

CALIDAD NUTRITIVA DE HOJAS DE DOS CULTIVARES DE FESTUCA ALTA
(*Festuca arundinacea* Schreb.)

Juan Ramón Insua

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de
MAGÍSTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

Unidad Integrada Balcarce

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

Balcarce, Argentina.

Diciembre 2011

**CALIDAD NUTRITIVA DE HOJAS DE DOS CULTIVARES DE FESTUCA ALTA
(*Festuca arundinacea* Schreb.)**

Juan Ramón Insua

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

Directora de Tesis

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

Co-director de Tesis

Jorge Carrete, Ing. Agr., MSc.

Asesor

**CALIDAD NUTRITIVA DE HOJAS DE DOS CULTIVARES DE FESTUCA ALTA
(*Festuca arundinacea* Schreb.)**

Juan Ramón Insua

Aprobada por:

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

Directora de Tesis

Evaluador Externo

Evaluador Externo

Evaluador Externo

DEDICATORIA

*A la Yaya,
mi primer maestra,
mi abuela...*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerles a mis directores, Mónica y Oscar, quienes me metieron en esto, y luego, me ayudaron a salir. Por la confianza brindada y el tiempo dedicado a mi formación académica y humana.

A todo el departamento de Producción Animal, en especial al grupo de Pasturas por su apoyo, ayuda y buena onda.

A “los chicos del Chinchorro” quienes hicieron más divertido el posgrado.

A Marita por todo su cariño y paciencia a lo largo de todo este tiempo.

A Jos, Marcela y Eugenia por su colaboración en las mediciones y en el laboratorio.

A Germán Berone por las horas de oficina que dedicamos a pensar y discutir, las cuales deberían figurar en el analítico.

A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) por darme la posibilidad de seguir estudiando.

Le agradezco profundamente a la Yaya por haberme enseñado el hábito de estudiar, el poder de la voluntad y la paciencia, y por ser la persona con la que aprendí a aprender por el solo hecho de querer aprender.

Para terminar, le dedico las últimas líneas a mi familia por su apoyo y contención incondicional. En especial a mi papá por contagiarme su amor por el campo; a “mi vieja” por sus consejos, tartas y empanadas; a mi tío por sus “charlas de tío”; y a mis hermanos que son mi fuente de risas y alegrías, aún en los momentos difíciles.

...y a ELLA, que la conocí durante el transcurso del posgrado. Por su colaboración en el ensayo, que a pesar de que a veces no la entiendo y de los muchos dolores de cabeza que me ha dado, en el fondo la quiero. Y aunque no soporta la playa, no voy a olvidar las largas horas del verano 2009 que pasamos juntos bajo el sol. Por todas las cosas que me enseñó y las que me enseñará: Gracias Festuca!

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Características generales de la especie en estudio	4
2.2. Factores que afectan los valores de Digestibilidad in vitro	5
2.2.1. Metodología de laboratorio	5
2.2.2. Fracciones de la planta	6
2.2.3. Cultivares	7
2.2.4. Estado de desarrollo de la pastura y manejo del pastoreo	8
2.3. Aspectos biológicos que determinan la calidad nutritiva de gramíneas	11
2.3.1. Composición de la Pared celular	11
2.3.1.1. Pared primaria y secundaria	12
2.3.1.2. Lignificación	12
2.3.1.3. Barreras químicas	13
2.3.1.4. Barreras físicas	14
2.3.2. Organización de los tejidos foliares	15
2.3.3. Edad foliar	16
2.3.4. Largo foliar	17
2.4. Crecimiento vegetativo de gramíneas y morfología foliar	18
2.5. Resumen de antecedentes	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21

3.1. Características del ensayo experimental	21
3.2. Medidas climáticas	21
3.3. Determinaciones en planta	22
3.4. Análisis estadísticos	24
4. RESULTADOS	27
4.1. Efecto del genotipo sobre la calidad de las láminas	27
4.2. Efecto de la edad foliar sobre la calidad de las láminas	28
4.3. Efecto del largo foliar sobre la calidad de las láminas	29
4.4. Efecto de la morfogénesis foliar sobre la calidad de las láminas	30
4.5. Evolución de la DAMS y la DFDN del conjunto de láminas	33
5. DISCUSIÓN	35
5.1. Efecto del genotipo sobre la calidad de las láminas	35
5.2. Efecto de la edad foliar sobre la calidad de las láminas	35
5.3. Efecto del largo foliar sobre la calidad de las láminas	38
5.4. Efecto de la morfogénesis foliar sobre la calidad de las láminas	39
5.5. Digestibilidad de la MS y FDN del conjunto de láminas	40
5.6. Consideraciones finales	41
6. CONCLUSIONES	43
7. BIBLIOGRAFIA	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de calidad nutritiva en ensayos comparativos de diferentes cultivares de festuca alta.	9
Tabla 2. Valores de calidad nutritiva en diferentes estados fenológicos de festuca alta.	10
Tabla 3: Esquema general de muestreo durante el rebrote de dos cultivares de festuca alta.	23
Tabla 4. Contenido de FDN, digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) y digestibilidad de la FDN (DFDN) en diferentes estados ontogénicos de Advance y El Palenque Plus.	27
Tabla 5. Digestibilidad de la FDN de láminas de tres generaciones sucesivas de hojas comparadas con y sin el efecto de envejecimiento dentro del tubo de vainas al momento de emergencia para Advance y El Palenque Plus.	37
Tabla 6. Estado de hoja, contenido de FDN, digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) y digestibilidad de la FDN (DFDN) del conjunto de láminas en tres momentos de un rebrote de Advance y El Palenque Plus.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Temperatura media, mínima y máxima diaria durante el período del ensayo.	22
Figura 2. Contenido de FDN de láminas de Advance y El Palenque Plus durante el período de rebrote expresado en grados días de crecimiento (GDC) acumulados.	28
Figura 3. Digestibilidad de la FDN (DFDN) de tres generaciones de hojas sucesivas (G1, G2, G3) para Advance y El Palenque Plus durante el período de rebrote expresado en grados días de crecimiento (GDC) acumulados.	29
Figura 4. Efecto del largo de lámina sobre el contenido de FDN y de DFDN para Advance y El Palenque Plus en diferentes estados ontogénicos de hojas vivas.	30
Figura 5. Evolución del intervalo de aparición de hoja (IAH) con el tiempo térmico expresado en grados días (GDC) acumulados para Advance y El Palenque Plus.	31
Figura 6. Evolución del número de hojas vivas (NHV) con el tiempo térmico expresado en grados días (GDC) acumulados para Advance y El Palenque Plus.	32
Figura 7. Largo de lámina de tres generaciones sucesivas para Advance y El Palenque Plus durante el período de rebrote expresado en grados días de crecimiento (GDC) acumulados.	32
Figura 8. Evolución del largo de vaina con el tiempo térmico expresado en grados días (GDC) acumulados para Advance y El Palenque Plus.	33
Figura 9. Digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) y digestibilidad de la FDN (DFDN) del conjunto de láminas durante un rebrote expresado en grados días (GDC) acumulados para Advance y El Palenque Plus.	34

RESUMEN

El estudio de la calidad del forraje en relación a parámetros morfogénicos y estructurales es importante para diseñar criterios de defoliación orientados a optimizar el crecimiento y la calidad de la pastura, en especies forrajeras que difieren en recambio foliar, porte y hábito de crecimiento. Este enfoque se utilizó en esta tesis para investigar la calidad de dos cultivares de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.), uno tradicional y otro seleccionado por suavidad de las hojas ("softer-leaved"). A tal efecto se evaluaron las variaciones del contenido de fibra detergente neutro (FDN) y digestibilidad de la FDN (DFDN) durante el ciclo de vida de las láminas y durante la senescencia de ambos cultivares. Se hipotetizó que: (i) el cultivar de hojas flexibles tiene menor contenido de FDN y mayor DFDN; (ii) ambos parámetros disminuyen con la edad y largo de hoja en ambos cultivares. El ensayo se llevó a cabo en EEA INTA Balcarce, en el cual se sembraron dos cultivares de festuca alta, uno de "hojas flexibles" (Grasslands Advance^{Gentos}) y otro tradicional (El Palenque Plus^{INTA}). Se utilizaron 250 macetas por cultivar al aire libre, sin limitantes hídricas ni nutricionales dispuestas en un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones. Ambos cultivares se manejaron bajo corte para lograr micro pasturas densas y foliosas. Durante el rebrote estival se realizaron ocho cosechas de 300 macollos por cultivar, de los cuales se separaron láminas de seis categorías de edad (desde la emergencia hasta la senescencia completa) de tres generaciones sucesivas de hojas (G1, G2 y G3) que conforman un ciclo de rebrote. En éstas se determinó el contenido de FDN, la digestibilidad de la FDN (DFDN) y la digestibilidad aparente de la MS (DAMS) a 24 horas de incubación (digestor Daisy^{II}, ANKOM). Además, se midió el intervalo de aparición de hoja (IAH), la tasa de elongación (TEF) y vida media foliar (VMF) en 15 macollos marcados por cultivar. El tiempo se expresó en grados días de crecimiento (GDC) que se calculó como la sumatoria de las temperaturas medias diarias por encima de 4°C. Las variables en estudio se analizaron con funciones lineales y curvilíneas, y se efectuó ANVA y comparación de medias (Tukey, $p < 0,05$). El largo foliar fue similar entre cultivares ($p = 0,14$), pero aumentó ($p < 0,0001$) entre generaciones de hojas sucesivas de 140 ± 12 , 240 ± 34 y 360 ± 39 mm para G1, G2 y G3, respectivamente. El contenido de FDN se mantuvo constante durante la vida foliar sin diferencias entre cultivares ($p = 0,14$) con una media de $54,5 \pm 3$ %FDN, pero aumentó a $64,9 \pm 0,8$ % durante la senescencia (fin VMF), período en el cual se exportan compuestos solubles. La DFDN fue similar entre cultivares a un mismo estado ontogénico ($p = 0,12$); sin embargo disminuyó con el tiempo a mayor tasa en Advance,

que tuvo menor VMF que El Palenque Plus (490 vs. $632 \pm 60^{\circ}\text{Cd}$). La DFDN disminuyó también entre generaciones sucesivas de hojas ($p < 0,0001$), con el largo ($p < 0,0001$) y edad foliar ($p < 0,0001$). La DAMS estuvo altamente asociada a la DFDN ($R^2 = 0,95$). La TEF y IAH fueron similares entre cultivares ($p > 0,05$). Se concluye que Advance, por tener menor VMF, debería defoliarse más frecuentemente que El Palenque Plus para mantener similar calidad nutritiva.

Palabras clave: hojas flexibles, digestibilidad FDN, morfogénesis foliar, manejo de la defoliación.

ABSTRACT

Research about of forage quality in relation to morphogenic and structural traits in grass species differing in size and growth habitat is important to design defoliation managements aimed to optimize pasture growth and quality. This frame work is also important to compare different cultivars within species such as tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in which there are traditional and soft leaf types. The purpose of this study were to study neutral detergent fiber (NDF) and NDF digestibility (NDFD) variations during leaf lifespan and senescence of two tall fescue cultivars differing in leaf softness. We hypothesized that (i) the new type cultivar has less NDF and higher NDFD; (ii) the NDFD decline with leaf age and length in both cultivars. The study was conducted at the EEA INTA Balcarce, in which two cultivars of tall fescue were sown (El Palenque Plus^{INTA} [traditional] and Grasslands Advance^{Gentos} [soft leaf type]) in 250 pots arranged in completely randomized design (three replicates). Both cultivars were managed under natural climate conditions with no limitation of water, N and P. Cultivars were defoliated to obtain dense mini swards of leafy structure. Eight harvested of 200 tillers/experimental unit were done to obtain six stages from leaf emergence to complete senescence, of three successive leaf generations (G1, G2, G3) of a summer regrowth. Leaf blades were separated from sheaths and used to determine NDF, NDFD and apparent DM digestibility (DMD) for 24 h of incubation in the DaisyII apparatus (Ankom technology). Moreover, the rates of leaf appearance (LAR) and leaf elongation (LER) and the leaf life span (LLS) were measured in 15 marked tillers/cultivar. Time was expressed in growing degree days ([GDD= \sum (daily Temp.- 4°C)]. The variables were analyzed by curvilinear and lineal functions. ANOVA and mean comparisons (Tukey, $p < 0.05$) were performed. The final lamina length was similar between cultivars ($p = 0.14$) and increased between successive leaf generations ($p < 0.0001$) from 140 ± 12 , 240 ± 34 to 360 ± 39 mm for G1, G2 y G3, respectively. The NDF content was stable throughout the LLS ($54.5 \pm 3\%$) without differences between cultivars ($p = 0.14$). However, the NDF increased during senescence to 64.9 ± 0.8 due to the exportation of soluble compounds. The NDFD were similar between cultivars at similar ontogenic stage ($p = 0.12$), but declined over time at higher rate in Advance, which had shorter LLS than El Palenque Plus (490 vs. $632 \pm 60^\circ\text{Cd}$). The NDFD decreased between generations ($p < 0.0001$), with leaf age ($p < 0.0001$) and with leaf length ($p < 0.0001$). The DMD was highly correlated with NDFD ($R^2 = 0.95$). Species did not differ in LAR and LER ($p > 0.05$). Data show that Advance because of its shorter

LLS should be defoliated more frequently than El Palenque Plus to maintain similar quality.

Keywords: soft leaf, digestibility of FDN, leaf morphogenesis, defoliation management.

1. INTRODUCCIÓN

Festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) es una de las gramíneas perennes templadas más extensamente difundidas en el mundo (Hannaway *et al.*, 2009) debido a que se adapta a un amplio rango de condiciones ambientales (Mazzanti *et al.*, 1992). Recientemente han aparecido en el mercado nuevas variedades de festuca alta que se conocen como cultivares de hojas flexibles (*soft leaf*), seleccionados para mejorar el consumo, la palatabilidad y la producción animal (Hopkins *et al.*, 2009). Algunos de estos cultivares como Grasslands Roa y Grasslands Advance han mostrado producciones de leche comparables con raigrás perenne (Milne *et al.*, 1997; Tharmaraj *et al.*, 2005; Chapman *et al.*, 2007). No obstante, ciertos trabajos no encontraron grandes diferencias de calidad nutritiva entre los cultivares nuevos y los tradicionales (Tempone *et al.*, 2000; Carrete, 2001; Asay *et al.* 2002; Burns, 2009). Esta situación abre nuevos interrogantes en cuanto a las diferencias en calidad de los materiales tradicionales y modernos, como también respecto del tipo de manejo necesario para que cada uno de ellos exprese su potencial.

El mantenimiento de la calidad nutritiva de festuca alta depende, al igual que en raigrás perenne (Fulkerson; Slack, 1994), del acople entre la frecuencia de defoliación (por corte o pastoreo) y la frecuencia de recambio foliar de la pastura (Donaghy *et al.*, 2008 Lattanzi *et al.*, 2007; Callow *et al.*, 2003). El recambio foliar se refiere al lapso de tiempo hasta que la pastura, si bien continua produciendo nuevas hojas, deja de acumularlas debido al inicio de la senescencia de las hojas formadas al comienzo del rebrote. En este tiempo, denominado vida media foliar, las plantas alcanzan un número máximo promedio de hojas vivas por macollo. Basado en este criterio, el tiempo requerido por cada especie o cultivar para alcanzar la vida media, o el número máximo de hojas vivas por macollo, establece el intervalo máximo entre pastoreos para evitar caídas marcadas de calidad nutritiva en pasturas en estado vegetativo (Fulkerson; Donaghy, 2001). De acuerdo con ello, el desarrollo de prácticas específicas de manejo para producir forraje de alta calidad, requiere de información comparativa sobre variaciones de calidad en relación con la dinámica de morfogénesis foliar para diferentes especies y cultivares en estado vegetativo.

Otro factor que puede ser determinante de la calidad nutritiva es la acumulación de biomasa. Al respecto, Lemaire; Gastal (1997) plantean que el aumento de biomasa

trae aparejado indefectiblemente un incremento de la proporción de tejido estructural, en detrimento de la fracción metabólica, para permitir el sostén y la actividad fotosintética de la cubierta. Estos tejidos de sostén se caracterizan por tener bajo contenido celular y paredes gruesas lignificadas (Wilson, 1997) que limitan la digestibilidad del forraje debido a que la fibra es lenta e incompletamente digestible (Buxton; Redfearn, 1997). De hecho, se ha observado en distintas especies, como raigrás (Groot; Neuteboom, 1997), pasto ovollo (Duru; Ducroq, 2002), agropiro (Di Marco; Agnusdei, 2010) y especies C4 (Wilson, 1976a; Avila *et al.*, 2010; Agnusdei *et al.*, 2009), que la calidad disminuye entre hojas sucesivas de un ciclo de rebrote concomitantemente con el incremento de su longitud. Agnusdei *et al.* (2009) explican esta asociación por la mayor proporción de tejido estructural en las hojas de mayor tamaño, tal como lo observó Wilson (1976b). En algunos casos el mayor contenido de tejido estructural no necesariamente se manifiesta en mayor contenido de fibra detergente neutro (FDN) sino que también puede implicar menor digestibilidad de FDN (DFDN).

La pared celular de los tejidos sufre con el paso del tiempo cambios físicos (Wilson, Mertens, 1995; Wilson, 1997) y/o químicos (Jung, 1989; Akin 1989; Van Soest, 1993; Jung; Allen, 1995; Buxton; Redfearn, 1997; Satter *et al.*, 1999), y arreglos estructurales (Wilson, 1997), que impiden el ataque microbiano en el rumen, haciendo menos digestibles la FDN. Groot; Neuteboom (1997), Agnusdei *et al.* (2009) y Avila *et al.* (2010) observaron una disminución de la DFDN en hojas de gramíneas C3 y C4 con la edad. Oba y Allen (1999) concluyen que la DFDN es un determinante importante de la digestibilidad de la MS (DMS) y el consumo voluntario de forraje.

En este trabajo se evaluó el contenido de FDN, DFDN, DMS y las características morfológicas durante la ontogenia de láminas de dos cultivares *Festuca arundinacea* en estado vegetativo. El objetivo fue comparar la calidad de las láminas de dos cultivares de festuca alta, uno tradicional y otro catalogado como de “hojas flexibles” (Fribourg; Milne, 2009), a lo largo de la vida media foliar durante un ciclo completo de rebrote estival en estado vegetativo.

Las hipótesis planteadas fueron:

1. El cultivar de hojas flexibles (Advance) presenta mayor digestibilidad y/o menor contenido de FDN que el cultivar tradicional (El Palenque Plus).
2. En ambos cultivares la DFDN disminuye con la edad foliar de las láminas.

3. El tamaño de hojas aumenta con las generaciones de hojas sucesivas, con la consecuente disminución de la DFDN.
4. La morfogénesis de las hojas (tasa de crecimiento, aparición y vida foliar) influyen sobre la FDN y DFDN.
5. La DAMS esta asociada tanto a la FDN como la DFDN.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características generales de la especie en estudio

Festuca alta es una forrajera perenne que se adapta a un amplio rango de condiciones ambientales, se recupera satisfactoriamente de sequías e inundaciones y soporta niveles moderados de salinidad y/o alcalinidad (Mazzanti *et al.*, 1992). Es nativa de Europa, norte de África y oeste y centro de Asia (Hoveland, 2009), y ha sido exitosamente introducida en el norte y sur de América, Sud África, Australia, Nueva Zelanda y este de Asia (Hannaway *et al.*, 2009). En Estados Unidos es considerada la pastura de gramínea cultivada más importante (Fribourg *et al.*, 2009), mientras que en Argentina es la principal gramínea templada ocupando más del 30% del total del área de pasturas cultivadas del país (3500000 ha), y más del 70% de las 500000 has del Uruguay (Milne, 2009). Por todo lo mencionado, *festuca alta* es probablemente la gramínea forrajera con las cualidades más sobresalientes para los ambientes ganaderos de las regiones templado-húmedas del mundo.

Festuca alta muestra una producción de ciclo otoño-invierno-primaveral (OIP), con una distribución estacional del forraje que puede variar según el tipo de material genético. Los cultivares de origen mediterráneo muestran durante el otoño e invierno un crecimiento más activo que los cultivares de origen templado, mientras que estos últimos concentran una mayor producción durante la primavera y verano. A pesar de las diferencias en el patrón de distribución estacional, los cultivares presentan similares producciones anuales de forraje (Mazzanti *et al.*, 1992). Este comportamiento en la producción primaria de los cultivares templados y mediterráneos fue confirmado por Lattanzi *et al.* (2007) en términos de producción animal.

A pesar de que *festuca alta* ha sido catalogada como una especie de pobre calidad (Crowder, 1955; Lassiter *et al.*, 1956; Jacobson *et al.*, 1957), puede alcanzar valores de digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) de 70-75% en estado vegetativo, con valores de FDN de 50% y contenidos de proteína superiores a 15% (Burns, 2009). Con esta calidad nutritiva se pueden obtener ganancias de peso del orden de 0,5 y 0,8 kg día⁻¹ (Lattanzi *et al.*, 2007) y producciones de leche comparables a las obtenidas con pasturas en base a raigrás perenne (Chapman *et al.*, 2007).

2.2. Factores que afectan los valores de Digestibilidad *in vitro*

Existe un amplio rango de valores de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) en la bibliografía para festuca alta (Tabla 1 y 2), asociado a la metodología de laboratorio utilizada para medir la digestibilidad, fracciones de la planta analizadas, cultivar, estado de desarrollo de la pastura o manejo del pastoreo.

2.2.1. Metodología de laboratorio

Los procedimientos para determinar la digestibilidad *in vitro* pueden afectar los resultados de laboratorio debido al tamaño de molido de la muestra (Damiran *et al.*, 2008), técnica de laboratorio (Damiran *et al.*, 2008), forma de expresar la digestibilidad (Damiran *et al.*, 2008), fuente de inóculo (Holden, 1999) y tiempo de incubación (Oba; Allen, 2005; Avila *et al.*, 2010).

Las dos técnicas más utilizadas en el país para medir la digestibilidad *in vitro* son el método de Tilley y Terry (1963) y el método Daisy^{II} en el digestor Ankom.

El Tilley y Terry consta de dos etapas. En la primera, se coloca la muestra inicial durante 48 h en un ambiente anaeróbico junto al licor ruminal y una solución buffer. En la segunda etapa se simula la digestión postruminal, donde el residuo de la etapa anterior se trata con pepsina ácida durante otras 48 h. Por último, el residuo final se utiliza para el cálculo de la digestibilidad de la MS.

Recientemente, ANKOM Technology Corporation (Fairport, NY, USA) desarrolló la técnica de las bolsitas filtrantes (Daisy^{II}) para estimar la digestibilidad verdadera de la materia seca (DVMS) y la digestibilidad de la FDN (DFDN). En esta técnica, se colocan las bolsas filtrantes F57 (ANKOM Technology) con las muestras (MSi) en frascos con licor ruminal y solución buffer. Estos frascos se encuentran en continuo movimiento dentro de una cámara de digestión. Luego de un tiempo de incubación de 48 h, se mide el residuo de MS (MSr) para la determinación de la degradabilidad de la MS (DegMS). Como último paso, se lava la MSr con detergente neutro para obtener el residuo de FDN indigestible (FDNi). Con el residuo de FDNi se calcula la DFDN y la DVMS.

La DVMS se puede expresar como digestibilidad aparente de la MS (DAMS) restando un factor metabólico de 11,9 (Van Soest, 1994). El cálculo de la DAMS sirve para obtener valores comparables a los de digestibilidad *in vitro* de Tilley y Terry (Van Soest, 1994).

En lugar de las 48 h de incubación utilizadas por Tilley y Terry, en la bibliografía se pueden encontrar valores de digestibilidad a 24, 30 y 48 h (Hoffman *et al.*, 2003; Avila *et al.*, 2010). Oba y Allen (2005) argumentaron que las 48 h de incubación sobreestimarían la DIVMS debido a que el tiempo de retención de los alimentos en el rumen sería menor; y que la reducción del tiempo de incubación compensaría el incremento de la tasa de digestión por efecto del molido de la muestra. Por otra parte, Minson (1982) encontró que el tiempo promedio de retención en el rumen de hojas de gramíneas fue de 25 h, menor a las 48 h comúnmente utilizadas en las estimaciones *in vitro*.

La degradabilidad efectiva (DE) de un alimento, o componente de un alimento (ej. proteína, FDN), surge de los parámetros de cinética ruminal (fracción soluble, FS; fracción degradable, FD; tasa de digestión, Kd; tasa de pasaje, Kp). Estos se determinan mediante la técnica de incubación de bolsitas de nylon, también llamado *in situ* o *in sacco* (Colombatto *et al.*, 2006).

- $DegMS = (MSi - MSr) / (MSi)$
- $DFDN = [(MSi \times FDN) - FDNi] / (MSi \times FDN)$
- $DVMS = (MSi - FDNi) / (MSi)$
- $DAMS = DVMS - 11,9$
- $DE = FS + FD [Kd / (Kd + Kp)]$

2.2.2. Fracciones de la planta

Las hojas de gramíneas, en general, presentan menor contenido de fibra y mayor digestibilidad que los tallos (Buxton; Redfearn, 1997; Groot *et al.*, 2003). Estos últimos pierden digestibilidad con la edad más abruptamente que las hojas (Akin 1989; Buxton; Redfearn, 1997; Groot *et al.*, 2003). A su vez, las láminas de las hojas muestran mayor digestibilidad que las vainas (Buxton; Redfearn, 1997; Groot *et al.*, 2003).

2.2.3. Cultivares

Existe un gran número de cultivares de festuca alta disponibles en el mercado mundial (Hopkins *et al.*, 2009) con más de 70 cultivares registrados en Argentina (INASE, 2011). Los recientes materiales genéticos (e.g. Advance, Lubrette, Barcel, Sopline, Adora) seleccionados por hojas de mayor suavidad (“*soft-leaved*”, Hopkins *et al.*, 2009), conocidos en la jerga comercial como “flexibles”, se publicitan como variedades de festuca alta de mayor DIVMS. Estos cultivares han sido mejorados para la utilización de la especie en cadenas forrajeras de sistemas intensivos de producción ganadera, ya que los cultivares tradicionales (como El Palenque, Demeter, Manade, Jessup, Dovey), comparativamente de hojas más rígidas (“*tough-leaved*”), se han caracterizado como de baja calidad nutritiva y palatabilidad para el ganado (Lassiter *et al.*, 1956; Jacobson *et al.*, 1957; Marten, 1978; Fribourg; Milne, 2009).

La reputación de los materiales “flexibles” se sustenta en experiencias que ponen en evidencia una mayor palatabilidad que los rígidos (Burnett, Rutherglen, 2008) y producciones de leche comparables con raigrás perenne (Milne *et al.*, 1997; Tharmaraj *et al.*, 2005; Chapman *et al.*, 2007).

Grasslands Advance es un cultivar de hojas flexibles, muy palatable y extensamente evaluado por muchos productores desde 1995, que confirman una alta producción animal (Fribourg; Milne, 2009). Advance fue desarrollado a partir de varios padres, entre ellos Grasslands “Roa” (AgResearch Grasslands), un cultivar de hojas levemente rígidas de alto valor alimenticio y ampliamente usado en Nueva Zelanda desde 1980 hasta 1994 (Fribourg y Milne, 2009). Se ha observado que Advance superó a raigrás perenne en producción de leche (Milne, 2001), producción estival y anual de forraje, y persistencia (más de 9 años hasta la fecha). En Victoria (Australia) Advance mostró una buena *performance* en zonas de riego y una buena adaptación en zonas de secano, con ventajas en crecimiento estival y producción durante las estaciones secas (Nie *et al.*, 2000; Tharmaraj; Lane, 2003).

A pesar de las diferencias productivas observadas a campo no está claro si existen diferencias de calidad entre los cultivares modernos y los tradicionales (Tabla 1 y 2). Hasta lo revisado, no se encontraron reportes de casos de incrementos en la digestibilidad por selección de cultivares de festuca alta (Hopkins *et al.*, 2009). La suavidad de las hojas, cuantificada como la resistencia a la tensión (*tensile strength*), en algunos casos parecería tener una pobre relación con la DIVMS (Hopkins *et al.*,

2009). Por un lado, hay autores que no encontraron grandes diferencias en digestibilidad, FDN y PB con respecto a los tradicionales (Tempone, 2000; Carrete; Rimieri, 2002, Callow *et al.* 2003). Por otro, Carrete (2001) en un ensayo comparativo de cuatro cultivares encontró un leve mejor comportamiento de Advance en la DE durante algunos momentos del año. Mientras que Asay *et al.* (2002) en una comparación de 10 cultivares encontraron una leve superioridad de Grasslands Advance, concluyendo que la calidad forrajera debe ser de mayor consideración al momento de la elección del cultivar.

2.2.4. Estado de desarrollo de la pastura y manejo del pastoreo

Callow *et al.* (2003) observaron una disminución de la calidad luego de una defoliación de distintos cultivares de diferente flexibilidad de hoja con un efecto marcado del estado de desarrollo de la pastura. Asimismo, Carrete (2001) observó mayor variación en DE entre fechas (debidas al estado de desarrollo de la pastura) que entre cultivares para una misma fecha (Tabla 2). Con respecto al manejo del pastoreo, existe información que indica que las diferencias de calidad de festuca alta son debidas a la sincronización entre el recambio de hojas (*turn over*) y la frecuencia de cortes (Callow *et al.*, 2003; Lattanzi *et al.*, 2007; Donaghy *et al.*, 2008).

Tabla 1. Valores de calidad nutritiva (%) en ensayos comparativos de diferentes cultivares de festuca alta.

OBSERVACIÓN	DIGESTIBILIDAD	FDN	PB	AUTOR
Advance vs	75	45	23	
Raigrás (10 ensayos)	73 (DAMS)	46	22	Milne <i>et al.</i> , 1997
Advance	79	42	26	
Raigrás	77 (DAMS)	40	23	Milne <i>et al.</i> , 1997
Advance				
El Palenque Plus	51 - 54	64 - 67		Adaptado de
Quantum	(DE)			Carrete; Rimieri,
Experimental				2002
10 cultivares	85 - 88 (DVMS)	46 - 47	15,4 - 18,9	Asay <i>et al.</i> , 2002
Festuca alta	83 (DVMS)	57	15	Cherney; Cherne, 2005

Tabla 2. Valores de calidad nutritiva (%) en diferentes estados fenológicos de festuca

OBSERVACIÓN	DIGESTIBILIDAD	FDN	PB	AUTOR
Primavera	49,8			
Verano	58,7			
Otoño	74,4			Gargano <i>et al.</i> , 1988
Invierno	71,5			
<hr/>				
Maris Kasba				
Hoja joven	71,4			
Hoja adulta	64,3			Cordero, 1996
Hoja presenescente	57,9			
<hr/>				
Lámina El Palenque				
Estado vegetativo	76,4	40,2	16,3	
Inicio reproductivo	70,3	49,2	16,3	
<hr/>				
Láminas Torpedo				Tempone, 2000
Estado vegetativo	72,8	46,7	16,8	
Inicio reproductivo	69,6	49,0	21,4	
<hr/>				
Advance	62,3 - 39,2 (DE)			
El Palenque Plus	46,3 - 25,8 (DE de la FDN)			Carrete, 2001
Quantum				
Experimental	Marzo-Enero			
<hr/>				
Advance				
1 leaf stage	74,9 a	56,2 a	22,3 a	
2 leaf stage	72,3 b	62,2 b	13,3 b	Donaghy <i>et al.</i> , 2008
4 leaf stage	71,6 b	63,1 b	8,7 c	

leaf stage: número de hojas acumuladas

2.3. Aspectos biológicos que determinan la calidad nutritiva de gramíneas

La digestibilidad de la MS (DMS) es ampliamente utilizada para el cálculo de la energía metabolizable (EM). Las estimaciones de DMS implican análisis que involucran procesos biológicos que interactúan con la composición química de los alimentos. De esta forma la DMS resulta de la interacción de la cantidad y digestibilidad de varios componentes. A su vez, algunos alimentos como las pasturas muestran grandes variaciones en la DMS debido a que sus tejidos sufren constantes cambios físico-químicos durante el crecimiento. Esta complejidad dificulta la comprensión de los comportamientos fisiológicos de las plantas que subyacen en los cambios de DMS de las pasturas. Para un adecuado entendimiento de las causas de las variaciones de la DMS es necesario conocer el contenido de FDN como así también su digestibilidad (DFDN). La pared celular o FDN contribuye entre un 50 y 80 % del total de energía digestible de las gramíneas (Buxton; Redfearn, 1997). Mientras que el contenido celular (CS), que se considera completamente digestible, aporta el resto. A pesar de que es aceptado que la FDN limita la *performance* productiva de los rumiantes bajo sistemas de producciones intensivos (Satter *et al.*, 1999), las variaciones en la cantidad de energía que puede aportar un mismo contenido de FDN se deben a que este parámetro indica las proporciones relativas de fibra sin discriminar entre las fracciones parcial o completamente indigestibles. Así mismo, aunque la digestibilidad del CS es considerada cercana al 100%, entre un 10-70% puede escapar de la digestión por quedar atrapado dentro de los tejidos indigestibles (Dove, 1996). De esta forma, la DFDN es un indicador del contenido de compuestos indigestibles (FDNi) que no solo reducen la digestión de la fibra sino que también reducen la digestibilidad del CS. Así, tanto la cantidad como la digestibilidad de la FDN afectan el consumo potencial por su incidencia en el llenado del rumen y tasa de pasaje, que finalmente determina la energía disponible de los forrajes (Jung; Allen, 1995) y la ganancia de peso animal.

2.3.1. Composición de la Pared celular

La pared celular comprende entre el 20 y 80 % del peso seco del forraje y está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (Wilson, 1994). Además de estos constituyentes, en la pared celular se encuentran una variedad de

proteínas que cumplen funciones estructurales (extensinas) o enzimáticas (Goodwin; Mercer, 1983).

2.3.1.1. Pared primaria y secundaria

Durante la formación de la pared celular se pueden distinguir dos fases. En la primera, que es la de elongación celular, ocurre la deposición de la pared primaria. En esta etapa se deposita celulosa, xilosa y pectinas. En la segunda fase, después que finaliza la elongación celular, comienza el engrosamiento de la pared secundaria con mayor deposición de celulosa que de xylanos. La acumulación de material comienza desde el borde interior de la pared primaria hacia el lumen de la célula. La laminilla media es el espacio entre células adyacentes y está compuesto principalmente por pectina.

2.3.1.2. Lignificación

Además de la deposición de estos compuestos, durante la formación de la pared celular se acumulan ácidos fenólicos y lignina. La lignina es un polímero natural de alcoholes que surge de la deshidrogenación de tres principales precursores: *trans*-coniferyl, *trans*-sinapyl, y *trans*-*p*-coumaryl. Los alcoholes de *p*-coumaryl, coniferyl y sinapyl son los precursores que prevalecen en los tipos de lignina *p*-hydroxyphenol, guaiacyl y syringyl, respectivamente (Jung; Allen, 1995). La lignina rica en syringyl puede formar más enlaces con los polisacáridos que la del tipo guaiacyl, y podría, por tener una estructura más lineal, proteger de la degradación a una mayor proporción de la pared celular (Satter *et al.*, 1999).

La lignificación se inicia una vez que la elongación se completó, comenzando desde las esquinas hacia la laminilla media/pared primaria continuando hacia la pared secundaria (Jung y Allen, 1995). De esta forma, los polisacáridos recientemente depositados en la pared secundaria no son lignificados, mientras que la laminilla media/pared primaria tiene mayor concentración de lignina, de forma más condensada y con mayor relación guaiacyl:syringyl (Wilson, 1994).

Además de la deposición de lignina durante el engrosamiento de la pared secundaria, se producen uniones covalentes entre los polisacáridos de la pared celular y los monómeros fenólicos de la lignina a través de los ácidos ferúlicos que actúan como agentes de uniones ésteres (Satter *et al.*, 1999; Jung; Allen, 1995). El ácido *trans*-

ferúlico (AF) y el ácido *trans-p*-coumarico (APC) son los monómeros fenólicos predominantes en las gramíneas (Akin, 1989). Cuando se deposita la pared secundaria, los ésteres del AF actúan como sitios de iniciación de la polimerización de la lignina en la pared primaria (Satter *et al.*, 1999). Durante la formación de la pared secundaria no se deposita AF mientras que APC es incorporado a la pared mediante enlaces éter con la lignina.

2.3.1.3. Barreras químicas

A medida que avanza el estado de lignificación desde la pared primaria hacia la secundaria, se incorpora una mayor cantidad relativa de enlaces ésteres de APC con la lignina y cambia la composición química de esta última, pasando del tipo guaiacyl hacia el tipo syringyl. Como resultado, el AF prevalece en plantas jóvenes pero decrece como proporción del total del contenido de compuestos fenólicos con la maduración de la planta, debido al aumento en la proporción del APC con la madurez.

Debido a que la lignina es un componente de la pared celular, se asume que el efecto de la lignina en la digestibilidad del forraje se debe a un efecto directo sobre la digestibilidad de la pared celular más que a un efecto sobre la digestibilidad del total de la materia orgánica del forraje (Van Soest, 1993). La lignificación es generalmente considerada como el factor dominante que limita el grado de degradación de los polisacáridos de la pared celular (Satter *et al.*, 1999). Numerosos estudios *in vitro* han mostrado que los monómeros fenólicos son tóxicos para las bacterias del rumen (Akin 1982). A pesar de la naturaleza tóxica de estos compuestos *in vitro*, no hay evidencia reportada *in vivo* (Akin, 1982). La toxicidad inhibitoria de los microorganismos por los monómeros fenólicos *in vivo*, no ocurriría por la relativa baja concentración en el rumen (Chesson *et al.*, 1982). Jung; Deetz (1993) sostienen que la lignina afecta negativamente la digestión de los polisacáridos de la pared celular debido a que actúa como escudo contra la hidrólisis de las enzimas. En otras palabras, la lignina y los polisacáridos se mantienen en una estrecha proximidad física que impide el acceso de las enzimas microbianas (Jung; Deetz 1993; Jung; Allen 1995; Satter *et al.*, 1999).

Independientemente de las causas, la relación negativa entre la lignina y la digestibilidad de los forrajes ha sido extensamente reportada por varios autores (Sullivan, 1959; Tomlin *et al.*, 1964; Jung, 1989). Sin embargo, Van Soest (1967);

Jung; Vogel (1986); Jung; Casler (1991); Jung y Vogel (1992); Wilson (1994) han mencionado que dicha relación no sería tan clara. De esta forma, es evidente que mientras que la lignina cumple un rol en la degradabilidad de la pared celular, las simples diferencias en la concentración de lignina no explican las grandes variaciones de la degradabilidad de la pared celular a un mismo estado de madurez del forraje (Satter *et al.*, 1999).

2.3.1.4. Barreras físicas

Wilson y colaboradores (Wilson 1994; Wilson; Mertens 1995; Wilson; Kennedy, 1996) adjudican a las características anatómicas de las células un rol importante como barreras físicas a la degradabilidad de la pared celular. Wilson (1994) sostiene que tal vez, las paredes celulares gruesas de la fibra sean principalmente una limitación anatómica más que química. A diferencia de las barreras químicas relacionadas con la lignificación, las barreras físicas de la pared celular impiden el acceso de las enzimas de los microorganismos necesarios para la degradación. A medida que la pared se engrosa, disminuye la superficie específica de la célula con la consecuente disminución de la superficie de contacto necesaria para la adherencia de la microflora ruminal (Wilson; Mertens, 1995). Otra consecuencia de la organización física de las células es que impide la digestión del contenido celular y la pared potencialmente digestible (Wilson; Mertens, 1995).

La pared primaria/laminilla media altamente lignificada cementa las células adyacentes funcionando como una barrera impenetrable para la degradación de los microorganismos del rumen (Wilson 1994). Esto resulta en un impedimento en la degradación de estas partículas de fibra multicelulares, ya que el ataque microbiano ocurre desde el lumen de una célula hacia el lumen de la célula adyacente (Buxton; Redfearn, 1997; Satter *et al.*, 1999). La degradación de los tejidos lignificados parecería tener lugar únicamente desde el lado interior de la pared celular y no a través de la pared primaria/laminilla media (Wilson 1993). Esta observación condujo a Wilson y sus colaboradores (Wilson 1993; Wilson; Mertens, 1995; Wilson; Kennedy, 1996) a proponer que la estructura anatómica juega el mayor rol en la limitación de la degradación de las partículas de forraje en el rumen.

Como resumen, durante el avance de la madurez de la planta, tanto la acumulación de lignina y compuestos fenólicos, como la organización física de las células imparten

dureza y rigidez a los tejidos, y estas características afectan la digestibilidad por su efecto sobre los microorganismos del rumen.

2.3.2. Organización de los tejidos foliares

La discusión anterior acerca del desarrollo de la pared celular es una generalización de lo que sucede en una célula vegetal tipo. Sin embargo, existen distintos tipos de células dependiendo del tejido de planta que compongan. De esta forma, las células difieren tanto en las funciones que cumplen dentro de la planta como en su anatomía. Algunas células como las del esclerénquima, que se encuentra asociado a los tejidos vasculares, desarrollan una gruesa pared secundaria con un alto contenido de lignina, mientras que por el contrario, el floema y el mesófilo de las hojas, poseen una fina pared celular no lignificada (Wilson, 1997; Buxton; Redfearn, 1997). Estas diferencias entre los distintos tipos de células, principalmente el grosor de las paredes y el contenido celular, influyen en la facilidad con que se digieren los distintos tipos de tejido (Wilson 1997). Por ejemplo, las gruesas paredes celulares de las vainas parenquimáticas son lentamente digestibles (entre 24-48 h o más) provocando además, una disminución del contenido soluble disponible dentro de estas células (Wilson, 1994). A partir de un compilado de literatura, Akin (1989) lista la degradación de varios tejidos vegetales posicionando al xilema como el tejido de las hojas de gramíneas más resistentes a la degradación y, en el otro extremo, al mesófilo con una rápida degradabilidad. En un nivel intermedio, el esclerénquima, la vaina parenquimática y la epidermis muestran una lenta a parcial degradación.

De esta forma, la caída en la digestibilidad observada durante la acumulación de biomasa de una pastura, es consecuencia del aumento en la proporción de los tejidos estructurales, los cuales están provistos mayormente por los tejidos vasculares y esclerenquimáticos asociados, de paredes más gruesas y mayor resistencia a la degradabilidad ruminal.

Las proporciones de los tipos de células con paredes delgadas y gruesas, generalmente explican las diferencias que existen en el contenido de FDN y la digestibilidad entre órganos. Aunque los tejidos vasculares y del esclerénquima representan una pequeña contribución en el volumen total de tejido que ocupan, estos tienen un gran impacto en la calidad del forraje debido a las características anatómicas

y al gran empaquetamiento de sus células de paredes gruesas (Wilson; Mertens, 1995). Akin *et al.* (1975) observó en cortes transversales de tejidos de láminas de hoja de festuca alta, que el 11% correspondía a tejido vascular, mientras que el mesófilo ocupaba el 65%.

2.3.3. Edad foliar

A pesar de los cambios en la estructura de la planta durante la acumulación de biomasa, las pasturas en estado vegetativo pierden calidad debido a un continuo ciclo de envejecimiento de los tejidos foliares durante el recambio de hojas. Últimamente, las láminas de las hojas han recibido mayor atención, debido a su gran impacto en la producción animal, como consecuencia de ser la fracción más preferida y susceptible físicamente a ser defoliada por los animales. Groot; Neuteboom (1997) estudiaron el efecto de la edad, o envejecimiento foliar, en tres hojas sucesivas de raigrás anual. Estos autores observaron una pérdida de la digestibilidad de la materia orgánica de las láminas con la edad foliar con un similar comportamiento para las sucesivas generaciones de hojas. Esta disminución de la calidad se observó desde la emergencia de las láminas por fuera del tubo de vainas continuando inclusive una vez finalizada la etapa de elongación. Trabajos posteriores confirmaron el efecto de la edad foliar sobre la pérdida de calidad en hojas de especies C3 (Groot *et al.*, 1999; Duru; Ducroq, 2002; Di Marco; Agnusdei, 2010) y especies C4 (Agnusdei *et al.*, 2009; Avila *et al.*, 2010).

Las causas de las pérdidas de calidad de las láminas que ocurren durante la vida de una hoja son el resultado de dos procesos principales: la pérdida de DFDN y el proceso de senescencia. La disminución de DFDN se produce como consecuencia de los cambios físico-químicos de las paredes celulares de los tejidos, anteriormente explicados. Con respecto a la senescencia, ésta es la vía más contundente de pérdida de calidad nutritiva del forraje. En la mayoría de las gramíneas forrajeras, el comienzo de este proceso requiere acumular alrededor de 500 a 600 °Cd y entre 2,5 a 4 hojas, a partir del inicio de un ciclo de rebrote. Transcurrido ese lapso, las hojas formadas al comienzo del período de rebrote empiezan a exportar los compuestos solubles hacia las hojas más jóvenes. Esta exportación no solo incide en la pérdida de digestibilidad de los tejidos, sino que también conduce a un aumento pasivo del contenido de FDN. Vale recalcar que este aumento de FDN no involucra una deposición de fibra, la cual

solo ocurre durante la formación de la pared celular en la zona meristemática, sino que se debe a un aumento relativo de las paredes celulares de los tejidos por exportación del contenido celular. Desde un punto de vista práctico, vale mencionar aquí, que el uso del número de hojas acumuladas por macollo (*leaf-stage*) como pauta para definir el momento de pastoreo en sistemas rotativos, apunta a minimizar o evitar que se desencadene esta principal vía de pérdida de calidad nutritiva del forraje.

2.3.4. Largo foliar

El aumento del tamaño de las hojas que ocurre de manera concomitante con el aumento de la biomasa acumulada trae aparejado la caída de la calidad nutritiva de las láminas. Este efecto del largo foliar sobre la calidad de las láminas ha sido atribuido por varios autores (Groot; Neuteboom, 1997; Duru; Ducrocq, 2002) al mayor período de crecimiento de las láminas dentro del tubo de vainas, lo cual conlleva un incremento en su grado de envejecimiento. De acuerdo con este planteo, el tamaño en sí mismo no sería el factor primario determinante de los cambios de calidad nutritiva. En contraposición con esta postura, resultados obtenidos por Agnusdei *et al.* (2009) y Avila *et al.* (2010) en especies megatérmicas, indicaron que el retraso en la emergencia de las láminas aportaría escasamente a las pérdidas de calidad nutritiva entre hojas sucesivas. Estos trabajos sugieren que el tamaño *per se* sería el principal factor que explicaría el incremento del contenido de FDN y la caída de la DFDN en la medida en que aumenta el tamaño de las hojas. Este planteo condice con la asociación positiva que se ha encontrado entre el incremento de tamaño de las plantas y la inversión de biomasa en tejidos de sostén (Wilson, 1976b; Givish, 1982; Koppers, 1985, ambos citados por Werger *et al.*, 2002;) lo cual a su vez, podría reflejar modificaciones en la conformación del xilema como respuesta plástica para mantener la funcionalidad estructural (Lemaire; Gastal, 1997) e hidrodinámica (West *et al.*, 1997) de las plantas.

Como resumen de lo mencionado hasta ahora, los cambios en la calidad nutritiva del forraje constituyen una problemática compleja debido a que son el resultado de variaciones en la anatomía tisular y composición físico-química de las paredes celulares de las diferentes fracciones de la biomasa. Desde este punto de vista, la

calidad de una pastura en estado vegetativo puede ser interpretada como el resultado de cambios en el peso y tamaño de las hojas de las plantas, las que inciden en la composición físico-química de la fibra. En este contexto, los cambios de calidad son interpretados como una respuesta plástica (o de adaptación morfológica), de tipo fotomorfogenética (inducida por el ambiente lumínico dentro del canopeo), que se halla íntimamente ligada al proceso de crecimiento y acumulación de biomasa. Este enfoque, el cual integra el crecimiento y la morfología foliar con la calidad de las pasturas, constituye la base para la modelación mecanística de la calidad nutritiva del forraje (v.g., Groot; Neuteboom, 1997; Duru; Ducrocq, 2002) y para su articulación con modelos de crecimiento de pasturas (v.g., DairyMod).

2.4. Crecimiento vegetativo de gramíneas y morfología foliar

Las pasturas de gramíneas son estudiadas como poblaciones de macollos. El macollo es una entidad dinámica que representa la unidad morfofisiológica de la cubierta vegetal. Durante el estado vegetativo de una pastura, la producción de forraje está dada principalmente por la producción de hojas (Nelson, 2000). Aunque las causas no están claras (Skinner; Nelson, 1995), la sincronización y coordinación entre el desarrollo de una hoja y la siguiente son ampliamente conocidas (Etter, 1951; Schnyder *et al.*, 1990) y es el mecanismo por el cual la mayoría de las gramíneas de zonas templadas (C3) muestran una sola hoja en crecimiento por vez.

La elongación foliar tiene lugar a partir de la producción de células del meristema intercalar ubicados en la zona de crecimiento. Durante el crecimiento vegetativo la zona de crecimiento del macollo se encuentra al ras del suelo generando hojas sucesivas. En esta zona de crecimiento las células se dividen y son desplazadas hacia la porción distal del meristema. De esta forma, el nuevo tejido foliar atraviesa el tubo de vainas (pseudotallo) durante la elongación foliar. Cuando la lígula se hace visible por fuera del pseudotallo, finaliza la elongación y la hoja alcanza su máximo tamaño (hoja expandida). Así permanece verde en su fase adulta durante el resto de su vida foliar hasta que comienza la senescencia. En consecuencia, la hoja atraviesa una serie de etapas que son elongación, hoja adulta y senescencia.

Otra particularidad de las gramíneas es que los macollos acumulan hojas hasta un cierto momento en que la aparición de una nueva hoja es acompañada por el inicio de

la senescencia de la hoja más vieja. Esta acumulación y posterior sincronización entre la generación y la senescencia de hojas define un número máximo de hojas vivas por macollo que es típico de cada especie y que se mantiene relativamente constante en las pasturas vegetativas (Davies, 1993; Lemaire; Chapman, 1996). Como resultado de la sincronización del crecimiento de hojas sucesivas y el constante recambio foliar, los macollos poseen para un determinado momento una cantidad de hojas de diferente edad ontogénica. En el caso de las gramíneas templadas, por ejemplo, una vez que se estabiliza el número de hojas, los macollos presentan cuatro categorías de hoja diferentes: una hoja en crecimiento, una recientemente expandida, una adulta y una última senescente.

Esta dinámica de macollos origina que durante un ciclo de rebrote la acumulación de forraje muestre una función sigmoidea (Agnusdei *et al.*, 1998; Chapman; Lemaire, 1993; Lemaire; Chapman 1996). En estados tempranos, la acumulación neta del forraje es igual a la acumulación bruta debido a la ausencia de senescencia foliar. Una vez que comienza la senescencia de las hojas adultas, la tasa de acumulación de forraje verde comienza a disminuir hasta llegar a cero cuando se alcanza la acumulación máxima. En este momento la producción de las nuevas hojas es contrabalanceada por la senescencia de las más viejas. El desacople entre las tasas de crecimiento y senescencia (Parsons, 1988) determinan que las variaciones en las tasas de crecimiento tengan un efecto retrasado sobre la senescencia. Este comportamiento ha sido explicado en la bibliografía en términos de balance de carbono (Parsons, 1988; Parsons, 1994) y morfogénesis foliar (Lemaire; Chapman, 1996) y es el responsable de que en la práctica el *plateau* de acumulación neta de forraje se alcance con posterioridad al comienzo de la senescencia de las primeras hojas. En situaciones a campo se observa que el tamaño de las hojas sucesivas tiende a aumentar en ambientes donde la luz disponible se incrementa o mantiene constante (Chapman; Lemaire, 1993; Lemaire; Chapman, 1996; Lemaire; Agnusdei, 2000). En estos casos las hojas que aparecen son de mayor tamaño que las que senescen por lo que el balance sigue siendo positivo y continúa la acumulación de forraje verde. Una vez que se estabiliza el tamaño de las hojas, se alcanza el techo de acumulación neta cuando la tasa de senescencia iguala a la del crecimiento.

Diversos autores han reportado la existencia de una relación estrecha entre el largo final de una hoja y la longitud de la vaina de la hoja anterior (Wilson; Laidlaw, 1985; Casey *et al.*, 1999; Skinner; Nelson 1995; Groot; Neuteboom, 1997; Duru; Ducroq,

2000). A pesar de que se desconocen las causas, la vaina ejerce un efecto morfogenético sobre el tamaño de la zona de crecimiento y sobre la tasa de elongación foliar (Arredondo; Schnyder, 2003; Kavanová *et al.*, 2006) que repercute en el largo final de la hoja en crecimiento. La asociación positiva entre largo de vaina y tasa de elongación, y entre ésta última y el largo foliar final, ha sido reportada por diversos autores en la literatura (largo de vaina y tasa de elongación: Casey *et al.*, 1999; Arredondo; Schnyder, 2003; Kavanová *et al.*, 2006; tasa de elongación y largo foliar final: Mazzanti *et al.*, 1994; Lattanzi, 1998; Berone *et al.*, 2007; Agnusdei; Assuero, 2004; Agnusdei *et al.*, 2007).

2.5 Resumen de antecedentes.

Según la información previamente analizada se puede concluir que las diferencias en calidad de las pasturas en estado vegetativo están asociadas a variables morfogenéticas que controlan el crecimiento y tamaño de las hojas. De esta forma, el aumento de tamaño que ocurre durante un ciclo de rebrote como respuesta plástica de las plantas a la competencia por luz dentro del canopy, implica una caída en la calidad de las pasturas. En consecuencia, la digestibilidad de la MS disminuye debido a un aumento del tejido de sostén de las plantas necesario para mantener una mayor estructura. Estos cambios no necesariamente implican mayor contenido de FDN sino una disminución de la digestibilidad de la FDN. A su vez, tanto la FDN como la DFDN están determinados en parte, por características intrínsecas de la especie o cultivar en la composición físico-química de sus tejidos, las cuales pueden optimizarse mediante el manejo de pastoreo que considere las variables morfogenéticas que más influyen sobre la calidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Características del ensayo y sitio experimental

El ensayo se llevó a cabo durante el verano de 2009/10 (8/12/09 al 15/03/10) en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA de Balcarce, situada en el sudeste Bonaerense (37° 45' S; 58° 18' W). Se evaluaron dos cultivares de festuca alta (*Festuca arundinacea*): (i) Grassland Advance^{Gentos} y (ii) El Palenque Plus^{INTA}. Ambos cultivares se sembraron el 4 de agosto de 2009 en macetas de plástico de 20 x 40 cm con suelo virgen, tamizado y rico en materia orgánica, proveniente del horizonte A de un Argiudol típico de la zona. Las mismas se mantuvieron al aire libre, sin limitantes hídricas ni nutricionales. Para ello se aplicó riego por aspersión diariamente hasta capacidad de campo y se realizó una fertilización inicial con Nitrato de Amonio Calcáreo (150 kg N ha⁻¹) y Fosfato Diamónico (50 kg P ha⁻¹), más fertilizaciones semanales de Nitrato de Amonio Calcáreo (35 kg N ha⁻¹) durante todo el ensayo.

Se utilizaron 250 macetas por especie, dispuestas en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con 3 repeticiones. Durante la implantación hasta el muestreo los cultivares se manejaron bajo corte para conformar micropasturas densas y foliosas. Previo al inicio del período experimental se realizaron 3 cortes con el fin de garantizar una adecuada densidad de plantas y una homogénea edad de macollos. El ensayo comenzó el día 8 de Diciembre con un corte de homogenización y sincronización del crecimiento a 5 cm de altura.

3.2. Medidas climáticas

Se registró la temperatura diaria por medio de cuatro Data Loggers Watchdog (Spectrum Technologies Inc., East-Plainfield, IL, USA) ubicados en el sitio experimental. La media de todo el período experimental fue 21±2,8°C (Figura 1). La variable tiempo se expresó como grados días de crecimiento (GDC), los que se calcularon como la acumulación de la temperatura media diaria (Tm) menos la temperatura base (Tb) para esta especie (4°C), según la siguiente fórmula:

$$G = D \sum_{l=1}^n (T - mT) / l$$

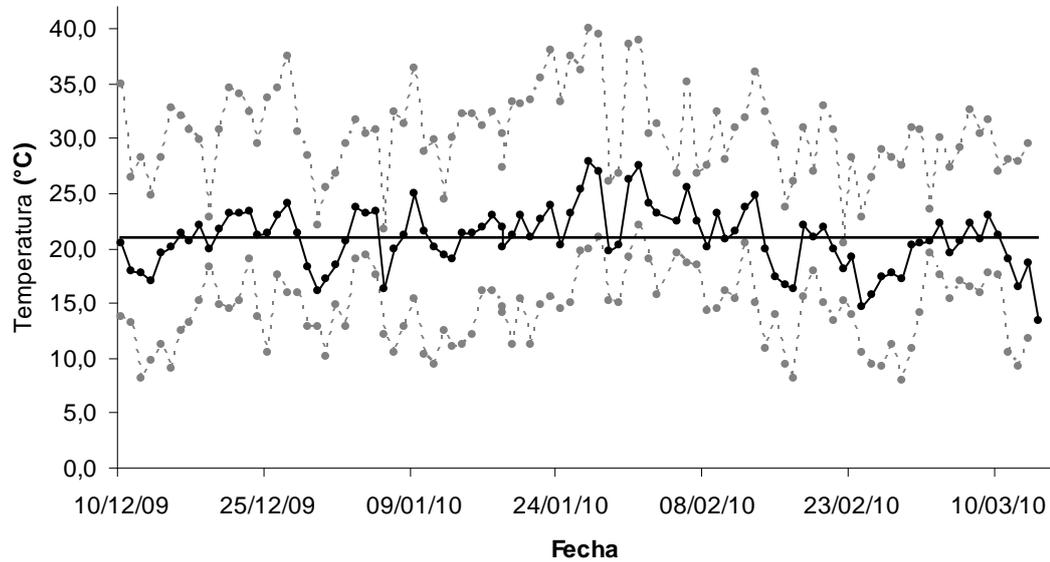


Figura 1. Temperatura media (línea continua), mínima y máxima (línea punteada) diaria durante el período del ensayo. Línea horizontal indica la temperatura media diaria para todo el periodo.

3.3. Determinaciones en planta

Se marcaron al azar 15 macollos por cultivar (5 por repetición) y se registró la aparición de hojas, el largo de vaina y de láminas con una frecuencia de tres veces por semana. Con estas mediciones se calculó la tasa de elongación foliar (TEF), el intervalo de aparición de hojas (IAH), el número de hojas vivas por macollo (NHV) y la vida media foliar (VMF). Para el cálculo de la VMF se midió el tiempo térmico (GDC acumulados) transcurrido entre la aparición aparente de la lámina (lámina visible fuera del tubo de vainas) y el comienzo de la senescencia.

Se cosecharon aproximadamente 300 macollos por repetición (ó unidad experimental) en 8 cortes a lo largo del período de rebrote (Tabla 3). Las frecuencias de corte (Tabla 3) fueron determinadas en función del estado de desarrollo de las hojas, como se explica posteriormente.

Tabla 3: Esquema general de muestreo durante el rebrote de dos cultivares de festuca alta. G1, G2, y G3 indica la generación de hoja. Valores entre paréntesis indican frecuencia de cosecha (días entre cosechas).

Cosecha	Días de rebrote		Láminas cosechadas (Generación y categoría)
	Advance	El Palenque	
1	7 (7)	7 (7)	G1-Crecimiento
2	15 (8)	15 (8)	G1-Lígula visible; G2-Crecimiento
3	27 (12)	27 (12)	G1-Adulta; G2-Lígula visible; G3-Crecimiento
4	43 (16)	43 (16)	G1-Pre Senescente; G2-Adulta; G3-Lígula visible
5	52 (9)	52 (9)	G1-50%Senescente; G2-Pre Senescente; G3-Adulta
6	59 (7)	63 (11)	G1-100%Senescente.; G2-50%Senescente.; G3-Pre Senescente.
7	65 (6)	72 (9)	G2- 100%Senescente; G3-50%Senescente.
8	91 (21)	97 (25)	G3-100%Senescente.

Los macollos se cortaron a nivel de la base y se congelaron inmediatamente en N líquido. Luego se almacenaron en freezer (-20°C) hasta su posterior separación y procesado. A continuación se descongelaron y se mantuvieron en bandejas sobre hielo durante el procesamiento. De los macollos se obtuvieron las tres primeras generaciones de hojas aparecidas durante el rebrote, que se denominaron G1, G2 y G3. La primera hoja aparecida en el período del ensayo fue la G1 y así sucesivamente la G2 y G3. Las demás hojas no fueron estudiadas y se descartaron. De cada hoja se separó la lámina de su vaina.

El momento de cosecha que se muestra en la Tabla 3 se estableció para obtener láminas de cada generación de hoja, en las siguientes 6 categorías de edad o estado de desarrollo. Éstas fueron: i) hoja en crecimiento, ii) hoja recién expandida (lígula visible), iii) hoja adulta (2/3 VMF), iv) hoja pre senescente (Fin VMF), v) mitad de hoja senescente y vi) senescencia completa. De esta forma el muestreo abarcó desde que emergió la primera hoja hasta que la tercera estuvo completamente seca. El inicio de

la senescencia (fin de la VMF) se determinó cuando se registraba sobre la misma lámina, un progreso del área de tejido seco durante dos mediciones consecutivas.

Las láminas y vainas se midieron y pesaron por separado, luego se liofilizaron (liofilizador Chriss 336) y molieron con un molino tipo Cyclotec Sample Mill 1093 con malla de 1 mm. En las láminas se determinó el contenido de FDN (Van Soest *et al.*, 1991), como así también la digestibilidad de la FDN (DFDN) y la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) por incubación in vitro (250 mg de muestra) a 24 h de incubación en el equipo Daisy^{II} (ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU). La DAMS se calculó como la digestibilidad verdadera (DVMS) menos el factor metabólico 11,9 (Van Soest, 1994).

Los valores de calidad de cada generación de láminas (G1, G2, G3) se integraron con los parámetros morfológicos para el cálculo de la evolución de la DAMS, DFDN y FDN del *conjunto* de láminas. Para esto se utilizaron los datos de IAH, VMF, NHV, longitud de lámina, conjuntamente con los efectos del largo y edad foliar sobre la calidad. La contribución de cada generación de hojas sobre el *conjunto* de láminas (L_{ij}) se calculó en función del largo foliar, como proporción del total del largo de lámina acumulado por macollo (largo lámina G_i / largo total). De esta forma se estimó las variables de calidad del conjunto de láminas como:

$$G_{Conjunto} = \sum_{i=1}^3 (G_{ij} * L_{ij}) \quad i= 1, 2, 3 \quad j= 1, 2, 3, 4, 5, 6$$

donde:

G_{ij} = calidad (FDN, DFDN o DAMS) de la i-ésima generación de hoja en el j-ésima categoría de edad foliar.

L_{ij} = peso relativo de la i-ésima generación de hoja en el j-ésimo tiempo térmico de rebrote

3.4. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con un modelo estadístico lineal para un diseño completamente aleatorizado (DCA) con un factor y tres repeticiones.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2 \quad j = 1, 2, 3$$

donde:

Y_{ij} observación del i-ésimo cultivar en la j-ésima repetición

μ media general

τ_i efecto del i-ésimo cultivar de festuca alta

ε_{ij} error experimental

Con respecto a las variables morfológicas se realizaron mediciones repetidas en el tiempo tomando en cuenta a los macollos marcados como sujetos de estudio y al cultivar como el factor de tratamiento. Además, se analizó el factor tiempo dentro de cada sujeto para determinar significancia de tendencias en el tiempo.

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + d_{ik} + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2 \quad j = 1, 2, 3$$

donde:

Y_{ijk} observación del i-ésimo cultivar en la j-ésima repetición

μ media general

τ_i efecto del i-ésimo cultivar de Festuca alta

d_{ik} error experimental aleatorio para los macollos dentro del cultivar

β_j efecto del j-ésimo tiempo

$(\tau\beta)_{ij}$ interacción entre cultivar y tiempo

ε_{ijk} error experimental

Para el análisis del comportamiento de las variables de calidad en el tiempo, se evaluaron los cultivares y las generaciones de láminas realizando ajustes de funciones lineales y polinómicas con la edad expresada en GDC. Las comparaciones entre cultivares y generaciones se realizaron mediante análisis de variables dummy.

Los datos se analizaron con los procedimientos PROC REG y PROC GLM de la versión 8 de SAS. Se efectuó un análisis de la varianza para un DCA de las variables de interés y se compararon las medias utilizando la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Efecto del genotipo sobre la calidad de las láminas.

Las láminas de ambos cultivares mostraron similar DAMS, FDN y DFDN al compararlas a un mismo estado ontogénico foliar (Tabla 4). La DAMS y la DFDN disminuyeron con el progreso de la ontogenia foliar ($p < 0,0001$, Tabla 4) y estuvieron altamente relacionadas entre sí ($y = 0,68x (\pm 0,02) + 26,4 (\pm 0,68)$, $R^2 = 0,95$, $p < 0,0001$). No se observaron variaciones significativas en la FDN en los primeros estados ontogénicos, pero hubo incrementos durante la senescencia foliar. El contenido de FDN mostró una moderada relación con la DAMS ($y = -1,91x (\pm 0,17) + 162 (\pm 9,8)$, $R^2 = 0,54$, $p < 0,0001$) y una pobre asociación con la DFDN ($y = 2,2x (\pm 0,3) - 163 (\pm 17)$, $R^2 = 0,33$, $p < 0,0001$).

Tabla 4. Contenido de Fibra detergente neutro (FDN), digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) y digestibilidad de la FDN (DFDN) en diferentes estados ontogénicos de Advance (A) y El Palenque Plus (EP). Los datos corresponden al promedio de tres generaciones de hojas sucesivas. Distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cultivares. EE: Error estándar de la media.

Estado Ontogénico	FDN			DAMS			DFDN		
	A	EP	EE	A	EP	EE	A	EP	EE
Crecimiento	53,2 A	55,7 A	0,8	69,8 A	68,1 A	0,76	65,7 A	64,0 A	1,7
Lígula visible	54,1 A	55,4 A	1,0	65,1 A	62,7 B	0,77	57,4 A	54,3 A	1,1
Adulta	53,5 A	54,8 A	1,1	59,3 A	59,2 A	0,80	46,1 A	47,3 A	1,6
Pre Senescente	53,6 A	55,6 A	1,1	52,8 A	54,2 A	0,78	34,0 A	38,8 A	1,6
50% Senescente	58,9 A	58,6 A	1,0	44,9 A	46,4 A	0,67	26,5 A	29,0 A	1,3
100% Senescente	63,6 A	66,2 A	0,8	30,0 A	30,9 A	0,43	8,3 A	12,8 A	1,2

4.2. Efecto de la edad foliar sobre la calidad de las láminas

El contenido de FDN se mantuvo constante durante la vida foliar (VMF, ver punto 4.4) sin observarse diferencias entre cultivares ($p=0,14$). Si bien la FDN tendió ($p=0,06$) a aumentar entre generaciones de hojas sucesivas ($53,2\pm 3,9$, $54,7\pm 2,7$ y $55,6\pm 2,6$ %FDN para G1, G2 y G3, respectivamente) las diferencias fueron de escasa magnitud. Posteriormente, al finalizar la VMF, el contenido de FDN aumentó en ambos cultivares durante la senescencia hasta llegar a un valor promedio de $64,9\pm 0,8\%$ (Figura 2).

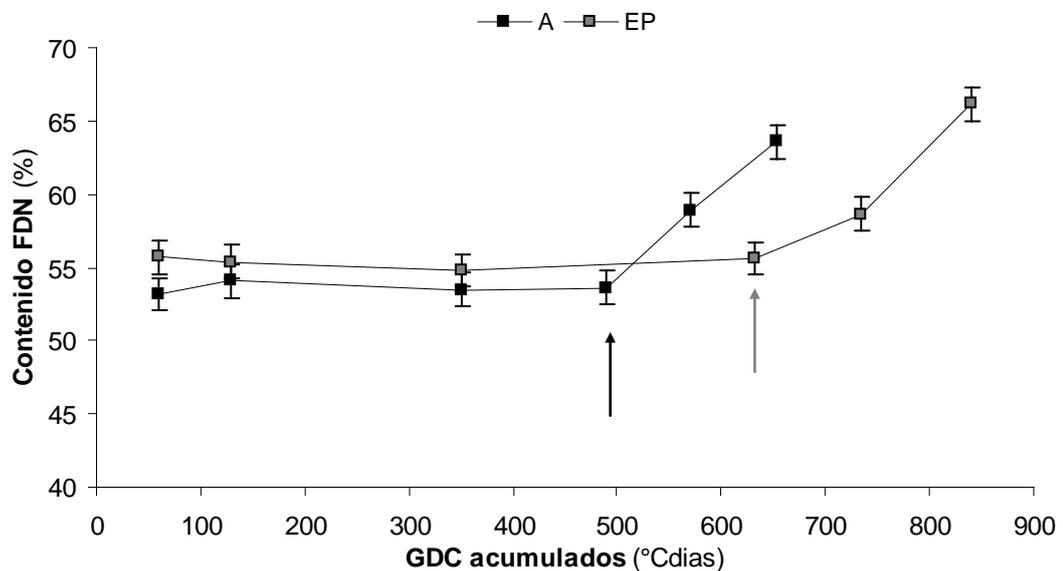


Figura 2. Contenido de Fibra detergente neutro (FDN) de láminas de Advance (A) y El Palenque Plus (EP) durante la edad foliar expresada en grados días de crecimiento (GDC) acumulados. Cada punto representa el promedio de tres generaciones sucesivas de hojas y las barras indican error estándar de medias. Las flechas muestran el comienzo de la senescencia en ambos cultivares.

Aunque la DFDN fue similar entre cultivares a un mismo estado ontogénico (Tabla 4), en la Figura 3 se observa que Advance tuvo una mayor caída de la DFDN durante la VMF (paralelismo $p=0,0004$), sin detectarse diferencias durante la senescencia (paralelismo $p=0,11$) en comparación a El Palenque Plus. A su vez, dentro de cada cultivar, el patrón de disminución de DFDN con la edad foliar fue similar (paralelismo $p=0,38$ y $p=0,79$) para las tres generaciones de hojas. Las diferencias en la ordenada al origen ($p=0,02$ y $p=0,01$ para Advance y El Palenque Plus, respectivamente) se

corresponde con la disminución de DFDN entre generaciones de hojas sucesivas ($p < 0,0001$).

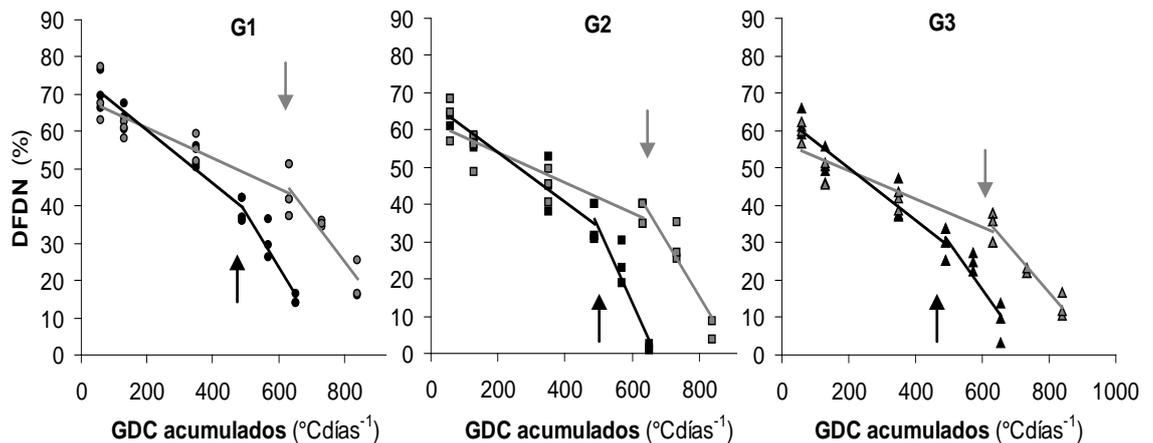


Figura 3. Digestibilidad de la FDN (DFDN) de tres generaciones de hojas sucesivas (G1, G2, G3) para Advance (línea negra) y El Palenque Plus (línea gris) durante la edad foliar expresada en grados días de crecimiento (GDC) acumulados. Las flechas indican el comienzo de la senescencia en ambos cultivares.

4.3. Efecto del largo foliar sobre la calidad de las láminas

El efecto del largo foliar sobre las variables de calidad se analizó dentro de cada categoría de hoja por separado para aislar el efecto de la edad foliar (Figura 4). Durante los diferentes estados de madurez de las hojas, que comprendieron desde la aparición de la lígula hasta el final de la VMF, el contenido de FDN no fue afectado por el aumento del largo de lámina, con un promedio general de $54,5 \pm 3$ % (Figura 4). Tampoco hubo diferencias en DFDN entre cultivares (coincidencia $p=0,1$, $p=0,9$ y $p=0,3$ para las hojas en estado de Lígula, 2/3 VMF y Fin VMF, respectivamente). Sin embargo, la DFDN disminuyó con una tasa de aproximadamente 0,5 unidades porcentuales por cada cm de aumento en la longitud de lámina para las tres categorías de hojas mencionadas (paralelismo $p=0,94$), detectándose diferencias en la ordenada al origen ($p=0,0002$).

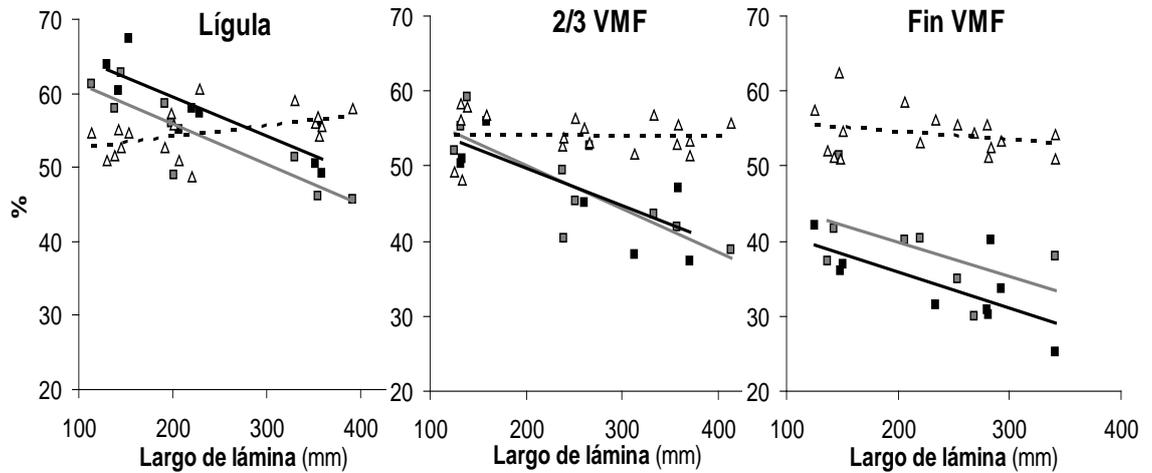


Figura 4. Efecto del largo de lámina sobre el contenido de FDN (línea punteada) y de DFDN para Advance (línea negra) y El Palenque Plus (línea gris) en diferentes estados ontogénicos de hojas vivas. Lígula= $-0,53x(\pm 0,1)+68,2(\pm 2,4), R^2=0,67$; 2/3VMF= $-0,57x(\pm 0,1)+61,2(\pm 2,7), R^2=0,67$; FinVMF= $-0,52x(\pm 0,2)+48,2(\pm 4), R^2=0,38$. Todos $p < 0,0001$.

4.4. Efecto de la morfogénesis foliar sobre la calidad de las láminas

Advance presentó menor VMF que El Palenque Plus (490 vs $632 \pm 60^\circ\text{Cd}$, respectivamente), no detectándose diferencias en IAH ($p > 0,7$). Esta última variable aumentó con el tiempo térmico en ambos cultivares, respondiendo a una función cuadrática (Figura 5). Esto implicó un retraso en la aparición de generaciones de hojas sucesivas que aumentó de 90 ± 23 hasta estabilizarse en 310°Cd a partir de la cuarta hoja. A su vez, la TEF mostró interacción significativa cultivar \times tiempo ($p = 0,05$) debido a que fue similar para ambos cultivares ($17 \pm 1,8 \text{ mm día}^{-1} \text{ macollo}^{-1}$) durante el crecimiento de las primera tres generaciones de hojas (hasta los 735 GDC).

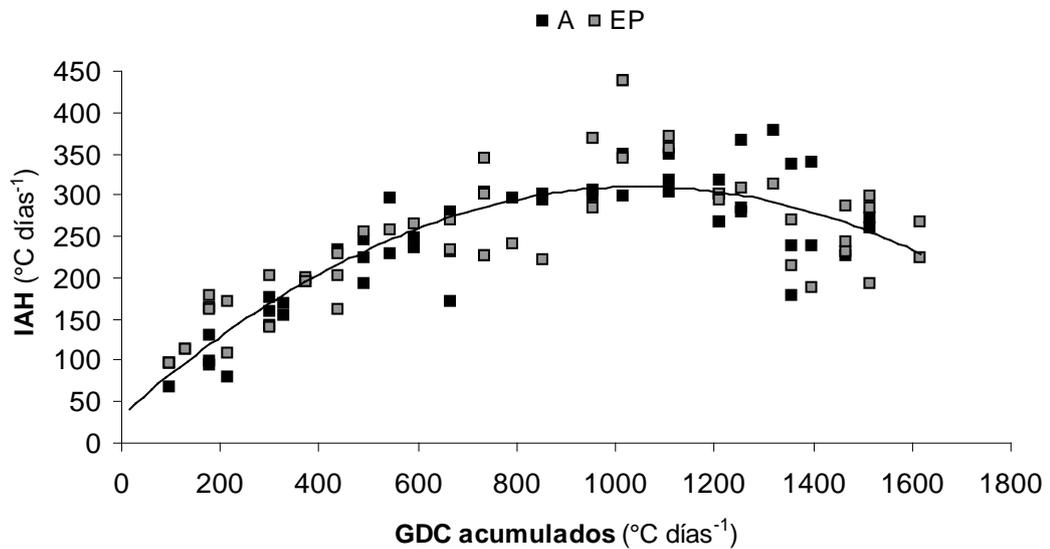


Figura 5. Evolución del intervalo de aparición de hoja (IAH) con el tiempo térmico expresado en grados días (GDC) acumulados para Advance (A) y El Palenque Plus (EP). Ecuación cuadrática ajustada ($n=102$): $IAH = -0,0003x^2 + 0,53x + 33,4$, $R^2=0,73$.

El NHV máximo de El Palenque Plus fue mayor que en Advance ($3,3 \pm 0,21$ vs. $2,5 \pm 0,21$ hojas macollo⁻¹). La Figura 6 muestra que luego de alcanzar el valor de NHV máximo, ambos cultivares mostraron una caída que fue anticipada y más abrupta en Advance, que llegó a un valor aproximado de 1,5 NHV respecto de las 2,5 NHV que mantuvo El Palenque Plus.

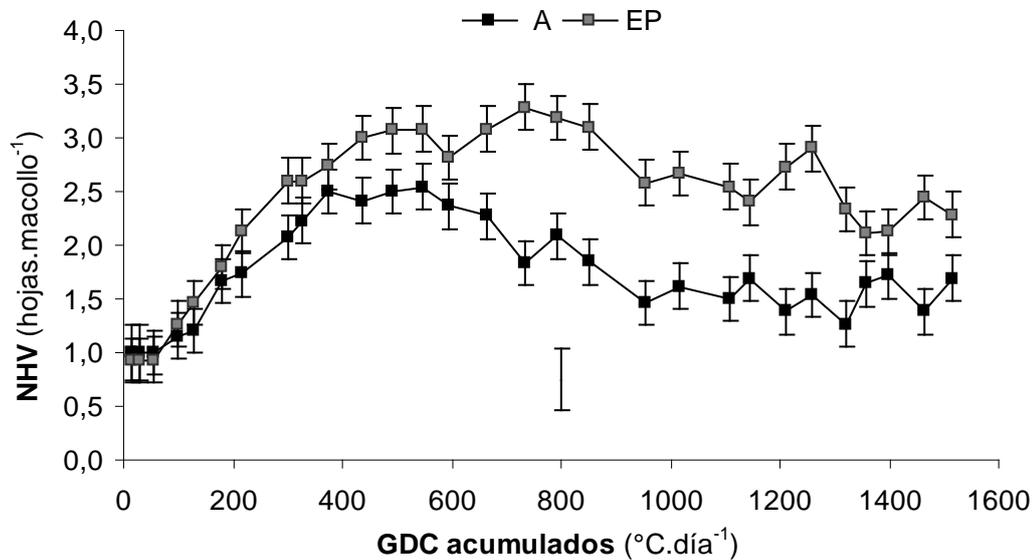


Figura 6. Evolución del número de hojas vivas (NHV) con el tiempo térmico expresado en grados días de crecimiento (GDC) acumulados para Advance (A) y El Palenque Plus (EP). Barras indican error estándar de la media. Diferencia mínima significativa para comparaciones entre medias: $\Delta = 0,59$, $p=0,05$.

El largo de lámina fue similar entre cultivares ($p=0,14$), aunque aumentó entre generaciones sucesivas de hojas ($p<0,0001$) de 140 ± 12 , 240 ± 34 y 360 ± 39 mm para G1, G2 y G3, respectivamente (Figura 7).

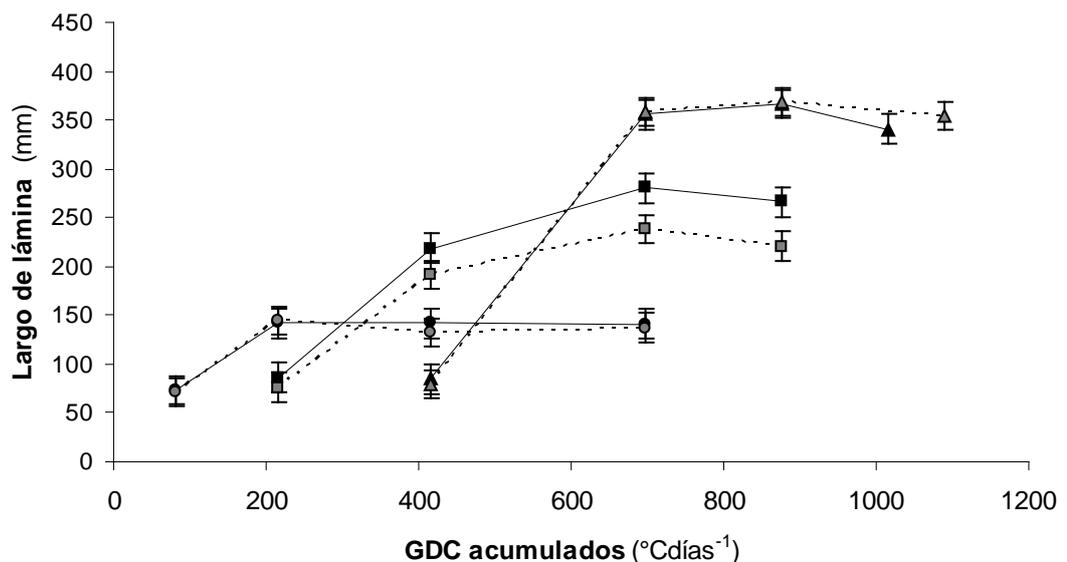


Figura 7. Largo de lámina de tres generaciones sucesivas para Advance (línea continua) y El Palenque Plus (línea punteada) durante el período de rebrote expresado en grados días de crecimiento (GDC) acumulados. Barras indican error estándar de medias.

El largo de vaina aumentó de igual forma en ambos cultivares para las primeras tres generaciones de hojas (37, 69 y 100 mm para la G1, G2 y G3, respectivamente), pero luego de los 735 GDC el aumento fue mayor en Advance (interacción cultivar x tiempo significativa $p < 0,005$). Al final del ensayo, el largo de vaina fue de $162 \pm 5,7$ y $139 \pm 5,7$ mm, para Advance y el Palenque Plus, respectivamente (Figura 8).

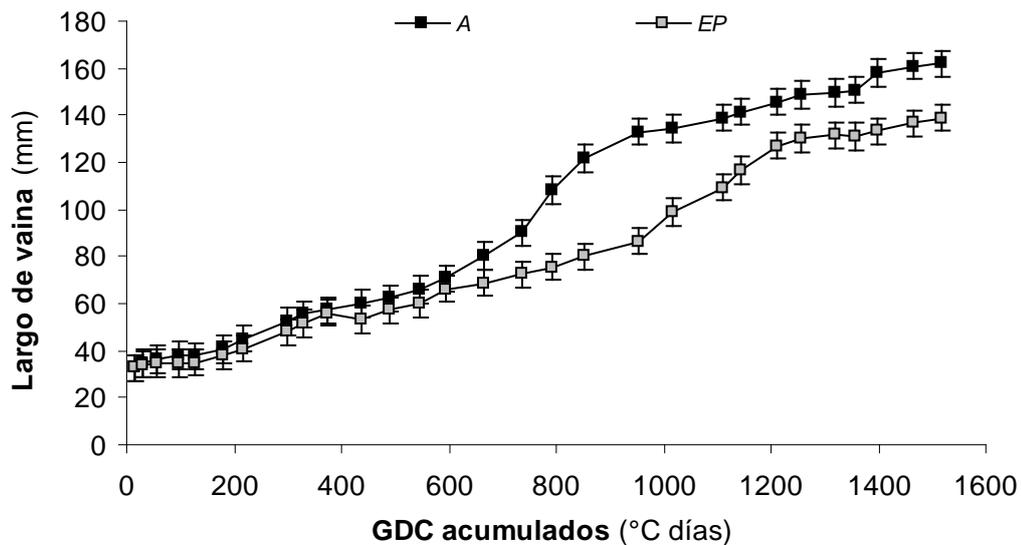


Figura 8. Evolución del largo de vaina con el tiempo térmico expresado en grados días (GDC) acumulados para Advance (A) y El Palenque Plus (EP). Barras indican error estándar de medias.

4.5. Evolución de la DAMS y la DFDN del conjunto de láminas

A partir de las variables de calidad y morfogénesis se calculó la evolución de la DAMS y la DFDN del conjunto de láminas durante el rebrote de ambos cultivares (Figura 9). Estos comportamientos fueron similares al patrón de pérdida de DFDN descrito anteriormente para las láminas individuales (Figura 3).

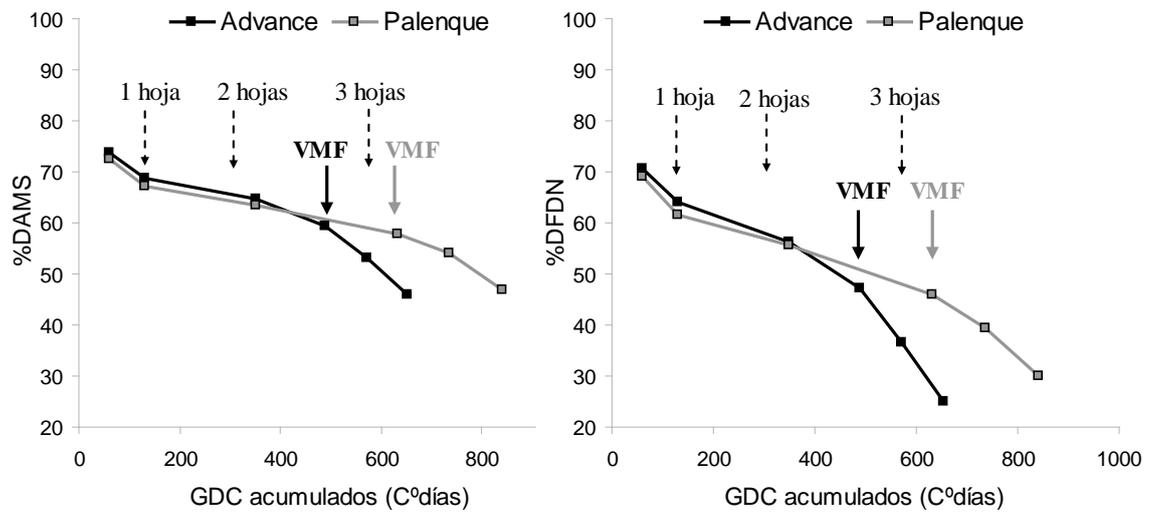


Figura 9. Digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) y digestibilidad de la FDN (DFDN) del conjunto de láminas durante un rebrote expresado en grados días (GDC) acumulados para Advance y El Palenque Plus. Las flechas en línea cortada indican el número de hojas acumulado durante la evolución del rebrote. Las flechas en línea entera indican el comienzo de la senescencia en ambos cultivares.

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto del genotipo sobre la calidad de las láminas

Ambos cultivares mostraron similar calidad de láminas para los distintos estados ontogénicos de hojas (Tabla 4). Las láminas de ambos cultivares mostraron un amplio rango de DAMS a lo largo del desarrollo foliar. La misma varió aproximadamente entre 70 a 50%, desde su emergencia hasta el final de la VMF, es decir el momento previo a la senescencia. Posteriormente la DAMS continuó disminuyendo en la medida que avanzó la senescencia, llegando al 30% en la lámina completamente seca. Dichas variaciones estuvieron altamente asociadas a las variaciones en la DFDN ($R^2=95\%$). La asociación entre la DAMS y el contenido de FDN fue menor ($R^2=54\%$), debido a que la FDN permaneció constante durante la VMF, como se muestra en la Figura 2. La alta relación entre DAMS y DFDN indicaría que, durante el desarrollo y la senescencia de la hoja, ocurren modificaciones en la estructura de la pared celular que la hacen más resistente al ataque de los microorganismos del rumen (Akin 1989; Jung; Deetz, 1993; Wilson; Mertens, 1995). La pobre asociación entre DFDN y FDN ($R^2=33\%$) se debió, por un lado, a que durante la VMF la FDN se mantuvo estable y la DFDN disminuyó y, por otro, a que durante la senescencia la FDN aumentó y la DFDN continuó cayendo. Estos resultados muestran que los cambios que hacen menos digestible a la FDN son independientes de su contenido. Por lo tanto, la DFDN sería un importante parámetro de calidad que debería tenerse en cuenta para una mejor interpretación de los cambios de calidad del forraje (Oba; Allen 1999). De manera importante, la DFDN no cambia con variaciones en el contenido de compuestos solubles como ocurre con la digestibilidad de la MS, ya sea aparente o verdadera.

5.2. Efecto de la edad foliar sobre la calidad de las láminas

El contenido de FDN de las láminas verdes (durante la VFM) se mantuvo constante en un promedio de $54,5 \pm 3,2$, valor similar al encontrado por Buxton; Redfearn (1997) en festuca alta. A su vez, la constancia de la FDN durante toda la vida foliar concuerda con lo observado en *Thinopyrum ponticum* (Harkes, 2011), *Chloris gayana*, *Cenchrus ciliaris* (Avila et al., 2010) y *Digitaria decumbens* (Agnusdei et al., 2009). Esto se debe a que la deposición de materia seca y de fibra sólo tiene lugar en la zona de crecimiento, o sea mientras la lámina está creciendo dentro del tubo de vainas (Mac

Adam; Nelson 1987; Schnyder *et al.*, 1987; Maurice *et al.*, 1997). No obstante, el incremento de alrededor 10 unidades de FDN (desde 54,5 hasta 64,9%) observado durante la senescencia (Figura 2) es en realidad un aumento relativo resultante de la exportación del contenido celular hacia las hojas en crecimiento (Robson; Deacon 1978).

Los valores de DFDN fueron similares entre ambos cultivares cuando se los comparó al mismo estado ontogénico, cayendo progresivamente de 65% hasta 36% desde la emergencia de la hoja hasta el final de la VMF, y llegando al 10% en la hoja completamente senescente (Tabla 4). Sin embargo, la VMF de Advance fue un 20% menor que la de El Palenque Plus (490 vs. 630 GDC, respectivamente). Estos resultados indican que los procesos físicos (Wilson; Mertens, 1995; Wilson, 1997) y químicos (Jung, 1989; Akin 1989; Van Soest, 1993; Jung; Allen, 1995; Buxton; Redfearn, 1997; Satter *et al.*, 1999) que hacen la pared celular menos digestible, sucedieron más aceleradamente en el cultivar con recambio foliar más rápido (Figura 3). Adicionalmente, la marcada caída de la DFDN posterior a la VMF sugiere que los procesos físico-químicos antes señalados continuaron operando aún durante la senescencia.

El patrón de pérdida de DFDN con la edad foliar fue similar entre las generaciones de hojas, pero la DFDN disminuyó con las generaciones sucesivas (Figura 3). Esto último estaría asociado al incremento de la longitud del tubo de vainas con el aumento de la acumulación de biomasa, tal como fue observado en otras especies (Groot; Neuteboom, 1997 en raigrás anual; Duru; Ducroq, 2002 en pasto ovillo; Agnusdei *et al.* 2009 y Avila *et al.* 2010 en grama rhodes).

Por un lado, Groot; Neuteboom (1997) y Duru; Ducroq (2002) propusieron que la disminución en DFDN entre generaciones sucesivas se debe al mayor tiempo de residencia dentro del tubo de vainas. Por el otro, Agnusdei *et al.*, (2009) concluyeron que el principal determinante de tal disminución fue la mayor longitud de las hojas, asociada al aumento progresivo del largo del tubo de vainas durante el rebrote. Para verificar en qué medida el mayor tiempo de residencia dentro del tubo de vainas provocó las diferencias en DFDN entre generaciones, se utilizaron los datos de IAH como medida del tiempo de elongación de una lámina dentro del tubo de vainas. El fundamento de ello es la existencia de una coordinación en el crecimiento de las hojas de un macollo: cuando la G1 detiene su crecimiento, la G2 se hace visible por fuera del tubo de vainas y la G3 inicia la elongación de la lámina dentro del tubo de vainas

(invisible) en el primordio del meristema (Skinner; Nelson, 1994). Esta sincronización regulada por la emergencia de la lámina (Fournier *et al.*, 2005) permite estimar el tiempo de elongación dentro del tubo de vainas como el IAH de cada generación. Según este supuesto, las láminas de la G2 y G3 tardaron 82 y 127 GDC más en atravesar un tubo de vainas 32 y 63 mm más largo, respectivamente, que la G1. Durante este tiempo las láminas de la G2 y G3 perdieron 5,6 y 8,8 puntos de DFDN en el interior del tubo de vainas, respectivamente. Así, cuando a la DFDN de las láminas se le descontó el efecto de mayor edad ocasionado por las diferencias en largo de vaina, se anularon las diferencias entre generaciones al momento de la aparición (Tabla 5). Según estos cálculos, las diferencias de DFDN entre generaciones de hojas sucesivas, se deberían al mayor tiempo requerido para atravesar un tubo de vainas progresivamente más largo, en concordancia con lo observado por Groot; Neutboon (1997) y Duru; Ducroq (2002).

Tabla 5. Digestibilidad de la FDN de láminas de tres generaciones sucesivas de hojas (G1, G2 y G3) comparadas con y sin el efecto de envejecimiento dentro del tubo de vainas al momento de emergencia para Advance y El Palenque Plus.

Generación	Datos Originales		Sin envejecimiento	
	Advance	El Palenque Plus	Advance	El Palenque Plus
G1	70,7a	69,2a	70,7	69,2
G2	64,4b	63,3b	70,0	68,9
G3	62,1c	59,7c	70,9	68,5

Así, a pesar de que el incremento del largo de vaina se asoció con un aumento de la TEF (Kavanová *et al.*, 2006; Arredondo; Schnyder, 2003), las razón del retraso en la aparición de las láminas sucesivas (IAH) por fuera de un tubo de vainas progresivamente más largo, se debería a que el crecimiento de la hoja dentro del tubo de vainas (TEF invisible) es menor al crecimiento visible (Durand *et al.*, 1999). Para corroborar este planteo se procedió a verificar, a partir de la TEF y el largo de vaina, si este mecanismo explica el aumento del IAH. Para esto, se asumió una TEF dentro del tubo de vainas (invisible) proporcional a la TEF medida (visible), que fue calculada en base a los datos reportados por Durand *et al.* (1999) para festuca alta. Bajo estos

supuestos las estimaciones del tiempo de permanencia de cada generación dentro del tubo de vainas confirma las diferencias observadas en el aumento del IAH (72 y 141 GDC más para la G2 y G3, respectivamente, en comparación a la G1). De acuerdo con estos supuestos, la aparente inconsistencia entre los resultados del presente trabajo y los obtenidos por Agnusdei *et al.* (2009) radica en que estos autores asumieron igual TEF dentro y fuera del tubo de vainas (TEF invisible y visible, respectivamente). Teniendo en cuenta los antecedentes y los resultados de esta tesis previamente discutidos, el tiempo de permanencia de las láminas dentro del tubo de vainas estimada por los referidos autores habría sido subestimado.

5.3. Efecto del largo foliar sobre la calidad de las láminas

Al aumentar de tamaño, la planta debe invertir en mayor tejido de sostén para sostener una mayor estructura (Lemaire; Gastal 1997; Givish, 1982, citado por Werger *et al.*, 2002). Ello podría implicar que al incrementarse el largo foliar de hojas sucesivas se aumenta el contenido de FDN (Wilson, 1976a, Groot; Neuteboom, 1997; Groot *et al.*, 1999; Agnusdei *et al.*, 2009) y/o disminuye la DFDN (Di Marco; Agnusdei, 2010).

Tal como fue observado en *Thinopyrum ponticum* (Di Marco; Agnusdei, 2010) y en especies C₄ (Avila *et al.*, 2010; Agnusdei *et al.*, 2009), mientras el contenido de FDN no se vio afectado por el largo de hoja comprendido entre los 100 y 400 mm, la DFDN mostró una fuerte caída con el incremento del largo foliar (Figura 4). En este trabajo, la tasa de pérdida de DFDN estuvo comprendida en el rango de valores reportados en los trabajos antes citados, con tasas de 0,5 puntos porcentuales por cm de longitud de lámina, respecto a los 0,9 (Nenning, 2009) y 0,2 (Avila, 2009) observados en especies C₄, y 0,2 en agropiro alargado (Harkes, 2011). La falta de asociación de la FDN con el incremento del largo foliar señalada previamente, puede explicarse a partir de la naturaleza de este parámetro. Así, mientras la FDN es un indicador del contenido total de pared celular, el cual incluye componentes altamente digestibles y componentes parcial o completamente indigestibles asociados a las estructuras de sostén y conducción, la DFDN (o su complemento, la fracción indigestible de la FDN) debería ser un mejor indicador del segundo tipo de componentes. En línea con este planteo, el hecho de que la DFDN caiga consistentemente con el aumento de tamaño de las plantas mientras que la FDN resulta relativamente constante, sugiere que la DFDN fue

sensible a los incrementos en el contenido de tejidos de sostén indigestibles asociados al aumento en la longitud de las láminas.

La disminución de la DFDN entre hojas sucesivas a igual estado ontogénico, como por ejemplo en hojas recientemente expandidas (lígula, G1: 62,2a, G2:55,6b y G3: 49,8c), ha sido atribuido en trabajos previos (Agnusdei *et al.*, 2009) no sólo al efecto de mayor edad mencionado en la sección anterior, sino que también se explicaría a través de un efecto de tamaño de hoja *per se*. Duru *et al.* (1999) observó que la disminución de la digestibilidad de hojas sucesivas recientemente expandidas fue debida a un aumento de segmentos de menor digestibilidad, como consecuencia de un incremento en la proporción de tejido estructural con el largo de hoja. Esta idea coincide con Wilson (1976b), que registró un aumento en la proporción de esclerénquima y tejidos vasculares en láminas de generaciones de hojas sucesivas.

Di Marco; Agnusdei (2010), por su parte, observaron en pasturas de agropiro manejadas con diferentes regimenes de defoliación (i.e. pastura corta y larga), que la reducción de la altura de la pastura fue coincidente con un incremento de 10% en la DFDN. Estos autores observaron que el aumento de la TEF con el largo de vaina en la pastura larga sobre compensó el mayor recorrido de vaina a atravesar por las láminas, resultando en similar tiempo de permanencia dentro del tubo de vainas que la pastura corta. Las diferencias en la permanencia dentro del tubo de vainas (35 GDC) serían insuficientes para explicar los 5,5 puntos de DFDN de diferencia a favor de la pastura corta. Debido a lo expuesto, se podrían atribuir las diferencias en DFDN a un efecto de tamaño de hoja *per se*. A pesar de lo cual, en el presente trabajo en el que las pasturas se dejaron crecer libremente, parecería ser que no hubo tal efecto de tamaño *per se*, pero no se descarta que exista tal mecanismo en pasturas bajo manejos de pastoreos contrastantes.

5.4. Efecto de la morfogénesis foliar sobre la calidad de las láminas

La VMF de ambos cultivares estuvo dentro del rango de los 500-600 GDC citados para festuca alta (Lemaire, 1985; Gao; Wilman ,1994; Lemaire; Chapman 1996; Labreveux, 1998; Lemaire; Agnusdei, 2000; Agnusdei; Assuero, 2004). Ello indica que es una gramínea de moderada tasa de recambio de hojas, en comparación con raigrás perenne, que tiene una VMF de 330 GDC (Davies, 1988) y se clasifica como de alta

tasa de recambio foliar. La menor VMF de Advance (490 vs 630GDC, respectivamente) explica el menor NHV en comparación a El Palenque Plus (2,5 vs 3,3, respectivamente), ya que el NHV surge del cociente entre la VMF y el IAH ($NHV = VMF/IAH$) (Chapman; Lemaire 1993; Lemaire; Agnusdei 2000). De acuerdo con esta relación, el aumento del IAH de ambos cultivares (Figura 5) determinó la disminución del NHV luego de alcanzar el nivel máximo (Figura 6). En otras palabras, el NHV fue variable debido al retraso en la aparición de hojas sucesivas, tal como se ha observado en pasturas creciendo luego de una defoliación (Skinner; Nelson, 1994). Este comportamiento se debería al progresivo alargamiento del tubo de vainas (Figura 8) por el que deben atravesar las hojas en crecimiento, provocando un retraso en la aparición de las láminas (Wilson; Laidlaw, 1985; Skinner; Nelson, 1995; Duru *et al.*, 1999). A pesar de la relación positiva entre la longitud de vaina y la TEF (Kavanová *et al.*, 2006; Arredondo; Schnyder, 2003), en el presente trabajo el efecto del aumento de la TEF con el largo de vaina ($y = 0,01x + 0,06$, $R^2 = 0,78$, $n=74$, $p<0,0001$) no compensaría el mayor recorrido del tubo de vainas a atravesar por la lámina en crecimiento, dando como resultado el aumento del IAH en el tiempo como lo observado por Skinner; Nelson (1995); Duru; Ducrocq, (2000a). Según los cálculos realizados, para que el IAH se hubiera mantenido constante, el efecto de vaina sobre la TEF debería haber sido 6 veces mayor al observado (pendiente 0,06 vs 0,01).

Al presentar ambos cultivares una sola hoja en crecimiento por vez, el tiempo transcurrido entre la aparición de dos hojas sucesivas corresponde al tiempo en que las láminas se mantuvieron creciendo (Robson, 1967). De esta forma, los aumentos del IAH pueden ser interpretados como aumentos en la duración de la elongación foliar (DEF). Asimismo, el incremento del largo de lámina de hojas sucesivas (Figura 7) estuvo dado por aumentos en la TEF (datos no presentados) y en la DEF durante el rebrote (Lemaire; Agnusdei, 2000; Fiorani *et al.*, 2000).

5.5. Digestibilidad de la MS y FDN del conjunto de láminas

Durante la acumulación de las primeras tres generaciones de hojas, la DAMS y DFDN del conjunto de láminas ($DAMS_{conjunto}$, $DFDN_{conjunto}$) fue similar para ambos cultivares hasta los 490 GDC, pero posteriormente fue menor en Advance debido a que comenzó la senescencia antes que El Palenque Plus (Figura 9). Al igual que lo observado por Duru y Ducrocq, (2002), la $DAMS_{conjunto}$ estuvo muy relacionada a la

DAMS de la lámina recientemente expandida ($DAMS_{conjunto} = 1,06 DAMS_{exp} - 3,95$, $R^2=0,96$, $n=6$). En este caso, la pendiente positiva indica que la DAMS de la primera lámina expandida (G1-Lígula) es más parecida a la $DAMS_{conjunto}$ en comparación a las posteriores hojas (G2 y G3) donde la $DAMS_{conjunto}$ fue menor. Esto se debe a que al avanzar el ciclo de rebrote, aumenta levemente el porcentaje de tejido foliar de mayor edad en relación a la hoja recientemente expandida. Cabe aclarar que esto sucedería en épocas en donde el tamaño de las hojas aumenta sucesivamente como ocurre en primavera y verano. Posteriores estudios o modelaciones se deberían desarrollar para estudiar el comportamiento en épocas como el otoño, donde el aumento del tamaño de hojas sucesivas no es tan marcado.

En resumen, se puede inferir a partir de los cálculos de calidad del conjunto de hojas que i) ambos cultivares defoliados dentro de su VMF presentaron similar calidad nutritiva; y que ii) tanto la senescencia, como la edad y el largo foliar fueron los factores que determinaron la caída de calidad durante el rebrote.

5.6. Consideraciones finales

La gran pérdida de digestibilidad durante la senescencia, resalta la importancia de tener en cuenta la VMF de las especies forrajeras como criterio de manejo de la defoliación, a los efectos de evitar las pérdidas de calidad asociadas a este proceso. Bajo este concepto, los resultados indican que los manejos de pastoreos orientados a optimizar la calidad, pueden diferir inclusive para cultivares de una misma especie. Para el caso de los cultivares analizados, con ambos se alcanzarían similares valores de calidad, pero para ello Advance debería ser defoliado más frecuentemente que El Palenque Plus (Tabla 6). De esta forma, un adecuado manejo respetando la VMF debería estar en el orden de los 500 GDC para Advance y de 600 GDC para El Palenque Plus. Esto representaría una frecuencia no mayor a 30 días para Advance y de 40 días para El Palenque Plus durante un rebrote de verano (temperatura media 21°C). En este lapso de tiempo ambos cultivares alcanzarían un “estado de hoja”, conocido en Inglés como *leaf stage*, de 2,5 hojas vivas para Advance y 3,3 para El Palenque Plus.

Por otro lado, el efecto observado de las vainas sobre el largo y edad de las láminas, y consecuentemente sobre la pérdida de calidad, revelan que el largo de vainas es un indicador relevante para controlar el remanente pos pastoreo en sistemas rotativos, o la altura de la pastura en sistemas de pastoreo continuo, orientados a

optimizar producción y calidad nutritiva del forraje, tal como lo han señalado diversos autores (v.g., Duru *et al.*, 1999; Duru; Ducroq, 2002; Pascuet, 2003; Di Marco y Agnusdei, 2010).

Tabla 6. Estado de hojas, contenido de FDN, digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) y digestibilidad de la FDN (DFDN) del conjunto de láminas en tres momentos de un rebrote de Advance y El Palenque Plus.

Variable	<i>Días de rebrote</i>						
	20		30		40		
	Advance	Palenque Plus	Advance	Palenque Plus	Advance	Palenque Plus	
GDC	309		490		630		
NHV	2		2,5		2,5	3,3	
Estado de hojas (% conjunto)	1°	Adulta (37)		PreSen (25)		50%Sen(19)	PreSen(19)
	2°	Lígula (63)		Adulta (43)		PreSen (32)	Adulta (32)
	3°	-		Creciendo (32)		Lígula(49)	Lígula(49)
%DAMS	64,5	63,4	59,3	60,6	47,9	57,9	
%DFDN	56,2	55,7	47,0	50,9	28,2	46,1	
%FDN	53,9	55,9	54,4	56,1	55,7	56,3	

6. CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias de calidad entre cultivares al mismo estado ontogénico. Sin embargo, Advance tuvo una menor VMF, y en consecuencia una mayor tasa de pérdida de DFDN que El Palenque Plus, llegando a un mismo nivel de DFDN al final de la VMF. Posteriormente, durante la senescencia, no hubo diferencias entre cultivares.

Durante la VMF las láminas perdieron DAMS debido a una disminución de DFDN, ya que la FDN se mantuvo constante. Sin embargo, durante la senescencia la pérdida de DAMS estuvo dada por un aumento del contenido de FDN y una disminución de la DFDN.

La disminución de DFDN entre generaciones de hojas sucesivas se debería principalmente a un efecto de mayor edad ocasionado por el aumento del largo de vaina.

Los resultados de este trabajo confirman la influencia de las variables morfogénicas (tasa de crecimiento, aparición y vida foliar) sobre la calidad de las láminas a través de sus efectos sobre la edad y el tamaño foliar.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGNUSDEI, M.G, NENNING, F.R., DI MARCO, O.N. y AELLO, M.S. 2009. Variaciones de calidad nutritiva durante el crecimiento vegetativo de gramíneas megatérmicas de diferente porte y longitud foliar (*Chloris gayana* y *Digitaria decumbens*). Rev. Arg. Prod. Anim. 29: 13-25.
- AGNUSDEI, M.G.; ASSUERO, S.G.; 2004. Leaf tissue flows under grazing and sward structure of different temperate forage grasses in the humid Pampas of Argentina. In: Proceedings of the II Symposium on "Grassland ecophysiology and grazing ecology". Curitiba, Brasil. CD-ROM.
- AGNUSDEI, M.G.; ASSUERO, S.G.; FERNANDEZ GRECCO, R.C.; CORDERO J.J.; BURGHI, V.H. 2007. Influence of sward condition on leaf tissue turnover in tall fescue and tall wheatgrass swards under continuous grazing. Grass and Forage Science 62: 55–65.
- AGNUSDEI, M.G.; MAZZANTI, A.; COLABELLI, M.; LABREVEAUX, M. 1998. Fundamentos para el manejo del pastoreo de pastizales y pasturas cultivadas de la pampa húmeda bonaerense. Boletín Técnico N° 147. INTA Balcarce. 18 p.
- AKIN, D.A. 1982. Section to slide technique for study of forage anatomy and digestion. Crop Sci. 22:444-446.
- AKIN, D.A.; BARTON, I.I.; BURDICK, D. 1975. Scanning electron microscopy of Coastal Bermuda and Kentucky 31 tall fescue extracted with neutral and acid detergents. J. Agric. Food Chem. 23:924-927.
- AKIN, D.E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility at forages. Agron. J. 1:17–25.
- 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.
- ASAY, K. H.; JENSEN, K. B.; WALDRON, B. L.; GUODONG, H.; JONHSON, D. A.; MONACO, T. A. 2002. Forage Quality of Tall Fescue across an Irrigation Gradient. Agron. J. 94:1337–1343.
- ASSUERO S.G.; MOLLIER A.; PELLERIN S. 2004 The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. Plant, Cell and Environment. 27:887–895.
- AVILA, R.E. 2009. Contenido y digestibilidad *in vitro* de la fibra de láminas de *Chloris Gayana* Kunth en relación a la edad y tamaño foliar. Tesis Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 78p.

- AVILA, R.E.; DI MARCO, O.N.; AGNUSDEI, M.G.; MAYORAL, C. 2010. Digestibilidad de la fibra y materia seca de dos gramíneas megatermicas (*Chloris gayana* y *Cenchrus ciliaris*) de diferente porte. Relación con la edad y largo foliar. Rev. Arg. Prod. Anim. 30: 1-13.
- BERONE, G.D.; LATTANZI, F.A.; COLABELLI, M.R.; AGNUSDEI, M.G. 2007. A Comparative Analysis of the Temperature Response of Leaf Elongation in *Bromus stamineus* and *Lolium perenne* Plants in the Field: Intrinsic and Size-mediated Effects. Ann. Bot. 100, 813–820.
- BURNETT, V.; RUTHERGLEN. 2008. Grasses for dryland dairying Tall Fescue: species and cultivars. Agriculture Notes. States of Victoria, Department of Primary Industries. 1-3.
- BURNS, J.C. 2009. Nutritive value. In: Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B.; West, C.P. (eds.). Tall fescue for the Twenty-first Century. Agron. Monogr. 53. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp.159-202.
- BUXTON, D.R.; REDFEARN, D.D. 1997. Plant Limitations to Fiber Digestion and Utilization. J. Nutr. 127 (5): 814S-818S.
- CALLOW, M.N.; LOWE, K.F.; BOWDLER, T.M.; LOWE, S.A.; GOBIUS, N.R. 2003. Dry matter yield, forage quality and persistence of tall fescue (*Festuca arundinacea*) cultivars compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in a subtropical environment. Aust. J. Exp. Agric. 43:1093–1099.
- CARRETE, J. R. Y RIMIERI, P. 2002. Calidad del forraje de cuatro genotipos de *Festuca alta*. 25 Congreso Argentino de Producción Animal. Bs. As. Rev. Arg. Prod. Anim. 22(supl. 1):220-221.
- CARRETE, J.R. 2001. Producción y calidad del forraje en cultivares comerciales de festuca alta. Reunión anual sobre forrajeras. Una mirada hacia los suelos ganaderos. Estación Experimental Agropecuaria. INTA. Pergamino. 8 de Noviembre. pp 36-45.
- 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.). Annals Appl. Biolo. 134: 251–257.
- CHAPMAN, D. F.; THARMARAJ, J.; NIE, N. 2007. Milk-production potential of different sward types in a temperate southern Australian environment. Grass Forage Sci. 63, 221-233.
- 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 Publishing, Wellington. pp. 55-64.

- CHERNEY, D.J.R.; CHERNEY, J.H. 2005. Forage Yield and Quality of Temperate Perennial Grasses as Influenced by Stubble Height. Online. Forage and Grazinglands doi:10.1094/FG-2005-0215-01-RS.
- CHESSON, A.; STEWART, C.S.; WALLACE, R.J. 1982. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:597-603.
- COLOMBATTO, D. 2006. Análisis de alimentos: aplicaciones prácticas. [en línea] <www. agro. uba. ar / catedras / p _ lechera / resumencolombato. pdf> [Consulta:15-10-08].
- CORDERO, J.J. 1996. Dinámica del crecimiento y eficiencia de utilización de una pastura de *Festuca arundinacea* Schreb., bajo pastoreo continuo de ovinos. Tesis *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 81p.
- CROWDER, L.V. 1995. Interspecific and intergeneric hybrids of *Festuca* and *Lolium*. *J. Hered.* 44:195-203.
- 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. Tech.* 141 (1): 15-35.
- DAVIES, A. 1988. The regrowth of the grass sward. *In*: Jones M.B.; Lazenby, A. eds. *The Grass Crop: The Physiological Basis of Production*. Chapman and Hall, London. pp. 129-169.
- 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.
- Di MARCO, O.N.; AGNUSDEI, M.G. 2010. Plant Morphogenetical plasticity in response to sward height can modify fibre digestibility in C3 (*Thinopyrum ponticum*) and C4 grass species (*Chloris gayana*). *In*: Machado, C.F.; Wade, M.; Carneiro Da Silva, S.; Agnusdei, M.; De Faccio Carvalho, P.; Morris, S.; Beskow, W. eds. *An overview of research on pastoral-based systems in the southern part of south America*. First edition. Tandil. Editorail Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. pp. 18-27.
- DONAGHY, D.J.; TURNER, L.R.; ADAMCZEWSKI, K.A. 2008. Effect of defoliation management on water-soluble carbohydrate energy reserves, dry matter yields, and herbage quality of Tall Fescue. *Agron. J.* 100:122-127.
- DOVE, H. 1996. The ruminant, the rumen and the pasture resource: nutrient interactions in the grazing animal. *In*: Hodgson J.; Illius, A.W. *The ecology and management of grazing systems*. CAB International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK. pp. 219-246.

- DURU, M. and DUCROCQ, H. 2000a. Growth and senescence of the successive grass leaves on a tiller. Ontogenic development and effect of temperature. *Ann. Bot.* 85:635-643.
- DURU, M.; DUCROCQ, H. 2000b. 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.
- 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.
- ETTER, A.G. 1951. How Kentucky bluegrass grows. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 38: 293–375.
- 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.
- FOURNIER, C.; DURAND, J.L.; LJUTOVAC S.; SCHAUFLELE, R.; GASTAL, F.; ANDRIEU, B. 2005. A functional-structural model of elongation of the grass leaf and its relationships with the phyllochron. *New Phytologist* 166: 881–894.
- FRIBOURG, H.A.; HANNAWAY, D.B.; WEST, C.P. 2009. Preface. In: Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B.; West, C.P. (eds.). *Tall fescue for the Twenty-first Century*. Agron. Monogr. 53. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp.xi-xii.
- FRIBOURG, H.A.; MILNE, G. 2009. Establishment and renovation of old sods for forage. In: Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B.; West, C.P. (eds.). *Tall fescue for the Twenty-first Century*. Agron. Monogr. 53. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp.67-84.
- FULKERSON, W.J.; DONAGHY, D.J. 2001. Plant soluble carbohydrate reserves and senescence- key criteria for developing an effective grazing management system for ryegrass-based pastures: A review. *Aust. J. Exp. Agric.* 41:261–275.
- FULKERSON, W.J.; SLACK, K. 1994. Leaf number as a criterion for determining defoliation time for *Lolium perenne* 1. Effect of water-soluble carbohydrates and senescence. *Grass Forage Sci.* 49: 373-377.
- GAO; Y.; WILMAN, D. 1994. Leaf development in eight related grasses. *J. Agr. Sci.* 123, 41-46.
- GARGANO, A.O.; ARDURIZ, M.A.; LABORDE, H.E. 1988. Evaluación de cuatro gramíneas templadas perennes. 2. Digestibilidad in vitro y proteína bruta. *Rev. Arg. Prod. Animal* 8: 385-395

- GASTAL, F.; BÈLANGER, G.; LEMAIRE, G. 1992. A model of the leaf extension rate in tall fescue in response to nitrogen and temperature. *Ann. 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.
- GOODWIN, T.W.; MERCER, E. I. 1983. The plant cell wall. In *Introduction to plant biochemistry*, Pergamon Press, New York, p 55-91.
- 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.
- 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.
- HANNAWAY, D.B.; DALY, C.; HALBLEIB, M. D.; JAMES, D.; WEST, C.P.; VOLENEC, J.J.; CHAPMAN, D.; LI, X.; CAO, W.; SHEN, J.; SHI, X.; JOHNSON, S. 2009. Development of suitability maps with examples for the United States and China. In: Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B.; West, C.P. (eds.). *Tall fescue for the Twenty-first Century*. Agron. Monogr. 53. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp.33-48.
- HARKES, H. 2011. Calidad nutritiva de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). su relación con la altura de la pastura, la edad y morfogénesis foliar. Tesis *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 89 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.
- HOPKINS, A.A.; SAHA, M.C.; WANG, Z.Y. 2009. Breeding, genetics, and cultivars. In: Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B.; West, C.P. (eds.). *Tall fescue for the Twenty-first Century*. Agron. Monogr. 53. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp.339-366.

- HOVELAND, C.S. 2009. Origin and History. In: Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B.; West, C.P. (eds.). Tall fescue for the Twenty-first Century. Agron. Monogr. 53. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp.3-10.
- INASE, 2011. Registro Nacional de Cultivares (RNC). Catalogo Nacional. [en línea] http://www.inase.gov.ar/index.php?option=com_remository&Itemid=102&func=st artdown&id=857&lang=en [consulta: Mayo 2011]
- JACOBSON, D.R.; SINGER, R.H.; RUST, J.W.; SEATH, D.M. 1957 A preliminary comparison of the nutritive value of orchdgrass, smooth bromegrass, Kentucky-31 fescue and G1-43 fescue. J. Dairy Sci. 40:613.
- JUNG, H.G. ; VOGEL, K.P. 1992. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. J. Sci. Food Agric. 59:169-176.
- 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. p 315. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- JUNG, H.G.; VOGEL, K.P. 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. J. Anim. Sci. 62:1703.
- JUNG, H.J. 1989. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. Agron. J. 81: 33-38.
- 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.
- 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 Environm. 29: 511-520.
- 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 *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 74 p.

- LASSITER, C.A.; SEATH, D.M.; WOODRUFF, J.W.; TAYLOR, J.A.; RUST, J.W. 1956. Comparative value of Kentucky bluegrass, Kentucky31 fescue, orchardgrass, and bromegrass as pasture for milk cows. II. Effect of kind of grass on dry matter and crude protein contents and digestibility and intake of dry matter. *J.Dairy Sci.* 39:581-588.
- 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.; MAZZANTI, A.; WADE, M.H. 2007. Seasonal animal production of temperate and Mediterranean tall fescue cultivars under continuous variable stocking with close control of sward state. *Aust. J. Agric. Res.* 58:203–213.
- LEMAIRE, G. 1985. Cinétique de croissance d'un peuplement de féтуque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) pendant l'hiver et le printemps:effects des facteurs climatiques. Thèse d'Etat, Université de Caen, 96 p.
- LEMAIRE, G.; AGNUSDEI, M. 2000. Leaf tissue turnover and efficiency of herbage utilization. In: LEMAIRES, G.; HODGSON, J.; de MORAES, A.; CARVALHO, P.C. de F.; NABINGER, C. *Grassland ecophysiology and grazing ecology*. CAB International. pp. 265-287.
- 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.; GASTAL, F. 1997. N uptake and distribution in plant canopies. In: Lemaire, G. (eds.). *Diagnosis of the nitrogen status in crops* INRA. Station d'Ecophysiologie de plants fourrageres. 1:3-41.
- 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. Bot.* 59: 369–376.
- MARTEN, G. C., 1978. The animal-plant complex in forage palatability phenomena. *Agron. J. of Animal Sci.* 46:1470-1477.
- MATTHEW, C.; ASSUERO, S.G.; BLACK, C.K.; SACKVILLE HAMILTON, N.R. 2000. Tiller Dynamics of Grazed Sward. In: Lemaire, G.; Hodgson, J.; de Moraes, A.; Carvalho, P.C. de F.; Nabinger, C.(eds.). *Grassland ecophysiology and grazing ecology*. CAB International. pp. 127-150.
- MATTHEW, C.; LEMAIRES, G.; SACKVILLE HAMILTON, N.R.; HERNANDEZ GARAY, A. 1995. A modified self-thinning equation to describe size/density relationships for defoliated swards. *Ann. Bot.* 76, 579–587.

- 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. Bot.* 80: 673–683.
- MAZZANTI, A.; CASTAÑO, J.; SEVILLA, G.H.; ORBEA, J.R. 1992. Características agronómicas de especies y cultivares de gramíneas y leguminosas forrajeras adaptadas al sudeste de la provincia de Buenos Aires. Centro Regional Buenos Aires Sur, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 73p.
- 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 Forage Sci.* 49: 111-120.
- MILNE, G.D. 2001. Tall fescue - dramatic changes. In: Proceedings of the Grassland Society of Victoria 42nd Annual Conference. pp.60-69.
- MILNE, G.D. 2005. Management-Southern Hemisphere. En: HA Fribourg, DB Hannaway, eds. Tall Fescue-Online Monograph disponible <http://forages.oregonstate.edu/is/tfis/book/tf21c/management-south-hemisphere.pdf>. Oregon State University,
- MILNE, G.D. 2009. Management in New Zealand, Australia, and South America. In: Fribourg, H.A.; Hannaway, D.B.; West, C.P. (eds.). Tall fescue for the Twenty-first Century. *Agron. Monogr.* 53. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp.101-118.
- MILNE, G.D.; SHAW, R.; POWELL, R.; PIRIE, B.; PIRIE, J. 1997. Tall fescue use on dairy farms. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 59: 163-167.
- 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.
- NELSON, C.J. 2000. Shoot Morphological Plasticity of Grasses: Leaf Growth vs. Tillering. In: Lemaire, G.; Hodgson, J.; de Moraes, A.; Carvalho, P.C. de F.; Nabinger, C.(eds.). *Grassland ecophysiology and grazing ecology*. CAB International. pp. 101-126.
- NENNING, F.R. 2009. Calidad nutritiva de láminas de gramíneas megatérmicas de diferente hábito de crecimiento en relación al envejecimiento y tamaño foliar. Tesis *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 57p.
- NIE, Z.N; CLEMENTS, R.; CHAPMAN, D.F.; LETTS, E.R. 2000. Effects of pasture type and management on persistence and productivity of dairy pastures in south west Victoria. *Proc. Grassl. Soc. Victoria* 41st Ann. Conf. 2:158-159.

- OBA, M.; ALLEN, M. 2005. In Vitro Digestibility of Forages. Tri-State Dairy Nutrition Conference.
- 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.
- 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. 129-177.
- PARSONS, A.J. 1994. Exploiting resource capture – grassland. In: Monteith, J.L.; Unsworth, M.H. (eds) *Resource Capture in Crops*. Nottingham University Press, Nottingham. pp. 315–344.
- 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 *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 83 p.
- ROBSON M.J.; DEACON, M.J. 1978 Nitrogen deficiency in small closed communities of S24 ryegrass. II. Changes in the weight and chemical composition of single leaves during their growth and death. *Ann Bot* 42, 1199-1213.
- ROBSON, M.J. 1967. A comparison of British and North African varieties of tall fescue. 1– Leaf growth during winter and the effect on it of temperature and daylength. *J. Appl. Ecol.* 4, 475–484.
- SAS. 2001. SAS/STAT® User's guide (Release 8.0). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- SATTER, L.; JUNG, H.; VAN VUUREN, A.; ENGELS, F. 1999. Challenges in the nutrition of high producing ruminants. In: Jung H.; Fahey, G. (Eds.) *Nutritional ecology of herbivores. Proceedings of the international symposium on the nutrition of herbivores*. ASAS Illinois, USA. pp.609-646.
- SCHNYDER, H.; NELSON, C.J.; COUTTS, J.H. 1987. Assessment of spatial distribution of growth in the elongation zone of grass leaf blades. *Plant Physiol.* 85, 290-293.
- 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. Epidermal cell division and coordination of leaf and tiller development *Ann. Bot.* 74:9-15.
- SKINNER, R.H.; NELSON, C.J. 1995. Elongation of the grass leaf and its relationship to the phyllochron. *Crop Sci.* 35: 4-10.

- SULLIVAN, J. T. 1959. A rapid method for the determination of acid insoluble lignin in forages and its relation to digestibility. *J. Anim. Sci.* 18:1292.
- TEMPONE, L.B. 2000. Cambios en valor nutritivo y porcentaje de tejidos foliares en respuesta a fertilización y estado de desarrollo en dos cultivares de festuca alta. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 74 p.
- THARMARAJ, J.; CHAPMAN, D.F.; NIE, Z.N. 2005. Seasonal herbage accumulation of different dairy pasture types in southern Australia. In: O'Mara F.P., Wilkins R.J., Manette L., Lovett D.K., Rogers P.A.M. and Boland T.M. (eds) 20^o International Grassland Congress: Offered Papers, Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. pp. 460.
- THARMARAJ, J.; LANE, A. 2003. Pasture technology for dairy production in South West Victoria. In: Field Day <proc. Univ. Melbourne, Australia. p.10-13.
- THOMAS, H.; STODDART, J.L. 1980. Leaf senescence. *Annual 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.
- 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.
- 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. 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Dairy Sci.* 119-128.
- 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.
- 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. *Journal of Vegetation Science* 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.

- 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.; 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. 47:199-225.
- 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, J.R. 1976a. 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. 1976b. Variation of leaf characteristics with level of insertion on a grass tiller. II. Anatomy. Aust. J. Agric. Res. 27:355–364.
- 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. Simposio internacional sobre produção animal em pastejo. Viçosa, MG. Anais Viçosa, MG: UFV. pp.173-208.
- 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.