1970). Influence de la teneur en eau et de la dèshydratation de l'herbe sur sa valeur alimentaire pour les vaches laitières. *Annales de Zootechnie*, 19, 255-268.
120. Vilela D, Juntolli FV. (2022). Alfalfa: potencial para apoyar la expansión de la ganadería y de los sistemas agroalimentarios y agroindustriales de América Latina. En: *Alfalfa: del cultivo a sus múltiples usos*. Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA), Brasilia, MAPA/AECS, 2022. 260p. ISBN: 978-85-7991-152-1
121. Waghorn GC, Reid CSW, Ulyatt MJ, John A. (1986). Feed comminution, particle composition and distribution between the four compartments of the stomach in sheep fed chaffed lucerne hay at two feeding frequencies and intake levels. *J. Agric. Sci.* 106:287-296.
122. Wales WJ, Kolver ES. (2017). Challenges of feeding dairy cows in Australia and New Zealand. *Anim. Prod. Sci.* 57:1366–1383. <https://doi.org/10.1071/AN16828>.
123. Wales WJ, Marett LC, Greenwood JS, Wright MM, Thornhill JB, Jacobs JL, Ho CKM, Auldism MJ. (2013). Use of partial mixed rations in pasture-based dairying in temperate regions of Australia. *Anim Prod Sci* 53:1167-1178.
124. Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K., & Lin, C. J. (2003). History of silage. *Silage science and technology*, 42, 1-30.
125. Williams CH, David DJ, Iismaa O. (1962). The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J Agric Sci (Camb)* 59:381-385.
126. Wright W, Illius AW. (1995). A comparative study of the fracture properties of five grasses. *Functional Ecology* 9:269–278.
127. Yemm EW, Willis AJ. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J* 57:508-514.
128. Zebeli Q, Tafaj M, Weber I, Dijkstra J, Steingass H, Drochner W. (2007). Effects of Varying Dietary Forage Particle Size in Two Concentrate Levels on Chewing Activity, Ruminal Mat Characteristics, and Passage in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90:1929–1942 doi:10.3168/jds.2006-354



## ANEXOS

### **Publicación 1.**

Santana A, C. Cajarville, A. Mendoza, JL. Repetto. (2023). Including 8 h of access to alfalfa in 1 or 2 grazing sessions in dairy cows fed a partial mixed ration: impacts on intake, behavior, digestion, and milk production and composition. J Dairy Sci. Manuscript ID: JDS.2022-22743.R4 (aceptado para su publicación).

### **Publicación 2.**

Santana A, C. Cajarville, JL. Repetto. (2023). Alfalfa pre-graze mowing with or without wilted, effect on productive performance, feeding behavior and digestive response of dairy cows fed a partial mixed ration. Para enviar al J Dairy Sci.