

## **Ambiente y digestión ruminal de una alfalfa seleccionada por menor desaparición ruminal para reducir su potencial meteorizante**

### **Ruminal environment and digestion of an alfalfa selected for low initial ruminal disappearance for reduce the bloat potential.**

Bernaldez, M. L.<sup>1</sup>; J. Martínez Ferrer<sup>2</sup>; D. Basigalup<sup>2</sup>; D. Alomar<sup>1</sup>; M. E. Terreno<sup>3</sup> & M. S. Busceme<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias y Dirección de Investigación y Desarrollo, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. E-mail: [mbernal@puc.cl](mailto:mbernal@puc.cl)

<sup>2</sup> Área de Producción Animal, Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Manfredi, Córdoba, Argentina.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

#### **RESUMEN**

Se realizó un ensayo, repetido en 6 períodos experimentales, para determinar la desaparición inicial en el rumen (DIR) de las hojas y los metabolitos de la fermentación ruminal de un cultivar de alfalfa seleccionado por menor DIR, denominado ProINTA Carmina (Carmina) y un cultivar comercial Bárbara SP INTA (Bárbara) como testigo. Carmina posee al menos 22,67% menos DIR que la población original y fue creada con la finalidad de reducir su potencial meteorizante en bovinos en pastoreo. Cada cultivar fue implantado en dos parcelas experimentales. Usando 4 novillos fistulados pastoreando los cultivares se determinó la degradación ruminal *in situ* a 4 h, el pH, la concentración de NH<sub>3</sub> y la proporción de los principales AGV en el fluido ruminal. No se encontró diferencia en el fluido ruminal de los fistulados en pastoreo de los tratamientos para el pH, la concentración de NH<sub>3</sub> y la proporción de los principales AGV, en tanto que Carmina presentó menor concentración de AGV totales. Carmina exhibió menor DIR de las hojas que Bárbara. La diferencia de DIR entre los cultivares se reflejó en una menor concentración de AGV totales, pero no en las otras variables del ambiente ruminal estudiadas.

**Palabras clave:** cultivar de alfalfa, pastoreo, dinámica ruminal inicial.

#### **ABSTRACT**

To compare the initial ruminal of disappearance (IRD) and the production of metabolites from rumen fermentation, leaves from an alfalfa cultivar selected for lower IRD (cv. ProINTA Carmina) and from a commercial check (cv. Barbara SP INTA) were evaluated in a grazing trial including six experimental periods. ProINTA Carmina was reported to have 22.67% lower IRD than the original breeding population from which it was derived. Every cultivar was planted in two experimental plots and grazed by four fistulated steers. *In situ* rumen degradation and rumen liquor pH, NH<sub>3</sub> concentration and main fatty-acid proportion were determined. Even though ProINTA Carmina had lower total fatty-acid concentration, no differences were detected in the rest of rumen liquor variables. IRD values from ProINTA Carmina were lower than those from the check. It is concluded that in this study, lower IRD in ProINTA Carmina was reflected in lower total fatty-acid concentration but not in the other traits.

**Key words:** alfalfa cultivar, grazing, initial ruminal kinetic.

#### **INTRODUCCIÓN**

El meteorismo espumoso bovino producido por el pastoreo de alfalfa es un trastorno digestivo que provoca cuantiosas pérdidas económicas. El *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* de Argentina (INTA), con cultivares de reposo invernal corto (grado de reposo invernal 8) ha trabajado en un programa de mejoramiento genético mediante selección de plantas con menor tasa inicial de desaparición en el rumen (DIR) en su tercio superior (Basigalup et al., 1998). Este criterio de selección se basa en que algunas leguminosas no meteorizantes poseen una tasa de desaparición ruminal 25-30% más lenta que las leguminosas meteorizantes (Howarth et al., 1982). La mayor DIR de leguminosas meteorizantes es el resultado de una mayor fragilidad de la pared celular, principalmente de las células del mesófilo y de la epidermis foliar (Goplen et al., 1993). De la resistencia de la pared celular depende su nivel de daño durante la masticación ingestiva, lo que genera sitios de invasión para los microorganismos y constituyen una vía de liberación del contenido intracelular (Zhu et al., 1999). En el contenido intracelular se localizan el 100% de los carbohidratos solubles, que al degradarse en el rumen a una tasa superior al 300% h<sup>-1</sup> generan ácidos

grasos volátiles (AGV) de cadena corta y gases durante su fermentación (Boudon & Peyraud, 2001), y más del 80% de los componentes nitrogenados, en su mayoría proteínas solubles que en un rango de pH de 4,5-6,3 (Jones & Lyttleton, 1972) adquieren propiedades espumógenas.

El cultivar creado en Argentina (ProINTA Carmina) es el resultado de tres ciclos de selección fenotípica y genotípica con prueba de progenie (policruza) en un proceso recurrente sobre el tercio superior del forraje, partiendo de una población original conformada por 4 cultivares de alfalfa (Monarca SP INTA, 5929, Mecca y Sequel). El material obtenido en el segundo ciclo de selección presentó una DIR (4 h) de 50% y mostró una caída promedio de 22,7% en la DIR del tercio superior del forraje en relación a la población original (Basigalup et al, 2004). Evaluaciones con bovino bajo condiciones de pastoreo han demostrado menor incidencia de meteorismo en el pastoreo de ProINTA Carmina en relación al pastoreo de cultivares comerciales de amplia difusión en Argentina (Bernáldez et al., 2007).

El objetivo del presente trabajo es estimar las diferencias en la degradación inicial de hojas en el rumen entre ProINTA Carmina y un cultivar testigo, y detectar dichas diferencias en el análisis de algunos metabolitos de la fermentación ruminal inicial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo para determinar simultáneamente la desaparición inicial en el rumen (DIR) de las hojas y la generación de metabolitos de la fermentación ruminal de un cultivar de alfalfa seleccionado por menor DIR denominado ProINTA Carmina (Carmina) y de un cultivar comercial de amplia difusión en Argentina, Bárbara SP INTA (Bárbara), usado como testigo. Carmina posee al menos 22,7% menos DIR del tercio superior del forraje que la población original.

El ensayo fue repetido en 6 períodos experimentales (PE): PE1 (diciembre 2003), PE2 (marzo 2004), PE3 (abril 2004), PE4 (diciembre 2004), PE5 (enero 2005) y PE6 (abril 2005). En otoño del 2003 cada cultivar fue implantado en dos parcelas experimentales de pastoreo en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Manfredi del INTA, ubicada en la Pcia. de Córdoba, Argentina (31° 49' 12" de latitud S, 63° 46' 00" de longitud O, y 260msnm de altitud). El suelo Haplustol típico de textura franco limosa se presenta como una serie pura en toda la superficie que comprende la EEA.

En cada PE, las parcelas experimentales fueron pastoreadas por 4 novillos raza Hereford fistulados de rumen con cánula permanente. Al momento de utilización la pastura se encontraba en estado vegetativo con un rebrote de corona de 5cm de altura en otoño y en botón tardío-inicio de floración en primavera-verano. Se usó alta asignación forrajera (promedio de 8,3kgMS 100kgPV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) en pastoreos cortos (4 horas).

La DIR de las hojas del tercio superior del forraje producido por cada cultivar se estimó con la técnica *in situ* (Mehrez & Ørskov, 1977) con las modificaciones descritas por Basigalup *et al.* (2003) a las 0, 2 y 4 horas de incubación ruminal. Para la concentración *in vivo* de metabolitos de la fermentación ruminal (NH<sub>3</sub>, pH y AGV) los horarios de medición son coincidentes con las horas de incubación mencionadas para la DIR y corresponden a 0, 2 y 4 horas de pastoreo en las parcelas experimentales. En el fluido ruminal filtrado a través de dos capas de lienzo se midió el pH con un peachímetro digital portátil Sartorius PT-10 (Sartorius AG Goettingen, Germany), y se tomaron sub-muestras para determinar la concentración de amoníaco (mgNH<sub>3</sub> dl<sup>-1</sup>) mediante estimación de nitrógeno amoniacal por el método de Kjeldahl y de AGV de cadena corta (mmolAGV dl<sup>-1</sup>) por cromatografía gaseosa en un aparato Shimadzu modelo GC 14 (columnas empacadas, relleno con chromosorb AW, 10% polyetilen glicol adipato y 3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y detector FID). Las sub-muestras se conservaron a -18°C con reactivos ácidos, ácido sulfúrico concentrado a razón de 1ml por cada 50ml de fluido ruminal, y ácido fosfórico al 24% en ácido sulfúrico 3N a razón de 1ml por cada 5ml de fluido ruminal, hasta realizar las determinaciones analíticas de N-NH<sub>3</sub> y AGV respectivamente. Se calcularon las proporciones de los tres principales AGV: ácido acético (A), ácido propiónico (P), ácido butírico (B) sobre el total de AGV presentes en las muestras.

Todas las variables fueron analizadas mediante ANAVA usando un modelo de bloques generalizados completos al azar con medidas repetidas en el tiempo, que incluye el efecto tiempo u horario de muestreo (T) y su interacción con el cultivar (Cv×T). Las variables medidas a tiempo cero fueron usadas como covariables. Todas las pruebas de hipótesis se realizaron con un nivel de significación del 10%.

## RESULTADOS

La totalidad de las variables en estudio presentó bajos coeficientes de variación, con valores inferiores al 10% para la concentración de NH<sub>3</sub> y menores al 5% para el resto de las variables estudiadas.

La DIR de las hojas de Carmina fue inferior a la de Bárbara (Tabla 1) y los animales pastoreando Carmina presentaron menor concentración de AGV. Sin embargo los demás metabolitos de la fermentación ruminal estudiados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los novillos que pastoreaban los cultivares evaluados (Tabla 1). Estos resultados revelan que la diferencia en la DIR *in situ*

expresada entre cultivares no se reflejó en la concentración de todos los metabolitos de la fermentación ruminal medidos simultáneamente *in vivo*. La baja relación entre eventos o mediciones que ocurren *in situ* e *in vivo* ha sido señalada por Illius et al. (2000).

En el presente trabajo la DIR de Carmina representa el 95% de la DIR de Bárbara. Realizar más ciclos de selección para lograr un mayor progreso genético en el carácter seleccionado podría incrementar la brecha de la DIR entre cultivares y podría marcar diferencias en el ambiente ruminal generado por los metabolitos de la fermentación.

Tabla 1. Desaparición ruminal de hojas *in situ* y parámetros fermentativos del rumen *in vivo* generados por el consumo en pastoreo de alfalfa (valores promedio).

†	Carmina			Bárbara			Valor p	
	0 ††	2	4	0	2	4	Cv	Cv×PE
DIR	45,84	66,49	76,14	47,49	68,72	79,69	0,0900	0,2541
pH	6,80	6,30	6,04	6,75	6,21	6,09	0,9624	0,5323
NH <sub>3</sub>	27,76	58,37	68,63	26,31	61,19	76,23	0,2660	0,0630
AGV	111,54	168,27	188,06	113,28	178,91	199,06	0,0109	0,7333
Acético <sup>1</sup>	67,47	67,65	66,35	68,60	67,73	66,23	0,7406	0,0320
Propionico <sup>1</sup>	15,83	18,32	18,25	15,66	18,62	18,17	0,6338	0,2392
Butírico <sup>1</sup>	8,97	7,73	8,73	8,94	7,76	8,95	0,5762	0,1356

† DIR: degradabilidad inicial en el rumen; NH<sub>3</sub>: concentración de amoníaco (mg 100ml<sup>-1</sup>); AGV: concentración de ácidos grasos volátiles (mM). <sup>1</sup> proporción de los AGV individuales expresada como % de los AGV totales. †† Horas de muestreo del fluido ruminal (coincidente con horas de pastoreo experimental).

La DIR de las hojas medida en el presente trabajo es superior al valor de DIR (4 h) medido por Basigalup et al. (2004) para el segundo ciclo de selección en el desarrollo de ProINTA Carmina. Esa diferencia es consecuente con la mayor desaparición de las hojas respecto a una muestra de planta entera reconocida por diversos autores (Buxton et al, 1985; Griffin et al., 1994).

La generación de AGV durante la fermentación microbiana en el rumen provoca una disminución en el pH ruminal. En el presente trabajo, la caída de pH en el tiempo es coincidente con el incremento de la concentración de AGV (Tabla 1). Mientras que a las 4 h de pastoreo el 79% de los registros presentaron valores adecuados para la formación de espuma estable, a las 2 h y 0 h esos valores fueron de 42% y 21%, respectivamente. El valor más bajo de pH (5,66) se registró a las 4h del PE4 en un animal pastoreando Bárbara. Los valores mínimos de pH encontrados en pastoreo de alfalfa en vacas lecheras (Castillo & Gallardo, 1995) y en novillos (*J. Martínez, comunicación personal*) están en el orden de los reportados en este trabajo.

La concentración de amoníaco (NH<sub>3</sub>) en el rumen guarda estrecha relación con el metabolismo microbiano del N. Los valores encontrados en el presente trabajo son comparables a los picos de concentración superiores a 60 mg NH<sub>3</sub> dl<sup>-1</sup> que reporta Castillo (1992) en vacas lecheras en pastoreo de alfalfa.

Las cantidades relativas de los principales AGV no difieron entre cultivares. Esto último se condice con algunos antecedentes que señalan que la proporción de los principales AGV es bastante estándar en dietas basadas sólo en pastoreo de forrajes y que estas proporciones pueden cambiar al alterarse los patrones de fermentación por el agregado de concentrados a la dieta (Seal & Parker, 2000).

Como se observa en la tabla 1, el ANAVA detectó interacción entre el efecto cultivar y el período experimental (Cv×PE) para la concentración de NH<sub>3</sub> y para la proporción de acético. Sin embargo, el análisis por período experimental no detectó ninguna tendencia relevante para estas variables. La interacción entre el efecto cultivar y el tiempo de muestreo (Cv×Tpo) no fue significativa para ninguna variable estudiadas (p>0,100).

## CONCLUSIÓN

El cultivar seleccionado por menor DIR del tercio superior de la planta, ProINTA Carmina, exhibió menor DIR en hojas que el cultivar testigo. La diferencia de DIR entre los cultivares se reflejó en una menor concentración de AGV totales para los animales pastoreando Carmina, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron pH, concentración de HN<sub>3</sub> y proporción de los

principales AGV. Hasta dónde esa ausencia de correlación entre estos eventos se debió a la condición intrínseca de los materiales evaluados o a la capacidad de detección de la metodología empleada deberá ser determinada en futuros trabajos.

### Literatura Citada

Basigalup, D. H.; C.V. Castell & C.D. Giaveno. (2004). Response to selection for lower initial rate of dry matter disappearance in the development of a bloat-tolerant on-dormant alfalfa population. *J. of Gen. & Breed.* 57: 31-38.

Bernaldez, M. L.; P. Davies, D. H. Basigalup, J. Martínez Ferrer, D. Méndez, M. Balzarini & D. Alomar. (2007). Evaluación del potencial meteorizante de un cultivar de alfalfa en dos localidades. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 24:*en prensa*

Buxton D.R.; J.S. Hornstein, W.F. Wedin & G.C. Marten. (1985). Forage quality in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil, and red clover. *Crop Sci.* 25:273-279.

Castillo, A. R. (1992). Suplementación de vacas lecheras en pastoreo de alfalfa durante el otoño-invierno. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 12:16-17.

Castillo A. R. & M. R. A. Gallardo. (1995). Suplementación de vacas lecheras en pastoreo de alfalfa. Concentrados y forrajes conservados. In: *La alfalfa en la Argentina*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (E. H. Hijano & A. Navarro eds.). Ed. Editar, San Juan, Argentina. Pp.195-207.

Glophen, B. P.; R. E. Howarth & G. L. Lees. (1993). Selection of alfalfa for a lower initial rate of digestion and corresponding changes in the epidermal and mesophyll cell wall thickness. *Can. J. Plant Sci.* 73:111-122.

Griffin, T. S.; K. A. Cassida, O. B. Hesterman & S. R. Rust. (1994). Alfalfa maturity and cultivar effects on chemical and in situ estimates of protein degradability. *Crop Sci.* 34:1654-1661.

Illius, A. W.; N. S. Jessop & M. Gill. (2000). Mathematical models of food intake and metabolism in ruminants. In: *Ruminant physiology. Digestion, metabolism, growth and reproduction*. (P. B. Cronjé). Ed. C.A.B International, Wallingford, UK Pp.21-40.

Jones, W.T. & Lyttleton, J.W. (1972). Bloat in Cattle. XXXVI. Further studies on the foaming properties of soluble leaf proteins. *New Zealand J. Agric. Res* 15:267-278.

Mehrez, A. Z. & E. R. Ørskov. (1977). The use of a Dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. *J. Agric. Sci., Camb.* 88:645-650.

SAS Institute Inc. (2003) SAS STAT. User's Guide Versión 9.1. Cary, NC, USA.

Seal, C. J. & D. S. Packer. (2000). Influence of gastrointestinal metabolism on substrate supply to the liver. In: *Ruminant physiology. Digestion, metabolism, growth and reproduction*. (P. B. Cronjé). Ed. C.A.B International, Wallingford, UK. Pp.131-148.

Zhu, W. Y.; A. H. Kingston-Smith, D. Troncoso, R. J. Merry, D. R. Davies, G. Pichard, H. Thomas & M. K Theodorou. (1999) Evidence of a Role for Plant Proteases in the Degradation of Hbage Proteins in the Rumen of Grazing Cattle. *J. Dairy Sci.* 82: 2651-2658.