

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Efecto sinérgico de las mezclas de raigrás perenne con trébol sobre la degradabilidad ruminal

Francisco Gutiérrez¹, Mónica Sacido², Susana Feldman³

RESUMEN

La ganadería se fundamenta en la alimentación a base de pasturas con diferentes niveles de calidad, especies y madurez. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto sinérgico de las mezclas de *Lolium perenne* con *Trifolium repens* o *T. pratense* sobre la cinética de degradabilidad ruminal de la materia seca y la proteína bruta. La investigación se realizó en la provincia de Pichincha, Ecuador; en los cantones de Mejía (mezcla forrajera), Quito (análisis de laboratorio) y Rumiñahui (degradabilidad *in situ*), entre los meses de diciembre del 2022 y junio del 2023. Para ello, se plantearon dos experimentos: el primero con mezclas de raigrás (R) y trébol blanco (Tb) [(90:10, 80:20, 70:30) 100% R y 100% Tb], y el segundo con mezclas de raigrás (R) y trébol rojo (Tr) [(90:10, 80:20, 70:30), 100% R y 100% Tr]. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y cada uno de estos fue evaluado en los siguientes tiempos de incubación: 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48, y 72 horas. Se evaluó la degradabilidad efectiva y la tasa de degradabilidad. Las variables estudiadas fueron la degradabilidad ruminal de la materia seca (MS) y de la proteína bruta (Pb). Se utilizó un diseño completamente al azar y una prueba de Tukey para separación de medias. Los resultados indicaron que la incorporación de trébol a las mezclas con raigrás perenne modifica la composición química, aumentan la concentración de Pb y

¹Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ecuador. Autor para correspondencia: fgutierrezce@edu.ec (<https://orcid.org/0000-0002-9749-3467>).

²Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Agrarias. Rosario, Argentina. Correo electrónico: msacido@hotmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-0552-2831>).

³Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Agrarias. Rosario, Argentina. Correo electrónico: susanarfeldman@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-2043-5074>).

Recibido: 16 febrero 2024 Aceptado: 06 agosto 2024

Esta obra está bajo licencia internacional Creative Commons Reconocimiento-NoComercial SinObrasDerivadas 4.0.



disminuyen la FDN y la FDA. Se observaron diferencias ($p < 0.05$) para degradabilidad de la MS y Pb, siendo, en los dos experimentos, la mezcla con 70% de raigrás (R) y 30% de trébol (T) la que tuvo una degradabilidad potencial (ab) del 90% y 96%, respectivamente. La incorporación de tréboles a la mezcla con raigrás mejoró la degradabilidad conjunta de la mezcla. No obstante, el riesgo de timpanismo en rumiantes aumenta con porcentajes más altos de tréboles. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas entre la incorporación de trébol blanco y trébol rojo.

Palabras claves: Ganadería, pasturas, fermentación, producción, leguminosas, gramíneas.

ABSTRACT

Synergistic effect of perennial ryegrass mixtures with clover on ruminal degradability. Livestock nutrition is based on pastures with diverse levels of quality, species, and maturity. The objective of this research was to evaluate the synergistic effect of mixtures of *Lolium perenne* with *Trifolium rapens* or *T. pratense* on the kinetics of dry matter and crude protein rumen degradability. The research was conducted in the province of Pichincha, Ecuador; in the cantons of Mejía (forage mixture), Quito (laboratory analysis), and Rumiñahui (in situ degradability), between December 2022 and June 2023. Two experiments were proposed: the first one being a mixture of ryegrass (R) and white clover (Wc) [(90:10, 80:20, 70:30), 100 % R and 100% Wc], and the second mixture of ryegrass (R) and red clover (Rc) [(90:10, 80:20, 70:30), 100% R and 100% Rc]. Three repetitions per treatment were considered. Each treatment was evaluated at the following incubation times: 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48 and 72 hours. The effective degradability and the degradability rate were evaluated. The variables studied were rumen degradability of dry matter (DM) and crude protein (CP). A completely randomized design and Tukey test for mean separation were used. The results indicate that adding clover to the mixtures with perennial ryegrass modifies the chemical composition, increases the concentration of CP, and decreases the NDF and ADF. Differences were observed ($p < 0.05$) for the degradability of DM and CP, being, in both experiments, the

mixture with 70% ryegrass and 30% clover had a potential degradability of 90% and 96%, respectively. The addition of clovers to the mixture with ryegrass improves the joint degradability of the mixture. However, the risk of foamy swelling in ruminants is a risk with higher clovers percentages. Finally, no significant differences were found between the incorporation of white clover and red clover.

Keywords: Livestock, pasture grasses, fermentation, production, legumes, grasses.

INTRODUCCIÓN

La alimentación en los sistemas de producción pecuarios es el rubro económico más importante (Núñez, 2017). La principal fuente de alimento en rumiantes es el pasto, pero este presenta una gran variabilidad en su calidad por la etapa de crecimiento y las fracciones de la planta (hoja, tallo y fruto) (Mieres, 2004). Sin embargo, el pasto le proporciona al rumiante fibra; componente nutricional que le permite una correcta salud ruminal. Por ello, los animales deben consumir una cantidad mínima de fibra que estimule la rumia y la salivación (Bacha y Llera, 2009; Palladino et al., 2006).

No obstante, la proporción de pastos en la dieta disminuye a medida que se intensifican los sistemas de producción ganadera, a pesar de sus beneficios (Pol et al., 2018). Anrique y Vásquez (2012) aseguran que la genética y la alimentación son los aspectos más influyentes en la producción de rumiantes, aunque el factor genético tiene un efecto mayor que la alimentación. Para Hennessy et al. (2020), la disponibilidad de mano de obra, los patrones de parto, el uso de vacas de alto valor genético, el creciente número de vacas por explotación y la fragmentación de la tierra son algunas de las razones de la disminución del pastoreo.

Asimismo, algunas plantas pueden presentar metabolitos secundarios que pueden afectar negativamente el consumo, la palatabilidad, la digestibilidad o degradabilidad, la absorción de nutrientes o la salud del individuo (Camacho et al., 2020). Tal es el caso de algunas leguminosas forrajeras, las cuales contienen glucósidos de esteroides conocidos como

saponinas y, al ser consumidas en altas cantidades, pueden provocar intoxicaciones letales a los rumiantes (León et al., 2018). En cambio, las gramíneas rápidamente ganan un compuesto fenólico conocido como lignina conforme crecen; este tiene un efecto negativo sobre la digestibilidad de la pared celular (Paciullo, 2002).

Sin embargo, la asociación de gramíneas y leguminosas forrajeras en la producción y nutrición de rumiantes tienen varias ventajas. Como lo indica Solomon (2022), las vacas lecheras holstein que se alimentaron con pastos mixtos de raigrás perenne (*Lolium perenne* L.) y trébol blanco (*Trifolium repens* L.) produjeron un 9,9% más de leche al día que aquellas que pastaban únicamente raigrás perenne. Esto es ratificado por Wilson et al. (2020), quienes además aseveran que hay un aumento en la concentración de sólidos lácteos. Por otro lado, Eugène et al. (2021) aseguran que la inclusión de leguminosas en las mezclas forrajeras disminuye la producción de metano, esto debido a que mejora la digestibilidad de la pastura consumida.

Otro factor clave para comprender a un rumiante es entender el funcionamiento del rumen y los diferentes microorganismos que coexisten en una relación de mutualismo. Las células microbianas son una fuente importante de aminoácidos, así como de energía, pudiendo proveer hasta dos tercios de los requerimientos de un rumiante (Freer y Dove, 2007). La población microbiana del rumen consiste en bacterias, protozoos y levaduras; la mayor parte de la concentración está en forma de bacterias que se agrupan con el sustrato fermentado. La dieta con que se alimenta a los rumiantes tiene influencia en el número y proporciones relativas de las diferentes especies microbianas en el rumen (Ishler et al., 1996). Las complejas interacciones que existen en el rumen son difíciles de simular, por lo que las técnicas *in situ* nos permiten estudiar la digestión dentro del propio rumen y evaluar diferentes dietas (Vanzant et al., 1998).

Por lo antes expuesto, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto sinérgico de las mezclas de *Lolium perenne* con *Trifolium repens* o *T. pratense* sobre la cinética de degradabilidad ruminal *in situ* de la materia seca y la proteína bruta.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la provincia de Pichincha, Ecuador, en tres localidades: en el cantón Mejía, se establecieron las parcelas con mezclas forrajeras; en el cantón Rumiñahui, en la Universidad de las Fuerzas Armadas, se desarrolló el estudio de degradabilidad *in situ*; y en el cantón Quito, en la Universidad Central del Ecuador, en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas, se realizaron los análisis de materia seca y proteína bruta de las muestras de degradabilidad. La investigación se llevó a cabo entre los meses de diciembre de 2022 y junio de 2023.

Las parcelas con las mezclas forrajeras se sembraron en un valle interandino, sus suelos se clasifican como andisoles, de textura franco-arcillosa, con alta materia orgánica y alto contenido de nutrientes (Espinosa et al., 2022). Según la clasificación climática de Köppen, corresponden a un clima templado y subtropical húmedo (García, 2005). En el Cuadro 1 se muestran las condiciones edafoclimáticas de esta investigación: los datos climáticos corresponden al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) y a la estación Santa Catalina (INAMHI, 2024); los informes de suelo pertenecen a los muestreos realizados en esta investigación.

Cuadro 1. Descripción de las condiciones edafoclimáticas durante el experimento en el cantón Mejía, donde se establecieron las parcelas con las mezclas forrajeras de raigrás y trébol.

Clima		
Precipitación anual	mm	1043
Temperatura media	°C	12
Temperatura máx.	°C	18
Temperatura mín.	°C	5
Altura	m s. n. m.	2993
Suelo		
pH		7,5
C.E.	dS/m	0,5
C.O.S.	%	4,0
M.O.S.	%	7,6
N total	%	0,3
P	ppm	73,5
K	cmol/kg	1,0
Ca	cmol/kg	16,4
Mg	cmol/kg	2,7

C.E.=conductividad eléctrica; C.O.S.=carbono orgánico del suelo; M.O.S.=materia orgánica del suelo.

Se establecieron parcelas de 300 m² con mezclas de raigrás perenne y dos especies de trébol, en una proporción de 25 kg/ha de raigrás (R) y 5 kg/ha de trébol (T) con semilla sexual. La primera mezcla fue de raigrás perenne (*Lolium perenne*) con trébol blanco (*Trifolium repens*), y la segunda de raigrás perenne (*L. perenne*) con trébol rojo (*Trifolium pratense*). Ambas mezclas se establecieron al mismo tiempo. Una vez establecidas las mezclas, se cortaron cuando acumularon 300 °C, equivalente a 35 días; tiempo necesario para que, en esta localidad, se acumule la temperatura requerida y el raigrás perenne alcance su punto óptimo de crecimiento.

La mezcla se cosechó a una altura de 5 cm desde el suelo. Se hizo una separación manual de raigrás (R), trébol blanco (Tb) y trébol rojo (Tr). Luego, cada material fue deshidratado en una estufa con ventilación forzada a 60 °C por 24 horas (De La Roza-Delgado et al., 2002).

En base seca se plantearon 2 experimentos: en el primero, se consideraron 5 diferentes mezclas porcentuales de R y Tb (Cuadro 2); en el segundo, también se utilizaron 5 diferentes mezclas porcentuales, pero de R con Tr (Cuadro 3).

Cuadro 2. Diferentes mezclas porcentuales de raigrás (R) con trébol blanco (Tb).

Mezclas	% R	% Tb
1	100	0
2	90	10
3	80	20
4	70	30
5	0	100

R=raigrás; Tb=Trébol blanco.

Cuadro 3. Diferentes mezclas porcentuales de raigrás (R) con trébol rojo (Tr).

Mezclas	% R	% Tr
1	100	0
2	90	10
3	80	20
4	70	30
5	0	100

R=raigrás; Tb=Trébol rojo.

La degradabilidad efectiva (DE) se estimó considerando la tasa de pasaje ruminal (kp), de acuerdo al modelo propuesto por Ørskov y McDonald (1979):

$$D = a + b(1 - e^{-kd \cdot t})$$

Donde la degradabilidad (D) está dada por:

a = fracción soluble

b = fracción potencialmente degradable

t = tiempo de incubación en horas

kd = tasa de pasaje o tránsito ruminal por hora

La tasa de degradabilidad (kd) se estimó utilizando la metodología descrita por Correa (2008), mientras que en la DE se consideró la k_p (Ørskov y McDonald, 1979) de $0,02 \text{ h}^{-1}$, $0,05 \text{ h}^{-1}$ y $0,08 \text{ h}^{-1}$, que se ajusta a la siguiente ecuación:

$$DE = a + b \left(\frac{kd}{kd+kp} \right)$$

Siendo:

a = fracción soluble

b = fracción insoluble pero potencialmente degradable

kd = tasa de degradación por hora

k_p = velocidad de tránsito o pasaje ruminal por hora

Para los análisis de degradación ruminal, se usaron bolsas de nylon de 10 x 20 cm, con un tamaño de poro de $45 \mu\text{m}$. Las bolsas fueron llenadas con 5 g de las mezclas forrajeras, que previamente fueron molidas en un tamaño de criba de 2 mm (Pan et al., 2021) e inmediatamente fueron selladas con calor. Las muestras de las mezclas fueron fermentadas dentro del rumen del animal, por medio de la suspensión de las bolsas, sometidas a la acción microbial. Cada muestra de forraje fue incubado en el bovino por un periodo de tiempo de: 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48 y 72 horas (Vanzant et al., 1998).

Luego de extraer las bolsas del rumen, fueron lavadas con agua hasta que estuvieran limpias. Se realizó un primer secado al ambiente, luego se ingresaron a un horno con convección por 48 h a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ y finalmente fueron pesadas para estimar el contenido de materia seca (MS) (Álvarez et al., 2015). Posteriormente, se procedió con el análisis de proteína bruta (Pb), el cual se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por AOAC (2006).

Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, estas fueron evaluadas una a la vez; luego de una semana se calculó la siguiente repetición. Es decir, esta investigación tuvo una duración de 3 semanas. Se analizó la degradabilidad ruminal de la MS y Pb.

Se utilizó una vaca de raza holstein friesian de 8 años, la cual estaba fistulada desde los 3 años; su alimentación se basó en un sistema 100% pastoril y gozaba de los 5 dominios del bienestar animal (Huertas, 2023). Además, durante el desarrollo de la investigación, se consideraron las 3 R del bienestar animal: reemplazo (se utilizó una sola vaca, al considerar que la investigación tenía como factor de estudio el alimento y no era factor de estudio el animal), reducir (se redujo el número de tratamientos que se han realizado) y refinamiento (se evaluaron los protocolos a usar durante la investigación, como fue el ingreso y la salida de muestras en la fístula) (de Osorio, 2006).

Análisis estadístico

Para ambos experimentos se trabajó con un diseño estadístico completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento. Las variables que presentaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) se compararon con una prueba de Tukey. Se utilizó el programa estadístico INFOSTAT para el análisis de datos (Di Rienzo et al., 2010).

El modelo matemático propuesto para cinética de degradabilidad ruminal de la materia seca y de las proteínas fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + F_j + E_{ijk}$$

Siendo:

Y_{ijk} = Variable respuesta

μ = Efecto medio total

M_i = Efecto de la mezcla de raigrás con trébol por el nivel i

F_j = Efecto del tiempo de incubación por el nivel j

E_{ijk} = Error experimental en nivel i de mezcla de raigrás con trébol y nivel j del tiempo de incubación

RESULTADOS

Resultados del experimento de mezclas de raigrás con trébol blanco

En el Cuadro 4 se puede observar la composición química de las mezclas de raigrás (R) con trébol blanco (Tb), previo al estudio de degradabilidad ruminal. El Tb (100) tuvo una mayor concentración de Pb y un menor nivel de fibra bruta (Fb), fibra neutro detergente (FDN) y fibra ácido detergente (FAD). Por su parte, el R (100) tuvo una composición opuesta, disminuyó la Pb y aumentó los niveles de fibra. Las mezclas tuvieron valores intermedios dependiendo de la relación de R y Tb. El extracto etéreo, las cenizas y los elementos libres de nitrógeno no se modificaron en las distintas mezclas.

Cuadro 4. Composición química del raigrás (R), del trébol blanco (Tb) y de las diferentes mezclas forrajeras previo al estudio de degradabilidad ruminal.

Parámetro	Tb	R	R:Tb	R:Tb	R:Tb
	(100)	(100)	(70:30)	(80:20)	(90:10)
	%				
Proteína bruta (Pb)	26,36	18,06	22,38	20,59	19,50
Extracto etéreo (EE)	2,50	2,31	2,73	2,45	2,35
Fibra Bruta (Fb)	16,36	23,71	22,37	23,33	23,84
Cenizas	10,20	11,49	11,03	11,40	11,13
Extractos libres de nitrógeno (ELN)	44,58	44,43	41,49	42,23	43,18
Fibra neutro detergente (FDN)	26,75	51,88	45,30	47,21	48,76
Fibra ácido detergente (FAD)	26,11	30,68	29,95	29,34	29,35

R=raigrás; Tb=trébol blanco.

En el Cuadro 5 se muestra la degradabilidad ruminal de la MS. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la fracción soluble (a) ni en la fracción insoluble potencialmente degradable (b) de las mezclas estudiadas. Sin embargo, sí hubo diferencias ($p < 0.05$) en la fracción con degradabilidad potencial (ab) y en la fracción indigestible (ld). El tratamiento Tb (100) presentó la mayor degradabilidad, que disminuyó en el tratamiento R (100), mientras

que las demás mezclas obtuvieron valores intermedios. En cuanto a la fracción indigestible (Id), esta fue mayor en el tratamiento R (100) y menor en el Tb (100). También se observaron diferencias significativas en la digestibilidad efectiva (DE) con un tránsito ruminal (k_p) de $0,02 \text{ h}^{-1}$ y $0,05 \text{ h}^{-1}$. El tratamiento Tb (100) mostró una mayor velocidad de tránsito en comparación con el R (100), mientras que las mezclas presentaron valores intermedios.

Por otro lado, en la degradabilidad de la Pb, se observaron diferencias ($p < 0.05$) en las fracciones a, ab e Id. En las fracciones a y ab el Tb (100) tuvo un mayor valor y disminuyó en las mezclas de R:Tb y el R (100); mientras que en la fracción Id, el R (100) fue el más alto y el menor se presentó en las mezclas de R:Tb y el Tb (100). El tratamiento Tb (100) también mostró una mayor tasa de degradación (k_d), la cual disminuyó progresivamente en las mezclas y en el R (100). En la DE, el Tb (100) tuvo la mayor degradabilidad, que disminuyó paulatinamente con la inclusión de R en las mezclas con Tb. Además, se observó que el Tb (100) presentó una mayor k_p a tasas de $0,02 \text{ h}^{-1}$, $0,05 \text{ h}^{-1}$ y $0,08 \text{ h}^{-1}$.

Cuadro 5. Efecto de la cinética de degradabilidad ruminal de diferentes mezclas de raigrás con trébol blanco en (a) materia seca (MS) y (b) proteína bruta (Pb).

(a)

Tratamientos	a	b	ab	ld	kd	Degradabilidad efectiva			
						0,02	0,05	0,08	
	%			h ⁻¹			kp/h		
R (100)	39,20	49,33	88,53 c	11,47 a	0,03	66,77 b	56,06	51,38	
RTb (90:10)	38,40	50,67	89,07 bc	10,93 ab	0,03	70,45 ab	59,15	53,76	
RTb (80:20)	40,43	48,84	89,27 bc	10,73 ab	0,03	69,31 ab	58,41	53,49	
RTb (70:30)	41,99	48,10	90,09 b	9,91 b	0,03	71,45 ab	60,70	55,71	
Tb (100)	40,80	51,46	92,26 a	7,74 c	0,04	74,32 a	62,83	57,20	
media	40,12	49,65	89,83	9,96	0,03	70,37	59,34	54,23	
p valor	0,6727	0,6463	0,0001	0,0001	0,4292	0,0578	0,0793	0,0993	
CV	7,82	5,96	0,64	5,64	22,78	3,76	4,34	4,40	

(b)

Tratamientos	a	b	ab	ld	kd	Degradabilidad efectiva			
						0,02	0,05	0,08	
	%			h ⁻¹			kp/h		
R (100)	34,9 b	55,8	90,8 c	9,2 a	0,02 d	60,7 d	49,2 d	44,8 d	
R:Tb (90:10)	37,7 b	53,2	90,9 bc	9,1 ab	0,02 cd	64,9 cd	53,4 cd	48,7 cd	
R:Tb (80:20)	38,9 ab	52,6	91,5 bc	8,5 ab	0,03 bc	68,6 c	56,8 bc	51,8 bc	
R:Tb (70:30)	41,4 ab	52,4	93,8 ab	6,5 bc	0,03 b	73,2 b	61,4 b	56,0 b	
Tb (100)	47,7 a	47,8	95,5 a	4,5 c	0,04 a	79,4 a	68,8 a	63,5 a	
media	39,7	52,2	92,5	7,0	0,0261	68,7	57,2	52,2	
p valor	0,015	0,258	0,001	0,001	0,0001	0,0	0,0	0,0	
CV	9,1	7,7	1,2	14,9	11,5	2,3	3,6	4,5	

a: fracción soluble; b: fracción insoluble, pero potencialmente degradable; ab: degradabilidad potencial; ld: fracción indigestible; kd: tasa de degradabilidad; kp: tránsito ruminal.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0.05), ausencia de letras indican que no existe diferencias entre tratamientos (p > 0.05).

Resultados del experimento de mezclas de raigrás con trébol rojo

En el Cuadro 6 se puede observar la composición química de las mezclas de raigrás (R) con trébol rojo (Tr), previo al estudio de degradabilidad. El Tr (100) tuvo una mayor concentración de Pb y un menor nivel de Fb, FDN y FDA. El R (100) redujo la concentración de Pb e incrementó los niveles de fibra. Las mezclas mostraron niveles de Pb y fibras dependiendo de la relación R y Tr.

Cuadro 6. Composición química del raigrás (R), el trébol rojo (Tr) y las diferentes mezclas forrajeras previo al estudio de degradabilidad ruminal.

Parámetro	Tr	R	R:Tr	R:Tr	R:Tr
	(100)	(100)	(70:30)	(80:20)	(90:10)
	%				
Proteína bruta (Pb)	26,86	18,06	21,48	19,70	18,63
Extracto etéreo	2,88	2,31	2,89	2,53	2,38
Fibra Bruta (Fb)	18,44	23,71	22,37	22,71	23,52
Cenizas	9,81	11,49	10,86	11,10	11,24
Extractos libres de nitrógeno (ELN)	42,01	44,43	42,40	43,97	44,23
Fibra neutro detergente (FDN)	29,89	51,88	46,85	48,56	50,22
Fibra ácido detergente (FAD)	24,27	30,68	27,70	28,03	27,48

R=raigrás; Tr=trébol rojo.

En el Cuadro 7 se detallan los valores de degradabilidad para MS y Pb. En la degradabilidad de la MS se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las fracciones ab e Id. El tratamiento Tr (100) presentó la fracción ab más alta y la fracción Id más baja. En contraste, los tratamientos R (100) y las mezclas de R:Tr mostraron una fracción ab más baja y una fracción Id más alta. La kd fue mayor en el Tr (100) y disminuyó en las mezclas R:Tr y en el R (100). También se observaron diferencias en la DE y en la kp a tasas de $0,02 \text{ h}^{-1}$, $0,05 \text{ h}^{-1}$ y $0,08 \text{ h}^{-1}$. En todas las tasas, el Tr (100) tuvo la mayor degradabilidad, que disminuyó rápidamente en las mezclas R:Tr y en el R (100).

En la degradabilidad de la Pb se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las fracciones a, ab e Id. El tratamiento Tr (100) mostró los valores más altos, que disminuyeron en las mezclas

R:Tr y en R (100). La fracción I_d fue mayor en R (100) y disminuyó en las mezclas y en Tr (100). La k_d fue mayor en Tr (100), seguida de las mezclas R:Tr y finalmente de R (100). La DE y la k_p fueron mayores en Tr (100) a tasas de $0,02 \text{ h}^{-1}$, $0,05 \text{ h}^{-1}$ y $0,08 \text{ h}^{-1}$, mientras que en las mezclas y en R (100) fueron menores.

Cuadro 7. Efecto de la cinética de degradabilidad ruminal de diferentes mezclas de raigrás con trébol rojo en (a) materia seca (MS) y (b) proteína bruta (Pb). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

(a)

Tratamientos	Degradabilidad efectiva								
	a	b	ab	ld	kd	0,02	0,05	0,08	
	%			h^{-1}		kp/h			
R (100)	36,03	52,95	88,99 b	11,01 a	0,02 b	64,64 b	53,01 b	48,11 b	
R:Tr (90:10)	39,47	49,01	88,48 b	11,52 a	0,02 b	63,64 b	53,27 b	49,13 b	
R:Tr (80:20)	40,06	48,20	88,26 b	11,74 a	0,02 b	64,58 b	54,19 b	49,99 b	
R:Tr (70:30)	38,22	51,11	89,33 b	10,67 a	0,03 ab	67,03 b	55,83 b	50,93 b	
Tr (100)	40,99	51,37	92,36 a	7,64 b	0,04 a	75,01 a	63,59 a	57,92 a	
media	38,88	50,47	89,46	10,26	0,02	66,74	55,72	51,00	
p valor	0,5186	0,5921	0,0028	0,0028	0,0079	0,0008	0,0020	0,0057	
CV	9,18	7,68	1,09	9,30	20,77	3,50	4,44	4,94	

(b)

Tratamientos	Degradabilidad efectiva								
	a	b	ab	ld	kd	0,02	0,05	0,08	
	%			h^{-1}		kp/h			
R (100)	34,33 c	56,53	90,87 c	9,13 a	0,02 c	60,43 d	48,81 c	44,35 d	
R:Tr (90:10)	38,50 bc	53,93	92,43 bc	7,57 ab	0,02 c	65,56 c	54,06 b	49,42 c	
R:Tr (80:20)	40,40 ab	52,77	92,77 bc	7,23 ab	0,03 bc	69,61 bc	57,99 b	52,99 bc	
R:Tr (70:30)	42,23 ab	52,37	93,90 b	6,10 b	0,03 ab	73,69 ab	62,08 a	56,75 ab	
Tr (100)	44,10 a	51,67	96,90 a	3,10 c	0,04 a	77,88 a	66,05 a	60,35 a	
media	39,62	53,40	93,33	5,77	0,03	68,89	57,16	52,17	
p valor	0,0011	0,2403	0,0002	0,0002	0,0004	0,0001	0,0001	0,0001	
CV	4,90	4,83	1,01	14,17	13,51	2,33	2,61	2,70	

a: fracción soluble; b: fracción insoluble pero potencialmente degradable; ab: degradabilidad potencial; ld: fracción indigestible; kd: tasa de degradabilidad; kp: tránsito ruminal.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$), ausencia de letras indican que no existe diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Las mezclas de raigrás y trébol tuvieron niveles de FDN entre 45% y 50% y FAD entre 27% y 30% (cuadro 4 y 6). Según FEDNA (2024), los contenidos de FDN y FDA en los forrajes determinan la calidad del forraje; el FDN determina el potencial de ingesta de animales en base seca y el FDA, la digestibilidad. Esta información es ratificada por Utrilla et al. (2022), quien menciona que, al aumentar la lignificación en los forrajes, se disminuye el contenido de proteína; lo cual puede reducir la digestión de la fibra en el forraje consumido y genera una disminución en la digestibilidad y el aporte de nutrientes. Esto guarda relación con esta investigación, ya que la degradabilidad de las mezclas que tenían mayores niveles de FDA fue menor, como en el caso del R (100) (Cuadro 5 y Cuadro 7).

La digestibilidad de las hojas es más estable y mayor que la de los tallos, se reduce rápidamente con el desarrollo de la planta al modificar sus contenidos de FDN y FDA (Álvarez-Vázquez et al., 2021; Hernández et al., 2020; Hodgson, 1990). Sin embargo, Barahona y Sánchez (2005) señalan que las leguminosas son típicamente más digeribles que las gramíneas, puesto que tienen menor contenido de FAD. Esto explicaría las diferencias en la degradabilidad de las mezclas, la cual se modificó conforme aumentó la inclusión del trébol. En cualquier caso, Moore y Jung (2001) señalan que el objetivo de gestionar la calidad del forraje no es necesariamente minimizar la concentración de FAD, sino más bien disminuir sus impactos en la digestión y en el consumo de fibra. Desde una perspectiva práctica, se debe manipular la mezcla forrajera de manera que contenga plantas más digeribles, así como el momento de cosecha para tener plantas menos lignificadas.

En los dos experimentos se observaron diferencias en la degradabilidad de la MS (Cuadros 5 y Cuadro 7), siendo la fracción ab la que muestra diferencias. El raigrás tuvo una degradabilidad del 88%, siendo la más baja. Las mezclas propuestas tuvieron degradabilidades intermedias entre el 89% y el 90%, mientras que en el trébol obtuvo un 92%, siendo este el valor más alto. Estos resultados concuerdan con los de Morales et al.

(2013), donde demostraron que la degradabilidad del kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) como monocultivo fue menor que sus asociaciones con Lotus (*Lotus corniculatus*).

Los efectos de la inclusión de leguminosas en las mezclas con gramíneas sobre la disponibilidad de los principales componentes nutricionales dependerán de la especie de leguminosa y del nivel de inclusión. Esto podría relacionarse con las diferencias en la estructura físico-química de las paredes celulares, la tasa de degradación del material en el rumen y la velocidad del paso por el tracto digestivo (Cardona et al., 2015; Rodríguez et al., 1998). Esto tiene relación con esta investigación, ya que la inclusión de la leguminosa en la mezcla con la gramínea mejoró la degradabilidad de la MS y Pb.

Por otro lado, Faría y Sánchez (2007) aseguran que la presencia de las leguminosas en la pastura asociada con gramíneas permite mejorar el valor nutritivo del forraje de bajo valor nutritivo o con madurez avanzada, esto debido a sus mayores concentraciones de proteína cruda en el follaje y mejor digestibilidad de la materia orgánica. McCarthy et al. (2023) aseguran que las mezclas de gramíneas y leguminosas tienen una alta degradabilidad y tasa de degradación en el rumen. Sin embargo, se debe tener cuidado para asegurar una cantidad adecuada de FDN debido a la baja concentración de fibra y la naturaleza altamente degradable del forraje.

En esta investigación se evaluó la fracción Id (fracción indigestible) de la MS y Pb en los dos experimentos, y se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Según Soufizadeh et al. (2018), esta fracción indigestible es útil, ya que puede predecir la degradabilidad de los forrajes. Para Tedeschi y Fox (2020), esta es necesaria para desarrollar modelos de cinética de digestión y nutrición dinámica. Sin embargo, en condiciones normales, esta fracción escaparía del rumen, como se determinó en esta investigación a las 72 horas de incubación (Foster et al., 2023).

Los tratamientos Tr (100) y Tb (100) tuvieron contenidos de Pb del 26%, mientras que las mezclas de los experimentos tuvieron valores entre 21% y 18%, dependiendo de la inclusión de T, y el R tuvo un valor de 18% (cuadro 4 y 6). La mayor concentración de N en los tréboles se puede explicar por su capacidad de fijar N ambiental por la asociación simbiótica

leguminosas-*Rhizobium* (Bianco, 2018), lo cual le permite tener una mayor concentración de N como Pb.

En la cinética de la degradabilidad ruminal de la proteína (cuadro 5 y 7), se observaron diferencias ($p < 0.05$) en la fracción ab; los tratamientos Tr (100) y Tb (100) tuvieron una mayor degradabilidad, alcanzando un 96%. Las mezclas alcanzaron valores intermedios entre 91% y 93%, aumentando de acuerdo con la inclusión de la leguminosa.

El tratamiento R (100) tuvo un 90%, siendo el valor más bajo. Según Stojanović et al. (2020), la proteína degradable unida al FDN suelen ser mayores en las gramíneas que en las leguminosas forrajeras en etapas de crecimiento comparativas. Para Lloveras et al. (2020), estas fracciones de proteína unidas al FDN o FDA no son utilizables por el animal, esto explicaría las diferencias en la degradabilidad entre R, T y las mezclas de R:T.

De manera similar a esta investigación, McCarthy et al. (2023) aseguran que las mezclas de R:T tienen una fracción ab más alta que las de R solo. En investigaciones realizadas en megatérmicas con maní forrajero (*Arachis pinto*) y brachiaria (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu), se concluye que la inclusión de leguminosas aumentó la fracción ab de la proteína y disminuyó la fracción Id (Berça et al., 2021).

En un estudio realizado con ciervos, Freudemberger et al. (1994) determinaron que la concentración y la salida de amoníaco del rumen, junto con la excreción urinaria de N, fueron mucho mayores en los animales alimentados con trébol que en los alimentados con raigrás perenne. Esto obedece a las mayores concentraciones de nitrógeno en las leguminosas y también a que el trébol tiene una tasa de degradación ruminal más rápida. Si bien la Pb en la ración de los animales es un factor a tener presente, los excesos de Pb tienen un importante impacto ambiental en los recursos hídricos al promover la eutrofización (Celis-Alvarez et al., 2021).

Broderick y Albrecht (1997) sugieren que las diferencias en la degradación de proteínas en el rumen entre las leguminosas forrajeras se explican sólo en parte por la presencia de taninos, y que las diferencias en las tasas de degradación y el escape ruminal son proporcionales a la concentración de taninos. No obstante, la utilización de taninos en hojas de tréboles puede

funcionar para prevenir el timpanismo y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero por lo rumiantes (Roldan et al., 2022). Asimismo, Marković et al. (2022) afirman que existen diferencias entre los cultivares de trébol, porque las variedades tetraploides tienen un mayor contenido de proteína y más rápidamente degradables que los cultivares diploides.

Si bien los valores de proteína en un pasto o forraje son importantes, es necesaria una sincronía entre las proteínas y los carbohidratos fermentables en rumen, ya que se optimiza la productividad animal (Cohen, 2001; Hall, 2013). Esto permite aumentar la disponibilidad de los nutrientes, la concentración de NH_3 , los niveles totales de ácidos grasos volátiles y la síntesis de proteínas microbianas (Putri et al., 2021).

Hodgson y Brookes (1999) aseguran que estos cambios de la digestibilidad y contenido de proteína son usualmente más leves en las leguminosas que las gramíneas. Las razones son: una degradación más rápida en el rumen (lo que provoca un drenaje ruminal más rápido y una mayor ingesta voluntaria), una utilización más eficiente de la energía metabolizable, y una mayor absorción de proteínas por unidad de energía.

Lv et al. (2020) mencionan que un nivel bajo de energía en la dieta restringe el rendimiento del crecimiento y cambia la microbiota y los fenotipos asociados a la fermentación ruminal de los corderos; así como también aseguran que los niveles bajos de proteína tienen un efecto menor. Tremblay et al. (2023) afirman que agregar tréboles a las mezclas forrajeras es una estrategia valiosa para aumentar la relación energía-proteína del forraje, puesto que los tréboles incorporan carbohidratos fermentables en el rumen.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos permiten concluir que la incorporación de tréboles a la mezcla de raigrás perenne modifica la composición química del forraje para el animal, aumenta la concentración de Pb y disminuye el FDA y FDN en la ración. Los tréboles son más digestibles que las gramíneas, por lo que la incorporación de leguminosas (como trébol blanco o rojo) a la mezcla con raigrás perenne mejora la degradabilidad de la Pb y la MS. Sin embargo, la magnitud de esto estará determinada por el porcentaje de inclusión de las leguminosas en la mezcla.

No se encontraron diferencias entre las mezclas de trébol blanco y trébol rojo, por lo que la asociación de raigrás perenne con cualquiera de las dos leguminosas produce resultados similares. Las mezclas compuestas por 70% de raigrás perenne y 30% de leguminosas serían las más adecuadas para la producción de leche, con una alta degradabilidad de la MS y de la Pb. No obstante, el riesgo de timpanismo en rumiantes es un factor para tener en cuenta cuando se utilizan porcentajes superiores de tréboles en las mezclas con raigrás.

AGRADECIMIENTOS

Se le agradece a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a su Facultad de Ciencias Agropecuarias IASA y a sus docentes, Ing. Diego Vela e Ing. Jennifer Cuenca, por su apoyo al facilitarnos sus instalaciones, el animal fistulado y su colaboración en todo momento durante la investigación. Asimismo, a la Universidad Central del Ecuador, a la Dirección Nacional de Investigación por financiar la investigación y a su Facultad de Ciencias Agrícolas y sus docentes, Ing. Arnulfo Portilla e Ing. Karina Sani, en el Laboratorio de Nutrición Animal.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, A., C. Hidrovo, E. Bazeley-White, J. Cevallos, L. Ferrín y M. Galeas. 2015. Composición química y degradación de cuatro especies de *Pennisetum* sp. Ciencia y Tecnología, 8 (2): 13-27. doi: 10.18779/cyt.v8i2.151.
- Álvarez-Vázquez, P., S. Mendoza-Pedroza, S. Cadena-Villegas, J. Calzada-Marín, E. Ortega-Jiménez, H. Vaquera-Huerta, J. Enríquez-Quiroz y M. Rivas-Jacobo. 2021. Cambios en el rendimiento y composición química del pasto maralfalfa (*Cenchrus* sp) a diferente edad. Revista Fitotecnia Mexicana, 44 (4-A): 729-729. doi: 10.35196/rfm.2021.4-A.729.
- Anrique, R. y J. Vásquez. 2012. Nutrición y alimentación de vacas en pastoreo. Vol. 2. Imprenta America LTDA, Valdivia, Chile.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2006. Protein (crude) in animal feed. AOAC official method 990.03. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg: ASA-SSA Inc. <https://www.scienceopen.com/document?vid=aa8a7d3b-e9b6-4215-a6b6-4556ff2f30cc>. Consultado: 17 enero, 2024.
- Bacha, E. y F. Llera. 2009. Efecto de la suplementación energética sobre la degradabilidad de la fibra en rumiantes en pastoreo. Semiárida, 20: 62-62.
- Barahona, R. y S. Sánchez. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 6 (1): 69-82.
- Berça, A., A. Cardoso, V. Longhini, L. Tedeschi, R. Boddey, R. Reis y A. Ruggieri. 2021. Protein and Carbohydrate Fractions in Warm-Season Pastures: Effects of Nitrogen Management Strategies. Agronomy, 11 (5): 847. doi: 10.3390/agronomy11050847.
- Bianco, L., y A. Cenzano. 2018. Leguminosas nativas: estrategias adaptativas y capacidad para la fijación biológica de nitrógeno. Implicancia ecológica. Idesia (Arica), 36 (4): 71-80. doi: 10.4067/S0718-34292018005002601.
- Broderick, G. A. y K. A. Albrecht. 1997. Ruminant *In Vitro* Degradation of Protein in Tannin-Free and Tannin-Containing Forage Legume Species. Crop Science, 37 (6). doi: 10.2135/cropsci1997.0011183X003700060037x.
- Camacho, M., D. Ramos, N. Ávila, E. Sánchez y S. López. 2020. Las defensas físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. Terra Latinoamericana, 38 (2): 443-453. doi: 10.28940/terra.v38i2.629.
- Cardona, C., J. Naranjo, A. Tarazona, R. Barahona, Herrera, Fredy A. Sánchez y G. Correa. 2015. Valor nutritivo y cinética de fermentación *in vitro* de mezclas forrajeras utilizadas en sistemas silvopastoriles intensivos. Zootecnia Tropical, 33 (4).

- Celis-Alvarez, M., F. López-González, C. Arriaga-Jordán, L. Robles-Jiménez y M. González-Ronquillo. 2021. Feeding Forage Mixtures of Ryegrass (*Lolium* spp.) with Clover (*Trifolium* spp.) Supplemented with Local Feed Diets to Reduce Enteric Methane Emission Efficiency in Small-Scale Dairy Systems: A Simulated Study. *Animals*, 11 (4): 946. doi: 10.3390/ani11040946.
- Cohen, D. C. 2001. Degradability of Crude Protein from Clover Herbage Used in Irrigated Dairy Production Systems in Northern Victoria. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52 (3): 415-425. doi: 10.1071/ar00033.
- Correa, H. 2008. Estimation Of Effective Degradability In Rumen Trough Numerical Methods. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61 (2): 4654-4657.
- De La Roza-Delgado, B., A. Martínez y A. Argamentoría. 2002. Determinación De Materia Seca En Pastos Y Forrajes A Partir De La Temperatura De Secado Para Análisis. *Pastos*, 32 (1): 91-104.
- De Osorio, A. 2006. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. *Revista Colombiana de Bioética*, 1 (1): 163-83.
- Di Rienzo, J., M. Balzarini, L. Gonzalez, F. Casanoves, M. Tablada y C. W. Robledo. 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Espinosa, J., J. Moreno y G. Bernal. 2022. Suelos del Ecuador, clasificación, uso y manejo. Instituto Geográfico Militar, Quito, Ecuador.
- Eugène, M., K. Klumpp y D. Sauvant. 2021. Methane Mitigating Options with Forages Fed to Ruminants. *Grass and Forage Science*, 76 (2): 196-204. doi: 10.1111/gfs.12540.
- Faría, J. y A. Sánchez. 2007. Efecto del aplazamiento de utilización sobre el contenido de nutrientes y digestibilidad de la materia orgánica de la asociación buffel - leucaena. *Interciencia*, 32 (3): 185-187.
- FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal). 2024. Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid. <https://www.fundacionfedna.org/forrajes/unidades-utilizadas>. (Consultado el 29 may. 2024).
- Foster, J. L., W. B. Smith, F. M. Rouquette y L. O. Tedeschi. 2023. Forages and pastures symposium: an update on *in vitro* and *in situ* experimental techniques for approximation of ruminal fiber degradation. *Journal of Animal Science*, 101: skad097. doi: 10.1093/jas/skad097.
- Freer, M. y H. Dove. 2007. Nutrient Requirements of Domesticated Ruminants. 1ª ed. Csiro Publishing. Melbourne, Australia.
- Freudenberger, D. O., C. J. Burns, K. Toyokawa y T. N. Barry. 1994. Digestion and Rumen Metabolism of Red Clover and Perennial Ryegrass/White Clover Forages by Red Deer. *The Journal of Agricultural Science*, 122 (1): 115-120. doi: 10.1017/S0021859600065850.

- García, E. 2005. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/book/83> (Consultado el 19 sep. 2023).
- Hall, M. 2013. Dietary starch source and protein degradability in diets containing sucrose: Effects on ruminal measures and proposed mechanism for degradable protein effects. *Journal of Dairy Science*, 96 (11): 7093-7109. doi: 10.3168/jds.2012-5663.
- Hennessy, D., L. Delaby, A. Van den Pol-van Dasselaar y L. Shalloo. 2020. Increasing Grazing in Dairy Cow Milk Production Systems in Europe. *Sustainability*, 12 (6): 2443. doi: 10.3390/su12062443.
- Hernández, U., E. Lopez, G. Bollati, E. Carloni, A. Reutemann y H. Grunberg. 2020. Estudio comparativo de cambios morfo-anatómicos y de calidad forrajera en la ontogenia de *Megathyrus maximus*. 43° Congreso Argentino de Producción Animal, 25 al 27 de noviembre 2020.
- Hodgson, J. 1990. *Grazing Management. Science into Practice*. Longman Scientific & Technical. p. 203.
- Hodgson, J. y I. Brookes,. 1999. Nutrition of grazing animals. En *New Zealand pasture and crop science*, editado por J. White y J. Hodgson. Melbourne-Australia: Ligare Book Printers. Huertas, S. 2023. La importancia del bienestar animal en los sistemas de producción sostenibles. *Veterinaria (Montevideo)*, 59 (220). doi: 10.29155/vet.59.220.1. p. 117-133.
- INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). 2024. Aplicativos web. <https://www.inamhi.gob.ec/> (Consultado el 28 may. 2024).
- Ishler, V., J. Heinrichs y G. Varga. 1996. From feed to milk: understanding rumen function. Vol. 422. Pennsylvania State University, Pensilvania, Estados Unidos de América.
- León, R., N. Bonifaz y F. Gutiérrez. 2018. Pastos y forrajes del Ecuador: siembra y producción de pasturas. 1ª ed. Editorial Universitaria Abya-Yala, Quito, Ecuador. p. 622.
- Lloveras, J., I. Delgado y C. Chocarro. 2020. La alfalfa. Universitat de Lleida, Lérida, España. p. 368.
- Lv, X., K. Cui, M. Qi, S. Wang, Q. Diao y N. Zhang. 2020. Ruminal Microbiota and Fermentation in Response to Dietary Protein and Energy Levels in Weaned Lambs. *Animals*, 10 (1): 109. doi: 10.3390/ani10010109.
- Marković, J., D. Lazarević, F. Bekčić, M. Prijović, T. Vasic, S. Živković y R. Štrbanović. 2022. Protein and Carbohydrate Profiles of a Diploid and a Tetraploid Red Clover Cultivar. *Agricultural and Food Science*, 31 (2): 104-112. doi: 10.23986/afsci.113478.

- McCarthy, K. M., M. B. Lynch, K. M. Pierce, A. G. Fahey, V. P. Gath, M. McDonald, T. M. Boland, H. Sheridan, M. Markiewicz-Keszycka y F. J. Mulligan. 2023. Rumen fermentation and forage degradability in dairy cows offered perennial ryegrass, perennial ryegrass and white clover, or a multispecies forage. *Livestock Science*, 269: 105185. doi: 10.1016/j.livsci.2023.105185.
- Mieres, J. 2004. Guía para la alimentación de rumiantes. 1ª ed. Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA. Programa Nacional Bovinos para Leche. Montevideo, Uruguay.
- Moore, K. y H. Jung. 2001. Lignin and Fiber Digestion. *Journal of Range Management*, 54 (4): 420-230. doi: 10.2307/4003113.
- Morales, A., J. Leon, E. Cárdenas, G. Afanador y J. Carulla. 2013. Composición química de la leche, digestibilidad *in vitro* de la materia seca y producción en vacas alimentadas con gramíneas solas o asociadas con *Lotus uliginosus*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 60 (1): 32-48.
- Núñez, O. 2017. Los costos de la alimentación en la producción pecuaria. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4 (2): 93-94.
- Ørskov, E. R. y I. McDonald. 1979. The Estimation of Protein Degradability in the Rumen from Incubation Measurements Weighted According to Rate of Passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92 (2): 499-503. doi: 10.1017/S0021859600063048.
- Paciullo, D. 2002. Características anatómicas relacionadas al valor nutritivo de gramíneas forrajeras. *Ciência Rural*, 32: 357-364. doi: 10.1590/S0103-84782002000200029.
- Palladino, A., F. Bargo y A. Wawrzkiwicz. 2006. El rol de la fibra en las dietas de vacas lecheras. *Infortambo*. 202, 82-84.
- Pan, L., K. H. Huang, T. Middlebrook, D. Zhang, W. L. Bryden y X. Li. 2021. Rumen Degradability of Barley, Oats, Sorghum, Triticale, and Wheat *In Situ* and the Effect of Pelleting. *Agriculture*, 11 (7): 647. doi: 10.3390/agriculture11070647.
- Pol, A., T. Becker, A. Botana-Fernandez, T. Hennessy y G. Peratoner. 2018. Social and Economic Impacts of Grass Based Ruminant Production. *Proceedings of the 27th General Meeting of the European Grassland Federation Cork, Ireland. 17-21 June 2018. European Grassland Federation EGF.*
- Putri, E., M. Zain, L. Warly y H. Hermon. 2021. Effects of rumen-degradable-to-undegradable protein ratio in ruminant diet on *in vitro* digestibility, rumen fermentation, and microbial protein synthesis. *Veterinary World*, 14 (3): 640-48. doi: 10.14202/vetworld.2021.640-648.
- Rodríguez, A., E. Riquelme y P. Randel. 1998. Inclusión de leguminosas forrajeras en dietas basadas en gramíneas tropicales. Consumo voluntario y digestibilidad aparente de nutrimentos. *Journal of Agriculture*, 82.

- Roldan, M., G. Cousins, S. Muetzel, W. Zeller, K. Fraser, J. Salminen, A. Blanc, R. Kaur, K. Richardson, D. Maher, Z. Jahufer, D. Woodfield, J. Caradus y C. Voisey. 2022. Condensed Tannins in White Clover (*Trifolium repens*) Foliar Tissues Expressing the Transcription Factor TaMYB14-1 Bind to Forage Protein and Reduce Ammonia and Methane Emissions *in vitro*. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Solomon, J. 2022. Legumes for animal nutrition and dietary energy. En R. Meena y S. Kumar, editores, *Advances in Legumes for Sustainable Intensification*. Academic Press. p. 227-244.
- Soufizadeh, M., R. Pirmohammadi, Y. Alijoo y H. Khalilvandi Behroozyar. 2018. Indigestible neutral detergent fibers: Relationship between forage fragility and neutral detergent fibers digestibility in total mixed ration and some feedstuffs in dairy cattle. *Veterinary Research Forum*, 9 (1): 49-57.
- Stojanović, B., N. Đorđević, A. SiMić, A. Božičković, V. Davidović y A. Ivetić. 2020. The *in Vitro* Protein Degradability of Legume and Sudan Grass Forage Types and Ensiled Mixtures. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 67 (4): 419-425. doi: 10.33988/auvfd.702257.
- Tedeschi, L. y D. Fox. 2020. Ruminant nutrition system. Vol. 1. 3.^a ed. Xanadu Publishing Incorporated, United States of America.
- Tremblay, G., M. Thériault, P. Seguin, X. Godin, A. Claessens, S. Bittman, D. Hunt, G. Bélanger, J. Hakl, A. Bertrand y M. Thivierge. 2023. Legume Addition to Alfalfa-Based Mixtures Improves the Forage Energy to Protein Ratio. *Agronomy Journal*, 115 (4): 1842-1855. doi: 10.1002/agj2.21386.
- Utrilla, V., M. Andrade y R. Gallardo. 2022. Aprovechamiento de pasturas en estado reproductivo y desempeño de corderas en la Patagonia Austral. *Informe Técnico. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. p. 13.
- Vanzant, E. S., R. C. Cochran, y E. C. Titgemeyer. 1998. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science*, 76 (10): 2717-2129. doi: 10.2527/1998.76102717x.
- Wilson, R., M. Bionaz, J. MacAdam, K. Beauchemin, H. Naumann y S. Ates. 2020. Milk production, nitrogen utilization, and methane emissions of dairy cows grazing grass, forb, and legume-based pastures. *Journal of Animal Science*, 98 (7): skaa220. doi: 10.1093/jas/skaa220.