EFECTO DEL ENSILAJE DE MAÍZ NERVADURA MARRÓN SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA DE VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN Y PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN *IN VITRO*

Gabriel Alberto Genero

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de MAGISTER en PRODUCCIÓN ANIMAL

Orientación Nutrición Animal

Área de Producción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Balcarce, Argentina
Junio, 2015

EFECTO DEL ENSILAJE DE MAÍZ NERVADURA MARRÓN SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA DE VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN Y PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN *IN VITRO*

Gabriel Alberto Genero

Director: Ing. Agr., M.Sci., Dr. Gerardo Antonio Gagliostro

Comité de Consejeros: Ing. Agr., M.Sci. Alberto Daniel Garciarena

Ing. Agr., M.Sci. Carlos Alberto Cangiano

Ing. Agr., M.Sci., Dra. María Delfina Montiel

EFECTO DEL ENSILAJE DE MAÍZ NERVADURA MARRÓN SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA DE VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN Y PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN *IN VITRO*

Gabriel Alberto Genero

Aprobada por:

Evaluador/a:Ing. Agr., M.Sci., Ph.D., Horacio Leandro Gonda

Evaluador/a:Ing. Agr., M.Sci., Ph.D., Enrique Paván

DEDICATORIA

A mi gran compañero de la vida, que desde mi infancia me enseñó a amar a la actividad agropecuaria y al campo en sí, el querido Nildo, para mí “Titi”.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité de tesis: Daniel, Carlos, Delfina y, en especial a Gerardo, por confiar en mí y aceptarme como un integrante más de su equipo de trabajo.

A Liliana, quien a pesar de no haber formado parte del comité siempre estuvo presente; a Marita; al personal del tambo y del laboratorio de análisis de alimentos; a Susana, por su disponibilidad absoluta para mis innumerables consultas; y a Enrique, por abrirnos las puertas de su laboratorio y permitirnos trabajar con absoluta confianza.

A mis grandes amigos, Alejandra, Alejandro, Andrés, Laura, Lía, Lucas, Mauro, Nelsis, Rafa, Ricardo, de los cuales guardo los mejores recuerdos y, lo más importante, pudimos continuar nuestra amistad más allá de la etapa del posgrado.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam que brindó todo su apoyo para mi formación.

A mis padres, Martha y Omar, quienes fueron el sostén emocional en todo momento. Y finalmente, a Analía, mi esposa, persona que desde un principio y sin dudar me brindó toda su confianza y fue el motor para llevar a cabo este posgrado.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN……..……1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA……..……....……....…...5
1. La pared celular…….……...……5
2. Relación entre el consumo de materia seca y la pared celular del forraje…….…8
3. Digestibilidad de la fibra en detergente neutro……...9
3.1. Importancia y factores a tener en cuenta para su interpretación…….……9
3.2. Componentes de la planta que afectan a la digestibilidad de la fibra en detergente neutro…….12
3.3. Opciones para incrementar la digestibilidad de la fibra en detergente neutro en ensilajes……..……...……..……15
3.3.1. Inoculantes…..……...……15
3.3.2. Maíces con nervadura marrón…….....….16
3.3.2.1. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre el consumo de materia seca……..…19
3.3.2.1.1. Lactancia temprana……..…….21
3.3.2.1.2. Lactancia media…….…….24
3.3.2.1.3. Lactancia avanzada……..……...….25
3.3.2.1.4. Conclusión……..……..….25
3.3.2.2. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre la producción de leche……..…….26
3.3.2.2.1. Lactancia temprana…….....…..…26
3.3.2.2.2. Lactancia media…….……30
3.3.2.2.3. Lactancia avanzada…….…….…31
3.3.2.2.4. Conclusión……..…….....31
3.3.2.3. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre la composición química de la leche…….…….31
3.3.2.4. Digestibilidad, *in vitro* e *in vivo*, de la fibra en detergente neutro de los ensilajes de maíz nervadura marrón…….……35
3.3.2.5. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre el sitio de digestión y la digestibilidad *in vivo* del almidón……..…….…...36
3.3.2.6. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre la concentración ruminal de ácidos grasos volátiles……....37

3.3.2.7. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre el pH del medio ruminal……..……...……..……39

HIPÓTESIS……..……41

OBJETIVOS……..……42

MATERIALES Y MÉTODOS……..……43
1. Experimento 1: RESPUESTA PRODUCTIVA EN VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN……..43
1.1. Lugar y fecha……..……..43
1.2. Cultivo y confección de los ensilaje de maíz……..……..……43
1.3. Animales……..……..44
1.4. Diseño experimental y tratamientos……..……44
1.5. Manejo general de los animales……..……..45
1.6. Mediciones en los alimentos……..……45
1.7. Medición del consumo de alimento……..……..…….....…….46
1.8. Estimación de la digestibilidad *in vivo*……..……47
1.9. Medición de la producción y composición química de la leche……..…....…48
1.10. Medición del peso vivo, obtención de plasma y análisis de metabolitos y hormonas……..……...……49
1.11. Cálculo del balance energético……..……..49
1.11.1. Consumo de energía metabolizable……....……..…...49
1.11.2. Requerimientos de energía metabolizable……..……..…….....….51
1.11.2.1. Mantenimiento……..……51
1.11.2.2. Gestación……..……..……52
1.11.2.3. Producción de leche……..……52
1.11.2.4. Ganancia de peso……..……52
1.12. Análisis estadístico……..…..53
2. Experimento 2: FERMENTADORES DE DOBLE FLUJO CONTINUO…….…....54
2.1. Lugar y fecha……..……..54
2.2. Equipamiento y condiciones de fermentación……..…..…54
2.3. Diseño experimental y tratamientos……..……55
2.4. Mediciones en el medio de cultivo……..……..56
2.4.1. pH……..……..56

2.4.2. Concentración de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal…..….....56
2.5. Mediciones en los efluentes……..……...…….57
2.6. Determinación del flujo de nitrógeno microbiano……..……...…...…57
2.7. Análisis estadístico……..……58

RESULTADOS……..……...…...60
1. Experimento 1: RESPUESTA PRODUCTIVA EN VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN……...……...……..…..……60
1.1. Composición química y valor nutricional de los maíces previo al ensilado…....60
1.2. Composición química y valor nutricional de los alimentos y de las raciones completamente mezcladas.....61
1.3. Consumo de alimento…….…..……64
1.4. Digestibilidad *in vivo*…….…..…….....64
1.5. Producción y composición química de la leche…….…….66
1.6. Ganancia de peso y concentración plasmática de metabolitos y hormonas.....71
1.7. Balance energético……..……71
2. Experimento 2: FERMENTADORES DE DOBLE FLUJO CONTINUO…….....72

DISCUSIÓN……..……78
1. Experimento 1: RESPUESTA PRODUCTIVA EN VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN……...……...……...78
1.1. Composición química y valor nutricional de los ensilajes y de las raciones completamente mezcladas…….……78
1.2. Consumo de alimento……..……...79
1.3. Digestibilidad *in vivo*……..…….…….....80
1.4. Producción de leche…….…….....81
1.5. Composición química de la leche y producción de grasa y proteína……82
1.6. Ganancia de peso……...85
1.7. Concentración plasmática de metabolitos y hormonas……..…….....86
2. Experimento 2: FERMENTADORES DE DOBLE FLUJO CONTINUO…….....87
2.1. Degradabilidad de la materia seca y de sus componentes……..…...…87
2.2. Flujos de nitrógeno y síntesis microbiana……....90
2.3. Concentración y perfil de ácidos grasos volátiles…….....92
2.4. pH del medio de fermentación……..…....95

CONCLUSIONES…..……..…….96

BIBLIOGRAFÍA……..……...97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias en el conteniendo de lignina y en la digestibilidad de la fibra en detergente neutro (DFDN) entre ensilajes de maíz nervadura marrón (EBMR) y convencional (EC), expresadas como porcentaje respecto al convencional……..18

Tabla 2. Diferencias en el consumo de materia seca (CMS), la producción de leche y leche corregida por grasa (LCG) y, el contenido y la producción de proteína y grasa entre vacas alimentadas con dietas conteniendo ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) y vacas alimentadas con dietas conteniendo ensilaje de maíz convencional (EC)…….19

Tabla 3. Contenido y aporte de energía bruta (EB) de cada uno de los ingredientes de las raciones completamente mezcladas (TMR)……..……...50

Tabla 4. Ingredientes de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz nervadura marrón (BMR) o convencional (C)……..…..56

Tabla 5. Composición química y valor nutricional de los maíces convencional y nervadura marrón previo al ensilado…….……60

Tabla 6. Composición química y valor nutricional de los ensilajes de maíz convencional (EC) y nervadura marrón (EBMR)……..……..62

Tabla 7. Distribución de partículas de los ensilajes de maíz convencional (EC) y nervadura marrón (EBMR)…….……62

Tabla 8. Composición química y valor nutricional de los ingredientes dietarios utilizados en la formulación de las raciones completamente mezcladas (TMR)……63

Tabla 9. Composición química estimada de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).…63

Tabla 10. Consumo de materia seca y componentes de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR) en vacas en lactancia temprana y avanzada……..……64

Tabla 11. Digestibilidad *in vivo* (%) de la materia seca, de la fibra en detergente neutro y ácido y del almidón de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR), en vacas en lactancia temprana…….……65

Tabla 12. Producción y composición de leche en vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)…….66

Tabla 13. Producción y composición de leche en vacas en lactancia avanzada alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)……..……..……...67

Tabla 14. Promedios de las diferencias en la producción y composición de leche entre el período experimental [(1)] y el período de covariable [(2)] en vacas en estado de lactancia temprana y avanzada alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)….68

Tabla 15. Perfil de ácidos grasos (g/100 g de ácidos grasos totales) en la leche de vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)….69

Tabla 16. Concentraciones de hormonas y metabolitos plasmáticos y ganancia de peso en vacas en lactancia temprana y avanzada alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)……..…71

Tabla 17. Degradabilidad de la materia seca y componentes de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR) en fermentadores de doble flujo continuo……..73

Tabla 18. Flujos de nitrógeno (N) total y de sus fracciones en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)…….…73

Tabla 19. pH y concentración de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)…….75

Tabla 20. Producción diaria de ácidos grasos volátiles en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)……77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre la concentración de lignina y la digestibilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro (DFDN) de dos especies de gramíneas cosechadas a tres estados de madurez (•) y seis líneas genéticas de una especie de gramínea cosechadas a un único estado de madurez (○), evaluadas a través de todas las muestras (a) o por set de datos (b). Adaptado de Jung (2012)……...14

Figura 2. Esquema representativo de las uniones cruzadas entre el ácido ferúlico de la lignina y la hemicelulosa en gramíneas. Adaptado de Jung (2012)……15

Figura 3. Consumo de materia seca (CMS) en vacas alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) o convencional (EC) durante el período pre (-3 semanas) y posparto (+3 semanas), seguido por una dieta con EC desde la semana 4 hasta la 15. Adaptado de Stone *et al.* (2012)……..……..……...23

Figura 4. Producción de leche corregida al 3,5% de grasa butirosa (LCG) en vacas alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) o convencional (EC) durante el período posparto (+3 semanas), seguido por una dieta con EC desde la semana 4 hasta la 15. Adaptado de Stone *et al.* (2012)…….28

Figura 5. Relación entre la respuesta en producción de leche al tratamiento con ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) y la producción de leche promedio durante los 14 días anteriores al comienzo del experimento (producción inicial). Adaptado de Oba y Allen (1999a)……..……..……...29

Figura 6. Relación entre las digestibilidades *in vivo* de la materia seca (DMS) y de la fibra en detergente neutro (DFDN) en vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)……..…….65

Figura 7. Relación entre las concentraciones de grasa butirosa (% de la producción de leche) y de 18:1 *trans*-10 (g/100 g de ácidos grasos totales) en la leche de vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)……..…70

Figura 8. Relación entre las concentraciones de grasa butirosa (% de la producción de leche) y de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (g/100 g de ácidos grasos totales) en la leche de vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)….70

Figura 9. pH registrado durante los días 9 al 11 del período experimental en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)……..75

Figura 10. Concentración de nitrógeno amoniacal ($N\text{-}NH_3$) y pH registrados durante el día 10 del período experimental en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR)……..76

Figura 11. Concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGVt) y pH registrados durante el día 10 del período experimental en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).……76

RESUMEN

Debido a la mayor digestibilidad de su fibra, el ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) es utilizado en reemplazo al de maíz convencional (EC) para aumentar la producción en vacas lecheras. Los objetivos fueron conocer el efecto de la alimentación con EBMR sobre la digestibilidad *in vivo*, el consumo, la producción y composición de leche, la variación de peso vivo y el perfil de metabolitos y hormonas plasmáticos en vacas en lactancia temprana y avanzada (Experimento 1), y sobre parámetros de fermentación *in vitro* (Experimento 2). En el experimento 1 se evaluaron 2 raciones completamente mezcladas (TMR), una con EBMR (BMR) y otra con EC (C), durante 9 semanas, en 26 vacas en lactancia temprana y 14 en lactancia avanzada, mediante un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2 × 2. La digestibilidad *in vivo* de la fibra en detergente neutro (FDN) fue mayor en la ración BMR respecto a C. En lactancia temprana, las vacas de BMR presentaron mayores consumos de materia seca (+1,5 kg MS/día), proteína (+0,3 kg/día) y FDN (+0,4 kg/día) que las vacas alimentadas con la ración C, con una tendencia en el consumo de energía. Las producciones de leche (+2,9 kg/día) y de proteína láctea (+0,08 kg/día) también fueron superiores en BMR, mientras que el contenido de grasa fue menor (-0,43 unidades %) y la producción de grasa tendió a serlo. Las concentraciones de los ácidos grasos (AG) 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (AG inhibidores de la lipogénesis mamaria) fueron mayores en la leche de BMR. En lactancia avanzada, el consumo de almidón fue menor (-0,5 kg/día), y las producciones de leche y de grasa tendieron a ser menores en BMR. El tipo de ensilaje no afectó ni a la eficiencia de producción ni a las ganancias de peso en ningún estado de lactancia. El nivel de hormona de crecimiento (GH) fue superior en C. En el experimento 2 se evaluaron las TMRs del experimento 1 (BMR y C), en 2 períodos de 11 días cada uno, usando 4 fermentadores de doble flujo continuo, bajo un diseño en bloques completos al azar. La ración BMR resultó en una mayor degradabilidad de la FDN, mayor concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) totales y menor pH del medio ruminal. La síntesis y la eficiencia de crecimiento microbiano fueron similares entre las TMRs. Los resultados productivos sugieren una respuesta diferencial entre estados de lactancia. En lactancia temprana, la mayor digestibilidad de la FDN del EBMR estaría asociada con el incremento en el consumo de MS, energía y proteína, y esto con el aumento en la producción de leche y de proteína láctea. La concentración y producción de grasa butirosa pudo estar asociada a un efecto dilución y, en parte, a la mayor producción de AG inhibidores de la síntesis mamaria *de novo*. El menor pH

del medio ruminal observado *in vitro* con la ración BMR pudo estar explicado por la mayor degradabilidad de la fibra y concentración de AGV y podría asociarse con el incremento en la producción *in vivo* de AG inhibidores de la lipogénesis mamaria. En lactancia avanzada, el EBMR tendió a disminuir la producción de leche por un menor consumo de almidón y menor secreción de GH.

Palabras clave: raciones completamente mezcladas, producción y composición de leche, consumo de materia seca, digestibilidad de la fibra, híbridos BMR.

ABSTRACT

Because of its higher fiber digestibility, brown midrib corn silage (EBMR) is used as an alternative to conventional corn silage (EC) in order to increase yield in dairy cows. The objectives were to know the effect of fed EBMR on *in vivo* digestibility, food intake, milk yield, milk composition, live weight variation, and plasma metabolite and hormone profile in early and late lactation dairy cows (Experiment 1), and on parameters of *in vitro* fermentation (Experiment 2). In experiment 1 were evaluated 2 total mixed rations (TMR) containing EBMR (BMR) or EC (C), during 9 weeks, in 26 early dairy cows and 14 late dairy cows, throughout a completely randomized design with a 2 × 2 factorial arrangement. Neutral detergent fiber (FDN) *in vivo* digestibility was higher in BMR than in C ration. In early lactation, dry mater (+1.5 kg MS/day), protein (+0.3 kg/day) and FDN (+0.4 kg/day) intakes were higher in BMR cows, with a tendency to increase energy intake. Milk (+2.9 kg/day) and protein (+0.08 kg/day) yields were also higher in BMR, whereas milk fat content was lower (-0.43 percentage units) and milk fat yield tended to decrease. Concentrations of the fatty acids (AG) *trans*-10 C18:1 and *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (inhibitors AG of mammary lipogenesis) were higher in BMR milk. In late lactation, starch intake was lower (-0.5 kg/day), and milk and fat yields tended to be lower in BMR. The silage type did not affect feed efficiency nor weight gains at any lactation stage. Growth hormone (GH) concentration was higher in C. The TMRs of the experiment 1 (BMR and C) were evaluated in experiment 2, during 2 periods of 11 days each, using 4 dual-flow continuous culture systems. A randomized complete block design was used as experimental design. The BMR ration resulted in higher FDN degradability, higher volatile fatty acids (AGV) concentration and lower ruminal pH. Microbial growth synthesis and efficiency were similar between TMRs. The productive results suggest a different response between lactation stages. In early lactation, the higher fiber digestibility of EBMR would be associated with increasing intakes of MS, energy and protein, and this with increasing milk yield and milk protein yield. The lower milk fat concentration and yield could be related to a dilution effect and, partially, to higher production of inhibitors AG of *de novo* mammary synthesis. The lower ruminal pH observed in *in vitro* conditions with BMR ration could be explained by higher fiber degradability and AGV concentration, and could be associated with the increased *in vivo* production of inhibitors AG of mammary lipogenesis. In late lactation, EBMR tended to decrease milk yield by a lower starch intake and GH concentration.

Key words: total mixed rations, milk yield and composition, dry matter intake, fiber digestibility, BMR hybrids.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la superficie destinada a forrajes para ensilaje de planta entera ha mostrado un considerable incremento, desde unas 620000 hectáreas en la campaña 2006/2007 a más de 1,5 millones en la del 2012/2013 (Opacak, F.A., com. pers., 2013). Algunas razones que llevaron a este aumento en la confección de ensilajes han sido sus elevados rindes de materia seca (MS) y su contribución a resolver el inconveniente de la producción estacional de forraje (Bertoia, 2011). Durante la última campaña, se estimó que el 52% de la superficie picada fue para la producción de leche y el 48% restante para carne, siendo el maíz, el cultivo predominante con aproximadamente el 60% del total (Opacak, F.A., com. pers., 2013).

El ensilaje de planta entera de maíz es un recurso utilizado para cubrir deficiencias de disponibilidad de forraje en otoño-invierno o como parte de las llamadas raciones completamente mezcladas (TMR). No obstante, pese a su amplia y creciente difusión, las evaluaciones de su composición química muestran una calidad nutricional relativamente baja. Durante mucho tiempo, la calidad de la fracción vegetativa ha sido poco considerada por los mejoradores genéticos que priorizaron el rendimiento de grano (Bertoia, 2011). Sin embargo, cuando se emplean ensilajes de planta entera en altas proporciones de las dietas para rumiantes, el interés nutricional pasa por la calidad de la planta en su conjunto. Tomando un índice de cosecha promedio para maíz de 0,45 (Andrade *et al*., 2009), el 55% del total de biomasa aérea producida (base MS) corresponde a la fracción vegetativa, poniendo de manifiesto la alta proporción en la que participa esta fracción y, por ende, la importancia que tiene su calidad nutricional. En Argentina, los ensilajes de maíz se caracterizan por un contenido elevado de fibra en detergente neutro (FDN), una baja concentración de almidón y una baja digestibilidad de la materia seca (DMS), con valores promedios (en % de la MS) de 47,4 (±6,7), 18 (±7,7) y 61,4 (±5,6), respectivamente (Guaita y Fernández, 2011). En consecuencia, el contenido de energía metabolizable (EM), estimado a partir de la DMS, es relativamente bajo (2,2±0,2 Mcal/kg de MS) respecto a los requerimientos de vacas lecheras que producen más de 30 kg de leche por día (2,6-2,7 Mcal EM/kg de MS, NRC 2001). Datos de la región norte de la provincia de Santa Fe muestran tendencias similares en los valores promedios de FDN (51,5%, ±2,95), DMS (63,01%, ±1,86) y EM (2,27 Mcal/kg de MS, ±0,07) (Royo; Secanell, 2013).

Si bien los ensilajes, así como también otros tipos de forrajes, son un componente necesario de las dietas de vacas lecheras en lactación proveyendo de fibra grosera para un óptimo funcionamiento del rumen (Oba; Allen, 2011), su baja digestibilidad y alta concentración de pared celular (FDN) limitan la disponibilidad energética al incidir negativamente sobre el consumo voluntario de alimento, especialmente cuando son incluidos en altas proporciones de las dietas (Jung; Allen, 1995). Los componentes fibrosos de los forrajes ocupan mayor volumen que los componentes del contenido celular, aumentando el llenado físico del rumen (Mertens, 1987). El llenado ruminal está en función de las tasas de digestión y pasaje y de la concentración de FDN de la dieta (Jung; Allen, 1995). Comparado con maíces convencionales, los maíces con nervadura marrón (BMR, por sus siglas en inglés) debido a su menor contenido de lignina y a una composición química alterada de esta (Hatfield *et al.*, 1999; Sattler *et al.*, 2010) han resultado en mayores digestibilidades de su fracción fibrosa (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Balard *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Ebling; Kung, 2004; Taylor; Allen, 2005a; Weiss; Wyatt, 2006; Gehman *et al.*, 2008; Kung *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013). Esto reduciría el llenado y aumentaría el *turnover* del contenido ruminal, el consumo de materia seca (CMS) (Castro *et al.*, 2010) y, de esta manera, el consumo de energía y la producción de leche.

Junto con las limitaciones productivas que impone el suministro de forrajes de mediana a baja calidad, surge el desafío de cosechar la mayor producción de leche por hectárea debido a los altos costos de la tierra y, en algunos casos, su limitada disponibilidad (Cherney *et al.* 2004). Estimaciones realizadas por técnicos de la EEA INTA Rafaela indican que la dieta promedio para vacas en producción de los tambos argentinos es predominantemente pastoril, ya que el 72% está constituida por el consumo de forraje en pié. Una menor proporción está conformada por concentrados (17%) y por ensilajes y henos (11%). El 48% de la superficie total de los tambos es destinada a praderas permanentes, el 17% a verdeos de invierno, el 11% a verdeos de verano y el 14% a cultivos para ensilado y grano húmedo. Sería interesante que ese 14% de la superficie permita extraer la mayor cantidad de leche y sólidos por kg de MS cosechada, convirtiéndose la elección del híbrido en el punto clave para lograr este objetivo.

En numerosas oportunidades ha sido publicado que la inclusión de ensilajes de maíz nervadura marrón (EBMR) en raciones para vacas lecheras incrementa el CMS y la producción de leche (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Tine *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Ebling; Kung, 2004; Stone *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013). Oba y Allen (1999a)

evaluaron dietas que contenían concentraciones similares de FDN y que variaban solo en el tipo de ensilaje, EBMR o ensilaje de maíz convencional, y observaron que el suministro de la dieta con EBMR resultó en un incremento de 2,1 y 2,6 kg/día en el CMS y en la producción de leche corregida al 3,5% de grasa, respectivamente. No obstante, estas respuestas dependerían del estado de lactancia en que se encuentran los animales (Tine *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2010).

En cuanto a la composición química de la leche, parece que el componente afectado con mayor frecuencia ante el suministro de EBMR es el contenido de grasa butirosa (Frenchick *et al.*, 1976; Block *et al.*, 1981; Oba; Allen, 2000a; Taylor; Allen, 2005a; Weiss; Wyatt, 2006; Holt *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2013). Sin embargo, las causas de su disminución no estarían establecidas y faltan asociaciones con la teoría de la biohidrogenación ruminal de los lípidos para explicar la caída de grasa en leche. Según esta teoría, las vías de biohidrogenación pueden alterarse bajo ciertas condiciones de alimentación dando origen a determinados ácidos grasos con un potente efecto inhibidor de la síntesis de grasa a nivel mamario (Bauman; Griinari, 2001). El perfil de ácidos grasos de la leche puede ser usado como una aproximación a los cambios que ocurren en el metabolismo ruminal de los lípidos (Harvatine *et al.*, 2009). No se ha encontrado ningún trabajo que analice el perfil de ácidos grasos de la leche de vacas alimentadas con EBMR.

Por otra parte, son escasos los trabajos con EBMR que midieron algún metabolito u hormona en sangre (Castro *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2012). Mediciones al respecto darán un panorama más amplio del estado fisiológico de los animales y pueden brindar elementos de discusión para las demás variables en evaluación.

Analizando las variables ruminales, las vacas que ingieren dietas con EBMR tienden a presentar valores de pH más bajos que aquellas que consumen dietas con un ensilaje de maíz convencional (Frenchick *et al.*, 1976; Rook *et al.*, 1977; Oba; Allen, 2000a; Greenfield *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Taylor; Allen, 2005b; Gehman *et al.*, 2008), aunque los motivos no serían claros. También permanecen dudas si el EBMR es capaz de modificar la cantidad y el perfil de ácidos grasos volátiles (AGV). Posiblemente la proporción de AGV ramificados sea menor con EBMR (Greenfield *et al.*, 2001; Taylor; Allen, 2005b; Gehman *et al.*, 2008), asociado a una menor proteólisis y mayor proliferación de bacterias celulolíticas que los requieren como substratos para su crecimiento.

La utilización de EBMR con una digestibilidad mayor a la media permitiría formular TMRs con una mayor cantidad de forraje, reduciendo el contenido de almidón en la

dieta y mejorando, de esta forma, la salud de las vacas a través de una fibra más digestible y un pH del medio ruminal más elevado. La incidencia de desplazamiento de abomaso y otros desórdenes metabólicos debería reducirse (NRC, 2001).

La respuesta productiva de vacas en lactación ante la inclusión de EBMR en la dieta y los efectos sobre el contenido de grasa y proteína de la leche podrían ser mejor explicados si la producción de proteína microbiana y perfiles de AGV en rumen y de ácidos grasos en la leche resultan conocidos. En Argentina, aún no existen investigaciones que evalúen el efecto sobre la producción y composición láctea y sobre el ambiente ruminal de vacas lecheras ante la utilización de EBMR en dietas TMR.

De aquí en adelante, cuando se haga referencia a un ensilaje de maíz convencional se lo nombrará como “EC” y a uno de maíz nervadura marrón como “EBMR”.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En una primera instancia se hará una breve reseña referente a la pared celular y a los componentes de la planta que afectan a la digestibilidad de la fibra, para luego describir algunas de las formas que existen para mejorar a este parámetro en los ensilajes y que están siendo objeto de estudio en la actualidad, profundizando en los maíces nervadura marrón. En este último aspecto, se desarrollarán los efectos observados ante la alimentación de vacas lecheras con TMR conteniendo EBMR sobre: el CMS, la producción y la composición química de la leche, la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de la fibra, el sitio de digestión del almidón, la concentración de AGV y el pH del medio ruminal.

La presente revisión será empleada en la discusión de los resultados obtenidos en los experimentos de la presente tesis.

1. La pared celular

Los tejidos vegetales contienen entre el 35 y el 80% de su materia orgánica (MO) en la pared celular (Jung; Allen, 1995), la cual constituye la principal fuente energética para los rumiantes, aunque desafortunadamente menos del 50% de esta fracción es rápidamente digerida y utilizada por el animal (Hatfield *et al.*, 1999). Las paredes celulares de las plantas no han evolucionado para servir de alimento a rumiantes, sino que han resultado en una estructura de variable y, generalmente, baja digestibilidad (Jung, 1997). La digestibilidad de los forrajes es extremadamente variable, por lo general, menor que la de los granos, y siendo la pared celular el principal componente estructural de estos, su digestibilidad es considerada como uno de los principales determinantes de la eficiencia y productividad animal (Jung, 2012).

Jung y Allen (1995) consideran pertinente diferenciar los términos “pared celular” y “fibra”, más allá de que se usen indistintamente uno del otro. La pared celular, cuya síntesis está controlada por enzimas codificadas y reguladas por genes (Jung; Allen, 1995), es una compleja matriz de polímeros que rodean a cada célula vegetal y proveen el soporte físico requerido por las plantas para su crecimiento, a la vez que las protegen contra el ataque de patógenos e insectos (Jung, 2012). La fibra, estimada por el método de los detergentes como fibra en detergente neutro o ácido (FDN y FDA, respectivamente), es un procedimiento analítico que describe aquellos componentes con baja solubilidad en solventes específicos y que, desde un punto de vista

nutricional, son relativamente menos digestibles que el almidón (Jung; Allen, 1995). En algunos casos, como en gramíneas maduras, el contenido de pared celular y de FDN son muy similares. En otros, por ejemplo en leguminosas, el contenido de FDN puede ser menor que el de pared celular debido a que las pectinas, compuestos que forman una porción importante de la pared celular en estas especies, se solubilizan en el detergente neutro (Jung; Allen, 1995; Hatfield *et al.*, 1999; Jung, 2012). La determinación de la FDN constituye una herramienta adecuada para estudios nutricionales y descripciones generales de la calidad de un forraje. Sin embargo, es necesario tener cierta precaución cuando el objetivo es trabajar sobre aspectos genéticos. Igualmente, si bien las plantas no tienen genes que codifiquen para FDN y FDA, estas entidades químicas representan la mayor parte de la pared celular e indudablemente se encuentran fuertemente correlacionadas con la actividad de genes relacionados con la síntesis de celulosa, xilanos y lignina (Jung; Allen, 1995).

La celulosa es el componente más abundante de la pared celular y está compuesta exclusivamente de cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces β-1,4 (Van Soest, 1994). Los otros polisacáridos de la pared celular son la hemicelulosa y la pectina, caracterizados por los métodos de extracción más que por similitud de sus estructuras químicas. La hemicelulosa es extraída desde paredes celulares delignificadas por medio del uso de álcalis y en su estructura química se incluyen xilanos, xiloglucanos y mananos, mientras que las pectinas son un grupo de diversos polisacáridos solubles en ácido oxálico (Jung, 2012). En el caso particular de la lignina su definición es un tanto más compleja, encontrándose diferentes criterios por tratarse de un compuesto con una estructura no demasiado estable como el resto de los constituyentes de la pared. En general, se trata de un polímero de compuestos fenólicos que interaccionan con otros polímeros de la pared celular para proveer integridad estructural, resistencia a la degradación e impermeabilidad al agua (Hatfield *et al.*, 1999). Sus precursores son los alcoholes coniferil, sinapil y *p*-coumaril, que por medio de reacciones catalizadas por peroxidasas y oxidasas forman las unidades de lignina guaiacil, siringil y *p*-hidroxifenil, respectivamente (Jung; Allen, 1995; Hatfield *et al.*, 1999). Por otro lado se encuentran los ácidos fenólicos (ácido ferúlico y *p*-cumárico), también conocidos como hidroxicinámicos, que se relacionan estructuralmente con los precursores de la lignina y tienen un rol preponderante en la organización de la matriz de la pared celular (Hatfield *et al.*, 1999).

El crecimiento de la pared de una célula vegetal típica puede dividirse en dos etapas. Se desarrollará una breve explicación al respecto basado en Jung y Allen

(1995). Durante la primera etapa se produce el crecimiento de la pared celular primaria por deposición de polisacáridos (celulosa, arabinoxilanos y pectinas), proteínas y ácidos fenólicos. En este momento no hay deposición de lignina y, en el caso de las gramíneas, el ácido ferúlico y pequeñas cantidades del cumárico son esterificados a los polímeros de arabinoxilanos. Cuando la elongación de la pared primaria cesa, comienza la segunda etapa, caracterizada por el engrosamiento de la pared secundaria desde el borde interior de la pared primaria hacia el interior de la célula. El principal polisacárido depositado es la celulosa y ya no se incorpora pectina y ácido ferúlico. Se deposita más ácido *p*-cumárico y comienza a sintetizarse y depositarse lignina desde la región de la laminilla media hasta llegar e invadir a la pared secundaria. Es por este motivo, que los últimos polisacáridos depositados en la pared son los menos lignificados y sería una explicación del por qué los microorganismos ruminales comienzan a degradar a la pared celular desde el lumen hacia el exterior de la célula (Jung; Allen, 1995). En una primera instancia degradan la pared secundaria, luego atacan a la primaria y si logran degradarla pasarán a la célula vecina. Cuando la pared primaria ha sufrido un cierto grado de lignificación, se convierte en una barrera para el avance de los microorganismos a otras células con polisacáridos estructurales potencialmente digestibles (Raffrenato *et al.*, 2009). Durante el engrosamiento de la pared secundaria, algunos de los ésteres formados entre los ácidos ferúlicos y los arabinoxilanos de la pared primaria se unen a través de uniones éter con los alcoholes de la lignina en formación y dan lugar a lo que se conoce como uniones cruzadas entre la lignina y los polisacáridos de la pared celular (Jung; Allen, 1995; Hatfield *et al.*, 1999). Se piensa que los ésteres de ferulatos serían como puntos de iniciación para la síntesis de lignina (Jung; Allen, 1995; Hatfield *et al.*, 1999). Cuando la lignina avanza hacia la pared secundaria va sufriendo una modificación en su composición química desde el tipo guaiacil al tipo siringil. En estos momentos, el ácido *p*-cumárico formaría uniones éter a la lignina dentro de la pared secundaria (Jung; Allen, 1995).

Cada tejido vegetal posee características celulares específicas y lo mencionado con anterioridad sobre el desarrollo de la pared es una generalización. Por ejemplo, tejidos como el mesófilo tienen una pared secundaria muy poco engrosada y prácticamente no depositan lignina a diferencia de las partes vasculares, como el esclerénquima, que presentan una pared secundaria mucho más desarrollada y altos contenidos de lignina (Jung; Allen, 1995).

En el presente trabajo y bajo un criterio nutricional, sabiendo ya las correspondientes diferencias, se asumirá que el contenido de FDN será un buen

representante del contenido de pared celular y los términos pared celular y FDN serán usados indistintamente.

2. Relación entre el consumo de materia seca y la pared celular del forraje

El contenido de pared celular de los forrajes puede afectar al consumo a través de su contribución al llenado ruminal (Jung; Allen, 1995) imponiendo una restricción física a la ingesta de nuevo alimento. Se cree que los constituyentes solubles contribuyen muy poco al llenado del retículo rumen, mientras que los componentes fibrosos desplazan un mayor volumen y, por lo tanto, tendrían un rol preponderante en su llenado físico (Mertens, 1987). La FDN es uno de los métodos de estimación del contenido fibroso del forraje que es utilizado rutinariamente, que aísla a la mayoría de los componentes fibrosos (celulosa, hemicelulosa y lignina) y que, además, se correlaciona altamente con el volumen de los alimentos (NRC, 2001). De una revisión de diversos experimentos se estimó que en vacas con las más altas producciones de leche, el consumo diario de FDN era de 1,2±1% del peso vivo, sugiriéndose su uso en modelos de consumo voluntario para representar el llenado ruminal (Mertens, 1987). Consumos de FDN por encima de 1,2% del peso vivo limitarían el CMS y, como consecuencia, la producción de leche.

Según un modelo simple de digestión de la pared celular propuesto por Jung y Allen (1995), el llenado ruminal es una función de las tasas de digestión y pasaje y de la concentración de pared celular (FDN). Según este modelo, los factores del forraje que inciden sobre la tasa de pasaje incluyen aquellos que afectan a la reducción del tamaño de partícula por la masticación y aquellos relacionados con la flotabilidad de las partículas en el rumen. Dentro de estos últimos se encuentran: 1) la capacidad de las partículas para retener gases, la cual se relaciona con la anatomía y la tasa de digestión de los tejidos de la planta, y 2) la tasa de producción de ese gas, afectada por la fracción de MS potencialmente digestible y por su tasa de digestión.

De los párrafos anteriores surge que dietas con menor contenido de FDN y/o mayor digestibilidad pueden ser alternativas de manejo para disminuir el llenado e incrementar el CMS. Teniendo en cuenta que disminuir el contenido de FDN más allá de un límite no sería aconsejable por los perjuicios que tiene sobre la salud del animal (NRC, 2001), trabajar en incrementar la fracción digestible de esa FDN podría ser una opción.

3. Digestibilidad de la fibra en detergente neutro

3.1. Importancia y factores a tener en cuenta para su interpretación

La determinación de la digestibilidad de la FDN (DFDN) está creciendo rápidamente en el mundo por su alta asociación con el consumo voluntario y la respuesta animal (Di Marco, 2011). Ha sido reconocida recientemente como un parámetro de calidad de los forrajes y con efectos consistentes sobre la productividad de vacas lecheras (Oba; Allen, 2011). Se debería tener presente que su determinación *in vitro* requiere de líquido ruminal y, por lo tanto, al tratarse de un material biológico la variabilidad de la técnica entre laboratorios es alta. Además, las condiciones ambientales bajo las cuales creció el forraje pueden modificar la DFDN y deben ser consideradas si se pretende analizar un mismo híbrido o diferentes híbridos sembrados en ambientes distintos.

Mientras que muchos parámetros de calidad del forraje afectan la formulación de una dieta y posiblemente su costo, son pocos los que afectan el consumo de alimento y la producción de leche si las dietas son formuladas adecuadamente (Oba; Allen, 2011). Oba y Allen (1999b) llevaron a cabo un metanálisis a partir de ensayos con diferentes especies de forrajes con el objetivo de evaluar y cuantificar el efecto de la DFDN sobre el CMS y la producción de leche en vacas lecheras y observaron que una unidad de incremento en la DFDN *in vitro* o *in situ* se asociaba con un aumento diario de 0,17 kg en el CMS y de 0,25 kg en producción de leche corregida al 4% de grasa butirosa.

La DFDN es considerada un buen indicador de la calidad de los forrajes, pudiendo ser de utilidad para clasificarlos por su valor nutritivo pero no para estimar su contenido energético (Oba; Allen, 2011). Esto se debería, por un lado, a que la respuesta al CMS de vacas en lactancia ante una mejora en la DFDN depende del nivel de producción de leche, de esta manera, vacas de mayor producción tendrían mayores beneficios cuando consumen un ensilaje con mayor DFDN comparadas con aquellas de menor potencial (Oba; Allen, 1999a); y, por otro, a que una mayor DFDN *in vitro* no necesariamente se traduciría en un incremento en la densidad energética ya que, un aumento en el CMS puede afectar negativamente a la DMS y, así, a la cantidad de energía por unidad de MS consumida (Oba; Allen, 1999a; Tine *et al.*, 2001).

A diferencia de lo que ocurre con la DMS *in vitro*, la DFDN es independiente de las determinaciones químicas de calidad de un forraje que comúnmente se hacen en los

laboratorios de nutrición animal. La DFDN depende de la naturaleza intrínseca de la pared celular y no sería afectada en gran medida por los contenidos de carbohidratos solubles y de FDN, que al variar hasta en el transcurso del día, pueden enmascarar la DMS independientemente de las características intrínsecas del forraje en evaluación. La concentración de carbohidratos solubles varía con la época del año, y aún dentro del día, y de esta manera, ante un incremento en el contenido de carbohidratos solubles disminuye el contenido de FDN (por dilución), al mismo tiempo que incrementa la DMS (Di Marco, 2011). Tal es el caso de forrajes pastoreados a la tarde, donde las concentraciones de carbohidratos solubles suelen ser mayores comparado con la mañana (Nolan; Dobos, 2005).

La técnica de DFDN *in vitro* consiste en incubar una muestra de alimento en líquido ruminal a temperatura controlada y en condiciones de anaerobiosis durante un tiempo determinado. La necesidad de contar con líquido ruminal, provisto por un animal donante, hace que sea una técnica con mayor variación intrínseca comparada con las determinaciones químicas, como el contenido de PB o de FDN. Oba y Allen (2011) destacan la importancia de reconocer a la DFDN *in vitro* como una evaluación biológica más que química de la calidad de los forrajes. Esta naturaleza biológica de la técnica lleva a que encontrar un valor absoluto comparable entre laboratorios constituya un verdadero desafío. Para una misma muestra, los valores de DFDN pueden variar en 10 puntos porcentuales (50 ó 40%, por ejemplo) entre laboratorios (Oba; Allen, 2011). Oba y Allen (2011) sugieren que la variabilidad en la técnica de DFDN puede disminuirse adoptando algunos procedimientos básicos, como: la alimentación de los animales donantes con dietas altas en forraje que aseguren una flora celulolítica, la extracción del líquido ruminal a tiempos regulares después del suministro de la ración y el mezclado de varios líquidos de distintos animales para cada determinación de digestibilidad.

En cuanto al tiempo de incubación para determinar la DFDN, Oba y Allen (2011) consideran que 48 horas podría ser excesivo, al menos por dos razones: 1) el tiempo de retención de la FDN indigestible en vacas alimentadas a mantenimiento es menor a 48 horas, y 2) el molido de la muestra incrementa enormemente la tasa de digestión, por lo que el tiempo de incubación debería ser disminuido para compensar dicho incremento. Sugieren que podría no superarse las 30 horas cuando se evalúa un forraje destinado a la alimentación de vacas lecheras de alta producción pero que, así mismo, la elección de un tiempo específico no es de mucho interés cuando el objetivo

es hacer un ranking de forrajes de menor a mayor digestibilidad, siempre que la DFND a 48 horas guarde una alta correlación con la DFDN a 24 ó 30 horas.

Otro factor a tener en cuenta es la variación entre sitios de cultivo debidas al suelo, clima, etc. Un estudio realizado en el estado de Michigan (EE.UU.) demostró que la DFDN de un mismo híbrido de maíz varió hasta un 11-13% según la región en la que fue cultivado (Mahanna, 2010). Se ha demostrado que las plantas que crecen bajo condiciones más frías poseen una DFDN más elevada comparadas con aquellas que crecen bajo condiciones más calurosas (Hoffman *et al.*, 2001) ya que temperaturas frías, especialmente durante la noche, inhibirían el desarrollo de la pared celular secundaria (Mahanna, 2010). Ligeras condiciones de estrés hídrico anteriores a la floración del cultivo incrementan la DFDN. En la publicación de Mahanna (2010) se observa que la DFDN a 24 horas fue, en promedio, 6,5 puntos superior en los ensilajes confeccionados en un año relativamente seco (2007) comparado con los mismos híbridos cultivados en las mismas parcelas durante un año relativamente húmedo (2006). En ambos años, las mayores digestibilidades fueron alcanzadas por los híbridos con nervadura marrón.

Finalmente, es importante conocer la técnica para medir a la DFDN (Oba; Allen, 2011). Los valores de DFDN cuando se evalúa *in vitro* suelen ser mayores que cuando se lo hace *in vivo*. En primer lugar, la alimentación de vacas lecheras con dietas altamente fermentables puede predisponer a un medio ruminal con valores de pH menores a los óptimos para las bacterias fibrolíticas. Segundo, el tamaño de partícula en el rumen es mayor que aquel utilizado para la determinación de digestibilidad en laboratorio, lo que limita el área de superficie por unidad de masa de fibra para la degradación bacteriana. Por último, el medio de incubación *in vitro* es capaz de mantener condiciones más estables de pH, temperatura y anaerobiosis respecto a un animal expuesto a variadas condiciones de manejo.

En conclusión, la DFDN, teniendo en cuenta algunos aspectos que inciden en su interpretación, aparece como una herramienta de gran utilidad en la evaluación de la calidad de los forrajes destinados a la alimentación animal, que refleja relativamente bien las características intrínsecas de un material y que tiene una alta asociación con el CMS y la productividad de vacas lecheras.

3.2. Componentes de la planta que afectan a la digestibilidad de la fibra en detergente neutro

Como se describió párrafos arriba, la pared celular es el resultado de la suma de varios componentes y la interacción entre cada uno de ellos es lo que determina su estructura y función y, como consecuencia, su susceptibilidad al ataque por los microorganismos ruminales. Por este motivo, puede pensarse que sería equívoco referirse a unas pocas variables para explicar a los factores y mecanismos involucrados en la DFDN, pero sin embargo, pueden identificarse elementos con un rol preponderante en la degradación ruminal de la fibra (Hatfield *et al.*, 1999).

El contenido de lignina explicaría entre el 40 y el 60% de la variación en la DFDN de un forraje (Figura 1a, Jung, 2012). Aunque el contenido de lignina *per se* no logre explicar a la DFDN en su totalidad, según Jung (2012), la información obtenida mediante estudios de tejidos vegetales por microscopía demuestra claramente que la lignificación es crítica para definir la digestibilidad potencial de los tejidos de un forraje. Parece ser que la cantidad de lignina y las uniones cruzadas que forma con los polisacáridos de la pared celular a través de los puentes de ácido ferúlico (Figura 2), serían los principales determinantes de la DFDN (Jung; Allen, 1995; Hatfield *et al.*, 1999). Se ha propuesto que el efecto negativo de la lignina sobre la digestibilidad sería por una cuestión de espacio físico o impedimento estérico, ya que los ésteres de ácido ferúlico y arabinoxilanos dificultarían el alineamiento entre xilanasas y sustrato, paso necesario para que ocurra la hidrólisis de la hemicelulosa (Jung; Allen, 1995). Es muy poca la cantidad de ácido *p*-cumárico que forma las uniones éster con los arabinoxilanos y que interfiere con la DFDN, estando en su mayoría esterificado a la lignina. Su correlación negativa con la DFDN es principalmente un efecto de la propia lignificación ya que ambos compuestos se depositan en simultáneo durante el desarrollo de la pared celular (Jung; Allen, 1995).

Las correlaciones negativas entre la DFDN y el contenido de lignina son relativamente fuertes para un mismo forraje en distintos estados de madurez, aunque más débiles para diferentes especies forrajeras pertenecientes a una misma familia y pobres, cuando se junta la información de diferentes familias de plantas, como por ejemplo, leguminosas y gramíneas (Raffrenato *et al.*, 2009). Traxler *et al.* (1998) sugieren que la relación entre el contenido de lignina y el contenido de FDN indigestible es consecuencia de la madurez. Es evidente la disminución en DFDN a medida que aumenta el contenido de lignina a través de tres estados de madurez

fisiológica (R^2= 0,96) (círculos rellenos de la Figura 1b). En cambio, la DFDN parece no variar ante aumentos en el contenido de lignina en seis líneas genéticas diferentes pero cosechadas a un mismo estado de madurez (R^2= 0,08) (círculos vacíos de la Figura 1b).

Durante el desarrollo de la pared celular, los ácidos fenólicos y la lignina son depositados en conformaciones estructurales específicas y en una estricta secuencia (Jung; Allen, 1995). La DFDN decrece lentamente durante los primeros estados de crecimiento (elongación de tallo), acelerándose cuando incrementan los diámetros de los tallos y las células y durante el desarrollo de los xilemas lignificados (Hoffman *et al.*, 2001). Al avanzar la madurez, la acumulación de biomasa en forma de tallos excede a la de hojas. Los tallos contienen una mayor proporción de tejidos con paredes celulares engrosadas y menos tejidos fotosintéticos comparados con las hojas, de manera que la concentración de pared celular en el forraje como un todo se ve incrementada. Asociado a este incremento en contenido de pared celular ocurre un cambio en su composición química dado por un aumento en las concentraciones de lignina, xilanos y celulosa, y una caída en el contenido de pectina. Estos cambios reflejan la composición de la pared celular secundaria y el hecho de que los tallos acumulan tejidos con mayor proporción de este tipo de pared (Jung, 2012). Según Jung y Allen (1995), debido al fuerte efecto de la madurez sobre el contenido de lignina en los tallos y a la reducción en la relación hoja/tallo cuando la madurez progresa, puede ser que las muestras de forraje total (hojas más tallos) obtenidas de diferentes estados de madurez resulten en una fuerte correlación negativa entre concentración de lignina y DFDN. No obstante, independientemente de la proporción de tallos, también existe una relación negativa entre la vida media foliar y la DFDN de las hojas (Di Marco, 2011).

Como se dijo anteriormente, la lignina no es un componente químico de estructura física y química uniforme y no todos los tipos de ligninas afectan de igual manera a la DFDN (Jung; Allen, 1995). En el caso particular de los maíces con nervadura marrón, además de poseer un menor contenido de lignina en comparación con maíces convencionales, han resultado casos con menores cantidades de ácido *p*-cumárico y de unidades siringil (Kuc *et al.*, 1968), ambos factores involucrados en la mayor DFDN de estos genotipos (Jung; Allen, 1995). Variaciones en la relación siringil/guaiacil parecen alterar la estructura tridimensional de la lignina y la acción inhibitoria de esta sobre la DFDN (Jung, 2012). La lignina tipo siringil tiene una estructura más lineal, se extiende al interior de la pared secundaria y protege en mayor proporción a los

polisacáridos de su digestión (Jung; Allen, 1995). Esto ha sido cuestionado en un trabajo de Jung *et al.* (1999) que comparó la degradabilidad *in vitro* de la pared celular de dos líneas mutantes de *Arabidopsis* que no depositaban lignina tipo siringil con una línea control que sí lo hacía. Los investigadores no encontraron diferencias ni en el contenido de lignina ni en la degradabilidad de la pared celular. Sin embargo, una de las líneas mutantes presentó niveles significativamente mayores de uniones éster de ácido ferúlico en la pared celular que podrían haber enmascarado el efecto de las unidades siringil sobre la DFDN y, como se vio, el impacto negativo de las uniones cruzadas de ácido ferúlico con otros componentes de la pared celular inciden enormemente sobre la DFDN (Jung, 2012). Por otra parte, estas plantas fueron analizadas en un estado extremo de madurez y las concentraciones de lignina fueron elevadas (33% de la pared celular). Esto pudo haber sido contundente y haber determinado la DFDN, teniendo en cuenta que el efecto de la composición de la lignina sobre la digestibilidad puede estar limitado a materiales menos lignificados. Esta es la reflexión que Jung y Allen (1995) hacen unos cuatro años antes de que se publiquen los resultados del ensayo de Jung (1999).

Podría concluirse entonces que, la cantidad y la composición química de la lignina y las uniones cruzadas entre esta y los polisacáridos de la pared celular a través de los ácidos ferúlicos son los componentes claves de la planta que inciden sobre la DFDN. La relación negativa entre el contenido de lignina y la DFDN es, en gran parte, efecto de la madurez del forraje dado por el aumento en la proporción de tallos.

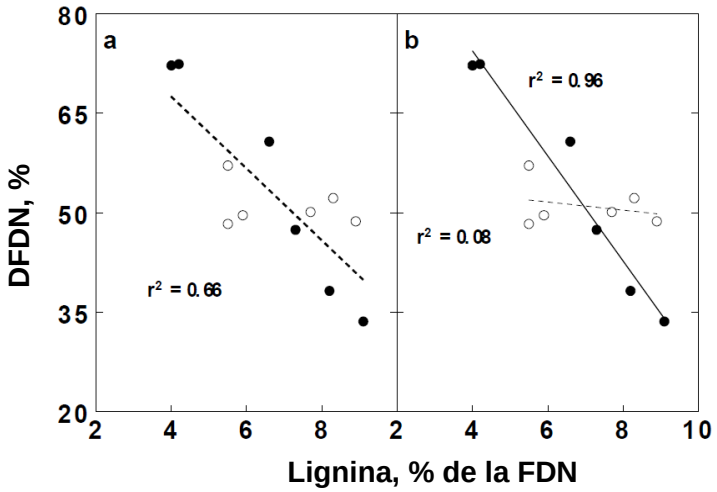

Figura 1. Relación entre la concentración de lignina y la digestibilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro (DFDN) de dos especies de gramíneas cosechadas a tres estados de madurez (●) y seis líneas genéticas de una especie de gramínea cosechadas a un único estado de madurez (○), evaluadas a través de todas las muestras (**a**) o por set de datos (**b**). Adaptado de Jung (2012).

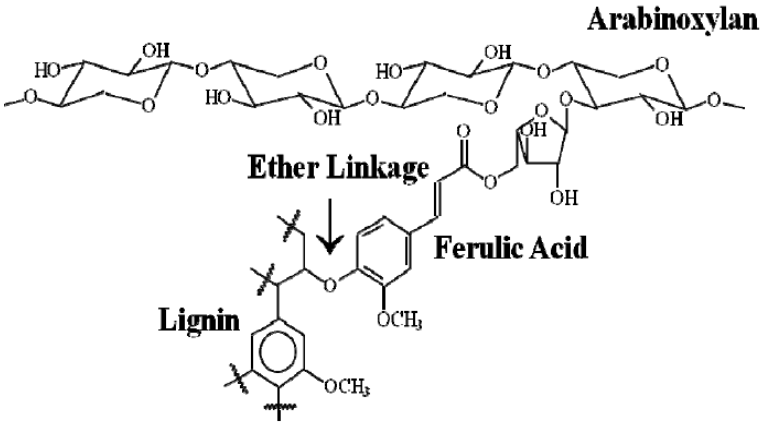

Figura 2. Esquema representativo de las uniones cruzadas entre el ácido ferúlico de la lignina y la hemicelulosa en gramíneas. Adaptado de Jung (2012).

3.3. Opciones para incrementar la digestibilidad de la fibra en detergente neutro en ensilajes

La DFDN de un ensilaje de maíz puede ser mejorada mediante la selección de híbridos apropiados, como ya se nombró en alguna oportunidad, o a partir de ciertos inoculantes aplicados directamente en la dieta o en el momento de la confección del ensilaje.

3.3.1. Inoculantes

La adición de ciertas enzimas exógenas con actividad fibrolítica, sobre todo con actividad endoglucanasa, incrementó la degradabilidad *in vitro* de la FDN hasta en un 60,3% (Eun *et al.*, 2007). En otro casos, la combinación de polisacaridasas y proteasas presentó efectos aditivos y en algunos casos sinérgicos sobre dicha variable (Eun; Beauchemin, 2007). La utilización de bacterias ácido lácticas mejoró la DFDN *in vitro* cuando se agregaron directamente sobre el inóculo ruminal o al material previo al ensilado (Weinberg *et al.*, 2007). La inoculación con bacterias homofermentativas y *Lactobacillus buchneri* incrementó 7% la DFDN *in situ* en dos ensilajes de maíz puestos a prueba (Adesogan, 2008).

En general, y acorde a la bibliografía, se necesita de más información para conocer los efectos de estos inoculantes sobre la producción animal, ya que un resultado *in vitro* no necesariamente se traduce en una mejora en la respuesta productiva.

3.3.2. Maíces con nervadura marrón

Genotipos para nervadura marrón han sido aislados en maíz, sorgo y mijo perla. La coloración marrón de la nervadura central de las hojas, lo que da el nombre a estos materiales, está asociada con un menor contenido de lignina y con un cambio en su composición (Sattler *et al.*, 2010) que resultarían en una mayor DFDN (Jung; Allen, 1995). Se piensa que la coloración marrón de la nervadura es debida a la incorporación de otros compuestos fenólicos a la lignina, a parte del coumaril, coniferil y sinapil, y aunque la causa exacta se desconozca, este cambio en la coloración parece ser un buen marcador de una síntesis alterada de la lignina en gramíneas C4.

Las primeras observaciones fueron hechas en maíces dentados en el estado de Minnesota (EE.UU.) y habrían ocurrido como una mutación natural. Se hallaron un total de cuatro mutantes para nervadura marrón en maíz designados como *bm*1, *bm*2, *bm*3 y *bm*4, descubiertos por Jorgenson en el año 1931, Burnham y Brink en 1932, Emerson *et al.* en 1935 y Burnham en 1947 (Lauer; Coors, 1997). A partir de aquí, se aislaron los mutantes para nervadura marrón en otras gramíneas C4, sorgo (*Sorghum bicolor*) y mijo (*Pennistum glaucum*). Recientemente, Haney *et al.* (2008) descubrieron un quinto mutante para nervadura marrón en maíz, el *bm*5 (Sattler *et al.*, 2010). Al menos en maíz, solamente el genotipo *bm*3 ha demostrado mejorar el valor nutricional de los EBMR y la respuesta productiva en animales (Barrière *et al.*, 1994; Sattler *et al.*, 2010).

Como se mencionó anteriormente, los maíces con nervadura marrón presentan un menor contenido y/o una composición alterada de la lignina. Las concentraciones de ácido *p*-cumárico y de unidades siringil han resultado menores comparados con maíces convencionales (Kuc *et al.*, 1968). El loci *bm*3 afecta la actividad de la enzima *O*-metiltransferasa, enzima encargada de transferir un grupo metilo a un intermediario de la síntesis del alcohol sinapil (Hatfield *et al.*, 1999; Sattler *et al.*, 2010). Como consecuencia, se reduce la síntesis del alcohol sinapil y la cantidad de lignina tipo siringil, aumentando un intermediario de la cadena biosintética, el 5-hidroxi-coniferil, que da lugar a la formación de 5-hidroxi-guaiacil (Hatfield *et al.*, 1999; Sattler *et al.*, 2010). Por este motivo, esta mutación podría resultar en similar contenido de lignina entre maíces nervadura marrón y maíces convencionales, pero de diferente composición química (Hatfield *et al.*, 1999).

Generalmente, los maíces con nervadura marrón están asociados a menores rendimientos de MS por unidad de superficie comparados con híbridos convencionales

(Sattler *et al.*, 2010). En un ensayo donde se evaluaron 15 híbridos *bm*3 y sus contrapartes convencionales, *bm*3 resultó menor en rendimiento de grano (-20%) y de la fracción fibrosa (-17%) (Lee; Brewbaker, 1984 citado por Sattler *et al.*, 2010). Otros trabajos citados por Sattler *et al.* (2010) también muestran una reducción de entre 15 y 21% en el rendimiento de MS. En el presente, el desarrollo de nuevos híbridos pueden presentar mejoras en sus rendimientos (Cherney *et al.*, 2004). Trabajos realizados por la Cooperativa de Extensión de la Universidad de Wisconsin en el año 2008 obtuvieron rendimientos muy similares entre un híbrido nervadura marrón y el promedio del ensayo. No obstante, otros cinco genotipos nervadura marrón produjeron 13% menos respecto al promedio (Sattler *et al.*, 2010).

Existen ciertos supuestos de que los maíces con nervadura marrón serían más susceptibles al vuelco y a enfermedades. La lignina provee de una barrera física al ataque inicial de patógenos y, a su vez, su síntesis y deposición en la pared celular puede ser inducida rápidamente en respuesta a alguna causa de estrés, tanto de origen biótico como abiótico (Sattler *et al.*, 2010). A pesar de esto, se ha observado que la acumulación de precursores o intermediarios de la síntesis de lignina, producto de la alteración de su cadena biosintética, inhiben el crecimiento de hongos y/o la producción de factores de virulencia (Sattler *et al.*, 2010), poniendo en discusión al supuesto de la mayor susceptibilidad de estos materiales a contraer enfermedades.

Se llevó a cabo una revisión de trabajos publicados que evaluaron la composición y calidad nutricional de EBMR y EC, y el efecto de la alimentación con estos ensilajes sobre la respuesta productiva de vacas lecheras. El objetivo de la revisión fue conocer las diferencias en el contenido de lignina y DFDN entre EBMR y EC, y el efecto de los EBMR sobre la respuesta productiva de vacas lecheras. Para ello, se tomaron las medias o LSM (*least square means*) correspondientes a contenido de lignina, DFDN, CMS, producción de leche y de leche corregida por grasa y producción y concentración de proteína y grasa en leche. Cada comparación fue considerada como una unidad experimental ya que algunas publicaciones comparaban el EBMR con dos o más híbridos, por ejemplo, Ballard *et al*. (2001) compararon un EBMR con un *leafy* y con un doble propósito. En otros casos, como en Oba y Allen (2000a), los investigadores evaluaron el efecto ensilaje (EBMR o EC) con dos niveles de FDN en la dieta (alta o baja FDN) de modo que quedó un arreglo factorial dos por dos; en este caso los resultados obtenidos con EBMR y EC en dietas con baja FDN fueron tomados como una comparación y los obtenidos con EBMR y EC en dietas con alta FDN fueron otra comparación (n= 2). Las medias se analizaron mediante una prueba t de *Student*

para muestras apareadas. En promedio, los EBMR presentaron una reducción en el contenido de lignina del orden de 32,6% y un incremento en la DFDN de 30,5% (Tabla1). Este aumento en DFDN se correspondió con un aumento de 12,5 (±2,84) unidades porcentuales respecto a los otros ensilajes. Basado en el metanálisis realizado por Oba y Allen (1999b) donde una unidad de incremento en la DFDN fue asociada con un aumento diario de 0,17 kg en el CMS y de 0,25 kg en producción de leche corregida al 4% de grasa butirosa, dichos incrementos en DFDN podrían traducirse en un aumento del CMS y de la producción de leche corregida de 2,1 y 3,1 kg/día, respectivamente. En la presente revisión, las vacas alimentadas con dietas conteniendo EBMR tuvieron un mayor CMS y de producción de leche, leche corregida y proteína (Tabla 2). Dichas diferencias no fueron de la magnitud estimada mediante el trabajo de Oba y Allen (1999b). Entre otras cosas, estos autores consideraron diferentes tipos de forrajes (no solo ensilajes de maíz) y diferentes mediciones de DFDN (*in vitro*, *in situ* y variadas horas de incubación) que pueden explicar la falta de coincidencia entre los valores mostrados en la tabla 1 y los estimados. Si bien la producción de grasa no fue afectada por el ensilaje, el contenido de grasa butirosa resultó menor en las vacas que recibieron EBMR en 0,12 unidades porcentuales.

De la totalidad de los trabajos evaluados (n= 25) surge que el contenido de FDN de los ensilajes (EBMR: 43 ± 5%; EC: 44 ± 4,2%), el nivel de inclusión de los ensilajes en las raciones(ración con EBMR: 45 ± 12,5%; ración con EC: 45 ± 12,6%) y el contenido de FDN de las raciones fue muy similar entre los tratamientos (ración con EBMR: 33 ± 3,9%; ración con EC: 34 ± 3,9%).

Tabla 1. Diferencias en el conteniendo de lignina y en la digestibilidad de la fibra en detergente neutro (DFDN) entre ensilajes de maíz nervadura marrón (EBMR) y convencional (EC), expresadas como porcentaje respecto al convencional.[1]

	Media	DE	*P*[2]	n
Lignina	-32,6	14,46	<0,0001	26
DFDN-30	30,5	13,11	<0,0001	11

[1](EBMR – EC) / EC × 100.[2] Prueba t de *Student* para muestras apareadas. DE: desvío estándar; n: cantidad de comparaciones. Fuentes: Rook *et al.* (1977); Keith *et al.* (1979); Sommerfeldt *et al.* (1979); Block *et al.* (1981); Stallings *et al.* (1982); Oba; Allen (1999); Bal *et al.* (2000); Oba; Allen (2000a); Tjardes *et al.* (2000); Ballard *et al.* (2001); Greenfield *et al.* (2001); Tine *et al.* (2001); Qiu *et al.* (2003); Cherney *et al.* (2004); Ebling; Kung (2004); Taylor; Allen (2005a); Weiss; Wyatt (2006); Gehman *et al.* (2008); Kung *et al.* (2008); Castro *et al.* (2010); Holt *et al.* (2010); Barlow *et al.* (2012); Stone *et al.* (2012); Holt *et al.* (2013).

Tabla 2. Diferencias en el consumo de materia seca (CMS), la producción de leche y leche corregida por grasa (LCG) y, el contenido y la producción de proteína y grasa entre vacas alimentadas con dietas conteniendo ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) y vacas alimentadas con dietas conteniendo ensilaje de maíz convencional (EC). [1]

	Media	DE	*P*[2]	n
CMS, kg/día	1,13	1,00	<0,0001	37
Producción de leche, kg/día	1,45	1,39	<0,0001	39
LCG, kg/día	0,86	1,55	0,003	34
Proteína, unidades %	-0,03	0,18	0,322	36
Grasa butirosa, unidades %	-0,12	0,23	0,003	38
Proteína, kg/día	0,04	0,05	0,0002	30
Grasa butirosa, kg/día	0,01	0,09	0,443	30

[1]EBMR – EC.[2]Prueba t de *Student* para muestras apareadas. DE: desvío estándar; n: cantidad de comparaciones. Fuentes: Frenchick *et al.* (1976); Rook *et al.* (1977); Keith *et al.* (1979); Sommerfeldt *et al.* (1979); Block *et al.* (1981); Stallings *et al.* (1982); Oba; Allen (1999); Bal *et al.* (2000); Oba; Allen (2000a); Ballard *et al.* (2001); Greenfield *et al.* (2001); Tine *et al.* (2001); Qiu *et al.* (2003); Cherney *et al.* (2004); Ebling; Kung (2004); Taylor; Allen (2005a); Weiss; Wyatt (2006); Gehman *et al.*(2008); Kung *et al.* (2008); Castro *et al.* (2010); Holt *et al.* (2010); Barlow *et al.* (2012); Stone *et al.* (2012); Holt *et al.* (2013).

3.3.2.1. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre el consumo de materia seca

Si bien el CMS promedio a través de los experimentos resulta superior con EBMR (Tabla 2), cuando se recurre a un análisis en particular de cada uno de los trabajos, las respuestas en consumo podrían depender del estado de lactancia de los animales. La alimentación con EBMR parece incrementar el CMS cuando se suministra a vacas lecheras que se encuentran en un estado de lactancia temprana a media debido a una reducción en las limitaciones físicas de llenado ruminal (Tine *et al.*, 2001). En vacas de lactancia temprana el CMS estaría limitado por llenado (Mertens, 1987; Dado; Allen, 1995; Allen, 1996; Allen *et al.*, 2009) y, de este modo, forrajes con mayor DFDN permitirían una desaparición más rápida de la FDN desde el rumen, por incremento en las tasas de digestión o de pasaje, y un mayor CMS (Oba; Allen, 1999b).

Allen *et al.* (2009) realizaron una extensa revisión bibliográfica sobre el control del consumo voluntario de alimento, desde estudios a nivel fisiológico con roedores, hasta trabajos con enfoque productivo con bovinos para carne y leche. Los autores propusieron que los mecanismos involucrados en la regulación del consumo voluntario de alimento varían con el estado de lactancia de los animales. Es así que, durante los primeros días o semanas de la lactancia (también conocido como "*fresh cow"* en

inglés) el control sería ejercido por la oxidación hepática de ácidos grasos no esterificados (AGNE), mientras que alrededor del pico de lactancia (lactancia temprana) cobraría mayor importancia el llenado físico del rumen y, en lactancia media a avanzada la oxidación hepática de propionato sería el principal mecanismo de regulación. La teoría de la oxidación hepática propone que si bien el propionato es en su mayoría usado como sustrato gluconeogénico, una pequeña porción también es oxidada en el hígado estimulando la oxidación de acetil-CoA en el ciclo de Krebs. Esta oxidación de los grupos acetilos incrementa el estatus energético del hígado por acumulación de ATP (Adenosin trifosfato), que estaría involucrado en la disminución de señales estimulatorias del hambre al sistema nervioso central, vía nervio vago. Brevemente se explicará lo que sucede en los diferentes estados de lactancia según Allen *et al.* (2009) para poder establecer relaciones con los trabajos que evaluaron materiales nervadura marrón donde parece ser que las respuestas en consumo dependen del estado de lactancia de los animales.

Durante los primeros días de la lactancia, la concentración de insulina en plasma y la sensibilidad de los tejidos a ésta disminuyen. Como resultado, aumentan los niveles plasmáticos y la oxidación hepática de AGNE. Al mismo tiempo, pequeñas cantidades de propionato estimularían la oxidación de los acetil-CoA originados de estos AGNE, incrementando los niveles de ATP en el hígado que, como se dijo en el párrafo anterior, afectan negativamente al consumo. Cuando la lactancia avanza, la producción de leche incrementa rápidamente, aumentan los niveles de glucosa en plasma y se estimula la liberación de insulina. Esto lleva a una disminución gradual en la tasa de lipólisis y en la disponibilidad de AGNE para su oxidación en el hígado. De igual manera, la alta demanda de glucosa por la glándula mamaria disminuye la oxidación hepática de propionato, direccionándolo hacia gluconeogénesis. De esta manera, se reduce la oxidación de metabolitos en el hígado, el control del consumo por oxidación hepática pierde importancia y el llenado ruminal se convierte en el principal limitante. Es en este momento de la lactancia, que puede ser de apenas 7 a 10 días posparto para algunas vacas y más de 3 semanas para otras, donde cobraría importancia el suministro de alimentos con baja capacidad de llenado y más fermentables, como los EBMR. Después del pico de producción de leche, el control del consumo por llenado es gradualmente reemplazo por la oxidación hepática de propionato. Se produce un incremento importante tanto en la circulación plasmática de insulina como en la sensibilidad de los tejidos a su concentración en plasma. La magnitud en la depresión del consumo estaría relacionada positivamente con la

insulinemia, probablemente por el efecto inhibidor de la insulina sobre la gluconeogénesis. Como consecuencia, disminuiría la utilización de propionato para la síntesis de glucosa, demanda que también disminuye por una menor producción láctea pasado el pico de producción, incrementándose su oxidación hepática y aumentando el estatus energético de los hepatocitos lo que disminuye las señales estimulatorias del hambre al sistema nervioso central.

Tomando como base a la teoría expuesta anteriormente sobre el control del consumo de alimento y haciendo referencia específicamente a las respuestas en CMS obtenidas con EBMR en vacas lecheras, los resultados de los trabajos publicados al respecto serán presentados agrupados en función del período de lactancia: lactancia temprana (menos de 100 días en lactancia), media (entre 100 y 200) y avanzada (más de 200).

3.3.2.1.1. Lactancia temprana

En lactancia temprana, la inclusión de EBMR en dietas TMR generalmente resultó en un incremento de 1,4 ± 0,97 kg en el CMS (Rook *et al.*, 1977; Sommerfeldt *et al.*, 1979; Block *et al.*, 1981; Oba; Allen, 1999a, 2000a; Tine *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Taylor; Allen, 2005a; Castro *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013), aunque en algunos casos no se observaron diferencias (Kung *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2010; Barlow *et al.*, 2012). Si bien no se pueden descartar otros factores (Oba; Allen, 2000a), la explicación del mayor CMS logrado con EBMR parece radicar en su mayor DFDN (Oba; Allen, 1999a; Tine *et al.*, 2001).

Oba y Allen (2000a) hipotetizaron que el efecto positivo del EBMR sobre el CMS sería superior en dietas con mayor capacidad de llenado ruminal, o sea con mayor contenido de FDN. Para probar su hipótesis, suministraron a vacas en lactancia temprana cuatro dietas que resultaron de la combinación de dos niveles de FDN (29 y 38% de la MS) y dos tipos de ensilaje (EC y EBMR). Contrariamente a su postulado, no hallaron interacción entre ambos factores, siendo el CMS del tratamiento con EBMR, en promedio, superior a las del tratamiento con EC. Sin embargo, debido a lo hallado en otras variables los autores sugirieron diferentes mecanismos por los cuales el EBMR incrementó el CMS y que dependió del nivel de FDN en la dieta. Observaron una interacción significativa entre nivel de FDN y tipo de ensilaje para el tamaño de ingesta y el intervalo entre comidas. Con alta FDN (38%), ambas variables fueron mayores en las vacas que comieron el EBMR y, con baja FDN (29%), fueron menores.

Por su parte, el volumen y la masa del contenido ruminal fue menor en las dietas con baja FDN vs. alta FDN, sin importar el tipo de ensilaje. Esto indicaría que las vacas alimentadas con baja FDN, tanto las que recibieron el EBMR como el EC, tuvieron capacidad ruminal adicional para permitir un mayor CMS (Oba; Allen, 2000c). Por este motivo, el mayor CMS de EBMR dado por un mayor tamaño de ingesta sería por un menor efecto de llenado ruminal de la dieta con alto contenido de FDN. En las vacas alimentadas con EBMR y baja FDN sería otro el mecanismo que explica el mayor consumo. Los autores especularon que debido al menor pH del medio ruminal hallado en las vacas de EBMR-baja FDN, la absorción de los AGV pudo ser más rápida por encontrarse como sales, al igual que su subsecuente toma por los tejidos periféricos. Esto pondría al animal en una sensación de hambre más anticipadamente respecto a las vacas de EC-baja FDN, que condujo a un menor intervalo entre comidas y mayor CMS (Oba; Allen, 2000a). Esto da una idea de los múltiples factores existentes en la regulación del CMS y que la explicación de su incremento ante el empleo de EBMR puede ir más allá de una limitante física ruminal.

Holt *et al.* (2013) evaluaron el suministro de una dieta con EBMR vs. EC desde el inicio hasta los 180 días de lactancia y separaron el análisis de los datos en dos períodos, de 0 a 60 y de 61 a 180 días, encontrando diferencias con el momento de la lactancia en acuerdo con la teoría de la oxidación hepática. El CMS tendió a ser superior solo en el segundo período. Probablemente, desde el parto hasta los 60 días, las vacas regularon su consumo por oxidación hepática y no obtuvieron ningún beneficio al recibir un material con mayor DFDN. Pasados los 60 días, la regulación física predominó en el control del CMS y la alimentación con EBMR presentó ventajas (Holt *et al.*, 2013).

La inclusión de EBMR en dietas de preparto podría resultar en un mayor CMS en las semanas inmediatas a este con un posible efecto residual sobre el mismo. Stone *et al.* (2012) alimentaron un grupo de vacas en transición (3 semanas antes y 3 semanas después del parto) con una TMR conteniendo un EC y otro grupo con la misma TMR pero con un EBMR. Durante las semanas 4 a 15 posparto todas las vacas fueron alimentadas con la TMR con EC, evaluando de esta manera el efecto residual del EBMR. El CMS fue superior en las vacas que consumieron la TMR con EBMR (Figura 3), desde 2 semanas preparto (14,3 vs. 13,2 kg/día) hasta las 3 semanas posparto (20,1 vs. 18,1 kg/día). Cuando el EBMR fue reemplazo por el EC, los consumos se igualaron (25,4 vs. 25,0; $P > 0,3$), manifestando la falta de un efecto residual sobre esta variable (Figura 3). Los autores opinaron que el aumento del CMS preparto fue debido

a una reducción del llenado ruminal por la mayor DFDN del EBMR, mientras que el incremento posparto fue tanto por una disminución en las limitantes físicas como por el mayor consumo logrado en el preparto.

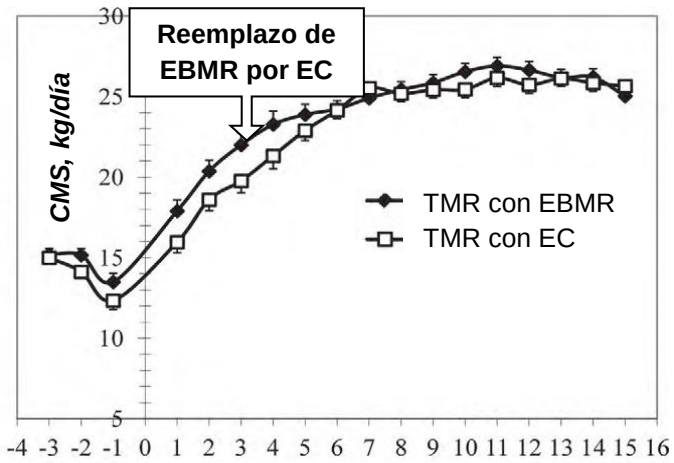

Figura 3. Consumo de materia seca (CMS) en vacas alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) o convencional (EC) durante el período pre (-3 semanas) y posparto (+3 semanas), seguido por una dieta con EC desde la semana 4 hasta la 15. Adaptado de Stone *et al.* (2012).

No es claro el motivo por el que algunos trabajos no hallaron diferencias en el CMS en vacas en lactancia temprana alimentadas con EBMR o EC. En el trabajo de Holt *et al.* (2010), si bien la DFDN *in vitro* fue mayor en EBMR, la digestibilidad *in vivo* de la FDN y FDA de la ración donde fue incluido tendió a ser menor comparado con la ración con EC, pudiendo explicar parte de la falta de diferencias en el CMS. Los autores especularon que la alta calidad nutricional sumada a un tamaño de picado fino del heno de alfalfa adicionado a las TMRs habría incrementado la tasa de pasaje ruminal y diluido los efectos potenciales del EBMR (Holt *et al.*, 2010). Por otra parte, Kung *et al.* (2008) sugirieron que su período experimental pudo haber sido demasiado corto (3 semanas en total, los últimos 10 días fueron de colección de datos) como para que se exprese un aumento en el consumo. No obstante, Barlow *et al.* (2012) emplearon un período experimental de mayor duración (9 semanas) y tampoco hallaron diferencias. En la figura 3 puede observarse que después de la primera semana las vacas alimentadas con EBMR fueron capaces de consumir más ración que las del tratamiento EC. Por lo tanto, es poco probable que la falta de respuesta en CMS cuando se alimenta con EBMR a vacas en lactancia temprana pueda explicarse por períodos experimentales cortos.

3.3.2.1.2. Lactancia media

En lactancia media, Qiu *et al.* (2003), Ebling y Kung (2004) y Gehman *et al.* (2008) hallaron un mayor CMS con EBMR, mientras que Stallings *et al.* (1982), Bal *et al.* (2000) y Weiss y Wyatt (2006) no obtuvieron diferencias.

Weiss y Wyatt (2006) sugirieron dos motivos por los cuales no obtuvieron diferencias en el CMS. En primer lugar, los autores atribuyen la falta de respuesta en CMS al híbrido con el que fue comparado el EBMR debido a que emplearon un ensilaje de maíz doble propósito, mientras que la mayoría de los trabajos publicados lo hacen con un isohíbrido (en la presente revisión denominado como EC) que solo varía del EBMR en que carece del gen *bm*3. En segundo lugar, al comparar sus dietas con las de otros trabajos que hallaron incrementos significativos en el CMS al utilizar EBMR, los autores especularon que el bajo contenido de PB y de proteína degradable en rumen de sus raciones pudo haber afectado las respuestas en consumo (Weiss; Wyatt, 2006).

En el trabajo de Bal *et al.* (2000) la TMR con EBMR tuvo 27% más de forraje que la TMR con EC y puede explicar la falta de un efecto del ensilaje sobre el CMS. El hecho de que los CMS hayan resultados iguales entre las vacas que consumieron las TMRs con EC y EBMR, pese al mayor contenido de forraje de la última dieta, sugeriría cierta ventaja a favor del EBMR. Qiu *et al.* (2003) formularon cuatro dietas con la misma concentración de FDN (38,5% de la MS), variando el tipo de ensilaje de maíz (EBMR o EC) y la proporción de FDN provista por el forraje (FDNF, 17 ó 21%), a fin de evaluar si existían ventajas al incorporar EBMR en dietas con mayor proporción de alimentos voluminosos. El contenido de FDNF lo variaron mediante el ensilaje de maíz y un ensilaje de alfalfa. Las vacas alimentadas con el mayor nivel de FDNF y EC tuvieron un menor CMS (23,5 kg/día) que las alimentadas con el menor nivel de FDNF y EC (25 kg/día), a diferencia de las que comieron EBMR que, en promedio, siempre consumieron más y no se diferenciaron con el nivel de FDNF (26,5 kg/día). Este efecto del EBMR sobre el CMS estaría explicado por su mayor DFDN o por una mayor tasa de pasaje (Qiu *et al.*, 2003). El EBMR parece tener ventajas cuando las dietas contienen una mayor proporción de forraje, con los efectos positivos que ello significa desde un punto de vista tanto sanitario como económico.

Comentado ya los resultados observados al alimentar con EBMR a vacas en lactancia media, cabe hacer mención al trabajo de Ebling y Kung (2004) donde se evaluó el procesamiento mecánico del grano del ensilaje (conocido como *cracker*) y el

tipo de híbrido en vacas con 143 días en lactancia. Conformaron tres tratamientos, una dieta con EBMR sin procesar y otras dos con EBMR o EC, ambos procesados. El CMS solo fue diferente y superior en las vacas que consumieron la dieta con EBMR-procesado comparado con EC-procesado, estando EBMR-sin procesado en una posición intermedia. La explicación podría ser la mayor DFDN *in vivo* de la dieta con EBMR-procesado. En un estudio anterior, Schwab *et al.* (2002) no encontraron diferencias en el consumo cuando suministraron un EBMR-procesado y un EBMR-sin procesado, por lo cual el beneficio potencial de emplear *cracker* al momento de la confección de un EBMR es incierto.

3.3.2.1.3. Lactancia avanzada

Greenfield *et al.* (2001) no hallaron diferencias significativas en el CMS entre vacas alimentadas con EBMR o EC (21,2 vs. 19,8 kg/día, *P*> 0,13), a pesar de que con EBMR la DFDN fue mayor. Esto estaría de acuerdo con que la regulación del consumo de alimento por llenado físico del rumen no es el mecanismo que prevalece en este estado de lactancia. No obstante, la cantidad de trabajos publicados no es suficiente como para ser concluyente al respecto.

3.3.2.1.4. Conclusión

Habría cierta consistencia en el efecto de los EBMR sobre el CMS en vacas en lactancia temprana, aunque son necesarios una mayor cantidad de estudios en estados más avanzados de la lactancia. Si bien algunos autores han abordado otros puntos para explicar los mayores consumos de alimento cuando se alimenta con EBMR, la mayor digestibilidad de la fracción fibrosa de estos materiales parece ser, hasta el momento, la explicación más clara al respecto. No obstante, hay diversos factores que inciden sobre la regulación del CMS y, como lo planteó Mertens (1987), el consumo depende de la interacción entre la dieta, el animal y el ambiente de alimentación. Por estos motivos, las respuestas obtenidas con EBMR en el exterior no pueden generalizarse a todos los ambientes de alimentación, poniendo de manifiesto la necesidad de evaluar el comportamiento de estos híbridos a nivel local.

3.3.2.2. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre la producción de leche

Al igual que para CMS, las respuestas en producción de leche obtenidas con EBMR serán separadas en base a los días de lactancia de los animales: lactancia temprana (menos de 100 días), media (entre 100 y 200 días) y avanzada (más de 300 días).

3.3.2.2.1. Lactancia temprana

Varios trabajos reportaron aumentos en la producción de leche al incorporar EBMR en dietas para vacas lecheras en lactancia temprana (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Tine *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Taylor; Allen, 2005a; Kung *et al.*, 2008; Barlow *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013), aunque no fue el caso de otros (Rook *et al.*, 1977; Sommerfeldt *et al.*, 1979; Block *et al.*, 1981; Castro *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2010). La mayoría de los trabajos publicados que reportaron mayor producción de leche también reportaron mayor CMS (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Tine *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Stone *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013). Así, *a priori*, el incremento en la ingesta de MS explicaría el incremento en producción de leche al alimentar con EBMR.

Los aumentos en producción de leche obtenidos con EBMR, pero sin aumentos en el CMS, serían explicados, en parte, por un mayor aporte de energía debido a una mayor DFDN (Kung *et al.*, 2008; Barlow *et al.*, 2012). No obstante, Oba y Allen (2000a) especularon que, al menos en su experimento donde el consumo de MS digerida no difirió entre tratamientos, el incremento en la producción de leche podría explicarse por un incremento en la eficiencia de utilización de la energía consumida para la producción de leche y no a un mayor consumo de energía. Los autores sugirieron que los valores más bajos de pH del medio ruminal (y sin grandes fluctuaciones en el día) registrados en las vacas que ingirieron el EBMR podrían haber favorecido una absorción y un suministro más estable de nutrientes a la circulación sanguínea y a la glándula mamaria, y una menor partición hacia tejido adiposo. Posiblemente, una absorción más constante de nutrientes determine una menor liberación de insulina (Oba; Allen, 2000a).

Estudios de calorimetría indirecta indicaron que los incrementos en producción obtenidos con EBMR se deberían a un mayor CMS y no a una mayor eficiencia en el uso de la energía (Tine *et al.*, 2001). A pesar de la mayor DFDN *in vivo* de la dieta con

EBMR, no se obtuvieron incrementos en la producción de leche cuando el CMS fue restringido a un nivel similar al alcanzado por las vacas que ingirieron la ración con EC. Cuando el CMS fue *ad libitum*, las vacas que recibieron la dieta con EBMR incrementaron la ingesta de MS y, la producción de leche fue 3,1 kg/día mayor que en las vacas que consumieron la dieta con EC (Tine *et al.*, 2001). En este trabajo, la mayor digestibilidad de la materia orgánica de la dieta con EBMR resultó en una mayor concentración de energía digestible y metabolizable solo en las vacas secas alimentadas a nivel de mantenimiento pero no en las vacas en producción alimentadas *ad libitum*. Es muy probable que el incremento en el CMS haya afectado negativamente a la DMS *in vivo*. Independientemente del nivel de consumo, mantenimiento o producción, la concentración de energía neta de lactancia fue similar entre las dietas con EBMR y con EC, lo que refleja la falta de diferencias en la eficiencia de uso de la energía. En conclusión, cuando se incluyen EBMR en raciones para vacas lecheras, el mayor CMS y no una mayor eficiencia energética sería el factor que permitiría incrementar la producción láctea (Tine *et al.*, 2001), mientras que el potencial efecto positivo de una mayor DFDN sobre la densidad energética de la dieta se diluiría si hay incrementos en el CMS (Tine *et al.*, 2001; Oba; Allen, 2011).

En apoyo a las evidencias anteriores, Oba y Allen (1999a) reportaron que el incremento en producción de los tratamientos EBMR se debió al mayor CMS y no a una mayor DMS o densidad energética de la dieta. Además, Holt *et al.* (2013) hallaron una mayor producción de leche solamente cuando las vacas que recibían la dieta con EBMR fueron capaces de consumir una mayor cantidad de MS que las del tratamiento control (desde los 60 a 180 días pos parto). En el período comprendido entre 0 y 60 días posparto, las vacas que recibieron la dieta con EBMR tuvieron igual CMS que las que recibieron la dieta con EC y, a pesar de la mejor calidad de la fibra del EBMR, las producciones de leche no se diferenciaron (Holt *et al.*, 2013).

Del trabajo de Stone *et al.* (2012), ya descrito en el ítem correspondiente a consumo, surge la posibilidad de incluir EBMR en dietas de vacas lecheras en transición. Las vacas del tratamiento con EBMR presentaron una mayor producción de leche en las primeras 3 semanas posparto manifestando un efecto residual desde la semana 4 hasta la 15 cuando todos los animales fueron alimentados con la TMR con EC (Figura 4). Esto estaría explicado por los mayores CMS de las raciones con EBMR durante el periparto (Figura 3).

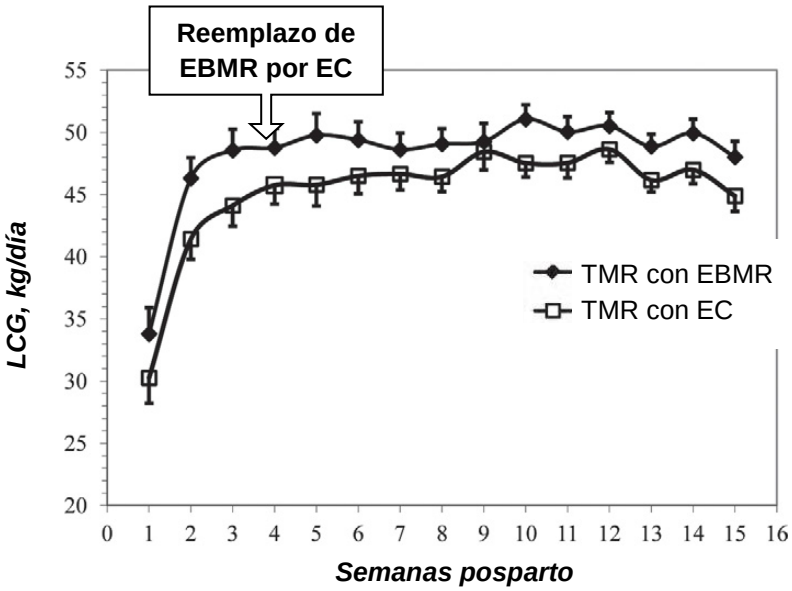

Figura 4. Producción de leche corregida al 3,5% de grasa butirosa (LCG) en vacas alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) o convencional (EC) durante el período posparto (+3 semanas), seguido por una dieta con EC desde la semana 4 hasta la 15. Adaptado de Stone *et al.*(2012).

Como fue mencionado, en algunos casos, vacas en lactancia temprana no incrementaron su producción láctea al ser alimentadas con EBMR (Rook *et al.*, 1977; Sommerfeldt *et al.*, 1979; Block *et al.*, 1981; Castro *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2010). En Rook *et al.* (1977), Sommerfeldt *et al.* (1979) y Block *et al.* (1981), las vacas que se alimentaron con EBMR presentaron mayores CMS y ganaron más peso que las que se alimentaron con EC, lo que indicaría que hubo un direccionamiento de los nutrientes hacia reservas corporales en detrimento de la producción de leche. Algo similar ocurrió en Castro *et al.* (2010). Estos últimos investigadores sugirieron que existen al menos dos razones que pueden explicar la falta de respuesta en producción de leche, aún cuando se hayan obtenido mayores CMS:

1. El cambio natural en la partición de energía desde síntesis de leche hacia reservas corporales que ocurre cuando la lactancia progresa.
2. Vacas con menor potencial productivo que presentan bajos requerimientos energéticos y respuestas marginales ante incrementos en el consumo de energía.

En acuerdo con este último punto, Oba y Allen (1999a) observaron que los incrementos en producción de leche en vacas alimentadas con EBMR fueron de mayor magnitud en aquellas vacas que tenían una más alta producción inicial (Figura 5). Si se parte de una producción relativamente baja, es probable que las respuestas productivas no sean las esperadas.

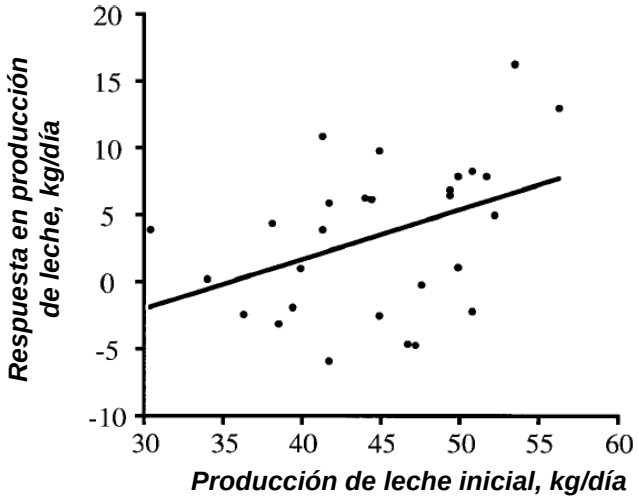

Figura 5. Relación entre la respuesta en producción de leche al tratamiento con ensilaje de maíz nervadura marrón (EBMR) y la producción de leche promedio durante los 14 días anteriores al comienzo del experimento (producción inicial). Respuesta en producción de leche (EBMR – EC)= -13,2 + 0,37 × producción de leche pre ensayo; R^2= 0,17; *P*< 0,03. Adaptado de Oba y Allen (1999a).

Un punto a destacar del trabajo de Tine *et al.* (2001) es la forma en que fue particionado el excedente de energía metabolizable consumida por las vacas alimentadas con EBMR. Cuando la dieta que contenía al EBMR fue suministrada *ad libitum* solo el 18,2% del excedente de energía metabolizable consumida fue dirigida hacia producción de leche, mientras que el 45,4% fue hacia tejidos de reserva y el 36,4% se perdió como calor, respecto a cuando su ingesta fue restringida. La partición de la energía es afectada por el nivel de producción de leche, estado de lactancia y limitaciones debido a otros nutrientes de la dieta (Tine *et al.*, 2001) y las respuestas en producción de leche no serán proporcionales al incremento en CMS.

Algunos factores relacionados con la formulación de la dieta pueden interaccionar con el ensilaje cuando se analiza la producción de leche. Holt *et al.* (2010) formularon cuatro TMRs mediante la combinación de dos ensilajes (EBMR o EC) y dos fuentes de fibra (una fuente no forrajera conformada por cascarilla de soja y pulpa de remolacha, o una fuente de fibra forrajera constituida por heno de alfalfa). La producción de leche solo mostró una tendencia a ser superior en la combinación EBMR-fuente de fibra no forrajera. Los autores especularon que la falta de respuesta con EBMR-fuente de fibra forrajera pudo deberse a una dilución de las características del EBMR por su baja proporción en la dieta (25 y 31%, según se incorpore o no la fuente de fibra no forrajera) y por la alta calidad del heno de alfalfa (21, 38 y 27% de la MS fue PB, FDN y FDA, respectivamente). Los trabajos que reportaron una mayor producción de leche con EBMR incluyeron, en promedio, un 17% (base MS) más de ensilaje en las TMRs

(Oba; Allen, 1999a, 2000a; Tine *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Taylor; Allen, 2005a; Kung *et al.*, 2008; Barlow *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013) comparados con los que no hallaron diferencias (Rook *et al.*, 1977; Sommerfeldt *et al.*, 1979; Block *et al.*, 1981; Taylor; Allen, 2005a; Castro *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2010). Por otro lado, en uno de los trabajos publicados, la producción de leche corregida por grasa fue superior en vacas alimentadas con EBMR solamente cuando en la dieta se incluyó un grano de maíz con endosperma harinoso, pero no cuando la dieta contuvo grano de maíz con endosperma vítreo (Taylor; Allen, 2005a). Por lo tanto, la proporción de ensilaje y el tipo de fibra y de grano incorporados en la dieta son factores a tener en cuenta y que pueden incidir sobre las respuestas productivas cuando se evalúa un EBMR.

3.3.2.2.2. Lactancia media

Las respuestas en producción de leche obtenidas con EBMR en vacas en el segundo tercio de su lactancia no han sido consistentes. En algunos casos la producción de leche fue mayor (Ebling; Kung, 2004; Weiss; Wyatt, 2006), mientras que en otros igual (Stallings *et al.*, 1982; Qiu *et al.*, 2003; Gehman *et al.*, 2008) o menor (Bal *et al.*, 2000).

Ebling y Kung (2004) compararon un EC procesado con *cracker* con un EBMR también procesado y con el mismo EBMR sin procesado. La producción de leche, la DFDN *in vivo* y el CMS solo fueron superiores con EBMR cuando este fue procesado con *cracker*. El mayor CMS y la mayor DFDN *in vivo* explicarían el incremento en la producción de leche. Weiss y Wyatt (2006) reportaron mayor producción de leche con EBMR cuando lo compararon con un ensilaje de maíz doble propósito, pero este aumento no puede ser explicado por un mayor CMS debido a que no observaron diferencias en esta variable. Tampoco se hallaron diferencias en la digestibilidad *in vivo* de las TMRs (Weiss; Wyatt, 2006).

En el trabajo de Stallings *et al.* (1982) la falta de respuesta en producción de leche por parte de las vacas alimentadas con el EBMR puede explicarse por la falta de diferencias en el CMS. No así en Qiu *et al.* (2003) y Gehman *et al.* (2008), quienes reportaron un mayor CMS de la ración con EBMR. En el trabajo de Qiu *et al.* (2003) el mayor consumo de almidón registrado en el tratamiento que incluyó al EBMR podría haber resultado en una mayor absorción de energía, una mayor liberación de insulina y un cambio en la partición de nutrientes hacia deposición de reservas corporales. En

Gehman *et al.* (2008) el incremento en el CMS en los tratamientos con EBMR estuvo asociado con una disminución en la digestibilidad *in vivo* de la MS de la TMR y de algunos componentes (FDA, nitrógeno). Esto determinó una menor densidad energética de las dietas con EBMR (1,54 vs. 1,62 Mcal EN de lactancia/kg de MS) lo que podría haber llevado a similares consumos de energía entre las vacas alimentadas con EBMR y EC, y diluir los efectos del mayor CMS sobre la producción de leche.

Bal *et al.* (2000) obtuvieron una menor producción con EBMR, pero la TMR en la que fue incluido tuvo un 60% de forraje (entre ensilaje de maíz y de alfalfa) y 20% de almidón comparado con un 48% de forraje y 29% de almidón de la TMR con EC, factores ampliamente influyentes en la producción de leche.

3.3.2.2.3. Lactancia avanzada

Solo dos trabajos evaluaron un EBMR en vacas con más de 200 días posparto. Mientras que Greenfield *et al.* (2001) no reportaron diferencias, Ballard *et al.* (2001) observaron una mayor producción con EBMR comparado con otros dos ensilajes de maíz, *leafy* y doble propósito. Este último no cuenta con mediciones de consumo como para arribar a mayores conclusiones.

3.3.2.2.4. Conclusión

La inclusión de EBMR en dietas para vacas lecheras en lactancia temprana podría incrementar la producción de leche por un incremento en el CMS. No obstante, y al igual que cuando se analizó el CMS, todos los trabajos fueron hechos en el exterior (EE.UU.), con materiales genéticos adaptados a la respectiva zona geográfica y animales con diferente mérito genético a los de nuestro país. Merece mayor investigación el efecto de los EBMR en estados más avanzados de lactancia.

3.3.2.3. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre la composición química de la leche

Diversos trabajos han reportado una disminución en la concentración de grasa butirosa al incluir EBMR en dietas para vacas lecheras (Frenchick *et al.*, 1976; Block *et al.*, 1981; Oba; Allen, 2000a; Taylor; Allen, 2005a; Weiss; Wyatt, 2006; Holt *et al.*,

2010; Holt *et al.*, 2013) y, en algunos casos, también se observó una merma en la producción de grasa (Holt *et al.*, 2010; Weiss; Wyatt, 2006).

Una menor concentración de grasa butirosa no revestiría demasiada importancia si la producción de la misma es compensada por una mayor producción de leche. Sin embargo, puede darse el caso en que la producción de leche incremente y, aun así, no compense la caída en el contenido de grasa. Entre los factores dietarios que pueden afectar tanto la producción como la composición de la grasa butirosa se encuentran: la cantidad y calidad de la fibra, la relación forraje/concentrado, el sitio y la tasa de degradación del almidón, la composición de los ácidos grasos dietarios y el grado de protección y digestibilidad de los lípidos protegidos de la degradabilidad ruminal (Bunting, 2004).

Como fue descripto en su oportunidad, el tipo de fibra de un maíz nervadura marrón y, por ende de su ensilaje, posee características diferenciales a la de maíces convencionales y podría ser la causa de los descensos en el tenor graso de la leche. La mayor DFDN se asociaría a una mayor fragilidad de partículas y, como consecuencia, la capacidad como fibra efectiva podría verse disminuida (Grant, 2010). Además, la mayor DFDN puede determinar mayores producciones de AGV derivados de su fermentación (Oba; Allen, 2000a; Taylor; Allen, 2005b). Si el pH del medio ruminal desciende, la biohidrogenación de los lípidos podría alterarse y originar ácidos grasos inhibidores de la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Bauman; Griinari, 2001).

La teoría de Bauman y Griinari (2001) plantea que bajo ciertas condiciones de alimentación, las vías de biohidrogenación ruminal de los lípidos pueden alterarse, dando origen a determinados isómeros de ácidos grasos con un potente efecto inhibidor de la síntesis de grasa a nivel de los alvéolos mamarios. Debe tenerse presente que estos isómeros de ácidos grasos poliinsaturados pasan a duodeno, son absorbidos e incorporados a la grasa de la leche, permitiendo, por lo tanto, que el perfil de ácidos grasos de la leche pueda ser usado como una aproximación a los cambios que ocurren en el rumen (Harvatine *et al.*, 2009). Los mecanismos moleculares por los cuales estos isómeros de ácidos grasos disminuyen la producción de grasa butirosa incluirían una reducción en la expresión de genes que codifican para enzimas y proteínas claves involucradas en la toma, síntesis, transporte y esterificación de ácidos grasos en la glándula mamaria (Harvatine *et al.*, 2009). Aquellas dietas que predisponen a bajos valores de pH del medio ruminal y que, además, incluyen ácidos grasos poliinsaturados no protegidos son frecuentemente relacionadas con un

metabolismo microbiano alterado y un consecuente aumento de isómeros *trans* con capacidad inhibitoria de la síntesis de lípidos en glándula mamaria (Bauman; Griinari, 2001).

Brevemente se describirán los argumentos a los que los autores han acudido para explicar el menor contenido y/o producción de grasa.

Block *et al.* (1981) explicaron que el contenido de grasa fue menor en las vacas alimentadas con el EBMR debido a la menor concentración de FDA (18,7 vs. 20%) en la dieta en la cual fue incluido. Oba y Allen (2000a) detectaron una interacción entre el híbrido y el contenido de FDN de la dieta. Con un 29% de FDN, el contenido de grasa en leche fue menor con EBMR que con EC, mientras que con un 38% no hubo diferencias con el tipo de ensilaje. A pesar de que no midieron el perfil de ácidos grasos de la leche, los autores descartaron a la teoría de la biohidrogenación ruminal de los lípidos propuesta por Bauman y Griinari (2001), ya que no observaron diferencias en la producción diaria de grasa (uno de los supuestos de dicha teoría). Sugirieron que la causa del menor tenor graso fue un efecto dilución por mayor volumen de leche producida por las vacas que consumieron el EBMR, aunque esto no explica por qué la disminución fue solo con las dietas bajas en FDN. Probablemente esté asociado al tipo diferente de fibra de los ensilajes (Grant, 2010). En base al experimento de Oba y Allen (2000a) otro grupo de investigadores (Bal *et al.*, 2000) incluyeron una mayor proporción de forraje en la dieta con EBMR (60% en la dieta con EBMR vs. 48% en la dieta con EC) con el fin de evitar una reducción en la concentración de grasa y observaron que el contenido y la producción de grasa fueron mayores al suministrar esta dieta respecto a la que contuvo EC. En otro estudio, vacas alimentadas con dietas conteniendo EBMR presentaron un menor contenido y producción de grasa butirosa cuando el ensilaje fue confeccionado con el uso del *cracker* respecto a si dicho proceso no era aplicado (Schwab *et al.*, 2002). Los animales que consumieron la dieta con el EBMR procesado tuvieron una mayor digestibilidad del almidón y una menor DFDN que determinaron mayor proporción de propionato y menor relación acetato/propionato en el medio ruminal. Estas variables fueron las empleadas por los autores para explicar la menor cantidad de grasa cuando procesaron al EBMR. Especularon que si hubiesen incrementado el contenido de fibra y disminuido la proporción de maíz molido, la depresión en el contenido y rendimiento de grasa podrían haberse atenuado, y que debe prestarse especial atención a la concentración de almidón y de fibra en la dieta cuando se emplean EBMR debido a su mayor DFDN (Schwab *et al.*, 2002). Holt *et al.* (2010) atribuyeron la caída en la

concentración y producción de grasa a la menor concentración de fibra efectiva del EBMR comparado con el EC (78,5 vs. 82,6%, respectivamente). La estimación de esta fibra efectiva fue realizada a partir del factor de efectividad física (en inglés conocido como "$pef_{8.0}$": *physical effectiveness factor*), determinado como la proporción de partículas retenidas sobre los dos tamices superiores del separador de Pensilvania y de un tamaño superior a los 8 mm. Otro punto interesante del trabajo Holt *et al.* (2010) fue que, al reemplazar una proporción del forraje (heno de alfalfa y ensilaje de maíz) por una fuente de fibra no forrajera (base MS: 57% de forraje en la dieta sin la fuente fibra no forrajera y 48,6% en la que contuvo dicha fuente), el contenido de grasa fue menor en la dieta con EBMR, mientras que no se alteró en la dieta con EC. Esto brindaría más evidencias de que el tipo de fibra aportada por el forraje puede estar incidiendo en la síntesis de grasa por la glándula mamaria. Por otro lado, Weiss y Wyatt (2006) explican que parte de la caída en el contenido de grasa con EBMR observada en su experimento podría atribuirse a un efecto dilución por mayor producción de leche, pero no completamente, ya que la producción de grasa también fue menor. Las variables ruminales no aportaron elementos para otra posible explicación. Taylor y Allen (2005a) observaron que el contenido graso dependió del tipo de almidón incorporado en la dieta. El mayor contenido de grasa butirosa fue cuando combinaron EC con almidón vítreo y lo asociaron a la teoría de la biohidrogenación ruminal de los lípidos (Bauman y Griinari, 2001). Los autores especularon que el mayor pH del medio ruminal hallado en estas vacas habría llevado a una menor producción ruminal de ácidos grasos inhibidores de la síntesis de grasa (Taylor; Allen, 2005a).

Si bien los trabajos hasta la actualidad no son lo suficientemente contundentes en cuanto los efectos de los EBMR sobre la concentración y producción de grasa, parecería que en la mayoría de los casos una mayor producción de leche compensa las disminuciones, que generalmente ocurren, en los porcentajes de grasa. Se deberían investigar con más detalle las causas de estas disminuciones. No se dispone de trabajos que hayan evaluado el perfil de ácidos grasos en leche y su correlación con el contenido de grasa butirosa para analizar una posible alteración en la biohidrogenación ruminal de los lípidos con producción de ácidos grasos inhibidores de la síntesis de lípidos mamarios (Bauman; Griinari, 2001).

En cuanto a la producción de proteína láctea, algunos trabajos han reportado incrementos al incorporar EBMR en las dietas (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Kung *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2012). El mayor CMS y la mayor fermentabilidad de la dieta con

EBMR pueden incrementar la producción de proteína microbiana, reducir la utilización de aminoácidos para gluconeogénesis y aumentar la cantidad de aminoácidos disponibles para la síntesis de proteína láctea (Oba; Allen, 1999a). En acuerdo con ello, Oba y Allen (2000c) demostraron un mayor flujo duodenal de proteína microbiana al incluir EBMR en la ración.

3.3.2.4. Digestibilidad, *in vitro* e *in vivo*, de la fibra en detergente neutro de los ensilajes de maíz nervadura marrón

En condiciones de fermentación *in vitro,* la DFDN generalmente es superior en EBMR comparado con otros ensilajes de maíz (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Balard *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Ebling; Kung, 2004; Cherney *et al.*, 2004; Taylor; Allen, 2005a; Weiss; Wyatt, 2006; Gehman *et al.*, 2008; Kung *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013). En estudios *in* vivo, sin embargo, los resultados obtenidos fueron más variables. En algunos trabajos, la DFDN *in vivo* fue mayor en las dietas con EBMR (Oba; Allen, 1999a; Greenfield *et al.*, 2001; Tine *et al.*, 2001; Ebling; Kung, 2004; Taylor; Allen, 2005c; Barlow *et al.*, 2012), mientras que en otros fue similar a las dietas con EC (Oba; Allen, 2000c; Qiu *et al.*, 2003; Weiss; Wyatt, 2006; Gehman *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2010). En otros casos, la diferencia en DFDN *in vitro* de los ensilajes (49,1 vs. 39,4% en EBMR y EC, respectivamente) fue superior a la diferencia en DFDN *in vivo* de las raciones donde fueron incluidos (33,1 vs. 30,9% en las TMR con EBMR y EC, respectivamente) (Oba; Allen, 1999a). Por lo tanto, la DFDN obtenida en el laboratorio no necesariamente será similar a la digestibilidad *in vivo* cuando los mismos ensilajes se encuentran formando parte de una TMR.

La falta de diferencias en la DFDN *in vivo* entre dietas con EBMR y EC podrían deberse a los efectos negativos sobre la digestibilidad de la fibra que tienen el incremento del CMS (Oba; Allen, 1999a; Qiu *et al.*, 2003) y/o el descenso del pH del medio ruminal (Oba; Allen, 2000c; Gehman *et al.*, 2008).

- El mayor CMS puede aumentar la tasa de pasaje y disminuir el tiempo de permanencia del alimento en el rumen, afectando a la colonización y ataque microbiano de la pared celular. Al comparar dos niveles de alimentación, la DFDN de una ración con EBMR disminuyó 2,5 unidades porcentuales al incrementar 2,9 kg el CMS (Tine *et al*., 2001).
- El pH es uno de los factores ruminales más importantes que afectan a la digestibilidad de la fibra (Mouriño *et al.*, 2001; Firkins, 2012; Nagaraja, 2012), y

como será analizado en párrafos posteriores (Punto 3.3.2.7), la alimentación con EBMR frecuentemente se relaciona con un menor pH del medio ruminal. El criterio más relacionado con la digestibilidad de la fibra, más que el pH promedio, es el tiempo durante el cual el pH está por debajo de 5,6-5,8 (Nagaraja, 2012; Firkins, 2012). También fue propuesto que un determinante clave en la digestión de la fracción fibrosa, sino más importante que el anterior, es el pH inicial del medio de fermentación durante el cual se comienza a establecer la adhesión y el ataque microbiano a las partículas de fibra (Mouriño *et al.*, 2001).

Por lo tanto, las determinaciones de DFDN *in vitro* son muy débiles para predecir respuestas *in vivo*, donde una mayor tasa de pasaje, un menor pH del medio ruminal o la combinación de ambos factores pueden estar incidiendo sobre la degradabilidad ruminal de la fibra. Evaluaciones de la digestibilidad *in vivo* de las raciones son necesarias ya que brindarían elementos de discusión en ensayos donde se midan otras variables, como el CMS y la producción de leche.

3.3.2.5. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre el sitio de digestión y la digestibilidad *in vivo* del almidón

Algunos trabajos han reportado disminuciones de entre 1 y 1,7 unidades porcentuales en la digestibilidad *in vivo* del almidón cuando se incluyó EBMR en dietas de vacas lecheras (Oba; Allen, 2000c; Greenfield *et al.*, 2001; Taylor; Allen, 2005c), aunque otros no registraron diferencias (Oba; Allen, 1999a; Qiu *et al.*, 2003; Ebling; Kung, 2004; Weiss; Wyatt, 2006; Barlow *et al.*, 2012). Por otro lado, y salvando estas ligeras disminuciones en el porcentaje de digestibilidad, la cantidad de almidón digerido por día no varió (Oba; Allen, 2000c; Taylor; Allen, 2005c), o incluso fue mayor con EBMR, debido a un incremento en la cantidad consumida (Greenfield *et al.*, 2001).

En vacas alimentadas con EBMR se observó un cambio en el sitio de digestión del almidón. Oba y Allen (2000c) observaron que dietas con EBMR tuvieron menor degradabilidad ruminal del almidón respecto de aquellas con EC, ya sea cuando lo expresaron en cantidades diarias (3,8 vs. 4,2 kg/día) como cuando lo hicieron relativo al consumo diario de almidón (50,5 vs. 57,9%). De manera similar, Greenfield *et al.* (2001) también hallaron una menor degradabilidad ruminal del almidón con EBMR que con EC, tanto en cantidades absolutas (1,3 vs. 1,9 kg/día) como relativas (24,0 vs. 37,3%), a pesar del mayor consumo de almidón obtenido con EBMR. Aparentemente,

las causas serían una mayor tasa de pasaje (12,9 vs. 10,6%/hora) por mayor CMS (+1,1 kg/día) y una menor tasa de degradación ruminal del almidón (12,7 vs. 14,2%/hora) de las dietas con EBMR vs. las dietas con EC (Oba; Allen, 2000c). También se ha planteado que la mata de fibra ruminal de las vacas que reciben la dieta con EBMR podría ser menos efectiva en atrapar los granos de maíz lo que resulta en mayor pasaje de granos hacia el duodeno (Oba; Allen, 2000c).

Junto con la menor digestión ruminal del almidón, también se observó que la cantidad de almidón que pasó hacia duodeno (Oba; Allen, 2000c; Greenfield *et al.*, 2001) y que se digirió en este sitio (Oba; Allen, 2000c) fue superior cuando el EBMR fue incluido en las dietas. Debido a un aumento de la energía metabolizable suministrada por el almidón al ser digerido en intestino delgado y absorbido como glucosa, evitando así pérdidas por fermentación, podría esperarse algún tipo de respuesta marginal en producción de leche (Oba; Allen, 2000c). Sin embargo, Taylor y Allen (2005c) no observaron ningún tipo de respuesta diferencial en cuanto a sitio de digestión y tasas de degradación y pasaje del almidón entre dietas con EBMR y EC, y ponen en duda el efecto positivo de una mayor digestión pos-ruminal del almidón sobre la producción de leche, ya que, el incremento en la oferta de glucosa podría aumentar la liberación de insulina, desviando la energía absorbida hacia reservas corporales.

Son necesarios más estudios de digestibilidad *in vivo* del almidón para evaluar si dietas con EBMR afectan dicha variable. Por otro lado, estudios *in vitro* con tasas de pasaje controladas posibilitarían determinar alguna posible diferencia en la degradabilidad del almidón de híbridos nervadura marrón respecto a híbridos convencionales.

3.3.2.6. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre la concentración ruminal de ácidos grasos volátiles

En general, la alimentación de vacas lecheras con dietas conteniendo EBMR o EC resulta en concentraciones ruminales similares de AGV totales, que en promedio rondan los 119,9 (±16,1) mmol/l (Greenfield *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2003; Cherney *et al.*, 2004; Weiss; Wyatt, 2006; Gehman *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2013). Se encontraron dos estudios en donde la inclusión de EBMR en las dietas afectó la concentración de AGV totales (Oba; Allen, 2000a; Taylor; Allen, 2005b). Oba y Allen (2000a) observaron que dietas altas en FDN (38% de la MS)

resultaron en mayor concentración de AGV totales cuando contuvieron EBMR que cuando incluyeron EC (92,6 vs. 80,4 mmol/l), mientras que dietas bajas en FDN (29%) arrojaron valores opuestos (92,8 vs. 98,3 mmol/l). En el otro estudio, la alimentación con EBMR resultó en una mayor concentración de AGV totales (140,5 vs. 137 mmol/l) sin interaccionar con el tipo de grano de maíz, harinoso o vítreo, incluido en la dieta (Taylor; Allen, 2005b).

El efecto de los EBMR sobre las proporciones molares de los AGV individuales es inconsistente. Weiss y Wyatt (2006), Holt *et al.* (2010) y Holt *et al.* (2013) no hallaron diferencias en ninguno de los AGV entre vacas alimentadas con EBMR o EC. Por su parte, Taylor y Allen (2005b) observaron que el tratamiento con EBMR tendió a presentar menor proporción de acetato. En cuanto a la proporción de propionato, en algunos casos este fue superior en vacas que recibieron dietas con EBMR (Greenfield *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2003; Cherney *et al.*, 2004) pero inferior en otros (Gehman *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2010). En el caso particular de Cherney *et al.* (2004), los autores atribuyeron la mayor proporción de propionato al mayor contenido de almidón de la dieta con EBMR. No se halló una explicación para la menor concentración de propionato en el tratamiento con EBMR en el estudio de Gehman *et al.* (2008). Por su parte, en Castro *et al.* (2010) la proporción molar de este AGV fue menor con EBMR cuando la dieta contuvo heno de pasto bermuda, pero no se diferenció cuando el heno no fue incluido, resultando en una interacción. Oba y Allen (2000a) encontraron una respuesta similar en butirato que en AGV totales, es decir que interaccionó con el nivel de FND de la dieta. Qiu *et al.* (2003) y Cherney *et al.* (2004) hallaron menor concentración de butirato con EBMR.

Con respecto a los AGV ramificados, su concentración disminuiría cuando en las dietas se incluye EBMR (Greenfield *et al.*, 2001; Taylor; Allen, 2005b; Gehman *et al.*, 2008), coincidiendo, en algunos casos, con menores concentraciones de amonio (Gehman *et al.*, 2008). Una menor proporción de ramificados puede indicar una menor proteólisis (Taylor; Allen, 2005b; Bach *et al.*, 2005) y/o un uso mayor de estos ácidos grasos por las bacterias celulolíticas que los requieren como sustratos para su normal crecimiento (Russell *et al.*, 1992; Van Soest, 1994). La mayor degradabilidad de la fibra del EBMR puede aumentar la proliferación y los requerimientos de estas poblaciones bacterianas.

3.3.2.7. Efectos de los ensilajes de maíz nervadura marrón sobre el pH del medio ruminal

Diversos trabajos publicados reportaron niveles de pH del medio ruminal más bajos en vacas lecheras consumiendo dietas con EBMR vs. EC (Frenchick *et al.*, 1976; Rook *et al.*, 1977; Oba; Allen, 2000a; Greenfield *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Taylor; Allen, 2005b; Gehman *et al.*, 2008). Otros estudios no reportaron efecto del ensilaje sobre esta variable (Weiss; Wyatt, 2006; Castro *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2010, 2013). Un metanálisis mostró una asociación negativa entre la DFDN, de varios forrajes en general, y el pH del medio ruminal de los animales que los consumieron (Oba; Allen, 1999b), lo que podría asociarse a los niveles más bajos de pH cuando se incluyen EBMR en dietas de vacas lecheras. No obstante, no está claro si el menor pH es debido a una menor acción del EBMR como fibra efectiva o a una mayor producción de AGV producto de su fibra más digestible.

Como ya se ha hecho mención en el punto de composición química de la leche, existe cierta evidencia de que el porcentaje de DFDN se asocia positivamente con la fragilidad de las partículas, motivo por el cual, a igual tamaño de picado, un EBMR podría proveer de menos fibra efectiva que un EC (Grant, 2010). Sin embargo, los trabajos que evaluaron la conducta ingestiva de animales a los que se alimentó con EBMR no atribuyeron el menor pH del medio ruminal a una menor capacidad del ensilaje como fuente de fibra efectiva. Oba y Allen (2000b) no encontraron diferencias en los tiempos de masticación entre vacas lecheras alimentadas con dietas conteniendo EBMR o EC (ni durante la ingesta de alimento, ni durante la rumia). Hallaron que el contenido ruminal, expresado en litros o kg de MS, tampoco difirió entre los tratamientos, pero que la tasa de *turnover* de la MS, MO, FDN y FDN indigestible del contenido ruminal y el CMS fueron mayores con EBMR. Los autores especularon que el incremento en el CMS fue capaz de mantener un contenido ruminal similar entre ambos tratamientos y que las actividades de masticación no se verían afectadas por la DFDN del forraje cuando se mantiene una cantidad crítica de material en el rumen. Si un menor llenado ruminal, por un mayor *turnover*, no es seguido por un incremento en el CMS, tal como sucedió en el experimento de Oba y Allen (2000b), el contenido ruminal se vería disminuido y las actividades de masticación posiblemente disminuyan. Contrariamente a lo reportado en el trabajo anterior, Taylor y Allen (2005a) observaron menores tiempos de rumia en los animales que consumieron la ración con EBMR, aunque concluyeron que esta no sería la causa

del menor pH registrado en dichas vacas debido a que ambas variables se correlacionaron negativamente.

En el trabajo de Greenfield *et al.* (2001), el pH del medio ruminal de las vacas alimentadas con EBMR se mantuvo por debajo del registrado en las vacas alimentadas con EC durante prácticamente todas las horas de medición. En este caso, puede asociarse a la mayor cantidad de MO degradada verdaderamente en rumen, que si bien no difirió estadísticamente entre tratamientos, la diferencia fue de +1 kg/día en el tratamiento con EBMR. Cherney *et al.* (2004) obtuvieron un menor pH con EBMR cuando lo compararon con un ensilaje de maíz *leafy*. En una comparación contra un ensilaje de maíz doble propósito, el suministro de dietas con EBMR resultó en un menor pH del medio ruminal y se sugiere que la mayor DFDN *in vitro* y el incremento de los ácidos orgánicos resultantes de dicha fermentación contribuyeron a su menor valor (Gehman *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos autores sostienen que una mayor cantidad de sustrato fermentado en rumen tampoco sería la causa del menor pH debido a que cuando se evaluó la cantidad de MO verdaderamente degradada, esta resultó similar entre dietas con EBMR y con EC (Oba; Allen, 2000c; Taylor; Allen, 2005b).

Por lo tanto y aún cuando las causas no sean claras, la alimentación de vacas lecheras con raciones que incluyen como fuente de forraje a un EBMR puede resultar en valores menores de pH del medio ruminal. Estudios *in vitro* donde se puedan controlar determinadas variables ayudarían al estudio de los factores involucrados. Además de los efectos negativos del pH sobre la salud del animal, existen ciertos efectos sobre el metabolismo microbiano que puede conducir a una alteración en la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos poliinsaturados e indirectamente alterar la síntesis mamaria de lípidos (Bauman; Griinari, 2001; Fuentes *et al.*, 2009).

HIPÓTESIS

La digestibilidad *in vitro* de la FDN es mayor en ensilajes de maíz nervadura marrón que en ensilajes de maíz convencional. En consecuencia, la digestibilidad *in vivo* de la FDN de las raciones completamente mezcladas que incluyen ensilajes de maíz nervadura marrón es mayor a la de las raciones formuladas con ensilajes de maíz convencional cuando son suministradas a vacas lecheras en producción.

La mayor digestibilidad *in vivo* de la FDN de las raciones completamente mezcladas que incluyen ensilajes de maíz nervadura marrón produce un aumento del consumo de materia seca y energía capaz de inducir una mayor producción de leche, de grasa butirosa y de proteína, sin cambios en la composición química y el perfil de ácidos grasos de la leche.

El efecto de las raciones con ensilaje de maíz nervadura marrón sobre la producción de leche resulta superior en vacas en lactancia temprana respecto a vacas en lactancia avanzada debido a una partición diferencial de la energía adicional absorbida hacia la producción de leche.

La mayor degradabilidad de la FDN de las raciones con ensilajes de maíz nervadura marrón resulta en una mayor concentración ruminal *in vitro* de ácidos grasos volátiles, un menor pH del medio ruminal y una mayor producción de proteína microbiana.

OBJETIVOS

Conocer el efecto de la alimentación con ensilaje de maíz nervadura marrón comparado con un híbrido convencional sobre la digestibilidad *in vivo*, el consumo, la producción y composición de leche, la variación de peso vivo y el perfil plasmático de metabolitos y hormonas en vacas en lactancia temprana y avanzada.

Determinar las diferencias inducidas por ambos ensilajes sobre parámetros de fermentación, producción de proteína microbiana y degradabilidad de la FDN utilizando fermentadores de doble flujo continuo.

Confirmar a nivel local las ventajas nutricionales atribuidas en el extranjero al maíz nervadura marrón mediante un ensayo de alimentación estabulada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos propuestos se llevaron a cabo dos experimentos: “Experimento 1: Respuesta productiva en vacas lecheras en estabulación” y “Experimento 2: Fermentadores de doble flujo continuo”.

1. Experimento 1: RESPUESTA PRODUCTIVA EN VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN

1.1. Lugar y fecha

Se llevó a cabo en el tambo de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del INTA, ubicada a 37º45´S, 58º18´O y 130 metros sobre el nivel del mar, durante los meses de abril a junio de 2011. Tuvo una duración de 9 semanas de las cuales 3 correspondieron a un período de covariable y 6 al período experimental. Las dos primeras semanas del período experimental se consideraron como acostumbramiento de los animales a los tratamientos y las cuatro restantes de toma de muestras y registro de la respuesta productiva. El experimento se desarrolló bajo condiciones de estabulación.

1.2. Cultivo y confección de los ensilaje de maíz

Se usaron dos híbridos de maíz (Dow AgroSciences, Colón, Buenos Aires, Argentina) genéticamente muy similares. Uno de ellos fue un híbrido comercial nervadura marrón (BMR126HX) y el otro, un iso-híbrido convencional (código experimental: EM0429HX). La relación genética entre ambos híbridos, estimada mediante marcadores SNP (*single nucleotide polymorphism*), fue del 98,6%. Fueron sembrados en el tambo de la EEA Balcarce del INTA el 18 de noviembre de 2010 a una densidad de 76000 plantas por hectárea y una distancia entre hileras de 52 cm en una superficie total de 10 hectáreas. El sistema de labranza fue convencional. Los ensilajes fueron confeccionados el 12 de marzo de 2011 cuando las plantas tenían un 35% de materia seca (MS), con un rendimiento similar para ambos híbridos, estimado en 21824 (± 537) kg de MS por hectárea. Se empleó un largo teórico de corte de 20 mm y el material fue procesado con *cracker*. Ambos ensilajes fueron almacenados y fermentados en silobolsas adyacentes (Silobolsa, Plastar SanLuis S.A., San Luis,

Argentina). Durante la cosecha del material a ensilar se tomaron muestras de ambos híbridos las que fueron analizadas en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Estación Experimental Balcarce del INTA. Los resultados correspondientes al maíz convencional fueron utilizados para la formulación de las raciones experimentales (Ver tabla 5 en resultados).

Al igual que durante el desarrollo de la revisión bibliográfica, los ensilajes serán designados como EBMR (ensilaje de maíz nervadura marrón) y EC (ensilaje de maíz convencional).

1.3. Animales

Se utilizaron 26 vacas Holando Argentino en lactancia temprana, de parición 2011, con 43 (± 26) días de lactancia, un peso promedio de 626 (± 88) kg y una producción de 34,7 (± 7,69) kg/día; y 14 vacas de la misma raza pero en lactancia avanzada, de parición 2010, con 239 (± 32) días de lactancia, un peso promedio de 637 (± 74) kg y una producción de 25,1 (± 1,65) kg/día.

1.4. Diseño experimental y tratamientos

Se formularon dos raciones completamente mezcladas (TMR) que diferían solamente en el ensilaje de maíz utilizado (EBMR o EC). Cada TMR fue suministrada a 13 vacas lecheras en lactancia temprana y a 7 en lactancia avanzada. De este modo, el diseño experimental fue un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2 × 2, donde uno de los factores fue el ensilaje de maíz y el otro factor, el estado de lactancia de los animales. A modo de diferenciar los tratamientos del ensilaje *per se*, se designarán como BMR y C a los tratamientos que incluyeron al EBMR y al EC, respectivamente. De esta manera quedaron conformados cuatro tratamientos, BMR-lactancia temprana; C-lactancia temprana; BMR-lactancia avanzada; C-lactancia avanzada.

La formulación de la TMR fue realizada utilizando el Programa Ración-INTA para una vaca Holando Argentino multípara de 600 kg de peso vivo, produciendo 35 kg de leche/día con un 3,4% de grasa butirosa. Para la formulación se usaron los datos de composición química del EC. En base MS, la TMR quedó integrada por un 54,1% de ensilaje de maíz (EBMR o EC), 32,1% de balanceado comercial (90,7 % de MS, 19,3 % de PB y 2,73 Mcal de EM/kg MS), 3,9% de pellet de soja, 4% de grano de soja

partido, 2,1% de harina de plumas, 1,9% de proteína pasante (Aminmax, GEPSA, Grupo Pilar S.A., Pilar, Buenos Aires, Argentina), 1,3% de grasa pasante (QuickFat, Tecnuar S.R.L., Rosario, Santa Fe, Argentina) y 0,6% de núcleo mineral. La composición química estimada para la TMR (48,7% MS) fue: 15,1% de PB con 69,3% de proteína degradable en rumen (PDR) y 30,7% de no degradable (PNDR), 40,3% de FDN y 2,64 Mcal EM/kg de MS. El consumo de FDN estimado fue equivalente al 1,52% del peso vivo de la vaca.

Durante el período de covariable los animales recibieron la TMR anteriormente descripta pero integrada por un ensilaje de maíz confeccionado en 2011, diferente al usado en los tratamientos. Con el objetivo de lograr lotes de animales homogéneos, para asignar a los animales a los tratamientos, se tuvieron en cuenta la producción promedio de leche registrada durante las semanas 2 y 3 del período de covariable, los días en lactancia y el peso individual.

Durante todo el experimento, los animales recibieron, además de la TMR, 0,9 kg de MS en cada ordeño del mismo balanceado comercial incluido en la TMR (1,8 kg de MS/día) a fines de mantener una correcta rutina de ordeño y evitar manifestaciones de estrés en los animales.

1.5. Manejo general de los animales

Los animales fueron alojados en corrales de alimentación grupal separados por tratamiento, excepto durante los días de medición de consumo individual de ración, donde cada vaca fue alojada en un corral individual. El acceso al agua de bebida fue a voluntad durante todo el ensayo. La TMR fue suministrada mediante tractor y mixer de mezclado horizontal en dos ofertas diarias, aportando el 67% de la ración luego del ordeño de la mañana y el 33% restante luego del ordeño de la tarde. Si bien se buscó un consumo a voluntad, de ambas TMR se ofreció un máximo de 30 kg de MS por animal y por día a fines de evitar desórdenes digestivos, compactaciones y/o desplazamientos de abomaso por un excesivo consumo voluntario. Los animales fueron ordeñados dos veces por día, a las horas 5:00 y 16:00.

1.6. Mediciones en los alimentos

A lo largo de todo el ensayo se obtuvieron muestras semanales de cada una de las TMRs y de todos los componentes de la misma (0,5 kg) para el análisis de materia

seca (MS; 100ºC durante 24 horas), materia orgánica (MO; calcinado a 550-600ºC durante 4 horas), proteína bruta (PB; Horneck; Miller, 1998 con un analizador LECO FP-528, Leco Corp., Saint Joseph, MI, EE.UU.), carbohidratos solubles en agua (CSA; Morris, 1948), fibra en detergente neutro (FDN) y ácido (FDA) por la técnica de bolsas filtrantes (Komarek *et al.*, 1994 y Komarek *et al.*, 1993, respectivamente) con un autoanalizador (ANKOM Corp., Fairtport, NY, EE.UU.), extracto etéreo (EE) por la técnica de extracción con solventes en alta temperatura (AOCS, 2004) con un autoanalizador (ANKOM Corp., Fairtport, NY, EE.UU.), DMS a 30 y 48 horas de incubación *in vitro* mediante la determinación de FDN en los residuos (equipo Daisy II, ANKOM) y almidón (Mc Rae; Armstrong, 1968). En el caso de los ensilajes también se determinó el contenido de lignina mediante la técnica del permanganato de potasio (Goering; Van Soest, 1970), la digestibilidad de la FDN (DFDN) a 30 y 48 horas mediante el mismo procedimiento utilizado para DMS y se evaluó el tamaño de partículas a través de la metodología de la Universidad de Pennsylvania (Lammers *et al.*, 1996).

Se realizaron dos determinaciones por semana del contenido de MS de los ensilajes, en estufa a 100ºC por 24 horas, a fines de mantener constante la proporción de ensilaje en la ración durante todo el experimento.

1.7. Medición del consumo de alimento

El consumo de TMR fue medido individualmente mediante la cuantificación de oferta y rechazo en la tercera y cuarta semana del período experimental. En la semana 3 se registró el consumo a la mitad de los animales de cada tratamiento y en la semana 4 al resto de los animales. En cada caso, la medición individual de oferta y rechazo se realizó durante cinco días consecutivos. Las vacas fueron alojadas en corrales individuales para recibir la cantidad diaria de TMR en dos ofertas diarias ajustadas al 67% luego del ordeño de la mañana y 33% del total luego del ordeño de la tarde. Los rechazos se recolectaron una vez al día en el momento anterior al suministro matutino. Diariamente se determinó el contenido de MS de la ración a 100ºC durante 24 horas, tanto para las ofertas como para los rechazos. Para la determinación del consumo en la última semana del período de covariable se utilizó el mismo procedimiento, pero sólo durante tres días consecutivos.

A partir del consumo de MS y de la composición química de los alimentos se estimó el consumo individual de PB, FDN y almidón (considerando los 1,8 kg de MS del

balanceado consumido diariamente en la sala de ordeñe). Además se calculó el consumo de MS y FDN en relación al peso vivo, tomando para el cálculo el peso promedio y sin desbastar de los animales, correspondiente a los días 8 y 29 del período experimental de modo de representar con una mayor aproximación al peso durante los días de medición de consumo. Durante los días de medición individual de consumo no se realizaron pesadas para no interferir con el comportamiento animal, tratando de evitar alteraciones en la estimación de la cantidad de ración ingerida.

1.8. Estimación de la digestibilidad *in vivo*

Durante los cinco días de medición de consumo individual se recolectaron muestras de materia fecal dos veces al día, a las 4:00 y a las 15:00 horas (anterior a cada ordeñe), correspondientes a diez animales en lactancia temprana de BMR y diez de C. Posteriormente se procedió al secado de la totalidad de las muestras (60ºC hasta peso constante) para luego confeccionar una única muestra individual (pool) de 30 g de MS de la mañana y 30 g de MS de la tarde. Los mismos días se tomaron muestras de la TMR y del balanceado suministrado en sala de ordeño. Las muestras de heces, TMR y balanceado fueron incubadas *in vitro* durante 120 horas (equipo Daisy II, ANKOM), por triplicado, para determinar el contenido de FDN en el residuo con la misma metodología utilizada para los alimentos. Esta concentración de FDN fue considerada como indigestible y utilizada como un marcador interno (Cochran *et al.*, 1986; Lippke *et al.*, 1986) para el cálculo de la producción total de heces (Lippke, 2002) (Fórmula 1). Conociendo este valor, el consumo de MS y la composición química del alimento y de las heces, se calculó la digestibilidad *in vivo* de la MS (Lippke, 2002), FDN, FDA y almidón (Fórmula 2 y 3).

$$\mathrm{H} = \frac{\mathrm{Ci}}{\mathrm{Ih}} \times \mathrm{Tr} \qquad [1]$$

Donde:

H: Producción total de heces, kg de MS/día.

Ci: Definido por Lippke (2002) como dosis de marcador externo, en este caso corresponde al consumo del indicador interno (FDN indigestible a 120 horas), kg/día.

Ih: Concentración del indicador en heces, %.

Tr: Tasa de recuperación del indicador, %. Debido a que la determinación de este factor requiere de la colección total de heces, se asumió un valor de la bibliografía del 83% (Lippke *et al.*, 1986).

$$\mathrm{DMS} = 1 - \frac{\mathrm{H}}{\mathrm{CMS}} \qquad [2]$$

Donde:

DMS: Coeficiente de digestibilidad *in vivo* de la MS.

CMS: Consumo de MS, kg/día.

$$\mathrm{DN} = 1 - \frac{\mathrm{EN}}{\mathrm{CN}} \qquad [3]$$

Donde:

DN: Coeficiente de digestibilidad *in vivo* de un nutriente.

EN: Excreción del nutriente, kg/día.

CN: Consumo del nutriente, kg/día.

En este caso “nutriente”= FDN, FDA o almidón.

1.9. Medición de la producción y composición química de la leche

La producción de leche fue registrada de manera individual durante cinco días a la semana a lo largo de todo el ensayo por medio de lactómetros (Waikato Milkmeter, Hamilton, Nueva Zelanda). La composición química de la leche fue determinada dos veces por semana en dos días no consecutivos, durante todo el ensayo, utilizando muestras de leche correspondientes a cada turno de ordeño para confeccionar una muestra única individual (pool) por día ponderada por la respectiva producción individual. En cada muestra compuesta (tarde-mañana) se determinó el contenido de grasa, proteína, lactosa y sólidos totales a través de un autoanalizador por espectrofotometría infrarroja (Foss 300 MilkoScan, Foss Electric, Hllerod, Dinamarca). La concentración de nitrógeno ureico en leche (NUL) fue cuantificada manualmente utilizando un kit enzimático (Laboratorio Wiener, Rosario, Santa Fe, Argentina), previa centrifugación y obtención del suero de la leche. En la última semana experimental se tomaron alícuotas individuales de 50 ml de leche del pool mañana-tarde para confeccionar una muestra compuesta (100 ml) la que fue congelada (-24ºC) hasta la determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa, según las guías del *Bulletin of International Dairy Federation* No. 265 (1991) e ISO 15884-IDF 182 (*Milk fat, preparation of fatty acid methyl esters*) en el Parque Tecnológico Miguelete, INTI, Lácteos.

1.10. Medición del peso vivo, obtención de plasma y análisis de metabolitos y hormonas

Las vacas fueron pesadas dos veces consecutivas en el mismo día para sacar un promedio de ambos valores. Las mediciones fueron hechas después del ordeño de la mañana y antes del suministro de las TMRs (entre las horas 6:00 y 8:00), restringiendo el acceso al agua de bebida, al principio y al final del período de covariable y a los días 8, 29 y 43 del período experimental. En cada día de pesada se obtuvieron muestras individuales de sangre por punción de vena yugular. La sangre fue colectada en tubos de 45 ml conteniendo EDTA (7-8 gotas) (0,342 mol/l, pH 7,2, Anticoagulante Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina) para la posterior obtención del plasma por centrifugación (2000 × g por 15 minutos a 4ºC) y almacenamiento a -24°C hasta los análisis de glucosa (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina), urea (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina), ácidos grasos no esterificados (AGNE, Randox Laboratories Ltd., UK), insulina, hormona de crecimiento (GH) y somatomedinas (IGF-I) por radioinmuno análisis en el IByME (Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina).

1.11. Cálculo del balance energético

El cálculo del balance energético fue realizado mediante la diferencia entre el consumo y el requerimiento diario de energía metabolizable (EM), teniendo en cuenta la energía aportada por los tejidos en los casos en los que se detectaron pérdidas de peso corporal.

1.11.1. Consumo de energía metabolizable

El consumo de EM (Mcal/día) fue calculado como el producto entre el CMS (kg/día) y la densidad energética de la dieta (Mcal EM/kg de MS).

En primer lugar se estimó la concentración de energía bruta (EB) de la dieta, ponderando la EB de cada ingrediente por su participación en la TMR, excepto para la grasa pasante como será explicado (Tabla 3). Los valores de EB de los ingredientes fueron tomados de las tablas del INRA (1989), menos para la proteína (Fórmula 5) y la grasa (Fórmula 6) pasante que fueron estimados mediante las fórmula 4 y 5.

$$\text{EB de la proteína pasante} = 0{,}4573 \times 5{,}6 + 0{,}4789 \times 4{,}2 \qquad [4]$$

0,4573 es el contenido de PB de la fuente de proteína pasante utilizada y 0,4789 es la diferencia entre el contenido de MO y la PB de este mismo ingrediente (Tabla 8 de Resultados), asumiendo que dicha diferencia representa en su mayor parte a carbohidratos; 5,6 y 4,2 son las EB (Mcal/kg) de las proteínas y carbohidratos, respectivamente (NRC, 2001).

$$\text{EB de la grasa pasante} = 0{,}7055 \times 9{,}5 \qquad [5]$$

0,7055 es el contenido de MO de la grasa pasante (Tabla 8) y 9,5 el contenido de EB (Mcal/kg) estimado para ácidos grasos de cadena larga, ya utilizado por otros autores (Chalupa *et al.*, 1986). Se asumió que la totalidad de la MO estaba compuesta de ácidos grasos debido a que las restantes determinaciones (PB, FDN y FDA) resultaron insignificantes o directamente no arrojaron valores detectables por las técnicas (Tabla 8).

Tabla 3. Contenido y aporte de energía bruta (EB) de cada uno de los ingredientes de las raciones completamente mezcladas (TMR).

	%de la MS de la TMR	EB de los ingredientes [1]	EB aportada a la TMR [2]
Ensilaje de maíz	54,1	4,50	2,44
Balanceado comercial	32,1	4,47	1,43
Grano de soja	4,0	5,48	0,22
Harina de soja	3,9	4,61	0,18
Harina de plumas	2,1	5,47	0,11
Proteína pasante	1,9	4,57	0,09
Grasa pasante	1,3	6,70	-
Núcleo mineral	0,6	-	-
Sumatoria	-	-	4,47 [3]

[1] EB de cada ingrediente (Mcal/kg de MS) extraído de tablas del INRA (1989), excepto para proteína y grasa pasante, calculados como: *EB de la proteína pasante*= 0,4573 × 5,6 + 0,4789 × 4,2; *EB de la grasa pasante*= 0,7055 × 9,5.
[2] % de cada ingrediente por su contenido de EB (Mcal/kg de MS de la TMR).
[3] Contenido de EB de la TMR sin contar la energía aportada por los ácidos grasos de la grasa pasante (Mcal/kg de MS).

Para la estimación de la concentración de EM de la dieta (Fórmula 6) se procedió según el AFRC (1993) utilizando los resultados de DMS *in vivo* (Tabla 11 de Resultados). Al valor final se sumó la cantidad de EM aportada por la grasa pasante

según su participación en la dieta. La EM de la grasa pasante (4,69 Mcal/kg de MS) fue calculada mediante la multiplicación de su contenido de EB obtenido en la fórmula 5, por el 70% de digestibilidad estimada para los ácidos grasos de cadena larga (Chilliard *et al.*, 1991). Esta última consideración fue debido a que los lípidos no tienen pérdidas por fermentación, con lo cual aplicarle un coeficiente de 0,82 sería erróneo.

$$\text{EM} = \text{EB} \times \text{DMS}\ in\ vivo \times 0{,}82 + \text{EM grasa pasante} \qquad [6]$$

1.11.2. Requerimientos de energía metabolizable

El cálculo de EM por día (Fórmula 7) se hizo por el método factorial sumando los requerimientos de EM para mantenimiento (m), producción de leche (pl), gestación (gest) y ganancia de peso (gp), según el NRC (2001).

Para convertir la energía neta de mantenimiento (ENm) y producción de leche (ENpl) a EM se asumió una eficiencia de 0,64 (NRC, 2001).

$$\text{EM (Mcal/día)} = ((\text{ENm} + \text{ENpl})/0{,}64) + \text{EMgest} + \text{EMgp} \qquad [7]$$

1.11.2.1. Mantenimiento

Para la estimación de los requerimientos de ENm se consideró una producción de calor en ayuno de 0,08 Mcal/kg de peso metabólico (peso vivo elevado a la 0,75). Este cálculo incluye un incremento en los costos de mantenimiento del 10% por actividad voluntaria correspondiente a animales en confinamiento (Fórmula 8).

$$\text{ENm} = 0{,}08 \times \text{PV}^{0{,}075} \qquad [8]$$

PV es el peso vivo sin desbaste correspondiente al promedio de las pesadas de los días 8 y 29 del período experimental, entre los cuales se midió el consumo individual de las TMRs.

En el caso de las vacas en lactancia avanzada al PV se le restó el peso estimado del *conceptus* (PC, fórmula 9).

$$\text{PC} = \Big(18 + \big((\text{DG} - 190) \times 0{,}665\big)\Big) \times (\text{PTN}/45) \qquad [9]$$

DG son los días de gestación. Se tomó un promedio de 204 días ya que la fecha estimada de parto era muy similar entre los animales.

PTN corresponde al peso estimado del ternero al nacimiento, tomando un peso adulto de 650 kg (Fórmula 10).

$$\text{PTN} = \text{PV adulto} \times 0{,}06275 \qquad [10]$$

1.11.2.2. Gestación

El NRC (2001) considera un requerimiento de gestación a partir de los 190 días de la concepción, de modo que solo fue calculado para las vacas en lactancia avanzada (Fórmula 11). El denominador 0,14 es el coeficiente de utilización de la EMgest.

$$\text{EMgest} = ((2 \times 0{,}00159 \times \text{DG} - 0{,}0352) \times (\text{PTN}/45))/0{,}14 \qquad [11]$$

1.11.2.3. Producción de leche

Para el cálculo de la ENpl (Fórmula 12) se tomaron los datos de producción (kg/día) y composición química de la leche (%) correspondientes a los días de medición de consumo (semanas 3 y 4 del período experimental).

$$\text{ENpl} = (0{,}0929 \times \text{grasa} + 0{,}0547 \times \text{proteína} + 0{,}0395 \times \text{lactosa}) \times \text{producción de leche} \qquad [12]$$

1.11.2.4. Ganancia de peso

El NRC (2001) expresa la concentración energética de las reservas corporales en Mcal/kg de peso vacío. Por este motivo, siguiendo el procedimiento sugerido por el NRC (2001), los pesos registrados en la covariable (peso inicial) y al final de período experimental (día 43) fueron multiplicados por 0,817 y posteriormente se calculó la ganancia diaria de peso vacío (GDPV).

Cuando la GDPV fue mayor a cero se asumió una concentración energética de 6,98 Mcal/kg de ganancia de PV para vacas en lactancia temprana y de 7,61 Mcal/kg para vacas en lactancia avanzada, correspondientes a una condición corporal de 2,5 y 3,

respectivamente. El producto entre GDPV y concentración energética fue dividido por 0,75 que representa la eficiencia de uso de la EMgp (NRC, 2001).

Cuando la GDPV fue inferior a cero se asumió una concentración energética de 6,41 Mcal/kg de pérdida de PV correspondiente a una condición corporal de 2,5 (NRC, 2001). El producto entre GDPV y concentración energética de la variación de PV se multiplicó por 0,82 (eficiencia de uso de la energía de tejidos de reserva para producción de leche) y descontado del correspondiente requerimiento de ENpl.

1.12. Análisis estadístico

Los consumos fueron analizados mediante un modelo con los efectos del ensilaje, estado de lactancia y la interacción ensilaje por estado, ajustado por covariable. La covariable usada para analizar el consumo de energía metabolizable fue el CMS debido a que no se midió la DMS *in vivo* durante dicho período, variable usada para la estimación de la concentración energética de la dieta. Las demás covariables fueron las correspondientes a cada variable analizada, es decir, el consumo de FDN fue ajustado por el consumo de FDN registrado en el período de covariable, y así sucesivamente con el consumo de PB, almidón y MS y FDN relativos al peso vivo.

Para el análisis de la producción y composición de leche se promediaron los datos registrados durante las últimas dos semanas del período de covariable y los correspondientes a las últimas cuatro semanas del período experimental o de aplicación de los tratamientos. La inclusión de los datos de producción de leche del período de covariable, como covariable para el análisis de las variables de producción, fue significativa. Sin embargo, como el rango de valores que toman las covariables es muy distinto entre estados de lactancia, las estimaciones corregidas por las covariables pueden llevar a conclusiones erróneas, pues extrapolan la información a niveles de la covariable no estudiados para alguno de los estados de lactancia. Por este motivo, al ser la covariable afectada por el estado de lactancia, el análisis de los datos de producción y composición de la leche mediante un modelo que contiene los efectos de ensilaje, estado de lactancia e interacción ensilaje por estado de lactancia ajustado por covariable fue reemplazado por dos modelos independientes según el estado de lactancia, temprana o avanzada, que incluyeron sólo el efecto del ensilaje ajustado por covariable. Con este mismo modelo se analizó la eficiencia de conversión (kg de leche producidos por kg de MS ingerida).

Además, se realizó una comparación de las diferencias en producción y composición de leche entre el período experimental (promedio de las últimas cuatro semanas del período experimental) y el período de covariable (promedio de las últimas dos semanas del período de covariable) mediante un modelo que incluyó el efecto de ensilaje, el estado de lactancia y la interacción ensilaje por estado de lactancia.

Se estimó la ganancia diaria de peso vacío por diferencia entre el peso final (registrado el día 43 del período experimental) y el peso inicial (período de covariable), previamente corregidos por 0,817 (NRC, 2001), y fue analizada en un modelo con los efectos de ensilaje, estado de lactancia y la interacción entre ambos. De la misma manera se analizó la concentración plasmática de metabolitos y hormonas.

En todos los casos que el modelo tuvo un efecto de covariable se testeó la interacción tratamiento por covariable y se consideró paralelismo cuando $P > 0,05$, lo que habilitaba el análisis de covarianza. Cuando la covariable no fue significativa ($P > 0,05$) se testeó el efecto de tratamiento sin remover el efecto de la covariable del modelo.

Para todos los análisis se utilizó el procedimiento “PROC GLM” de SAS 9.0. Los efectos principales de los tratamientos fueron considerados significativos cuando $P < 0,05$ y tendencias cuando $P < 0,1$. Las interacciones entre los tratamientos fueron declaradas significativas cuando $P < 0,1$.

Se hicieron matrices de correlación entre las diferentes variables analizadas, considerando significativas a aquellas con un $P < 0,05$.

2. Experimento 2: FERMENTADORES DE DOBLE FLUJO CONTINUO

2.1. Lugar y fecha

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Fermentadores del Departamento de Producción Animal de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce del INTA durante los meses de octubre y noviembre de 2011.

2.2. Equipamiento y condiciones de fermentación

Se utilizaron 4 fermentadores de doble flujo continuo (Minifors, Infors HT, Bottmingen, Suiza) con vasos de fermentación de una capacidad de 1,5 l. Los fermentadores fueron inoculados con líquido ruminal de dos animales donantes

alimentados con una dieta de forraje y concentrado. El medio de fermentación fue mantenido a una temperatura constante de 38,5°C, permitiéndose una fluctuación libre del pH entre 5,0 y 7,0 y una velocidad de agitación de 300 rpm. Estas condiciones de fermentación fueron monitoreadas y controladas mediante el software “Iris NT Versión 5.20.709.0997 Copyright® Infors AG 1997”. Saliva artificial (Weller; Pilgrim, 1974) fue infundida al medio de fermentación mediante bombas peristálticas. Esta infusión permitió controlar la tasa de pasaje de sólidos, la que fue fijada en un 5%/hora. Por su parte, la tasa de pasaje de líquidos fue manipulada a través de la filtración del contenido ruminal, también con el uso de bombas peristálticas, de modo que se fijó en un 10%/hora. De esta manera, el *turnover* de líquidos fue de 2,4 volúmenes diarios y el tiempo de retención de sólidos en el vaso de fermentación de 20 horas.

2.3. Diseño experimental y tratamientos

Se formularon dos tratamientos, una TMR con EC y una TMR con EBMR, evaluados en dos períodos. El diseño experimental empleado fue un diseño en bloques completos aleatorizados donde el criterio de bloqueo fue el período.

Los ingredientes de las TMRs fueron los mismos que en el experimento 1, con una leve modificación en la participación relativa de cada uno de ellos para considerar el consumo de balanceado en sala de ordeñe. Para ello se estimó el CMS promedio de todas las vacas del experimento 1 (23,6 kg/día, n= 40) al que se le adicionó los 1,8 kg de balanceado y luego se calculó el porcentaje de cada ingrediente (Tabla 4). De esta manera, la proporción de balanceado tuvo un leve incremento, mientras que la de los demás ingredientes disminuyó ligeramente. Cada ingrediente fue secado a 60ºC en estufa hasta peso constante y molido a un tamaño de 2 mm en molino Willey. Posteriormente se mezclaron durante 20 minutos, respetando las proporciones indicadas en la tabla 4, y se almacenaron en heladera hasta el inicio del período experimental.

Cada período tuvo una duración de 11 días. El día 1 se hizo la inoculación y hasta el día 8 fue considerado como período de adaptación de la microflora. La toma de muestras y registro de datos se realizó durante los últimos tres días (día 9 al 11). El suministro de las TMRs fue de 90 g de MS por día, dividido en dos ofertas iguales (45 g) a las 8:00 y 20:00 horas.

Tabla 4. Ingredientes de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz nervadura marrón (BMR) o convencional (C).

	% de la MS
Ensilaje de maíz, EBMR/EC	50,3
Balanceado comercial	36,9
Harina de soja	3,6
Grano de soja	3,7
Harina de plumas	2,0
Proteína pasante	1,8
Grasa pasante	1,2
Núcleo vitamínico-mineral	0,6

MS: materia seca; EBMR: ensilaje de maíz nervadura marrón; EC: ensilaje de maíz convencional.

2.4. Mediciones en el medio de cultivo

2.4.1. pH

El pH fue medido a través de un pH-metro sumergido constantemente en el medio de cultivo durante todo el período de ensayo. La calibración de estos dispositivos fue en el instante anterior a la inoculación y se configuró el equipo parar llevar un registro cada treinta minutos mediante el software nombrado anteriormente (Iris NT Versión 5.20.709.0997 Copyright® Infors AG 1997).

2.4.2. Concentración de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal

Durante el día 10 del período experimental se extrajeron seis muestras, cada dos horas, de 20 ml del filtrado de cada fermentador. La primer muestra fue tomada inmediatamente antes del suministro matutino de la TMR (hora 8:00) y considerada como hora 0. De los 20 ml, 9,9 ml se conservaron con 0,1 ml de H_2SO_4 al 98% para la determinación de AGV y, 4 ml se conservaron con 4 ml de HCl 0,2 M para la cuantificación de N-NH_3. Ambas muestras fueron congeladas a -20°C, para una vez concluido el muestreo ser descongeladas y centrifugadas a 10000 g durante 15 minutos (Eppendorf, modelo Centrifuge 5810R). La determinación de AGV fue realizada por cromatografía gaseosa (Laboratorio de Nutrición Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires), utilizando un Equipo Konik 5000B con inyección automática Robokrom GC y equipado con un detector de ionización a la llama (FID), una columna capilar Nukol de 30 m y 0,32 mm de diámetro interno, y un

patrón de referencia Sigma Cat. Nro. 46975-U. La temperatura del inyector y del detector del FID fue mantenida a 250ºC. La concentración de N-NH_3 fue realizada por espectrofotometría (Espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific, modelo Genesys 10-S) según Weatherburn (1967).

2.5. Mediciones en los efluentes

Durante los días de muestreo, 9 a 11 del período experimental, los recipientes de los efluentes fueron mantenidos a una temperatura de entre 4 y 10°C para detener la actividad microbiana. Al finalizar cada día de muestreo, los efluentes líquidos y sólidos de cada fermentador fueron homogeneizados durante un minuto para tomar 600 ml de muestra por aspiración, la que fue congelada a -20°C. Al final de cada período, las muestras de los tres días de colecta fueron descongeladas y homogeneizadas en un único pool por fermentador. De este pool se tomaron 9,9 y 4 ml por duplicado, los cuales fueron conservados de igual manera que en el ítem anterior, para la determinación de AGV y N-NH_3. Las concentraciones (mmol/l) de AGV totales y de cada uno de ellos fueron multiplicadas por la cantidad diaria de efluentes (l/día, promedio de los tres días de muestreo) para estimar la producción diaria de AGV. Además, 600 ml representativos del pool fueron tomados por aspiración y liofilizados para la posterior determinación de MS, MO, PB, FDN, FDA, almidón (mediante las mismas metodologías empleadas en el experimento 1) y contenido de purinas según la técnica de Zinn y Owens (1986) modificada por Makkar y Becker (1999). A partir de ello se estimó la degradabilidad aparente de la MS, MO y almidón y, la degradabilidad verdadera de la MS, MO, FDN, FDA y PB, según Stern y Hoover (1990).

2.6. Determinación del flujo de nitrógeno microbiano

Durante dos días consecutivos al finalizar el período experimental se realizó la toma de muestras y aislamiento de bacterias asociadas a la fase sólida y líquida de los vasos de fermentación mediante una combinación de diversas centrifugaciones (Whitehouse *et al.*, 1994). Brevemente, después de realizar la última recolección de efluentes (final del día 11), en cada vaso de fermentación, se agregaron 100 ml de una solución de metilcelulosa al 0,2% y 20 bolillas de cristal, se incubaron durante 1 hora a 38ºC y 300 rpm para remover las bacterias ligadas a las partículas de alimento y se llevaron a heladera por 24 horas. Pasadas las 24 horas se realizó una segunda

agitación para desprender las bacterias ligeramente adheridas. El contenido de los frascos fue filtrado con un lienzo y lavado con una solución salina de ClNa al 0,85%. Las células bacterianas fueron aisladas a través de una serie de centrifugaciones, la primera a 1000 g × 10 min para eliminar las partículas de alimento recuperando el sobrenadante y, la segunda, a 20000 g × 20 min para aislar el pellet microbiano. Los pellets fueron resuspendidos con la solución salina y centrifugados a 20000 × 20 min. Por último, se recogieron los pellets lavando con agua destilada para prevenir la contaminación con cenizas y se procedió al liofilizado y análisis del aislamiento microbiano por MO, N y contenido de purinas. La cuantificación de purinas fue hecha por espectrofotometría mediante la técnica de Zinn y Owens (1986) modificada por Makkar y Becker (1999). Posteriormente, se calculó la relación entre purinas y N microbiano para la estimación del contenido de N microbiano en los efluentes, previo conocimiento del contenido de N en estos (Punto 2.5.).

2.7. Análisis estadístico

La degradabilidad de las distintas fracciones de las TMRs y la producción diaria de AGV fue analizada mediante un modelo que consideró los efectos del período (bloque) y del ensilaje. Se utilizó el procedimiento “PROC GLM” de SAS 9.0.

El pH (registrado durante los días 9 a 11 del período experimental) y la concentración de AGV y N-NH_3 fueron analizados a través de un modelo con medidas repetidas en el tiempo que consideró los efectos del período (bloque), del ensilaje, de la hora de medición y de la interacción ensilaje × hora. La estructura de la matriz de correlación usada para modelar el error fue seleccionada teniendo en cuenta: 1) la magnitud en que se diferenció de un modelo sin estructura de correlación; 2) el valor de AIC (Akaike Information Criterion); 3) diferenciación de otros modelos con similar valor de AIC. Esta comparación entre modelos se realizó mediante una Chi cuadrado que tuvo en cuenta la diferencia entre los valores de Likelihood (valor de la Chi^2) y la cantidad de parámetros (grados de libertad de la Chi^2) de cada modelo. Si $P< 0,05$, los modelos se consideraron diferentes, seleccionando en ese caso a aquel con menor valor AIC. La matriz autorregresiva de primer orden (AR1) fue usada para el análisis del pH y N-NH_3; Compound Symmetry (CS) para acetato, propionato, butirato y caproato; AR1 y CS para varianzas heterogéneas (CSH, ARH1) para valerato y ácidos grasos ramificados, respectivamente. Para el análisis se empleó el procedimiento “PROC MIXED” de SAS 9.0.

Los efectos principales de los tratamientos fueron considerados significativos cuando $P< 0,05$ y tendencias cuando $P< 0,1$. Las interacciones fueron declarados significativas cuando $P< 0,1$.

Se hicieron matrices de correlación entre las diferentes variables analizadas, considerando significativas a aquellas con un $P< 0,05$.

RESULTADOS

1. Experimento 1: RESPUESTA PRODUCTIVA EN VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN

1.1. Composición química y valor nutricional de los maíces previo al ensilado

Inmediatamente antes del proceso de ensilado (Tabla 5) ambos híbridos presentaron similar contenido de MS, almidón, FDN y FDA. El contenido de PB resultó 20% superior en el híbrido con nervadura marrón respecto al convencional y la concentración de CSA 16% mayor en el convencional. La concentración de lignina tendió a ser menor en el maíz con nervadura marrón (-11%).

Tabla 5. Composición química y valor nutricional de los maíces convencional y nervadura marrón previo al ensilado.

	Convencional		Nervadura marrón		*P* [1]
	Media	DE	Media	DE	
MS, %	33,4	2,09	33,8	2,34	0,715
% de la MS,					
MO	93,9	0,75	93,1	0,94	0,058
PB	6,1	0,43	7,3	0,78	0,004
Almidón	19,3	3,76	17,7	3,69	0,412
CSA	11,9	1,11	10,3	1,04	0,009
FDN	45,0	2,21	50,1	3,37	0,945
FDA	24,2	1,08	24,8	1,85	0,406
Lignina	1,8	0,24	1,6	0,23	0,071
DMS-30	59,2	1,77	61,1	3,07	0,147
DMS-48	64,6	1,20	69,3	1,77	<0,0001
EM, Mcal/kg de MS	2,33	0,04	2,50	0,06	<0,0001
DFDN-30, % de la FDN	42,0	3,89	45,9	6,28	0,154
DFDN-48, % de la FDN	53,0	2,66	62,4	3,87	<0,0001

[1] Prueba t de *Student* para muestras independientes, n= 8. DE: desvío estándar. MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; CSA: carbohidratos solubles en agua; EE: extracto etéreo; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácido; DMS: digestibilidad aparente de la MS a 30 y 48 horas de incubación *in vitro*; EM: energía metabolizable estimada según AFRC (1993) mediante la DMS-48; DFDN: digestibilidad de la FDN a 30 y 48 horas de incubación *in vitro*.

No se detectaron diferencias en la DFDN y en la DMS *in vitro* a las 30 horas de incubación, pero ambas digestibilidades resultaron superiores en el maíz con nervadura marrón cuando el tiempo de incubación fue de 48 horas (+18 y 7%, respectivamente; Tabla 5). Por lo tanto, la densidad energética estimada a partir de la DMS-48 resultó 7% superior en el maíz con nervadura marrón.

1.2. Composición química y valor nutricional de los alimentos y de las raciones completamente mezcladas

Ambos ensilajes presentaron valores similares de pH y de contenido de MS, MO, almidón, CSA, EE, FDN, FDA y lignina, mientras que el nivel de PB tendió a ser un 19% mayor en el EBMR (Tabla 6). No hubo diferencias en la DMS a 30 horas pero si a 48 horas de incubación, siendo superior en el EBMR. Como resultado, el contenido de EM, estimado a partir de dicha digestibilidad, también fue mayor en el EBMR por 0,12 Mcal. La DFDN *in vitro* fue más alta en el EBMR tanto a las 30 como a las 48 horas, por 6,3 y 7,4 unidades porcentuales, respectivamente.

Las correlaciones entre el contenido de lignina y la DFDN *in vitro* a las 30 o las 48 horas no resultaron significativas, ya sea cuando se analizaron de manera separada por híbrido (n= 7) o en conjunto (n= 14) ($P > 0,19$).

La evaluación del tamaño de partículas de los ensilajes resultó en patrones de distribución similares entre híbridos, encontrándose que más del 80% del material fue superior a los 8 mm (Tabla 7).

La composición química y el valor nutricional del resto de los ingredientes de las TMRs puede observarse en la tabla 8. A partir de los resultados obtenidos en las tablas 6 y 8 se estimó la composición química de las dos TMRs experimentales (Tabla 9).

Tabla 6. Composición química y valor nutricional de los ensilajes de maíz convencional (EC) y nervadura marrón (EBMR).

	EC		EBMR		$P^{(1)}$
	Media	DE	Media	DE	
MS, %	33,3	0,66	32,7	1,84	0,391
pH	3,82	0,05	3,85	0,06	0,266
% de la MS,					
MO	94,5	0,30	94,0	0,74	0,114
PB	5,9	1,20	7,0	1,05	0,076
Almidón	26,5	3,46	23,5	4,46	0,178
CSA	11,7	1,79	10,9	2,16	0,450
EE	2,5	0,72	2,6	1,05	0,891
FDN	40,8	3,51	40,8	2,72	0,987
FDA	20,6	1,41	21,8	1,98	0,215
Lignina	2,7	0,64	2,3	0,49	0,266
DMS-30	60,8	1,44	62,5	3,29	0,245
DMS-48	65,4	2,20	68,7	2,60	0,025
EM, Mcal/kg de MS	2,36	0,08	2,48	0,09	0,025
DFDN-30, % de la FDN	30,6	3,46	36,9	4,01	0,011
DFDN-48, % de la FDN	42,0	5,12	49,4	2,65	0,009

(1) Prueba t de *Student* para muestras independientes, n= 7. DE: desvío estándar. MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; CSA: carbohidratos solubles en agua; EE: extracto etéreo; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácido; DMS: digestibilidad aparente de la MS a 30 y 48 horas de incubación *in vitro*; EM: energía metabolizable estimada según AFRC (1993) mediante la DMS-48; DFDN: digestibilidad de la FDN a 30 y 48 horas de incubación *in vitro*.

Tabla 7. Distribución de partículas de los ensilajes de maíz convencional (EC) y nervadura marrón (EBMR).[1]

	EC		EBMR	
	Media	DE	Media	DE
Mayor a 19 mm	10,04	2,10	12,93	1,49
De 8 a 19 mm	72,67	1,78	71,54	1,77
Menor a 8 mm	17,29	0,90	15,52	0,51

[1] Resultados expresados como la proporción (%) de material retenido en cada tamiz, respecto del peso total de material tamizado (base materia verde). DE: desvío estándar.

Tabla 8. Composición química y valor nutricional de los ingredientes dietarios utilizados en la formulación de las raciones completamente mezcladas (TMR).

	MS	MO	DMS-30	DMS-48	EM	PB	FDN	FDA	Almidón	CSA	EE
Balanceado	89,8	92,9	67,8	71,2	2,57	16,7	28,5	12,9	27,9	17,1	3,4
	±1,12	±1,89	±2,22	±1,60	±0,06	±1,37	±2,97	±1,11	±4,98	±1,00	±0,30
Grano de soja	90,1	92,8	82,5	85,1	3,42[1]	35,8	22,2	14,2	*	11,2	15,9
	±0,70	±3,18	±2,24	±0,51	_	±3,30	±2,39	±2,38		±0,46	±1,76
Harina de soja	89,4	93,1	84,6	86,6	3,12	42,2	16,2	10,1	*	15,0	1,3
	±0,88	±1,96	±0,92	±0,45	±0,02	±2,75	±2,23	±1,70		±0,91	±0,42
Harina de plumas	91,8	92,7	58,8	65,8	2,37	77,4	*	*	*	*	9,6
	±1,52	±2,01	±5,29	±3,95	±0,14	±2,89					±3,05
Proteína pasante	92,2	93,6	80,9	85,9	3,10	45,7	20,0	7,00	2,2	16,3	1,3
	±0,79	±1,79	±1,16	±1,09	±0,04	±1,55	±1,16	±1,25	±1,80	±0,96	±0,40
Grasa pasante	86,1	70,6	86,8	87,6	4,69[2]	**	***	***	*	*	*
	±1,69	±2,10	±0,86	±0,40	_						

[1)] Valor de referencia INRA (1989). [2)] Explicado en el punto 1.11.1. de materiales y métodos. n: 7, excepto el balanceado (n: 6). MS: materia seca; MO: materia orgánica; EE: extracto etéreo; PB: proteína bruta; CSA: carbohidratos solubles en agua; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácido; DMS: digestibilidad aparente de la MS a 30 y 48 horas de incubación *in vitro*; EM: energía metabolizable estimada según AFRC (1993) mediante la DMS-48. Expresados en % de la MS, excepto EM expresada en Mcal/kg de MS. *Sin determinar. **No detectable. ***Insignificante.

Tabla 9. Composición química estimada de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

	C	BMR
MS, %	46,9	46,1
% de la MS,		
MO	92,9	92,6
PB	14,1	14,7
Almidón	23,4	21,7
CSA	13,2	12,7
EE	3,3	3,4
FDN	33,1	33,1
FDA	16,4	17,0
EM, Mcal/kg de MS	2,28	2,27

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; CSA: carbohidratos soluble en agua; EE: extracto etéreo; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácido; EM: energía metabolizable estimada según AFRC (1993) a partir de la digestibilidad *in vivo* de la MS y de la energía bruta de los ingredientes según INRA (1989).

1.3. Consumo de alimento

Se detectaron interacciones significativas (*P*< 0,07) entre el tipo de ensilaje y el estado de lactancia de los animales para los consumos de MS y de los componentes de las raciones (Tabla 10).

En las vacas en lactancia temprana, el CMS fue 1,5 kg/día mayor en BMR que en C y como consecuencia, los consumos de PB y FDN también fueron superiores en dichas vacas (+0,3 y +0,4 kg/día, respectivamente). El consumo de EM tendió a ser superior en BMR por 3,2 Mcal/día y el de almidón fue similar entre tratamientos. Las vacas que consumieron la dieta BMR también tuvieron un mayor consumo de MS y FDN cuando se expresó relativo al peso vivo.

Por otro lado, en las vacas en lactancia avanzada solo el consumo diario de almidón difirió con el ensilaje, siendo 0,5 kg mayor en C que en BMR.

Tabla 10. Consumo de materia seca y componentes de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR) en vacas en lactancia temprana y avanzada.

	Lactancia temprana			Lactancia avanzada			*P*		
	C	BMR	EE	C	BMR	EE	E	L	E × L
MS, kg/día	24,8[b]	26,3[a]	0,49	25,5	24,6	0,67	0,581	0,365	0,058
PB, kg/día	3,6[b]	3,9[a]	0,07	3,6	3,7	0,10	0,026	0,359	0,053
FDN, kg/día	8,2[b]	8,6[a]	0,16	8,4	8,1	0,22	0,598	0,365	0,058
Almidón, kg/día	5,9	5,8	0,11	6,0[a]	5,5[b]	0,15	0,023	0,375	0,067
EM, Mcal/día	56,6[d]	59,8[c]	1,12	58,1	55,9	1,53	0,717	0,366	0,059
MS, % del PV	3,9[b]	4,2[a]	0,08	4,0	3,8	0,11	0,545	0,054	0,006
FDN, % del PV	1,3[b]	1,4[a]	0,03	1,3	1,2	0,04	0,559	0,054	0,006

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje; L: efecto del estado de lactancia; E × L: efecto de la interacción entre E y L; MS: materia seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra en detergente neutro; EM: energía metabolizable; PV: peso vivo.

[a, b] LSM con distintas letras difieren dentro de cada estado de lactancia (*P*< 0,05).

[c, d] LSM con distintas letras tienden a diferir dentro de cada estado de lactancia (*P*< 0,1).

El efecto de covariable fue significativo para todas las variables (*P*< 0,05).

1.4. Digestibilidad *in vivo*

La digestibilidad *in vivo* de la MS y del almidón fue similar entre los tratamientos, promediando 60 y 98,5%, respectivamente (Tabla 11). Por su parte, la digestibilidad *in*

vivo de la FDN y FDA fue superior en la TMR que incluyó al EBMR por 6,6 y 5,5 unidades porcentuales comparada con la ración con EC.

La digestibilidad *in vivo* de la MS y la FDN se relacionaron positivamente, observándose que por cada unidad de incremento en la DFDN, la DMS incrementó en 0,25 unidades (Figura 6).

Tabla 11. Digestibilidad *in vivo* (%) de la materia seca, de la fibra en detergente neutro y ácido y del almidón de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR), en vacas en lactancia temprana.

	C	BMR	EE	E
DMS	60,5	60,2	0,94	0,786
DFDN	33,4	40,0	1,50	0,006
DFDA	35,2	40,7	1,27	0,007
Digestibilidad del almidón	98,7	98,3	0,46	0,614

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje (*P* valor). DMS: digestibilidad aparente de la materia seca; DFDN: digestibilidad de la fibra en detergente neutro; DFDA: digestibilidad de la fibra en detergente ácido.

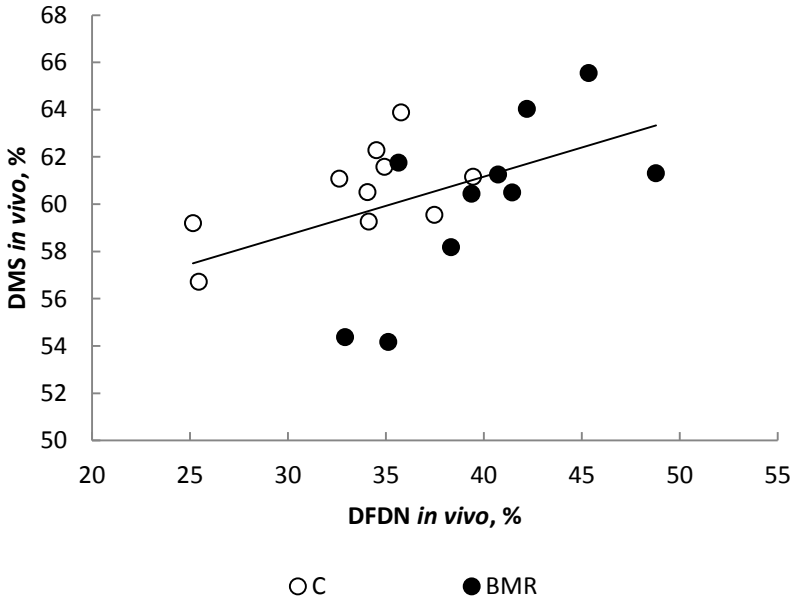

Figura 6. Relación entre las digestibilidades *in vivo* de la materia seca (DMS) y de la fibra en detergente neutro (DFDN) en vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR). DMS= 51,3 + 0,25 × DFDN (R^2= 0,24; *P*= 0,028).

1.5. Producción y composición química de la leche

En lactancia temprana, las vacas de BMR produjeron 2,9 kg/día más de leche que las de C lo que significó un 8% de incremento en la producción (Tabla 12). La producción diaria de proteína láctea fue superior en BMR (+0,08 kg), mientras que la de grasa mostró una tendencia negativa (-0,11 kg). De esta manera, la producción de LCG resultó similar entre BMR y C, siendo en promedio de 31,85 kg/día. Las concentraciones de proteína, lactosa y urea en leche no fueron afectadas por el ensilaje. En cambio, las concentraciones de grasa y sólidos totales fueron menores en la leche de las vacas de BMR por 0,43 y 0,47 unidades porcentuales, respectivamente. La eficiencia de producción, expresada como kg de leche por kg de MS de ración consumida, resultó alta en ambos tratamientos (1,4), pero sin diferencias entre ellos.

Tabla 12. Producción y composición de leche en vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

	C	BMR	EE	E	Covariable
Producción, kg/día					
Leche	35,4	38,3	0,85	0,029	<0,0001
LCG-4%	31,8	31,9	1,10	0,944	<0,0001
Proteína	1,20	1,28	0,03	0,040	<0,0001
Grasa	1,12	1,01	0,04	0,061	<0,0001
Composición, %					
Proteína	3,42	3,38	0,04	0,619	<0,0001
Grasa	3,34	2,91	0,13	0,034	<0,0001
Lactosa	5,08	5,11	0,04	0,542	<0,0001
Sólidos totales	12,61	12,14	0,13	0,020	<0,0001
Urea, mg/dl	29,05	27,97	1,10	0,384	0,540
Eficiencia de conversión	1,42	1,43	0,05	0,899	<0,0001

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje (*P* valor); covariable: efecto de la covariable (*P* valor); LCG-4%: producción de leche corregida al 4% de grasa butirosa; eficiencia de conversión: cociente entre la producción diaria de leche y el consumo de materia seca (kg/kg).

En lactancia avanzada, las producciones de leche y de grasa tendieron a ser menores en BMR por 1,8 y 0,11 kg/día, respectivamente, lo que llevó a una menor producción de LCG, de 2,6 kg/día (Tabla 13). La producción de proteína, la composición química de la leche y la eficiencia de conversión fueron muy similares entre tratamientos.

Tabla 13. Producción y composición de leche en vacas en lactancia avanzada alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

	C	BMR	EE	E	Covariable
Producción, kg/día					
Leche	26,4	24,6	0,91	0,088	0,077
LCG-4%	23,9	21,3	0,88	0,040	0,245
Proteína	0,99	0,96	0,04	0,592	0,020
Grasa	0,88	0,77	0,04	0,059	0,064
Composición, %					
Proteína	3,76	3,88	0,06	0,203	0,003
Grasa	3,34	3,17	0,15	0,434	0,003
Lactosa	5,09	5,03	0,05	0,427	<0,0001
Sólidos totales	12,92	12,86	0,20	0,846	0,018
Urea, mg/dl	31,56	31,77	0,94	0,776	0,395
Eficiencia de conversión	1,04	1,03	0,04	0,788	0,028

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje (*P* valor); covariable: efecto de la covariable (*P* valor); LCG-4%: producción de leche corregida al 4% de grasa butirosa; eficiencia de conversión: cociente entre la producción diaria de leche y el consumo de materia seca (kg/kg).

En lactancia temprana, las vacas correspondientes al tratamiento BMR mostraron un incremento en la producción diaria de leche durante el período experimental que resultó 3,5 kg superior a la producción registrada al inicio de la prueba (promedio de las últimas dos semanas del período de covariable) y significativamente mayor a las de C (Tabla 14). Este incremento de producción no fue observado en las vacas de C, siendo la diferencia de tan solo 0,8 kg, valor que no resultó diferente de cero. En lactancia avanzada, las diferencias en producción de leche no difirieron entre BMR y C, lo que explica la interacción significativa (*P*= 0,027) entre el tipo de ensilaje y el estado de lactancia de los animales. Sin discriminar por estado de lactancia, la diferencia en concentración de grasa butirosa en el tratamiento BMR (+0,22 unidades porcentuales) tendió (*P*= 0,069) a ser menor a la observada en C (+0,5 unidades porcentuales). El incremento en la producción diaria de grasa butirosa tendió (*P*= 0,069) a ser menor en las vacas de BMR (+0,07 kg) que en las de C (+0,175 kg). No se observaron efectos del ensilaje sobre las diferencias de LCG-4% y contenido de proteína, lactosa y sólidos totales.

Tabla 14. Promedios de las diferencias en la producción y composición de leche entre el período experimental[(1)] y el período de covariable[(2)] en vacas en estado de lactancia temprana y avanzada alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

	Lactancia temprana			Lactancia avanzada			*P*		
	C	BMR	EE	C	BMR	EE	E	L	E × L
Producción, kg/día									
Leche	0,8 [b]	3,5[a]	0,79	1,3	-0,5	1,08	0,614	0,077	0,027
LGC-4%	3,0	3,1	0,99	3,0	1,0	1,34	0,424	0,392	0,381
Proteína	0,04	0,12	0,03	0,02	-0,01	0,04	0,518	0,034	0,114
Grasa	0,18	0,06	0,05	0,17	0,08	0,06	0,069	0,960	0,807
Composición, %									
Proteína	0,05	0,02	0,05	-0,10	0,02	0,06	0,349	0,179	0,184
Grasa	0,47	0,06	0,13	0,53	0,38	0,17	0,069	0,212	0,398
Lactosa	-0,02	0,00	0,04	0,05	-0,01	0,05	0,666	0,540	0,327
Sólidos	0,50	0,09	0,14	0,47	0,37	0,19	0,141	0,444	0,362

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje; L: efecto del estado de lactancia; E × L: efecto de la interacción entre E y L; LCG-4%: producción de leche corregida al 4% de grasa butirosa.

(1) Período experimental: promedio de los datos correspondientes a las últimas cuatro semanas del período experimental.

(2) Período de covariable: promedio de las últimas dos semanas del período de covariable.

[a, b] LSM con distintas letras difieren dentro de cada estado de lactancia ($P< 0,05$).

El perfil de ácidos grasos de la leche (evaluado solo en lactancia temprana) fue afectado por el ensilaje (Tabla 15). En primer lugar, la leche de BMR resultó con un mayor contenido de ácidos grasos *trans*. Dentro de estos, la concentración de 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12 fue superior en un 72 y 50%, respectivamente. Por otra parte, la leche de BMR tuvo un contenido mayor de 14:1, 18:2 *cis*-9, *cis*-12 (ácido linoleico) y 18:3 (ácido linolénico) y menor de 15:1 y 18:0 (ácido esteárico). El índice de desaturación, indicador de la actividad de la enzima Δ-9 desaturasa, fue más alto en BMR para los ácidos grasos 14:0, 18:0 y 18:2 *cis*-9, *trans*-11 y, en consecuencia, la relación ruménico/vaccénico resultó incrementada en dicho tratamiento. No se hallaron diferencias ni en la proporción de ácidos grasos sintetizados *de novo* ni en la de preformados. Tampoco se evidenciaron diferencias en la fracción hipercolesterolémica.

Se observó una correlación negativa entre la concentración de grasa butirosa y el contenido de 18:1 *trans*-10 (r= -0,69; $P= 0,0001$, Figura 7) y 18:2 *trans*-10,*cis*-12 (r= -0,55; $P= 0,004$, Figura 8).

Tabla 15. Perfil de ácidos grasos (g/100 g de ácidos grasos totales) en la leche de vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

	C		BMR		*P*[1]
	Media	DE	Media	DE	
4:0	2,30	0,21	2,20	0,42	0,496
6:0	1,60	0,23	1,45	0,36	0,222
8:0	1,06	0,22	0,93	0,29	0,201
10:0	2,57	0,61	2,30	0,73	0,332
10:1	0,22	0,07	0,21	0,06	0,791
12:0	3,10	0,75	2,95	0,76	0,623
12:1	0,10	0,03	0,09	0,01	0,085
14:0	10,03	1,55	10,53	1,12	0,359
15:0 iso	0,17	0,02	0,17	0,03	0,727
14:1	0,87	0,22	1,24	0,35	0,005
15:0	0,91	0,16	0,89	0,09	0,682
15:1	0,25	0,07	0,21	0,04	0,045
16:0	25,91	2,29	26,80	2,72	0,388
16:1	1,38	0,36	1,58	0,39	0,197
17:0	0,56	0,07	0,53	0,04	0,221
17:1	0,22	0,05	0,22	0,04	0,685
18:0	11,97	1,95	9,10	1,17	0,0002
18:1 *trans*-8	0,79	0,16	0,89	0,22	0,197
18:1 *trans*-9	0,47	0,16	0,58	0,13	0,070
18:1 *trans*-10	2,06	1,00	3,55	1,84	0,021
18:1 *trans*-11 (ácido vaccénico)	2,50	0,49	2,31	0,67	0,447
18:1 *cis*-9	23,83	2,90	22,90	2,45	0,394
18:1 *cis*-11	1,18	0,19	1,26	0,22	0,341
18:2 *trans*-9, *trans*-12	0,09	0,09	0,08	0,03	0,806
18:2 *cis*-9, *cis*-12	3,91	0,41	4,90	0,52	<0,0001
18:3	0,41	0,04	0,48	0,05	0,001
18:2 *cis*-9, *trans*-11 (ácido ruménico)	1,19	0,23	1,33	0,34	0,242
18:2 *trans*-10, *cis*-12	0,04	0,02	0,06	0,02	0,038
18:2 *trans*-9, *trans*-11	0,07	0,01	0,07	0,02	0,722
20:4	0,20	0,05	0,19	0,04	0,548
20:5	0,03	0,01	0,03	0,01	0,896
22:6	0,02	0,01	0,02	0,01	0,827
Sintetizados *de novo*[2]	23,19	3,75	23,17	3,16	0,992
Preformados[3]	49,52	4,87	48,46	4,78	0,587
trans- totales	7,21	1,36	8,83	2,22	0,040
Ácidos grasos hipercolesterolémicos[4]	39,04	3,46	40,28	3,72	0,397
Índice de desaturación					
14:1 / (14:0 + 14:1)	0,08	0,01	0,11	0,03	0,014
16:1 / (16:0 + 16:1)	0,05	0,01	0,06	0,01	0,272
18:1 / (18:0 + 18:1)	0,67	0,03	0,72	0,03	0,001
Ruménico / (vaccénico + ruménico)	0,32	0,03	0,37	0,04	0,003
Relación ruménico / vaccénico	0,48	0,06	0,58	0,09	0,004

[1] Prueba t de *Student* para muestras independientes.
[2] Suma desde 4:0 hasta 15:1
[3] Suma desde 17:0 hasta 22:6
[4] 12:0 + 14:0 + 16:0

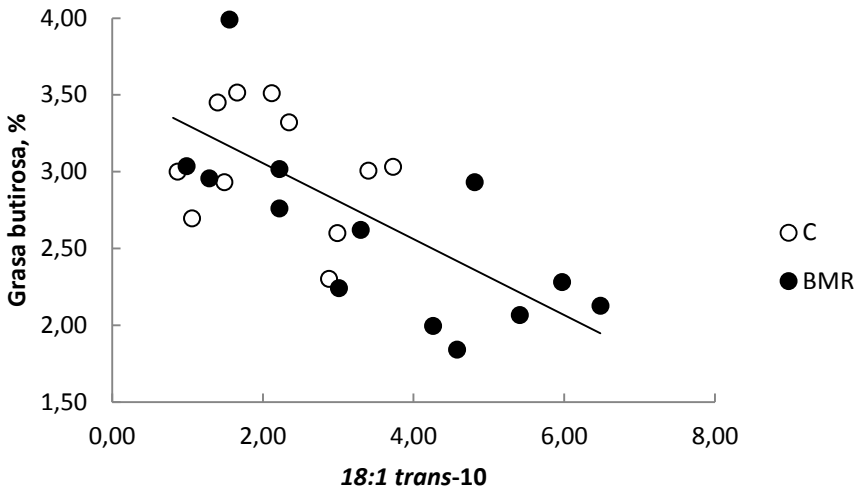

Figura 7. Relación entre las concentraciones de grasa butirosa (% de la producción de leche) y de 18:1 *trans*-10 (g/100 g de ácidos grasos totales) en la leche de vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR). Concentración de grasa butirosa= 3,55 - 0,25 × concentración de 18:1 *trans*-10 (R^2= 0,48; *P*= 0,0001).

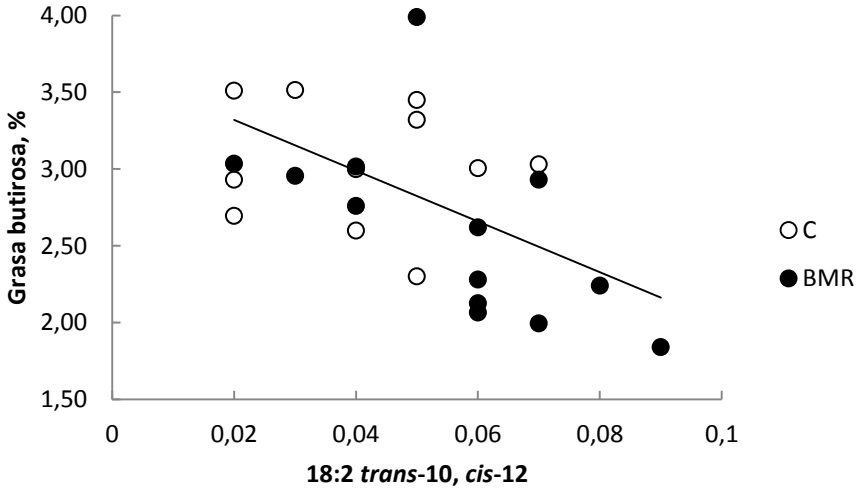

Figura 8. Relación entre las concentraciones de grasa butirosa (% de la producción de leche) y de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (g/100 g de ácidos grasos totales) en la leche de vacas en lactancia temprana alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR). Concentración de grasa butirosa= 3,65 - 16,51 × concentración de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (R^2= 0,3; *P*= 0,004).

1.6. Ganancia de peso y concentración plasmática de metabolitos y hormonas

No hubo interacción entre el ensilaje y el estado de lactancia ni para ganancia de peso ni para la concentración de metabolitos y hormonas (Tabla 16). Las vacas en lactancia avanzada tuvieron mayores ganancias de peso (1,02 vs. 0,52 kg/día), menores concentraciones de AGNE (198,84 vs. 346,55 mEq/l) y mayores de insulina (0,62 vs. 0,39 ng/ml) que las vacas en lactancia temprana. Además, las vacas en lactancia avanzada tendieron a presentar valores más elevados de urea (28,82 vs. 26,07 mg/dl) e IGF-I (193,96 vs. 157,78 ng/ml).

Las vacas de C mostraron mayores niveles de GH comparadas con las de BMR, 3,31 vs. 2,28 ng/ml (Tabla 16).

Tabla 16. Concentraciones de hormonas y metabolitos plasmáticos y ganancia de peso en vacas en lactancia temprana y avanzada alimentadas con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

	Lactancia temprana			Lactancia avanzada			*P*		
	C	BMR	EE	C	BMR	EE	E	L	E × L
GDPV, kg/día	0,44	0,59	0,11	0,98	1,06	0,14	0,362	0,0003	0,822
Glucosa, mg/dl	71,09	65,69	2,33	66,08	68,28	3,18	0,570	0,666	0,182
Urea, mg/dl	27,19	24,95	1,16	28,25	29,39	1,58	0,694	0,055	0,231
AGNE, µEq/l	350,82	342,27	31,88	194,42	203,26	43,44	0,997	0,0004	0,821
IGF-I, ng/ml	150,56	164,99	18,33	209,20	178,72	23,99	0,709	0,099	0,300
Insulina, ng/ml	0,37	0,41	0,07	0,65	0,59	0,09	0,896	0,008	0,514
GH, ng/ml	3,74	2,19	0,34	2,87	2,36	0,44	0,013	0,384	0,195

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje; L: efecto del estado de lactancia; E × L: efecto de la interacción entre E y L. GDPV: ganancia diaria de peso vacío; AGNE: ácidos grasos no esterificados; IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo uno; GH: hormona de crecimiento.

1.7. Balance energético

En lactancia temprana, el balance energético estimado a partir de la DMS *in vivo* resultó positivo en ambos tratamientos, con valores promedios de 1,30 y 1,29 Mcal de EM/día en BMR y C, respectivamente. Los consumos medios de EM excedieron a los requerimientos en un 2%. Según los requerimientos de EM, la concentración energética de las dietas de BMR y C habría sido de 2,22 y 2,24 Mcal de EM/kg de MS,

respectivamente. Esto representa 0,05 y 0,04 Mcal menos a las densidades energéticas estimadas en el punto 1.11.1 correspondiente a Materiales y Métodos.

En lactancia avanzada, asumiendo los mismos valores de DMS que en lactancia temprana, el balance energético fue de -0,16 y -1,02 Mcal de EM/día en BMR y C, respectivamente. En estos animales, la densidad energética de las dietas (Mcal de EM/kg de MS) debería haber sido de 2,28 en BMR y 2,32 en C, es decir, 0,01 y 0,04 Mcal por encima de lo estimado. No obstante, estos resultados deberían ser tomados con precaución debido a que la digestibilidad *in vivo* no fue estimada para este estado de la lactancia.

2. Experimento 2: FERMENTADORES DE DOBLE FLUJO CONTINUO

Las tasas de pasaje obtenidas en el experimento 2 resultaron muy similares a los valores fijados *a priori* de un 5%/hora para sólidos y 10%/hora para líquidos y, además, muy similares entre tratamientos. Las tasas de pasaje de sólidos promediaron un valor de 4,83%/hora (±0,09) para C y de 4,85%/hora (±0,02) para BMR. Por su parte, las tasas de pasaje de líquidos fueron de 9,69 (±0,06) y 9,72 (±0,03) %/hora para C y BMR, respectivamente.

No hubo efecto del tipo de ensilaje sobre la degradabilidad aparente de la MS, MO y almidón, arrojando valores promedios de 41,65, 27,7 y 87,75%, respectivamente (Tabla 17). Al descontar la síntesis microbiana, la degradabilidad verdadera de la MS (57,75%), MO (40,85%) y PB (68,75%) tampoco fue afectada por el ensilaje. Por el contrario, el tipo de ensilaje sí afectó la degradación de la fracción fibrosa de la dieta, siendo la degradabilidad de la FDN superior en BMR por 7,3 unidades porcentuales, con una tendencia en la degradabilidad de la FDA (P= 0,074). No obstante, la cantidad de MOVD por día fue similar entre los tratamientos y del orden de 34,32 g.

El flujo de nitrógeno (N) total fue 6% mayor con la ración BMR (Tabla 18). A pesar de ello, ninguna de las fracciones del flujo diario de N fue estadísticamente diferente entre los tratamientos (P> 0,1), ya sea en cantidades absolutas como relativas al N total. En general, la masa microbiana formó parte de la mayor cantidad del flujo de N total con un 48%, seguido por el N no amoniacal-no microbiano (39%) y por el N-NH_3 (13%).

La eficiencia de crecimiento microbiano, estimada a partir de los g de N microbiano por cada 100 g de MOVD, arrojó un valor promedio de 3% (Tabla 18) sin ser afectada por el tipo de ensilaje (P> 0,59). La eficiencia con la que los microorganismos utilizaron

el N disponible a nivel ruminal para la síntesis de su proteína (56%) tampoco resultó afectada por el ensilaje.

Tabla 17. Degradabilidad de la materia seca y componentes de las raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR) en fermentadores de doble flujo continuo.

	C	BMR	EE	E
Degradabilidad aparente, %				
MS	41,9	41,4	0,29	0,351
MO	27,8	27,6	0,39	0,708
Almidón	87,8	87,7	1,24	0,949
Degradabilidad verdadera, %				
MS	57,2	58,3	0,51	0,177
MO	40,5	41,2	0,53	0,396
PB	69,8	67,7	1,83	0,450
FDN	26,8	34,1	1,71	0,030
FDA	28,9	35,34	2,03	0,074
Cantidad de MOVD, g/día	34,0	34,6	0,45	0,369

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje (*P* valor); MS: materia seca; MO: materia orgánica; FDN: fibra en detergente neutro; FDA: fibra en detergente ácido; MOVD: materia orgánica verdaderamente degradada.

Tabla 18. Flujos de nitrógeno (N) total y de sus fracciones en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

	C	BMR	EE	E
g/día,				
N total	2,10	2,22	0,03	0,045
N-NH_3	0,28	0,26	0,02	0,568
N no amoniacal, no microbiano	0,80	0,89	0,05	0,236
N microbiano	1,02	1,06	0,04	0,467
% del N total,				
N-NH_3	13,50	12,03	1,03	0,361
N no amoniacal, no microbiano	38,01	40,06	2,12	0,525
N microbiano	48,49	47,91	1,99	0,845
Eficiencia de síntesis microbiana, %[1]	2,98	3,07	0,12	0,596
Eficiencia de utilización del N, %[2]	54,96	57,06	2,13	0,516

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje (*P* valor).[1] g de N microbiano por cada 100 g de materia orgánica verdaderamente degradada.[2] g de N microbiano por cada 100 g de N disponible (N disponible= consumo de N + N infundido con la saliva artificial – N no degradado en el fermentador o N no amoniacal, no microbiano).

No hubo interacción entre el ensilaje y la hora para la variable pH, resultando, en promedio durante todo el tiempo de medición, en 0,07 unidades más bajo en BMR que en C (Tabla 19). Además, la proporción del tiempo diario durante el cual el pH se encontró por debajo de 6 fue de un 33% (480 min/día) en BMR, mayor a lo observado en C donde dicha proporción no superó el 16% (225 min/día).

En ambos tratamientos, el pH del medio de cultivo mostró una evidente variación con la hora (Tabla 19). Puede observarse que inmediatamente después del suministro de las TMRs, el pH disminuyó marcadamente, alcanzando los valores mínimos alrededor de 4 horas después (Figura 9). A partir de este punto, el pH experimentó un pronunciado y sostenido ascenso, registrándose los valores máximos en el instante anterior al próximo suministro de las TMRs.

No hubo interacción entre ensilaje y hora, ni efecto del ensilaje, sobre la concentración ruminal de N-NH_3 (Tabla 19). A las 6 horas posteriores al suministro de las TMRs, la concentración de N-NH_3 disminuyó, en promedio, desde 15,66 a 8,42 mg/dl (Figura 10), para luego incrementar hasta el próximo suministro de ración, evidenciando un efecto de la hora de medición (Tabla 19). El patrón fue similar a la curva de pH graficada a partir de los valores registrados en el mismo momento de medición de N-NH_3 (Figura 10).

En cuanto a la concentración de AGV, la interacción entre ensilaje y hora resultó significativa solo para AGV totales (Tabla 19), los cuales alcanzaron mayores concentraciones en BMR a las 2 y 6 horas pos suministro de la TMR (Figura 11). Como puede observarse en la figura 11, la concentración de AGV totales estuvo inversamente relacionada con los valores de pH del medio ruminal registrados en el mismo momento de medición (r= -0,76; *P*= 0,004). Excepto la proporción de acetato y propionato, el resto de las mismas (butirato, valerato, caproato y ramificados) se modificó con la hora. Por otro lado, la ración BMR determinó una menor concentración de caproato (*P*< 0,02), con una tendencia en la de valerato (*P*< 0,08) y, con una mínima diferencia numérica, aunque no significativa, en la proporción de ramificados (*P*< 0,14). No se detectó efecto del ensilaje para las restantes proporciones de AGV.

Tabla 19. pH y concentración de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

				P		
	C	BMR	EE	E	H	E × H
pH	6,18	6,11	0,01	<0,0001	<0,0001	1,000
N-NH_3, mg/dl	11,45	10,28	1,20	0,497	<0,0001	0,144
AGV totales, mmol/l	93,04	108,37	1,58	<0,0001	0,002	<0,0001
Proporción, % de los AGV totales						
Acetato	57,19	58,42	1,35	0,523	0,181	0,616
Propionato	19,55	20,34	1,12	0,623	0,264	0,777
Butirato	16,10	14,99	0,92	0,398	0,008	0,830
Valerato	2,28	2,08	0,08	0,079	0,005	0,335
Caproato	1,80	1,34	0,13	0,020	0,0004	0,076
Ramificados[1]	2,97	2,76	0,10	0,140	0,0002	0,543

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje; H: efecto de las hora de medición; E × H: efecto de la interacción entre el ensilaje y la hora de medición; AGV: ácidos grasos volátiles. [1] Suma de iso-butirato e iso-valerato.

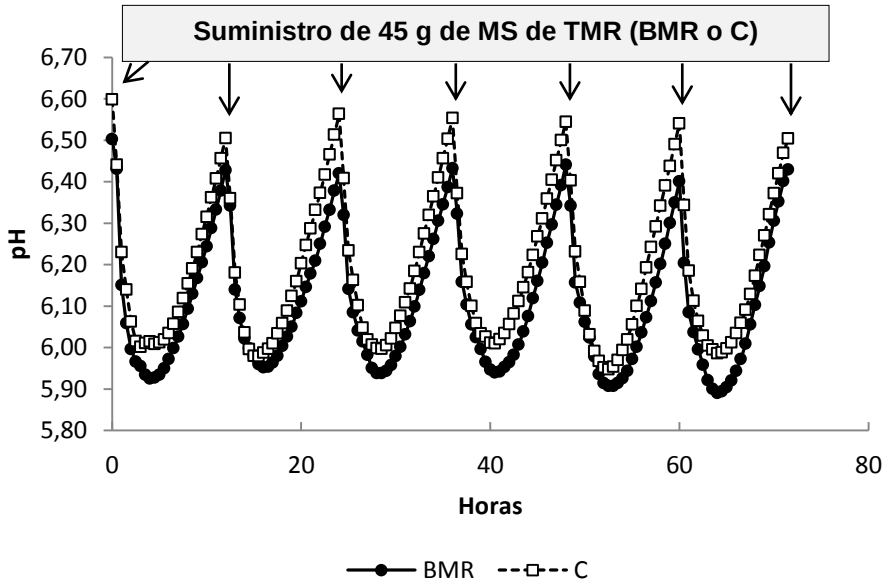

Figura 9. pH registrado durante los días 9 al 11 del período experimental en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

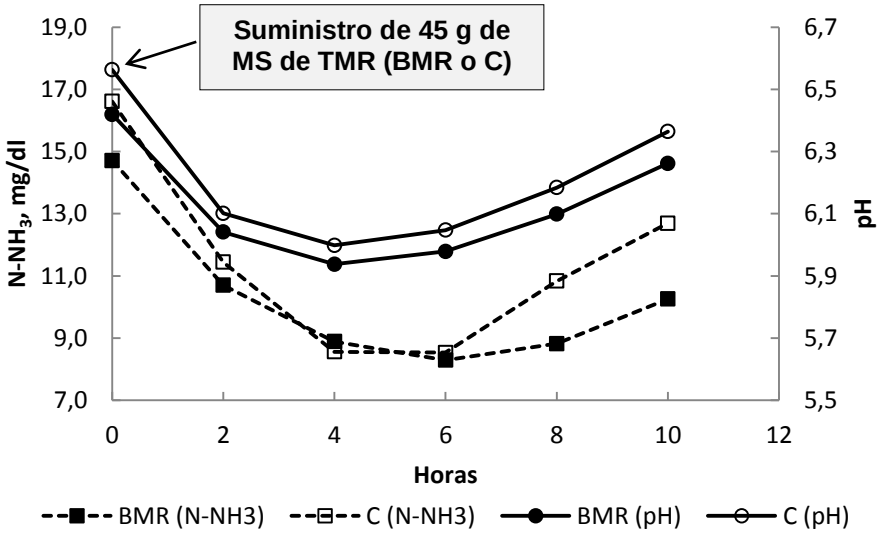

Figura 10. Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_3) y pH registrados durante el día 10 del período experimental en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

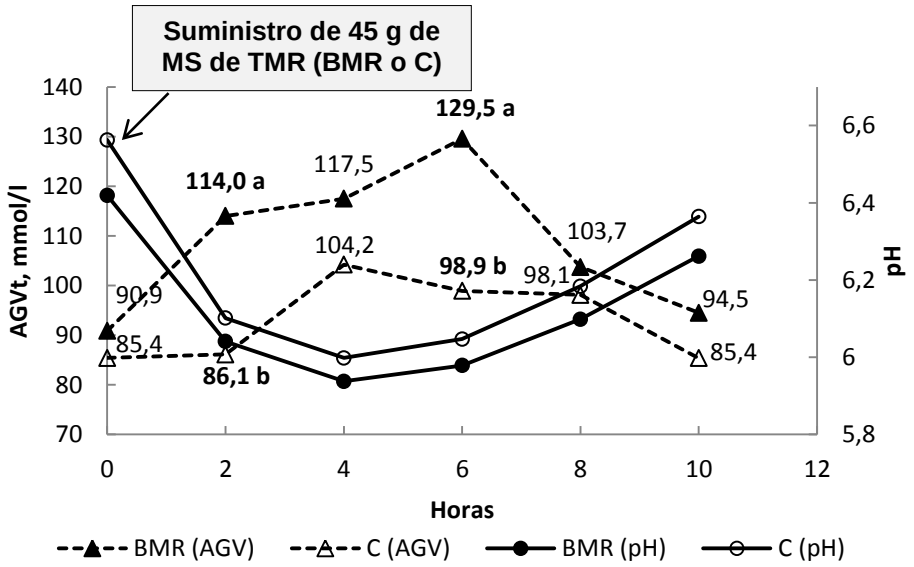

Figura 11. Concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGVt) y pH registrados durante el día 10 del período experimental en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR). LSM con distintas letras (a, b) difieren dentro de cada hora (P< 0,05).

La producción diaria de AGV no resultó afectada por el ensilaje promediando 302,85 mmol/día (Tabla 20). De este total, la mayor proporción fue de acetato (57,82%), seguido por propionato (21,27%), butirato (15,1%), ramificados (2,61%), valerato (1,87%), caproato (1,31%) y trazas de C7 (valores no presentados). Estas proporciones estuvieron altamente correlacionadas (r= 1, *P*< 0,01) con las mediciones horarias del medio ruminal presentadas en la tabla 19.

Tabla 20. Producción diaria de ácidos grasos volátiles en fermentadores de doble flujo continuo inoculados con raciones completamente mezcladas (TMR) conteniendo ensilaje de maíz convencional (C) o nervadura marrón (BMR).

	C	BMR	EE	E
Producción, mmol/día				
AGV totales	303,39	302,31	8,89	0,935
Acetato	171,95	178,26	5,12	0,424
Propionato	65,50	63,32	2,97	0,626
Butirato	47,57	43,92	3,61	0,506
Valerato	5,62	5,69	0,33	0,883
Caproato	4,41	3,52	0,42	0,193
Iso-butirato	3,03	2,78	0,78	0,830
Iso-valerato	5,18	4,81	0,33	0,474

Datos expresados como medias mínimas cuadráticas (LSM: *least square means*) con su error estándar (EE). E: efecto del ensilaje (*P* valor); AGV: ácidos grasos volátiles.

DISCUSIÓN

1. Experimento 1: RESPUESTA PRODUCTIVA EN VACAS LECHERAS EN ESTABULACIÓN

1.1. Composición química y valor nutricional de los ensilajes y de las raciones completamente mezcladas

La mayor DFDN *in vitro* del EBMR coincide con lo reportado por numerosos trabajos (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Ballard *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Ebling; Kung, 2004; Taylor; Allen, 2005a; Gehman *et al.*, 2008; Kung *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013). Esta mayor DFDN no podría atribuirse completamente a un menor contenido de lignina ya que el porcentaje de reducción de lignina en EBMR respecto a EC fue de un15%, diferencia no significativa (*P*= 0,266) y que se acerca más al valor inferior que al promedio reportado por la literatura de alrededor de 32,6% (±14,46) (Tabla 1). La estructura de la lignina, las uniones cruzadas con los polisacáridos de la pared y otras características estructurales son factores adicionales al contenido de lignina *per se* que impactan en la digestión de la pared celular (Raffrenato *et al.*, 2009; Jung, 2012). La mutación para nervadura marrón puede no afectar el contenido de lignina pero si alterar su composición química (Hatfield *et al.*, 1999). Maíces con nervadura marrón han resultado en menores unidades de lignina tipo siringil (Kuc *et al.*, 1968; Barrière *et al.*, 1994) lo que podría explicar parte de los incrementos en la digestibilidad de la fibra. La lignina tipo siringil tiene una estructura más lineal que la guaiacil y se extiende en mayor medida al interior de la pared secundaria protegiendo una alta proporción de los polisacáridos de su digestión (Jung; Allen, 1995). Sin embargo, como en el presente trabajo no se analizó la composición química y la estructura de la lignina, no puede concluirse que esta fue la causa de la mayor DFDN en el EBMR respecto al EC.

En coincidencia con la literatura sobre forrajes cosechados en estado de madurez fisiológica similar (Raffrenato *et al.*, 2009; Jung, 2012), las correlaciones entre el contenido de lignina y la DFDN *in vitro* a las 30 o las 48 horas no resultaron significativas, ya sea diferenciando por híbrido o en general (*P*> 0,19). Por lo tanto, los resultados apoyan la hipótesis de que el contenido de lignina no sería un buen estimador de la digestibilidad de la fibra en forrajes cosechados en similar estado de

desarrollo, aunque esto debería tomarse con precaución teniendo en cuenta que solo se evaluaron dos híbridos.

La distribución de partículas según la metodología de la Universidad de Pensilvania estuvo por encima de los valores recomendados para mantener una correcta rumia y un ambiente ruminal saludable (Heinrichs, 2013), sugiriendo que ambos ensilajes serían una fuente de fibra efectiva.

Los niveles de fibra en las dietas habrían sido adecuadas para favorecer un ambiente ruminal saludable. La concentración de FDN en la dieta está inversamente relacionada con el pH del medio ruminal debido a que, por un lado, la FDN de los alimentos fermenta más lentamente y es menos digestible que los carbohidratos no fibrosos (CNF) produciendo menos ácidos en el rumen y, por otro, a que la mayor cantidad de FDN de la dieta es provista por los forrajes, los cuales por su estructura física promueven la masticación y la producción de saliva que actúa como buffer (NRC, 2001). En base MS, la ración debería contener 25% de FDN y 19% de FDN provista por forraje, siempre y cuando, los CNF no superen el 44% (NRC, 2001). Las TMRs de C y BMR presentaron (base MS) 33,1 y 33,3% de FDN, 22,1 y 22,1% de FDN de los ensilajes y 42,4 y 41,4% de CNF, respectivamente. Por lo tanto, los niveles de fibra en las TMRs cubrieron las recomendaciones del NRC (2001) para mantener un ambiente ruminal adecuado.

Las TMRs de BMR y C resultaron muy similares en su composición química, lo que presenta una ventaja al momento de la evaluación del efecto del ensilaje. La densidad energética estimada para ambas TMRs fue relativamente baja para vacas lecheras en lactación, sin embargo y como se verá posteriormente, los elevados CMS alcanzados por los animales permitieron niveles de ingesta de EM acordes para sostener altas producciones de leche. No hubo diferencias en la densidad de energía entre los tratamientos debido a que la DMS *in vivo* fue muy similar en las dos raciones.

1.2. Consumo de alimento

El incremento en el CMS (+1,5 kg, Tabla 10) observado en lactancia temprana por las vacas BMR comparado con las C está en acuerdo con lo reportado en la bibliografía para vacas en similar estado de lactancia (+1,4 kg) (Rook *et al.*, 1977; Block *et al.*, 1981; Oba; Allen, 1999a, 2000a; Tine *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2012). Este mayor CMS podría deberse a la mayor DFDN *in vitro* del EBMR expresada también en una superior

DFDN *in vivo* de la TMR donde fue incluido. Diversos investigadores han sugerido que el CMS en vacas en lactancia temprana está limitado por llenado del rumen (Mertens, 1987; Dado; Allen, 1995; Allen, 1996). El mecanismo predominante sobre la regulación del consumo de alimento en vacas alrededor del pico de lactancia sería la distención física del rumen (Allen *et al.*, 2009) y, por este motivo, forrajes con mayor DFDN podrían incrementar el CMS debido a una mayor tasa de digestión y/o pasaje que disminuyen el tiempo de permanencia del alimento en el rumen (Oba; Allen, 1999b). En acuerdo con esto, Tine *et al.* (2001) sugirieron que los EBMR incrementan el CMS cuando se suministran a vacas lecheras en lactancia temprana a media, posiblemente, por una reducción de las limitaciones físicas de llenado ruminal.

En coincidencia con Greenfield *et al.* (2001), el CMS en lactancia avanzada fue similar entre las vacas de BMR y C debido, probablemente, a que en estos estados de lactancia el llenado físico del rumen no es el factor predominante sobre la regulación del consumo voluntario de alimento (Allen *et al.*, 2009). En estados avanzados de la lactancia, la regulación del consumo estaría dominado por la oxidación hepática de propionato y el suministro de ensilajes con mayor DFDN no tendría ventajas (Allen *et al.*, 2009).

El menor consumo de almidón en vacas en lactancia avanzada de BMR podría ser explicado tanto por el menor contenido de almidón del EBMR (-11%) como por el menor CMS (-0,9 kg/día) registrado en dichas vacas, resultados no significativos estadísticamente, pero que al multiplicar la concentración de almidón de la TMR por el CMS inciden sobre la ingesta diaria de este componente.

1.3. Digestibilidad *in vivo*

Otros trabajos también han reportado una mayor DFDN *in vivo* de las raciones con EBMR (Oba; Allen, 1999a; Greenfield *et al.*, 2001; Tine *et al.*, 2001; Ebling; Kung, 2004; Taylor; Allen, 2005c; Barlow *et al.*, 2012). Sin embargo, y como fue descripto en la revisión bibliográfica, en varias ocasiones la DFDN *in vivo* resultó muy similar entre dietas con EBMR y dietas con EC (Oba; Allen, 2000c; Qiu *et al.*, 2003; Gehman *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2010) o ensilaje de maíz doble propósito (Weiss; Wyatt, 2006).

La falta de diferencias en la DFDN *in vivo* entre dietas con EBMR y EC observada en otros trabajos podría deberse a los efectos negativos de un mayor CMS (Oba; Allen, 1999a; Qiu *et al.*, 2003) y/o un menor pH del medio ruminal (Oba; Allen, 2000c; Gehman *et al.*, 2008) sobre la degradabilidad de la fibra. En el caso del presente

trabajo, las posibles modificaciones (pH del medio ruminal y/o tasa de pasaje) generadas por el mayor consumo no habrían sido suficientes para afectar sustancialmente la DFDN *in vivo*. Esto también está de acuerdo con las similares diferencias entre los ensilajes y las dietas observadas para DFDN-30, DFDN-48 y la degradabilidad verdadera (fermentadores) determinadas en situaciones controladas y las diferencias observadas para la DFDN *in vivo*. Si el mayor consumo hubiese afectado la DFDN *in vivo*, se hubiese esperado una reducción o desaparición de las diferencias observadas *in vitro*.

La DMS *in vivo* no fue afectada por el ensilaje estando de acuerdo con la mayoría de los trabajos (Oba; Allen, 1999a, 2000c; Greenfield *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2003; Ebling; Kung, 2004; Taylor; Allen, 2005c; Weiss; Wyatt, 2006; Holt *et al.*, 2010; Barlow *et al.*, 2012). No obstante, debido a la relación positiva observada entre la digestibilidad *in vivo* de la MS y la FDN (Figura 6) y a la mayor DFDN *in vivo* de BMR, se esperaba que la TMR-BMR resulte en una mayor DMS. La falta de diferencias en DMS *in vivo* podría deberse a ligeras diferencias en el contenido de almidón entre las raciones. La TMR de C resultó ligeramente superior en contenido de almidón que la de BMR (+8%, Tabla 9), pudiendo haber compensado parte de su menor DFDN y equiparado los porcentajes de DMS.

1.4. Producción de leche

En el presente experimento y en acuerdo con Oba y Allen (1999a, 2000a), Tine *et al.* (2001), Cherney *et al.* (2004), Kung *et al.* (2008), Stone *et al.* (2012), Holt *et al.* (2013), las vacas en lactancia temprana alimentadas con EBMR produjeron mayores cantidades de leche. Las causas del incremento en la producción de leche podrían ser el mayor CMS y de EM (Tabla 10). Como fue mencionado en la revisión, el único estudio que evaluó EBMR en vacas lecheras estimando la partición de la energía de la dieta por estudios de calorimetría indirecta señaló que es el aumento en el CMS lo que permite aumentar la producción cuando se alimenta con estos materiales y no una mayor eficiencia energética de la ración consumida (Tine *et al.*, 2001).

Las publicaciones referentes a vacas lecheras en lactancia avanzada alimentadas con EBMR no son abundantes ni consistentes. Greenfield *et al.* (2001) no encontraron diferencias entre BMR y C, mientras que Ballard *et al.* (2001) reportaron una mayor producción en las vacas de BMR cuando compararon con dietas conteniendo un ensilaje de maíz *leafy* o un ensilaje de maíz doble propósito. La tendencia a una menor

producción de leche observada en las vacas en lactancia avanzada de BMR del presente experimento puede deberse al menor consumo de almidón y a la menor concentración de GH en plasma. Los aumentos en los niveles de GH que ocurren durante la lactancia incrementan la disponibilidad de nutrientes a la glándula mamaria y la producción de leche (Tucker, 2000). Se determinó una correlación positiva entre la producción de leche y la concentración plasmática de AGNE en las vacas de C (r= 0,90; *P*= 0,006) y una correlación negativa entre la producción de leche y el contenido de insulina en plasma en las vacas de BMR (r= -0,72; *P*= 0,067). Las vacas de C, que presentaron mayores niveles de GH circulante que las de BMR, podrían haber particionado más cantidad de nutrientes a síntesis de leche. Debido a que el CMS y EM fue similar entre las vacas en lactancia avanzada de BMR y C, los resultados sugieren que la tendencia a una mayor producción de leche en C fue, probablemente en parte, por el aporte de energía endógena. Si esto fue así, no se encuentra una explicación lógica a la diferencia en la partición de la energía entre los tratamientos cuando la única variación entre ellos fue el tipo de ensilaje incluido en la ración.

1.5. Composición química de la leche y producción de grasa y proteína

Diversos trabajos han reportado una menor concentración de grasa en leche al suministrar raciones con EBMR a vacas en lactancia temprana (Block *et al.*, 1981; Oba; Allen, 2000a; Taylor; Allen, 2005a; Holt *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2013). En algunos casos, la mayor producción de leche compensa el menor contenido de grasa y, de esta manera, los rendimientos diarios de grasa son similares entre vacas alimentadas con dietas que incluyen EBMR o EC (Oba; Allen 2000a; Holt *et al.*, 2013).

En el actual experimento, el menor tenor graso podría deberse a un efecto de dilución por la mayor producción de leche, aunque no puede descartarse una disminución en la síntesis de grasa a nivel mamario. Dos observaciones en BMR sugerirían algún grado de disminución en la síntesis de grasa butirosa: la tendencia a una menor producción diaria de grasa (-0,11 kg/día respecto a C) y la mayor concentración en la grasa de la leche de 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (+72 y 50% respecto a C). Los ácidos grasos 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12 han sido citados como inhibidores de la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Harvatine *et al.*, 2009; Shingfield *et al.*, 2010). Además, cabe señalar que ambos ácidos grasos correlacionaron negativamente con la concentración de grasa butirosa (Figuras 7 y 8).

Diversas revisiones colocan al 18:2 *trans*-10, *cis*-12 como el principal inhibidor de la síntesis de ácidos grasos a nivel mamario, mientras que el 18:1 *trans*-10 permanece más discutible pero considerado como posible candidato (Bauman; Griinari, 2001; Harvatine *et al.*, 2009; Shingfield *et al.*, 2010). De un resumen de varios trabajos, Harvatine *et al.* (2009) observaron que las mayores reducciones en producción de grasa son observadas con concentraciones de 1,5 a 2,5% de 18:1 *trans*-10 en la grasa de la leche, aunque se han encontrado mayores concentraciones con ciertas dietas experimentales. Los niveles de 18:1 *trans*-10 en BMR fueron de 3,55%, valor por encima del límite superior del rango mencionado por Harvatine *et al.* (2009). Shingfield *et al.* (2010) analizaron una serie de trabajos con bovinos que recibieron dietas con ensilaje de maíz como fuente de forraje predominante y una fuente de lípidos exógena, aceite de girasol o soja. Observaron que los valores de 18:1 *trans*-10 y de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 en la grasa de la leche variaron desde 7,22 hasta 18,62% y desde 0,024 hasta 0,096%, respectivamente. Si bien los valores de 18:1 *trans*-10 son muy superiores a los mencionados con anterioridad, los correspondientes a 18:2 *trans*-10, *cis*-12 son similares a los hallados en el experimento 1, de 0,06% en BMR y 0,04% en C.

En los párrafos siguientes se discutirá acerca de los posibles factores involucrados en el incremento de 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12 en la grasa butirosa de BMR del presente experimento.

Aquellas dietas que predisponen a bajos valores de pH del medio ruminal y/o que incluyen ácidos grasos poliinsaturados no protegidos son frecuentemente relacionadas con un aumento de isómeros *trans* con capacidad inhibitoria de la síntesis de lípidos en glándula mamaria (Bauman; Griinari, 2001). El incremento de 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12 en la grasa butirosa de BMR podría relacionarse a un menor pH del medio ruminal y a una disociación parcial de la grasa pasante incluida en la dieta. Un pH ruminal más bajo en BMR, como fue observado en el experimento 2 y en diversos trabajos con vacas lecheras (Frenchick *et al.*, 1976; Rook *et al.*, 1977; Oba; Allen, 2000a; Greenfield *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Taylor; Allen, 2005b; Gehman *et al.*, 2008), podría haber provocado una alteración de la flora y del metabolismo microbiano. Se observó que la disminución del pH incrementó la producción ruminal *in vitro* de 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12 (Fuentes *et al.*, 2009). Por otro lado, un menor pH ruminal en BMR podría asociarse con una disociación parcial de las sales cálcicas incluidas en la dieta lo que dejaría ácidos grasos poliinsaturados libres en el medio ruminal. En un estudio, el 57% de los ácidos grasos insaturados de 18 carbonos

suministrados bajo la forma de sales cálcicas fueron hidrogenados por los microorganismos ruminales, demostrando que la protección de los ácidos grasos a la biohidrogenación ruminal es incompleta (Wu *et al.*, 1991). Disminuciones del pH del medio ruminal pueden incrementar dichas hidrogenaciones al aumentar la disociación de las sales de calcio (Chilliard; Ferlay, 2004). Teniendo en cuenta que la grasa pasante incluida en las TMR del presente experimento contenía un 52% de ácido linoleico (18:2 *cis*-9, *cis*-12), la mayor concentración de *trans*-10 y *trans*-10, *cis*-12, derivados en parte de su incompleta biohidrogenación ruminal, serían indicios de una disociación de las sales cálcicas en el rumen de estas vacas.

Además, el mayor CMS de las vacas en lactancia temprana de BMR (+1,5 kg/día, Tabla 10) habría aumentado el consumo de ácidos grasos poliinsaturados (ya sea aportados por la grasa pasante o por el resto de los ingredientes dietarios) y la tasa de pasaje del alimento desde el rumen hacia duodeno (Oba; Allen, 2000c) y, así, el flujo duodenal de los ácidos grasos 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12.

La producción ruminal de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 no habría sido lo suficientemente alta como para inducir una disminución en la proporción de ácidos grasos sintetizados *de novo* (Bauman; Griinari, 2003; Shingfield; Griinari, 2007). Infusiones en abomaso de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 provocaron una disminución en la proporción de ácidos grasos sintetizados *de novo* cuando las dosis fueron de 10 (Baumgard *et al.*, 2000), 7,5 y 14 g/día (Baumgard *et al.*, 2001), pero no cuando las dosis fueron menores, del orden de 3,5 (Baumgard *et al.*, 2001), 1,25, 2,5 y 5 g/día (Peterson *et al.*, 2002).

El índice de desaturación fue superior en BMR, aunque podría haberse obtenido el resultado inverso debido a que el incremento de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 se relaciona negativamente con la actividad de la enzima Δ-9 desaturasa (Harvatine *et al.*, 2009). Sin embargo, y al igual que lo sucedido con el perfil de ácidos grasos, las cantidades producidas de 18:2 *trans*-10, *cis*-12 no habrían sido suficientes como para disminuir la actividad de la Δ-9 desaturasa (Baumgard *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2002).

La mayor producción de proteína láctea registrada en las vacas en lactancia temprana de BMR está en acuerdo con lo reportado por Oba y Allen (1999a, 2000a), Kung *et al.* (2008) y Holt *et al.* (2013) y podría deberse al mayor CMS y PB y a la mayor DFDN de la ración BMR. El mayor CMS y la mayor DFDN podrían haber incrementado la producción de proteína microbiana, reduciendo el uso de aminoácidos para gluconeogénesis y preservándolos para la síntesis de proteína láctea (Oba; Allen, 1999a). Un aumento en el CMS por mayor DFDN podría incrementar el flujo de nitrógeno microbiano al duodeno y disminuir el *turnover* microbiano en el rumen,

aumentando la producción de proteína microbiana (Oba; Allen, 2000c). Es probable que si la mayor digestibilidad de la fibra no es acompañada por un mayor CMS, la síntesis microbiana no se vea afectada, como fue demostrado en el experimento 2 con fermentadores. Por otro lado, el mayor consumo de PB por las vacas de BMR podría haber incrementado el aporte de aminoácidos a la glándula mamaria.

La concentración de urea o de nitrógeno ureico en leche es un indicador de la nutrición proteica y de la eficiencia de utilización del nitrógeno (Holt *et al.*, 2013). El mayor consumo de PB por las vacas en lactancia temprana de BMR (+0,36 kg/día) no se reflejó en una mayor concentración de urea en leche, que dado el caso contrario habría indicado una menor eficiencia en el uso del nitrógeno respecto a las vacas de C. Esto podría atribuirse a que esta mayor ingesta de proteína proveyó de más aminoácidos a la glándula mamaria, la cual fue capaz de mantener la síntesis diaria de proteína ante aumentos en la producción de leche, incrementando en 80 g la producción de proteína láctea comparado con las vacas de C.

La menor producción de grasa butirosa hallada en las vacas en lactancia avanzada de BMR no está en acuerdo con Greenfield *et al.* (2001) quienes no encontraron diferencias en animales en similar estado de lactancia. Probablemente, la teoría de la biohidrogenación pueda explicarlo, aunque no se cuenta con el perfil de ácidos grasos de la leche de estas vacas. Lo observado en lactancia temprana podría apoyar esta hipótesis. En este estado de lactancia, a un mismo consumo de PB, la eficiencia de utilización del nitrógeno no habría sido afectada por el ensilaje debido a la similar concentración de urea en leche hallada entre BMR y C (Holt *et al.*, 2013).

1.6. Ganancia de peso

Leves incrementos en las ganancias de peso, sin alcanzar significancia estadística, también han sido hallados por otros autores al suministrar dietas con EBMR (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Kung *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2010; Barlow *et al.*, 2012). Trabajos anteriores han reportado incrementos significativos (Frenchick *et al.*, 1976; Rook *et al.*, 1977; Sommerfeldt *et al.*, 1979; Block *et al.*, 1981), mientras que otros observaron que con EBMR las pérdidas de peso fueron ligeramente menores que con EC (Rook *et al.*, 1981; Weiss; Wyatt, 2006; Holt *et al.,* 2013). Tal vez, períodos experimentales demasiado cortos y una alta variabilidad en los datos no permiten encontrar diferencias en esta variable y arribar a conclusiones más claras.

1.7. Concentración plasmática de metabolitos y hormonas

Es escasa la bibliografía que informa sobre el perfil hormonal y metabólico de vacas alimentadas con EBMR.

En lactancia avanzada, el mayor nivel de GH en las vacas de C está de acuerdo con la tendencia a una mayor producción de leche. Durante la lactancia, la GH incrementa la disponibilidad de nutrientes a la glándula mamaria (Tucker, 2000), por lo que es de esperar que un aumento en la concentración plasmática de esta hormona se acompañe de un incremento en la producción láctea.

Sin embargo, en lactancia temprana, la concentración de GH también fue superior en las vacas de C, mientras que la producción de leche fue menor que en BMR. Posiblemente, el menor consumo de energía y proteína de estas vacas condujo a un menor *feedback* negativo sobre la adenohipófisis, incrementándose la síntesis y liberación de GH (Lucy *et al.*, 2001; Lucy, 2004). La concentración plasmática de IGF-I no fue menor en C, lo cual permitiría extraer conclusiones más claras al respecto. La GH se une a receptores en el hígado y estimula la síntesis y secreción de IGF-I (Tucker, 2000). Una inferior nutrición energética y proteica puede afectar negativamente la expresión de estos receptores hepáticos para GH, traduciéndose en menor secreción de IGF-I, disminución de las señales inhibitorias en adenohipófisis y aumento en los niveles plasmáticos de GH (Lucy *et al.*, 2001).

Los resultados de glucemia no están en acuerdo con lo observado por Castro *et al.* (2010) quienes obtuvieron valores mayores en las vacas que recibieron la ración con EBMR. En ese estudio, las vacas BMR tuvieron un mayor CMS que las vacas C lo cual podría haber incrementado la disponibilidad de glucosa y así la glucemia (Castro *et al.*, 2010). En el presente experimento, las vacas BMR también tuvieron un mayor CMS, pero a diferencia de Castro *et al.* (2010), la producción fue mayor a las vacas de C, lo cual habría aumentado la demanda de glucosa y resultado en niveles de glucemia similar entre los tratamientos.

Las concentraciones de AGNE no fueron afectadas por el ensilaje, resultados que se asemejan a los publicados por Stone *et al.* (2012). Como era de esperar, independientemente de los ensilajes suministrados, las vacas en lactancia avanzada se encontraron en un estado homeorético diferente y particionaron mayor cantidad de nutrientes a reservas corporales que las de lactancia temprana. Esto puede ser demostrado por las menores concentraciones de AGNE y los mayores niveles de insulina y ganancias de peso registradas en las vacas en lactancia avanzada.

2. Experimento 2: FERMENTADORES DE DOBLE FLUJO CONTINUO

La mayoría de los trabajos que evaluaron el efecto de los EBMR sobre variables ruminales han empleado vacas fistuladas en rumen y/o duodeno. No se han encontrado trabajos que lo hayan hecho mediante el uso de fermentadores de doble flujo continuo. Por tal motivo, toda la discusión del experimento 2 estará basada en los resultados obtenidos con animales fistulados y, en el caso particular de la fracción fibrosa (FDN y FDA), también se cuenta con evaluaciones de digestibilidad de los ensilajes a través de otras metodologías de laboratorio.

2.1. Degradabilidad de la materia seca y de sus componentes

Los valores obtenidos de degradabilidad de la MS, MO y FDN se asemejan a los publicados en la literatura de trabajos que evaluaron dietas para vacas lecheras con fermentadores de doble flujo continuo (Calsamiglia *et al.*, 2002; Cerrato-Sánchez *et al.*, 2007a, 2007b; Fuentes *et al.*, 2009).

En coincidencia con lo hallado en el presente experimento, no existiría un efecto del EBMR sobre la degradabilidad verdadera de la MS y de la MO (Greenfield *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2003; Taylor; Allen, 2005c). Greenfield *et al.* (2001) observaron una mayor degradabilidad aparente de la MS y de la MO en BMR, pero no obtuvieron diferencias cuando ajustaron por la biomasa microbiana para obtener las respectivas degradabilidades verdaderas. Oba y Allen (2000b) obtuvieron una menor degradabilidad aparente de la MO en BMR, pero la degradabilidad verdadera resultó depender del contenido de FDN en la dieta. Cuando la dieta tuvo un 29% de FDN, la degradabilidad verdadera de la MO fue menor con EBMR, pero no se diferenció cuando el contenido fue del 38% (Oba; Allen, 2000b).

En cuanto a la degradabilidad verdadera la PB, los resultados están de acuerdo con lo reportado por Qiu *et al.* (2003) quienes tampoco han encontrado diferencias entre dietas conteniendo EBMR o EC.

La mayor degradabilidad de la fibra de la ración BMR resultó en el mismo sentido a lo reportado por otros autores, los cuales, en su mayoría, evaluaron dicha variable en los ensilajes y mediante técnicas *in vitro* según Goering y Van Soest (1970) o mediante la metodología “Daisy ANKOM” (Oba; Allen, 1999a, 2000a; Balard *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Ebling; Kung, 2004; Taylor; Allen, 2005c; Weiss; Wyatt, 2006; Gehman *et al.*, 2008; Kung *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2012; Holt

et al., 2013). Si se analizan los trabajos que emplearon animales fistulados puede observarse que algunas veces la degradabilidad de la FDN fue superior en las vacas que recibieron la ración con EBMR (Greenfield *et al.*, 2001), aunque en varias ocasiones no se obtuvieron diferencias de aquellas alimentados con la ración conteniendo EC (Oba; Allen, 2000b; Qiu *et al.*, 2003; Taylor; Allen, 2005c). De todos modos, hay que tener presente que en estos últimos trabajos el incremento en el CMS pudo disminuir la degradabilidad ruminal de la fibra, lo que no quiere decir que la cantidad de FDN degradable por día fue menor. Si se comparan los resultados de degradabilidad o digestibilidad de la FDN obtenidos en los experimentos 1 y 2 del presente trabajo puede observarse que, la magnitud en que se diferenciaron las raciones o los ensilajes fue muy similar, alrededor de 6-7 unidades porcentuales a favor de la ración BMR o del EBMR, ya sea cuando se evaluó la degradabilidad y la digestibilidad de las TMRs *in vitro* en fermentadores (Tabla 17) o *in vivo* en vacas lecheras (Tabla 11), como cuando se determinó la digestibilidad de los ensilajes *in vitro* mediante la metodología “Daisy ANKOM” (Tabla 6).

En coincidencia con Taylor y Allen (2005c) que compararon dos raciones con EBMR donde variaron el tipo de grano de maíz (endosperma harinoso o vítreo), el menor pH del medio ruminal del tratamiento BMR no habría afectado a la degradación de la fibra. Firkins (2012) sugiere que el tiempo durante el cual el pH permanece por debajo de 5,8 es uno de los criterios más relacionados con la digestibilidad de la fibra, valor nunca alcanzado en este experimento por ninguno de los tratamientos. También se calculó el tiempo que el pH estuvo por debajo de 6,0; valor donde Mouriño *et al.* (2001) hallaron que la tasa de digestión de la celulosa se redujo significativamente. Se encontró que el pH del medio ruminal permaneció, aproximadamente, el doble de tiempo por debajo de 6,0 cuando se suministró la ración con EBMR respecto a la ración con EC. Aun así, la degradabilidad de la FDN no fue afectada, o en el caso de haber existido algún grado de inhibición, el efecto del pH no fue de tal magnitud como para suprimir la ventaja del EBMR sobre la DFDN. Posiblemente, valores de pH por encima de 6,0 en el momento en que se suministró la ración y en los minutos inmediatamente posteriores puedan explicar la razón por la cual el pH no afectó negativamente a la degradabilidad de la FDN en BMR (Mouriño *et al.*, 2001). Mediante una serie de experimentos *in vitro*, Mouriño *et al.* (2001) propusieron un modelo para la digestión de la celulosa donde el pH inicial, es decir, aquel registrado en el momento del suministro de la ración y durante el cual se comienza a establecer la fermentación de la celulosa, sería tanto o más importante que la fracción de tiempo que el pH

permanece por debajo de un valor crítico. En dicho modelo, los autores plantean que altos niveles de pH al momento del suministro de la ración (pH inicial mayor a 6,0) favorecerían los eventos tempranos y críticos de los procesos celulolíticos, esto es, la adhesión inicial entre las bacterias y la celulosa y la subsecuente formación del glicocálix sobre la superficie de la fibra. En el presente experimento, los valores de pH inicial siempre se encontraron por encima de 6,0 en ambos tratamientos (Figura 9). En el caso de BMR dichos valores fueron mayores a 6,4. Esto puede explicar el motivo por el cual, el tratamiento BMR resultó en mayor degradabilidad de la FDN a pesar de presentar menor pH que C.

En apoyo a los resultados discutidos en el párrafo precedente, Calsamiglia *et al.* (2002) trabajando con fermentadores de doble flujo continuo observaron que la digestión de la fibra era menor si el pH del medio ruminal era mantenido constante a 5,7 respecto a 6,4. Sin embargo, la digestión no se afectaba si el pH permanecía temporariamente por debajo de 6,4 (aproximadamente unas 8 horas al día). Especularon que los microorganismos celulolíticos pueden soportar niveles de pH bajos, siempre y cuando, el pH se recupere y permanezca relativamente alto durante un tiempo prudencial que permita la recuperación de la población microbiana. La inhibición por completo de la digestión de la fibra solo ocurriría cuando el pH disminuye por debajo de 5,3 debido a la pérdida de la unión entre bacterias y partículas de alimento, o directamente, debido a la lisis de los microorganismos (Mouriño *et al.*, 2001).

Algunos trabajos reportaron un cambio en el sitio de digestión del almidón cuando incluyeron EBMR en raciones de vacas lecheras, desde el rumen hacia el intestino delgado (Oba; Allen, 2000c; Greenfield *et al.*, 2001). Una menor degradabilidad ruminal del almidón y un incremento en la cantidad digerido en duodeno podría aumentar la cantidad de EM aportada por la ración como resultado de una disminución de las pérdidas por fermentación y de una mayor absorción de glucosa, dando otra posible explicación al aumento de producción de leche que se obtiene con los EBMR (Oba; Allen,2000c). La disminución en la cantidad de almidón degradado ruminalmente ha sido atribuida a una mayor tasa de pasaje, a una menor tasa de degradabilidad del almidón del EBMR o a ambos factores (Oba; Allen,2000c; Greenfield *et al.*, 2001). En el presente experimento, las tasas de pasaje fueron controladas y mantenidas al mismo nivel entre tratamientos y la degradabilidad del almidón no fue afectada por el ensilaje (87,7 vs. 87,82%, $P>$ 0,9 en BMR y C, respectivamente) estando de acuerdo con Taylor y Allen (2005c) quienes no

observaron diferencias en el sitio de digestión cuando incluyeron EBMR en raciones para vacas lecheras. Quizá una mayor tasa de pasaje sea el principal factor que explica los cambios de sitio de digestión observados por otros investigadores.

La alta degradabilidad del almidón en ambos tratamientos, en promedio superior al 87%, indicaría que se trató de un almidón altamente disponible para la fermentación microbiana. Estos resultados son razonables teniendo en cuenta que el mayor aporte de almidón lo hizo el ensilaje y el balanceado comercial (55 y 45% del almidón total de la TMR, respectivamente), siendo ambos ingredientes fuentes de almidón altamente fermentable.

2.2. Flujos de nitrógeno y síntesis microbiana

El mayor flujo de N total en BMR podría deberse al mayor contenido de PB del EBMR. La cantidad de ensilaje inoculado en los fermentadores fue estimativamente de 45,27 g de MS/día (90 g de MS/día de TMR con una proporción de ensilaje del 50,3% de la MS). Considerando que el contenido de N (%PB / 6,25), fue 0,19 unidades % más alto en EBMR respecto a EC (Tabla 6), la TMR de BMR habría aportado 0,09 g/día más de N que la TMR de C. Esto podría asociarse a los 0,12 g/día más de N total hallado en los efluentes de BMR. Esta diferencia en el flujo de N estuvo representada principalmente por el N no amoniacal-no microbiano (11% mayor en BMR) y en menor proporción por el N microbiano (4% mayor en BMR), pero no por el $N\text{-}NH_3$ (7% menor en BMR).

Similar a lo hallado en el presente experimento, otros trabajos tampoco detectaron un efecto del ensilaje sobre la síntesis de N microbiano (Taylor; Allen, 2005b; Gehman *et al.*, 2008) y la eficiencia de crecimiento microbiano (Qiu *et al.*, 2003; Taylor; Allen, 2005b). La concentración promedio de $N\text{-}NH_3$ en el líquido ruminal de ambos tratamientos fue de 10,87 mg/dl, indicando que el suministro de N al medio de fermentación fue adecuado y no habría afectado a la eficiencia de crecimiento de los microorganismos. Concentraciones por encima de 5 mg/dl no limitarían dicha eficiencia (Nolan; Dobos, 2005).

En el presente experimento, de la misma manera que en los trabajos de Taylor y Allen (2005b) y Oba y Allen (2000c), el menor pH del medio ruminal de BMR no habría afectado a la eficiencia de crecimiento microbiano. Un pH ruminal bajo puede afectar negativamente a la eficiencia de crecimiento microbiano ya que, el incremento de hidrogeniones en el medio ruminal aumenta la cantidad de energía requerida por los

microorganismos para mantener el balance de iones a través de su membrana celular, lo que eleva sus requerimientos de mantenimiento (Taylor; Allen, 2005b). Oba y Allen (2000c) reportaron que a pesar de un pH del medio ruminal menor, el tratamiento BMR presentó mayor eficiencia de crecimiento microbiano, posiblemente debido a que la mayor tasa de pasaje ruminal redujo el *turnover* de bacterias y diluyó los efectos negativos del pH. Es decir, al aumentar la tasa de pasaje, las bacterias son removidas del rumen antes de que ocurra su lisis, ya sea por protozoos o por su propia autolisis, de manera que disminuye el *turnover*, pudiéndose incrementar el flujo y la eficiencia de síntesis de N microbiano (Wells; Russell, 1996). Además, altas tasas de pasaje permitirían cierta selección de especies microbianas con mayores tasas de crecimiento, una mayor proporción de bacterias en la fase exponencial de crecimiento y una dilución de los costos de mantenimiento de los microorganismos (Bach *et al.*, 2005). Contrariamente a Oba y Allen (2000c), en Greenfield *et al.* (2001) el menor pH del medio ruminal de BMR pudo haber reducido la eficiencia de crecimiento microbiano cuando ni el CMS, y probablemente la tasa de pasaje, fueron afectadas por el ensilaje. Taylor y Allen (2005b) hipotetizaron que el potencial de un EBMR para incrementar la eficiencia de crecimiento microbiano depende del aumento de la tasa de pasaje ruminal relativo a los efectos negativos del menor pH. Sin embargo, contrario a su hipótesis, estos autores observaron que las tasas de pasaje fueron iguales entre animales alimentados con EBMR y EC (Taylor; Allen, 2005c) y, aunque el pH fue más bajo en los primeros, las eficiencias de síntesis no difirieron con el ensilaje (Taylor; Allen, 2005b). El presente experimento con fermentadores permitió establecer iguales CMS y tasas de pasaje entre los tratamientos, de modo que no hubo un efecto diferencial de estas variables sobre el crecimiento microbiano y, pese al pH más bajo de BMR, la eficiencia de crecimiento microbiano no fue afectada, resultados que apoyan a los reportados por Taylor y Allen (2005b). Experimentos con fermentadores de doble flujo continuo que estudiaron el efecto del pH sobre la eficiencia de crecimiento microbiano apoyan los resultados del experimento 2 ya que, aparentemente, la eficiencia de crecimiento solo disminuiría cuando el pH disminuye por debajo de 5,5 (Hoover; Miller, 1992 citado por Calsamiglia *et al.*, 2002; Calsamiglia *et al.*, 2002; Cerrato-Sánchez *et al.*, 2007, 2007b), valores de pH no registrados en el presente trabajo. Por último, un metanálisis de resultados obtenidos de experimentos *in vivo* no encontró relación alguna entre la eficiencia de crecimiento microbiano y el pH del medio ruminal (Bach *et al.*, 2005), por lo que habría que reconsiderar la relación

entre estas dos variables en situaciones prácticas donde el pH del medio ruminal se mantenga dentro de los rangos fisiológicos.

2.3. Concentración y perfil de ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV en el rumen es producto del balance entre la tasa de producción y la tasa de pérdida, esta última referida fundamentalmente a la absorción de AGV por el epitelio ruminal y al pasaje de estos hacia el tracto digestivo posterior (France; Dijkstra, 2005). En el caso de los fermentadores de doble flujo continuo, la única pérdida sería por pasaje. Como lo muestra la figura 11, la concentración de AGV incrementó luego del suministro de la ración, probablemente porque la tasa de producción superó a la tasa de pasaje, y disminuyó tiempo después cuando ocurrió el proceso inverso. Las concentraciones de AGV totales en el medio ruminal pueden rondar entre 30 y 200 mmol/l, aunque lo más normal es hallar valores entre 70 y 130 mmol/l (France; Dijkstra, 2005). Los resultados del presente experimento estarían de acuerdo con estos valores reportados por la literatura. Observando la evolución de la concentración de AGV en las horas (Figura 11) pueden verse concentraciones de entre 85,4 y 104,2 mmol/l para C, y de 90,9 a 129,5 mmol/l para BMR.

La concentración más alta de AGV en BMR respecto a C en las horas posteriores al suministro de las raciones (114 vs. 86,1 mmol/l y 129,5 vs. 98,9 mmol/l a la hora 2 y 6, respectivamente) se debería a una mayor cantidad de sustrato fermentado, atribuible a la más alta degradabilidad de la FDN. Esto está de acuerdo a lo hallado por Oba y Allen (2000a) y Taylor y Allen (2005b), aunque en varios trabajos no se han obtenido diferencias en las concentraciones de AGV totales al suministrar dietas con EBMR o EC (Greenfield *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2003; Cherney *et al.*, 2004; Weiss; Wyatt, 2006; Gehman *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2013). No obstante, debería considerarse que los trabajos citados hicieron las mediciones a partir de vacas fistuladas, donde no solo la producción y el pasaje de AGV hacia el tracto posterior determinan la concentración de estos compuestos en el medio ruminal, sino que también entra en juego la absorción de AGV a través del epitelio del rumen, dificultando las comparaciones con los fermentadores de doble flujo continuo.

Este incremento en la concentración de AGV no estuvo acompañado de una mayor cantidad de MOVD. De todos modos, la eficiencia con la que los microorganismos ruminales fermentan la MO del alimento ingerido puede llevar a que dos dietas con similar degradabilidad resulten en diferentes producciones de AGV (Aschenbach *et al.*,

2011). Sin embargo, dicha eficiencia estimada como el cociente entre la producción diaria de AGV totales y la cantidad de MOVD por día (8,73 vs. 8,93 mmol de AGV totales/g de MOVD para BMR y C, respectivamente) tampoco resultó diferente (*P*= 0,645; datos no mostrados), siendo la mayor degradabilidad de la FDN la única explicación al incremento de AGV observado en BMR. Calsamiglia *et al.* (2002) emplearon fermentadores de doble flujo continuo para evaluar diferentes condiciones de ambiente ruminal y reportaron mayor degradabilidad de la FDN y FDA y mayor concentración de AGV totales, aunque sin diferencias en degradabilidad verdadera de la MS y MO, al igual que el presente experimento.

Es inconsistente el efecto del tipo de ensilaje (EBMR o EC) sobre las proporciones molares de cada AGV en particular. Los resultados del presente experimento coinciden parcialmente con Weiss y Wyatt (2006), Holt *et al.* (2010) y Holt *et al.* (2013) quienes no hallaron diferencias en ninguna de las proporciones de AGV.

La proporción molar de valerato tendió a ser menor en BMR (-9%, *P*= 0,079; Tabla 19) y podría deberse a un mayor consumo de este AGV por los microorganismos ruminales. Las bacterias que digieren a la fibra requieren para su crecimiento de ciertos metabolitos que le brinda la fermentación ruminal y, el valerato es uno de ellos (Van Soest, 1994). Por lo tanto, es de esperar que debido a la mayor degradabilidad de la FDN de la ración BMR, la masa de bacterias celulolíticas haya sido superior y/o demandado mayores cantidades de valerato llevando a una menor concentración respecto a C.

Por otro lado, la ración de C aportó alrededor de 1,38 g/día más de almidón que la de BMR debido al contenido más elevado de almidón del EC (+13%). Este mayor suministro de almidón, asociado posiblemente a un incremento en la producción de lactato, puede asociarse a las más altas proporciones de valerato (Nagaraja; Titgemeyer, 2007; Bramley *et al.*, 2008; Lean *et al.*, 2013) y caproato (Nagaraja; Titgemeyer, 2007) medidas en el medio ruminal de C respecto al de BMR. En el rumen, el L-lactato es metabolizado a propionato vía acrilato, y el D-lactato es convertido a piruvato por una D-láctico deshidrogenasa independiente de NAD, o a L-lactato por una lactato racemasa (Nagaraja; Titgemeyer, 2007). El piruvato producido desde el D-lactato sería metabolizado a acetato, butirato, valerato o caproato, produciendo ATP (Nagaraja; Titgemeyer, 2007). Normalmente, el valerato se encuentra en muy bajas concentraciones en el rumen, siendo su principal productor la bacteria *Megasphaera elsdenii* que utiliza entre el 60 y 95% del lactato producido en el rumen para convertirlo en su mayoría a valerato (Bramley *et al.*, 2008). Podría ser de

interés que en estudios futuros se considere no solo la proporción de los más renombrados AGV (acetato, propionato y butirato), sino también, la concentración de otros ácidos grasos producidos en menor cuantía y su relación con el pH del medio ruminal y desempeño productivo de vacas lecheras, para establecer otros indicadores de una adecuada fermentación ruminal.

Debido a la mayor degradabilidad de la fibra y al menor pH del medio ruminal registrados en el tratamiento BMR, la proporción de ramificados podría haber resultado menor en este tratamiento. Por un lado, estos AGV son utilizados predominantemente por las bacterias celulolíticas como sustratos para su crecimiento y proliferación (Russell *et al.*, 1992; Van Soest, 1994) y, al igual que lo desarrollado para valerato, la población y actividad de estas bacterias podría haber sido mayor en BMR, aumentando los requerimientos de ácidos ramificados comparado con C. Por el otro, los aminoácidos ramificados son los precursores de los AGV ramificados y pH bajos disminuyen la proteólisis y, por ende, la disponibilidad ruminal de estos aminoácidos (Bach *et al.*, 2005). Sin embargo, y a pesar de que la proporción de AGV ramificados fue 7% menor en BMR respecto a C (2,76 vs. 2,97%, respectivamente; Tabla 19), dicha diferencia no alcanzó significancia estadística (*P*= 0,14).

Toda la bibliografía referente a EBMR reporta concentraciones de AGV por litro de líquido ruminal o en porcentaje de los AGV totales, pero hasta entonces, parece que ningún trabajo informa producciones diarias de AGV (mmol/día). En el presente experimento, debido a las mayores concentraciones de AGV totales registradas en determinadas horas pos suministro de la ración BMR, se esperaba encontrar mayores producciones diarias de AGV en BMR, pero no fue así (Tabla 20). Hay que tener presente que la medición de la concentración de AGV en las sucesivas horas pos alimentación fue realizada directamente del filtrado ruminal del frasco de fermentación durante el segundo día de muestreo. Por su parte, las producciones diarias de AGV fueron estimadas a través de la cuantificación de AGV en un pool de efluentes correspondiente a tres días de muestreo, multiplicando luego dichas concentraciones por los litros de efluentes diarios. Esto lleva a asumir que lo ocurrido al cabo de los tres días en los efluentes fue similar a lo acontecido durante el segundo día de muestreo en el frasco de fermentación. Por otro lado, la temperatura de los frascos de recolección de efluentes pudo no haber sido lo suficientemente baja como para inhibir a la actividad microbiana y, por ende, la fermentación de una restante FDN potencialmente digestible continuó en C; mientras que en BMR, producto de una fibra más degradable, el resto de FDN potencialmente digestible era escaso como para

seguir fermentando. Otra explicación sería que la diferencia en producción de AGV totales a la hora 2 y 6 no fue de tal magnitud como para expresarse en una diferencia considerable al cabo del día. No obstante, las asociaciones entre las curvas de pH y concentración de AGV totales (Figura 11), el menor pH (Tabla 19) y la mayor degradabilidad de la fracción fibrosa de BMR (Tabla 17) serían elementos que apoyan a una mayor producción de ácidos derivados de la fermentación cuando se suministró la ración con EBMR, quedando dudas respecto a lo ocurrido con la estimación de la producción diaria de AGV.

2.4. pH del medio de fermentación

El menor pH registrado en el medio de fermentación al suministrar la dieta con EBMR respecto a la dieta con EC está de acuerdo con diversos trabajos realizados con vacas lecheras (Frenchick *et al.*, 1976; Rook *et al.*, 1977; Oba; Allen, 2000a; Greenfield *et al.*, 2001; Cherney *et al.*, 2004; Taylor; Allen, 2005b; Gehman *et al.*, 2008). De manera similar a Gehman *et al.*(2008), este pH más bajo en el tratamiento BMR se explicaría por el incremento en la concentración de compuestos derivados de la fermentación (AGV totales), asociado a la mayor degradación de la fracción fibrosa de la ración. La producción de 1 mol de AGV está asociada a la liberación de 1 mol de H^+ (Aschenbach *et al.*, 2011). Por lo tanto, es esperable una mayor concentración de H^+ en el medio de fermentación de BMR ante la mayor producción de AGV, explicando el menor pH. Un metanálisis mostró que el consumo de forrajes con mayor DFDN se relacionó con un pH del medio ruminal más bajo que el consumo de forrajes con menor DFDN (Oba; Allen, 1999b).

El hallazgo del menor pH al evaluar el EBMR en fermentadores de doble flujo apoya el supuesto de un menor pH del medio ruminal en las vacas de BMR del experimento 1. Se especuló que un menor pH del medio ruminal en las vacas que recibieron la TMR con el EBMR pudo inducir a una disociación parcial de las sales cálcicas de ácidos grasos poliinsaturados y alterado el metabolismo microbiano como para incrementar el flujo duodenal de 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12, metabolitos relacionados con la merma en la síntesis de ácidos grasos en la glándula mamaria. Fuentes *et al.* (2009) demostraron mediante el uso de fermentadores de doble flujo continuo que pH bajos incrementaron la producción ruminal de 18:1 *trans*-10 y 18:2 *trans*-10, *cis*-12.

CONCLUSIONES

Los resultados productivos sugieren una respuesta diferencial entre estados de lactancia.

En lactancia temprana, la mayor digestibilidad *in vitro* de la FDN del EBMR resultó consistente con la mayor digestibilidad *in vivo* de la FDN de la ración donde fue incluido, lo que resulta a su vez coherente con el mayor consumo de MS, energía y proteína observados y con la mayor producción de leche y proteína láctea.

En vacas en lactancia temprana alimentadas con el EBMR, la concentración de grasa butirosa resultó menor, lo que pudo estar asociado a un efecto dilución y/o a la mayor producción de ácidos grasos inhibidores de la lipogénesis mamaria como el 18:1 *trans*-10 y el 18:2 *trans*-10, *cis*-12.

En lactancia avanzada, la tendencia a una menor producción de leche con el EBMR podría explicarse por el menor consumo de almidón y la menor concentración de hormona de crecimiento.

El perfil metabólico y las ganancias de peso no fueron afectados por la mayor digestibilidad de la FDN del EBMR, aspectos que deberían evaluarse en experimentos a largo plazo.

El menor pH del medio ruminal observado *in vitro* con la ración conteniendo al EBMR pudo estar asociado con la mayor degradabilidad de la FDN y concentración de ácidos grasos volátiles y con el incremento en la producción *in vivo* de ácidos grasos de cadena larga inhibidores de la lipogénesis mamaria.

A pesar de la mayor degradabilidad de la FDN de la ración conteniendo al EBMR, la producción de proteína microbiana *in vitro* no fue incrementada.

La utilización de EBMR en vacas en confinamiento sería una estrategia nutricional adecuada en vacas en inicio de lactancia a fines de incrementar el consumo voluntario y la producción láctea, cuyos hipotéticos efectos residuales merecerían evaluarse en experimentos de lactancia completa.

Los factores asociados a la caída en el tenor graso de la leche y su prevención más las ventajas de utilización de estos híbridos en suplementación de vacas en sistemas de alimentación pastoril merecen ser estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

ADESOGAN, A.T. 2008. Recent advances in bacterial silage inoculant technology. Proc. 19th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida, EE.UU., enero 2008.

Agricultural and Food Research Council. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford, UK.

ALLEN, M.S. 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. J. Anim. Sci. 74:3063-3075.

ALLEN, M.S.; BRADFORD, B.J.; OBA, M. 2009. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. J. Anim. Sci. 87:3317-3334.

ANDRADE, F.H.; AGUIRREZÁBAL, L.A.N.; RIZZALLI, R.H. 2009. Crecimiento y rendimiento comparados. En: Andrade, F.H.; Sadras, V.O. (eds.) Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. 3ra ed., E.E.A. Balcarce INTA – FCA, UNMdP. Balcarce, Argentina. pp. 41-67.

AOAC International (formerly the Association of Official Analyitical Chemist´s). 1990. Official Methods of Analysis. Arlington, VA: AOAC International. No 942.05.

AOCS (American Oil Chemists' Society). 2004. Sampling and analysis of vegetable oil source materials. Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. Procedure AM 5-04.

ASCHENBACH, J.R.; PENNER, G.B.; STUMPFF, F.; GABEL, G. 2011. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. J. Anim. Sci. 89:1092-1107.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 88:E9-E21.

BAL, M.A.; SHAVER, R.D.; SHINNERS, K.J.; COORS, J.G.; LAUER, J.G.; STRAUB, R.J.; KOEGEL, R.G. 2000. Stage of maturity, processing, and hybrid effects on ruminant in situ disappearance of whole-plant corn silage. Anim. Feed Sci. Tech. 86:83-94.

BALLARD, C.S.; THOMAS, E.D.; TSANG, D.S.; MANDEBVU, P.; SNIFFEN, C.J.; ENDRES, M.I.; CARTER, M.P. 2001. Effect of corn silage hybrid on dry matter yield, nutrient composition, in vitro digestion, intake by dairy heifers, and milk production by dairy cows. J. Dairy Sci. 84:442-452.

BARLOW, J.S.; BERNARD, J.K.; MULLIS, N.A. 2012. Production response to corn silage produced from normal, brown midrib, or waxy corn hybrids. J. Dairy Sci. 95:4550-4555.

BARRIÈRE, Y.; ARGILLIER, O.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M.T.; MONTIES, B. 1994. Breeding silage maize with brown-midrib genes. Feeding value and biochemical characteristics. Agronomie 14:15-25.

BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J. Dairy Sci. 63:1514-1529.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. Annu. Rev. Nutr. 23:203-227.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. Livest. Prod. Sci. 70:15-29.

BAUMGARD, L.H., CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBØ, A.; BAUMAN, D.E. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. Am. J. Physiol. 278:R179-R184.

BAUMGARD, L.H.; SANGSTER, J.K.; BAUMAN, D.E. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). J. Nutr. 131:1764-1769.

BERTOIA, L. 2011. Criterios para seleccionar maíz de silaje y su manejo. Manual de forrajes conservados. [en línea] Mercoláctea 2011<http://mercolactea.com.ar/admin/upload/docs/Manual%20de%20Forrajes%202011.pdf> [consulta: 23 septiembre 2013].

BLOCK, E.; MULLER, L.D.; GRIEL, L.C., Jr.; GARWOOD, D.L. 1981. Brown midrib-3 corn silage and heat extruded soybeans for early lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 64:1813-1825.

BRAMLEY, E.; LEAN, I.J.; FULKERSON, W.J.; STEVENSON, M.A.; RABIEE, A.R.; COSTA, N.D. 2008. The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates. J. Dairy Sci. 91:308-321.

BUNTING, L.D. 2004. Estrategias nutricionales para cambiar los componentes de la leche. 2º Seminario sobre alimentación y manejo de ganado lechero: “Efecto de la proteína de soya, los aminoácidos y los micro-minerales en la producción”, Querétaro, Qro. y Guadalajara, Jal., México, junio, 2004.

CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; DEVANT, M. 2002. Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. J. Dairy Sci. 85:574-579.

CASTIGNANI, H.; ZEHNDER, R.; GAMBUZZI, E.; CHIMICZ, J. 2005. Caracterización de los sistemas de producción lecheros argentinos, y de sus principales cuencas. [en línea]<http://www.icaarg.com.ar/images/archivos/caracterizacion%20sistemas%20de%20produccion%20lechero%20argentinos%5B1%5DDr.Manch%20Casilda.pdf> [consulta: 02 abril 2012].

CASTRO, J.J.; BERNARD, J.K.; MULLIS, N.A.; EGGLESTON, R.B. 2010. Brown midrib corn silage and Tifton 85 bermudagrass in rations for early-lactation cows. J. Dairy Sci. 93:2143-2152.

CERRATO-SÁNCHEZ, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. 2007a. Effects of patterns of suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. J. Dairy Sci. 90:4368-4377.

CERRATO-SÁNCHEZ, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. 2007b. Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. J. Dairy Sci. 90:1486-1492.

CHALUPA, W.; VECCHIARELLI, B.; ELSER, A.E.; KRONFELD, D.S.; SKLAN, D.; PALMQUIST, D.L. 1986. Ruminal fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. J. Dairy Sci. 69:1293-1301.

CHERNEY, D.J.R; CHERNEY, J.H.; CHASE, L.E.; COX, W.J. 2004. Milk production in high producing dairy cows as influenced by corn silage quality. The Professional Animal Scientist 20:302-311.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. Reprod. Nutr. Dev. 44:467-492.

CHILLIARD, Y.; BAUCHART, D.; GAGLIOSTRO, G.A; OLLIER, A.; VERMOREL, M. 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and mid lactation cows. 1. Intestinal apparent digestibility of fatty acids and lipids. J. Dairy Sci. 74:490-498.

COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D.; GALYEAN, M.L. 1986. Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. J. Dairy Sci. 63:1476-1483.

DADO, R.G.; ALLEN, M.S. 1995. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. J. Dairy Sci. 78:118-133.

DI MARCO, O. 2011. Consideraciones sobre calidad de los forrajes. Visión Rural 88:20-24.

EBLING, T.L.; KUNG, L., Jr. 2004. A comparison of processed conventional corn silage to unprocessed and processed brown midrib corn silage on intake, digestion, and milk production by dairy cows. J. Dairy Sci. 87:2519-2526.

EUN, J.S.; BEAUCHEMIN, K.A. 2007. Enhancing *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. J. Dairy Sci. 90:2839-2851.

EUN, J.S.; BEAUCHEMIN, K.A; SCHULZE H. 2007. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance *in vitro* fermentation of alfalfa hay and corn silage. J. Dairy Sci. 90:1440-1451.

FIRKINS, J.L. 2012. Impact of carbohydrate source on the rumen microbial ecosystem. 27th Annual Southwest Nutrition and Management Conference, Tempe, Arizona, EE.UU., febrero, 2012. pp. 38-56.

FRANCE, J.; DIJKSTRA, J. 2005. Volatile fatty acid production. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J.M.; FRANCE, J. eds. Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. 2nd ed. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. pp. 157-175.

FRENCHICK, G.E.; JOHNSON D.G.; MURPHY, J.M.; OTTERBY, D.E. 1976. Brown midrib corn silage in dairy cattle rations. J. Dairy Sci. 59:2126-2129.

FUENTES, M.C.; CALSAMIGLIA, S; CARDOZO, P.W.; VLAEMINCK, B. 2009. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. J. Dairy Sci. 92:4456-4466.

GEHMAN, A.M.; KONONOFF, P.J.; MULLINS, C.R.; JANICEK, B.N. 2008. Evaluation of nitrogen utilization and the effects of monensin in dairy cows fed brown midrib corn silage. J. Dairy Sci. 91:288-300.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agric. Handbook No 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, D.C.

GRANT, R. Forage fragility, fiber digestibility, and chewing response in dairy cattle. Proc. Tri-State Dairy Nutrition Conference, abril, 2010. pp. 27-40.

GREENFIELD, T.L.; BALDWIN, R.L.; ERDMAN, R.A.; MCLEOD, K.R. 2001. Ruminal fermentation and intestinal flow of nutrients by lactating cows consuming brown midrib corn silages. J. Dairy Sci. 84:2469-2477.

GUAITA, M.S.; FERNÁNDEZ, H.H. 2011. Tablas de composición química de alimentos para rumiantes. 2da ed., Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Publicaciones Regionales: Centro Regional Buenos Aires Sur.

HARVATINE, K.J.; BOISCLAIR, Y.R.; BAUMAN, D.E. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. Animal 3:40-54.

HATFIELD, R.D.; RALPH, J.; GRABBER, J.H. 1999. Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. Crop Sci. 39:27-37.

HEINRICHS, J. 2013. Estimating Physically Effective Fiber with the Penn State Particle Separator. [en línea] <http://extension.psu.edu/animals/dairy/news/2013/estimating-physically-effective-fiber-with-the-penn-state-particle-separator> [consulta: 05 noviembre 2013].

HOFFMAN, P.C.; SHAVER, R.D.; COMBS, D.K.; UNDERSANDER, D.J.; BAUMAN, L.M.; SEEGER, T.K. 2001. Understanding NDF digestibility. [en línea] Focus on Forage. <http://www.uwex.edu/ces/crops/uwforage/focusonforage.htm> [consulta: 30 septiembre 2012].

HOLT, M.S.; WILLIAMS, C.M.; DSCHAAK, C.M.; EUN, J.-S.; YOUNG, A.J. 2010. Effects of corn silage hybrids and dietary nonforage fiber sources on feed intake, digestibility, ruminal fermentation, and productive performance of lactating Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 93:5397-5407.

HOLT, M.S.; EUN, J.-S.; THACKER, C.R.; YOUNG, A.J.; DAI, X.; NESTOR, K.E, Jr. 2013. Effects of feeding brown midrib corn silage with a high dietary concentration of alfalfa hay on lactational performance of Holstein dairy cows for the first 180 days of lactation. J. Dairy Sci. 96:515-523.

HORNECK, D.A, MILLER, R.O. 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In KALRA, Y.P. (eds.) Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 75-83.

Institut National de la Recherche Agronomique. 1989. Ruminant nutrition. Recommended allowances andfeed tables. Ed. John Libbey Eurotext, London, England and Paris, France.

JUNG, H.G. 1997. Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants. J. Nutr. 127:810S-813S.

JUNG, H.G. 2012. Forage digestibility: The intersection of cell wall lignification and plant tissue anatomy. Proc. 23rd Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida, EE.UU., enero-febrero 2012. pp. 162-174.

JUNG, H.G.; ALLEN, M.S. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. J. Dairy Sci. 73:2774-2790.

JUNG, H.G.; NI, W.; CHAPPLE, C.C.S.; MEYER, K. 1999. Impact of lignin composition on cell-wall degradability in an *Arabidopsis* mutant. J. Sci. Food Agric. 79:922-928.

KANG, T.W.; ADESOGAN, A.T.; KIM, S.C.; LEE, S.S. 2009. Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. J. Dairy Sci. 92:732-738.

KEITH, E.A.; COLENBRANDER, V.F.; LECHTENBERG, V.L.; BAUMAN, L.F. 1979. Nutritional value of brown midrib corn silage for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 62:788-792.

KOMAREK, A.R.; ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. 1993. A comparison of methods for determining ADF using the filter bag technique versus conventional filtration. J. Dairy Sci.77 (Suppl. 1):250 (Abstr.).

KOMAREK, A.R.; ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. 1994. Comparison of the filter bag technique to conventional filtration in the Van Soest NDF analysis of 21 feeds. Proc. National Conference on Forage Quality, Evaluation and Utilization. Nebraska University, Lincoln, NE. p 78.

KUC, J.; NELSON, O.E.; FLANAGAN, P. 1968. Degradation of abnormal lignins in the brown-midrib mutants and double mutants of maize. Phytochem. 7(8):1435-1436.

KUNG, L., Jr.; MOULDER, B.M; MULROONEY, C.M.; TELLER, R.S.; SCHMIDT, R.J. 2008. The effect of silage cutting height on the nutritive value of a normal corn silage hybrid compared with brown midrib corn silage fed to lactating cows. J. Dairy Sci. 91:1451-1457.

LAMMERS, B.P.; BUCKMASTER, D.R.; HEINRICHS, A.J. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. J. Dairy Sci. 79:922-928.

LAUER, J.; COORS, J. 1997. Brown midrib corn. Field Crops 28:31-11.

LEAN, I.J.; GOLDER, H.M.; BLACK, J.L.; KING, R.; RABIEE, A.R. 2013. In vivo indices for predicting acidosis risk of grains in cattle: Comparison with in vitro methods. J. Anim. Sci. 91:2823-2835.

LIPPKE, H. 2002. Estimation of forage intake by ruminants on pasture. Crop Sci. 42:869-872.

LIPPKE, H.; ELLIS, W.C.; JACOBS, B.F. 1986. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. J. Dairy Sci. 69:403-412.

LUCY, M.C.; JIANG, H.; KOBAYASHI, Y. 2001. Changes in the somatotropic axis associated with the initiation of lactation. J. Dairy Sci. 84:E113-E119.

LUCY, M.C. 2004. Mechanisms linking the somatotropic axis with insulin: Lessons from the postpartum dairy cow. Proc. of the New Zealand Society of Animal Production, enero 2004. pp. 19-23. [en línea] http://www.sciquest.org.nz/node/41463 [consulta: 22 febrero 2015].

MAHANNA, B. 2010. Growing conditions affect silage quality. Feedstuffs. 82, No 24.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. 1999. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. Br. J. Nutr. 81:107-112.

MC RAE, J.C; ARMSTRONG, D.G. 1968. Enzyme method for determination of alpha-linked glucose polymers in biological materials. J. Sci. Food Agr. 19:578-581.

MERTENS, D.R. 1987. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. J. Anim. Sci. 64:1548-1558.

MORRIS, L.D.1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood´santhrone reagent. Science 107:254-255.

MOURIÑO, F.; AKKARAWONGSA, R.; WEIMER, P.J. 2001. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. J. Dairy Sci. 84:848-859.

NAGARAJA, T.G. 2012. A Microbiologist's view on improving nutrient utilization in ruminants. Proc. 23rd Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida, EE.UU., enero y febrero 2012. pp. 135-161.

NAGARAJA, T.G; TITGEMEYER, E.C. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. J. Dairy Sci. 90: E17-E38.

National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. Nat. Acad. Sci., Washington, DC. 381 p.

NOLAN, J.V.; DOBOS, R.C. 2005. Nitrogen transactions in ruminants. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J.M.; FRANCE, J. eds. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. 2nd ed. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. pp. 177-206.

OBA, M.; ALLEN, M.S. 1999a. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on dry matter intake and productivity of high yielding dairy cows. J. Dairy Sci. 82:135-142.

OBA, M.; ALLEN, M.S. 1999b. 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.

OBA, M.; ALLEN, M.S. 2000a. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1. Feeding behavior and nutrient utilization. J. Dairy Sci. 83:1333-1341.

OBA, M.; ALLEN, M.S. 2000b. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 2. Chewing activities. J. Dairy Sci. 83:1342-1349.

OBA, M.; ALLEN, M.S. 2000c. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 3. Digestibility and microbial efficiency. J. Dairy Sci. 83:1350-1358.

OBA, M.; ALLEN, M.S. 2011. The impact of improving NDF digestibility of corn silage on dairy cow performance. Proc. 22nd Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Gainesville, Florida, EE.UU., febrero 2011. pp. 105-117.

OWENS, F. 2008. Corn silage-Facts, fantasies and the future. Proc. 19th Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida, EE.UU., enero 2008.

PETERSON, D.G.; BAUMGARD, L.H.; BAUMAN,D.E. 2002.Short communication: Milk fat response to low doses of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). J. Dairy Sci. 85:1764-1766.

QIU, X.; EASTRIDGE, M.L.; WANG, Z. 2003. Effects of corn silage hybrid and dietary concentration of forage NDF on digestibility and performance by dairy cows. J. Dairy Sci. 86:3667-3674.

RAFFRENATO, E.; FIEVISOHN, R.; COTANCH, K.W.; GRANT, R.J.; VAN SOEST, P.J.; CHASE, L.E.; VAN AMBURGH, M.E. 2009. ANDF, DNFD, INDF, ADL and Kd: What have we learned? Proceedings of the 71st Cornell Nutrition Conference for feed manufacturers, East Syracuse, New York, EE.UU., octubre 2009. pp. 77-93.

ROOK, J.A.; MULLER, L.D.; SHANK, D.B. 1977. Intake and digestibility of brown midrib corn silage by lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 60:1894-1904.

ROYO, L.S.; SECANELL, E.R. 2013. Confección y calidad de silajes. [en línea] Voces y Ecos (29) EEA Reconquista <http://inta.gob.ar/documentos/confeccion-y-calidad-de-silajes-1/> [consulta: 23 septiembre 2013].

RUSSELL, J.B; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G.; VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. J. Anim. Sci. 70:3551-3561.

The SAS System for Windows 9.0. Copyright 2002 by SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.

SATTLER, S.E.; FUNNELL-HARRIS, D.L.; PEDERSEN, J.F. 2010. Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. Plant Science 178:229-238.

SCHWAB, E.C.; SHAVER, R.D.; SHINNERS, K.J.; LAUER, J.G.; COORS, J.G. 2002. Processing and chop length effects in brown-midrib corn silage on intake, digestion, and milk production by dairy cows. J. Dairy Sci. 85:613-623.

SHINGFIELD, K.J.; GRIINARI, J.M. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109:799-816.

SHINGFIELD, K.J.; BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. Animal 4:1140-1166.

SOMMERFELDT, J.L.; SCHINGOETHE, D.J.; MULLER, L.D. 1979. Brown-midrib corn silage for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 62:1611-1618.

STALLINGS, C.C.; DONALDSON, B.M.; THOMAS, J.W.; ROSSMAN, E.C. 1982. In vivo evaluation of brown-midrib corn silage by sheep and lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 65:1945-1949.

STERN, M.D.; HOOVER, W.H. 1990. The dual flow continuous culture system. Proc. Continuous culture fermenters: Frustration or fermentation. Northeast ADSA-ASAS Regional Meeting, Chazy, NY, EE.UU. pp. 17-32.

STONE, W.C.; CHASE, L.E.; OVERTON, T.R.; NESTOR, K.E. 2012. Brown midrib corn silage fed during the peripartal period increased intake and resulted in a persistent increase in milk solids yield of Holstein cows. J. Dairy Sci. 95:6665-6676.

TAYLOR, C.C; ALLEN, M.S. 2005a. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: Feeding behavior and milk yield of lactating cows. J. Dairy Sci. 88:1425-1433.

TAYLOR, C.C; ALLEN, M.S. 2005b. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: Ruminal fermentation and N partitioning in lactating cows. J. Dairy Sci. 88:1434-1442.

TAYLOR, C.C; ALLEN, M.S. 2005c. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: Site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. J. Dairy Sci. 88:1413-1424.

TINE, M.A.; MCLEOD, K.R.; ERDMAN, R.A.; BALDWIN, R.L VI. 2001. Effects of brown midrib corn silage on the energy balance of dairy cattle. J. Dairy Sci. 84:885-895.

TRAXLER, M.J.; FOX, D.G.; VAN SOEST, P.J.; PELL, A.N.; LASCANO, C.E.; LANNA, D.P.; MOORE, J.E.; LANA, R.P.; VÉLEZ, M.; FLORES, A. 1998. Predicting forage indigestible NDF from lignin concentration. J. Dairy Sci. 76:1469-1480.

TUCKER, A.H. 2000. Symposium: Hormonal regulation of milk synthesis. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. J. Dairy Sci. 83:874-884.

VAN SOEST, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed., Comstock Publishing Associated, a division of Cornell University Press., Ithaca, New York, EE.UU. 476 p.

WEATHERBURN, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39:971-974.

WEINBERG, Z.G.; SHATZ, O.; CHEN, Y.; YOSEF, E.; NIKBAHAT, M.; BEN-GHEDALIA, D.; MIRON, J. 2007. Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro digestibility of wheat and corn silages. J. Dairy Sci. 90:4754-4762.

WEISS, W.P.; WYATT, D.J. 2006. Effect of corn silage hybrid and metabolizable protein supply on nitrogen metabolism of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 89:1644-1653.

WELLER, R.A.; PILGRIM, A.F. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of a sheep and from a continuous in vitro fermentation system. Br. J. Nutr. 32:341-351.

WELLS, J.E.; RUSSELL, J.B. 1996. Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly. J. Dairy Sci. 79:1487-1495.

WHITEHOUSE, N.L.; OLSON, V.M.; SCHWAB, C.G.; CHESBRO, W.R.; CUNNINGHAN, K.D.; LYCOS, K.D. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. J. Anim. Sci. 72:1335-1343.

WU, Z.; OHAJURUKA, O.A.; PALMQUIST, D.L. 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. J. Dairy Sci. 74:3025-3034.

ZINN, R.A.; OWENS, F.N. 1986.A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. Can. J. Anim. Sci. 66:157-166.