

**CONTENIDO Y DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA FIBRA DE LÁMINAS DE *Chloris  
gayana* Kunth EN RELACIÓN A LA EDAD Y TAMAÑO FOLIAR**

**Roxana Edith Avila**

**Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito para optar al título de  
MAGÍSTER SCIENTIE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Unidad Integrada Balcarce**

Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria - Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata

**Balcarce, Argentina.**

**2009**

**CONTENIDO Y DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA FIBRA DE LÁMINAS DE *Chloris  
gayana* Kunth EN RELACIÓN A LA EDAD Y TAMAÑO FOLIAR**

**Roxana Edith Avila**

Comité Consejero

-----  
Oscar Di Marco, Ing. Agr., MSc., Ph. D.

Director de Tesis

-----  
Mónica Agnusdei, Ing. Agr., MSc., Dra.

Co-directora de Tesis

**CONTENIDO Y DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA FIBRA DE LÁMINAS DE *Chloris  
gayana* Kunth EN RELACIÓN A LA EDAD Y TAMAÑO FOLIAR**

**Roxana Edith Avila**

Aprobada por:

-----

Oscar Di Marco, Ing. Agr., MSc., Ph. D.

Director de Tesis

-----

José Arroqy, Ing. Agr., MSc., Ph.D.

Evaluador Externo

-----

Jorge Carrete, Ing. Agr., MSc.

Evaluador Externo

-----

Jorge Castaño, Ing. Agr., MSc.

Evaluador Externo

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermana, por su amor y apoyo incondicional. A mi hermana Adriana, que me guía desde algún lado...

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de beca, Ing. Carlos Ferrando, por su apoyo y aliento permanente durante el desarrollo del postgrado, por guiarme en la investigación en producción animal, y por su calidez y generosidad como ser humano.

A mis directores de tesis, Dr. Di Marco y Dra. Agnusdei, por permitirme trabajar con ellos y tiempo dedicado a la elaboración de este trabajo.

A mis amigos de siempre: Karina, Oscar, Horacio, Victoria, Mariana, Emiliano, Daniel, Juan, por acompañarme en todo momento.

A mis amigos cosechados en estos años en Balcarce: Lorena, Silvina y Gaspar, Ingrid, Adriana, Mariel, Julia, Estanislao, Hipólito, Florencia, por los momentos compartidos. En especial a María Inés por ser más que una amiga... una hermana!!!

A mis compañeros del postgrado y del casino. En especial a aquellos que colaboraron en el ensayo: Sebastián, Miguel, Carlos G., Fernando N.

A Germán Berone por sus aportes y ayuda en el trabajo experimental.

A César Mayoral por su colaboración durante los muestreos y procesamiento de muestras.

Al personal del INTA La Rioja, directivos, administrativos, profesionales, técnicos y personal de campo, por facilitarme todo a la distancia.

Al Grupo de Pastura, investigadores y personal de Laboratorio, del INTA EEA Balcarce.

## ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Características de la especie en estudio	4
2.2. Crecimiento y desarrollo de las gramíneas forrajeras	6
2.2.1. Características morfogénéticas	7
2.2.2. Características estructurales	8
2.2.2.1. Largo foliar	8
2.2.2.2. Área, peso y área foliar específica	10
2.3. El estudio de la calidad del forraje	11
2.3.1. Breve reseña histórica	12
2.3.2. Terminología utilizada	13
2.3.3. Enfoques para evaluar la calidad del forraje	15
2.3.4. Parámetros que definen la calidad	15
2.3.4.1. Digestibilidad in vitro	15
2.3.4.1.1. Método de Tilley y Terry (1963)	15
2.3.4.1.2. Método Daisy II	16
2.3.4.1.3. Técnica de producción de gas in vitro	17
2.3.4.2. Ecuaciones de predicción	18

2.3.5. Importancia de la digestibilidad de materia seca y de la FDN	18
2.3.6. Factores que afectan la digestibilidad	19
2.3.6.1. Barreras químicas y físicas	19
2.3.6.2. Tipos de tejidos	21
2.3.6.3. Edad	23
2.3.6.4. Tamaño	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Sitio y periodo experimental	28
3.2. Periodo pre-experimental	28
3.3. Periodo experimental	29
3.3.1. Variables morfogénicas	29
3.3.2. Variables estructurales y de calidad	30
3.3.2.1. Obtención de muestras	30
3.3.2.2. Variables estructurales	31
3.3.2.2.1. Largo foliar	31
3.3.2.2.2. Área, peso y área foliar específica	32
3.3.2.3. Variables de calidad	32
3.3.2.3.1. Digestibilidad in vitro por el método ANKOM	33
3.3.2.3.1.1. Preparación de la solución buffer combinada	33
3.3.2.3.1.2. Obtención del licor ruminal	34
3.3.2.3.1.3. Incubación y cálculo de la digestibilidad in vitro	34
3.4. Análisis estadístico	36
3.4.1. Modelo estadístico	36
3.4.2. Análisis de las distintas variables	36
4. RESULTADOS	38
4.1. Vida media foliar	38
4.2. Características estructurales	38
4.2.1. Largo foliar	38
4.2.2. Relación largo de lámina: largo de vainas	40
4.2.3. Área, peso y área foliar específica de láminas adultas	43

4.3. Digestibilidad aparente de la materia seca de láminas adultas	44
4.4. Peso específico y peso de la fibra por unidad de área	45
4.5. Fibra indigestible (FDNi-24) de láminas de generaciones sucesivas de hojas	46
4.5.1. Relación con la edad foliar	46
4.5.2. Relación con el peso específico	47
4.5.3. Relación con el largo foliar	48
4.6. Relación entre parámetros de calidad	49
5. DISCUSIÓN	52
5.1. Vida media foliar	52
5.2. Características estructurales	52
5.2.1. Largo foliar	52
5.2.2. Área, peso y área foliar específica de láminas adultas	53
5.3. Digestibilidad in vitro, peso específico, peso de la fibra y peso de la fibra indigestible por unidad de área	55
5.4. Fibra indigestible (FDNi-24) de láminas de generaciones sucesivas de hojas	59
5.5. Relación entre parámetros de calidad	61
5.6. Consideraciones finales	62
6. CONCLUSIONES	64
7. BIBLIOGRAFIA	65
8. APÉNDICE	79



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Calidad del forraje de dos cultivares de <i>Chloris gayana</i> en distintos estados fenológicos	5
<b>Cuadro 2.</b>	Calidad del forraje de <i>Chloris gayana</i> cv. Común bajo dos frecuencias de cortes.	6
<b>Cuadro 3.</b>	Terminología recomendada por la revista Feed Science and Technology (2005) al enviar una publicación de acuerdo al procedimiento seguido para determinar fibra.	14
<b>Cuadro 4.</b>	Factores simples para convertir digestibilidad in vitro FDN de 30 a 48 h en forrajes comunes.	17
<b>Cuadro 5.</b>	Una comparación de los valores medios de lignina ( $\pm$ DE) generados de la aplicación de distintos métodos en un rango de muestras de forrajes	20
<b>Cuadro 6.</b>	Síntesis de tejidos de plantas y su digestibilidad	22
<b>Cuadro 7.</b>	Proporción promedio de tejidos (% área transversal) de láminas de gramíneas C4 y C3.	23
<b>Cuadro 8.</b>	Componentes de la solución buffer A y B	33
<b>Cuadro 9.</b>	Composición química (%) de heno de alfalfa	34
<b>Cuadro 10.</b>	Promedio ( $\pm$ DE) de área, peso y área foliar específica (AFE) de láminas adultas de la generación 1, 2 y 3 de los tratamientos corto y largo.	43
<b>Cuadro I.</b>	Análisis de varianza para vida media foliar (grados días de crecimiento, GDC) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento*gener).	79
<b>Cuadro II.</b>	Análisis de varianza para largo de lámina (mm) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento*gener).	79
<b>Cuadro III.</b>	Análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo para largo de pseudotallo (mm) de dos tratamientos (tamaño foliar), medición y la interacción (tratamiento*medición).	79

<b>Cuadro IV.</b>	Análisis de varianza para largo foliar (lámina+vainas, mm) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento*gener).	80
<b>Cuadro V.</b>	Análisis de varianza para área foliar específica (AFE, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento*gener).	80
<b>Cuadro VI.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para área foliar específica (AFE, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ , variable y) y largo foliar (lámina+vainas, mm, variable x).	80
<b>Cuadro VII.</b>	Análisis de varianza para digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS, $\text{g kg}^{-1}$ ) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento*gener).	81
<b>Cuadro VIII.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS, $\text{g kg}^{-1}$ , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento corto.	81
<b>Cuadro IX.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS, $\text{g kg}^{-1}$ , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento largo.	81
<b>Cuadro X.</b>	Análisis de varianza para peso específico (Pe, $\text{mg cm}^{-2}$ ) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento*gener).	82
<b>Cuadro XI.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para peso específico (Pe, $\text{mg cm}^{-2}$ , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento corto.	82
<b>Cuadro XII.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para peso específico (Pe, $\text{mg cm}^{-2}$ , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento largo.	82
<b>Cuadro XIII.</b>	Análisis de varianza para fibra de detergente neutro específico (FDNe, $\text{mgFDN cm}^{-2}$ ) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento*gener).	83
<b>Cuadro XIV.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro específico (FDNe, $\text{mgFDN cm}^{-2}$ , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento corto.	83

<b>Cuadro XV.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro específico (FDNe, mgFDN cm <sup>-2</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento largo.	84
<b>Cuadro XVI.</b>	Análisis de varianza para fibra de detergente neutro indigestible específico (FDNie, mgFDNi cm <sup>-2</sup> ) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento*gener).	84
<b>Cuadro XVII.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible específico (FDNie, mgFDNi cm <sup>-2</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento corto.	84
<b>Cuadro XVIII.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible específico (FDNie, mgFDNi cm <sup>-2</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento largo.	85
<b>Cuadro XIX.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 1 del tratamiento corto.	85
<b>Cuadro XX.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 2 del tratamiento corto.	86
<b>Cuadro XXI.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 3 del tratamiento corto.	86
<b>Cuadro XXII.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 1 del tratamiento largo.	86
<b>Cuadro XXIII.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 2 del tratamiento largo.	87
<b>Cuadro XXIV.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 3 del tratamiento largo.	87

<b>Cuadro XXV.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y largo foliar (largo láminas+vainas, mm, variable x).	88
<b>Cuadro XXVI.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y largo de lámina (mm, variable x).	88
<b>Cuadro XXVII.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y peso específico (Pe, mg cm <sup>-2</sup> , variable x).	88
<b>Cuadro XXVIII.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad de la FDN (DFDN, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y fibra de detergente neutro (FDN, g kg <sup>-1</sup> , variable x).	89
<b>Cuadro XXIX.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad de la FDN (DFDN, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y fibra de detergente ácido (FDA, g kg <sup>-1</sup> , variable x).	89
<b>Cuadro XXX.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad de la FDN (DFDN, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y lignina de detergente ácido (LDA, g kg <sup>-1</sup> , variable x).	90
<b>Cuadro XXXI.</b>	Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS, g kg <sup>-1</sup> , variable y) y digestibilidad de la FDN (DFDN, g kg <sup>-1</sup> , variable x).	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Evolución de los métodos de evaluación de calidad del forraje	13
<b>Figura 2.</b>	Temperaturas del aire en invernáculo durante el periodo experimental	28
<b>Figura 3.</b>	Esquema general de los momentos en los cuales fueron realizados los muestreos en cada generación de hoja.	31
<b>Figura 4.</b>	Evolución del largo de lámina (mm) de tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Las barras indican el error estándar de la media.	39
<b>Figura 5.</b>	Evolución de la longitud de vainas (mm) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Las barras indican el error estándar de la media.	39
<b>Figura 6.</b>	Largo lámina y largo de vainas (mm) de tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L).	40
<b>Figura 7.</b>	Relación largo lámina: largo de vainas (mm) de tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L).	41
<b>Figura 8.</b>	Distribución de frecuencias de la relación largo lámina: largo foliar (largo lámina+largo vainas) en macollos marcados de tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (izquierda) y tratamiento largo (derecha).	42
<b>Figura 9.</b>	Relación general entre AFE (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ) y largo total de hoja (largo lámina+vainas). Ecuación lineal correspondiente: $y = -0,0609x + 137,2$ $R^2 = 0,579$ .	44
<b>Figura 10</b>	Evolución de la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) de láminas adultas del tratamiento corto (C) y largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: C: $y = -0,1023x + 601,7$ , $R^2 = 0,006$ ; L: $y = -0,223x + 585,5$ , $R^2 = 0,337$ . Las barras indican error estándar de la media.	45

- Figura 11.** Peso específico (Pe), fibra de detergente neutro específica (FDNe) y fibra de detergente neutro indigestible específica (FDNie) del tratamiento corto (C) y largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: C Pe:  $y = 0,0015x + 9,41$ ,  $R^2 = 0,012$ ; C FDNe:  $y = 0,006x + 4,24$ ,  $R^2 = 0,197$ ; C FDNie:  $y = 0,0028x + 3,67$ ,  $R^2 = 0,087$ ; L Pe:  $y = 0,0035x + 11,31$ ,  $R^2 = 0,02$ ; L FDNe:  $y = 0,0007x + 7,41$ ,  $R^2 = 0,002$ ; L FDNie:  $y = -0,0001x^2 + 0,07x - 4,0$ ,  $R^2 = 0,146$ . Las barras indican error estándar de la media. 46
- Figura 12.** Evolución de FDNI-24 ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: C G1:  $y = 0,011x + 455,5$ ,  $R^2 = 0,087$ ; C G2:  $y = 0,058x + 455,3$ ,  $R^2 = 0,088$ ; C G3:  $y = -0,023x + 503,1$ ,  $R^2 = 0,016$ ; L G1:  $y = 0,286x + 463,9$ ,  $R^2 = 0,209$ ; L G2:  $y = 0,289x + 458,3$ ,  $R^2 = 0,263$ ; L G3:  $y = 0,054x + 535,1$ ,  $R^2 = 0,056$ . Las barras indican error estándar de la media. 47
- Figura 13.** Relación entre FDNI-24 y Pe para las láminas de los tratamientos corto (C) y largo (L). Ecuación lineal correspondiente:  $\text{FDNI-24} = 18,073x + 315,3$ ,  $R^2 = 0,456$ . 48
- Figura 14.** Relación entre FDNI-24 y largo foliar (largo lámina+vainas, A) y entre FDNI-24 y largo de lámina (B) para las muestras del tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: A:  $y = 0,1958x + 367,6$ ,  $R^2 = 0,623$ ; B:  $y = 0,2634x + 391,2$ ,  $R^2 = 0,352$ . 49
- Figura 15.** Relación entre la DFDN-24 y FDN (A), DFDN-24 y FDA (B), DFDN-24 y LDA (C) ( $\text{g kg}^{-1}$ ) para el conjunto de muestras del tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: A:  $y = -1,085x + 1153,2$ ,  $R^2 = 0,1262$ ; B:  $y = -1,601x + 977,47$ ,  $R^2 = 0,1937$ ; C:  $y = -1,415x + 526,94$ ,  $R^2 = 0,056$ . 50
- Figura 16.** Relación entre la DAMS y DFDN-24 para el conjunto de muestras del tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes:  $y = 0,723x + 192,08$ ,  $R^2 = 0,754$ . 51

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**C:** tratamiento corto

**L:** tratamiento largo

**G1:** generación 1 de hoja

**G2:** generación 2 de hoja

**G3:** generación 3 de hoja

**DVIVMS:** digestibilidad verdadera in vitro de la materia seca ( $\text{g kg}^{-1}$ )

**DAMS:** digestibilidad aparente de la materia seca ( $\text{g kg}^{-1}$ )

**DFDN-24:** digestibilidad de la fibra de detergente neutro obtenida por incubación durante 24 h ( $\text{g kg}^{-1}$ ).

**FDNi-24:** fibra de detergente neutro indigestible ( $\text{g kg}^{-1}$ ), es la recíproca de la DFDN.

**Pe:** peso específico ( $\text{mg MS cm}^{-2}$ )

**FDNe:** fibra de detergente neutro específica ( $\text{mg FDN cm}^{-2}$ )

**FDNie:** fibra de detergente neutro indigestible específica ( $\text{mg FDNi cm}^{-2}$ )

**FDN:** fibra de detergente neutro ( $\text{g kg}^{-1}$ )

**FDA:** fibra de detergente ácida ( $\text{g kg}^{-1}$ )

**LDA:** lignina de detergente ácida ( $\text{g kg}^{-1}$ )

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue describir la acumulación de FDN y FDNi (fibra de detergente neutro indigestible) en láminas adultas de generaciones sucesivas de hojas de *Chloris gayana* Kunth cv. Finecut en función de la edad y tamaño foliar. Durante un periodo pre-experimental se establecieron dos tratamientos de diferente tamaño foliar: láminas cortas (C) y láminas largas (L), mediante la aplicación de dos regímenes de defoliación que variaron en intensidad y frecuencia de corte. Luego de dicho periodo, y durante el ciclo de vida foliar de tres generaciones sucesivas de hojas (G1, G2 y G3), el cual abarca aproximadamente un ciclo de rebrote, se cosecharon aproximadamente 200 macollos por tratamiento cada 58 GDC ( $\pm 22$ ). Además, en cada tratamiento se registraron variables morfogénicas en 15 macollos marcados. La temperatura promedio durante el periodo experimental fue de 24°C ( $\pm 3$ ) y se consideró 12°C como temperatura base para el cálculo de los grados días de crecimiento (GDC). En laboratorio, las láminas de los macollos de las tres generaciones de hojas fueron separadas en las siguientes categorías de edad: lámina recientemente expandida (con lígula) y láminas adultas (tres categorías). En cada categoría de edad, se registraron variables estructurales (largo de lámina, área, peso, área foliar específica) y variables de calidad del forraje. Para esta última, se midió la cantidad de FDN y su composición (FDA, LDA), así como la digestibilidad verdadera in vitro de la materia seca (DVIVMS) y de la FDN (DFDN) en el incubador Daisy<sup>II</sup> (ANKOM) por un periodo de incubación de 24 hs. A partir de los valores de DVIVMS se estimó la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS = DVIVMS - 11,9) y la FDNi (1- DFDN). También se realizaron estimaciones del peso por unidad de área de la materia seca y de la fibra (peso específico, Pe; FDN específica, FDNe; FDNi específica, FDNie). Los datos se analizaron según un diseño en bloques con arreglo factorial de 2 x 3 (tamaño de lámina y generación de hoja, respectivamente). Las láminas del tratamiento C presentaron en promedio menor largo, área y peso, y mayor área foliar específica que las láminas del tratamiento L. El Pe, FDNe y FDNie también fue menor en C. Las láminas de dicho tratamiento tuvieron mayor DAMS (10 %) y menor FDNi (15%) que las respectivas de L. El envejecimiento afectó en menor medida las variables analizadas, siendo menos marcado en C que en L. De las variables estructurales evaluadas, el tamaño de la hoja fue el principal factor que explicó las variaciones en



FDNi. La composición química de la fibra determinada por los análisis de FDN, FDA y LDA, explicaron menos del 20% las variaciones en FDNi. Se concluye que el tamaño de la hoja es el principal factor que determina los cambios en contenido y digestibilidad de FDN (o FDNi) y DAMS en *Chloris gayana*. En cambio el envejecimiento tuvo un menor efecto en las variaciones de los mencionados parámetros.

Palabras clave: *Chloris gayana*, tamaño de lámina, envejecimiento, fibra indigestible, digestibilidad de MS.

## ABSTRACT

The effect of leaf age and size on neutral detergent fiber (NDF) content and digestibility of adult successive leaves of *Chloris gayana* Kunth cv. Finecut was investigated. Two treatments with different lamina size: short (S) and large (L) achieved by defoliation were evaluated. After treatments were established a regrowth period was initiated. A total of three successive leaf generations were sampled during this period. Sample collection was made every 58 GGD ( $\pm 22$ ). Two hundred tillers per treatment were cut. Moreover, in fifteen individual marked tiller per treatment were recorded morphogenic characteristics. Average daily temperature was 24°C ( $\pm 3$ ) and to calculate grow grade day (GGD) 12°C was used as base temperature. Tillers cut were separated in leaves generations and classified in four age categories: recently expanded lamina (with ligule) and adults laminae (three categories). Structural characteristic (lamina length, leaf area, weight and specific leaf area) and quality characteristic (NDF, ADF, ADL, in vitro true dry matter digestibility -IVTDMD- and neutral detergent fiber digestibility -NDFN-) were recorded. In vitro digestibility were determined after 24 h incubation with DaisyII apparatus (ANKOM). In vitro digestibility apparent (DMAD) and indigestible NDF (iNDF) were calculated from values of IVTDMD and NDFD. Moreover, there was estimated specific leaf mass, specific NDF and specific iNDF. Statistical design was a complete randomized block design with a 2 x 3 factorial arrangement of treatments (two lamina size and three leaves generation, respectively). Lamina of treatment C showed values of length, area and weight lower and specific leaf area higher than treatment L. Specific leaf mass, specific NDF and specific iNDF were lowest in C. These results caused lowest iNDF (15%) and highest DMAD (10 %) in this treatment. Ageing affected to a lesser extent the variables analyzed, being less marked in treatment C. Changes in amount of iNDF was explained mainly for leaf size. Chemical composition of the fiber (NDF, ADF and ADL) explained at least 20% of changes in iNDF. It can be concluded that leaf size is main factor in the changes of NDF content and digestibility in *Chloris gayana*, while ageing would have little effect.

Keys words: *Chloris gayana*, leaf size, ageing, indigestible fiber, dry matter digestibility

## 1. INTRODUCCIÓN

*Chloris gayana* Kunth es una gramínea megatérmica que se caracteriza por su resistencia a la semiaridez, salinidad, su adecuada producción de semillas y adaptación a diferentes tipos de suelos, encontrándose ampliamente distribuida en el NOA (Toll Vera et al., 2000). En esta región se desarrolla una ganadería extensiva, particularmente dedicada a la cría, sobre pastizales y bosques naturales degradados, con un fuerte componente de leñosas arbustivas y arbóreas que limitan severamente la oferta de forraje y la capacidad de carga de los sistemas (Kunst et al., 2003). Ello se ve agravado en la actualidad por el crecimiento de la ganadería en la región (Rearte, 2007), por lo cual la incorporación de pasturas cultivadas perennes tropicales, forman parte del paquete tecnológico introducido en la región con el cual se intenta elevar la carga animal y otorgar un manejo adecuado a los pastizales naturales (De León; Boetto, 2004). Sin embargo hay que considerar que las gramíneas megatérmicas tienen severas limitantes de calidad que afectan la producción animal (Minson, 1990), por lo que se hace necesario identificar factores de las especies que afectan la calidad nutritiva, para luego establecer estrategias especializadas de manejo que permitan lograr un uso eficiente del forraje en cantidad y calidad.

Los estudios sobre variaciones de la calidad nutritiva en gramíneas, generalmente se han concentrado en los cambios asociados a distintos estados fenológicos de la pastura, principalmente al cambio de la fase vegetativa a reproductiva y/o la de acumulación de material muerto. Sin embargo, también es importante considerar los cambios de calidad dentro del mismo estado vegetativo para el uso eficiente de pasturas bajo pastoreo (Groot; Neuteboom, 1997; Duru et al., 1999). En esta etapa, tienen lugar múltiples ciclos de envejecimiento tisular (recambio de tejido) que se suceden dentro de un lapso de tiempo corto en relación al ciclo fenológico. En este sentido Groot; Neuteboom (1997), describieron para raigrás anual el patrón de variación de la calidad con el envejecimiento de los tejidos. Estos autores, encontraron que la calidad de las láminas disminuía desde el momento que ellas aparecían fuera del tubo de vainas y que dicha disminución continuaba aún cuando las láminas alcanzaban su tamaño máximo (aparición de la lígula) hasta llegar a un plateau. Este patrón fue el mismo para láminas de hojas sucesivas, aunque la disminución de calidad fue mayor para las láminas aparecidas posteriormente, debido a que ellas presentaban un mayor envejecimiento de los tejidos por permanecer más tiempo creciendo dentro del tubo de vainas.

En pasturas en estado vegetativo, además del envejecimiento de los tejidos, las características morfogénicas y estructurales de las mismas afectarían la calidad nutritiva del forraje (Duru et al., 1999; Duru and Ducroq, 2002). En este sentido, el tamaño de los órganos, en el cual un aumento de los mismos implica inevitablemente mayor acumulación de fibra, comienza a ser reconocido en la literatura recientemente como factor determinante de las variaciones en la calidad nutritiva. Dicho proceso puede ser aún más serio en el caso de las gramíneas megatérmicas por el gran tamaño potencial de sus órganos respecto a las gramíneas templadas. Esta característica de las gramíneas C4, si bien pudo resultar de valor adaptativo para la competencia lumínica en las comunidades nativas, sus estructuras se contraponen con rasgos deseables asociadas a la calidad nutritiva (Wilson, 1997).

En gramíneas forrajeras el tamaño potencial de la lámina es una característica determinada genéticamente, sin embargo debido a su alta plasticidad morfológica es posible modificarlo mediante prácticas de manejo (Lemaire; Chapman, 1996). De esta forma se pueden obtener pasturas de alta calidad sin comprometer la persistencia y producción de las mismas.

En esta tesis se analiza la calidad como una consecuencia del crecimiento, lo cual implica acumulación de biomasa y de estructuras indigestibles. Por ello, la variable respuesta, se mide en términos de acumulaciones de fibra (FDN) y fibra indigestible (FDNi). Esta última ha sido identificada recientemente como una importante medida de calidad que es altamente variable entre forrajes y tiene consistentes efectos sobre la producción animal (Oba; Allen, 1999).

El enfoque funcional que se plantea, el cual vincula el proceso de crecimiento y envejecimiento de las láminas con la calidad nutritiva del forraje, ofrece un marco conceptual interesante para desarrollar estudios orientados a predecir el impacto de manejos que alteren el tamaño y contribución de las hojas de diferente edad en una misma especie forrajera.

### **Hipótesis**

- § La acumulación de fibra indigestible (FDNi) aumenta aún después de que las láminas alcanzan su tamaño máximo (aparición de lígula) hasta llegar a un plateau.
- § Las láminas sucesivas de un macollo, presentarán mayor acumulación de FDNi debido a un mayor tamaño y al mayor tiempo desde la iniciación de acumulación de fibra hasta su emergencia por fuera del tubo de vainas de las mismas.

- § Las láminas de menor tamaño originadas por el tratamiento de defoliación aplicado, acumularán menor cantidad de FDN y FDNi durante el proceso de envejecimiento respecto a las láminas de mayor tamaño. Esto determinará una mayor digestibilidad de la materia seca en las láminas más cortas.

### **Objetivo general**

Describir la acumulación de FDN y FDNi en láminas adultas de generaciones sucesivas de hojas de *Chloris gayana* Kunth cv. Finecut (grama rhodes) en función de la edad y tamaño foliar.

### **Objetivos específicos**

- § Obtener pasturas que difieran marcadamente (alrededor de 2 veces) en su tamaño foliar.
- § Determinar la digestibilidad de materia seca y la digestibilidad de la FDN (o la fibra indigestible, FDNi) en láminas adultas de tres generaciones sucesivas de hojas.
- § Estimar la composición específica de la materia seca y de la fibra (peso específico, Pe; FDN específica, FDNe; y FDNi específica, FDNie)
- § Establecer relaciones entre el contenido de FDNi y la edad térmica de láminas adultas de la especie en estudio.
- § Evaluar la asociación entre el contenido de FDNi de láminas adultas con distintas variables estructurales (tamaño foliar, peso específico).
- § Establecer relaciones entre FDNi y otras determinaciones comunes en los análisis de laboratorio (FDN, FDA y LDA).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Característica de la especie en estudio

**Origen y distribución.** *Chloris gayana* Kunth es una especie forrajera megatérmica, perenne, de porte erecto y con buena capacidad de formación de estolones que se enraízan en los nudos y le permiten cubrir el suelo eficientemente. Presenta una mata cuyo tamaño puede variar entre 0,70 y 1,50 m de altura, hojas delgadas y una inflorescencia digitada muy característica, compuesta por racimos espiciformes, verticilados.

Esta especie es originaria de África y está ampliamente distribuida en Argentina, pues se adapta desde climas subtropicales a climas templados, sean estos semiáridos o subhúmedos. Tiene una gran capacidad adaptativa a condiciones de suelos pobres y con ciertos tenores de salinidad. Sus requerimientos pluviométricos se encuentran por encima de los 600 mm anuales y su resistencia a heladas es intermedia (hasta - 5 °C no presenta severos problemas) (Toll Vera et al., 2000).

En Argentina, fue introducida en Tucumán a principios del siglo XX. A partir de las primeras experiencias, esta forrajera experimentó una continua y rápida expansión en las distintas zonas ganaderas del Norte y Centro del país, apoyada en su resistencia a semiaridez y salinidad, su producción de semillas y su adaptación a diferentes tipos de suelos. Se constituyó así, en la principal especie cultivada megatérmica hasta la década del 70. La necesidad de aprovechar tierras salinizadas con destino forrajero convirtieron a grama rhodes en una alternativa siempre válida en numerosas regiones subtropicales y templadas del mundo (Toll Vera et al., 2000).

En la región del Noroeste, los cultivares más tradicionalmente empleados son: Común, Katambora, Pioneer, Topcut y Finecut, entre los cultivares diploides; y Callidae y Samford entre los cultivares tetraploides.

El material en estudio corresponde al cultivar Finecut, éste es uno de los de más reciente aparición y se caracteriza por una alta foliosidad respecto de los tallos, maduración uniforme y buena resistencia a enfermedades. Estas características le confieren aptitud para la confección de henos (Martin, 2005)

**Producción.** Esta especie tiene un ciclo de crecimiento primavero –estival. Su ciclo vegetativo se extiende desde las primeras lluvias efectivas (en el NOA en general desde

mediados de Noviembre) y hasta las primeras heladas (en general hasta fines de Abril - principios de Mayo). La producción promedio acumulada de materia seca de esta especie oscila entre las 3 a 7 tn/ha por año, siendo los cultivares tetraploides los de mayor producción (Martin, 2005).

En evaluaciones de cortes, el cultivar Finecut presentó producciones de materia seca promedio que estuvieron en el orden de las 5 toneladas por hectárea (Cornachione, 2007). En otros cultivares de la especie (Boma, Callide, Topcut), se encontraron producciones promedio de materia seca de 9 tn/ha en evaluaciones con un corte final y de 5,2 tn/ha en evaluaciones con cortes frecuentes (cada 7 siete días) (Cornachione et al., 2007).

**Calidad del forraje.** Existen diferencias de acuerdo al cultivar o el manejo que se efectúe. Con respecto al cultivar, los tetraploides suelen mantener la calidad por más tiempo ya que encañan tardíamente. Tarumoto (2005), señaló que los cultivares diploides son neutrales a la longitud del día, mientras que los tetraploides son sensibles al fotoperiodo, y la floración se induce cuando se exponen a días acortándose. Esto último provoca que los cultivares tetraploides encañen más tardíamente. Sin embargo, el mismo autor señala que los cultivares diploides expuestos a longitudes de días cortos (12 horas) aceleran el inicio de la floración cuando las temperaturas medias son mayores a 22°C. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de la composición química para dos cultivares con diferente ploidia.

**Cuadro 1.** Calidad del forraje de dos cultivares de *Chloris gayana* en distintos estados fenológicos

Cultivar	Estado	MS	PB	FDN		FDA		DIVMS		
	Fenológico	(%)	(%) CV	(%) CV	(%) CV	(%) CV	(%) CV			
Finecut (diploide)	Prefloración	23	9	12	73,4	3	40,3	10	59,9	3
	Floración	28	6,8	15	76,2	2	45,4	5	50,1	4
	Diferida	40	5,5	16	80,1	4	51,8	6	48,2	4
Callidae (tetraploide)	Prefloración	24	8,5	13	71,3	7	40,1	4	60,1	9
	Floración	28	6,3	11	78,6	6	47,9	6	49,8	8

Adaptado de Nasca (2006)

En cuanto al manejo de la frecuencia de defoliación o corte, los valores más altos de calidad se encontraron con defoliaciones más frecuentes (Ricci et al., 1997). En el Cuadro 2 se presenta un resumen de la calidad del forraje para dos frecuencias de cortes.

**Cuadro 2.** Calidad del forraje de *Chloris gayana* cv. Común bajo dos frecuencias de cortes

Frecuencia de defoliación (días)	PB (%)	FDA (%)	DIVMS (%)
28	7,8	44,7	52
56	6,4	45,7	47

Adaptado de Ricci et al. (1997)

## 2.2. Crecimiento y desarrollo de las gramíneas forrajeras

En el ciclo de vida de una célula, planta o cultivo transcurren dos tipos de procesos simultáneos e interdependientes, los cuales se encuentran bajo control genético y son regulados por factores ambientales: el crecimiento y el desarrollo (Wilhelm; McMaster, 1995). El primero puede ser definido como el incremento de tamaño (área, volumen, masa) y, por lo tanto involucra cambios cuantitativos; por otro lado el desarrollo, está relacionado con la sucesión progresiva de estados diferenciados fisiológica y/o morfológicamente, y da énfasis a cambios cualitativos que se suceden durante el ciclo de vida (Salisbury; Ross, 1992).

El crecimiento y el desarrollo están fuertemente controlados por las condiciones ambientales. Dentro del medio abiótico, la luz, la temperatura y la disponibilidad de agua y nutrientes se destacan por ser altamente determinantes de los mencionados procesos (Colabelli et al., 1998).

Una planta de gramínea perenne está formada por un conjunto de macollos originados a partir de un macollo primario (Briske, 1991). Los mismos pasan a través de una secuencia de eventos de desarrollo comunes entre géneros (Moore; Moser, 1995). La ontogenia de un macollo puede ser dividida en cuatro períodos de crecimiento: vegetativo, elongación, reproducción y maduración de semillas (Moore et al., 1991). Este comportamiento es general en las gramíneas, y el macollo es la unidad morfofisiológica adecuada para la cuantificación de los procesos denominados por



Chapman; Lemaire (1993) como morfogénesis vegetal. Esto incluye la tasa de aparición de nuevos órganos, su tasa de expansión y su tasa de senescencia y descomposición. La cuantificación de dichos procesos brinda información básica para comprender la dinámica de la producción y pérdida de forraje.

### **2.2.1. Características morfogenéticas**

Para una gramínea en estado vegetativo en la cual solo hojas son producidas, la morfogénesis de la planta puede ser descrita por tres características principales: la tasa de aparición de hojas (TAH), la tasa de elongación foliar (TEF) y la vida media foliar (VMF) (Chapman; Lemaire, 1993). Estas características están determinadas genéticamente, pero son influenciadas por variables ambientales (Parsons, 1988).

La TAH se define como el intervalo de aparición de dos hojas sucesivas. Su inversa, el filocrono, determina el intervalo de tiempo necesario para la aparición de dos hojas consecutivas (Wilhelm; McMaster, 1995; Skinner; Nelson, 1995; Moore; Moser, 1995). Es la variable morfogenética más importante debido a que influencia cada una de las variables estructurales de la planta, desempeñando, por lo tanto, un papel central en la morfogénesis de las plantas (Chapman; Lemaire, 1993; Davies, 1993).

La TEF es la variable más relevante en la expansión del área foliar en gramíneas (Nelson; Sleper, 1981) debido que el crecimiento foliar es predominantemente unidireccional, paralelo al eje longitudinal de la lámina (Mac Adam et al., 1989). El ancho foliar presenta normalmente variaciones de menor magnitud.

La TEF responde en forma directa con el incremento de la temperatura (Peacock, 1975; Stoddart et al., 1986; Gastal et al., 1992), siendo esta respuesta más rápida durante la transición de crecimiento vegetativo a reproductivo (Parsons; Robson, 1980; Gastal et al., 1992; Nabinger, 1997). La tasa de elongación foliar es sensiblemente afectada por el estado nutricional de las plantas, particularmente el nitrogenado y el fosfatado, con incrementos que pueden más que duplicarse entre situaciones de déficit en comparación con situaciones no restringidas, tanto bajo corte (Gastal et al., 1992) como bajo pastoreo (Mazzanti et al., 1994; Rodríguez Palma, 1998).

La VMF se define como el período de tiempo durante el cual el nuevo tejido foliar aparecido permanece verde, es decir, desde su aparición hasta su senescencia (Lemaire; Agnusdei, 2000). La senescencia del tejido foliar está genéticamente programada (Thomas; Stoddart, 1980), y una vez desencadenado el proceso, primero se desmantelan los cloroplastos mientras que estomas y floema permanecen activos hasta las últimas etapas (Feller; Fischer, 1994). La duración de la vida de una hoja se

puede dividir en las fases que comprenden el tiempo entre el nacimiento y su expansión total, el tiempo durante el cual la hoja se mantiene expandida y verde, y el tiempo durante el que se seca hasta la muerte del tejido.

El tiempo empleado para alcanzar la máxima acumulación de hojas verdes tiene importantes connotaciones en el manejo de la frecuencia de defoliación del pasto, la que afecta la cantidad y la calidad de forraje a disposición del ganado. Desde el punto de vista de la producción lo ideal es mantener el intervalo que favorece la máxima acumulación neta de hoja verde. Los periodos entre defoliaciones superiores a este punto favorecen el descenso en la calidad de la dieta debido a una mayor proporción de hoja muerta; mientras que periodos más cortos dan lugar a una dieta de mejor calidad, pero más escasa.

### **2.2.2. Características estructurales**

La combinación de las características morfogénicas mencionadas en la sección anterior determina las tres principales características estructurales de la canopia: tamaño foliar, número de hojas por macollo (NH) y densidad de los mismos (DM). A su vez, estas tres características definen el índice de área foliar de las pasturas (Lemaire; Chapman, 1996).

En esta sección, y dado que los objetivos de esta tesis están centrados sobre los efectos del tamaño de la hoja (largo, área y peso), la revisión se centrará en este aspecto en particular.

#### **2.2.2.1. Largo foliar**

El largo foliar (longitud de hoja totalmente expandida, en adelante largo foliar final, LFF) es el producto de la tasa de elongación foliar (TEF) y la duración del período de elongación (DEF) para una hoja dada (Lemaire; Agnusdei, 2000).

El crecimiento de una hoja de gramínea se restringe a una zona en la base de la hoja, la cual está cubierta por las vainas de las hojas más maduras (Davidson; Milthorpe, 1966; Kemp, 1980; Volenec; Nelson, 1981). Esta zona de crecimiento está compuesta de una zona de división y de una zona de "solo elongación". En el meristema (intercalar) basal, las células se dividen y expanden simultáneamente. Posteriormente, las células son desplazadas a una localización más distal por la formación de nuevas células en la porción basal del meristema. La entrada en la zona de "sólo elongación" está caracterizada por la pérdida de la capacidad de dividirse de las células; en esta región las células sólo se expanden y alcanzan su tamaño maduro

(Skinner; Nelson, 1995; Fiorani et al., 2000). Fuera de la zona de crecimiento, las células entran en una zona de maduración donde tiene lugar deposición de pared secundaria (MacAdam; Nelson, 1987) y formación del aparato fotosintético (Nelson et al., 1992)

La TEF, una de las variables que determina el largo foliar, es función de la longitud de la zona de crecimiento y de la tasa de elongación de cada segmento de la misma. Estos parámetros dependen a su vez de la tasa de producción de células, la tasa de elongación celular y la duración de elongación de las células individuales (Mac Adam et al., 1989; Gastal; Nelson, 1994). Todos estos factores están determinados genéticamente y responden a cambios ambientales que generan diferencias en TEF (Skinner; Nelson, 1995). Trabajos que comparan niveles de nutrición nitrogenada (Marino, 1996; Lattanzi, 1998), niveles de radiación incidente (Bahmani et al., 2000), cultivares de una misma especie (Nelson; Sleper, 1981; Hazard et al., 1996; Lattanzi, 1998; Bahmani et al., 2000), y especies (Marino, 1996; Labreveux, 1998; Fiorani et al., 2000), muestran que la variación encontrada en LFF es explicada mayormente por cambios en la TEF, mientras que la duración de la elongación permanece relativamente constante.

En la revisión precedente se ha descrito la elongación de la hoja sin distinguir entre lámina y vaina. La separación entre ellas está dada por la lígula, la cual se ha determinado en festuca alta que aparece en la zona de división cuando la lámina ha alcanzado aproximadamente el 20% de su longitud final (Skinner; Nelson, 1994). Durante las etapas iniciales de la elongación de la hoja, sólo la lámina está creciendo activamente (Kemp, 1980; Volenec; Nelson, 1981). La transición entre crecimiento de la lámina y vaina ocurre sin cambios perceptibles en la tasa total de elongación de la hoja. Sólo cuando la vaina está alcanzando su longitud final, es decir, previamente a la exposición de la lígula, la elongación de la hoja disminuye rápidamente (Robson, 1972; Gallagher, 1979; Thomas, 1983; Schnyder et al., 1990). Por lo mencionado, distintos autores han sugerido que la zona de elongación de la lámina y de la vaina podría ser tratada como un continuo cuando se analiza la elongación de la hoja (Kemp, 1980; Schnyder et al., 1990).

La longitud final de la lámina incrementa en hojas sucesivas de canopias vegetativas debido a que las mismas deben atravesar un tubo de vainas cada vez mayor (Wilson, 1976; Skinner; Nelson 1995; Groot; Neuteboom, 1997; Duru; Ducroq, 2000). Por lo tanto, las vainas de las hojas más viejas ejercen un efecto morfogénico directo sobre la longitud de las láminas jóvenes. Según Begg; Wright (1962) y Wilson; Laidlaw (1985), la

emergencia de la punta de la lámina por fuera del tubo de vainas dispararía una señal que determinaría la cesación de producción de células de lámina en el meristema. Dichos autores mencionan que la división celular y, por ende la duración de la elongación de la lámina, serían más prolongados en láminas que atraviesan vainas largas respecto de láminas de plantas con un tubo más corto. Sin embargo, Skinner; Nelson (1995) señalaron que la formación de la lígula y, en consecuencia, la cesación de la elongación de la lámina, ocurre días antes de la aparición de la hoja por fuera del tubo de vainas. Por lo tanto, la luz no sería el factor que determina el cese de la elongación de la lámina. En distintos trabajos (Casey et al., 1999; Arredondo; Schnyder, 2003; Kavanová et al., 2006), se ha encontrado que el largo del tubo de vainas está altamente relacionado a la longitud de la zona de crecimiento de la hoja. Dicha zona influye principalmente en la TEF, sin provocar cambios en la duración de la elongación, por lo tanto, un acortamiento del tubo de vainas modificaría la longitud de las láminas por disminución de la TEF. Fiorani et al., (2000), señalaron que el mecanismo causal de la relación entre la longitud de vainas con la TEF y la longitud de la zona de crecimiento no es clara.

El patrón de incremento de la longitud de las láminas sucesivas en macollos vegetativos explicado anteriormente, puede ser revertido cuando los entrenudos comienzan a elongar (Maas et al., 1987; Maan et al., 1989). En estos casos, el tubo de vainas alcanza una longitud máxima y luego disminuye cuando los entrenudos elongan causando un acortamiento del tubo. Esto generalmente reduce más la longitud de la lámina en desarrollo que la longitud de la vaina (Skinner; Nelson 1995). Según Sbrissia; Da Silva (2001), el alargamiento del tallo aún en estado vegetativo es propio de la morfogénesis de las gramíneas megatérmicas y contrasta con el patrón característico descrito para las especies templadas (Chapman; Lemaire, 1993).

#### **2.2.2.2. Área, peso y área foliar específica**

Durante el proceso de crecimiento, las gramíneas aumentan el área de sus hojas con el objeto de capturar energía lumínica para la fotosíntesis y otras funciones de crecimiento. El área foliar específica (AFE), definida como la proporción de área de lámina y su peso seco, es un componente de la tasa de crecimiento relativo y representa la asignación de C que realiza la planta en la formación de material fotosintético (Lambers et al., 1989). Dingkuhn et al. (2001) mencionaron que el AFE determina el costo de producir una unidad de área de hoja y mencionaron que especies

con alto AFE en las etapas iniciales de crecimiento tienen ventajas adaptativas sobre aquellas de bajo AFE porque cubren el suelo más rápidamente.

El AFE en gramíneas, y también en dicotiledóneas (Cole, 1975; Jurik, 1986), sigue un patrón característico a medida que las hojas completan su expansión. MacAdam; Nelson (1987), observaron en festuca alta que la inversa del AFE (el peso específico de hoja, Pe), es alto cuando las laminas no están desplegadas, disminuye cuando ellas se expanden e incrementa cuando ellas maduran. Este patrón también fue observado a nivel de la zona de crecimiento de esta gramínea. El Pe es alto en la base de la hoja debido a que las células están estrechamente empaquetadas y dividiéndose activamente. Luego, el Pe disminuye en la zona de elongación debido que las células experimentan expansión y vacuolización. En el extremo distal de la zona de elongación donde las células dejan de elongar, el Pe fue mínimo debido a que aún las células presentan paredes finas. Más allá de dicho punto, en la zona de maduración, el Pe incrementa debido a que hay deposición de pared secundaria.

El AFE generalmente es mayor cuando las plantas están sombreadas (Groot; Neuteboom, 1997; Rodriguez et al., 2000), cuando no hay deficiencia de nutrientes (Ryser et al., 1997; Rodriguez et al., 2000) y en plantas defoliadas (Groot et al., 1999; Lattanzi et al., 2004; Cullen et al., 2006). A nivel de macollo, Groot; Neuteboom (1997) han encontrado que el AFE disminuye en hojas sucesivas como consecuencia de un incremento mayor en peso de las láminas con respecto al área de las mismas. Esta disminución del AFE fue mayor en plantas no sombreadas (plantas aisladas) respecto a plantas sombreadas (plantas mantenidas como en una pastura).

### **2.3. El estudio de la calidad del forraje**

El estudio de la calidad tiene una larga y rica historia con un auge en la década del 50, que posteriormente se fue enriqueciendo con la aparición de nuevas metodologías que permitieron investigar distintos aspectos de la misma. El tema es complejo porque queda a criterio del autor (i) el uso de la terminología, (ii) el enfoque del estudio, (iii) los parámetros a cuantificar y la (iiii) metodología a utilizar. En esta tesis la calidad del forraje se analiza como una consecuencia del crecimiento, lo cual implica acumulación de biomasa y de estructuras indigestibles (FDNi). Por ello, la variable respuesta se mide en términos de contenido y digestibilidad de la fibra (FDN) y en segundo lugar se analiza su relación con distintos parámetros utilizados para definir la calidad del forraje.

### 2.3.1. Breve reseña histórica.

El análisis de alimentos comienza en 1859, en que un grupo de investigadores de la estación experimental de Weende (Alemania) idearon una serie de procedimientos para medir distintas fracciones del alimento. El método, que aún se utiliza, se conoce como “Análisis Proximal” o “Esquema de Weende” y divide la materia seca en las siguientes fracciones: materias minerales o cenizas, materias nitrogenadas totales, materia grasa o extracto etéreo, fibra bruta y extractos no nitrogenados. Sin embargo, ninguno de ellas corresponde estrictamente a compuestos químicos puros o uniformes. El mayor inconveniente de dicho método está en la evaluación de la fibra (FB) que corresponde a la celulosa. En cuanto al primer registro de uso de la técnica de digestibilidad in vitro fue en 1919 de Waenting y Gierisch (Hungate, 1966), pero este método produjo valores de digestibilidad que fueron alrededor de 50 % menos que los valores in vivo esperados.

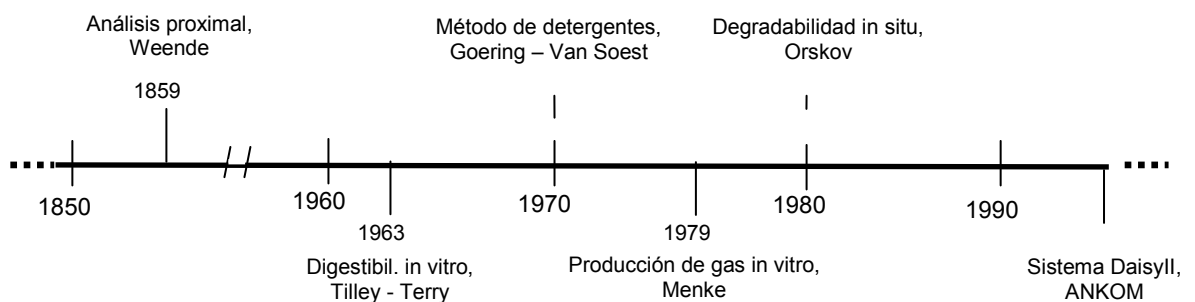
Los principales avances en evaluación de forrajes se producen en la década del 60 con el desarrollo del procedimiento Tilley; Terry (1963) para medir la digestibilidad in vitro y en la década del 70 para medir la fibra con el método de Goering; Van Soest (1970). Estos últimos autores separaron la pared celular con detergente neutro (FDN) y separaron la celulosa con detergente ácido (FDA) y la lignina con ácido sulfúrico, de esta forma se obtiene la hemicelulosa por diferencia. Ambas metodologías predominan en la bibliografía hasta la actualidad y son hitos en la evaluación de forrajes.

El método de Tilley y Terry es el más usado en el análisis de los alimentos y ha sido el método de laboratorio más preciso para predecir la digestibilidad (Goldman et al. 1987; Stern et al., 1997 citados por Mabweesh et al., 2000). Sin embargo, requiere mucho tiempo de incubación y cada muestra se incuba por separado. Las distintas modificaciones existentes (Alexander; McGowan, 1966; Minson; McLeod, 1972) no han mejorado estos aspectos, por lo se buscaron otras alternativas para reemplazarlo.

El método de Tilley y Terry tampoco permite estudiar la cinética del proceso de degradación en el rumen. A tal efecto se utilizan dos metodologías que aparecieron en la década del 80, la de bolsita de nylon (Ørskov et al., 1980), también llamado in situ o in sacco, y la técnica de producción de gas in vitro desarrollada por Menke et al. (1979) y Menke; Steingass (1988). En ésta última se mide el gas producido durante la fermentación y se usa tanto para estudiar la cinética como para medir la digestibilidad in vitro. Con respecto a la cinética tiene la ventaja que permite estudiar la degradación de los componentes solubles de los alimentos (Pell; Schofield, 1993, que son considerados inmediatamente “degradados” en el método in situ. Sin embargo, con respecto a la

digestibilidad no existen ecuaciones confiables que permitan convertir el volumen de gas en valores de digestibilidad, por lo que hay gran controversia entre autores con respecto a su utilidad (Beever; Mould, 2000; Pell et al., 2000).

Finalmente, la búsqueda por mejorar la eficiencia de trabajo del método in vitro de Tilley y Terry, ha llevado al desarrollo del aparato DaisyII (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY, EEUU), el cual permite la incubación simultánea de diferentes alimentos en bolsitas selladas en el mismo frasco de incubación. Holden (1999) realizó una comparación entre el método de dos etapas y el DaisyII, y encontró una buena relación entre los dos métodos, indicando que este último puede ser utilizado para predecir la digestibilidad in vitro de forrajes y granos. En la Figura 1, se muestra una síntesis sobre la aparición en el tiempo de los distintos métodos de evaluación de calidad.



**Figura 1.** Evolución de los métodos de evaluación de calidad del forraje

### 2.3.2. Terminología utilizada

En la evaluación de forrajes como alimento para el ganado no existe una terminología que tenga el mismo significado para distintos autores. Tampoco dentro de la misma terminología se incluyen los mismos parámetros, ni el mismo parámetro está evaluado de la misma manera. El problema mayor es con la digestibilidad y la fibra, ya que para ambos parámetros existen distintos métodos y aún dentro del mismo método hay diferencias entre laboratorios que no están estandarizadas a nivel mundial. Sin duda la digestibilidad, que se puede medir por distintos métodos como se comentarán posteriormente, es la que presenta mayores problemas ya que de ella se estima la energía metabolizable (EM) del alimento. Las diferencias entre las distintas metodologías ha llevado a Robinson et al. (2004) a concluir que debido a los objetivos cambiantes en el mundo de la nutrición, es poco probable que en un futuro próximo la

investigación tenga como objeto mejorar la precisión y exactitud con la que las distintas metodologías realizan la estimación de la EM.

Con la fibra obtenida por el método de Van Soest et al. (1991) también ocurre lo mismo, para lo cual la revista *Feed Science and Technology* en el año 2005 ha editado una lista de términos (Cuadro 3) que recomienda utilizar para enviar una publicación.

**Cuadro 3.** Terminología recomendada por la revista *Feed Science and Technology* (2005) al enviar una publicación de acuerdo al procedimiento seguido para determinar fibra.

Terminología	Referencia
FDN <sub>amo</sub>	FDN evaluada con amilasa estable al calor y expresada sin incluir cenizas
FDN <sub>mo</sub>	FDN no evaluada con amilasa estable al calor y expresada sin incluir cenizas
FDN <sub>a</sub>	FDN evaluada con amilasa estable al calor y expresada incluyendo cenizas
FDN	FDN evaluada sin amilasa estable al calor y expresada incluyendo cenizas
FDA <sub>mo</sub>	FDA expresada sin incluir cenizas
FDA	FDA expresada incluyendo cenizas
Lignina (as)	Lignina determinada por solubilización de celulosa con ácido sulfurico
Lignina (pm)	Lignina determinada por oxidación de lignina con permanganato

Entre el gran abanico de términos encontrados en la bibliografía científica para referirse a la calidad del forraje, los cuales se usan como sinónimos se pueden citar los siguientes: calidad forrajera (Mott; Moore, 1969 citado por Reid, 1994), calidad nutritiva o valor nutritivo (Crampton et al., 1960) y valor alimenticio (Demarquilly; Weiss, 1970). Al no existir una norma o criterio sobre su uso, queda librado al criterio del autor. Por lo tanto distintos términos pueden referirse a la misma evaluación, por ejemplo calidad nutritiva, valor nutritivo o calidad forrajera pueden estar haciendo referencia a la digestibilidad, proteína y FDN. Así como también el mismo término puede referirse a distintos parámetros, por ejemplo un autor puede utilizar la calidad nutritiva para referirse a la digestibilidad, proteína y FDN, y otro a la PB, FDN, FDA y lignina.



### **2.3.3. Enfoques para evaluar la calidad del forraje**

Tradicionalmente el estudio de calidad del forraje se realizó considerando biomasa total y su fraccionamiento en vivo y muerto o en hojas y tallos. Asimismo, las evaluaciones de cortes de forraje para determinación de calidad se realizan, por lo general, a tiempos de rebrote fijos sin tener en cuenta la dinámica de producción y senescencia del material en estudio. Por otra parte, distintos autores (Akin, 1981; Akin et al. 1987; Akin; Chesson, 1989; Wilson; Hattersley, 1989; Wilson, 1990; Wilson, 1993) centraron sus estudios sobre la descripción de los distintos tejidos y su degradabilidad. También hay trabajos a un nivel intermedio que estudian la calidad considerando la dinámica del crecimiento a nivel de las hojas de macollos vegetativos (Groot; Neuteboom, 1997; Groot et al., 1999; Duru et. al., 1999; Duru; Ducroq, 2002). Es decir, la calidad del forraje puede ser evaluada desde distintos puntos de vista según se considere la biomasa total, sus fracciones morfológicas obtenidas a tiempos fijos o considerando la dinámica del crecimiento y recambio de hojas.

### **2.3.4. Parámetros que definen la calidad**

El parámetro de referencia en la evaluación de calidad del forraje es la digestibilidad de la MS. La digestibilidad se puede medir in vivo o in vitro y se puede expresar en términos de MS, MO o FDN. Algunos laboratorios no miden la digestibilidad in vitro, sino que la estiman a partir de la FDN, FDA o lignina (Weiss, 1994).

Otros parámetros que se incluyen en una evaluación son la proteína bruta (PB), fibra bruta (FB) o fibra en detergente neutro (FDN) o en detergente ácido (FDA) y lignina.

A continuación se hará una breve referencia a los métodos de laboratorio más comúnmente utilizados en la determinación de digestibilidad.

#### **2.3.4.1. Digestibilidad in vitro**

##### **2.3.4.1.1. Método de Tilley y Terry (1963)**

Consiste en una fermentación inicial de la muestra con microorganismos ruminales junto a una solución buffer y en condiciones anaeróbicas durante 48 h. En una primera etapa se simula la digestión ruminal, y en una segunda etapa, se simula la digestión postruminal, donde el residuo de la etapa anterior se trata con pepsina ácida durante otras 48 h. El residuo resultante representa la fracción indegradable a partir del cual se calcula la digestibilidad de la MS.

#### **2.3.4.1.2. Método Daisy II (ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU)**

Esta técnica fue desarrollada con el objetivo de simplificar la estimación de digestibilidad in vitro. Consiste en una fermentación de las muestras colocadas en bolsitas dentro de frascos con licor ruminal que rotan dentro de una cámara mantenida a 39 °C. En el método original el residuo indigestible (MS) se lava con detergente neutro y se obtiene el residuo de FDN. A partir del dicho residuo se obtiene:

- 1) Digestibilidad de la FDN: FDN incubada – FDN residual.
- 2) Digestibilidad verdadera: MS incubada – FDN residual.

Como la digestibilidad del método de Tilley y Terry es digestibilidad aparente de la MS, la digestibilidad verdadera del DaisyII se puede convertir en digestibilidad aparente restando el factor metabólico de Van Soest (1994). Esto es: Digestibilidad aparente de la MS: Digestibilidad verdadera -11,9. Según este autor dicha estimación es tan precisa como la de la técnica de Tilley; Terry (1963) y requiere la mitad de tiempo para obtenerla

Hay que considerar que existen distintos factores que pueden hacer variar los resultados en el método DaisyII, por ejemplo el tamaño de poro y tipo de bolsita, método de lavado y secado de las mismas, dado que pueden generar potenciales pérdidas de partículas pequeñas (Colombatto, 2006). También, hay cierta controversia en la bibliografía sobre el tiempo de incubación de la muestra. Hoffman et al. (2003) y Oba; Allen (2005) mencionan que el periodo de incubación estándar de 48 h sobreestimaría los valores de digestibilidad in vivo. Estos autores aducen que aún en animales en mantenimiento el tiempo de retención sería menor a 48 h, y que por lo tanto en muestras molidas de forraje habría una tasa de digestión mayor que in vivo. Por lo tanto con la reducción del tiempo de incubación se compensaría esa mayor tasa.

Otro argumento a favor de reducir el tiempo de incubación es que las láminas de gramíneas megatérmica permanecerían en el rumen menos de 25 h y los tallos 33 h (Minson, 1982). También hay que considerar que en las láminas hay tejidos de distinta facilidad de digestión (Akin, 1989; Wilson, 1993). Es así que un tiempo de incubación prolongado favorecería a aquellas fracciones con mayor proporción de tejidos que se degradan más lentamente, que son los de menor importancia para el animal. En el Cuadro 4 se puede observar que las determinaciones a 30 y 48 h están altamente asociadas ( $R^2=0,82$ ) y que aumentando 18 h la incubación implica un aumento de digestibilidad de aproximadamente 10% (Hoffman et al., 2003).

**Cuadro 4.** Factores simples para convertir digestibilidad in vitro FDN de 30 a 48 h en forrajes comunes

Forrajes	Factor de conversión digestibilidad FDN, % FDN	
	30 h a 48 h	48 h a 30 h
Silaje de gramíneas	+11,9	-11,9
Heno de gramíneas	+10	-11,9
Silaje de maíz normal	+9,0	-9,0
Silaje de maíz nervadura marrón	+9,0	-9,0

Adaptado de Hoffman et al. (2003)

#### 2.3.4.1.3. Técnica de producción de gas in vitro

Menke et al. (1979) y Menke; Steingass (1988) desarrollaron esta técnica que permite valorar el valor nutritivo y estimar la tasa y magnitud de degradación de la MS a distintos horarios en forma indirecta utilizando la cantidad de gas producida (CO<sub>2</sub>) durante la fermentación. Esta técnica a diferencia de los métodos in situ, tiene en cuenta los componentes solubles de los alimentos (Pell; Schofield, 1993). Trabajos realizados por Khazaal et al. (1993) y Kamalak et al. (2005), indicaron que tanto la producción de gas in vitro como la degradabilidad de la MS in vitro presenta buena correlación con la digestibilidad in vivo. Sin embargo, algunos autores han señalado que una principal limitante de este método es asumir que la producción de gas es directamente proporcional a la digestión del sustrato y entonces de su valor nutritivo (Beever; Mould, 2000). Esto no sería adecuado porque la producción de gas es dependiente de la composición del sustrato, las poblaciones microbianas y la utilización de hexosas para crecimiento bacteriano (Colombatto, 2006). Si bien esta metodología es útil para describir la cinética de la digestión, ya que presenta ventajas sobre la técnica in situ para estudiar la fracción soluble, no se ha difundido para obtener valores puntuales de digestibilidad in vitro porque no existen ecuaciones, con excepción de las de Menke et al. (1979), para convertir el volumen de gas a digestibilidad.

#### **2.3.4.2. Ecuaciones de predicción**

Las ecuaciones predictivas de digestibilidad son una alternativa para evaluar rápidamente alimentos en los laboratorios comerciales de nutrición. Estas ecuaciones estiman la digestibilidad del alimento a partir de sus componentes químicos o de los constituyentes de la pared celular (Weiss, 1994). Entre las más utilizadas se encuentran la ecuación sumativa de Van Soest (1967) y la ecuación empírica de Rohweder et al. (1978). Estas ecuaciones se diferencian en que la primera estima la digestibilidad a partir de los componentes solubles y los de la pared celular, mientras que la segunda se basa únicamente en la fibra detergente ácida (FDA). Entre las ventajas de estas ecuaciones en la determinación de la digestibilidad, se ha mencionado la simplicidad, rapidez y menos costos de la determinación de los compuestos químicos. Como principal desventaja, se ha señalado la menor correlación con la digestibilidad in vivo. Posibles razones para esta menor correlación incluyen la ineficacia de los análisis químicos para representar la complejidad de un sistema biológico, y la falta de representación de la cinética de los procesos de digestión (Weiss, 1994).

#### **2.3.5. Importancia de la digestibilidad de materia seca y de la FDN**

Como ya se mencionó la digestibilidad de materia seca es el principal indicador de la calidad de un alimento y es el parámetro para calcular la energía metabolizable del alimento (ARC, 1980; AFRC, 1992; NRC, 1996). También es importante por su relación con el consumo voluntario. Sin embargo, dicha relación ha sido discutida por varios autores, quienes han mencionado una gran variabilidad de resultados. Minson (1990) menciona coeficientes de determinación que van desde 0,16 a 0,80. De igual manera, Moore; Coleman (2001) observan correlaciones entre consumo y digestibilidad desde 0,32 hasta 0,86. Por tal motivo, estos autores sugirieron que debido a la inconstancia de las relaciones, estas dos variables deberían considerarse como características independientes a la hora de describir la calidad de un forraje.

Debido a las limitaciones de la digestibilidad de materia seca para predecir el consumo, algunos autores (Oba; Allen, 1999; Hoffman et al., 2003) señalaron que la digestibilidad de FDN es un parámetro que se relaciona mejor con el consumo animal, constituyéndose por lo tanto en una importante determinación de calidad. Oba; Allen (2005), determinaron que 1 unidad de aumento en el contenido de DFDN en la dieta, resulta en un 0.177 kg/día de incremento en el consumo de materia seca. Además, dichos autores señalaron que la DFDN es una medida independiente de otras que son

comunes en las evaluaciones de forrajes, por ej. FDN, FDA, LDA y PB, por lo tanto aporta información sobre la calidad que no es obtenida con dichas determinaciones.

### **2.3.6. Factores que afectan la digestibilidad**

Si bien existen múltiples factores, propios de la pastura, del animal y del ambiente que pueden afectar la digestibilidad y, por ende, la calidad del forraje, en esta revisión se abordará aquellos que son objeto de estudio en esta tesis.

#### **2.3.6.1. Barreras químicas y físicas**

En la bibliografía se reconocen dos tipos de barreras que limitan la digestión de los compuestos de la pared celular, las químicas y físicas.

Las barreras químicas han estado asociadas generalmente al incremento de la lignina, lo cual provoca la caída de digestibilidad de los constituyentes de la pared celular (Jung, 1989; Van Soest, 1993; Jung; Allen, 1995). La lignina es un polímero de alcoholes cuyos precursores más importantes son el p-cumaril, coniferil y sinapil (Jung; Allen, 1995). La lignificación se produce por sucesivas deposiciones de los polímeros en la pared celular hasta formar un compuesto en el cual los polímeros son unidos unos con otros de una manera física y química. Este proceso comienza en la pared primaria, sigue por la laminilla media y termina en la pared secundaria (Wilson, 1994). Los ácidos fenólicos ferúlico (AF) y p-cumárico (APC) juegan un rol muy importante en la formación de la lignina. Por un lado, estos ácidos que se depositan durante la formación de la pared primaria y secundaria son los precursores junto al ácido sinápico de los alcoholes: p-cumaril, coniferil y sinapil (Ralph; Helm, 1993). Por otro lado, el AF y el APC pueden estar unidos a la lignina o a los polisacáridos de la pared ó a ambos generando una cerrada asociación física entre estos compuestos.

La relación negativa entre el contenido de lignina y la digestibilidad ha sido reconocida desde hace muchos años (Sullivan, 1959; Johnson et al., 1962; Tomlin et al., 1964). Sin embargo, Jung; Allen (1995) señalaron que algunas desviaciones de esta relación han sido reportadas en la bibliografía. Por ejemplo, Van Soest, (1967) y Jung; Vogel (1986), encontraron que los efectos de la lignina sobre la digestión de la fibra disminuye cuando la concentración de lignina incrementa. Halim et al. (1989); Jung; Casler (1991); Jung; Russelle (1991); Jung; Vogel (1992), mostraron que no existe correlación entre concentración de lignina y digestibilidad de la fibra, mientras que Jung et al. (1994), encontraron correlaciones positivas de la lignina con la digestibilidad. Según Jung; Allen (1995), las principales fuentes de variación de la relación

lignina/digestibilidad está asociada al tipo de forraje estudiado y al método de determinación de la concentración de lignina. Relaciones negativas fuertes se han encontrado cuando se incluye material obtenido en diferentes estados de madurez y cuando se analiza la masa total de forraje. En cuanto a la determinación del contenido de lignina, numerosos métodos se han desarrollado y han sido clasificados entre aquellos que realizan determinaciones gravimétricas (LDA, Klason, lignina permanganato) y los basados en métodos no invasivos (determinaciones mediante espectroscopia infrarroja). Según Hatfield; Fukushima (2005), los métodos más comúnmente usados son el procedimiento ácido sulfúrico al 72% o Klason, y el método de lignina de detergente ácido (LDA) propuesto por Goering; Van Soest (1970). Fukushima; Hatfield (2004), mostraron una alta variabilidad en las estimaciones de lignina para una misma muestra obtenidas por diferentes métodos, encontrando los valores más bajos para la determinación por el método LDA. Por lo tanto, especial cuidado debe tomarse cuando se comparan estimaciones obtenidas por diferentes métodos (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Una comparación de los valores medios de lignina ( $\pm$  DE) generados de la aplicación de distintos métodos en un rango de muestras de forrajes.

Material	LDA	Lignina Klason	Permanganato
Alfalfa FBLS	92,5 $\pm$ 3,0	144,8 $\pm$ 0,4	157,6 $\pm$ 16,8
Alfalfa FBUS	59,3 $\pm$ 0,3	111,4 $\pm$ 0,6	95,3 $\pm$ 10,9
Trébol rojo	41,7 $\pm$ 1,3	71,3 $\pm$ 1,5	115,6 $\pm$ 8,1
Bromus BSWS	30,4 $\pm$ 0,1	100,4 $\pm$ 13,8	64,1 $\pm$ 1,7
Bromus An WS	36,5 $\pm$ 1,3	109,8 $\pm$ 15,6	69,9 $\pm$ 6,4
Rastrojo de avena OSL	106,9 $\pm$ 2,8	138,1 $\pm$ 1,9	71,3 $\pm$ 8,1
Rastrojo de avena OSS	83,3 $\pm$ 0,6	171,2 $\pm$ 1,6	111,5 $\pm$ 5,4
Rastrojo de trigo WSL	103,4 $\pm$ 10,5	141,6 $\pm$ 0,1	74,3 $\pm$ 11,6
Rastrojo de trigo WSS	89,1 $\pm$ 10,8	184,2 $\pm$ 2,1	122,0 $\pm$ 12,9

Adaptado de Fukushima; Hatfield (2004)

Las características anatómicas de las células, principalmente aquellas que poseen paredes gruesas (células de la vaina del haz y esclerénquima), pueden ser tan importantes como la lignina en limitar la digestión de la fibra. Wilson; Mertens (1995), denominaron a estas limitaciones como barreras físicas a la digestión para diferenciarles de las barreras químicas relacionadas principalmente con la lignina. En

este sentido, algunas de las características estructurales que limitan la digestión de la fibra señaladas por Wilson; Mertens (1995) son: 1) la laminilla media y la pared primaria lignificada son indigestibles, ellas cementan las células adyacentes formando partículas de fibra multicelular, reduciendo o eliminando los espacios intercelular y dando la apariencia de una estructura indigestible. En este caso, la digestión solo puede proceder desde el interior de las células y para ello las partículas de fibras deben ser expuestas o quebradas por masticación; y 2) La digestión de las células de paredes gruesas requieren de la fijación de las bacterias a la superficie de las células. Por lo tanto con el incremento en grosor de la pared, la superficie para la fijación es menor en relación volumen de pared celular a ser digerido disminuyendo la digestibilidad de la pared.

#### **2.3.6.2. Tipos de tejidos**

Los tejidos de las gramíneas pueden imponer distintas limitaciones a la digestión según sean sus características anatómicas y la proporción que de ellos se encuentre en los distintos órganos de las plantas. En los forrajes, pueden encontrarse cinco tipos de tejidos: haces vasculares conteniendo células del floema y xilema, vaina del haz parenquimática que rodea el tejido vascular, esclerénquima que conecta los haces vasculares a la epidermis, células del mesófilo entre los haces vasculares y las capas epidérmicas, y, en el exterior, una capa simple de células epidérmicas cubiertas por una cutícula protectora (Akin, 1982). De acuerdo a la facilidad de digestión los tejidos han sido ordenados de la siguiente manera (Akin, 1989; Wilson, 1993): mesófilo y floema, epidermis y vaina parenquimática, esclerénquima, tejido vascular lignificado. Estas diferencias en digestibilidad de los tejidos están básicamente dadas por la cantidad de contenido soluble de las células y el grosor de la pared celular. Una mayor digestibilidad generalmente está asociada a un mayor volumen relativo de tejidos con alto contenido soluble y/o paredes primarias no lignificadas (mesófilo, floema, parénquima, clorénquima, células epidérmicas) versus tejidos con bajo contenido soluble y paredes gruesas lignificadas (haces vasculares, xilema y esclerénquima) (Wilson, 1997). Una síntesis de los tipos de tejidos y su digestibilidad se presentan en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Síntesis de tejidos de plantas y su digestibilidad

Tejido	Función	Digestibilidad
Mesófilo	contiene cloroplastos	Alta
Parénquima	Metabólico	moderada a alta
Vaina del haz parenquimática	contiene cloroplastos	moderada a alta
Fibra del floema	Estructural	Moderada
Epidermis	Termal	baja a alta
Tejido vascular	Vascular	ninguna a moderada
Esclerénquima	Estructural	ninguna a baja

Adaptado de Buxton; Redfearn (1997)

Entre tipos de especies de gramíneas C3 y C4 existen diferencias en la proporción de cada uno de los tejidos mencionados anteriormente (cuadro 7), lo cual explicaría la mayor parte de la diferencias en la composición de la fibra entre los dos tipos de gramíneas (Akin, 1989). En general, las gramíneas C3 tienen una proporción mayor de mesófilo, menor de vaina parenquimática (comparada con la vaina kranz de las C4), de esclerénquima, de tejidos vasculares y de epidérmicos que la especies C4 (Akin, 1984; Akin, 1989; Wilson; Hattersley, 1989). En particular, la vaina parenquimática del haz presenta una gran variación entre los tipos de vías fotosintética (Wilson et al., 1983). En las especies C4 dicha estructura es conocida como vaina kranz, la cual está formada por células de paredes muy gruesas comparadas con la vaina parenquimática de las C3 y posee una laminilla suberizada en las paredes radiales y tangenciales que es muy resistente a la digestión microbiana (Wilson; Hattersley, 1989). La digestión de la vaina parenquimática es muy lenta en las C4 y fácil en las especies C3 (Akin, 1984).



**Cuadro 7.** Proporción promedio de tejidos (% área transversal) de láminas de gramíneas C4 y C3.

Especie	EPI	MES	ESC	VAS	BS	Ref
C4	35	38	6	6	15	A
	29	39	3	9	21	B
C3	23	57	6	9	6	A
	22	60	2	6	9	B

EPI, epidermis; MES, mesófilo; ESC, esclerénquima; VAS, bandas vasculares; BS, vainas del haz parenquimática. Referencia: A, Akin (1989) y B, Wilson (1990). Adaptado de Wilson (1997).

### 2.3.6.3. Edad

Los cambios de digestibilidad en los forrajes comúnmente han sido asociados a distintos estados fenológicos por los cuales atraviesan las plantas a lo largo de su ciclo de vida, principalmente con el pasaje de estado vegetativo a reproductivo. Estudios sobre variaciones en la digestibilidad debido a cambios en la composición química y en la relación hoja:tallo con el avance del periodo de crecimiento de la pastura, frecuentemente son encontradas en la bibliografía.

En trabajos recientes se ha demostrado que pérdidas de calidad también ocurren durante la etapa vegetativa de la pastura. En este estado existen múltiples ciclos de envejecimiento tisular (recambio de tejido) que tienen lugar dentro de un lapso de tiempo corto en relación al ciclo fenológico. En este sentido, Groot; Neuteboom (1997) evaluaron las variaciones en digestibilidad de materia orgánica (DMO) a lo largo del ciclo de vida de las láminas de raigrás anual. Estos autores encontraron que la DMO de la lámina decrece progresivamente a partir de su aparición o emergencia fuera del tubo de vainas (pseudotallo), y que el proceso de pérdida de calidad prosigue por un cierto tiempo con posterioridad a la finalización del período de elongación. Este patrón de caída de la digestibilidad es similar entre láminas de diferente edad o momento de aparición. En trabajos realizados en otras gramíneas templadas, Cordero (1996) en festuca, Pascuet (2003) en agropiro y Duru; Ducroq (2002) en pasto ovillo, también observaron disminuciones de la digestibilidad asociadas al aumento en la edad de las hojas, con caídas importantes de los valores al pasar del estado de hoja joven, o recientemente aparecida, al estado de hoja senescente, o en vías de finalizar su ciclo. En gramíneas tropicales, se ha mencionado que esta caída puede llegar a ser más

importante debido a su estructura anatómica distinta a la de las gramíneas templadas, lo cual está asociado con su ruta fotosintética y las temperaturas más altas a las cuales estas gramíneas crecen (Minson, 1990).

Los cambios en digestibilidad mencionados anteriormente asociados con el envejecimiento de los tejidos, han sido explicados comúnmente como consecuencia de dos procesos principales. Uno es la exportación de compuestos solubles desde las hojas senescentes hacia aquellas en proceso de expansión, y el otro es por el incremento de los compuestos que forman la pared celular y la disminución de la digestibilidad de los mismos. Groot; Neuteboom (1997), asociaron los cambios de digestibilidad a un incremento en la proporción de pared celular indigestible (FDNi) en la materia orgánica de las láminas. Estos autores señalaron que el tiempo de acumulación de FDNi en láminas individuales, podría ser descrito adecuadamente por una curva de saturación exponencial negativa.

La caída de digestibilidad de los constituyentes de la pared celular, como se explicó en secciones anteriores, está asociada a la existencia de barreras químicas relacionadas a la lignina y a precursores de lignina, y barreras físicas asociadas al arreglo estructural de las células. La pared de las células atraviesa por dos fases durante su crecimiento y desarrollo: el crecimiento primario que ocurre cuando las células de la planta elongan, y el crecimiento secundario que se inicia cuando cesa la elongación de las células (Jung; Allen, 1995). Durante el crecimiento primario hay deposición de pectinas, xilanos y celulosa pero aun no hay deposición de lignina. Los ácidos ferulicos y cantidades pequeñas de ácido p-cumarico son esterificados a polímeros de arabinoxilanos y depositados también en la pared (He; Terashima, 1989,1990 citados por Jung; Allen, 1995). En el crecimiento secundario, la pared celular se vuelve progresivamente más gruesa y crece desde el borde interno de la pared primaria hacia el centro de la célula de la planta. En esta fase se produce la deposición de lignina, cuya inclusión comienza en la laminilla media, y la región de la pared primaria original, y luego procede dentro de la pared secundaria. Los efectos de este patrón de deposición de la lignina son que los polisacáridos recientemente depositados de la pared secundaria no son lignificados y la laminilla media y la pared primaria son las más intensamente lignificadas (Jung; Allen, 1995). También durante esta fase, hay incorporación de ácidos fenólicos y p-cumárico (Iiyama et al., 1990). Durante el engrosamiento de la pared, la composición de la lignina cambia desde el tipo guaiacil (predomina el alcohol coniferil) hacia el tipo siringil (predomina el alcohol sinapil), (Akin; Chesson, 1989; Terashima et al., 1993; Jung; Allen, 1995). Las unidades guaiacil

pueden formar más enlaces con los polisacáridos que las unidades de sinapil. Esto genera una mayor relación lignina/polisacáridos en la pared primaria y laminilla media que en la pared celular secundaria, donde la lignina es más rica en unidades de siringil. En consecuencia la lignina formada durante estados tempranos (rica en guaiacil) es más condensada y más inhibitoria de la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular que la formada más tardíamente (Terashima et al., 1993; Jung; Deetz, 1993). Estos cambios composicionales en la pared son acompañados en paralelo por cambios anatómicos.

#### **2.3.6.4. Tamaño**

Las características morfogénéticas y estructurales de las gramíneas están estrechamente vinculadas a la calidad del forraje, según lo mencionan en sus trabajos Duru; Ducroq (2002) y Groot et al. (1999, 2003). Estos autores mostraron que a medida que aumenta el área de la lámina, como así también su biomasa disminuye la proporción de material digestible. Estas variaciones en la calidad nutritiva de las láminas están asociadas al aumento en la proporción de los denominados “tejidos de sostén”, lo cual ocurre a costa de los llamados “tejidos metabólicos”, de alta degradabilidad, en los cuales se ubica el aparato fotosintético y, por ende, la mayor parte de las proteínas de las plantas. Duru et al. (1999), señalaron que la lámina puede ser considerada como un ensamblaje de dos componentes principales, uno metabólico y el otro estructural. La proporción del componente estructural incrementa con la longitud de la lámina. Si bien las láminas foliares no están comprometidas con sostener y elevar el aparato foliar o las inflorescencias, también requerirían una estructura adecuada para soportar láminas largas y adecuadamente posicionadas para favorecer la captura de la luz en canopeos densos. Niinemets et al. (2006), mostraron que un mayor tamaño de lámina está asociado a una mayor inversión de la planta en tejido de soporte (nervadura central en plantas de hojas simples y peciolo en hojas compuestas) y que dicha acumulación de tejido estructural reduce el contenido de N de la hoja por unidad de masa seca, reduciendo potencialmente la actividad fotosintética de las hojas de mayor tamaño.

El mayor tamaño de la lámina puede incrementar también las limitaciones físicas a la digestión señaladas por Wilson; Mertens (1995). Según Maurice et al. (1997), un incremento en el tamaño de la lámina es acompañado por un aumento en la densidad de materia seca por unidad de volumen. Esta mayor densidad representa un mayor empaquetamiento de las células, lo cual dificultaría el ataque microbiano.

Los cambios en calidad mencionados anteriormente, pueden aún ser más serios en el caso de gramíneas megatérmicas o tropicales. Estas gramíneas debido a sus características de crecimiento suelen poseer láminas de mayor tamaño respecto a las gramíneas templadas, para lo cual requieren una estructura fuerte para mantener su forma erecta. Este soporte surge del arreglo anatómico de los tejidos que están asociados con el funcionamiento de su ruta fotosintética (tejido vascular y esclerénquima), resultando en una mayor densidad de estos tejidos por unidad de ancho de hoja en comparación a las gramíneas C3. Estructura de soporte adicional en las C4 proviene de su sistema de nervaduras más desarrollada, la cual si bien solo ocupa del 8-13% del área transversal puede comprender más del 18% del peso de la hoja y más del 24% del peso de los tejidos vasculares (Wilson, 1990). En relación a esto, recientemente Ueno et al. (2006) confirmaron estadísticamente los hallazgos de otros autores sobre el sistema más denso de nervaduras longitudinales delgadas de las gramíneas C4 respecto a las C3. Buxton; Redfearn (1997) señalaron que estas características anatómicas contribuyen al incremento en la concentración de fibra.

En gramíneas forrajeras el tamaño potencial de la lámina es una característica determinada genéticamente, sin embargo es altamente susceptible de ser modificada por el manejo. Esta aseveración se basa en el concepto de que estas especies tienen alta plasticidad morfológica (Lemaire; Chapman, 1996). En este caso, la defoliación es una herramienta de manejo que permite modificar el tamaño de las láminas formadas luego del corte, y con ello la calidad del forraje. El mecanismo por el cual la defoliación permite reducir el tamaño de lámina formada posterior al corte, es por modificación del largo del tubo de vainas. Como ha sido señalado en la sección sobre Largo foliar, el tubo de vainas ejerce un efecto morfogénico sobre el largo de láminas sucesivas. En relación a lo mencionado, se ha observado que pasturas sometidas a pastoreo severo o defoliación frecuente, presentaron láminas y vainas más cortas y valores más altos de digestibilidad respecto a pasturas manejadas con una defoliación menos frecuente o un pastoreo liviano (Duru et al., 1999; Pascuet, 2003; Duru; Ducroq, 2002).

En síntesis, los conceptos más importantes que resultan de esta revisión son:

- § El crecimiento de la pastura implica acumulación de biomasa y estructuras indigestibles. Ello implica un aumento de la FDN, de la FDN indigestible y disminución de la digestibilidad de la FDN y MS. Por lo tanto el crecimiento es un determinante de la calidad nutricional.

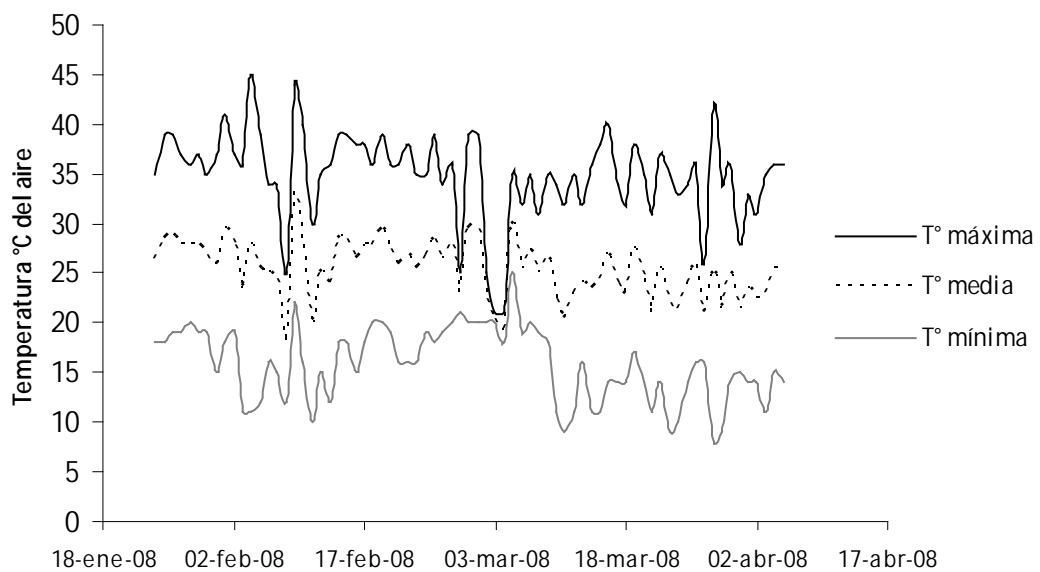
- § Es escasa la información sobre calidad de pasturas en estado vegetativo, teniendo en cuenta la morfología, edad y tamaño foliar. Por lo general la calidad ha sido evaluada a nivel de la biomasa total o del material vivo y muerto, o de las fracciones del material vivo: hojas y tallos, cortando la pastura a fechas fijas, sin tener en cuenta la tasa de recambio tisular.
- § Si bien la DMS es el parámetro más utilizado en evaluaciones de calidad del forraje, para determinar el valor energético del mismo, la DFDN es el principal determinante del consumo de MS y la calidad nutritiva.
- § El método más utilizado para evaluar la digestibilidad in vitro es el de Tilley; Terry (1963). Existen otras metodologías de laboratorio y ecuaciones de predicción para estimar la digestibilidad, cuyos resultados pueden o no guardar relación entre sí y/o con la digestibilidad in vivo.
- § Dentro de los métodos de laboratorios se está difundiendo el incubador DaisyII como una alternativa al método de Tilley y Terry para medir la DMS y DFDN. Este último parámetro no estaba incluido en evaluaciones de calidad debido a la falta de metodología de rutina para su análisis, pero desde el 2000 en adelante está tomando gran auge por su importancia como determinante de la calidad nutritiva y el consumo.
- § La relación entre DFDN y el contenido de lignina *per se* es pobre, dado que existen barreras químicas y físicas que pueden afectar dicho parámetro independientemente del contenido de lignina. La determinación de la lignina está sujeta a diferencias entre metodologías y, además, no está claro que compuestos fenólicos asociados a ella son los que en mayor medida afectan la DFDN.
- § Dado la pobre asociación entre la FDN y sus componentes (FDA y lignina) con la DMS, las estimaciones con ecuaciones de predicción son inconsistentes.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Sitio y período experimental

El ensayo se realizó en un invernáculo de plástico de aproximadamente 12 x 5 m, ubicado en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce (37°45' S, 58°18' W, 130 m sobre el nivel del mar).

El período experimental (el cual comprendió un periodo pre-experimental y un periodo experimental propiamente dicho) abarcó desde el 24 de enero hasta el 7 de abril de 2008. Durante este periodo se registraron las temperaturas máximas y mínimas diarias del aire (Figura 2) con un termómetro de máxima y mínima ubicado en una casilla dentro del invernáculo a 1,50 m de altura. La temperatura media del periodo experimental fue de  $24 \pm 3$ , la máxima de  $35 \pm 5$  y la mínima de  $16 \pm 4$ .



**Figura 2.-** Temperaturas del aire en invernáculo durante el periodo experimental

#### 3.2. Período Pre-experimental

Se implantaron en un estand denso micropasturas de *Chloris gayana* cv. Finecut en 3 bateas de 1 m de ancho x 3.5 m de largo x 3 m de alto cada una. Las plantas se obtuvieron del campo experimental del INTA Leales (Tucumán) en el año 2006. Las

mismas crecieron en adecuadas condiciones hídricas y de N, P (urea y fosfato diamónico equivalente a  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  y  $20 \text{ kg ha}^{-1}$ , respectivamente). Cada batea se subdividió en dos y se aplicaron al azar dos regímenes de defoliación desde el 24/1 al 26/2/08, que difirieron en intensidad y frecuencia de corte. La aplicación de dichos regímenes tuvieron como objeto lograr plantas que difieran 2 veces en tamaño foliar (tratamientos): lámina corta (C) y lámina larga (L). En el tratamiento C los cortes se realizaron a 5 cm del suelo cada 7 días y en el tratamiento L se efectuaron a 12 cm del suelo cada 15 días.

Previo al inicio del periodo experimental propiamente dicho, se realizó el 27/02/08 un corte de iniciación en las plantas de ambos tratamientos. En las del tratamiento C, el corte se realizó a 5 cm del suelo y en las del tratamiento L el corte se efectuó a la altura del pseudotallo (12 cm)

### **3.3. Periodo Experimental**

Luego del corte de iniciación y hasta el 7/04/08 se llevó a cabo el periodo experimental propiamente dicho. Durante el mismo se realizaron mediciones de variables morfogenéticas, estructurales y de calidad.

#### **3.3.1. Variables morfogenéticas**

En cada uno de los tratamientos, se realizaron mediciones sobre 15 macollos individuales marcados (5 por repetición) con una frecuencia de una o dos veces por semana en función de las temperaturas. Las mediciones efectuadas consistieron en:

1. Longitud de lámina verde: para el caso de las hojas en crecimiento, se midió desde la lígula de la última hoja completamente expandida hasta el extremo distal de la lámina en crecimiento. Para el caso de hojas expandidas, consistió en registrar el largo desde la lígula hasta el extremo distal no clorótico de las hojas en procesos de senescencia. Con estos datos se obtuvo el largo foliar de hojas totalmente expandidas, el cual se calculó a partir de la longitud desde la punta de la lámina hasta la lígula de la misma lámina. Esta determinación se realizó con el objeto de comparar los valores obtenidos en invernáculo con aquellos obtenidos en laboratorio.

2. Aparición de hojas e inicio de senescencia: las hojas nuevas se registraron como la aparición de la punta de la lámina sobre la lígula de la última hoja expandida, y el inicio de la senescencia se registró cuando el extremo distal de las láminas se presentaba no clorótico. Con estos datos se calculó la vida media foliar (VMF), en

unidades de grados días de crecimiento (GDC), como el intervalo de tiempo térmico entre la fecha de aparición foliar y la fecha en la que comenzó la senescencia. Para la especie en estudio, se consideró en el cálculo de los GDC una temperatura base ( $T_b$ ) de 12 °C.

La sumatoria de los grados días de crecimiento (GDC) se calculó como:

$$\text{GDC} = \sum_{i=1} (T_m - T_b),$$

donde  $T_m$  es la temperatura media diaria ((temp. máxima diaria + temp. mínima diaria) / 2),  $T_b$  es la temperatura base (12 °C).

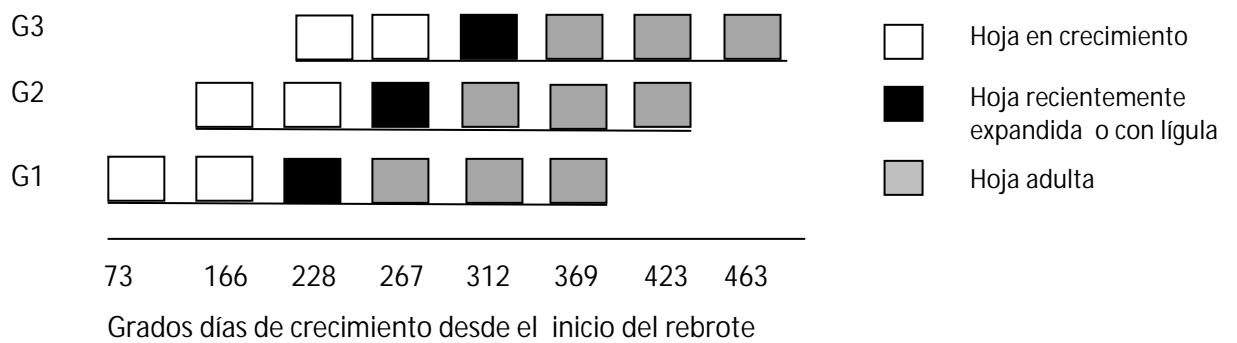
3. Longitud del pseudotallo: se consideró a la longitud desde el suelo hasta la lígula de la última hoja expandida.

### 3.3.2. Variables estructurales y de calidad

#### 3.3.2.1. Obtención de muestras

En cada tratamiento y durante el ciclo de vida foliar (desde emergencia hasta pre senescencia) de 3 generaciones de hojas sucesivas (las cuales representan un ciclo normal de rebrote) se cortaron aproximadamente 200 macollos cada  $58 \pm 20$  GDC. Los cortes se efectuaron con el objeto de obtener muestras para cada generación de hoja durante 6 momentos de la vida de las mismas: hojas en crecimiento (2 muestreos), hojas recientemente expandidas o con lígula (1 muestreo) y hojas adultas (3 muestreos). En la determinación de las variables de calidad, sólo se utilizaron los muestreos desde lígula en adelante (4 muestreos) para poder evaluar el efecto de tamaño. En la Figura 3 se presenta un esquema que representa los momentos en los cuales se efectuaron los cortes.





**Figura 3.** Esquema general de los momentos en los cuales fueron realizados los muestreos en cada generación de hoja.

El material cosechado inmediatamente fue colocado en nitrógeno líquido y luego conservadas en freezer hasta su procesamiento.

En laboratorio, las láminas de las hojas fueron cortadas del macollo principal y separadas por generación de hoja en las categorías de edad mencionadas anteriormente: hojas en crecimiento, hojas recientemente expandidas o con lígula y hojas adultas.

Con las muestras de láminas obtenidas de cada tratamiento y generación de hoja se realizaron las siguientes determinaciones:

### 3.3.2.2. Variables estructurales

#### 3.3.2.2.1. Largo foliar

El largo de las láminas separadas de cada generación y tratamiento se determinó utilizando una regla milimetrada. Estos datos conjuntamente con los datos de longitud de pseudotallo (o tubo de vainas) se utilizaron para calcular el largo total de la hoja (largo lámina + largo del tubo de vainas, mm).

En cada generación de hoja de los dos tratamientos en estudio, se calculó la relación largo lámina: largo vainas para cada uno de los momentos muestreados.

### 3.3.2.2.2. Área, peso y área foliar específica

Para estas determinaciones se consideraron sólo las láminas adultas de cada generación y tratamiento. El área foliar se determinó utilizando un planímetro LICOR-3100 (LI COR Inc, Lincoln, NE, USA) y para ello se tomó una muestra de aproximadamente 50 láminas por tratamiento y generación. Estas muestras luego fueron liofilizadas y finalmente pesadas. Con los datos de área foliar y peso seco de las láminas se determinó el área foliar específica (AFE,  $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ ) y su inversa, peso específico de lámina (Pe,  $\text{mg cm}^{-2}$ ). Siguiendo el criterio de Groot and Neuteboom (1997), se calcularon también el peso de la fibra de detergente neutro y el peso de la fibra de detergente neutro indigestible por unidad de área (en adelante denominadas: FDN específica – FDNe,  $\text{mg FDN cm}^{-2}$  - y FDNi específica -FDNie,  $\text{mg FDNi cm}^{-2}$ -). Para efectuar estos cálculos se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{FDNe} = \frac{\text{Peso seco de la muestra (mg MS)} * \text{FDN de la muestra (\%)}}{\text{Área foliar de la muestra (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{FDNie} = \frac{\text{Peso seco de la muestra (mg MS)} * \text{FDNi de la muestra (\%)}}{\text{Área foliar de la muestra (cm}^2\text{)}}$$

El material de láminas que no fue utilizado para determinar área y peso seco fue también liofilizado y destinado a la determinación de las variables de calidad.

### 3.3.2.3. Variables de calidad

Las láminas adultas correspondientes a cada tratamiento y generación de hoja, fueron molidas a 1 mm con un molino tipo Willey. En las muestras molidas se realizaron los siguientes análisis:

§ Materia seca (MS, en estufa a 105°C)

§ Fibra de detergente neutro (FDN, Van Soest et al., 1991)

§ Fibra de detergente ácido (FDA, Van Soest et al., 1991)

§ Lignina de detergente ácido (LDA, Van Soest et al., 1991)

§ Digestibilidad in vitro de la MS y FDN utilizando el equipo Daisy<sup>II</sup> (ANKOM).

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Calidad de Forrajes del INTA EEA La Rioja.

#### 3.3.2.3.1. Digestibilidad in vitro por el método ANKOM

La digestibilidad verdadera in vitro de la materia seca se determinó en el incubador Daisy<sup>II</sup> ANKOM (ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU). El aparato consta de una cámara de digestión con 4 vasos, los cuales rotan durante un cierto periodo de incubación.

Se pesaron 250 mg de materia seca de cada una de las muestras, las cuales fueron colocadas en bolsas filtros F57 (ANKOM Technology) dentro de frascos de incubación (capacidad ml), con capacidad para 24 bolsas. A cada frasco se le adicionó 1600 ml solución buffer combinada (solución A y B) y 400 ml de licor ruminal. Se introdujeron 2 blancos, bolsas sin muestra, las cuales fueron utilizadas para la corrección de las muestras analizadas.

##### 3.3.2.3.1.1. Preparación de la solución buffer combinada

Las soluciones A y B se prepararon en recipientes separados en las cantidades especificadas en el Cuadro 8. En un recipiente conteniendo 1330 ml de solución A, se agregó aproximadamente 266 ml de solución B (proporción 1:5). Las cantidades exactas de ambas soluciones fueron ajustadas para obtener un pH de 6.8 a 39° C.

**Cuadro 8.** Componentes de la solución buffer A y B

Solución buffer	g /litro
a) Solución A	
Potasio fosfato dibasico anhidro, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	10,0
Magnesio sulfato heptahidrato, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
Sodio cloruro, NaCl	0,5
Calcio cloruro dihidrato, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
Urea	0,5
b) Solución B	
Sodio carbonato anhidro, $\text{Na}_2\text{CO}_3$	15,0
Sodio sulfuro nonahidrato, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1,0

### 3.3.2.3.1.2. Obtención del licor ruminal

Se utilizó un animal donante alimentado con heno de alfalfa cuya composición química se muestra en el Cuadro 9. Inmediatamente de extraído el líquido ruminal se efectuó el filtrado y colocado del mismo en un recipiente térmico para mantener su temperatura a 39°C. El recipiente conteniendo el licor ruminal fue homogeneizado y gaseado con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Se midió 400 ml de licor ruminal y éste fue agregado a las jarras conteniendo las muestras y la solución buffer.

**Cuadro 9.-** Composición química (%) de heno de alfalfa

Composición	%
Materia Seca, MS	97,9
Cenizas,	10,5
Fibra de detergente neutro, FDN	49,2
Fibra de detergente ácido, FDA	30,2
Lignina de detergente ácido, LDA	7,8
Proteína bruta, PB	18,0
Digestibilidad in vitro de materia seca, DVIVMS	68,2
Digestibilidad in vitro de FDN, DFDN	47,5

### 3.3.2.3.1.3. Incubación y cálculo de la digestibilidad in vitro

Cada jarra de incubación conteniendo las muestras, la solución buffer y el licor ruminal, se ubicaron en el incubador Daisy II. Cada muestra se analizó por un periodo de incubación de 24 hs.

Al completar el período de incubación, de cada jarra se removió el fluido y las bolsas fueron lavadas con agua fría hasta lograr un fluido claro. Posteriormente, las bolsas se colocaron en el analizador de fibra **ANKOM**<sub>200/220</sub> y se siguió el procedimiento para determinar FDN (Van Soest et al., 1991).

La digestibilidad verdadera in vitro de la MS (DVIVMS) se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DVIVMS} = 100 - ((W_3 - (W_1 \times C_1)) \times 100 / (W_2 \times MS))$$

Donde:

$W_1$ : peso de la bolsa tarada

$W_2$ : peso de la muestra

$W_3$ : peso de la bolsa final después la determinación secuencial in vitro y FDN

$C_1$ : corrección de la bolsa blanco (peso final – peso seco/peso original de la bolsa blanco)

MS: % de materia seca

Los valores de digestibilidad verdadera fueron utilizados para calcular la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS). Para ello, el valor obtenido de DVIVMS se le sustrajo el factor metabólico 11,9 (Van Soest, 1994).

La digestibilidad de la FDN (DFDN) se estimó mediante la siguiente fórmula (Damiran, D. et al., 2008):

$$\% \text{ DFDN} = 100 - ((W_3 - (W_1 \times C_1)) \times 100 / (W_2 \times \text{FDN}))$$

Donde:

$W_1$ : peso de la bolsa tarada

$W_2$ : peso de la muestra

$W_3$ : peso de la bolsa final después la determinación secuencial in vitro y FDN

$C_1$ : corrección de la bolsa blanco (peso final – peso seco/peso original de la bolsa blanco)

FDN: % de fibra de detergente neutro de la muestra

Los valores de fibra de detergente neutro indigestible (FDNi) se obtuvieron de la diferencia entre 1 - DFDN.

### 3.4. Análisis estadístico

#### 3.4.1. Modelo estadístico

El modelo estadístico lineal utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = m + t_i + g_j + (tg)_{ij} + b_k + e_{ijk}$$

$$i = 1, 2 \quad j = 1, 2, 3, 4, 5, 6 \quad k = 1, 2, 3$$

donde:

$Y_{ijk}$  observación del i-ésimo régimen de defoliación en el j-ésimo nivel de generación de hoja en el k-ésimo bloque

$m$  media general

$t_i$  efecto del i-ésimo régimen de defoliación

$g_j$  efecto del j-ésimo nivel de generación de hoja

$(tg)_{ij}$  efecto de interacción entre el i-ésimo régimen de hoja y el j-ésimo nivel de generación de hoja

$b_k$  efecto del k-ésimo bloque

$e_{ijk}$  error experimental

#### 3.4.2. Análisis de las distintas variables.

Las variables morfogénicas se analizaron como observaciones repetidas en el tiempo empleando el procedimiento MIXED de SAS. Se consideró como sujeto de análisis a cada macollo marcado (15 en total por tratamiento), los cuales fueron medidos

en 15 oportunidades a lo largo del periodo experimental. La estructura de covarianza con la cual se encontró convergencia fue con simetría compuesta.

Las variables estructurales se analizaron mediante un diseño en bloques con arreglo factorial de 2 x 3 (tamaño de lámina y generación de hoja, respectivamente) utilizando el procedimiento PROC GLM de SAS (SAS Inst., Cary, NC, USA). Las medias se compararon a través del test de Tukey con un nivel de significancia del 5 % ( $p < 0,05$ ).

Para las variables de calidad se ajustaron funciones con la edad del tejido foliar (expresada en grados días de crecimiento) en cada generación y tratamiento. En los casos en los cuales las regresiones fueron significativas, se compararon los coeficientes estimados mediante utilización de variables *dummy*, de otro modo se analizaron mediante ANAVA. Se utilizó el procedimiento PROC REG y el PROC GLM de SAS. En algunos casos, con las ecuaciones de regresión se hicieron predicciones de Y para un determinado valor de X mediante intervalos de confianza (nivel de confianza, 95%).

Se ajustaron regresiones lineales entre los valores de FDNi y las siguientes variables: largo de lámina, largo total de hoja (largo lámina + largo vainas), y peso específico.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Vida media foliar

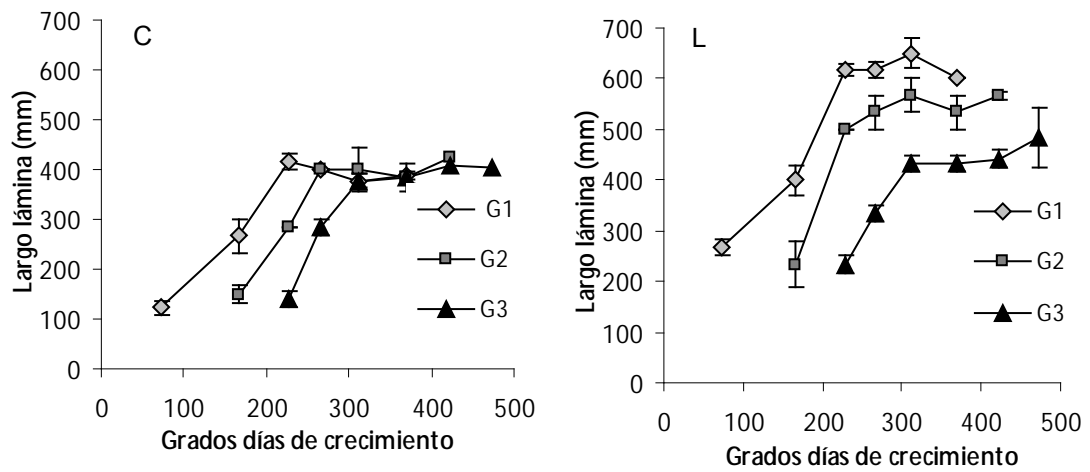
La vida media foliar estimada para la especie en estudio fue de  $293 \pm 39$  grados días de crecimiento (GDC), no encontrándose diferencias entre tratamientos o generaciones sucesivas. De acuerdo con esto, la Figura 4 indica que los muestreos realizados a lo largo de la ontogenia foliar fueron en general anteriores a que se iniciara la etapa de senescencia.

### 4.2. Características estructurales

#### 4.2.1. Largo foliar

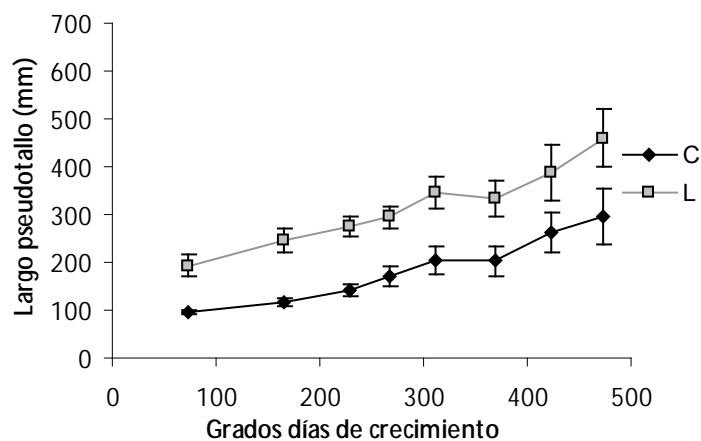
La evolución del largo de lámina durante el periodo experimental se presenta en la Figura 4. Se detectó efecto de tratamiento e interacción tratamiento x generación. El largo final de lámina, o sea, luego de que la lígula se hizo visible, fue similar entre generaciones sucesivas de hojas en el tratamiento C ( $397 \pm 31$  mm). En cambio, en el tratamiento L la variable mostró una reducción significativa entre generaciones, siendo el valor observado en la generación 3 similar al valor promedio de las tres generaciones del tratamiento C. El largo de lámina promedio de las generaciones 1 y 2 del tratamiento L fue de  $586 \pm 36$  mm, lo cual significó una reducción promedio de la longitud de lámina en el tratamiento C del orden del 33 %.





**Figura 4.** Evolución del largo de lámina (mm) de tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Las barras indican el error estándar de la media.

La longitud promedio del tubo de vainas registrada a lo largo del período experimental (Figura 5) fue un 36% superior en el tratamiento L respecto del C. En la figura se observa que dicha longitud se incrementó significativamente a través del periodo de mediciones.

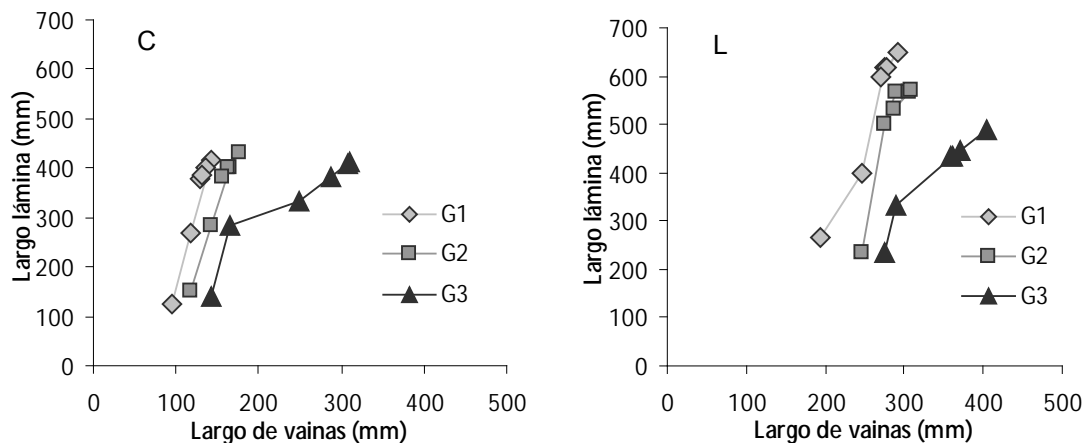


**Figura 5.** Evolución de la longitud de vainas (mm) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Las barras indican el error estándar de la media.

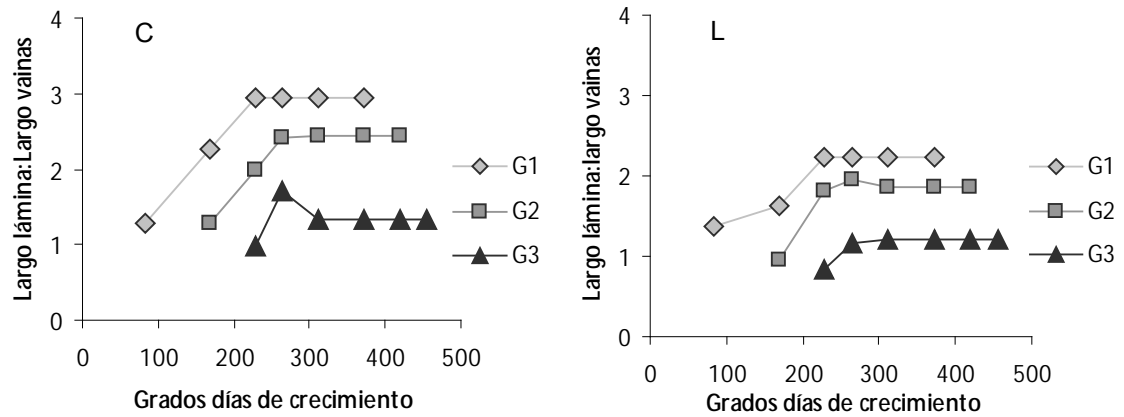
En el largo final de las hojas, incluyendo el largo de las fracciones lámina y vaina, se detectó efecto de interacción tratamiento x generación. En el tratamiento L, el largo de las hojas fue similar entre generaciones sucesivas, siendo el valor promedio de  $885 \pm 17$  mm. En el tratamiento C, el largo promedio fue de  $606 \pm 18$  mm, pero se detectó un incremento en el largo de las generaciones sucesivas, existiendo una diferencia entre la generación 1 y 3 del orden del 22 %.

#### 4.2.2. Relación largo de lámina: largo de vainas

En la figura 6 se muestra en forma conjunta la evolución del largo de lámina y del tubo de vainas. En ambos tratamientos, se observa que las vainas tuvieron escaso alargamiento durante la fase de expansión visible de las láminas de las generaciones 1 y 2. En ese momento el cociente entre el largo de lámina y de vaina fue del orden de 3 y 2 en los tratamiento C y L, respectivamente (Figura 7). En cambio en la generación 3 de ambos tratamientos, las vainas comenzaron a alargarse rápidamente antes de que las láminas completaran su expansión total. La relación entre el largo de lámina y de vaina fue del orden de 1 en el momento de aparición de la lígula en ambos tratamientos.

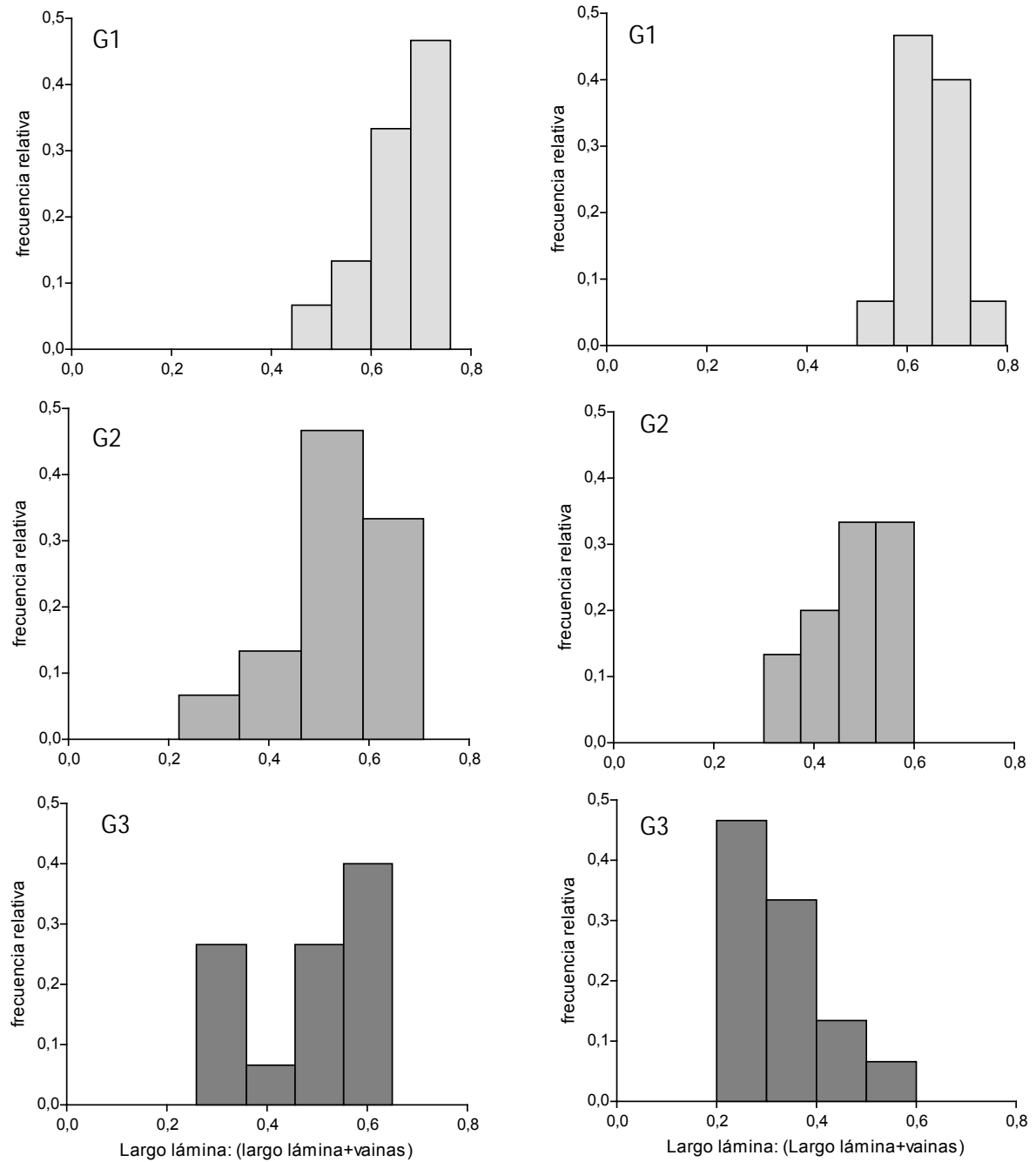


**Figura 6.** Largo lámina y largo de vainas (mm) de tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L).



**Figura 7.** Relación largo lámina: largo de vainas (mm) de tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L).

En función de lo anterior y con el objeto de conocer la proporción de la fase de expansión de las láminas que se desarrolló fuera del tubo de vainas, se determinó en los macollos marcados en invernáculo ( $n= 15$  en cada tratamiento), el momento en el cual la relación largo total de hoja: largo final de lámina era igual a 1. Hasta ese momento, se asumió que los cambios en largo de la hoja serían determinados por el crecimiento de la lámina, luego del mismo los cambios serían consecuencia del crecimiento de la vaina. Posteriormente, se realizó un promedio de la relación largo de lámina y largo total de hoja (largo lámina: largo lámina+largo de vainas) hasta el momento en que el crecimiento de la lámina deja de contribuir al largo total de la hoja (valor 1 de la relación mencionada inicialmente). Dicho promedio, daría idea de la proporción de la fase de expansión de la lámina que se desarrollo fuera del tubo de vainas. Estos cálculos se realizaron en cada generación de hojas de ambos tratamientos. En la Figura 8 se muestra que al menos en el 60 % de los macollos marcados del tratamiento C, la duración de la fase de expansión de las láminas fuera del tubo de vainas habría sido mayor al 50% de la duración total de dicha fase en todas las generaciones de hojas. En el tratamiento L, ocurrió algo similar pero solo en las generaciones 1 y 2. En la generación 3, la duración de la fase de expansión fuera del tubo de vainas habría sido menor al 50% de la duración total en más del 75 % de los macollos.



**Figura 8.** Distribución de frecuencias de la relación largo lámina:largo hoja (largo lámina+largo vainas) en macollos marcados de tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (izquierda) y tratamiento largo (derecha).

#### 4.2.3. Área, peso y área foliar específica de láminas adultas

En el Cuadro 10 se presentan los valores promedio de área ( $\text{cm}^2$ ), peso de láminas (mg) y área foliar específica ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ) de cada generación de hoja en ambos tratamientos. En las tres variables se detectó efecto de tratamiento x generación. En el tratamiento L, las láminas de las generaciones sucesivas tuvieron similar área. En el tratamiento C, el área de las láminas fue diferente entre generaciones, siendo la lámina de la generación 2 la que presentó mayor área y ésta fue similar al área promedio de las tres generaciones del tratamiento L.

En cuanto al peso, las láminas del tratamiento L fueron significativamente más pesadas que las del tratamiento C. En el L no se detectaron diferencias entre generaciones, mientras que en el C las generaciones 2 y 3 tuvieron similar peso entre ellas y mayor que la generación 1.

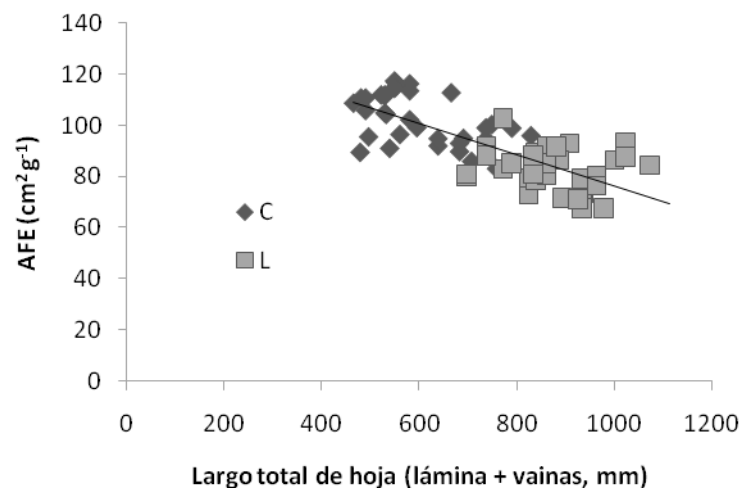
De la relación entre las variables área y peso de láminas se obtuvo el área foliar específica (AFE,  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ). En el tratamiento C, las láminas de las generaciones 2 y 3 presentaron similar AFE entre ellas y menor que la generación 1. En el tratamiento L, las láminas de las generaciones sucesivas presentaron similar AFE. Las láminas de la generación 1 y 2 del tratamiento C fueron de mayor AFE que las respectivas del tratamiento L, mientras que el AFE de la generación 3 fue similar entre tratamientos.

**Cuadro 10.** Promedio ( $\pm$ DE) de área ( $\text{cm}^2$ ), peso (mg) y área foliar específica (AFE) ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ) de láminas adultas de la generación 1, 2 y 3 de los tratamientos corto y largo.

Tratamiento	Área ( $\text{cm}^2$ )		
	Generación		
	1	2	3
Corto	71 $\pm$ 4Bc	105 $\pm$ 6Aa	90 $\pm$ 16Bb
Largo	108 $\pm$ 4Aab	106 $\pm$ 3Ab	113 $\pm$ 6Aa
Tratamiento	Peso (mg)		
	Generación		
	1	2	3
Corto	640 $\pm$ 47Bb	1058 $\pm$ 135Ba	950 $\pm$ 184Ba
Largo	1384 $\pm$ 155Aa	1294 $\pm$ 149Aa	1314 $\pm$ 153Aa
Tratamiento	AFE ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ )		
	Generación		
	1	2	3
Corto	112 $\pm$ 5Aa	100 $\pm$ 12Ab	95 $\pm$ 5Ab
Largo	79 $\pm$ 8Ba	83 $\pm$ 9Ba	86 $\pm$ 9Ba

Letras mayúsculas distintas indican diferencias entre tratamientos y minúsculas diferencias entre generaciones ( $p < 0,05$ ).

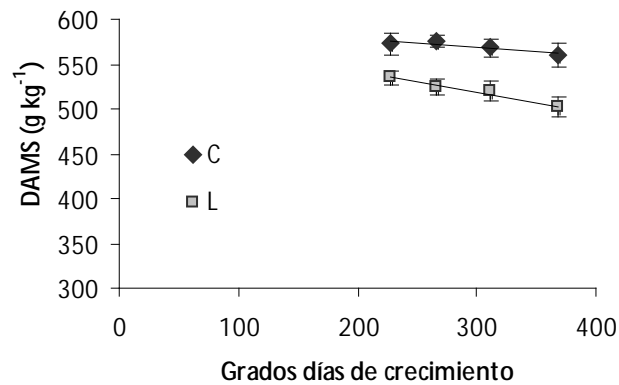
En la Figura 9 se presenta la relación general entre el AFE y el tamaño total de hoja (lámina+vaina). El tamaño explicó significativamente alrededor del 60 % de la variación total en el AFE.



**Figura 9.** Relación general entre AFE ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ) y largo total de hoja (largo lámina+vainas). Ecuación lineal correspondiente:  $y = -0,0609x + 137,2$   $R^2 = 0,579$

#### 4.3. Digestibilidad aparente de la materia seca de láminas adultas

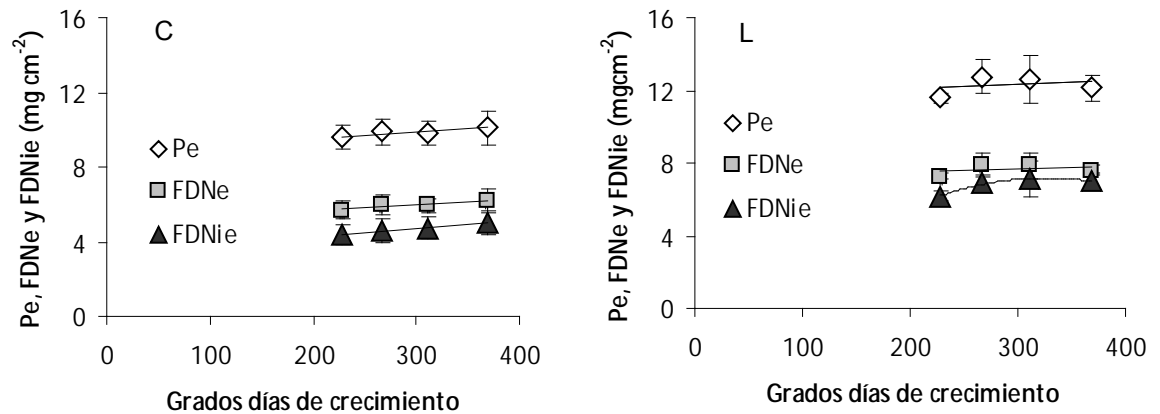
La evolución de la DAMS no evidenció cambios significativos en las láminas adultas del tratamiento C, con un valor medio estimado de  $570 \pm 27 \text{ g kg}^{-1}$ . En el tratamiento L, el ajuste lineal predice una caída significativa del 6% entre la aparición de la lígula y el inicio de la senescencia (Figura 10). El valor medio de DAMS estimado para este tratamiento fue de  $520 \pm 31 \text{ g kg}^{-1}$ , el cual fue significativamente menor respecto del tratamiento C.



**Figura 10.** Evolución de la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) de láminas adultas del tratamiento corto (C) y largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: C:  $y = -0,1023x + 601,7$ ,  $R^2 = 0,006$ ; L:  $y = -0,223x + 585,5$ ,  $R^2 = 0,337$ . Las barras indican error estándar de la media.

#### 4.4. Peso específico y peso de la fibra por unidad de área

En este punto se presenta el peso específico ( $Pe$ ,  $mg\ cm^{-2}$ ) y el peso de fibra de detergente neutro y fibra de detergente neutro indigestible por unidad de área (FDN específica –  $FDNe$ ,  $mg\ FDN\ cm^{-2}$  - y  $FDNi-24$  específica - $FDNi-24e$ ,  $mg\ FDNi-24\ cm^{-2}$  -) (Figura 11). La  $FDNe$  y  $FDNi-24e$  es una estandarización del contenido de ambas fracciones por unidad área. Ello tiene como propósito capturar eventuales efectos de los tratamientos sobre el ancho de las hojas, la cual es una respuesta plástica esperable frente a variaciones del ambiente (luz, nutrientes, etc), con eventuales implicancias nutricionales asociadas a la ruptura y ataque microbiano (Wilson y Mertens, 1995). De manera relevante, tal tipo de efecto podría no ser detectable cuando los datos se expresan como proporción del peso (Groot; Neuteboom, 1997). El  $Pe$ , la  $FDNe$  y  $FDNi-24e$  fueron superiores en L respecto de C, con valores medios de  $12\pm 1$  y  $10\pm 1$ ,  $8\pm 1$  y  $6\pm 1$ ,  $7\pm 1$  y  $5\pm 1$ , respectivamente. En el primer tratamiento, el  $Pe$  y la  $FDNe$  se mantuvieron relativamente estables en el tiempo mientras que la  $FDNi-24e$  presentó una tendencia cuadrática ( $p=0,07$ ). En el tratamiento C, el  $Pe$  se mantuvo estable mientras que  $FDNe$  y  $FDNi-24e$  presentaron un incremento del orden del 9 y 13%, respectivamente, entre la aparición de la lígula y el inicio de la senescencia.



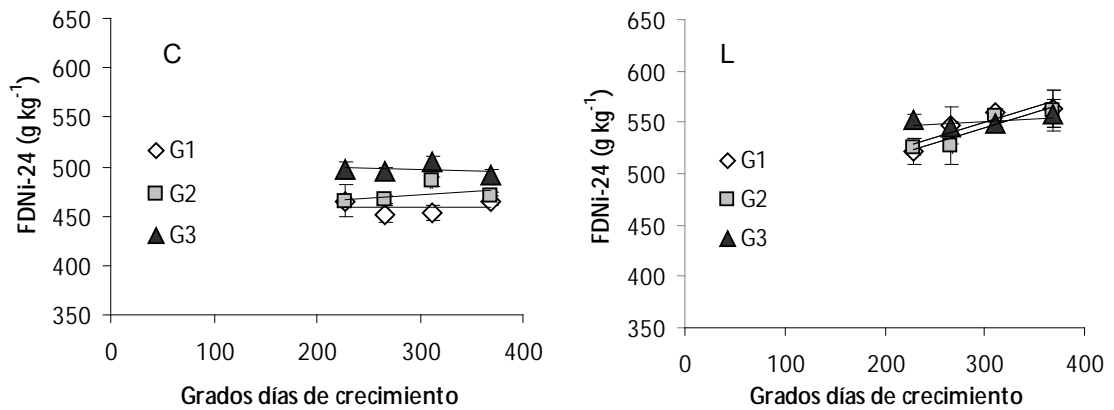
**Figura 11.** Peso específico (Pe), fibra de detergente neutro específica (FDNe) y fibra de detergente neutro indigestible específica (FDNie) del tratamiento corto (C) y largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: C Pe:  $y = 0,0015x + 9,41$ ,  $R^2 = 0,012$ ; C FDNe:  $y = 0,006x + 4,24$ ,  $R^2 = 0,197$ ; C FDNie:  $y = 0,0028x + 3,67$ ,  $R^2 = 0,087$ ; L Pe:  $y = 0,0035x + 11,31$ ,  $R^2 = 0,023$ ; L FDNe:  $y = 0,0007x + 7,41$ ,  $R^2 = 0,002$ ; L FDNie:  $y = -0,0001x^2 + 0,07x - 4,0$ ,  $R^2 = 0,146$ . Las barras indican error estándar de la media.

#### 4.5. Fibra indigestible (FDNi-24) de láminas de generaciones sucesivas de hojas

##### 4.5.1. Relación con la edad foliar

En el tratamiento C la FDNi-24 ( $\text{g kg}^{-1}$ ) se mantuvo relativamente estable desde que apareció la lígula hasta el inicio de la senescencia en las tres generaciones de hojas, siendo el valor medio de la generación 3 ( $497 \pm 11 \text{ g kg}^{-1}$ ) significativamente mayor respecto de las generaciones 1 y 2 ( $460 \pm 13$  y  $473 \pm 10 \text{ g kg}^{-1}$ , respectivamente). En el tratamiento L, la FDNi-24 de las generaciones 1 y 2 se incrementó a tasas similares para ambas generaciones a lo largo de dicho período. En cambio, la FDNi-24 se mantuvo relativamente estable en el caso de la generación 3 (Figura 12). El promedio de FDNi-24 alcanzado a los 369 GDC, el cual fue estimado a partir de las regresiones ajustadas para las generaciones 1 y 2, fue de  $570 \pm 91$  y  $565 \pm 108 \text{ g kg}^{-1}$ . Dicho valor resultó similar que la FDNi-24 media para la generación 3 ( $549 \pm 59 \text{ g kg}^{-1}$ ). Cuando se comparan estos valores con los estimados para el tratamiento C, el análisis muestra una superioridad media del 15 % del tratamiento L respecto del C.

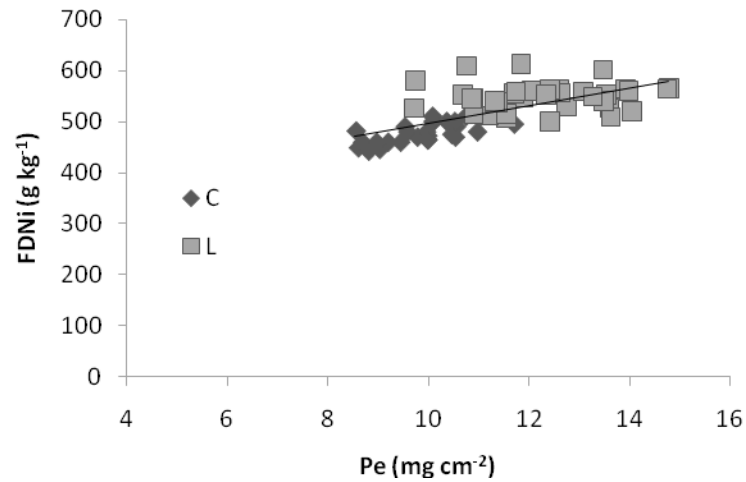




**Figura 12.** Evolución de FDNI-24 ( $\text{g kg}^{-1}$ ) en tres generaciones sucesivas de hoja (G1= Generación 1, G2= Generación 2 y G3= Generación 3) en el tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: C G1:  $y = 0,011x + 455,5$ ,  $R^2 = 0,087$ ; C G2:  $y = 0,058x + 454,6$ ,  $R^2 = 0,088$ ; C G3:  $y = -0,023x + 503,3$ ,  $R^2 = 0,016$ ; L G1:  $y = 0,286x + 463,9$ ,  $R^2 = 0,209$ ; L G2:  $y = 0,289x + 458,0$ ,  $R^2 = 0,263$ ; L G3:  $y = 0,054x + 535,1$ ,  $R^2 = 0,056$ . Las barras indican error estándar de la media.

#### 4.5.2. Relación con el peso específico

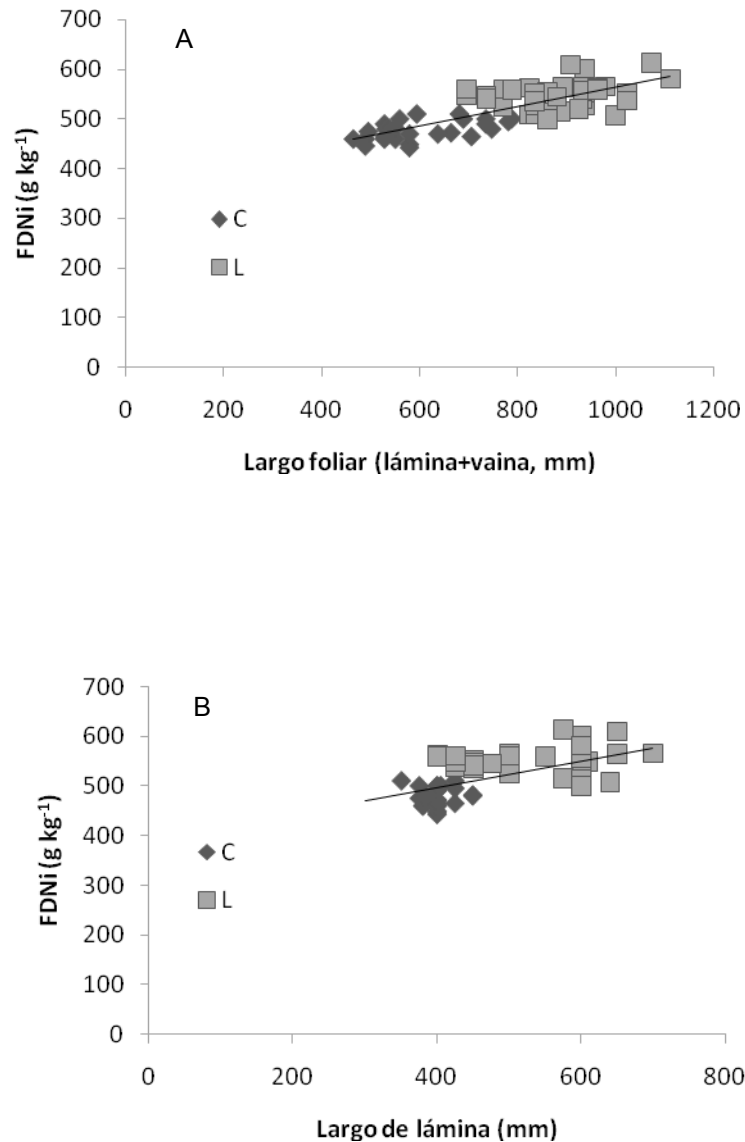
En la Figura 13, se muestra la relación entre la FDNI-24 con el peso específico de lámina ( $\text{Pe}$ ,  $\text{mg cm}^{-2}$ ). En la misma puede observarse que el  $\text{Pe}$  explica significativamente alrededor del 46 % de la variación observada en FDNI-24 de las láminas adultas.



**Figura 13.** Relación entre FDNI-24 y Pe para las láminas de los tratamientos corto (C) y largo (L). Ecuación lineal correspondiente:  $FDNI-24 = 17,474x + 321,1$ ,  $R^2 = 0,46$ .

#### 4.5.3. Relación con el largo foliar

En la Figura 14, se muestra la relación del FDNI-24 con el largo total de hoja (largo lámina+vainas) (A) y del FDNI-24 con el largo de lámina (B). En la figura se observa que el largo total de hoja explica significativamente el 60% de variación observada en el FDNI-24 de las láminas. Cuando se considera sólo el largo de lámina como regresora, si bien el ajuste sigue siendo significativo, la proporción de la variación de los datos que es explicada por la regresión disminuye al 35%.

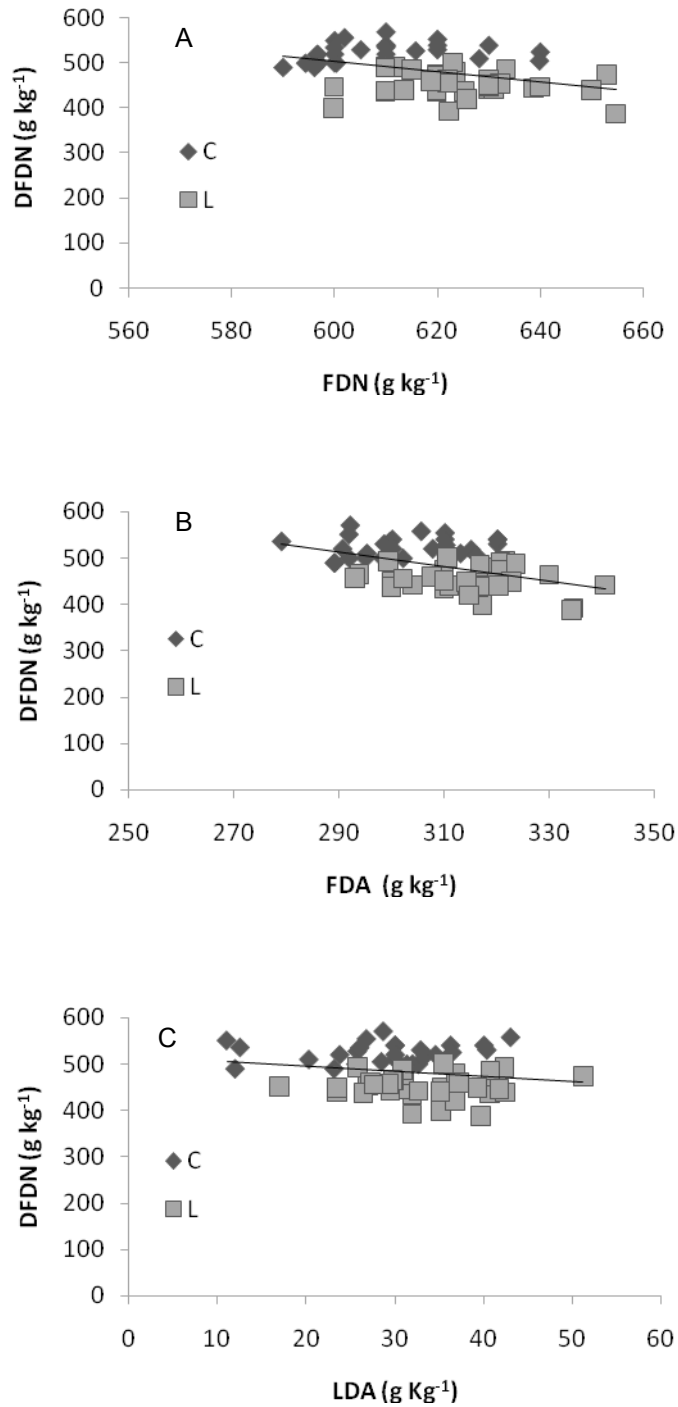


**Figura 14.** Relación entre FDNi-24 y largo foliar (largo lámina+vainas, A) y entre FDNi-24 y largo de lámina (B) para el conjunto de muestras del tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: A:  $y = 0,1958x + 367,6$ ,  $R^2 = 0,623$ ; B:  $y = 0,2634x + 391,2$ ,  $R^2 = 0,352$ .

#### 4.6. Relaciones entre parámetros de calidad

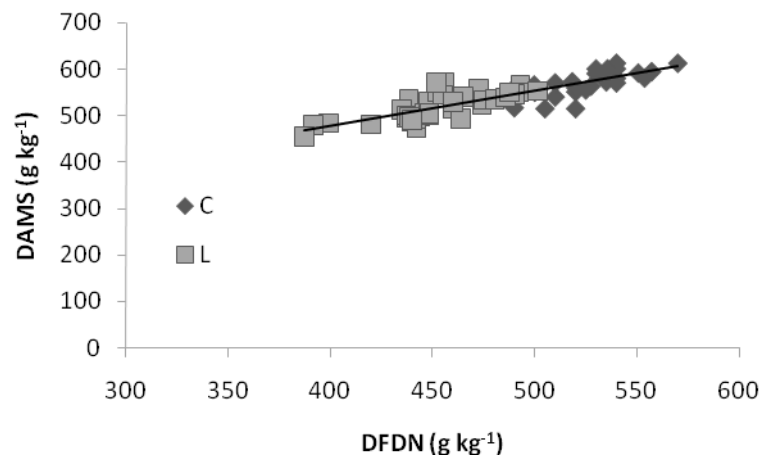
En la Figura 15, se muestran las relaciones entre FDN, FDA y LDA con la DFDN-24. En general se puede observar una relación negativa entre los parámetros mencionados y la DFDN-24. No obstante ello, la variación de la DFDN-24 explicada

por estos parámetros fueron de 12%, 19% y 6% para FDN, FDA y LDA, respectivamente.



**Figura 15.** Relación entre la DFDN-24 y FDN (A), DFDN-24 y FDA (B), DFDN-24 y LDA (C) (g kg<sup>-1</sup>) para el conjunto de muestras del tratamiento corto (C) y tratamiento largo (L). Ecuaciones lineales correspondientes: A:  $y = -1,085x + 1153,2$ ,  $R^2 = 0,1262$ ; B:  $y = -1,601x + 977,47$ ,  $R^2 = 0,1937$ ; C:  $y = -1,415x + 526,94$ ,  $R^2 = 0,056$ .

En la Figura 16 se muestra la relación entre DAMS y la DFDN-24, encontrándose una alta relación entre ambas variables ( $R^2 = 0,75$ ).



**Figura 16.** Relación entre la DAMS y DFDN-24 para el conjunto de datos. Ecuaciones lineales correspondientes:  $y = 0,723x + 192,08$ ,  $R^2 = 0,754$ .

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Vida media foliar

Los valores encontrados de VMF en este estudio para *Chloris gayana* (293 GDC) permiten clasificarla como una especie de “recambio foliar rápido”, presentando valores similares a la VMF de gramíneas templadas cultivadas como *Lolium perenne* (330 GDC, Lemaire; Chapman, 1996) y *Bromus stamineus* (220 GDC, Berone 2005). En gramíneas megatérmicas, son pocos los trabajos donde esta variable ha sido evaluada. Sbrissia (2004) citó para *Brachiaria brizantha* valores de 516 GDC en época estival (15°C temperatura base) y Ferri et al. (2006) en *Panicum coloratum* cv. Verde, valores de 600 – 665 GDC (10°C temperatura base). Hasta donde se revisó la bibliografía, no se encontraron datos sobre esta variable para la especie en estudio. La VMF tiene importantes connotaciones desde el punto de vista de manejo del forraje, ya que una vez superado el valor de la misma, la eficiencia del uso del forraje disminuye, ya sea por pérdidas a través de la senescencia, o por la cosecha de un material de menor calidad, generando menor producto animal por insumo vegetal utilizado (Hodgson, 1990; Mazzanti; Lemaire, 1994).

La VMF, al igual que otras variables morfogénicas (v.g. tasas de elongación y aparición foliar), es influenciada por la temperatura. Al respecto, hojas que crecen a altas temperaturas pierden su capacidad fotosintética más rápidamente (Woledge; Jewiss, 1969), mientras que mayores longevidades se han observado a bajas temperaturas (Robson, 1972). Sin embargo, en general, se acepta que el valor de VMF, expresado como tiempo térmico, es relativamente constante bajo un amplio rango de condiciones ambientales y de manejo (Anslow, 1967; Lemaire; Chapman, 1996). Esto está en concordancia con lo encontrado en este trabajo, donde no se detectó efecto de tratamiento o generación.

### 5.2. Características estructurales

#### 5.2.1. Largo foliar

El periodo pre-experimental tuvo como objetivo lograr tratamientos que difirieran marcadamente en la longitud de las láminas. Tal como se explica en Materiales y

Métodos, las plantas fueron sometidas a cortes de diferente frecuencia e intensidad de defoliación como vía para lograr los cambios morfológicos deseados. La estrategia de defoliación utilizada para diferenciar los tratamientos se fundamenta en que las variaciones en longitud del tubo de vainas tienen un efecto morfogénico directo sobre el largo de las láminas (Wilson; Laidlaw, 1985). Los autores previamente citados sugieren que la división celular y, por ende la duración de la elongación de la lámina, serían más prolongados en láminas que atraviesan vainas largas respecto de láminas de plantas con un tubo más corto. Sin embargo, estudios posteriores (Casey et al. 1999; Arredondo; Schnyder, 2003; Kavanová et al., 2006) mostraron que el acortamiento del tubo de vainas reduce la longitud de la zona de crecimiento, la cual disminuye principalmente la tasa y no la duración de la elongación (Fiorani et al., 2000).

Como resultado del manejo pre-experimental se obtuvo una reducción promedio del 33% del largo de láminas, la cual fue concomitante con una reducción del orden del 40% en el largo del tubo de vainas. Si bien se logró diferenciar tratamientos, la magnitud de la diferencia en el largo promedio de láminas fue menor a la esperada. Ello fue consecuencia, en parte, a que en el tratamiento L la longitud de las láminas se redujo progresivamente, con una diferencia entre tratamientos que cayó del 33% a nula entre la generación 1 y la 3. Esta tendencia contrasta con la correlación positiva esperada entre largo de tubo de vainas y el largo de láminas previamente explicada, como también con los resultados de diversos trabajos (Wilson, 1976; Groot; Neuteboom, 1997; Duru; Ducroq, 2000). En este experimento, un factor que habría influido en la no detección de esta respuesta podría ser la elongación del ápice vegetativo. Tal como ha sido señalado por Sbrissia; Da Silva (2001), este aspecto, el cual es propio de la morfogénesis de la mayoría de las especies megatérmicas en estado vegetativo, contrasta con el patrón característico descrito para las especies templadas (Chapman; Lemaire, 1993).

#### 5. 2.2. Área, peso y área foliar específica de láminas adultas

En estos tres parámetros, en promedio se observó que las láminas del tratamiento C presentaron menor área y peso y mayor AFE que el tratamiento L, siendo las diferencias del orden de 19, 34 y 24 %, respectivamente. La mayor reducción en peso en relación al área y, por ende, mayor AFE en plantas defoliadas, también fue observado por Groot et al. (1999), Cullen et al. (2006) y Lattanzi et al. (2004). Estos

resultados podrían estar asociados a una menor disponibilidad de carbono, como consecuencia del régimen de defoliación aplicado. En este sentido, De Visser et al. (1997) señalaron que la defoliación produce una rápida y significativa disminución de carbono, N y masa de agua en la zona de crecimiento, lo cual involucra movilización de carbohidratos no estructurales y disminución en la concentración de biomasa estructural. Este proceso fue denominado como dilución por Schnyder; De Visser (1999), y el mismo surge del desbalance entre el influjo de sustrato y la formación de tejido. Estos autores señalaron que dicho proceso produce cambios morfológicos relevantes en el tejido nuevo exportado, lo cual incluye incremento de AFE y disminución de la concentración de N.

Adicionalmente, respuestas fotomorfogenéticas e hidrodinámicas contribuirían a explicar los cambios en AFE con el tamaño de la planta. En el primer caso, es sabido que el aumento de altura es una respuesta generalizada de las plantas en condiciones de cubierta densa y disponibilidad lumínica limitante como estrategia para ubicar las hojas en condiciones apropiadas para la función fotosintética. Asociado a ello, se ha encontrado que el incremento de altura en las plantas se asocia a una mayor inversión de biomasa en tejidos de sostén (Givish, 1982; Koppers, 1985, ambos citados por Werger et al., 2002). En este contexto, Werger et al. (2002) encontraron que el AFE también se reduce en respuesta al aumento de tamaño de las plantas. Desde un punto de vista hidrodinámico, West et al. (1997) propusieron que la concomitante ramificación y afinamiento de los haces de conducción sería el mecanismo que explicaría la constancia en el flujo de transporte de agua que ocurre en los organismos vasculares de manera independiente a los incrementos en altura. Es de esperar, entonces, que el incremento de altura de las plantas traiga aparejado un aumento en la proporción del tejido de conducción debido al mencionado fenómeno de ramificación y afinamiento de los haces del xilema de modo de asegurar el transporte de agua hasta los puntos más distantes.

La disminución del AFE (Cuadro 10) observada entre generaciones sucesivas en el tratamiento C, la cual concuerda con los resultados obtenidos por otros en autores en raigrás anual (Groot; Neuteboom, 1997; Groot et al., 1999), estuvo asociada al aumento en el largo total de las hojas (lámina+vainas) ( $531\pm 42$ ,  $616\pm 102$ ,  $678\pm 102$  para las generaciones 1, 2 y 3 respectivamente). Estos resultados son concordantes con el efecto de tratamiento discutido en el párrafo precedente. Vale destacar, además, que la variación de largo foliar entre generaciones sucesivas registrada en el tratamiento C fue relativamente pequeña respecto de aquella lograda entre este



tratamiento y el L. Esto sugiere que la contribución de la fibra con función de sostén sería una característica altamente sensible al aumento del tamaño de las plantas. En el tratamiento L, a pesar de que el largo de láminas se redujo entre generaciones sucesivas, el largo total de las hojas fue similar ( $828\pm 48$ ). Ello explicaría la relativa estabilidad en los valores de AFE registrada en este tratamiento.

### **5.3. Digestibilidad in vitro, peso específico, peso de fibra y peso de fibra indigestible por unidad de área foliar**

En este trabajo, la digestibilidad in vitro ha sido determinada utilizando el incubador DaisyII de ANKOM. El protocolo para determinar digestibilidad que acompaña el mencionado equipo, recomienda utilizar un periodo de incubación de la muestra por 48 h para obtener al final del mismo el residuo de FDN. A partir de dicho residuo se puede estimar la digestibilidad verdadera in vitro (DVIVMS) y la digestibilidad de la FDN (DFDN). En esta tesis se realizaron dos modificaciones al mencionado protocolo: 1) se empleó un periodo de incubación de 24 h, y 2) a partir de los datos de digestibilidad verdadera se calcularon los valores de digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS).

El tiempo de incubación de 24 h se ha seleccionado porque en la bibliografía reciente se ha mencionado que una incubación por 48 h sobreestimaría los valores de digestibilidad (Hoffman et al., 2003; Oba; Allen, 2005). Estos autores aducen que en animales en mantenimiento, el tiempo de retención sería menor a 48 h y que el procesamiento del forraje realizado a la muestra para someterla al análisis incrementaría su tasa de digestión, por lo tanto con la reducción del tiempo de incubación se compensaría esa mayor tasa. Por otra parte, en esta tesis todos los análisis se efectuaron sobre la fracción lámina, la cual según Minson (1982) permanecería en el rumen menos de 25 h.

El valor de digestibilidad de materia seca se expresó como DAMS (DVIVMS - 11,9, Van Soest, 1994) debido a que la misma arroja valores similares a la digestibilidad in vitro de Tilley; Terry (1963), la cual ha sido la metodología más utilizada en la determinación de digestibilidad de los distintos recursos forrajeros, principalmente por su alta correlación con la digestibilidad in vivo y exactitud (Goldam et al., 1987; De Boever et al., 1988).

Tal como se esperaba, el tratamiento C presentó valores mayores DAMS que el tratamiento L ( $570\pm 27$  vs  $520\pm 31$  g  $\text{kg}^{-1}\text{MS}$ ). Estos resultados están en concordancia

con los observados por Duru et al. (1999) y Duru; Ducroq (2002) en pasto ovillo, donde los valores más altos se encontraron en láminas de pasturas sometidas a defoliaciones frecuentes (láminas cortas) respecto a defoliaciones menos frecuentes (láminas largas). En la bibliografía se han informado valores de digestibilidad in vitro de materia seca para *Chloris gayana* cv. Finecut en estado vegetativo de 599 g kg<sup>-1</sup> (Nasca, 2006). En otras gramíneas megatérmicas tales como *Panicum maximum*, *Panicum coloratum* y *Cenchrus ciliaris* se han informado valores de degradabilidad in situ de 680 – 730 g kg<sup>-1</sup> (De León et al., 1995; De León, 1998). En tanto que, Stritzler et al. (2002) encontraron valores de digestibilidad aparente in vivo para tres gramíneas megatérmicas que estuvieron en el orden de los 610 a 630 g kg<sup>-1</sup>. Si bien los valores encontrados en esta tesis son inferiores a los reportados en la bibliografía, una comparación completamente válida resulta dificultosa debido a que: (i) los métodos de determinación de digestibilidad utilizados son distintos o en algunos casos los mismos no están especificados, (ii) los análisis fueron realizados en un periodo de incubación de 24 h y no a 48 h como en las determinaciones convencionales, (iii) el tipo de material sometido a análisis en este trabajo fue diferente, ya que solamente se incluyeron láminas adultas verdes sin signos evidentes de senescencia, lo cual difiere de otro tipo de análisis en que se trabaja con un conjunto de fracciones morfológicas de distinta edad.

La digestibilidad de la materia seca depende de la proporción entre contenido celular y pared celular, y de la digestibilidad de la pared celular. Siguiendo el criterio de Groot; Neuteboom (1997), los resultados de DAMS se interpretaron según las variaciones entre tratamientos en términos del peso específico (Pe), de la fibra detergente neutro específica (FDNe, mg FDN cm<sup>-2</sup>) y de la fibra de detergente neutro indigestible específica (FDNie, mg FDNi cm<sup>-2</sup>). El primer parámetro sirve como indicador indirecto de cambios en el contenido de compuestos solubles debidos a eventuales variaciones en la actividad fotosintética, a pérdidas por respiración o a traslocación de asimilatos. Ello es relevante teniendo en cuenta que una vez alcanzado el tamaño máximo de las hojas no existe deposición de tejidos ni cambios morfológicos, por lo tanto, las variaciones en FDN no reflejarían cambios absolutos en el contenido de tejido estructural sino variaciones relativas que no afectan la distribución de la fibra por unidad de área. Luego del cese de la expansión de la hoja, el parámetro FDNie permitiría detectar las variaciones en la calidad de la fibra por modificaciones en el arreglo estructural de las células (empaquetamiento de células). Desde un punto de vista nutricional, la distribución de la fibra por unidad de área tiene

implicancias en la ruptura del material durante la masticación, en la tasa de digestión y en la tasa de pasaje, las cuales determinan el nivel de consumo. En este sentido, Wilson (1994), Wilson; Mertens (1995) y Wilson; Kennedy (1996) señalaron que el arreglo estructural de las células es tan importante como la composición química en la determinación de la digestibilidad y el consumo.

El incremento de Pe (o la disminución de su expresión inversa, el AFE) asociado al incremento de la longitud foliar (Figuras 9 y 11) es un fenómeno generalizado tanto en especies de gramíneas (v.g. Duru et al., 1999; Groot et al., 1999) como en latifoliadas (Niinemets et al., 2006). En las primeras se ha demostrado que dicho aumento es el resultado de la deposición continua de materia seca en la zona de crecimiento durante la fase de expansión foliar (Maurice et al., 1997). Tal como es esperable, la variación en Pe encontrada entre tratamientos ( $2 \text{ g cm}^{-2}$ ) estuvo asociada con el incremento en FDNe y FDNi-24e (Figura 11). Estas diferencias, fueron del orden de 17, 25 y 29% para Pe, FDNe y FDNi-24e entre los tratamientos C y L, respectivamente. Otros autores, trabajando en distintas gramíneas forrajeras, han encontrado también que el incremento en la longitud foliar es acompañado por aumentos en la FDN (Duru et al., 1999; Groot et al., 1999). También se han encontrado incrementos concomitantes entre el Pe y la FDNe (Groot et al., 1999). En este último trabajo, realizado en raigrás anual, se encontró que las láminas más largas presentaron un 33 % más de Pe y FDNe que las láminas más cortas, con valores promedio para ambas variables de 3 y 1, respectivamente. Estos valores son inferiores a los encontrados en el presente trabajo, en el cual las láminas tuvieron un promedio de 11 y 7 de Pe y FDNe, respectivamente. Wilson; Hattersley (1989), encontraron valores de Pe para distintas gramíneas megatérmicas, incluida *Chloris gayana*, que estuvieron en el orden de 5 y 8. Estas diferencias entre especies, para las variables citadas, ponen en evidencia las diferencias estructurales que se presentan entre gramíneas C3 y C4 y las cuales representarían limitaciones distintas para la digestión microbiana.

El incremento en Pe, FDNe y FDNi-24e observado con el aumento de tamaño foliar podría vincularse a modificaciones en la estructura de sostén de las plantas para favorecer la hidrodinamia y el soporte en la medida que se incrementa su tamaño, tal como fue discutido previamente (ver sección 5.2.2.). Dicho de otra manera, lo que se propone en este trabajo es que el aumento de los tres parámetros antes señalados sería una respuesta plástica, de origen fotomorfogenético, para asegurar la funcionalidad de las plantas en términos de captación lumínica y transporte de agua cuando su tamaño aumenta. De acuerdo con el planteo teórico propuesto por West et

al. (1997), el aumento de tamaño de las plantas traería aparejado no sólo un aumento del contenido de fibra (menos que proporcional al aumento de altura), sino también modificaciones en el arreglo estructural de los tejidos como consecuencia de la ramificación y afinamiento de los haces del xilema. Este aspecto en particular podría tener implicancias relevantes relacionadas con la ruptura y ataque microbiano de los tejidos (Wilson; Mertens, 1995)

Los cambios en DAMS ocurridos con el transcurso del tiempo, a veces referidos como envejecimiento, fueron marcados en el tratamiento L en comparación al C, el cual mostró una relativa estabilidad (Figura 10). En el primer caso la magnitud de la variación por envejecimiento fue del orden de 0,60 respecto de la variación promedio asociada al tamaño de las hojas generada por los tratamientos. Las variaciones temporales de la DAMS son determinados por la exportación de compuestos solubles desde las hojas senescentes hacia aquellas en proceso de expansión y a la disminución de la digestibilidad de los compuestos que forman la pared celular. Como se mencionó anteriormente, el Pe es un indicador indirecto de cambios en el contenido de compuestos solubles. La evolución del Pe, desde que apareció la lígula hasta el inicio de la senescencia, no mostró cambios en los tratamientos en estudio. Entonces, y de acuerdo con lo discutido previamente, la falta de detección de disminuciones en el Pe en ambos tratamientos sería una evidencia de que la movilización de compuestos solubles habría sido despreciable o poco marcada durante la vida foliar. Por lo tanto, los cambios en calidad encontrados en el tratamiento L habrían estado principalmente determinados por cambios en la fibra, tal como lo indica el incremento observado en FDNie en este tratamiento (Figura 11). La FDNe no mostró variaciones, hecho que va en línea con la idea de que la movilización de compuestos solubles no habría sido relevante. En contraste con los resultados de este trabajo en cuanto a DAMS, Groot; Neuteboom (1997) en láminas de raigrás anual y Duru; Ducroq (2002) en láminas de pasto ovillo, detectaron caídas importantes de la digestibilidad de la materia orgánica con el envejecimiento de los tejidos. Si bien los autores no especifican si las láminas de mayor edad o inserción en los macollos habían comenzado a senescer, este tipo de caída marcada difícilmente podría ser explicada por cambios en la composición de la fibra, estando generalmente determinadas por la movilización de compuestos solubles propia de la fase ontogénica señalada. En el caso de Groot; Neuteboom (1997), los autores encuentran una disminución significativa de compuestos solubles posterior a la aparición de la lígula. Además, en el mismo trabajo, la edad térmica alcanzada por los tejidos en el último muestreo fue del orden de los 600 GDC (temperatura base de 0°C).

De acuerdo a la información disponible sobre morfogénesis foliar de esta especie, dicho lapso pudo ser algo mayor que la vida media de las hojas (380 y 392 GDC citado por Agnusdei et al., 1997 y Da Silveira Pontes et al., 2003, respectivamente).

Tradicionalmente, la DAMS ha sido utilizada como un indicador de la calidad de un alimento. En la mayoría de los estándares de alimentación se utiliza la digestibilidad para predecir la cantidad de energía metabolizable del alimento (ARC, 1980; AFRC, 1992; NRC, 1996). Además, en numerosos trabajos se ha mencionado que la DAMS es buen predictor del consumo animal (Holmes et al., 1966). Sin embargo, la relación entre la digestibilidad de un forraje y su nivel de consumo ha sido discutida por varios autores, quienes han mencionado una gran variabilidad de resultados. Moore; Coleman (2001) sugirieron que debido a la inconstancia de dichas relaciones, ambas variables deberían considerarse como características independientes a la hora de describir la calidad de un forraje. Debido a las limitaciones que presenta la DAMS como predictor del consumo, algunos autores han señalado que la digestibilidad de FDN (o la FDN indigestible, FDNi) es un importante parámetro de calidad de los forrajes debido a que está altamente relacionado con el consumo animal (Oba; Allen, 1999; Hoffman et al., 2003). Según Jung; Allen (1995), el efecto de la digestibilidad de la fibra sobre el consumo es difícil de determinar debido a que su efecto es usualmente confundido con distintos niveles de FDN. Sin embargo Oba; Allen (1999) considerando dietas con un mismo nivel de FDN, determinaron que 1 unidad de aumento en el contenido de DFDN en la dieta, resulta en un 0.177 kg/día de incremento en el consumo de materia seca. Adicionalmente, algunos autores han mencionado que la DFDN es una importante medida de calidad, ya que está siendo usada en distintos enfoques sumativos para predecir la energía de los forrajes (Hoffman et al., 2003; Robinson et al., 2004).

#### **5.4. Fibra indigestible (FDNi-24) en láminas de generaciones sucesivas de hojas**

La evolución de la fibra indigestible entre láminas de generaciones sucesivas de hojas se analizará exclusivamente para los datos de FDNi-24 por unidad de peso foliar ( $\text{g kg}^{-1}$ , Figura 12) por razones de simplicidad dado que la presentación homóloga de los datos de FDNi-24e no agrega información adicional al análisis. Por otra parte, ésta es la forma de expresión más comúnmente utilizada.

Desde el momento de aparición visible de la lígula, el tratamiento L presentó mayor FDNi-24 (y de FDNi-24e) que el C en las tres generaciones evaluadas. El aumento simultáneo de ambas expresiones de la FDNi-24 difiere de lo encontrado en raigrás

anual (Groot; Neuteboom, 1997), donde sólo la FDNi-24e fue sensible al incremento de tamaño de las láminas. Ello sugiere que el incremento de tamaño foliar podría tener implicancias más serias en esta especie megatérmica que en la especie templada antes mencionada. Así, además del probable efecto negativo sobre la ruptura y ataque microbiano, sugerido a partir del incremento de la FDNi-24e, el aumento del tamaño foliar en esta especie determinaría un aumento concomitante en la cantidad de fibra por unidad de peso de forraje susceptible de ser consumido por el animal.

El otro aspecto relevante de la diferencia entre tratamientos, es que los mismos alcanzan hacia el final de la vida foliar diferentes niveles finales de acumulación de FDNi-24. Esto contrasta con lo observado por Groot; Neuteboom (1997) en pasturas de raigrás anual bajo distintos ambientes lumínicos, en las cuales la acumulación de FDNi alcanza un valor similar para las dos condiciones. Esto implicaría que, a diferencia de lo observado en raigrás anual, en *Chloris gayana* el incremento del largo foliar afectaría la composición química de los tejidos. Ello sería consecuencia de una mayor cantidad de haces vasculares por unidad de área, tal como se ha propuesto previamente en esta discusión, y de un consecuente aumento en la cantidad de sitios para la lignificación (Chonan, 1978, citado por Minson, 1990).

El aumento de FDNi-24 entre generaciones sucesivas observado en el tratamiento L (generaciones 1 y 2 respecto de la generación 3) en el momento en que se hace visible la lígula es un fenómeno encontrado en diversas gramíneas forrajeras (Groot; Neuteboom, 1997; Duru; Ducroq, 2002) y que se asocia consistentemente con el aumento progresivo del largo del tubo de vainas en la medida en que aumenta la acumulación de biomasa de la pastura. En la Figura 8, se mostró que la mayor parte de la fase de expansión de las láminas de la generación 1 y 2 tuvo lugar fuera del tubo de vainas en ambos tratamientos. En cambio, solo una parte de la duración total de la expansión se desarrolló fuera del tubo en la generación 3. La literatura antes citada sugiere que la cantidad de fibra indigestible dependería de la duración de la fase de elongación foliar dentro de las vainas y, vinculado a ello, al grado de avance del proceso de síntesis de fibra indigestible al momento en que la lámina se hace visible.

El incremento en la acumulación de FDNi-24 después de la aparición de la lígula observado en las láminas de las generaciones 1 y 2 del tratamiento L corrobora los resultados encontrados en raigrás anual (Groot; Neuteboom, 1997) y en esta misma especie estudiada en condiciones similares de manejo (Agnusdei et al., 2008). Sería interesante verificar si este patrón de envejecimiento de la fibra, el cual sugiere que la

lignificación transcurre durante una parte significativa de la vida foliar, es un fenómeno generalizable entre las gramíneas forrajeras.

La falta de acumulación de FDNi-24 en el tratamiento C no puede explicarse por el hecho de que las láminas hubieran desarrollado la mayor parte de la fase de elongación foliar dentro de las vainas (Figura 8). Las razones de esta diferencia entre tratamientos no son sencillas de proponer. A la luz de conocimientos sobre biomecánica de plantas, mayormente teóricos, podría especularse, sin embargo, sobre aspectos asociados a las respuestas morfológicas y anatómicas de las plantas frente a la incidencia de factores potencialmente perjudiciales para su estructura, como por ejemplo el viento (Niklas, 1999). Si bien el estudio se desarrolló en condiciones donde este tipo de inclemencia podría considerarse poco relevante, hay que considerar que el invernáculo estuvo siempre ventilado y que, naturalmente, la exposición a los movimientos de aire tuvo que ser mayor en el canopeo alto que en el bajo. Así, es probable que la falta de evidencias en cuanto a envejecimiento de la fibra observada en el tratamiento C con posterioridad a la aparición visible de la lígula responda, al menos en parte, a una menor necesidad de las plantas para resolver problemas de biomecánica del tipo de los previamente planteados. Esta presunción podría tener importantes implicancias prácticas en cuanto a las ventajas de manejar canopeos razonablemente bajos, compatibles con la estabilidad productiva de las pasturas y con objetivos de consumo animal. Tales ventajas radicarían en que el paso del tiempo no generaría variaciones relevantes en la calidad de la fibra, como es de esperar que ocurra en los canopeos altos. Será necesario desarrollar experimentos controlados, e inclusive verificaciones a campo, para avanzar y eventualmente confirmar este tipo hipótesis.

### **5.5. Relaciones entre parámetros de calidad**

Las determinaciones que evalúan los principales compuestos químicos de la pared celular (FDN, FDA y LDA), frecuentemente han sido mencionadas como estrechamente relacionadas a la digestibilidad de MS o de FDN y al nivel de consumo (Mertens, 1987; Minson, 1990; Moore et al., 1996). Van Soest (1965) encontró coeficientes de correlación de -0,65, -0,74 y -0,52 entre FDN, FDA y LDA y la digestibilidad de MS, respectivamente. Minson (1982) informó correlaciones entre FDA y digestibilidad de la MS que varían entre -0,5 y -0,95. Mientras que Damiran et al. (2008), encontraron coeficientes de determinación entre FDA y digestibilidad de MS estimada por Tilley-Terry, DaisyII e in situ de 0,45, 0,71 y 0,86, respectivamente. La

lignificación de la pared celular ha sido considerada el impedimento primario de la digestibilidad del forraje. En la bibliografía frecuentemente son encontradas las referencias de correlaciones negativas entre concentración de lignina y digestibilidad de MS y FDN. Sin embargo, Jung; Allen, (1995) señalaron que el contenido de lignina per se no sería responsable de la disminución de la digestión de la fibra, sino que la acción de la lignina consistiría en reducir el acceso de las enzimas a la fibra digestible. Según Hoffman et al. (2003) y Oba; Allen (2005), la DFDN es una medida independiente de calidad, la cual está escasamente relacionada a las evaluaciones comunes de PB, FDN, FDA y LDA. En este sentido, Crampton (1957) encontró que no existía relación entre la digestibilidad de la fibra y el contenido de ella luego de evaluar cinco especies templadas, entre ellas gramíneas y leguminosas. Mientras que Allen (1996), encontró que la LDA explicaba menos del 60 % de la variación de la DFDN en maíz y alfalfa. En este trabajo y de acuerdo con lo señalado por dichos autores, se encontraron coeficientes de determinación bajos (menores al 20 %) entre la DFDN y las determinaciones que estiman los componentes de la pared (FDN, FDA y LDA, Figura 15). Finalmente, cabe señalar que la alta relación entre DAMS y DFDN ( $R^2=0,75$ ) se debe a la forma en que dichos parámetros se estiman en el incubador DaisyII. Esto es, tanto la DAMS como la DFDN se calculan a partir del residuo de FDN indigestible al final del período de incubación. En el primer caso se resta a la MS incubada dicho residuo y en el segundo el mismo se deduce de la FDN incubada. Por lo tanto, y de acuerdo con lo ya señalado por Oba; Allen (2005) ambos parámetros están altamente relacionados.

## 5.6. Consideraciones finales

Finalmente, y a manera de síntesis de todo lo discutido, las relaciones entre la FDNi-24 con los parámetros de estructura foliar ( $P_e$ , Figura 13; largo de láminas y largo total de las hojas (lámina + vainas), Figura 14) muestran que el largo total de la hoja es el principal indicador de las variaciones en la calidad de la fibra. Ello es coherente con la idea de que el aumento del tamaño foliar en respuesta a incrementos en la biomasa de la pastura, conlleva variaciones en la estructura de haces vasculares, hecho que necesariamente involucra a la totalidad de la hoja. Las relaciones encontradas entre largo de hojas y calidad de la fibra son alentadoras en cuanto al impacto productivo que podría tener el manejo de la altura de la pastura en especies megatérmicas. En tal sentido, los datos obtenidos permiten estimar incrementos del orden de una unidad de FDNi por cada 50 mm de aumento en el largo



de las hojas, variación que podría tener efectos negativos indeseables en la respuesta productiva de los animales (Oba; Allen, 1999). En tal sentido, el largo foliar total podría considerarse como un indicador de manejo con potencial para controlar los cambios de calidad nutritiva en pasturas de *Chloris gayana*. Adicionalmente, el largo foliar total potencial podría ser tenido en cuenta como un carácter fenotípico valioso para incluir en etapas iniciales de evaluación de materiales con fines de mejora de la calidad nutritiva del forraje en gramíneas forrajeras.

## 6. CONCLUSIONES

El régimen de defoliación pre-experimental aplicado permitió reducir el tamaño promedio potencial de las láminas de *Chloris gayana* en un 33%, alcanzándose el objetivo de obtener tipos morfológicos contrastantes en longitud de hojas, lo cual muestra la plasticidad de esta especie frente al manejo de la defoliación. En paralelo con la reducción del largo foliar disminuyó el área y peso de las láminas y aumentó el área foliar específica (AFE), o decreció su inversa, el peso específico. Asociados a estos cambios estructurales, también se encontró que las láminas de menor tamaño tuvieron menor contenido de FDN y de FDNi-24 y mayor DAMS. Por otro lado, se constató que el proceso de envejecimiento afectó los parámetros en estudio solamente en las hojas de mayor tamaño. En este caso hubo un aumento de la FDNi-24 y una disminución de la DAMS desde la aparición de la lígula hasta el comienzo de la senescencia. La falta de evidencias de envejecimiento en las plantas de hojas cortas muestra un efecto secundario deseable de la reducción del tamaño foliar sobre la calidad nutritiva del forraje. En general, la caída de la calidad nutritiva de hojas adultas, resultado del proceso de envejecimiento, fue de menor magnitud que aquella ocasionada por el efecto del largo foliar. Finalmente, no se constató una fuerte asociación entre el contenido de FDN, FDA y lignina con la digestibilidad de la MS y FDN. Los resultados ponen en evidencia la importancia del tamaño foliar como determinante de las variaciones de la calidad nutritiva.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AFRC. 1992. Nutrient Requirements of Ruminant Animals: Protein. Technical committee on responses to nutrients. Report N° 9. Nutr. Abstr. Rev. (Series B) 62 (12):787-835.
- AGNUSDEI, M.; MAZZANTI, A.; COLABELLI, M. 1997. Análisis del crecimiento invernal de gramíneas de los pastizales de la Pampa Deprimida, Argentina. Rev. Arg.de Prod.Anim. 17(1):162-163.
- AGNUSDEI, M.; NENNING, F.; DI MARCO, O.; AELLO, M. 2008. Leaf growth dynamics and forage quality in temperate and tropical grasses. International IGC-IRC Congress, 29 de junio al 5 de Julio de 2008. Hohhot, China. pp.688.
- ALEXANDER R.H.; McGOWAN, M. 1966. The routine determination of *in vitro* digestibility of organic matter in forages. An investigation of the problems associated with continuous large scale operation. J. Br. Grassl. Soc. 21:140-147.
- ALLEN, M.S. 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. J Anim Sci. 74:3063-3075.
- AKIN, D.A. 1982. Section to slide technique for study of forage anatomy and digestion. Crop Sci. 22:444-446.
- AKIN, D. E. 1981. Microbial breakdown of feed in the digestive tract. Proceedings of International Symposium Nutritional limits to animal production from pastures, 24-28 august 1981. St Lucia, Australia. pp. 201-223.
- AKIN, D.E.; FALES, S.L.; RIGSBY, L.L.; SNOOK, M.E. 1987. Temperature effects on leaf anatomy, phenolic acids, and tissue digestibility in tall fescue. Agron.J. 79:271-275.
- AKIN, D.E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility at forages. Agron.J. 1:17-25.
- AKIN, D. E.; CHESSON, A. 1989. Lignification as the major factor limiting forage feeding value especially in warm conditions. Proc. 16th Int. Grassl. Congr. Assoc. Francaise pour la Production Fourragere, 4-11 october 1989. Nice, France. pp. 1753-1760.
- ANSLOW, R.C. 1967. Frequency of cutting and sward production. J.Agric.Sci. Camb., 68:377-384.
- ARC. 1980. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Technical review by an Agricultural Research Council Working Party. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal. 351 p.
- ARREDONDO, J.T.; SCHNYDER, H. 2003. Components of leaf elongation rate and their relationship to specific leaf area in contrasting grasses. New Phytologist 158:305-314.

- BAHMANI, I.; HAZARD, L.; VARLET-GRANCHER, C.; BETIN, M.; LEMAIRE, G.; MATTHEW, C.; THOM, E.R. 2000. Differences in tillering of long-and-short leaved perennial ryegrass genetic lines under full light and shade treatments. *Crop Sci.* 40: 1095-1102.
- BEEVER, D.E.; MOULD, F.L. 2000. Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. In Givens, D.I.; Owen, E.R.; Axford, R.F.E.; Omed, H.M. eds. *Forage evaluation in ruminant nutrition*, pp. 15-42.
- BEGG, J.E.; WRIGHT, M.J. 1962. Growth and development of leaves from intercalary meristems in *Phalaris arundinacea* L. *Nature* 197:1097-1098.
- BERONE, G.D. 2005. Caracterización morfogénica de dos cultivares de *Lolium perenne* y dos cultivares de *Bromus stamineus*. Tesis M.S. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina. 79 p.
- BRISKE, D.D. 1991. Developmental morphology and physiology of grasses. In: Heitschmidt, R.K.; Stuth, J.W. eds. *Grazing management – An ecological perspective*. Timber Press, Portland, Oregon, USA. pp. 85-108.
- BUXTON, D.R.; REDFEARN, D.D. 1997. Plant Limitations to Fiber Digestion and Utilization. *J. of Nutrition* 127(5):814S-818S.
- CASEY, I.A.; BRERETON, A.J.; LAIDLAW, A.S.; MCGILLOWAY, D.A. 1999. Effects of sheath tube length on leaf development in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Ann. of Appl. Biol.* 134:251-257.
- CHAPMAN, D.F.; LEMAIRE, G. 1993. Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. In: Baker, M.J. ed. *Grasslands for Our World*. SIR, Wellington. pp. 55-64.
- CHONAN, N. 1978. A comparative anatomy of mesophyll among the leaves of gramineous crops. *JARQ* 12:128-131.
- COLABELLI, M.; BUSTOS, J.; AGNUSDEI, M. 1998. Crecimiento de un pastizal natural de la pampa deprimida bonaerense bajo diferente disponibilidad de agua y nitrógeno. 1. Nitrógeno acumulado en el forraje. *Rev. Arg. de Prod. Anim.* 18(1): 123-124.
- COLE, D.F. 1975. Changes in leaf area and specific leaf weight of sugar beet leaves during the growing season. *Crop Sci.* 15:882-83.
- COLOMBATTO, D. 2006. Análisis de alimentos: aplicaciones prácticas. [en línea] <[www. agro. uba. ar / catedras / p\\_lechera / resumencolombato. pdf](http://www.agro.uba.ar/catedras/p_lechera/resumencolombato.pdf)> [Consulta:15 octubre 2008].
- CORDERO, J.J. 1996. Dinámica del crecimiento y eficiencia de utilización de una pastura de *Festuca arundinacea* Schreb., bajo pastoreo continuo de ovinos. Tesis M. Sc., Universidad Nacional Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina. 81 p.

- CORNACCHIONE, M.V. 2007. Producción forrajera de gramíneas subtropicales en el sudoeste santiagueño. *Rev.Arg.de Prod.Anim.* 27(1):224 -225.
- CORNACCHIONE, M.V.; PÉREZ, H.E.; FUMAGALLI, A.E. 2007. Efecto del cultivar y frecuencia de defoliación sobre la producción, composición y calidad de *Chloris gayana*. *Rev.Arg.de Prod.Anim.* 27(1):222-224.
- CRAMPTON, E.W. 1957. Interrelations between digestible nutrients and energy content, voluntary dry matter intake and overall feeding value of forages. *J.Anim. Sci.* 16:546-552.
- CRAMPTON, E.W.; DONEFER, E.; LLOYD, L.E. 1960. A nutritive value index for forages. *J.Anim.Sci.* 19:538-544.
- CULLEN, B.R; CHAPMAN, D.F.; QUIGLEY, P.E. 2006. Comparative defoliation tolerance of temperate perennial grasses. *Grass and Forage Sci.* 61:405-412.
- DAMIRAN, D.; DEL CURTO, T.; BOHNERT, D.W.; FINDHOLT, S.L. 2008. Comparison of techniques and grinding sizes to estimate digestibility of forage based ruminant diets. *Anim.Feed Sci. and Technol.* 141(1):15-35.
- DA SILVEIRA PONTES, L.; CARLOS NABINGER, C., DE FACCIO CARVALHO, P.; DA TRINDADE, J.; PORTELLA MONTARDO; DOS SANTOS, R. 2003. Variáveis morfogênicas e estruturais de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) manejado em diferentes alturas. *R. Bras. Zootec.* 32(4):814-820.
- DAVIDSON, J.L.; MILTHORPE, F.L. 1966. Leaf growth in *Dactylis glomerata* following defoliation. *Ann.of Bot.* 30:173-184.
- DAVIES, A. 1993. Tissue turnover in the sward. In: Davies, A.; Baker, R.D.; Grant, S.A.; Laidlaw, A.S. eds. *Sward Measurement Handbook*. The British Grassland Society, Reading. pp.183-216.
- DE BOEVER, J.L.; COTTYN, B.G.; ANDRIES, J.I.; BUYSSE, F.X.; VANACKER, J.M. 1988. The use of an enzymatic technique to predict digestibility metabolizable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Anim.Feed Sci.Technol.* 14:203-214.
- DE LEÓN, M. 1998. Producción y calidad forrajera de *Chloris gayana* y *Cenchrus ciliaris* bajo pastoreo en el norte de Córdoba. *Rev.Arg.de Prod.Anim.* 18(1):175-176.
- DE LEÓN, M.; BOETTO, C. 2004. Ampliando la frontera ganadera. INTA Estación Experimental Agropecuaria Manfredi, Argentina. Informe técnico N°6. 29 p.
- DE LEÓN, M.; LUNA, G.; PEUSER, R.; BOETTO, C.; BULASCEVICH, M. 1995. Efecto de la frecuencia de defoliación y el genotipo sobre la calidad del rebrote. Forraje producido en gramíneas megatérmicas. *Revista Argentina de Producción Animal.* 15 (1): 229 -231.
- DEMARQUILLY, C.; WEISS, P. 1970. Valeur alimentaire des fourrages verts. *Fourrages* 42: 3-22.

- DE VISSER, R.; VIANDEN, H.; SCHNYDER, H. 1997. Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N steady-state labelling. *Plant, Cell and Environ.* 20: 37-46.
- DINGKUNH, M.; TIVET, F.; SIBAND, P.L.; ASCH, F.; AUDEBERT, A.; SOW, A. 2001. Varietal differences in specific leaf area: a common physiological determinant of tillering ability and early growth vigor? In: Peng, S.; Hardy, B. eds. *Rice research for food security and poverty alleviation*. IRRI, Metro Manila. pp. 95-108.
- DURU, M.; FEUILLERAC, E.; DUCROCQ, H. 1999. In vitro digestibility response of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) to growth and defoliation: a simple model. *J. Agric.Sci.* 133: 379-388.
- DURU, M.; DUCROCQ, H. 2000. Growth and senescence of the successive leaves on a cocksfoot tiller. Effect of nitrogen and cutting regime. *Ann.Bot.* 85: 645-653.
- DURU, M.; DUCROCQ, H. 2002. A model of lamina digestibility of orchardgrass as influenced by nitrogen and defoliation. *Crop Sci.* 42: 214-223.
- FELLER, U.; FISCHER, A. 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Plants Sci.* 13:241-273.
- FERRI, C.M.; BRIZUELA, M.A.; CID, M.S.; STRITZLER, N.P. 2006. Dinámica de acumulación de láminas foliares y estructura del forraje diferido de *Panicum coloratum* L. *Agric.Téc.* 66(4):376-384.
- FIORANI, F.; BEEMSTER, G.T.; BULTYNCK, L.; LAMBERS, H. 2000. Can meristematic activity determine variation in leaf size and elongation rates between *Poa* species? A kinematic study. *Plant Physiol.* 124:845-856.
- FUKUSHIMA, R.S.; HATFIELD, R.D. 2004. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *J.Agric.Food Chem.* 52:3713-3720.
- GALLAGHER, J.N. 1979. Field studies of cereal leaf growth. I. Initiation and expansion in relation to temperature and ontogeny. *J.Exp.Bot.* 30: 625-636.
- GASTAL, F.; BÉLANGER, G.; LEMAIRE, G. 1992. A model of the leaf extension rate in tall fescue in response to nitrogen and temperature. *Ann.of Bot.* 70:437-442.
- GASTAL, F.; NELSON, C.J. 1994. Nitrogen use within the growing leaf blade of tall fescue. *Plant Physiol.* 105:191-197.
- GIVNISH, T.J. 1982. On the adaptive significance of leaf height in forest herbs. *Am. Nat.* 120:353-381.
- GOERING H.K.; VAN SOEST, P.J. 1970. *Forage Fiber Analyses. Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications*. ARS – USDA, Washington, DC.Agric. Handbook N° 379. 20 p.
- GOLDMAN, A.; GENIZI, A.; YUZARI, A.; SELIGMAN, N. 1987. Improving the reliability of the two –stage in vitro assay for ruminant feed digestibility by calibration

- against in vivo data from a wide range of sources. *Anim.Feed Sci.Technol.* 18:233-245.
- GROOT, J.C.; NEUTEBOOM, J.H. 1997. Composition and digestibility during ageing of Italian ryegrass leaves of consecutive insertion the same levels. *J.Sci.Food Agric.* 75:227-236.
- GROOT, J.C.; NEUTEBOOM, J.H.; DEINUM, B. 1999. Composition and digestibility during ageing of consecutive leaves on the main stem of Italian ryegrass plants, growing undisturbed or regrowing after cutting. *J.Sci.Food.Agric.* 79:1691-1697.
- GROOT, J.C.; LANTINGA, E.A.; NEUTEBOOM, J.H.; DEINUM, B. 2003. Analysis of the temperature effect on the components of plant digestibility in two populations of perennial ryegrass. *J.Sci.Food Agric.* 83:320-329.
- HALIM, R.A.; BUXTON, D.R; HATTENDORF, M.J.; CARLSON, R.E.1989. Water-stress effects on alfalfa forage quality after adjustment for maturity differences. *Agron.J.* 81:189.
- HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. 2005. Can Lignin Be Accurately Measured?. *Crop. Sci.* 45:832-839.
- HAZARD, L.; GHESQUIÈRE, M.; BARRAUX, C. 1996. Genetic variability for leaf development in perennial ryegrass populations. *Can.J.of Plant Sci.* 76: 113-118.
- HE, L.; TERASHIMA, N. 1989. Formation and structure of lignin in monocotyledons. 11. Deposition and distribution of phenolic acids and their association with cell wall polymers in rice plants (*Oryza sativa*). *Mokuzai Gakkaishi* 35:123.
- HE, L.; TERASHIMA, N. 1990. Formation and structure of lignin in monocotyledons. 111. Heterogeneity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) lignin with respect to the composition of structural units in different morphological regions. *J. Wood Chem.Technol.* 10:435.
- HODGSON, J. 1990. Grazing management. Science into practice. Longman Handbooks in Agriculture. Longman Scientific and Technical, Longman UK. 203 p.
- HOFFMAN, P.C.; LUNDBERG, K.M.; BAUMAN, L.M.; SHAVER, R.D. 2003. In vitro NDF Digestibility of Forages: The 30 vs. 48 hour debate. *Focus on Forage.* 5 (16): 1-3.
- HOLDEN, L.A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.* 82(8): 1791-1794.
- HOLMES, J.H.G.; FRANKLIN, M.C.; LAMBOURNE, L.J. 1966. The effects of season, supplementation and pelleting on intake and utilization of some tropical pastures. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 6: 354-363.
- HUNGATE, R.E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York and London. 533 p.

- IYAMA, K.; Lam, T.B.T.; Stone, B.A. 1990. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry (Oxf.)* 29:733.
- JOHNSON, R.R.; DEHORITY, B.A.; PARSONS, J.L.; SCOTT, H.W. 1962. Discrepancies between grasses and alfalfa when estimating nutritive value from in vitro cellulose digestibility by rumen microorganisms. *J. Anim.Sci.* 21:892.
- JUNG, H.J. 1989. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agron.J.* 81:33-38.
- JUNG, H.G.; SMITH, R.R.; ENDRES, C.S. 1994. Cell-wall composition and degradability of stem tissue from lucerne divergently selected for lignin and in vitro dry matter disappearance. *Grass Forage Sci.* 49:295.
- JUNG, H.J.; ALLEN, M.S. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J.Anim.Sci.* 73: 2774-2790.
- JUNG, H.G.; CASLER, M.D.1991. Relationship of lignin and esterified phenolics to fermentation of smooth bromegrass fibre. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32:63.
- JUNG, H.G.; DEETZ, D.A. 1993. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. eds. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. p.315.
- JUNG, H.G.; RUSSELLE, M.P. 1991. Light source and nutrient regime effects on fiber composition and digestibility of forages. *Crop Sci.* 31:1065.
- JUNG, H.G.; VOGEL, K.P. 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *J. Anim. Sci.* 62:1703.
- JUNG, H.G. ; VOGEL, K.P. 1992. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and big bluestem (*Andropogon gerardii* V.) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. *J. Sci. Food Agric.* 59:169-176.
- JURIK, T.K. 1986. Temporal and special patterns of specific leaf weight in successional northern hardwood tree species. *Amer.J.of Bot.* 73:1083-92.
- KAMALAK, A.; CANBOLAT, O.; GURBUZ, Y.; OZAY, O. 2005. Prediction of dry matter intake and digestibilities of some forages using the gas production techniques in sheep. *Turk. J. Vet. Anim.Sci.* 29(2):517-523.
- KHAZAAL, K.; DENTINHO, M.T.; RIBEIRO, M.; ORSKOV, E.R. 1993. A comparison of gas production during incubation with rumen contents in vitro and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility in vivo and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.* 57(1):105-112.
- KAVANOVÁ, M.; GRIMOLDI, A.A.; LATTANZI, F.A.; SCHNYDER, H. 2006. Phosphorus nutrition and mycorrhiza effects on grass leaf growth. P status- and size-mediated effects on growth zone kinematics. *Plant, Cell and Environm.* 29: 511-520.
- KEMP, D.R. 1980. The location and size of the extension zone of emerging wheat leaves. *New Phytologist* 84:729-737.



- KUNST, C.; LEDESMA, R.; BAZÁN, M.; ANGELLA, G.; PRIETO, D.; GODOY, J. 2003. Rolado de fachinales e infiltración de agua en el suelo en el Chaco occidental argentino. *Rev.de Invest.Agrop.* 32:105-122.
- KÜPPERS, M. 1985. Carbon relations and competition between woody species in a Central European hedgerow. IV. Growth form and partitioning. *Oecologia* 66:343-352.
- LABREVEUX, M.E. 1998. Caracterización de la producción de forraje y de la morfogénesis de ocho especies de gramíneas forrajeras de la pampa húmeda argentina. Tesis M.S., Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina. 75 p.
- LAMBERS, H.; FREIJSEN, N.; POORTER, H.; HIROSE, T.; VAN DER WERF, A. 1989. Analyses of growth based on net assimilation rate and nitrogen productivity, their physiological background. In: Lambers, H.; Cambridge, M.L.; Konings, H.; Pons, T.L. eds. Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants. SPB Academic, The Hague, The Netherlands. pp. 1-17.
- LATTANZI, F.A. 1998. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el crecimiento otoño-invernal y la morfogénesis de cultivares de festuca alta con diferentes patrones de crecimiento estacional. Tesis M. S., Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina. 115 p.
- LATTANZI, F.A., SCHNYDER, H.; THORNTON, B. 2004. Defoliation effects on carbon and nitrogen substrate import and tissue-bound efflux in leaf growth zones of grasses. *Plant, Cell and Environ.* 27:347-356.
- LEMAIRE, G.; CHAPMAN, D. 1996. Tissue flows in grazed plant communities. In: HODGSON, J.; ILLIUS, A.W. eds. The ecology and management of grazing system. CAB International. pp. 3-36.
- LEMAIRE, G.; AGNUSDEI, M. 2000. Leaf tissue turnover and efficiency of herbage utilization. In: Lemarie, G.; Hodgson, J.; de Moraes, A.; Carvalho, P.C. de F.; Nabinger, C. Grassland ecophysiology and grazing ecology. CAB International. pp. 265-287.
- MAAN, A.A.; WRIGHT, D.; ALCOCK, M.B. 1989. Effect of sowing date, sowing density and nitrogen supply on leaf extension in spring barley. *J.Agric.Sci.* 113: 305-315.
- MAAS, S.J.; ARKIN, G.F.; ROSENTHAL, W.D. 1987. Relationship between the areas of successive leaves on grain sorghum. *Agron.J.* 79:739-745.
- MABJEESH, S.J.; COHEN, M.; ARIELI, A. 2000. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *J. Dairy Sci.* 83:2289-2294.
- MAC ADAM, J.W.; NELSON, C.J. 1987. Specific leaf weight in zones of cell division, elongation and maturation in tall fescue leaf blades. *Ann.of Bot.* 59:369-376.

- MAC ADAM, J.W.; VOLENEC, J.J.; NELSON, C.J. 1989. Effects of nitrogen on mesophyll cell division and epidermal cell elongation in tall fescue leaf blades. *Plant Physiol.* 89:549-546.
- MARINO, M.A. 1996. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el crecimiento inverno primaveral, la composición química y la calidad del forraje de *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* Lam. Tesis M.S., Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina. 104 p.
- MARTIN, G.O. 2005. Pasturas cultivadas para el NOA (parte 1) Grama Rhodes. Cátedra de Forrajes y Cereales - FAZ - UNT. [en línea] [http://www.producción.com.ar/2005/05oct\\_12.htm](http://www.producción.com.ar/2005/05oct_12.htm) [Consulta: 10 setiembre 2008]
- MAURICE, I.; GASTAL, F.; DURAND, J.L. 1997. Generation of form and associated mass deposition during leaf development in grasses: a kinematic approach for non-steady growth. *Ann.of Bot.* 80: 673-683.
- MAZZANTI, A.; LEMAIRE, G.; GASTAL, F. 1994. The effect of nitrogen fertilization upon the herbage production of tall fescue swards continuously grazed with sheep. 1. Herbage growth dynamics. *Grass and Forage Sci.* 49:111-120.
- MAZZANTI, A.; LEMAIRE, G. 1994. Effect of nitrogen fertilization upon the herbage production of tall fescue swards continuously grazed with sheep. 2. Consumption and efficiency of herbage utilization. *Grass and Forage Sci.* 49:352-359.
- MENKE, K.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of feedingstuffs from the gas production when they incubated with rumen liquor in vitro. *J.Agric.Sci.* 93:217-222.
- MENKE, K.; STEINGASS, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim.Res. Develop.* 28:7-55.
- MERTENS, D.R.1987. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *J.Anim.Sci.* 64:1548-1558.
- MINSON, D. J. 1982. Effects of chemical and physical composition of herbage eaten upon intake. In: HACKER, J.B. ed. *Nutritional Limits to Animal Production from Pastures.* C.A.B. Farnham Royal, U.K. pp.167-82.
- MINSON, D.J. 1990. *Forage in ruminant nutrition.* Academic Press, San Diego, California. 483 p.
- MINSON, D.J.; MCLEOD, M.N.1972. The in vitro technique: Its modification for estimating digestibility of large numbers of tropical pasture samples. *Div. Tropical Pastures, Commonwealth Sci. Indust. Res. Org., Australia. Tech. Paper N° 8.* pp. 1-15.
- MOORE, J.E.; BURNS, J.C.; FISHER, D.S. 1996. Multiple regression equations for predicting relative feed value of grass hays. In: *Proceeding of the 1996 American Forages and Grassland Council, Vancouver, BC.* pp. 35-139.

- MOORE, K.J.; MOSER, L.E. 1995. Quantifying developmental morphology of perennial grasses. *Crop Sci.* 35:37-43.
- MOORE, J.E.; COLEMAN, S.W. 2001. Forage intake, digestibility, NDF and ADF: how well are they related? *P. Am. Forage Grassl. Council Conference.* 10:238-242.
- MOORE, K.J.; MOSER, L.E.; VOGEL, K.P.; WALLER, S.S.; JOHNSON, B.E.; PEDERSEN, J.F. 1991. Describing and quantifying growth stages of perennial forage grasses. *Agron.J.* 83:1073-1077.
- MOTT, G.O.; MOORE, J.E. 1969. Forage evaluation techniques in perspective. In Barnes, R.F.; Clanton, D.C.; Gordon, C.H.; Klopfenstein, T.J.; Waldo, D.R. eds. *Proc. Natl. Conf. Forage Quality Evaluation and Utilization, Nebraska Center Cont. Educ., Lincoln, NE.* pp. L1-L7.
- NABINGER, C. 1997. Eficiência do uso de pastagens: disponibilidades e perdas de forragem. 14° Simposio sobre manejo da pastagem. Pi racicaba, São Pablo. pp. 231-251.
- NASCA, J. 2006. Producción sostenible de carne bovina con pasturas tropicales en la Llanura Deprimida Salina de Tucumán. Tesis M.S. Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Agronomía y Zootecnia. 138 p.
- NELSON, C.J.; SLEPER, D.A. 1981. Using leaf area expansion rate to improve yield of tall fescue. *Proceedings of the 14° International Grassland Congress, Kentucky, USA.* pp. 413-452.
- NELSON, C.J.; CHOI, S.Y.; GASTAL, F.; COUTTS, J.H. 1992. Nitrogen effects on relationships between leaf growth and leaf photosynthesis. In: Murata, N. ed. *Research in photosynthesis.* Kluwer Academic Press, the Netherlands. pp. 789-792.
- NIKLAS, K. 1999. A mechanical perspective on foliage leaf form and function. *New Phytol.* 143: 19-31.
- NIINEMETS, U.; PORTSMUTH, A.; TOBIAS, M. 2006. Leaf size modifies support biomass distribution among stems, petioles and mid-ribs in temperate plants. *New Phytologist* 171: 91-104.
- NRC. 1996. *Nutrients requirements of beef cattle.* 7th ed. National academy press, Washington D.C. 242 p.
- OBA, M.; ALLEN, M. 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 589-596.
- OBA, M.; ALLEN, M. 2005. *In Vitro Digestibility of Forages.* Tri-State Dairy Nutrition Conference. 2-3 may 2005, Fort Wayne, Indiana. pp. 81-91.
- ØRSKOV, E. R.; HOVELL, B.D.; MOUID, F. 1980. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos. *Prod.Anim.Trop.* 5:213.

- PARSONS, A.J. 1988. The effects of season and management on the growth of grass swards. In: Jones, M.B.; Lazenby, A. eds. *The Grass Crop: The Physiological Basis of Production*. Chapman and Hall, London. pp. 129-169.
- PARSONS, A.J.; ROBSON, M.J. 1980. Seasonal changes in the physiology of S.24 perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). 1. Response of leaf extension to temperature during the transition from vegetative to reproductive growth. *Ann.of Bot.* 46:435-444.
- PASCUET, M.L. 2003. Dinámica del pastoreo de bovinos sobre pasturas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) mantenidas a diferentes alturas en primavera y otoño. Tesis M. S. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina. 83 p.
- PEACOCK, J.M. 1975. Temperature and leaf growth in *Lolium perenne*. I. The thermal microclimate: its measurement and relation to crop growth. *J.of Appl.Ecol.* 12:99-114.
- PELL, A.N.; MOLINA, D.O.; SCHOFIELD, P. 2000. Measurement of gas production in vitro. In *Proceedings of the EAAP Symposium "Gas Production: Fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity"*, BSAS, Wageningen, The Netherlands. pp 1-12.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073.
- RALPH, J.; HELM, R. 1993. Lignin/hydroxycinnamic acid/polysaccharide complexes: synthetic models for regiochemical characterization. In: Jung, H.G; Buxton, D.R.; Hatfield, R.D.; Ralph, J. eds. *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSASSA, Madison, Wi. pp. 201-246.
- REARTE, D. 2007. Distribución territorial de la ganadería vacuna. Proyecto Nacional de carnes. [en línea]<http://www.inta.gov.ar/balcarce/carnes/index.htm> [Consulta: 20 enero 2009]
- REID, R.L. 1994. Milestones in forage research (1969-1994). In Fahey, G.C.; Collins, M.; Mertens, D.R.; Moser, L. eds. *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA. pp. 1-58.
- RICCI, H.R.; Guzman, L.; Juarez, V.; Diaz, A. 1997. Producción de materia seca de siete gramíneas tropicales bajo tres frecuencias de corte. *Pasturas Trop.* 19 (2):45-49.
- ROBSON, M.J. 1972. The effect of temperature on the growth of S.170 tall fescue (*Festuca arundinacea*). I. Constant temperature. *J.of Appl.Ecol.* 9: 643-653.
- ROBINSON, P.H.; GIVEN, D.I.; GETACHEW, G. 2004. Evaluation of NRC, UC Davis and ADAS approaches to estimate the metabolizable energy values of feeds at maintenance energy intake from equations utilizing chemical assays and in vitro determinations. *Anim.Feed Sci. and Technol.* 114:75-90.
- RODRIGUEZ PALMA, R. 1998. Fertilización nitrogenada de un pastizal de la Pampa Deprimida: crecimiento y utilización del forraje bajo pastoreo de vacunos. Tesis

- M. S. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad Integrada Balcarce Argentina. 135 p.
- RODRÍGUEZ, D.; ANDRADE, F.H.; GOUDRIAAN, J. 2000. Does assimilate supply limit leaf expansion in wheat grown in the field under low phosphorus availability?. *Field Crops Res.* 67: 227-238.
- ROHWEDER, D.A.; BARNES, R.F.; JORGENSEN, N. 1978. Proposed hay grading standards based on laboratory analyses for evaluating quality. *J.Anim.Sci.* 47(3):747-759.
- RYSER, P.; VERDUYN, B.; LAMBERS, H. 1997. Phosphorus allocation and utilization in three grass species with contrasting response to N and P supply. *New Phytol.*137:293-302.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C. 1992. *Plant physiology*. Wadsworth, P. Vermont CA. 682 p.
- SAS, 1999. *Procedures Guide, Version 8*. SAS Institute, Cary, NC, USA. 1729 p.
- SBRISSIA, A. 2004. Morfogênese, dinâmica do perfilhamento e do acúmulo de forragem em pastos de capim –marandu sob lotação contínua. Tese Doutor em Agronomia. Universidade de Sao Paulo. 171 p.
- SBRISSIA, A.; Da SILVA, S.C. 2001. O ecossistema de pastagens e a produção animal. 38º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bootecnia, Piracicaba. pp.731-754.
- SCHNYDER H.; DE VISSER R. 1999. Fluxes of reserve-derived and currently assimilated carbon and nitrogen in perennial ryegrass recovering from defoliation. The regrowing tiller and its component functionally distinct zones. *Plant Physiol.* 119:1423-1435.
- SCHNYDER, H.; SEO, S.; RADEMACHER, I.; KÿHBAUCH, W. 1990. Spatial distribution of growth rates and of epidermal cell lengths in the elongation zone during leaf development in *Lolium perenne* L. *Planta* 181:423-431.
- SKINNER, R.H.; NELSON, C.J. 1994. Effect of tiller trimming on phyllochron and tillering regulation during tall fescue development. *Crop Sci.* 34:1267-1273.
- SKINNER, R.H.; NELSON, C.J. 1995. Elongation of the grass leaf and its relationship to the phyllochron. *Crop Sci.* 35:4-10.
- STERN, M.D.; BACH, A.; CALSAMIGLIA, S. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J.Anim.Sci.* 75:2256-2276.
- STODDART, J.L.; THOMAS, H.; LLOYD, E.J.; POLLOCK, C.J. 1986. The use of a temperature-profiled position transducer for the study of low-temperature growth in Graminae. *Planta* 167:359-368.
- STRITZLER, N.P.; PAGELLA, J.H.; FERRI, C.M.; FUENTES, M.E.; MARTÍNEZ, O.; STEFFANAZZI, R.B. 2002. Consumo y digestibilidad in vivo en gramíneas

- perennes estivales. Comparación del forraje de primavera entre especies. Rev. Arg.de Prod.Anim. 23(1):67.
- SULLIVAN, J. T. 1959. A rapid method for the determination of acid insoluble lignin in forages and its relation to digestibility. J.Anim.Sci. 18:292.
- TARUMOTO, I. 2005. The effect of temperature and daylength on heading in tetraploid cultivars of rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth). JARQ. 39 (2):105 -108.
- TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; HE, L.F.; TAKABE, K. 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield, R.D.; Ralph, J. eds. Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. p 247.
- THOMAS, H. 1983. Analysis of the nitrogen response of leaf extension in *Lolium temulentum* seedlings. Ann. Bot. 51:363-371.
- THOMAS, H.; STODDART, J.L. 1980. Leaf senescence. Ann.Review of Plant Physiol. 31: 83 -111.
- TILLEY, J.M.; TERRY, R.A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. J. Br. Grassl. Soc. 18:104-111.
- TOLL VERA, J.; MARTÍN, G.O. (H); NICOSIA, M.G.; LAGOMARSINO, E.D.; FERNÁNDEZ, M.M.; LIENDO, E.; CARLINO, G. 2000. Forrajas: Grama Rhodes (*Chloris gayana* Kunth) cultivares para el Este tucumano y el Oeste santiagueño (1ra. Parte). Cátedra de Forrajes y Manejo de Pasturas, FAZ – UNT. [en línea] [http://www.producción.com.ar/2000/00set\\_08.htm](http://www.producción.com.ar/2000/00set_08.htm) [Consulta: 20 setiembre 2008]
- TOMLIN, D.C.; JOHNSON, R.R.; DEHORITY, B.A. 1964. Relationship of lignification to in vitro cellulose digestibility of grasses and legumes. J. Anim. Sci. 23:161.
- UENO, O.; KAWANO, Y.; WAKAYAMA, M.; TAKEDA, T. 2006. Leaf Vascular Systems in C3 and C4 Grasses: A Two-dimensional Analysis. Ann.of Bot. 97: 611-621.
- VAN SOEST, P.J. 1965. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: Voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. J.Anim.Sci. 24:834.
- VAN SOEST, P.J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. J.Dairy Sci. 119-128.
- VAN SOEST P., ROBERTSON, J.; LEWIS, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dietary Sci. 74:3583-3597.
- VAN SOEST, P.J. 1993. Cell wall matrix interactions and degradation-Session synopsis. In: Jung, H.G, Buxton, D.R., Hatfield, R.D.; Ralph, J. eds. Forage cell wall structure and digestibility. ASA-CSSASSA, Madison, WI. pp. 377-395.
- VAN SOEST, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY. 476 p.

- VOLENEC, J.J.; NELSON, C.J. 1981. Cell dynamics in leaf meristems of contrasting tall fescue genotypes. *Crop Sci.* 21:381-385.
- WEISS, W.P. 1994. Estimation of Digestibility of forages by Laboratory Methods. In: Fahey, G.C.; Collins, M.; Mertens, D.R.; Moser, L. eds. *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA. pp. 644-681.
- WERGER, M.; HIROSE, T.; DURING, H.; HEIL, G.; HIKOSAKA, K.; ITO, T.; NACHINSHONHOR, U.; NAGAMATSU, D.; SHIBASAKI, K.; TAKATSUKI, S.; VAN RHEENEN, J.; ANTEN, N. 2002. Light partitioning among species and species replacement in early successional grasslands. *J. of Veg. Sci.* 13:615-626.
- WEST, G.; BROWN, J.; ENQUIST, B. 1997. A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science* 276:122-126.
- WILHELM, W.W.; McMASTER, G.S. 1995. Importance of the phyllochron in studying development and growth in grasses. *Crop Sci.* 35:1-3.
- WILSON, J.R. 1976. Variation of leaf characteristics with level of insertion on a grass tiller. I. Development rate, chemical composition and quality. and dry matter digestibility. *Aust. J. Agric. Res.* 27: 343-354.
- WILSON, J.R.; BROWN, R.H.; WINDHAM, W.R. 1983. Influence of leaf anatomy on the dry matter digestibility of C3, C4, and C3/C4 intermediate type of *Panicum* species. *Crop Sci.* 23:141-146.
- WILSON, J. R. 1990. Influence of plant anatomy on digestion and breakdown. In: AKIN, D.E.; LJUNGDAHL, L.G.; WILSON, J.R.; HARRIS, P.J. *Microbial and Plant Opportunities to Improve the Utilization of Lignocellulose by Ruminants*. Elsevier Science, New York. pp. 99-117.
- WILSON, J. R. 1993. Organization of forage plant tissues. In: Jung, H. G.; Buxton, D. R.; Hatfield, R. D.; Ralph, J. eds. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Madison, WI. pp.1-32.
- WILSON, J.R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *J. Agric. Sci Camb.* 122:173-182.
- WILSON, J.R. 1997. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. *Simpósio internacional sobre produção animal em pastejo*. 4-6 november 1997. Viçosa, MG. *Anais Viçosa, MG: UFV.* pp.173-208.
- WILSON, J.R.; HATTERSLEY, P.W. 1989. Anatomical characteristics and digestibility of leaves of *Panicum* and other grass genera of C3 and different types of C4 photosynthetic pathway. *Aust. J. Agric. Res.* 40:125-36.
- WILSON, J.R.; KENNEDY, P.M. 1996. Plant and animal constraints to voluntary feed intake associated with fibre characteristics and particle breakdown and passage in ruminants. *Aust. J. Agric. Res.* 47 (2):199-225.

- WILSON, J. R.; MERTENS, D.R. 1995. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Sci.* 35:251-259.
- WILSON, R.E.; LAIDLAW, A.S. 1985. The role of the sheath tube in the development of expanding leaves in perennial ryegrass. *Ann.Appl.Biol.* 106: 385-391.
- WOLEDGE, J.; JEWISS, O.R. 1969. The effect of temperature during growth on the subsequent rate of photosynthesis in leaves of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Ann.of Bot.* 33:897-913.



## 8. APÉNDICE

### Resultados de análisis estadísticos

**Cuadro I.** Análisis de varianza para vida media foliar (grados días de crecimiento, GDC) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento\*gener).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	2	57,600	428,800	0,51	0,603
Tratamiento	1	1345,600	1345,600	1,60	0,210
Gener	2	2326,400	1163,200	1,38	0,257
Tratamiento*Gener	2	1289,600	644,800	0,77	0,469

**Cuadro II.** Análisis de varianza para largo de lámina (mm) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento\*gener).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	2	3234,028	1617,014	1,08	0,344
Tratamiento	1	366938,888	366938,889	246,11	<,0001
Gener	2	93654,861	46827,431	31,41	<,0001
Tratamiento*Gener	2	88217,361	44108,681	29,58	<,0001

**Cuadro III.** Análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo para largo de pseudotallo (mm) de dos tratamientos (tamaño foliar), medición y la interacción (tratamiento\*medición).

Efecto	GL Num	GL Den	Valor F	Pr > F
Bloque	2	26	3,34	0,051
Tratamiento	1	26	6,91	0,014
Medición	14	390	39,16	<,0001
Tratamiento*Medición	14	390	0,31	0,993

**Cuadro IV.** Análisis de varianza para largo foliar (lámina+vainas, mm) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento\*gener).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	2	200119,112	100059,556	16,49	<,0001
Tratamiento	1	1351868,164	1351868,164	222,73	<,0001
Gener	2	47739,035	23869,517	3,93	0,025
Tratamiento*Gener	2	85573,809	42786,904	7,05	0,002

**Cuadro V.** Análisis de varianza para área foliar específica (AFE, cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento\*gener).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	2	104,662	52,331	0,86	0,427
Tratamiento	1	7036,283	7036,283	116,04	<,0001
Gener	2	322,091	161,046	2,66	0,078
Tratamiento*Gener	2	1707,989	853,995	14,08	<,0001

**Cuadro VI.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para área foliar específica (AFE, cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, variable y) y largo foliar (lámina+vainas, mm, variable x).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	7254,329	7254,329	93,77	<,0001	0,570
Error	68	5260,538	77,361			
Total corregido	69	2515,000				

Variable	GL	Estimación	Error	Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	137,225	4,784	28,68	<,0001
Largo foliar	1	-0,061	0,006	-9,68	<,0001

**Cuadro VII.** Análisis de varianza para digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS, g kg<sup>-1</sup>) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento\*gener).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	2	1465,194	732,597	0,99	0,377
Tratamiento	1	40196,455	40196,455	54,55	<,0001
Gener	2	7757,780	3878,890	5,26	0,008
Tratamiento*Gener	2	4253,551	2126,775	2,89	0,064

**Cuadro VIII.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento corto.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	853,176	853,176	1,16	0,293	0,006
Error	25	8457,000	738,299			
Total corregido	26	19311,000				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Error Estándar		
Intercepto	1	600,689	29,176	20,57	<,0001
GDC	1	-0,102	0,098	-1,07	0,293

**Cuadro IX.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento largo.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	4943,989	4943,989	5,99	0,019	0,337
Error	34	28085,000	826,023			
Total corregido	35	33029,000				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Error Estándar		

Intercepto	1	585,553	27,205	21,52	<,0001
GDC	1	-0,223	0,091	-2,45	0,019

**Cuadro X.** Análisis de varianza para peso específico (Pe, mg cm<sup>-2</sup>) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento\*gener).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	2	2,265	1,132	1,15	0,322
Tratamiento	1	103,933	103,933	105,97	<,0001
Gener	2	1,342	0,671	0,68	0,508
Tratamiento*Gener	2	21,223	10,611	10,82	<,0001

**Cuadro XI.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para peso específico (Pe, mg cm<sup>-2</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento corto.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	1,949	1,949	2,64	0,113	0,012
Error	34	25,052	0,737			
Total corregido	35	27,001				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	9,414	0,813	10,55	<,0001
GDC	1	0,001	0,003	1,63	0,113

**Cuadro XII.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para peso específico (Pe, mg cm<sup>-2</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento largo.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	0,505	0,505	0,29	0,596	0,023
Error	34	60,091	1,767			

Total corregido	35	60,596			
		Estimación	Error		
Variable	GL	Parámetros	Estándar	Valor t	Pr >  t
Intercepto	1	11,314	1,258	9,23	<,0001
GDC	1	0,004	0,004	0,53	0,596

**Cuadro XIII.** Análisis de varianza para fibra de detergente neutro específico (FDNe, mgFDN cm<sup>-2</sup>) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento\*gener).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	2	8,135	4,068	2,69	0,077
Tratamiento	1	73,902	73,902	48,85	<,0001
Gener	2	1,671	0,836	0,55	0,579
Tratamiento*Gener	2	1,143	0,572	0,38	0,687

**Cuadro XIV.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro específico (FDNe, mgFDN cm<sup>-2</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento corto.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	3,157	3,156	1,18	0,287	0,197
Error	27	72,258	2,676			
Total corregido	28	75,415				
		Estimación	Error			
Variable	GL	Parámetros	Estándar	Valor t	Pr >  t	
Intercepto	1	4,243	1,742	2,12	0,043	
GDC	1	0,006	0,006	1,09	0,287	

**Cuadro XV.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro específico (FDNe, mgFDN cm<sup>-2</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento largo.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	0,206	0,206	0,32	0,578	0,002
Error	34	22,181	0,652			
Total corregido	35	22,387				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	7,412	0,764	9,46	<0,0001
GD	1	0,001	0,003	0,56	0,578

**Cuadro XVI.** Análisis de varianza para fibra de detergente neutro indigestible específico (FDNie, mgFDNi cm<sup>-2</sup>) de dos tratamientos (tamaño foliar), tres generaciones (gener) y la interacción (tratamiento\*gener).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F
Bloque	2	1,676	0,838	2,02	0,143
Tratamiento	1	59,502	59,502	143,11	<,0001
Gener	2	0,806	0,403	0,97	0,386
Tratamiento*Gener	2	6,614	3,307	7,95	0,001

**Cuadro XVII.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible específico (FDNie, mgFDNi cm<sup>-2</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento corto.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	0,977	0,977	3,40	0,078	0,087
Error	24	6,900	0,288			
Total corregido	25	7,877				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		

Intercepto	1	3,673	0,598	6,07	<,0001
GDC	1	0,009	0,002	1,84	0,078

**Cuadro XVIII.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible específico (FDN<sub>ie</sub>, mgFDN<sub>i</sub> cm<sup>-2</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en el tratamiento largo.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajust
Modelo	2	3,65	1,825	2,82	0,074	0,151	0,146
Error	33	21,35	0,647				
Total corregido	35	25,00					

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Error Estándar		
Intercepto	1	-3,950	5,333	-0,74	0,464
GD	1	0,070	0,040	1,93	0,062
GD <sup>2</sup>	1	-0,000	0,000	-1,83	0,077

**Cuadro XIX.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDN<sub>i</sub>, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 1 del tratamiento corto.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	2,957	2,957	0,02	0,905	0,087
Error	6	1153,769	192,295			
Total corregido	7	1156,727				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Error Estándar		
Intercepto	1	455,349	27,844	16,35	<,0001
GDC	1	0,012	0,093	0,12	0,905

**Cuadro XX.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 2 del tratamiento corto.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	57,835	57,835	0,58	0,474	0,088
Error	6	594,955	99,159			
Total corregido	7	652,791				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	455,325	22,245	20,47	<,0001
GDC	1	0,058	0,074	0,76	0,474

**Cuadro XXI.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 3 del tratamiento corto.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	16,174	16,174	0,13	0,727	0,016
Error	8	988,313	123,539			
Total corregido	9	1004,487				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	503,146	18,627	27,01	<,0001
GDC	1	-0,022	0,062	-0,36	0,727

**Cuadro XXII.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 1 del tratamiento largo.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	2663,924	2663,924	2,63	0,101	0,209



Error	10	10113,000	1011,285
Total corregido	11	12777,000	

Variable	GL	Estimación	Error	Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	463,999	52,137	8,91	<,0001
GDC	1	0,286	0,175	1,62	0,101

**Cuadro XXIII.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 2 del tratamiento largo.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	2804,763	2804,763	3,57	0,088	0,263
Error	10	7865,958	786,596			
Total corregido	11	10671,000				

Variable	GL	Estimación	Error	Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	458,307	45,981	9,95	<,0001
GDC	1	0,289	0,154	1,89	0,088

**Cuadro XXIV.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y edad foliar (grados días de crecimiento, GDC, variable x) en la generación 3 del tratamiento largo.

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	98,312	98,312	0,59	0,461	0,056
Error	10	1669,683	166,968			
Total corregido	11	1767,995				

Variable	GL	Estimación	Error	Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	535,053	21,185	25,25	<,0001

GDC	1	0,054	0,071	0,77	0,461
-----	---	-------	-------	------	-------

**Cuadro XXV.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y largo foliar (largo láminas+vainas, mm, variable x).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	67798,000	67798,000	99,25	<,0001	0,623
Error	60	40988,000	683,128			
Total corregido	61	108786,000				

Variable	GL	Estimación Parámetros	Error Estándar	Valor t	Pr >  t
Intercepto	1	367,617	15,451	23,79	<,0001
Largo total	1	0,196	0,019	9,96	<,0001

**Cuadro XXVI.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y largo de lámina (mm, variable x).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	38323,000	38323,000	32,63	<,0001	0,352
Error	60	70463,000	1174,380			
Total corregido	61	108786,000				

Variable	GL	Estimación Parámetros	Error Estándar	Valor t	Pr >  t
Intercepto	1	391,244	22,603	17,31	<,0001
Largo lámina	1	0,263	0,046	5,71	<,0001

**Cuadro XXVII.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para fibra de detergente neutro indigestible (FDNi, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y peso específico (Pe, mg cm<sup>-2</sup>, variable x).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
--------	----	----	------------------	---------	--------	----------------

Modelo	1	50046,000	50046,000	51,12	<,0001	0,460
Error	60	58740,000	979,004			
Total corregido	61	108786,000				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Error Estándar		
Intercepto	1	321,049	27,825	11,54	<,0001
Peso específico	1	17,474	2,444	7,15	<,0001

**Cuadro XXVIII.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad de la FDN (DFDN, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y fibra de detergente neutro (FDN, g kg<sup>-1</sup>, variable x).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	18551,000	18551,000	11,56	0,001	0,126
Error	61	97848,000	1604,060			
Total corregido	62	116398,000				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Error Estándar		
Intercepto	1	1152,244	210,019	5,70	<,0001
FDN	1	-1,086	0,339	-3,40	0,001

**Cuadro XXIX.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad de la FDN (DFDN, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y fibra de detergente ácido (FDA, g kg<sup>-1</sup>, variable x).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	23481,000	23481,000	15,45	0,0002	0,194
Error	60	91163,000	1519,384			
Total corregido	61	114644,000				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Error Estándar		
Intercepto	1	977,471	122,843	7,86	<,0001
FDA	1	-1,601	0,397	-3,93	0,0002

**Cuadro XXX.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad de la FDN (DFDN, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y lignina de detergente ácido (LDA, g kg<sup>-1</sup>, variable x).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	4745,067	4745,067	2,55	0,116	0,056
Error	60	111608,000	1860,132			
Total corregido	61	116353,000				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	526,942	23,109	22,47	<,0001
LDA	1	-1,415	0,714	-1,60	0,116

**Cuadro XXXI.** Análisis de varianza y coeficientes de regresión para digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS, g kg<sup>-1</sup>, variable y) y digestibilidad de la FDN (DFDN, g kg<sup>-1</sup>, variable x).

Fuente	GL	SC	Cuadrados Medios	Valor F	Pr > F	R <sup>2</sup>
Modelo	1	65521,000	65521,000	163,38	<,0001	0,728
Error	61	24463,000	401,026			
Total corregido	62	89983,000				

Variable	GL	Estimación		Valor t	Pr >  t
		Parámetros	Estándar		
Intercepto	1	192,082	28,489	6,27	<,0001
DFDN	1	0,723	0,059	12,78	<,0001