



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Alimentación de la vaca en pastoreo.

Factores que impactan en la eficiencia del uso de los alimentos

Alsiane Simone Capelesso

Tesis de doctorado presentada en la modalidad de cotutela

Programa de Posgrado en Producción Animal

Facultad de Veterinaria, Universidad de la República - Uruguay

Programa de Pós graduação em Zootecnia,

Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria - Brasil

Montevideo – Uruguay

December de 2020



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Alimentación de la vaca en pastoreo.

Factores que impactan en la eficiencia del uso de los alimentos

Tesis de doctorado presentada en la modalidad de COTUTELA, al Programa de Posgrado en Producción Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (UdelaR) - Uruguay, como parte de los requisitos para la obtención del título de **Doctor en Producción Animal** y, ao programa de Pós graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal/Nutrição de Ruminantes, Centro de Ciências Rurais pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Brasil, como requisito para a obtenção do título **Doutor em Zootecnia**.

Director de tesis por la UdelaR:

PhD Cecilia Cajarville

Director de tesis pela UFSM:

PhD Gilberto Vilmar Kozloski

Codirectores:

PhD José Luis Repetto

PhD Alejandro Mendoza

Capelesso, Alsiane Simone
Alimentación de la vaca en pastoreo. Factores que
impactan en la eficiencia del uso de los alimentos /
Alsiane Simone Capelesso.- 2020.
167 p.; 30 cm

Orientador: Gilberto Kozloski (UFSM), Cecilia
Cajarville (UdelaR)
Coorientadores: Jose Luiz Repetto, Alejandro Mendoza
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, RS, 2020

1. Jejum alimentar 2. Ração total misturada 3. Origem
genética animal 4. Status energético 5. Uma ordenha
diária I. , Gilberto Kozloski (UFSM), Cecilia Cajarville
(UdelaR) II. Repetto, Jose Luiz III. Mendoza, Alejandro
IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ALSIANE SIMONE CAPELESSO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Universidad de la República
Programa de Posgrado en Producción Animal


Universidade Federal de Santa Maria
Programa de Pós graduação em Zootecnia,

Los integrantes del tribunal de defensa de tesis abajo aprobaran la tesis doctoral
Alimentación de la vaca en pastoreo. Factores que impactan en la eficiencia del uso de los alimentos

Elaborada por Alsiane Simone Capelesso

Como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de **Doctor en Producción Animal** por la Universidad de la Republica y **Doutor em Zootecnia** pela universidade Federal de Santa Maria.

Integrantes del tribunal:


Francisco Dieguez (UDELAR, Uruguay) (presidente) – Videoconferência


Sergio Calsamiglia (UAB, España) – Videoconferência


Fernando Bargo (UBA, Argentina) – Videoconferência


Pablo Chilibroste (UDELAR, Uruguay) – Videoconferência


Julio Viegas (UFSM, Brasil) – Videoconferência

A minha família,

Aos amigos, que permaneceram ao meu lado de maneira incondicional e

Aos que tanto me ajudaram, sem vocês esta tese não seria possível

DEDICO.

5'AUG CCG NNN GAU AUU GCG AGC GAA CGC CCG AUU NNN CGC TAG 3'

Ângulo de Visão

Lista de abreviaturas y siglas

AGNE	Ácidos Grasos no Esterificados
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
BEN	Balance Energético Negativo
CMS	Consumo de Materia Seca
ESM	Error Estándar de la Media
FDA	Fibra Ácido Detergente
FDN	Fibra Neutro Detergente
LCG 4%	Leche corregida por grasa a 4%
LCS 4%	Leche corregida por sólidos a 4%
MO	Materia Orgánica
MS	Materia Seca
NE _L	Energía Neta de Lactación
NH ₃ -N	Amoníaco
RPM	Ración Parcialmente Mezclada
RTM	Ración Totalmente Mezclada
βHB	β-Hidroxibutirato

Tratamientos

NA	Holstein de origen norteamericano
NZ	Holstein de origen neozelandés
PasFix	Pastoreo fijo
PasMax	Pastoreo máximo
Pas	Pastoreo
C _{5km}	Caminata de 5km/día
Ayu	Ayuno alimentario
UOD	Un ordeño diario
DOD	Dos ordeños diarios

Resumen

Un componente central en la estructuración de un sistema de producción de leche es la estrategia de alimentación a utilizar, y asociado a eso, el origen genético de los animales que mejor se adapte a cada sistema. Adicionalmente, la lechería pastoril plantea desafíos respecto a la cosecha directa de las pasturas, ya que los animales deben caminar largas distancias para obtener el alimento. Además, en estrategias de alimentación que cuentan con un componente de pastura, el enfoque también debe ser dado a la categoría animal, ya que vacas de primera cría podrían presentar mayor sensibilidad a estos sistemas. Por lo tanto, los tres trabajos realizados pretenden caracterizar como los factores impuestos afectan la eficiencia de uso de los alimentos de las vacas en sistemas de producción de leche pastoriles, siendo: (i) vacas de diferente origen genético que son manejadas en diferentes estrategias de alimentación en cuanto a la cosecha de pastura; (ii) vacas que necesitan caminar para obtener la pastura, y (iii) de vacas de primera cría que son sometidas a una reducción de la frecuencia de ordeño durante el inicio de la lactación. De manera general, la eficiencia alimentaria se vio afectada por todos los factores evaluados. Como resultados principales, se observó que el origen genético dentro de la raza Holstein afectó principalmente las variables de producción, y que la estrategia de alimentación afectó principalmente las variables de consumo y digestibilidad de los nutrientes. También que la caminata de 5 km/día, o el ayuno de aproximadamente 100 min al día no afectaron el consumo, pero el comportamiento, la fermentación del rumen y la producción de leche fueron afectados en mayor grado por el ayuno que por la caminata. Paralelamente, vacas ordeñadas una vez al día presentaron igual consumo que vacas ordeñadas dos veces por día, pero durante el período de tratamiento, la producción de leche fue 40% menor en vacas ordeñadas una vez al día. En estos mismos animales, la concentración sérica de β -Hidroxibutirato durante la lactancia temprana estuvo poco relacionada con el balance energético. De manera sintética concluimos que: (i) a mayor nivel de forraje cosechado en forma directa, menor es la eficiencia alimentaria para la producción de leche de las vacas, (ii) el ayuno durante la caminata, más que la caminata *per se*, es el gran responsable de la caída de la respuesta productiva de vacas lecheras, principalmente por afectar el aprovechamiento digestivo de la fracción fibrosa de la dieta, y (iii) las vacas ordeñadas una vez al día tuvieron una disminución aproximada de 50% de la eficiencia del uso de los nutrientes para producción, pero esto resultó en un mejor estatus energético de los animales. Así, en concordancia con la hipótesis general, los factores evaluados en la presente tesis doctoral impactaron en la eficiencia del uso de los nutrientes para la producción de leche de las vacas en sistemas de producción de leche pastoriles.

Palabras Clave: Ayuno alimentario. Caminata. Dieta totalmente mezclada. Estatus energético. Origen genético animal. Un ordeño diario.

Resumo

Um componente central na estruturação de um sistema de produção de leite é a estratégia de alimentação a ser utilizada, e associada a isso, o perfil dos animais quanto à origem genética adaptada a cada sistema. Além disso, a produção de leite com base pastoril apresenta desafios quando nos referimos ao pastoreio direto, pois nessas condições os animais devem caminhar. Ademais, nas estratégias de alimentação que incluem pastoreio, o foco também deve ser dado à categoria de animais, uma vez que as vacas de primeira cria podem apresentar maior sensibilidade a esses sistemas. Portanto, os três trabalhos realizados na presente tese pretendem caracterizar como os fatores impostos afetam a eficiência de uso de alimentos das vacas em um sistema com inclusão de pastoreio, sendo: (i) vacas de diferentes origens genéticas, manejadas em diferentes estratégias de alimentação; (ii) vacas que precisam caminhar para chegar ao pasto e (iii) vacas da primeira cria que são submetidas a uma redução na frequência da ordenha durante o início da lactação. De maneira geral, a eficiência alimentar foi afetada pelos fatores avaliados. Como principais resultados, foi observada que a genética Holandes afetou principalmente as variáveis de produção e as estratégias de alimentação afetaram principalmente as variáveis de consumo e digestibilidade dos nutrientes. Também foi observado que a caminhada de 5 km/dia ou o jejum de aproximadamente 100 min/dia não afetou o consumo, mas o comportamento, a fermentação ruminal e a produção de leite foram mais afetados pelo jejum do que pela caminhada. Paralelamente, as vacas ordenhadas uma vez ao dia tiveram o mesmo consumo em comparação as vacas ordenhadas duas vezes ao dia, mas durante o período de tratamento, a produção de leite foi 40% menor nas vacas ordenhadas uma vez ao dia. Nestes mesmos animais, a concentração sérica de β -hidroxibutirato durante o início da lactação esteve pouco relacionada ao balanço energético. Assim, de maneira geral concluímos que: (i) em maior nível de pastoreio, menor foi a eficiência alimentar para produção de leite, (ii) o jejum alimentar durante o exercício é o principal responsável pela queda da resposta produtiva de vacas leiteiras, por proporcionar menor aproveitamento da fração fibrosa da dieta, e (iii) vacas ordenhadas uma vez ao dia tiveram uma queda de aproximadamente 50% na eficiência de uso dos nutrientes para produção de leite, mas apresentaram melhor status energético. Assim, de acordo com a hipótese geral, os fatores avaliados na presente tese doutoral impactaram sobre a eficiência do uso dos nutrientes para a produção de leite de vacas leiteiras em um sistema de produção de leite a pasto.

Palavras Chave: Jejum alimentar. Ração total misturada. Origem genética animal. Status energético. Uma ordenha diária.

Abstract

A central component in the structure of a milk production system is the feeding strategy to be used and associated with this, the profile of the animals adapted to each system. Also, in a grazing dairy system, the distance to the grasslands is frequently viewed as a problem because the cows need to walk long distances to access the pasture every day. In feeding strategies which include pasture from direct harvest, the focus should also be given to the category of animals, since that primiparous dairy cows may be more sensitive to these systems. Therefore, the three experimental works carried out in this thesis intend to characterize how these three imposed factors affect the efficiency of food use testing: (i) Cows of different genetic origin, managed in different feeding strategies on direct grazing; (ii) cows that walking to access to the pasture, and, (iii) primiparous cows that were subjected to a reduction in milking frequency during early lactation. In general, food efficiency was affected by the factors evaluated. As the main results, it was observed that Holstein genetic mainly affected the production variables, and the feeding strategies mainly affected the nutrient consumption and digestibility variables. It was also observed that walking at 5 km/d or fasting for approximately 100 min/d did not affect intake, but behavior, rumen fermentation, and milk production were more affected by fasting than walking. At the same time, cows milked once a day had the same intake compared to cows milked twice, but during the treatment period, milk production was 40% lower in cows milked once a day. In these same animals, the serum concentration of β -hydroxybutyrate was poorly related to energy balance during early lactation. Thus, we synthetically conclude that: (i) the increasing inclusion of grass directly harvested by cows, decreases the feed efficiency for milk production, (ii) fasting during exercise is the main responsible for the decrease in milk production of dairy cows, as a consequence of lower fibrous digestibility, and (iii) cows milked once a day had a decrease of approximately 50% in nutrient-use efficiency for milk production but presented a better energy status. According to the general hypothesis, the factors evaluated in this doctoral thesis affected nutrient-use efficiency for milk production.

Key Words: Energy status. Fasting. Origin genetic. Once-daily milking. Total Mixed Ration. Walking.

Tabla de contenidos

Lista de abreviaturas y siglas	vii
Resumen.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract	x
Capítulo 1. Introducción.....	13
Capítulo 2. Fundamentos teóricos.....	16
2.1 El uso de pasturas en la dieta de vacas lecheras.....	16
2.2 La respuesta productiva de la suplementación de vacas lecheras en sistemas pastoriles.....	17
2.3 Origen genético Holstein en la respuesta productiva lechera.....	19
2.4 El ejercicio para el traslado a la parcela en la respuesta productiva lechera.....	20
2.5 Reducción de la frecuencia de ordeño en la respuesta productiva	22
2.5.1 Balance energético en lactación temprana	24
2.6 Planteamiento de los problemas abordados en la tesis.....	25
Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos	28
3.1 Hipótesis.....	28
3.2 Objetivos General e específicos	28
Capítulo 4. Estrategia de la investigación	29
Capítulo 5. Experimento I.....	30
5.1 Materiales y métodos	30
5.1.1 Diseño experimental, tratamientos y animales.....	30
5.1.2 Manejo de la alimentación durante el período experimental.....	32
5.1.3 Determinaciones y muestreos.....	33
5.1.4 Análisis laboratoriales	35
5.1.5 Cálculos.....	35
5.1.6 Análisis estadísticos	36
5.2 Resultados	37
Capítulo 6. Experimento II.....	44
6.1 Materiales y métodos	44
6.1.1 Diseño experimental, tratamientos y animales.....	44
6.1.2 Manejo de la alimentación durante el período experimental.....	45
6.1.3 Determinaciones y muestreos.....	46
6.1.4 Análisis laboratoriales	48
6.1.5 Cálculos.....	49
6.1.6 Análisis estadísticos	50

6.2 Resultados	51
Capítulo 7. Experimento III.....	57
7.1 Materiales y métodos.....	57
7.1.1 Diseño Experimental, Tratamientos y Animales.....	57
7.1.2 Manejo de la alimentación durante el período experimental.....	57
7.1.3 Determinaciones y muestreos.....	59
7.1.4 Análisis laboratoriales	60
7.1.5 Cálculos	61
7.1.6 Análisis estadísticos	62
7.2 Resultados	63
Capítulo 8. Discusión general	69
Capítulo 9. Consideraciones finales	77
Capítulo 10. Implicaciones prácticas e investigaciones futuras	78
Referencias bibliográficas	79
Anexos.....	87

Capítulo 1. Introducción

En sistemas lecheros con base pastoril el consumo de nutrientes puede limitar la producción de leche (Kolver y Muller 1998). Así una de las interrogantes que se plantean habitualmente en los sistemas pastoriles es, (1) si resulta conveniente priorizar el uso de la pastura, o si, por el contrario, (2) aún consumiendo una buena parte de la dieta cosechada por las vacas directamente de la parcela, conviene maximizar el ingreso de nutrientes en consonancia con la etapa de lactancia en que se encuentran los animales. En general, estos conceptos se asocian a sistemas de alimentación diferentes, siendo más frecuente el uso del suplemento en la sala de ordeño en el primer caso y el empleo de raciones parcialmente mezcladas (o dietas mixtas) en el segundo. Específicamente cuando se adopta la estrategia de alimentación con uso de suplementos en la sala de ordeño, la asincronía de nutrientes podría afectar negativamente el ambiente ruminal (Bramley et al., 2008) y resultar en menor eficiencia del uso de los alimentos (Cabrita et al., 2006). Paralelamente la oferta de los suplementos mezclados con otros componentes de la dieta permite ofrecer una dieta balanceada a los animales minimizando la selección de los componentes de la dieta (Gill, 1979; Coppock et al., 1981) y aumentando la eficiencia del uso de los nutrientes para la producción de leche. Además, tan importante cuanto el sistema de alimentación es el genotipo de ganado lechero a utilizar, ya que no necesariamente animales con diferente origen genético responderían igual para diferentes estrategias de alimentación (Prendiville et al., 2010). Dentro de la raza Holstein que es la predominante en los sistemas lecheros, son identificadas dos líneas genéticas de mayor importancia: (1) animales de origen genético norte americano, y (2) animales de origen neozelandés. Vacas con gran porcentaje de genes provenientes de ancestros norteamericanos se destacan por presentar elevado potencial productivo (Kolver et al., 2002; Fulkerson et al., 2008). Por otra vía, el ganado de origen de Nueva Zelanda se describe como seleccionado para sistemas pastoriles, con mayor rusticidad, una menor producción de leche que se compensaría con una mayor concentración de sólidos.

Adicionalmente, cuando el sistema productivo es basado en pastoreo directo con suplementación en la sala de ordeño, el ejercicio para llegar hasta la pastura podría afectar la performance productiva de los animales. Debido al gasto energético, las caminadas podrían disminuir la producción de leche (NRC, 2001), resultando en un menor aprovechamiento del uso de la energía consumida para la producción. Adicionalmente durante el tiempo que caminan las vacas están ayunando. En bovinos el período de ayuno puede afectar el comportamiento de ingestión, el consumo (Beauchemin, 2018), los parámetros del rumen (Rabaza et al., 2019), y esto podría tener consecuencias negativas en la producción de leche.

Complementariamente, en sistemas productivos basado en pastoreo directo, independiente de si la estrategia de alimentación cuenta o no con la inclusión de suplementos en la dieta, en el período del postparto inmediato (primeras 3 semanas postparto) las vacas generalmente se encuentran en balance energético negativo (BEN). Vacas lecheras con pronunciado BEN durante lactancia temprana pueden presentar desordenes metabólicos y disminución en la producción. Una herramienta para atenuar el BEN durante el inicio de la lactación es la disminución de la frecuencia de ordeño diario. Durante el inicio de lactación de vacas multíparas, la disminución de la frecuencia de ordeño resulta en una disminución en la producción de leche, pero no del consumo (Rémond et al., 1999; Kay et al., 2013). Por un lado, a pesar de la disminución en la eficiencia alimentaria, con valores entre 0,97 a 1,20 litros/kg CMS (Rémond et al., 1999; Kay et al., 2013), la disminución de la frecuencia de ordeño tendría el potencial de aliviar el BEN característico del período inicial de lactación (Patton et al., 2006; Kay et al., 2013; Grala et al., 2014).

En esta tesis doctoral se describen una serie de experimentos que tienen en común el hecho de que son manejos y estrategias que se aplican en forma más o menos habitual en sistemas pastoriles, y hipotetizamos que pueden tener efectos sobre la digestión y, por lo tanto, pueden afectar la producción y la eficiencia de uso del alimento. Específicamente se pretenden evaluar los siguientes manejos, (i) nivel de forraje cosechado en forma directa por vacas lecheras de distinto origen genético (Experimento I), (ii) ejercicio para el traslado a la parcela de pastura (Experimento II), y, (iii) reducción de la frecuencia de ordeño al inicio de la lactancia (Experimento III).

En el experimento I, se evaluaron dos grupos de animales: Holstein Friesian de origen norteamericano vs. Holstein Friesian de origen neozelandés. Cada grupo se sometió a dos estrategias de alimentación: estrategia pastura máxima, siendo 70% da dieta oriunda de pastoreo directo y 30% de concentrado ofrecido en la sala de ordeño vs. estrategia pastura fija, siendo la alimentación compuesta por 70% de una RPM y 30% da dieta oriunda de pastoreo directo.

En el ensayo II, para evaluar el efecto del ejercicio para el traslado a la pastura y diferenciar el efecto de la caminata del efecto del ayuno se evaluaron tres tratamientos: (i) Caminata: los animales caminaron 5 km/día extra en relación con los demás grupos (2,5 km/turno), posterior al ordeño matutino y previo al ordeño de la tarde.; (ii) Ayuno: ayuno alimentario durante un tiempo equivalente al período de la caminata del tratamiento anterior, y (iii) Pastoreo: sin ayuno y sin caminata.

Finalmente, para el ensayo III se evaluó en vacas Holstein primíparas el efecto de un ordeño diario o dos ordeños diarios durante las primeras ocho semanas de lactación. Después de este período todas las vacas fueron ordeñadas dos veces al día hasta el final de lactación.

De manera sintética concluimos que: (i) en mayor nivel de forraje cosechado en forma directa menor es la eficiencia alimentaria para la producción de leche, (ii) un ayuno alimentario de corta duración afectó negativamente el aprovechamiento de la fracción fibrosa de la dieta, efecto que, sorprendentemente fue parcialmente revertido por la acción de caminar (iii) las vacas ordeñadas una vez al día tuvieron una caída aproximada de 50% de la eficiencia del uso de los nutrientes para producción, resultando en mejor estatus energético de los animales. Así en concordancia con la hipótesis general, en la presente tesis se demostró que ciertos manejos impuestos a las vacas impactan sobre la eficiencia del uso de los alimentos, afectando el resultado productivo.

Esta tesis doctoral además de la presente *introducción* está organizada en nueve apartados. Primeramente, *capítulo 2*, que incluye la revisión de la literatura en que se fundamenta la investigación. En el *capítulo 3* que presenta la hipótesis y los objetivos. El *capítulo 4*, que describe las estrategias de investigación utilizadas. El *capítulo 5, 6 y 7* que describen el conjunto de trabajos experimentales realizados en la tesis doctoral. El *capítulo 8* que presenta una discusión general de los datos obtenidos de los ensayos experimentales propuestos en la tesis y en el *capítulo 9* cierran las consideraciones finales, que son un resumen de lo visto. Además, en el *capítulo 10*, se harán comentarios de las aplicaciones prácticas de los resultados encontrados en la presente tesis doctoral, bien como unas breves reflexiones sobre futuras investigaciones. Para finalizar, al final de la tesis, como anexos están las publicaciones producidas a partir de los ensayos experimentales.

Capítulo 2. Fundamentos teóricos

Este capítulo incluye la revisión de la literatura, de los enfoques, teorías o conceptos pertinentes en que se fundamenta la investigación. El capítulo se basa en la exposición de la utilización de pasturas y suplementos en la dieta de vacas lecheras con base pastoril, con enfoque en el uso de concentrado en la sala de ordeño o mezclado en una RPM y como eso impacta en la eficiencia alimentaria de vacas Holstein de diferente origen genético. Adicionalmente se expondrá situaciones que animales en sistemas pastoriles están sometidos, como las caminatas y la frecuencia de ordeño reducida, y su posible impacto en la eficiencia del uso de los alimentos.

2.1 El uso de pasturas en la dieta de vacas lecheras

En sistemas de producción de leche a base pastoril la producción de leche puede verse limitada principalmente por un menor consumo de materia seca (CMS) y de energía (Kolver y Muller 1998; Bargo et al., 2002a). Adicionalmente, los sistemas con alta inclusión de pastura directamente cosechada en la dieta tienen más dificultades en asegurar un flujo estable de nutrientes a los animales a lo largo del tiempo, debido a las variaciones temporales tanto en cantidad como calidad del forraje (Powell et al., 2010). Además, en sistemas lecheros basados en la cosecha directa de pastura existen costos adicionales de energía para el animal, asociados a la caminata y la cosecha del forraje, que puede reducir la disponibilidad de nutrientes destinados a la producción de leche (NRC, 2001) y estos factores podrían afectar negativamente la eficiencia alimentaria.

Adicionalmente, se menciona la dificultad de alcanzar los altos CMS en pastoreo, debido a que distintos atributos físicos y estructurales de las pasturas pueden afectar el consumo de forraje. A veces, aunque se disponga de una oferta de pastura por animal que atienda al objetivo planteado, si la masa de forraje por hectárea es baja, el consumo individual será limitado por factores como tiempo de pastoreo, tasa y masa de bocado (Bargo et al., 2002a; Chilbroste et al., 2015). Por ejemplo, simulando que se ofrece 20 kg de MS/vaca, medido a la altura del suelo, si la disponibilidad por hectárea varía de 6 a 3 toneladas de MS/hectárea el consumo individual de pastura puede disminuir aproximadamente un 25% (Delagarde et al., 2011). Además de la disponibilidad, el flujo variable de nutrientes en un sistema pastoril, debido a cambios en la calidad del pasto, puede afectar la respuesta animal. Es conocido que a lo largo del tiempo la pastura sufre variaciones en cuanto a la proporción de nutrientes, y la digestibilidad de estos nutrientes. Por ejemplo, suponiendo que se ofrecen 20 kg de MS de pastura/vaca, si la digestibilidad cae de 85 a 70%, el consumo individual de pastura por vaca puede disminuir aproximadamente 2 kg/día (Delagarde et al., 2011). Adicionalmente, cuando animales son manejados exclusivamente en pastoreo, una respuesta animal menor a la esperada

puede ser debida a la asincronía entre los nutrientes. De acuerdo con Cabrita et al. (2006), en las pasturas la celulosa no promueve un efectivo uso del nitrógeno debido a la baja proporción de celulosa que es rápidamente hidrolizada. En estas condiciones la eficiencia de uso del nitrógeno es generalmente baja, con valores menores a 30% (Powell et al., 2010). También es descrito que el tiempo que el animal permanece con acceso al pasto afecta el consumo (Mendoza et al., 2016). Tal factor es válido cuando la disponibilidad de forraje no es limitante, porque en este caso la baja disponibilidad limitará en mayor magnitud el consumo (Delagarde et al., 2011). Adicionalmente, cabe resaltar que la respuesta del consumo de la pastura va a ser dependiente además de factores como tiempo de acceso al pasto y de la habilidad del animal en cosechar el pasto.

En resumen, es importante tener en cuenta la manera como se ofrece la pastura a los animales. Actualmente son 2 las principales formas de como se ofrece la pastura para las vacas: como cosecha directa por parte del animal, o como reservas (ensilados, henolages y henos)¹. Generalmente, cuando se busca optimizar el consumo del pasto como cosecha directa, se ofertan suplementos concentrados en energía o proteína a los animales, y cuando se busca limitar lo que el animal consume como pastoreo directo generalmente se hace uso de suplementos tanto energéticos/proteicos como fibrosos (reservas). Así, asociar el manejo del pastoreo con la inclusión de suplementos puede ser una estrategia de producción interesante a ser evaluada ya que, en un sistema de producción de leche a base pastoril hay que evaluar si es mejor maximizar la cosecha de pastura por los animales o restringir el pastoreo y dar una dieta mejor balanceada incluyendo reservas.

2.2 La respuesta productiva de la suplementación de vacas lecheras en sistemas pastoriles

En los sistemas de alimentación basados en pasturas, el aumento de la producción de sólidos lácteos por vaca es limitado a menos que la dieta se complemente con alimentos más concentrados en energía o proteínas (Dillon et al., 2006). Para cubrir la falta de nutrientes en un sistema a base pastoril, la suplementación de las vacas lecheras generalmente ocurre de dos maneras: (1) como concentrado durante el ordeño o (2) ofrecido mezclado como una RPM.

De manera general, el uso de concentrado como suplemento para vacas en un sistema a base pastoril aumenta la producción de leche (Bargo et al., 2002a; Roche et al., 2006). Pero, cuando se ofrece el concentrado durante el ordeño, la asincronía entre la energía y la fuente de nitrógeno podría disminuir la síntesis de la proteína microbiana (Cabrita et al., 2006) y afectar el uso eficiente del nitrógeno

¹Además, hay manejos donde el productor corta la pastura y ofrece a los animales sea de forma fresca o marchitada, en el campo o en sistemas más confinados de producción, sin embargo, estas técnicas no serán evaluadas en la presente tesis.

(Powell et al., 2010). Por otra parte, en un sistema de producción de leche de base pastoril es más difícil controlar la proteína consumida a partir del pasto, ya que las pasturas generalmente aportan una cantidad más alta de proteína que el requerimiento de las vacas lecheras, y además la proteína de la pastura es generalmente de alta degradabilidad (NRC, 2001). Así, sumado a la asincronía entre el aporte de energía y nitrógeno, y la alta degradabilidad de la proteína en las pasturas, generalmente se observa un aumento de la concentración de amoníaco ($\text{NH}_3\text{-N}$) en el rumen, y de nitrógeno en la orina y en la leche (Beltran et al., 2019), resultando en menor eficiencia del uso del nitrógeno (Powell et al., 2010). Además, el uso de concentrados en la sala de ordeño puede resultar en una disminución a corto plazo del pH ruminal, y esto podría verse incrementado con pasturas de alta calidad (Bramley et al., 2008). El problema es que, cuando el pH del rumen baja a valores menores a 6, generalmente se inhibe el crecimiento y la actividad de las bacterias celulíticas (Russell and Wilson, 1996), lo que afecta la digestibilidad de la fibra, pudiendo afectar negativamente el CMS y la producción de leche (Doyle et al., 2005). Paralelamente, el uso del concentrado también puede conducir a efectos de sustitución, afectando el consumo de la pastura (McCarthy et al., 2007; Sheahan et al., 2011). Generalmente, a mayores cantidades de suplemento suministrado mayor será la disminución del consumo de pastura (Pulido y Leaver, 2001; Sheahan et al., 2011). Cabe resaltar que la disminución en el consumo no será dependiente únicamente de la cantidad de concentrado, pero también de la disponibilidad y calidad de la pastura (Delagarde et al., 2011), ya que, a mayor disponibilidad de pastura de mayor calidad, mayor será la tasa de sustitución (Bargo et al., 2002a).

Por otra vía, en un sistema de alimentación basado en pastura que incluye RPM en la dieta, es posible disminuir la selección de ingredientes de la dieta por parte de los animales, controlar mejor la relación nitrógeno y energía en la dieta (Gill, 1979; Coppock et al., 1981), aumentar el CMS y la producción de leche, además de aumentar la eficiencia del uso de los nutrientes para producción (Vibart et al., 2008; Fajardo et al., 2015; Mendoza et al., 2016; Pastorini et al., 2019). Adicionalmente, una RPM bien formulada podría resultar en una fermentación ruminal más estable y con menos variación en el pH del ambiente ruminal (Audist et al., 2013). Por esta razón, se ha sugerido que ofrecer una RPM a las vacas en pastoreo puede conducir a mejores respuestas de producción de leche en comparación con el suministro de los mismos alimentos, pero de forma separada (concentrados en la sala de ordeño y reservas fuera de la misma) (Bargo et al., 2002b).

Adicionalmente, de manera general es descrito que, a menor proporción de RPM en la dieta, mayor es el consumo del pasto, pero eso resulta en un menor CMS total en comparación a los animales que reciben exclusivamente una ración totalmente mezclada (RTM) (Bargo et al., 2002b). También, cuando las vacas son alimentadas con una RTM generalmente producen mayores rendimientos de leche que la combinación RTM y pastura. Por ejemplo, Vibart et al. (2008) describe que vacas alimentadas solo con RTM presentarían 5% más producción de leche corregida por grasa al 4% en

comparación a los animales que recibían aproximadamente un 30% de pastura en la dieta. Además, Bargo et al. (2002b), describen un aumento aproximado de 13% en leche corregida por grasa a 3,5% para animales que reciben el suplemento como RPM, en contraste a los animales que reciben concentrado en la sala de ordeño. Los mismos autores describen el aumento del CMS como el principal responsable. Paralelamente, Pastorini et al. (2019), Mendoza et al. (2016) y Fajardo et al. (2015) reportan que animales que reciben la dieta como una RTM presentan mayores CMS y mayor producción en comparación con animales que además de RPM acceden al pastoreo directo durante un turno de pastoreo (8 horas). Sin embargo, una dieta donde los animales reciben RPM y pastoreo (aproximadamente 30% del CMS) no disminuyó la eficiencia del uso del nitrógeno, o el CMS total cuando comparado una dieta 100% RTM (Pastorini et al., 2019; Mendoza et al., 2016).

2.3 Origen genético Holstein en la respuesta productiva lechera

Adicionalmente, tan importante cuanto el sistema de alimentación empleado en la producción lechera es el perfil de ganado a utilizar. En función de eso, son descritas diferencias entre animales de distintas razas lecheras (Spaans et al., 2018), pero incluso son observadas diferencias dentro de la misma raza. Dentro de la raza Holstein, por ejemplo, el ganado norte americano es principalmente utilizado en los sistemas lecheros estabulados, ya que este origen genético se caracteriza por tener un alto potencial para la producción de leche (Kolver et al., 2002; Fulkerson et al., 2008). Por otra vía, el ganado de origen neozelandés presenta mayor concentración de sólidos en la leche, pero menor habilidad para lograr altas producciones de leche (Fulkerson et al., 2008). A grandes rasgos, la diferencia cuanto al perfil de producción de cada origen genético es atribuido al proceso de selección desarrollado en cada uno de los sistemas de producción donde se origina cada grupo.

Las vacas norte americanas fueron seleccionadas por el aumento de la producción de leche en un entorno predominantemente confinado con el uso de RTM (Rauw et al., 1998; Kolver et al., 2002; Fulkerson et al., 2008). Sin embargo, los animales que fueron seleccionados para mayor mérito genético para producción de leche, cuando se manejan con un plan de alimentación restringido, ven su productividad reducida en mayor grado en comparación con las vacas de menor mérito genético (Horan et al., 2006). Por ejemplo, en vacas norte americanas cuando están en un sistema de alimentación de pastoreo, la producción de leche disminuye en mayor grado en contraste con las vacas lecheras de origen neozelandés (Kolver et al., 2002). Así, posiblemente las vacas lecheras que han sido seleccionadas para aumentar la producción de leche en un sistema predominantemente confinado no sean las más adecuadas para un sistema de producción en pastoreo directo (Dillon et al., 2006).

Adicionalmente, las vacas de origen neozelandés fueron seleccionados por una mayor concentración de sólidos, mayor fertilidad y capacidad de supervivencia para un sistema predominantemente a base de pasto (Harris y Kolver, 2001; Kolver et al., 2002; Fulkerson et al., 2008; Coleman et al., 2010). Eso es importante ya que, en un sistema de alimentación base pastoril, la producción de leche además de estar limitado por características del forraje, y por factores ambientales y de manejo (Dillon, 2006), estará influenciada por la habilidad de pastoreo de las vacas (Stakelum y Dillon, 2003). También es descrito que las vacas neozelandesas son más eficientes, pero generalmente los datos descritos son expresados como relación entre CMS y peso metabólico o como consumo residual de alimento, y no como relación entre producción y consumo (Coleman et al., 2010).

También como es descrito previamente, la inclusión de concentrados en la dieta afecta el consumo de pastura debido a un efecto de sustitución. Pero la tasa de sustitución a un mismo nivel de concentrado puede ser diferente dependiendo del origen genético de la vaca. Sheahan et al. (2011) describen que, durante el período de lactación media, vacas norte-americanas tuvieron una menor tasa de sustitución en contraste con vacas neozelandesas. Los mismos autores describe que la menor tasa de sustitución en vacas de origen genético norte-americano podría ser debido a factores como un peor balance energético y mayor producción. Similarmente, Kennedy et al. (2003) describen que vacas de mayor mérito genético presentaran mejor respuesta productiva ante un aumento del uso de concentrado en la dieta. Así, la existencia de interacción entre el origen genético y el sistema de alimentación es muy relevante, ya que la mejor genética para un sistema no es necesariamente la mejor para otro. Además, esta interacción entre origen genético y estrategia de alimentación para la producción y el CMS indican que se requiere un mayor conocimiento del genotipo y del entorno de alimentación para predecir el rendimiento de los animales (Horan et al., 2005).

Finalmente, en la mayoría de los estudios revisados las estrategias de alimentación evaluadas implicaron cambios en los niveles de suplementación, resultando en diferentes cantidades de nutrientes ofrecidos. Pero no es clara la información que se refiere a la respuesta productiva de animales de diferente origen genético cuando se manejan con estrategias de alimentación que, aunque no difieran en la cantidad total de materia seca, sí difieren en la proporción de pasto cosechado en la dieta.

2.4 El ejercicio para el traslado a la parcela en la respuesta productiva lechera

En los sistemas de producción de leche base pastoril, la distancia de las pasturas es visto como un problema, ya que las vacas necesitan caminar para acceder al pasto. Las caminatas constituyen un proceso costoso de energía, que podría disminuir la producción de las vacas lecheras. De acuerdo

con el NRC (2001), la energía requerida para caminar es 0,00045 Mcal de NE_L/kg de peso vivo por cada kilómetro horizontal caminado. Así, por ejemplo, suponiendo que las vacas ingresen a la pastura después de ambos ordeños, si la parcela está a 500 metros de la sala de ordeño, estos animales disminuirían aproximadamente de 0,5 a 0,8 kg de leche por día solo debido al gasto energético ocasionado por la caminata, lo que repercutiría en menor eficiencia del uso de la energía consumida en la dieta para la producción de leche. Sin embargo, en trabajos anteriores con vacas lecheras, son descritos disminuciones de 0,2 a 1,4 litros de leche por km caminado (Thomson y Barnes, 1993; Coulon et al., 1998; Spörndly y Wredle, 2004). Como describen los autores, una distancia más larga de caminata no siempre tiene una mayor disminución en la producción de leche, y el factor como la elevación del terreno, la asignación de pasto y la producción de leche previa pueden estar relacionadas. Paralelamente, estudios previos realizados con ganado lechero mostraron que las caminatas, además de disminuir la producción, pueden alterar la composición y la calidad de la leche. Son descritos aumentos del porcentaje de proteína en la leche (Coulon et al., 1998) y aumento de la concentración de células somáticas (Thomson y Barnes, 1993; Coulon et al., 1998). El aumento de la concentración de proteína podría ser debido a un efecto de concentración ya que generalmente la producción de proteína disminuye en vacas que caminan (Coulon et al., 1998). Los mismos autores describen también que el aumento de la concentración de las células somáticas en vacas que se ejercitan podría deberse principalmente por una inflamación traumática no infecciosa inducida por la caminata.

Es descrito, además, que las caminatas para las vacas lecheras podrían disminuir el CMS (Thomson y Barnes, 1993; Coulon et al., 1998; Spörndly y Wredle, 2004). Coulon et al. (1998) evaluando vacas cruza Jersey × Friesian y razas nativas de Francia encontraron que una caminata de aproximadamente 10 km/día disminuyó cerca de 12% el CMS del componente fibroso de la dieta. Similarmente, Spörndly y Wredle (2004) sospechan que animales que caminaron 800 m más que el grupo control, ingirieron menos pastura, ya que los otros componentes de la dieta no variaron y se observó una menor producción para los animales que caminaban. Adicionalmente, Thomson y Barnes (1993) no encontraron diferencias en la desaparición de pastura de vacas que caminaban, pero describen que la falta de diferencia podría ser debido a alta variación del método de determinación de la masa de forraje (± 250 kg de MS/hectárea).

Además del gasto energético y los efectos descritos anteriormente, el ejercicio en vacas lecheras tiene efectos sobre la fisiología (Davidson y Beede, 2003) y posiblemente sobre la función digestiva. Estudios previos realizados con vacas lecheras mostraron que el ejercicio aumenta la ingesta de agua (Benedetti et al., 1990). El aumento en la ingesta de agua se ha asociado con un aumento en el tránsito de la fase líquida del rumen. El aumento de pasaje de la fracción líquida de la dieta podría tener un efecto negativo en los parámetros ruminales, disminuyendo la concentración de los ácidos grasos

volátiles (AGV) y aumentando el pH ruminal (Fraley et al., 2015). Adicionalmente, es descrito que en caballos el ejercicio aumenta el tránsito intestinal de la fase sólida de la dieta, limita la digestión enzimática y la fermentación microbiana, resultando en una disminución de la digestibilidad de la dieta (Van Weyenberg et al., 2006). Sin embargo, a pesar de que hay evidencias de que el ejercicio podría afectar el proceso digestivo en las vacas lecheras, no se han encontrado estudios que evalúen el impacto de este sobre la fermentación ruminal y la digestión en vacas lecheras que caminan para acceder al pasto.

Además, durante el ejercicio de la caminata, las vacas no comen. Un período de ayuno corto en bovinos puede afectar el comportamiento de ingestión, la ingesta de alimento (Beauchemin, 2018), los parámetros del rumen (Rabaza et al., 2019), y esto podría tener consecuencias en la digestibilidad de la dieta (Gregorini et al., 2008). Por ejemplo, cuanto mayor es el tiempo de ayuno al que los animales están sometidos, más intenso es el pastoreo post ayuno, resultando en la ingestión de partículas de mayor tamaño. La presencia de partículas de mayor tamaño en el rumen puede alterar el tiempo de rumia y la fermentación ruminal, que puede afectar el consumo y la digestibilidad de la dieta (Soca et al., 2014; Gregorini et al., 2008; Gregorini et al., 2012; Félix et al., 2017). Una dieta con menor digestibilidad podría resultar en una menor producción de leche, y una menor eficiencia del uso de los nutrientes para la producción de leche.

En resumen, a pesar de las evidencias del potencial impacto negativo del ejercicio en el rendimiento productivo de las vacas lecheras, no se sabe cuál es la contribución del ejercicio *per se*, y cuál es del efecto del ayuno durante el período de la caminata.

2.5 Reducción de la frecuencia de ordeño en la respuesta productiva

La reducción de la frecuencia de ordeño de vacas lecheras es una estrategia utilizada en establecimientos lecheros para disminuir la demanda laboral en la sala de ordeño, reducir el ejercicio asociado a largas caminatas desde y hasta la sala de ordeño, y prevenir el estrés por calor en condiciones de clima cálido (Stelwagen et al., 2013). Sin embargo, un ordeño diario resulta en una disminución inmediata en la producción de leche, y este efecto puede persistir más allá del período en que la frecuencia de ordeño es reducida (Kay et al., 2013). Charton et al. (2016) describieron que un intervalo de 24 horas entre ordeños resulta en una disminución aproximada del 22% en la producción de leche, pero esta reducción puede variar del 10 al 33%. Adicionalmente, reducciones de 14, 21 y 25% en la producción de leche fueron encontradas cuando vacas multíparas fueron ordeñadas una vez al día durante las primeras 3, 6 y 4 semanas de lactación, respectivamente (Kay et al., 2013; Phyn et al., 2014; McNamara et al., 2008).

La reducción de la producción de leche con un ordeño diario es dependiente de varios factores, como el estadio de lactación, tiempo de reducción de la frecuencia de ordeño, y producción del animal. Es descrito que en lactación temprana las vacas almacenan una mayor proporción de leche en el compartimento alveolar de la glándula mamaria (Dewhurst and Knight, 1993; Davis et al., 1998; Caja et al., 2004; Charton et al., 2016). Cuando la leche es almacenada en mayor proporción en el alvéolo de la glándula mamaria, la disminución en la producción debido a la reducción de la frecuencia de ordeño podría ser mayor. Otra característica relacionada con la disminución en la producción y composición de leche con el manejo de un ordeño diario es la capacidad funcional de la glándula mamaria. Grala et al. (2011) describen que, en manejo de reducción de la frecuencia de ordeño, hay un aumento en la expresión de genes celulares apoptóticos y una reducción en la expresión de genes relacionados con la síntesis de los componentes de la leche, que promovería una disminución tanto en el número de células mamarias como en su actividad secretora. Así, un ordeño diario, además de afectar la producción, también podría alterar la composición y la calidad de la leche. En general, cuando se maneja un ordeño diario, la leche tiene mayores concentraciones de grasa y proteína, mientras que la concentración de lactosa disminuye (Stelwagen et al. 2013). Parte de los cambios en la mayor concentración de los componentes son debidos a un efecto de concentración por la menor producción de leche (Dutreuil et al., 2016). Sin embargo, según lo descrito por Clark et al. (2006), a pesar del aumento en el porcentaje de ciertos componentes, la menor producción de leche resulta en un menor rendimiento de los sólidos producidos en la leche, en comparación con animales en un régimen de dos ordeños diarios. Adicionalmente, es descrito que en régimen de un ordeño diario, debido a la mayor distensión alveolar, la integridad de la unión entre las células del epitelio mamario puede ser parcialmente rota, teniendo como resultado un aumentando en el intercambio de componentes entre la leche y los fluidos intersticiales (Stelwagen et al., 1994; Lacy-Hulbert et al., 1999; Stelwagen, 2001; Delamaire y Guinard-Flament, 2006), lo que promueve un aumento de la conductividad eléctrica de la leche (Milner et al., 1996; Kaşıkci et al., 2012).

Por otra parte, estudios previos realizados con vacas multíparas Holstein mostraron que ordeñar una vez al día reduce la producción de leche, pero no afecta el CMS (Rémond et al., 1999; Kay et al., 2013), teniendo entonces el potencial de atenuar el BEN en lactancia temprana (Patton et al., 2006; Kay et al., 2013; Grala et al., 2014). El potencial de mejora en el balance energético se da básicamente por una reducción de la proporción de energía consumida que es secretada vía leche. Paralelamente, el CMS de las vacas lecheras primíparas no alcanza su punto máximo tan temprano en la lactancia en comparación con vacas multíparas (NRC, 2001). Por lo tanto, la respuesta de consumo de vacas primíparas frente al manejo de reducir la frecuencia de ordeño en lactancia temprana podría ser diferente de las vacas multíparas y consecuentemente el balance energético podría ser diferente de lo descrito.

Sin embargo, a pesar de la posible mejora del estatus energético de vacas primíparas, el efecto inmediato y en toda la lactancia de disminuir la frecuencia de ordeño durante el inicio de lactación no ha sido evaluada en vacas Holstein primíparas manejadas en sistemas pastoriles.

2.5.1 Balance energético en lactación temprana

En el postparto inmediato y durante el período inicial de lactación las vacas tienen un aumento de los requerimientos para producción, pero simultáneamente las vacas presentan una limitada capacidad de CMS (NRC, 2001). El alto requerimiento y la baja capacidad de consumo de alimento en el período inicial de lactación resulta a un cuadro de BEN. Vacas en BEN presentan aumentos de las concentraciones de AGNE. Los AGNE son metabolitos del proceso catabólico de la lipólisis, que consiste en la separación de triglicéridos y la escisión de los enlaces éster (Nelson y Cox 2011).

En los bovinos, los AGNE pueden metabolizarse por tres vías principales, (1) pueden esterificarse en forma de triglicéridos en el citosol de la célula hepática y ser exportados por el hígado en forma de lipoproteínas de muy baja densidad, (2) se oxidan en el hígado en la β -oxidación y el acetilCoA resultante a través del ciclo de Krebs, o (3) cuando exceden la capacidad oxidativa por el ciclo de Krebs, la oxidación se desvía hacia la formación de cuerpos cetónicos. También puede ocurrir la acumulación de grasa en el hepatocito en forma de triglicéridos, lo que refleja el desequilibrio entre el flujo de AGNE, la oxidación de los ácidos grasos, la lipogénesis y la exportación de ácidos grasos (Beever, 2006).

Siguiendo con más detalle la ruta catabólica, los AGNE en el hígado pasan al interior de las mitocondrias de las células. A nivel mitocondrial, la β -oxidación genera acetil-CoA y reductores equivalentes de NADH/FADH₂². En este contexto, el acetil-CoA se oxida en el ciclo de Krebs, y los equivalentes reductores formados son oxidados a nivel de la cadena de transporte de electrones, generando al final del proceso adenosina trifosfato. Sin embargo, el hígado contiene una cantidad limitada de coenzima-A y cuando la mayor parte está atrapada en acetil-CoA, la β -oxidación se enlentece. Así la formación de cuerpos cetónicos, (acetoacetato, β HB y cetona) que ocurren a nivel hepático, son el resultado de la incapacidad del ciclo de Krebs en metabolizar completamente acetil-CoA (Hegardt, 1999) y de una forma de drenar cadenas de carbonos.

En vacas lecheras las concentraciones séricas de AGNE y β HB son usadas como indicativas de movilización de grasa y cetosis, respectivamente (Duffield et al., 2009; Ospina et al., 2010), y además indirectamente como indicativo de BEN (Schröder Y Staufenbiel, 2006). Sin embargo, tres razones

²Nicotinamina Adenosina Dinucleótido (NAD) y Flavina Adenosina Dinucleótido (FAD). Ambos son agentes oxidantes que participan de la respiración celular recibiendo hidrogeniones.

sugieren que β HB no es un indicador preciso del estado cetogénico de las vacas en BEN; (1) A pesar de que el β HB es el cuerpo cetónico predominante en el suero de las vacas, la relación β HB y cuerpos cetónicos totales disminuye cuando la concentración total de cuerpos cetónicos aumenta (Overton et al., 2017), (2) la concentración sérica de β HB en rumiantes también es un producto del metabolismo del butirato en el epitelio ruminal, y su concentración en sangre también aumenta al infundir butirato en el rumen (Krehbiel et al., 1992), y, (3) el aumento de las concentraciones de β HB en el suero de las vacas lecheras también puede ser el resultado de un mayor CMS (Bermingham et al., 2008) o por una mayor ingestión de alimentos ricos en almidón (Duske et al., 2009). Adicionalmente, es descrito que la tasa y la cantidad de grasa movilizada dependen de factores como la concentración de energía en la dieta, la lipólisis y la lipogénesis en el adipocito, la condición corporal en el momento del parto, y la producción de leche (Nelson & Cox, 2011; Komaragiri et al., 1998; Gallo et al., 1996; Golazo et al.; 2009; Horan et al., 2005). De esta manera, hipotetizamos que el β HB no sería un buen indicativo de BEN de vacas lecheras durante la lactancia temprana.

2.6 Planteamiento de los problemas abordados en la tesis

De acuerdo con la encuesta INALE (2014) en la lechería uruguaya hay una preponderancia del ganado de la raza Holstein, siendo dada principalmente por animales de origen genético norte americano (con más del 80% del rebaño), y en segundo lugar de animales origen neozelandés (6%). Estos dos grupos de vacas presentan grandes diferencias en cuanto al proceso de selección al que fueron expuestas. Las vacas norte-americanas fueron seleccionadas para alta producción de leche en sistemas de alimentación exclusivamente a base de RTM, mientras que las neozelandesas fueron seleccionadas por porcentaje de sólidos en la leche y para adaptabilidad a los sistemas pastoriles. Paralelamente, en los últimos 20 años en Uruguay la producción de leche por animal fue incrementada a costa del aumento del uso de concentrado en las dietas (INALE, 2014). Más recientemente, Fariña y Chilbroste (2019) describieron que entre los años 2013 a 2017, los tambos que más crecieron en Uruguay usaron 33% más pastura como cosecha directa en la dieta, pero aumentaron un 40% el uso del concentrado en las dietas de las vacas. De acuerdo con los mismos autores, todo lo mencionado conllevó en una mayor carga animal/hectárea y consecuentemente en una mayor producción de leche/hectárea. Por lo tanto, en sistemas de producción de leche a base pastoril hay que evaluar si es mejor maximizar la cosecha de pastura por los animales o restringir el pastoreo y dar una dieta más balanceada incluyendo reservas. Adicionalmente hay que evaluar como responden animales de distinto origen genético a las diferentes estrategias de alimentación, ya que el mejor origen genético para un sistema no es necesariamente es el mejor para otro.

Adicionalmente, en los últimos años, el área promedio de los tambos de Uruguay es de 275 hectárea, y según datos de FUCREA³ la superficie útil promedio del cuartil superior de los tambos (ordenados por ingreso de capital) es de cerca de 590 hectárea. En relación con las variables responsables por el mayor ingreso de capital en esos tambos está el mayor uso de pasturas, siendo que el consumo de forraje en pastoreo de los tambos del cuartil superior es un 60% más que los del cuartil inferior. Sin embargo, estos mismos sistemas pastoriles incorporan desafíos al sistema de producción, ya que la vaca debe caminar hasta la parcela y eso podría ir en detrimento de la producción. Pero en realidad no se sabe si los efectos negativos observados en la producción son por aspectos relacionados a la caminata, o al ayuno que estos animales están sometidos durante las caminatas, o a ambos factores.

Para los tambos del cuartil superior previamente descritos, simulando que la sala de ordeño estuviera en el centro del campo, las vacas para acceder a las parcelas más lejanas deberían caminar aproximadamente 2,5 km para moverse de la sala de ordeño hasta la pastura. Caso los animales estuviesen en doble turno de pastoreo deberían caminar 10 km/día. Sin embargo, de manera práctica en los tambos de Uruguay, el equipo involucrado en la tesis observó que, en condiciones en que la vaca debe caminar largas distancias para ascender al pasto, este manejo (por ejemplo, la caminata hacia una pastura muy alejada) es impuesto entre el período de ordeño de la mañana y de la tarde. Entre el ordeño de la tarde y de la mañana el productor opta por tener los animales en una parcela más cercana al tambo. Ese manejo se hace para facilitar el ordeño en la mañana, ya que generalmente la persona que arrea las vacas es la misma que realiza el ordeño.

Adicionalmente, se observa diferencias en cuanto a la producción y el consumo entre vacas multíparas y primíparas. Diferente de las vacas multíparas, las vacas primíparas no alcanzan su punto máximo de consumo tan temprano en la lactancia (NRC, 2001). Así, las vacas de primera cría pueden verse afectadas por el bajo consumo de nutrientes en sistemas de producción de leche que cuentan con pastoreo directo. Frente a eso, el manejo de la disminución de la frecuencia de ordeño durante en inicio de lactación podría ser una herramienta para ser adoptada, por tener el potencial de aliviar el BEN, ya que el CMS podría mantenerse a niveles normales, según lo revisado anteriormente. Sin embargo, no se conoce los impactos directos y residuales de la reducción de la frecuencia de ordeño en la producción de vacas primíparas en estos sistemas. Además, si vacas que son ordeñadas una vez al día durante el inicio de la lactación presentan un mejor estatus energético, y posiblemente las concentraciones séricas de β HB podrían ser menores.

Como fue descrito, la tesis aborda diferentes estrategias de producción de leche y su impacto en la productividad animal. Todos los manejos evaluados en la tesis parten de problemas actuales de la cadena productiva de leche uruguaya. Estas informaciones serán de gran importancia en el medio

³Federación Uruguaya de grupos CREA

productivo lechero, ya que a partir de los resultados se podrá cuantificar el impacto sobre la producción y la eficiencia de uso de los nutrientes para la producción de leche de diferentes estrategias de alimentación con vacas de origen genético diferente, del efecto del ejercicio previo al pastoreo, o de la aplicación de un ordeño diario en vacas primíparas durante un período estratégico en lactancia temprana y su efecto residual en el resto de la lactancia.

Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

En sistemas de producción de leche a base pastoril, factores como la estrategia de combinación de alimentos, el origen genético de los animales, el ejercicio y la frecuencia de ordeño, que afectarían la eficiencia de uso de los alimentos, por afectar la producción de leche debido principalmente al impacto sobre factores digestivos.

3.2 Objetivos General e específicos

Estudiar el impacto sobre la utilización de los nutrientes y la eficiencia de utilización de los alimentos de algunas estrategias y manejos sobre las vacas en producción. Específicamente se pretende evaluar:

- I. El impacto de dos estrategias de alimentación que incluyen distinta proporción de pastura, pero con ingreso similar de nutrientes, sobre vacas de dos orígenes genéticos (Experimento I).
- II. El impacto de la caminata vinculada al traslado hasta la parcela de pastoreo (Experimento II).
- III. El impacto de la reducción del balance negativo al inicio de la lactancia en vaquillonas a través de reducir la frecuencia de ordeño (Experimento III).

Capítulo 4. Estrategia de la investigación

Hay numerosos factores, vinculados con la alimentación y el manejo, que podrían impactar sobre la eficiencia alimentaria de las vacas. Por ejemplo, la elección de los ingredientes de las dietas, el uso de aditivos, la secuencia en el uso de alimentos, su fraccionamiento, el manejo entre el final de la gestación y el comienzo de la lactancia (desde todos sus aspectos), el manejo diario de los animales, la raza y incluso el origen genético empleado en la producción, son factores que tienen potencial impacto sobre el consumo, la digestión y el producto generado, y, por lo tanto, afectan la eficiencia de uso de los alimentos. Siguiendo interrogantes que se plantean habitualmente en los sistemas de producción, y considerando la información disponible, en esta tesis⁴ se incluyen tres experimentos independientes, cada uno de los cuales aborda respectivamente uno de los objetivos mencionados:

Experimento I: corresponde con el objetivo I, que fue realizado en la estación experimental del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, (INIA) Uruguay. Contó con financiación del proyecto de investigación fondo María Viñas (FMV_1_2017_1_136417). De este ensayo surge la publicación Anexo I, que será enviada a la revista *Journal of Dairy Science*⁵. A la fecha de la entrega de la tesis, el manuscrito se encuentra en proceso de revisión por parte de los autores.

Experimento II⁶: corresponde con el objetivo II, que fue realizado en el IPAV de Facultad de Veterinaria, localizado en Libertad, San José, Uruguay. El proyecto fue financiado por el Programa Proyectos de Investigación Comisión de Investigación y Desarrollo Científico de Facultad de Veterinaria – UdelaR (CIDEC 2017). Del ensayo, surge la publicación Anexo II será enviada a la revista *Journal of Dairy Science*. A la fecha de entrega de la tesis el manuscrito se encuentra en corrección idiomática final.

Experimento III: corresponde con el objetivo III, fue realizado en la estación experimental de INIA, Uruguay. El proyecto tuvo financiación de la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), programa de proyectos conjuntos de Investigaçãõ no Mercosul (Bolsa Capes/Mercosul 2014/2015, Brasil). Del ensayo, surgen las publicaciones Anexo III, publicado en la revista *Journal of Dairy Science*, y Anexo IV que fue enviado a publicación.

⁴La tesis contó con apoyo de la Comisión Académica de Posgrado de la UdelaR (Beca CAP 2017/2019).

⁵Factor de impacto: 3,08.

⁶Para el ensayo las empresas Torreveja y Bitay disponibilizaron al proyecto el premix vitamínico mineral y el antiespumante, respectivamente.

Capítulo 5. Experimento I

El objetivo de este estudio fue determinar a corto plazo el desempeño productivo de vacas lecheras Holstein de dos orígenes genéticos, manejadas en dos estrategias de alimentación (con distinto porcentaje de pastura bajo pastoreo), sin cambiar la cantidad total de materia seca ofrecida.

5.1 Materiales y métodos

5.1.1 Diseño experimental, tratamientos y animales

El experimento se realizó en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en Colonia, Uruguay y cumplió con las regulaciones del Comité de Bioética del Instituto (protocolo: INIA 2017.2). Este experimento se realizó en la primavera de 2018, durante 15 días consecutivos, siendo los primeros 5 días de adaptación al manejo y los otros días para mediciones. Durante el experimento, las características climáticas en promedio fueron: temperatura media 16,1°C (con 21,4°C de máxima y 10,8°C de mínima), 11 mm de acumulación de lluvia, y 12 horas de iluminación natural (0600 a 1800 horas).

Este ensayo fue parte de un estudio mayor de sistemas que evaluó dos estrategias de alimentación y dos orígenes genético de vacas Holstein durante 3 años. Las estrategias de alimentación evaluadas fueron: (i) Pastoreo máximo (**PasMax**): donde las vacas consumían pastura durante los dos turnos de comida (aproximadamente 70% del CMS total) y consumían concentrado durante el período de ordeño (aproximadamente 30% del CMS total); y (ii) Pastoreo fijo (**PasFix**): donde las vacas consumían pastura después del ordeño de la tarde hasta antes del ordeño de la mañana (aproximadamente 30% del CMS total) y consumían una RPM después del ordeño de la mañana hasta el ordeño de la tarde (aproximadamente 70% del CMS total). Dentro de cada estrategia de alimentación, se evaluaron dos orígenes genéticos de animales Holstein: (i) Holstein-Friesian de origen norteamericano (**NA**): donde las vacas tenían más del 75% de ascendencia genética de América del Norte, y (ii) Holstein-Friesian de origen neozelandés (**NZ**): compuesto por vacas con más del 75% de ascendencia genética de Nueva Zelanda. Así, se evaluaron cuatro tratamientos: (i) **PasFix NA** = pastoreo fijo con vacas de origen norteamericana ($n = 30$), (ii) **PasFix NZ** = pastoreo fijo con vacas de origen neozelandesa ($n = 30$), (iii) **PasMax NA** = Pastoreo máximo con vacas de origen norteamericana ($n = 30$), y (iv) **PasMax NZ** = Pastoreo máximo con vacas de origen neozelandesa ($n = 30$). Cada grupo se gestionó en módulos independientes. Para eso, se dividió una superficie de 60 hectáreas en 40 potreros de 1,5 hectáreas cada uno, y cada tratamiento se manejó exclusivamente en 10 potreros. Los potreros fueron distribuidos según características del suelo y

distancia de la sala de ordeño de forma que fueran similares entre tratamientos. La carga animal manejada fue de 2 y 2,5 vacas/hectárea para los tratamientos con vacas NA y NZ, respectivamente, resultando en una carga animal comparativa similar en kg de peso vivo/hectárea.

Se utilizó la misma pastura y cultivares y se realizó el mismo manejo agronómico en cada módulo, con el objetivo de cosechar 10.000 kg de MS de pastura/hectárea por año. Semanalmente se estimó el stock de pasto disponible promedio en todos los potreros (kg de MS/hectárea) y la tasa de crecimiento diario de pasto (kg de MS/día por hectárea) según Fariña et al. (2011). El potencial de CMS para cada origen genético se estimó de acuerdo con NRC (2001), utilizando información individual de peso vivo, producción y composición de leche, días de lactancia y score de condición corporal. Adicionalmente, fue establecido como máximo de CMS de pasto para los tratamientos PasMax NA y PasMax NZ en 16 y 14 kg de MS/vaca por día, respectivamente. Con datos de stock de pasto, tasa de crecimiento diario y consumo máximo de pasto, cada parcela fue ajustada en tamaño de acuerdo con la pastura disponible.

Para nuestro ensayo, dentro de cada tratamiento, fueron seleccionadas 12 vacas (todas multíparas) de tal manera que los grupos fueran equilibrados en días de lactancia, producción de leche, peso vivo, score de condición corporal y paridad (Tabla 1). Las vacas dentro de cada grupo de tratamiento se manejaron juntas. La parcela de pasto utilizada durante el período experimental estuvo a un máximo de 800 m de la sala de ordeño en cada tratamiento, y las vacas tuvieron acceso al agua en todos los potreros. Las vacas se ordeñaron diariamente a las 0500 y a las 1400 horas.

Tabla 1. Características de los animales durante el período experimental (desviación estándar entre paréntesis)

ítem	PasFix ¹		PasMax ²	
	NA ³	NZ ⁴	NA	NZ
Días en lactancia, d	133 (21)	129 (19)	138 (16)	136 (19)
Peso vivo, kg	575 (46)	523 (49)	544 (34)	511 (37)
Score de condición corporal ⁵ , 1-5	3,0 (0,4)	3,0 (0,5)	2,7 (0,4)	2,6 (0,2)
Paridad ⁶	3,4 (1,0)	3,1 (1,0)	3,0 (0,7)	3,2 (1,0)

¹PasFix = Pastoreo Fijo, donde las vacas consumían pastura después del ordeño de la tarde hasta antes del ordeño de la mañana (aproximadamente 30% del CMS total) y consumían una RPM después del ordeño de la mañana hasta el ordeño de la tarde (aproximadamente 70% del CMS total).

²PasMax = Pastoreo máximo, donde las vacas consumían pastura durante los dos turnos de comida (aproximadamente 70% del CMS total) y consumían concentrado durante el período de ordeño (aproximadamente 30% del CMS total).

³NA = Holstein-Friesian de origen norteamericano.

⁴NZ = Holstein-Friesian de origen neozelandés.

⁵Escala de 1 a 5, Edmonson et al. (1989).

⁶Solamente vacas multíparas fueron utilizadas.

5.1.2 Manejo de la alimentación durante el período experimental

Cada tratamiento se manejó por separado durante todo el período experimental. En el sistema de alimentación PasMax las vacas pastorearon durante los dos turnos de alimentación (aproximadamente el 70% del CMS total), y se ofrecía de manera individual concentrado durante ambos períodos de ordeño (5,3 y 4,6 kg de MS/animal para las vacas NA y NZ, respectivamente). En el sistema de alimentación PasFix las reservas y el concentrado se ofrecieron mezclados como una RPM que se ofrecía después del ordeño de la mañana (12,5 y 10,9 kg de MS de RPM/animal para las vacas NA y NZ, respectivamente). Después del ordeño de la tarde, las vacas ingresaban a un potrero ajustado para ofrecer aproximadamente el 33% del CMS total diario estimado (calculado por encima de 5 cm). A los grupos PasFix no se les ofreció concentrado durante el ordeño.

Tabla 2. Ingredientes y composición media de nutrientes (desviación estándar entre paréntesis) de los componentes de la dieta (% MS, a menos que se indique lo contrario) durante el período experimental

ítem	RPM	Concentrado	Pastura ¹
<i>Composición de los nutrientes</i>			
MS, % del total de dieta	50,7 (0,06)	89,9 (0,01)	19,2 (0,04)
MO	91,7 (0,10)	92,0 (0,42)	88,1 (0,18)
FDN	42,1 (0,93)	28,6 (0,42)	55,7 (2,22)
FDA	18,1 (0,18)	8,3 (0,09)	23,1 (1,54)
Lignina	3,93 (0,40)	1,7 (0,11)	3,85 (1,13)
Extracto etéreo	2,53 (0,14)	2,93 (0,05)	3,05 (0,21)
Proteína cruda	15,0 (0,38)	17,7 (0,30)	16,9 (0,29)
Almidón	29,4 (0,48)	38,9 (0,45)	-
NE _L ² , Mcal/kg de MS	1,51	1,81	1,39
<i>Ingredientes de la RPM, % da MS</i>			
Ensilaje de maíz	42,9		
Henolage de pastura ³	25,0		
Grano de maíz molido	14,0		
Afrechillo de trigo	8,4		
Harina de soja	7,9		
Bicarbonato de sodio	0,5		
Oxido de magnesio	0,4		
Urea	0,3		
Premix vitamínico y mineral	0,3		
Fosfato bicálcico	0,2		
Levadura	0,018		

¹Pastura mezcla compuesta por alfalfa (*Medicago sativa*), Dactilis (*Dactylis glomerata*) y festuca (*Festuca arundinacea*)

²Calculado de acuerdo con el NRC (2001),

³Alfalfa (*Medicago sativa*), Dactilis (*Dactylis glomerata*) y festuca (*Festuca arundinacea*)

⁴Aportando (por kg de MS de premix vitamínico mineral): 3 g of sal, 1,9 g de bicarbonato de sodio, 1,9 g de carbonato de calcio, e un producto comercial (conteniendo por kg de MS): 140 g of Ca, 14 g de P, 30 g de Mg, 150 g de Na, 110 g de Cl, 874 mg de Cu, 2.668 mg de Zn, 9 mg de Se, 1.090 mg d Mn, 23 mg de I, 3 mg de Co, 65.707 IU de vitamina A, 13.141 IU de vitamina D3, y 298 IU de vitamina E.

Las pasturas utilizadas para todos los tratamientos estuvieron compuestas por alfalfa (*Medicago sativa*), dactilis (*Dactylis glomerata*) y festuca (*Festuca arundinacea*). Durante el período experimental fue ofrecido en promedio 5,0 kg de MS de concentrado por vaca/día para los tratamientos PasMax y 11,7 kg de RPM por vaca/día para los tratamientos PasFix. En promedio durante el período experimental fue ofrecido aproximadamente 12 y 19 kg de MS de pastura para los tratamientos PasFix y PasMax respectivamente. La Tabla 2 muestra los ingredientes de la dieta, así como la composición química de la RPM, del concentrado y de las pasturas. Durante el período experimental el ensilaje de maíz y el henolage de pastura presentaron en promedio 37 y 43% de MS, 8,7 y 17,1% de proteína cruda, 35,9 y 48,9% de FDN, y 25,4 y 31,7% de FDA, respectivamente. Además, el concentrado y la PMR presentaron respectivamente 29,4 y 38,8% de almidón.

5.1.3 Determinaciones y muestreos

El consumo de pastura se determinó utilizando dióxido de titanio (TiO_2) como marcador externo (Titgemeyer et al., 2001; Glindemann et al., 2009) y fibra detergente neutro indigestible (FDNi) como marcador interno (Huhtanen et al., 1994). Para la determinación de la excreción fecal (kg de MS/vaca por día), durante 10 días cada animal recibió en una única dosis diaria 10 g de TiO_2 puro, suministrada de forma oral en cápsulas de gelatina (tamaño #10, Torpac, Nueva Jersey, EE.UU.) utilizando un aplicador dosificador (X-BG03 A, Torpac, Nueva Jersey, EE.UU.). Durante los últimos 5 días de dosificación de TiO_2 se recolectaron (después de cada ordeño) aproximadamente 150 g de heces/vaca por recolección dos veces al día, directamente del recto de cada vaca y se secaron en una estufa de aire forzado a 60°C durante 72 horas. Las muestras fueron molidas a 1 mm y se obtuvo una muestra compuesta por vaca para el análisis de TiO_2 mezclando cantidades iguales de MS de cada submuestra. De las muestras compuestas de heces de cada animal se analizaron los contenidos de MS, MO, proteína cruda, FDN y FDA (como se describe más adelante) y FDNi. Para el análisis fecal de FDNi, durante 2 días consecutivos, se recolectaron 4 muestras fecales puntuales (aproximadamente 200 g de heces/vaca por recolección) y se procesaron como se describió anteriormente. Para la determinación de FNDi, se pesaron 0,5 g de heces y muestras de alimento por cuadruplicado en bolsas F57 (Ankom Technology Corporation, Macedon, NY, tamaño de poro de 25 μm) como describen Bender et al. (2016), con una relación entre el tamaño de la muestra y el área de superficie de aproximadamente 13 mg/cm^2 . Las muestras se incubaron durante 288 horas consecutivas en el rumen de 2 vacas Holstein no lactantes alimentadas con una dieta compuesta (base MS) de: heno de alfalfa (74,6%), grano de maíz (10,9%), cascarilla de soja (10,9%) y harina de soja (3,6%). Después de la incubación, las bolsas fueron lavadas con agua corriente durante 30 minutos y se secaron en una estufa de aire forzado a 60°C durante 48 horas, y los residuos se analizaron para determinar la FDN, como se describe más adelante. Además, las muestras compuestas de alimento

se analizaron para FDNi (como se describió anteriormente) y MS, MO, FDN, FDA, lignina, extracto etéreo, proteína cruda y almidón (como se describe más adelante).

El comportamiento se registró durante 24 horas, excepto durante el ordeño (1 hora en el ordeño de la mañana y 2 horas en el ordeño de la tarde), durante 2 días consecutivos, por observadores entrenados. La actividad individual de cada vaca se registró en intervalos de 10 minutos (Sheahan et al., 2013), lo que proporcionó 126 observaciones/vaca por día. Los comportamientos evaluados fueron: (i) comiendo (pastoreando o comiendo RPM), (ii) echado rumiando (masticar bolos regurgitados de alimento en posición echada), (iii) parado rumiando (masticar bolos regurgitados de alimento en posición de pie), (iv) echado no rumiando (solo echado, ni comiendo ni rumiando), (v) de pie no rumiando (sólo de pie, ni comiendo ni rumiando) y, (vi) otros (es decir, no mostraban ninguna de las otras actividades). La rumia total se calculó como la suma de la rumia echada y la rumia de pie. La proporción de cada evento de comportamiento por hora se calculó como una fracción del total de observaciones.

Se tomaron muestras de líquido ruminal en 6 animales por tratamiento, en 4 puntos del día: (i) previo al turno de alimentación de la mañana, (ii) 4 horas después del inicio del turno de alimentación de la mañana, (iii) previo al turno de alimentación de la tarde y, (iv) 4 horas después del inicio del turno de alimentación de la tarde. Para las colectas se utilizó una sonda esofágica para obtener las muestras de rumen. La longitud de la sonda fue de 360 cm (Steiner et al., 2015) y se insertó a una profundidad de 200 cm (Shen et al., 2012). El diámetro interno y externo del tubo tenía 1,5 y 2,5 cm, respectivamente. Se utilizó una bomba de vacío (60 Hz) para recoger las muestras en un matraz Büchner. De la muestra, fue descartado los primeros 200 mL de contenido ruminal para minimizar la contaminación de la saliva y, cuando se observó aumento de viscosidad, se tomó otra muestra. El pH del líquido ruminal se midió inmediatamente usando un medidor de pH digital (Orion modelo 230/A, Orion Research Inc., Jacksonville, FL). Del líquido del rumen, una muestra de 0,5 mL de líquido ruminal se conservó con HClO₄ 0,1 M para AGV y otra muestra de 1 mL se conservó con 0,02 mL de H₂SO₄ al 50% (v/v) para determinaciones de NH₃-N y se almacenaron a -20°C hasta los análisis.

La producción de leche individual se registró automáticamente en cada ordeño durante el período experimental, utilizando DairyPlan C21 (GEA Farm Technologies, Düsseldorf, Alemania). Se recolectaron muestras de leche individuales con bronopol como conservante, en 6 ordeños consecutivos y se almacenaron a -4°C hasta sus análisis.

5.1.4 Análisis laboratoriales

El contenido de MS se determinó mediante secado a 105°C durante al menos 16 horas (Método ID 934.01; AOAC, 1990). La ceniza se determinó mediante la combustión a 600°C durante 3 horas y la MO mediante la diferencia de masa (Método ID 942.05; AOAC, 1990). El nitrógeno total se analizó con el método Kjeldahl (Method ID 984.13; AOAC, 1990) y la proteína cruda fue calculada como nitrógeno total \times 6,25. La concentración de extracto etéreo se determinó en un sistema de reflujo (Soxtherm 2000 S 306 M, Gerhardt; Königswinter, Alemania) con éter etílico a 180°C durante 2 horas (Method ID 920.39; AOAC, 1990). La FDN se analizó según los procedimientos descritos por Mertens (2002), utilizando α -amilasa termoestable y sulfito de sodio. La concentración de FDA se analizó según Van Soest et al. (1991). El contenido de lignina fue analizado de acuerdo con AOAC (1990; método ID 973.18). Los análisis de FDN y FDA se realizaron de forma independiente y FDN, FDA y lignina se expresaron libres de cenizas residuales. El contenido de almidón se determinó mediante hidrólisis enzimática utilizando kits comerciales (K-TSTA 07/11, Megazyme International Ireland, Bray, Co. Wicklow, Irlanda). La concentración de TiO₂ en muestras fecales se determinó mediante el método de Myers et al. (2004).

Para la determinación de los AGVs, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron (10.000 \times g durante 15 min a 4°C) y se analizaron mediante HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA) como describen Adams et al. (1984), utilizando una columna Acclaim Rezex Organic Acid H+ (8%, Phenomenex, Torrance, CA) de 7,8 \times 300 mm, ajustada a 210 nm. Las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico se presentaron en unidades de concentración y como proporciones molares. La concentración total de AGVs se calculó como la suma de las concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico. Para la determinación de NH₃-N, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron (10.000 \times g durante 15 min a 4°C) y se analizaron utilizando un espectrómetro ajustado a 625 nm como describe Weatherburn (1967).

5.1.5 Cálculos

La excreción fecal (kg de MS/día) se estimó para cada animal dividiendo el consumo diario de TiO₂ (mg/día) por la concentración de TiO₂ en las heces (mg/kg de MS). El consumo diario de concentrado y RPM (kg de MS/día) se determinó individualmente pesando la cantidad ofrecida y rechazada al inicio y al final de cada comida.

Consumo de la pastura individual (kg de MS/día) para los tratamientos PasMax fueron calculados como: Consumo de pastura (kg de MS/vaca por día) = {[producción fecal (kg de MS/día) \times FNDi en

heces (g/kg de MS)] - [(consumo de concentrado (kg de MS/día) × FDNi del concentrado (g/kg de MS))] / FDNi de la pastura (g/kg de MS). Consumo de la pastura (kg de MS/vaca por día) para los tratamientos PasFix fueron calculados como: Consumo de pastura (kg de MS/vaca por día) = {[producción fecal (kg de MS/día) × FNDi en heces (g/kg de MS)] - [(consumo de RPM (kg de MS/d) × FDNi de la RPM (g/kg de MS))] / FDNi de la pastura (g/kg de MS)

El CMS total (kg de MS/vaca por día) se calculó como la suma de la pastura y RPM o concentrado. Fue calculado el consumo de la MS, MO, FDN, FDA, proteína cruda y almidón multiplicando el CMS y la concentración del nutriente respectivo para cada componente de la dieta. El coeficiente total de digestibilidad aparente del tracto para MS, MO, proteína cruda y FDN de la dieta se obtuvo como: Digestibilidad total aparente del tracto = {[consumo (kg/día) – producción fecal (kg/día)] / consumo (kg/día)} × 100.

La producción de leche corregida por grasa (LCG 4%) fue calculada de acuerdo con el NRC (2001), como: LCG 4% = (0,4 × kg de leche por día) + [15 × (grasa % /100) × kg de leche por día]. La producción de leche corregida por sólidos (LCS 4%) fue calculada de acuerdo con Tyrrell and Reid (1965) como: LCS 4% = [(12,24 × kg de grasa por día) + (7,10 kg de proteína por día) + (6,35 × kg de lactosa por día) – 0,0345 × kg de leche por día]. La energía secretada en leche fue calculada de acuerdo con el NRC (2001) como: NE_L en leche, Mcal/día = (0,0929 × kg de grasa por día) + (0,0547 × kg de proteína por día) + (0,0395 × kg de lactosa por día).

La eficiencia de uso del nitrógeno se calculó como nitrógeno secretado de la leche (g/día) / nitrógeno ingerido (g/día). La eficiencia del uso de la energía ingerida fue calculada como NE_L secretada en leche (Mcal/día) / NE_L consumida (Mcal/día). La eficiencia alimentaria para la producción de leche se calculó como LCG 4% (kg/día) y LCS 4% / CMS (kg/día).

5.1.6 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (versión 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC). Los valores de pH y concentración de AGV en el rumen previo al inicio del turno de alimentación se utilizaron como covariables en sus respectivos análisis de datos. Las variables de consumo, fermentación ruminal, corporales, de producción y composición de la leche, se analizaron como:

$$Y_{ij} = \mu + EsA_i + Gen_j + Ani_k + (EsA_i \times Gen_j) + \varepsilon_{ij}$$

Donde Y_{ij} es la variable dependiente, EsA_i es el efecto fijo de la estrategia de alimentación ($i = \text{PasFix}$ y PasMax), Gen_j es el efecto fijo del origen genético ($j = \text{NA}$ y NZ), Ani_k es el efecto aleatorio del animal, $EsA_i \times Gen_j$ es el efecto fijo de la interacción estrategia de alimentación y origen genético, y ε_{ij} es el error residual. Se utilizó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador.

Las medidas repetidas (comportamiento) fueron analizadas para cada sesión de alimentación, y para todo el día, con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + EsA_i + Gen_j + H_k + Ani_L + (EsA_i \times Gen_j) + (EsA_i \times H_k) + (Gen_j \times H_k) + (EsA_i \times Gen_j \times H_k) + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es la variable dependiente, EsA_i es el efecto fijo de la estrategia de alimentación ($i = \text{PasFix}$ y PasMax), Gen_j es el efecto fijo del origen genético ($j = \text{NA}$ y NZ), H_k es el efecto fijo de la hora del día, Ani_k es el efecto aleatorio del animal, $EsA_i \times Gen_j$ es el efecto fijo de la interacción estrategia de alimentación e origen genético, $EsA_i \times H_k$ es el efecto fijo de la interacción estrategia de alimentación y hora del día, $Gen_j \times H_k$ es el efecto fijo de la interacción origen genético y hora del día, $EsA_i \times Gen_j \times H_k$ es el efecto fijo de la triple interacción estrategia de alimentación, origen genético y la hora del día, y ε_{ijk} es el error residual. Se utilizó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador. Las mediciones repetidas se analizaron con una estructura de covarianza autorregresiva de primer orden AR (1).

Previo a los análisis se testeó la distribución normal de los residuos mediante el procedimiento PROC UNIVARIATE y se eliminaron los *outliers*. Las medias de mínimos cuadrados se compararon mediante el test de Tukey. Las diferencias se declararon en $P \leq 0,05$ y las tendencias se discutieron en $0,05 < P \leq 0,10$. Los resultados se presentaron como media \pm error estándar de la media (ESM).

5.2 Resultados

El consumo y la digestibilidad de nutrientes para todos los tratamientos se presentan en la Tabla 3. El CMS total fue igual entre los tratamientos (19,2 kg/día, ESM = 0,47 kg/día, $P > 0,05$). En promedio el consumo de pastura y del concentrado representaran 39 y 20% para la estrategia de alimentación PasFix y 75 y 25% PasMax, respectivamente. Adicionalmente para la estrategia PasFix las reservas representaron 41% de la dieta consumida. En general, el consumo de nutrientes no se vio afectado por la estrategia de alimentación y origen genético animal, excepto que la ingesta de FDA y almidón fue menor para el tratamiento con PasMax NZ. El consumo de energía fue mayor ($P < 0,05$) para PasFix en comparación con PasMax (44,1 vs. 35,7 Mcal/día), y en NA en comparación

con NZ (41,4 vs. 38,5 Mcal/día), respectivamente. La digestibilidad de FDA fue menor para PasMax NZ, y la digestibilidad de proteína fue menor para PasFix en contraste con PasMax.

Los resultados de producción, composición de la leche y la eficiencia alimentaria se muestran en la Tabla 4. La estrategia de alimentación no afectó la producción de leche, pero las vacas NA produjeron más leche que las vacas NZ. Se encontró una mayor excreción de NE_L en leche para NA en contraste con las vacas lecheras de NZ. Los componentes del rendimiento de la leche (kg de sólidos/día) no se vieron afectados por la estrategia de alimentación, pero el rendimiento de lactosa fue menor en las vacas lecheras de NZ que en las NA (1,16 vs. 1,37, ESM = 0,11 kg/día, $P = 0,004$). Además, el porcentaje de proteína de la leche fue mayor para las vacas lecheras NZ que para las vacas lecheras NA. La concentración de nitrógeno ureico en la leche fue mayor para PasFix en contraste con PasMax (26,8 vs. 23,5 mg/dL, $P < 0,001$). En general, la estrategia de alimentación PasFix presentó mayores valores de eficiencia alimentaria que PasMax, excepto para los cálculos del uso de la energía, donde PasMax fue más eficiente. Cuando evaluamos la eficiencia del nitrógeno consumido, observamos diferencia de valores de 32% vs. 27% para la estrategia de alimentación PasFix vs. PasMax ($P < 0,001$ para efecto estrategia de alimentación). Adicionalmente los animales NA fueron más eficientes en términos de kg de leche producida por kg de MS consumido.

Cuatro horas después de la alimentación de la mañana no se encontraron diferencias para las mediciones ruminales (AGV totales = 72, mM, ESM = 22,6, $P > 0,05$; pH = 6,8, ESM = 0,3, $P > 0,05$). Cuatro horas después del inicio de la alimentación de la tarde la concentración total de los AGVs (108,5 vs. 88,6 mM, ESM = 15 mM, $P = 0,04$ para efecto interacción estrategia de alimentación y origen genético) y las concentraciones de ácido propiónico (24,2 vs. 17,9 mM, ESM = 1,99 mM, $P = 0,018$ para efecto interacción estrategia de alimentación y origen genético) fueron mayores para el grupo PasMax NZ en comparación con los otros grupos. La concentración ruminal de NH_3-N no difirió después de 4 horas del inicio de la alimentación de la mañana entre tratamientos (10,5 mg/100mL, ESM = 3,96 mg/100mL, $P > 0,05$). Después de las 4 horas de inicio de la alimentación de la tarde la concentración ruminal de NH_3-N fue mayor ($P = 0,002$ para efecto interacción estrategia de alimentación y origen genético) respectivamente para PasMax NZ (17,7 mg/100mL), para ambas estrategias de las vacas NA (11,7 mg/100mL) y para PasFix NZ (7,4 mg/100mL). El pH ruminal no fue diferente 4 horas después del inicio de la alimentación de la mañana (pH = 6,8, ESM = 0,2, $P > 0,05$), pero después de 4 horas del inicio de la comida de la tarde las vacas NZ tuvieron menor pH ruminal que las vacas NA (6,4 vs. 6,7, $P = 0,028$ para el efecto origen genético).

Se encontró una triple interacción para los datos de comportamiento (Figura 1 y 2). En general, a lo largo del día el comportamiento se vio afectado por la estrategia de alimentación y por el origen

genético animal. Durante la sesión de comida matutina las vacas del tratamiento PasMax dedicaron mayor proporción del tiempo comiendo, habiendo un segundo pico de consumo entre las 4 y 5 horas de acceso a la comida (Figura 1A). Fue observado que los animales que tenían acceso a la RPM tuvieron una menor proporción del tiempo total dedicado a comer, durante esta sesión de comida, tanto para las vacas NA como NZ. Durante la sesión de comida de la tarde no se encontraron diferencias entre los tratamientos para el tiempo dedicado al pastoreo entre los tratamientos (0,30, ESM = 0,01, $P = 0,795$), pero los tratamientos PasFix dedicaron menor proporción del tiempo a pastorear durante las primeras 3 horas de acceso a la pastura, cambiando por momentos de pastoreo en la madrugada.

Para la rumia (Figura 1B) fue observado que, en general, los animales PasMax dedicaron mayor proporción del tiempo disponible rumiando. Durante la mañana el grupo PasFix NA dedicó un menor tiempo a la rumiar en contraste con otros tratamientos. En este momento del día, los tratamientos PasFix rumiaron menos en posición hechada (0,24 vs. 0,11, $P < 0,001$, para efecto estrategia de alimentación) en relación con las vacas PasMax, y adicionalmente las vacas NA tuvieron mayores valores en contraste con las vacas NZ (0,21 vs. 0,14, $P < 0,001$, para efecto origen genético), y para la rumia en pie no se encontró interacción triple o doble. Para el período de alimentación de la tarde, las vacas PasFix NA dedicaron menor proporción del tiempo a rumiar, disminuyendo también el tiempo de rumia hechada. Cuando se evaluó todo el período, los tratamientos PasMax dedicaron mayor proporción de tiempo a comer (0,36 vs. 0,28, ESM = 0,012, $P < 0,05$) y a rumiar (0,37 vs. 0,31, ESM = 0,010, $P < 0,001$) en contraste a los tratamientos PasFix.

Adicionalmente, durante el turno matutino de comida los tratamientos PasFix (0,24 vs. 0,11, ESM = 0,02, $P < 0,001$) y los animales NA (0,21 vs. 0,14, ESM = 0,02, $P < 0,001$) tuvieron mayores proporciones del tiempo paradas sin rumiar en contraste con PasMax y NZ, respectivamente (Figura 2).

Tabla 3. Consumo de nutrientes y digestibilidad de vacas lecheras de diferente genética manejadas en dos estrategias de alimentación

Ítem	EsA ¹		Gen ²		EsA × Gen				ESM ³	P-valor ⁴		
	PasFix	PasMax	NA	NZ	PasFix		PasMax			EsA	Gen	EsA × Gen
					NA	NZ	NA	NZ				
<i>CMS, kg/día</i>												
Pastura ⁵	7,5 ^b	14,4 ^a	10,7	11,1	7,2	7,8	14,3	14,5	1,05	<0,001	0,564	0,871
RPM ⁶	11,6	-	6,2 ^a	5,4 ^b	12,4	10,8	-	-	0,05	-	<0,001	-
Reservas	7,9	-	4,2 ^a	3,7 ^b	8,4	7,3	-	-	0,04	-	<0,001	-
Concentrado	3,7	4,9	4,6	4,0	4,0 ^x	3,5 ^w	5,3 ^z	4,6 ^v	0,04	<0,001	<0,001	0,040
Total	19,1	19,3	19,6	18,8	19,6	18,6	19,6	19,0	1,07	0,807	0,289	0,787
Total, como % peso vivo	3,19	3,43	3,22	3,40	3,07	3,32	3,38	3,48	0,28	0,093	0,208	0,600
<i>Consumo de nutrientes, kg/día</i>												
MO	17,3	17,2	17,6	16,9	17,7	16,8	17,5	17	1,06	0,948	0,273	0,784
FDN	9,0	8,5	8,8	8,8	9,1	8,8	8,4	8,7	0,60	0,227	0,960	0,402
FDA	3,7	3,0	3,7	3,0	3,7 ^x	3,7 ^x	3,8 ^x	2,2 ^y	0,26	<0,001	<0,001	<0,001
Proteína cruda	3,0	3,2	3,2	3,0	3,1	2,9	3,3	3,2	0,20	0,103	0,169	0,769
Almidón	3,4	1,9	2,8	2,5	3,6 ^x	3,2 ^x	2,1 ^y	1,8 ^y	0,04	<0,001	<0,001	<0,001
NE _L ⁷ , Mcal/día	44,1 ^a	35,7 ^b	41,4 ^a	38,5 ^b	46,0	42,3	36,8	34,7	1,51	<0,001	0,007	0,416
<i>Digestibilidad, %</i>												
MS	67,8	70,7	71,0	67,5	68,9	66,7	73,1	68,2	2,26	0,138	0,070	0,489
MO	71,1	73,5	73,9	70,8	72,1	70,1	75,6	71,5	2,06	0,170	0,079	0,539
FDN	65,9	64,8	66,3	64,5	67,1	64,6	65,4	64,3	3,10	0,693	0,495	0,774
FDA	54,7	40,4	56,0	39,1	51,2 ^x	58,2 ^x	60,8 ^x	20,0 ^y	4,90	0,001	<0,001	<0,001
Proteína cruda	70,1 ^b	77,2 ^a	74,9	72,4	71,2	69,1	78,6	75,7	1,83	<0,001	0,108	0,770

¹EsA = estrategia de alimentación. PasFix = Pastoreo Fijo, donde las vacas consumían pastura (aproximadamente 30% del CMS total) después del ordeño de la tarde hasta antes del ordeño de la mañana y consumían una RPM (aproximadamente 70% del CMS total) después del ordeño de la mañana hasta el ordeño de la tarde. PasMax = Pastoreo máximo, donde las vacas consumían pastura durante los dos turnos de comida (aproximadamente 70% del CMS total) y consumían concentrado durante el período de ordeño (aproximadamente 30% del CMS total).

²Gen = genotipo. NA = Holstein-Friesian de origen norteamericano. NZ = Holstein-Friesian de origen neozelandés.

³Error estándar de las medias (mayor valor).

⁴EsA = estrategia de alimentación, Gen = genotipo, EsA × Gen = interacción estrategia de alimentación y genotipo. ^{x-y}Diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos cuando $EsA \times Gen \leq 0,05$. ^{a-b}Diferencias significativas ($P \leq 0,05$) cuando $SA \times Gen > 0,05$.

⁵Alfalfa (*Medicago sativa*), Dactilis (*Dactylis glomerata*) y festuca (*Festuca arundinacea*).

⁶Racion parcialmente mezclada, compuesta por 67,9% de reservas (ensilaje de maíz y henolage de pastura) y 32,1% de concentrado.

⁷Calculado de acuerdo con el NRC (2001).

Tabla 4. Producción y composición de la leche de vacas lecheras de diferente genética manejadas en dos estrategias de alimentación

Ítem	EsA ¹		Gen ²		EsA × Gen				ESM ³	P-valor ⁴		
	PasFix	PasMax	NA	NZ	PasFix		PasMax			EsA	Gen	EsA × Gen
					NA	NZ	NA	NZ				
<i>Producción</i>												
Producción de leche, kg/día	28,2	27,5	29,7 ^a	26,0 ^b	29,7	26,6	29,7	25,4	2,01	0,618	0,006	0,646
LCG ⁵ 4%, kg/día	28,6	27,0	29,5 ^a	26,2 ^b	30,7	26,5	28,3	25,8	2,62	0,280	0,023	0,535
LCS ⁶ 4%, kg/día	28,4	26,5	28,8 ^a	26,0 ^b	30,3	26,4	27,4	25,6	2,47	0,178	0,042	0,465
NE _L en leche ⁷ , Mcal/día	21,4	20,0	21,8 ^a	19,7 ^b	22,8	20,0	20,7	19,4	1,87	0,180	0,045	0,470
Grasa, %	4,80 ^a	4,40 ^b	4,43	4,77	4,70	4,91	4,16	4,64	0,18	0,029	0,059	0,456
Proteína, %	3,54 ^a	3,33 ^b	3,23 ^b	3,65 ^a	3,34	3,74	3,11	3,55	0,16	0,008	<0,001	0,724
Lactosa, %	4,84 ^a	4,71 ^b	4,79	4,76	4,89	4,79	4,69	4,74	0,05	0,006	0,547	0,102
Grasa, kg/día	1,19	1,09	1,20	1,09	1,28	1,11	1,12	1,07	0,13	0,111	0,094	0,353
Proteína, kg/día	0,90	0,85	0,90	0,85	0,93	0,87	0,86	0,84	0,07	0,220	0,286	0,671
Lactosa, kg/día	1,28	1,24	1,37 ^a	1,16 ^b	1,40	1,17	1,34	1,15	0,11	0,568	0,004	0,726
Nitrógeno ureico, mg/dL	26,8 ^a	23,5 ^b	24,5	25,7	26,0	27,6	23,1	23,9	0,68	<0,001	0,082	0,541
<i>Eficiencia alimentaria</i>												
N en leche / N consumido (g/día)	0,32 ^a	0,27 ^b	0,30	0,29	0,34	0,31	0,27	0,27	0,017	<0,001	0,502	0,330
NE _L en leche / NE _L ingerido (Mcal/día)	0,53 ^b	0,58 ^a	0,57	0,53	0,56	0,49	0,58	0,57	0,028	0,039	0,121	0,162
LCG 4% / CMS (kg/día)	1,69 ^a	1,47 ^b	1,68 ^a	1,48 ^b	1,84	1,53	1,52	1,42	0,091	0,008	0,012	0,168
LCS 4% / CMS (kg/día)	1,67 ^a	1,44 ^b	1,64 ^a	1,47 ^b	1,81	1,53	1,47	1,41	0,086	0,004	0,024	0,135

¹EsA = estrategia de alimentación. PasFix = Pastoreo Fijo, donde las vacas consumían pastura (aproximadamente 30% del CMS total) después del ordeño de la tarde hasta antes del ordeño de la mañana y consumían una RPM (aproximadamente 70% del CMS total) después de ordeño de la mañana hasta el ordeño de la tarde. PasMax = Pastoreo máximo, donde las vacas consumían pastura durante los dos turnos de comida (aproximadamente 70% del CMS total) y consumían concentrado durante el período de ordeño (aproximadamente 30% del CMS total).

²Gen = genotipo. NA = Holstein-Friesian de origen norteamericano. NZ = Holstein-Friesian de origen neozelandés.

³Error estándar de las medias (mayor valor).

⁴EsA = estrategia de alimentación, Gen = genotipo, EsA × Gen = interacción estrategia de alimentación y genotipo. ^{x-y}Diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos cuando $EsA \times Gen \leq 0,05$. ^{a-b}Diferencias significativas ($P \leq 0,05$) cuando $SA \times Gen > 0,05$.

⁵La producción de leche corregida por grasa a 4% fue calculada de acuerdo con el NRC (2001) como: $LCG\ 4\% = (0,4 \times \text{kg de leche por día}) + [15 \times (\text{grasa \%} / 100) \times \text{kg de leche por día}]$.

⁶Leche corregida por sólidos a 4% fue calculado de acuerdo con Tyrrell and Reid (1965) como: $LCS\ 4\% = [(12,24 \times \text{kg de grasa por día}) + (7,10 \text{ kg de proteína por día}) + (6,35 \times \text{kg de lactosa por día}) - 0,0345 \times \text{kg de leche por día}]$.

⁷La energía secretada en leche fue calculada de acuerdo con el NRC (2001) como: $NE_L \text{ en leche, Mcal/día} = (0,0929 \times \text{kg de grasa por día}) + (0,0547 \times \text{kg de proteína por día}) + (0,0395 \times \text{kg de lactosa por día})$.

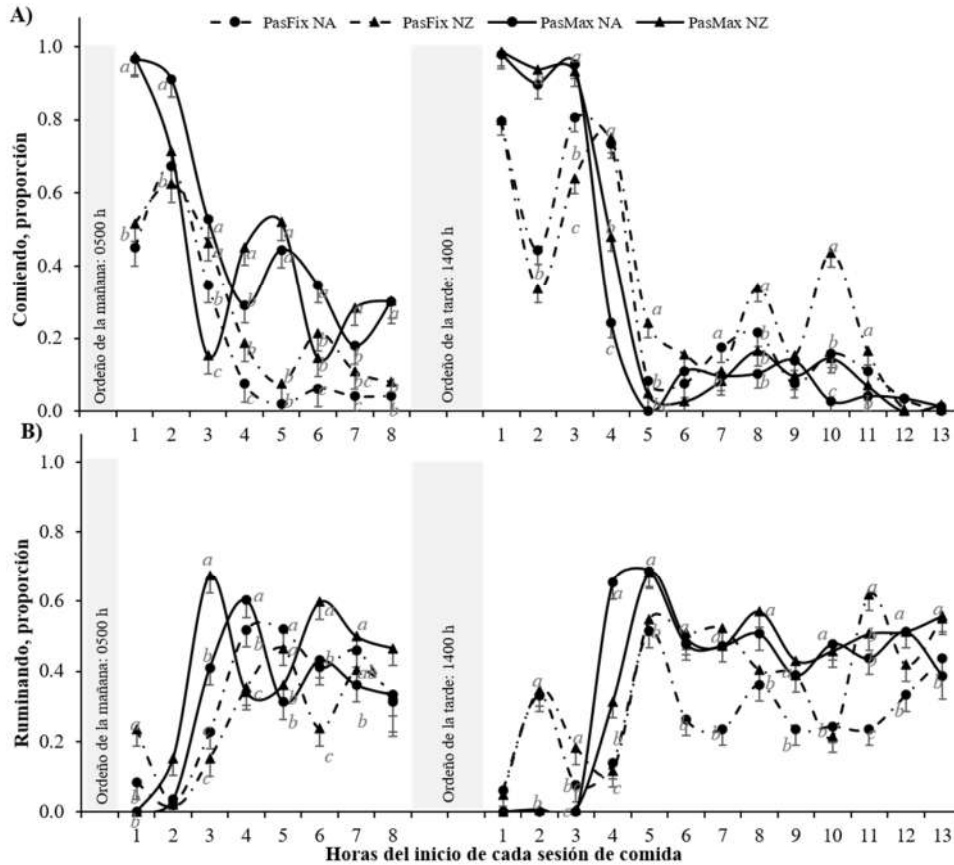


Figura 1. Comportamiento alimentario (expresado como proporción del total de observaciones) de vacas lecheras de diferente origen genético (NA y NZ) en dos diferentes estrategias de alimentación (PasFix y PasMax), onde: NA = Holstein-Friesian de origen norteamericano, NZ = Holstein-Friesian de origen neozelandés, PasFix = Pastoreo Fijo, donde las vacas consumían pastura (aproximadamente 30% del CMS total) después del ordeño de la tarde hasta antes del ordeño de la mañana y consumían una RPM (aproximadamente 70% del CMS total) después del ordeño de la mañana hasta el ordeño de la tarde. PasMax = Pastoreo máximo, donde las vacas consumían pastura durante los dos turnos de comida (aproximadamente 70% del CMS total) y consumían concentrado durante el período de ordeño (aproximadamente 30% del CMS total). Momentos del ordeño son presentados en color gris. EsA = estrategia de alimentación, Gen = genotipo, H = hora del día, EsA × Gen = interacción estrategia de alimentación y genotipo, Est × H = interacción estrategia de alimentación y hora del día, Gen × H = interacción origen genético y hora del día, EsA × Gen × H = interacción estrategia de alimentación, origen genético y hora del día. **(A)** Comiendo, después del ordeño de la mañana hasta previo al ordeño de la tarde (EsA, $P < 0,001$; Gen, $P = 0,654$; H, $P < 0,001$; EsA × Gen, $P < 0,001$; EsA × H, $P < 0,001$; Gen × H, $P < 0,001$; EsA × Gen × H, $P < 0,001$); comiendo después del ordeño de la tarde hasta previo al ordeño de la mañana (EsA, $P = 0,429$; Gen = 0,007; H, $P < 0,001$; EsA × Gen, $P < 0,795$; EsA × H, $P < 0,001$; Gen × H, $P < 0,001$; EsA × Gen × H, $P = 0,006$). **(B)** Rumiando, después del ordeño de la mañana hasta previo al ordeño de la tarde (EsA, $P = 0,008$; Gen, $P = 0,420$; H, $P < 0,001$; EsA × Gen, $P = 0,002$; EsA × H, $P < 0,001$; Gen × H, $P < 0,001$; EsA × Gen × H, $P = 0,002$); rumiando después del ordeño de la tarde hasta previo al ordeño de la mañana (EsA, $P < 0,001$; Gen, $P < 0,001$; H, $P < 0,001$; EsA × Gen, $P < 0,001$; EsA × H, $P < 0,001$; Gen × H, $P < 0,001$; EsA × Gen × H, $P = 0,015$). ^{a-b}Diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos cuando EsA, Gen o hora y EsA × Gen × H $\leq 0,05$.

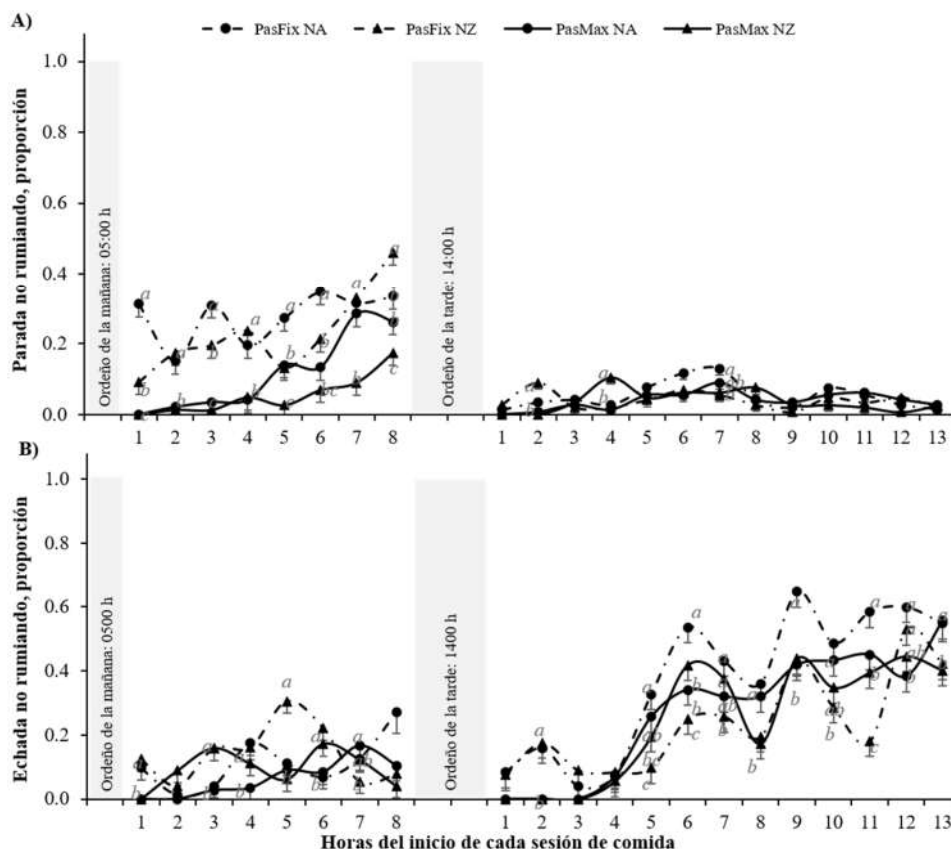


Figura 2. Comportamiento de postura (expresado como proporción del total de observaciones) de vacas lecheras de diferente origen genético (NA y NZ) en dos diferentes estrategias de alimentación (PasFix y PasMax), onde: NA = Holstein-Friesian de origen norteamericano, NZ = Holstein-Friesian de origen neozelandés, PasFix = Pastoreo Fijo, donde las vacas consumían pastura (aproximadamente 30% del CMS total) después del ordeño de la tarde hasta antes del ordeño de la mañana y consumían una RPM (aproximadamente 70% del CMS total) después del ordeño de la mañana hasta el ordeño de la tarde. PasMax = Pastoreo máximo, donde las vacas consumían pastura durante los dos turnos de comida (aproximadamente 70% del CMS total) y consumían concentrado durante el periodo de ordeño (aproximadamente 30% del CMS total). Momentos de ordeño son presentados en color gris. EsA = estrategia de alimentación, Gen = genotipo, H = hora del día, EsA × Gen = interacción estrategia de alimentación y genotipo, Est × H = interacción estrategia de alimentación y hora del día, Gen × H = interacción origen genético y hora del día, EsA × Gen × H = interacción estrategia de alimentación, origen genético y hora del día. (A) Parada no rumiando, después del ordeño de la mañana hasta previo al ordeño de la tarde (EsA, $P < 0,001$; Gen, $P < 0,001$; H, $P < 0,001$; EsA × Gen, $P = 0,744$; EsA × H, $P = 0,444$; Gen × H, $P = 0,014$; EsA × Gen × H, $P < 0,001$); parada no rumiando después del ordeño de la tarde hasta previo al ordeño de la mañana (EsA, $P = 0,171$; Gen, $P = 0,001$; H, $P < 0,001$; EsA × Gen, $P = 0,232$; EsA × H, $P = 0,035$; Gen × H, $P = 0,041$; EsA × Gen × H, $P = 0,103$). (B) Echada no rumiando, después del ordeño de la mañana hasta previo al ordeño de la tarde (EsA, $P < 0,001$; Gen, $P = 0,037$; H, $P < 0,001$; EsA × Gen, $P = 0,965$; EsA × H, $P = 0,003$; Gen × H, $P = 0,001$; EsA × Gen × H, $P = 0,009$); echada no rumiando después del ordeño de la tarde hasta previo al ordeño de la mañana (EsA, $P < 0,001$; Gen, $P < 0,001$; H, $P < 0,001$; EsA × Gen, $P < 0,001$; EsA × H, $P = 0,039$; Gen × H, $P < 0,001$; EsA × Gen × H, $P = 0,009$). ^{a-b}Diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos cuando EsA, Gen o hora y EsA × Gen × H $\leq 0,05$.

Capítulo 6. Experimento II

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos digestivos y productivos de caminar 5km/día entre la sala de ordeño y la parcela de pasto en un sistema de pastoreo, separando el efecto de la caminata *per se* del ayuno asociado a la caminata.

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Diseño experimental, tratamientos y animales

El experimento fue conducido en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria (IPAV-Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay) en Libertad, San José, Uruguay en primavera de 2017. Durante el período experimental, en promedio, la temperatura media fue de 17,7°C (con 24,2°C de máxima y 11,5°C de mínima), con 13 horas de iluminación natural (0600 a 1900 horas). El experimento se realizó de acuerdo con las normas que regulan el uso de animales en experimentación, educación e investigación establecidas por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Uruguaya (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, UdelaR, protocolo: 606/17). Para el ensayo, se seleccionaron 30 vacas lecheras cruza Holstein × Jersey, que fueron bloqueadas según días en leche (96 ± 54 d, media \pm desviación estándar), producción de leche ($22,1 \pm 4,1$ kg), peso vivo ($446 \pm 76,8$ kg), escore de condición corporal ($3,0 \pm 0,35$, escala de 1 a 5 puntos; Edmonson et al., 1989) y paridad (2 ± 1). En cada tratamiento a 4 vacas (todas multíparas) se les colocó un catéter ruminal (8 mm de diámetro y 120 cm de longitud). Las vacas fueron divididas en tres grupos y asignadas a los siguientes tratamientos que fueron aplicados después del ordeño de la mañana y previo al ordeño de la tarde: (i) Pastoreo (**Pas**), las vacas tenían acceso al pasto inmediatamente después del ordeño de la mañana y permanecían en el pasto hasta inmediatamente empezar el ordeño de la tarde, (ii) Caminata (**C_{5km}**), las vacas caminaban 2,5 km para acceder al pasto después del ordeño de la mañana y caminaban 2,5 km previo al ordeño de la tarde, totalizando una caminata extra de 5 km/día para acceder a la pastura y, (iii) Ayuno (**Ayu**), las vacas se mantuvieron en un corral sin acceso a alimento ni agua durante el tiempo que el grupo C_{5km} caminó. El potrero de pastura utilizado fue el mismo para todos los tratamientos, tenía 9 hectáreas de tamaño y se ubicó entre 100 y 500 m de la sala de ordeño. Las vacas del tratamiento C_{5km} caminaron en un circuito cerrado de 500 m (piso de tierra, pendiente aproximadamente de 0,5%), en un potrero ubicado cerca de la pastura, y el corral para vacas Ayu tenía 250 m². Durante la caminata, las vacas iban acompañadas de dos personas que quedaban al menos 2 m detrás de la última vaca. A las vacas no se les permitió comer ni beber mientras caminaban. Todas las vacas se ordeñaron diariamente de 0500 y a las 1700 horas. Todas las vacas

bebieron agua antes del ordeño y antes de ingresar al potrero. El experimento se realizó durante 33 días, con 12 días de adaptación y 21 días de mediciones.

6.1.2 Manejo de la alimentación durante el período experimental

Todas las vacas pastoreaban la misma pastura, que era compuesta por una mezcla de raigrás anual (*Lolium multiflorum*), trébol blanco (*Trifolium repens*), lotus (*Lotus corniculatus*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Las vacas de cada tratamiento pastaban en parcelas independientes, separados por hilo eléctrico, y en cada sesión de pastoreo las vacas ingresaban a una nueva parcela. Diariamente se ajustó el tamaño de cada parcela para proporcionar un mínimo de 15 kg de MS/vaca por parcela (a nivel del suelo). La masa del forraje se estimó cortando 3 muestras por día (0,25 m² cada una) a nivel del suelo, que fueron secadas en estufa de aire forzado a 55°C durante al menos 48 horas y pesadas. En promedio, durante el período experimental, la masa de forraje fue de 2.750 ± 445 kg de MS/hectárea. En cada ordeño, las vacas fueron suplementadas individualmente con 1,8 kg de MS de cáscara de soja. Además, exclusivamente en el ordeño de la mañana, las vacas recibieron una premezcla de vitaminas y minerales (150 g/vaca por día, que contiene por kg de MS, 325 g NaCl, 160 g Ca, 70 g P, 10 g Mg, 200 mg Cu, 5000 mg de Zn, 15 mg de Se, 40 mg de I, 8 mg de Co, 80.000 UI de vitamina A, 8.000 UI de vitamina D3, 80 UI de vitamina E) y alcoholes etoxilados (50 g/vaca por día, Phibro, Animal Health Corporation TM, Nueva Jersey, EE.UU.). Las muestras de cáscara de soja y pastura (cortadas a una altura de 5 cm) se secaron en una estufa de aire forzado a 55°C durante al menos 48 horas hasta alcanzar un peso constante y se molieron a 1 mm. Después del molido, una muestra compuesta de pastura y otra muestra compuesta de cascarilla de soja fueron obtenidas mezclando cantidades iguales de MS de cada submuestra, y fueron analizadas para MO, FDN, FDA, proteína cruda y extracto etéreo (Tabla 5).

Tabla 5. Composición nutricional (desviación estándar entre paréntesis) de los componentes de la dieta (% MS, a menos que se indique lo contrario) durante el período experimental

<i>Composición de los nutrientes, % de MS</i>	Pastura mezcla ¹	Cascarilla de soja
MS, % <i>tal cual</i>	24,5 (0,82)	92,0 (0,15)
MO	90,3 (0,57)	95,3 (0,08)
FDN	36,4 (0,79)	61,3 (0,20)
FDA	23,7 (1,02)	45,0 (0,50)
Extracto etéreo	1,9 (0,21)	2,0 (0,23)
Proteína cruda	20,9 (1,01)	14,4 (0,20)

¹Pastura mezcla compuesta por raigrás anual (*Lolium multiflorum*), trébol blanco (*Trifolium repens*), lotus (*Lotus corniculatus*) y alfalfa (*Medicago sativa*).

6.1.3 Determinaciones y muestreos

El consumo de pastura se determinó utilizando dióxido de titanio (TiO_2) como marcador externo (Titgemeyer et al., 2001; Glindemann et al., 2009) y fibra detergente neutro indigestible (FDNi) como marcador interno (Huhtanen et al., 1994). Para la determinación de la excreción fecal (kg de MS/vaca por día), durante 10 días cada animal recibió en una única dosis diaria 10 g de TiO_2 puro, suministrada de forma oral en cápsulas de gelatina (tamaño #10, Torpac, Nueva Jersey, EE.UU.) utilizando un aplicador dosificador (X-BG03 A, Torpac, Nueva Jersey, EE.UU.). Durante los últimos 5 días de dosificación de TiO_2 se recolectaron (después de cada ordeño) aproximadamente 150 g de heces/vaca por recolección, dos veces al día, directamente del recto de cada vaca y se secaron en una estufa de aire forzado a 60°C durante 72 horas. Las muestras fueron molidas a 1 mm y se obtuvo una muestra compuesta por vaca para el análisis de TiO_2 mezclando cantidades iguales de MS de cada submuestra. En cada muestra compuesta de heces de cada animal se analizaron los contenidos de MS, MO, proteína cruda, FDN y FDA (como se describe más adelante) y FDNi. Para el análisis fecal de FDNi, durante 2 días consecutivos, se recolectaron 4 muestras fecales puntuales (aproximadamente 200 g de heces/vaca por recolección) y se procesaron como se describió anteriormente. Para la determinación de FNDi, se pesaron 0,5 g de heces y muestras de alimento por cuadruplicado en bolsas F57 (Ankom Technology Corporation, Macedon, NY, tamaño de poro de $25\ \mu\text{m}$) como describen Bender et al. (2016), con una relación entre el tamaño de la muestra y el área de superficie de aproximadamente $13\ \text{mg}/\text{cm}^2$. Las muestras se incubaron durante 288 horas consecutivas en el rumen de 2 vacas Holstein no lactantes alimentadas con una dieta compuesta (base MS) de: heno de alfalfa (74,6%), grano de maíz (10,9%), cascarilla de soja (10,9%) y harina de soja (3,6%). Después de la incubación, las bolsas fueron lavadas con agua corriente durante 30 minutos, se secaron en una estufa de aire forzado a 60°C durante 48 horas, y los residuos se analizaron para determinar la FDN, como se describe más adelante. Además, las muestras compuestas de alimento se analizaron para FDNi (como se describió anteriormente) y MS, MO, proteína cruda y FDN (como se describe más adelante).

La tasa de pasaje de partículas se estimó utilizando FDN como mordente preparado con heno de alfalfa según Udén et al. (1980). Después del ordeño por la mañana, se administró por vía oral una dosis única de 150 g de Cr-mordente a 8 vacas por tratamiento. Se recolectaron muestras fecales directamente del recto a las 0, 6, 9, 12, 24, 30, 34, 38, 42, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 horas después de la dosificación del marcador. Las muestras fecales se secaron en una estufa con aire forzado a 60°C y se molieron a 1 mm para posterior análisis.

El comportamiento se registró durante 24 horas excepto durante el ordeño (2 horas en el ordeño de la mañana y 1 hora en el ordeño de la tarde) durante 3 días por observadores entrenados. La actividad

individual de cada vaca individual se registró en intervalos de 10 minutos (Sheahan et al., 2013), lo que proporcionó 126 observaciones/vaca por día. Los comportamientos evaluados fueron: (i) comiendo (pastoreando), (ii) echado rumiando (masticar bolos regurgitados de alimento en posición echada), (iii) parado rumiando (masticar bolos regurgitados de alimento en posición de pie), (iv) echado no rumiando (solo echado, ni comiendo ni rumiando), (v) de pie no rumiando (sólo de pie, ni comiendo ni rumiando) y, (vi) otros (es decir, no mostraban ninguna de las otras actividades). La rumia total se calculó como la suma de la rumia echada y la rumia de pie. La proporción de cada evento de comportamiento por hora se calculó como una fracción del total de observaciones.

Se tomaron muestras del líquido ruminal cada hora durante 24 horas consecutivas, excepto a las 12, 14 y 15 horas del día y mientras los períodos de ordeño. Luego de la colecta, el pH del líquido ruminal se midió inmediatamente con un medidor de pH digital (EW-05991-36, Cole Parmer, Vernon Hills, IL). Una muestra de 0,5 mL se conservó con 0,5 mL de HClO₄ 0,1 M y se almacenó a -20°C hasta realizar los análisis de los AGV. Para calcular el flujo de nitrógeno microbiano, se recolectaron muestras de orina puntuales dos veces al día (después de ambos ordeños) de 8 vacas por tratamiento, y se acidificaron 15 mL de orina fresca con 60 mL de H₂SO₄ 0,072 N, que se almacenaron a -20°C (Broderick et al., 2009) hasta realizar los análisis. Posteriormente, las muestras de orina se descongelaron a temperatura ambiente y se mezclaron partes iguales de cada una de las 4 muestras para obtener una muestra compuesta, que se utilizó para los análisis.

Se registró la producción de leche individual y se recolectaron muestras de leche en cada ordeño durante 3 días consecutivos por semana durante el período de medición. Se recolectaron muestras de leche (50 mL) con bronopol como conservante y se almacenaron a -4°C hasta su análisis. Se analizaron muestras de leche individuales para grasa, proteína, lactosa y nitrógeno ureico mediante análisis de espectroscopía de infrarrojo (Bentley Model 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). El análisis de la concentración de células somáticas se realizó utilizando un contador de células automatizado (Foss Electric A/S, Hillerod, Dinamarca).

El score de condición corporal fue estimado por el mismo observador usando intervalos de 0,25 unidades con una escala de 1,0 a 5,0 (Edmonson et al., 1989), previo y al final del experimento, después del ordeño y antes de la alimentación por la mañana. Se recolectaron muestras de sangre de 6 vacas por tratamiento a las 8, 11, 14 y 19 horas del día de la arteria/vena coccígea en tubos sin anticoagulante, para análisis de urea en suero. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora, posteriormente se colocaron en heladera a 4°C durante 2 horas, y se centrifugaron (2.800 × g durante 10 min a 20°C), y luego se almacenó el suero a -20°C hasta su análisis.

6.1.4 Análisis laboratoriales

El contenido de MS se determinó mediante secado a 105°C durante al menos 16 horas (Método ID 934.01; AOAC, 1990). La ceniza se determinó mediante la combustión a 600°C durante 3 horas y la MO mediante la diferencia de masa (Método ID 942.05; AOAC, 1990). El nitrógeno total se analizó con el método Kjeldahl (Method ID 984.13; AOAC, 1990) y la proteína cruda fue calculada como nitrógeno total \times 6,25. La concentración de extracto etéreo se determinó en un sistema de reflujo (Soxtherm 2000 S 306 M, Gerhardt; Königswinter, Alemania) con éter etílico a 180°C durante 2 horas (Method ID 920.39; AOAC, 1990). La FDN se analizó según los procedimientos descritos por Mertens (2002), utilizando α -amilasa termoestable y sulfito de sodio. La concentración de FDA se analizó según Van Soest et al. (1991). El contenido de lignina fue analizado de acuerdo con AOAC (1990; método ID 973.18). Los análisis de FDN y FDA se realizaron de forma independiente y FDN, FDA y lignina se expresaron sin incluir las cenizas residuales.

La concentración de TiO₂ en muestras fecales se determinó mediante el método de Myers et al. (2004). Las concentraciones de cromo fecal fueron determinadas utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3300, Perkin Elmer, Wellesley, MA) de acuerdo con el método de Williams et al. (1962).

En las muestras de líquido ruminal obtenidas de los horarios 2, 4, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 19 y 20 horas del día se analizó la concentración de AGVs. Para la determinación de los AGVs, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron (10.000 \times g durante 15 min a 4°C) y se analizaron mediante HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA) como describen Adams et al. (1984), utilizando una columna Acclaim Rezex Organic Acid H+ (8%, Phenomenex, Torrance, CA) de 7,8 \times 300 mm, ajustada a 210 nm. Las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico se presentaron en unidades de concentración y en proporciones molares. La concentración total de AGVs se calculó como la suma de las concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico. Muestras compuestas de orina de cada vaca fueron descongeladas a temperatura ambiente y centrifugadas (10.000 \times g for 15 min at 4°C) y analizadas para derivados de purinas (alantoína y ácido úrico) utilizando un HPLC (Dionex Ultimate 3000) como descrito por Balcells et al. (1992), utilizando una columna Acclaim C18 (Phenomenex) de 205 nm, 5 μ m, 4,6 \times 250 mm. Para los análisis de creatinina en orina y la concentración de urea en sangre se utilizó un equipo Selectra-2 autoanalyzer (Vital Scientific, Dieren, Netherlands), utilizando estándares Standatrol y Randox Hn1530. Las concentraciones séricas de urea y las concentraciones de creatinina en orina fueron analizadas utilizando los respectivos kits; Liquid kinetic UV urea, Wiener Laboratories S.A.I.C. Riobamba, Rosario, Argentina y picric acid, Wiener Laboratories S.A.I.C. Riobamba, Rosario,

Argentina. Los coeficientes de variación intra e inter específicos de todas las determinaciones fueron menores o iguales a 10%.

6.1.5 Cálculos

La excreción fecal (kg de MS/día) se estimó para cada animal dividiendo el consumo diario de TiO_2 (mg/día) por la concentración de TiO_2 en las heces (mg/kg de MS). El consumo diario de cascarilla (kg de MS/día) se determinó individualmente pesando la cantidad ofrecida y rechazada en cada ordeño.

El consumo individual de pastura (kg de MS/día) se calculó como: Consumo de pastura (kg de MS/vaca por día) = {[producción fecal (kg de MS/día) \times FNDi en heces (g/kg de MS)] - [(consumo de cascarilla de soja (kg de MS/día) \times FDNi de la cascarilla de soja (g/kg de MS))]} / FDNi de la pastura (g/kg de MS).

El CMS total (kg de MS/día) fue calculado individualmente por la suma del consumo de la cascarilla de soja y la pastura. El consumo de la MS, MO, proteína cruda y FDN se calculó multiplicando el CMS y la concentración de nutrientes para cada componente de la dieta. El coeficiente total de digestibilidad aparente del tracto para MS, MO, proteína cruda y FDN de la dieta se obtuvo como: Digestibilidad total aparente del tracto = {[consumo (kg/día) - producción fecal (kg/día)] / consumo (kg/día)} \times 100.

Las curvas individuales de excreción de cromo fueron ajustadas al modelo multi compartimental propuesto por Dhanoa et al. (1985):

$$Y = A \times (\exp(-k_1 \times (t - TT)) \times \exp(-n - 2) \exp(-k_2 - k_1) \times (t - TT)))$$

donde Y (mg/kg MS) es la concentración del marcador en heces al tiempo t (h); $T = t - TT$ donde TT es el tiempo de tránsito o tiempo de retraso (h) entre la administración del marcador y su primera aparición en heces; k_1 (h⁻¹) es la tasa de pasaje desde el retículo-rumen; k_2 (h⁻¹) es la tasa de pasaje desde el ciego-colon; A es un parámetro de escala dependiente de k_1 y n es el número de compartimiento en el modelo. El tiempo medio de retención en retículo-rumen (TMRR) y en ciego-colon (TMRC) fueron calculados como $1/k_1$ and $1/k_2$, respectivamente. El tiempo medio de retención total (TMRT) fue calculado como $TMRT = TMRR + TMRC + TT$ (Grover and Williams, 1973).

La excreción urinaria de derivados de purina (mmol/día) se calculó como la relación de las concentraciones (mmol/L) de derivados de purina:creatinina en los momentos de muestreo puntual

en relación con la excreción de creatinina esperada (mmol/día), que se estimó asumiendo una tasa de excreción de creatinina de 29 mg/kg de peso vivo (Valadares et al., 1999). El flujo duodenal de nitrógeno microbiano (g/día) se calculó de acuerdo con Chen y Gomes (1992), excepto que se utilizó una proporción de 0,134 nitrógeno purina / nitrógeno microbiano (Valadares et al., 1999). La síntesis microbiana de nitrógeno por MO digestible se calculó como: síntesis de proteína microbiana por MO digestible, g/kg = (g de proteína microbiana sintetizada / kg de MO digestible).

La producción de leche corregida por grasa fue calculada de acuerdo con el NRC (2001), como: como: LCG 4% = (0,4 × kg de leche por día) + [15 × (grasa % /100) × kg de leche por día]. La leche corregida por sólidos fue calculada de acuerdo con Tyrrell and Reid (1965) como: LCS 4% = [(12,24 × kg de grasa por día) + (7,10 kg de proteína por día) + (6,35 × kg de lactosa por día) – 0,0345 × kg de leche por día]. La energía secretada en leche fue calculada de acuerdo con el NRC (2001) como: NE_L en leche, Mcal/día = (0,0929 × kg de grasa por día) + (0,0547 × kg de proteína por día) + (0,0395 × kg de lactosa por día).

La eficiencia de uso del nitrógeno se calculó como nitrógeno de la leche (g/día) / nitrógeno ingerido (g/día). La eficiencia alimentaria para la producción de leche se calculó como LCG 4% (kg/día) y LCS 4% / CMS (kg/día).

6.1.6 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (versión 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC). Los valores de composición de la leche previo al inicio del experimento fueron utilizados como covariable en sus respectivos análisis. Consumo, tasa de pasaje, flujo de nitrógeno microbiano, y producción y composición de leche fueron analizados como:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde Y_{ij} es la variable dependiente, T_i es el efecto fijo del tratamiento ($i = \text{Pas, C}_{5\text{km}}$ y Ayu), B_j es el efecto aleatorio del bloque ($j = 1$ a 10), y ε_{ij} es el error residual. Se utilizó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador.

Variables repetidas en el tiempo (comportamiento, fermentación del rumen y urea en suero) fueron analizadas con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + B_k + (T_i \times H_j) + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} es la variable dependiente, T_i es el efecto fijo del tratamiento ($i = \text{Pas}, C_{5\text{km}}$ y Ayu), H_j es el efecto fijo de la hora del día ($j = 1$ a 24), B_k es el efecto aleatorio del bloque ($k = 1$ a 10), $T_i \times H_j$ = efecto fijo de la interacción tratamiento y hora del día y ε_{ij} es el error residual. Se utilizó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador y la estructura de covarianza SP(POW) fue utilizada.

La distribución de los residuos fue testada utilizando el procedimiento PROC UNIVARIATE de SAS. *Outliers* fueron eliminados y cuando los datos no presentaron distribución normal, el procedimiento BOX-COX fue testado para la transformación de los datos. La concentración de ácido butírico (mM) se transformó a la inversa y la concentración de células somáticas en leche se transformó logarítmicamente antes de los análisis estadísticos (Phyn et al., 2014). Se utilizaron contrastes ortogonales planificados previamente para separar los grupos que ayunaron de los que no lo hicieron ($\text{Pas vs. } C_{5\text{km}} + \text{Ayu}$) y para separar el grupo que caminó (y ayunó) del efecto exclusivo del ayuno ($C_{5\text{km}}$ vs. Ayu). Además, las variables con medidas repetidas se compararon utilizando el test de Tukey y los datos son presentados en figuras. Todos los resultados son presentados como media \pm ESM. Las diferencias se declararon cuando $P \leq 0,05$ y las tendencias se discuten cuando $0,05 < P \leq 0,10$.

6.2 Resultados

El CMS total, el consumo de nutrientes y la tasa de pasaje de partículas de la dieta no se vieron afectados por la caminata de 5 km/día o el ayuno, pero la digestibilidad de la FDN fue menor para el grupo Ayu (Tabla 6).

Los datos de producción de leche son presentados en la Tabla 7. La producción de leche (kg/día) fue menor para las vacas Ayu en contraste con las vacas $C_{5\text{km}}$. Fue observada una tendencia ($P = 0,093$) de mayor producción de LCG 4% para el grupo Pas en contraste a los demás tratamientos. Adicionalmente fue encontrada una tendencia ($P = 0,093$) de menor LCS 4% para el grupo Ayu en contraste al grupo $C_{5\text{km}}$. La concentración de grasa y lactosa en la leche fue similar para todos los tratamientos, pero la concentración de proteína fue mayor en el grupo Ayu que para el grupo $C_{5\text{km}}$. La producción de grasa y proteína de la leche no se vio afectada por los tratamientos, pero las vacas del tratamiento Pas produjeron más lactosa que los demás tratamientos. La concentración de nitrógeno ureico en leche fue mayor para las vacas $C_{5\text{km}}$ en comparación con Ayu. La concentración de células somáticas en leche fue menor para el grupo Pas. La eficiencia alimentaria no se vio afectada por los tratamientos (Tabla 7).

Tabla 6. Consumo y digestibilidad de los nutrientes, y tasa de pasaje de partículas de vacas que pastoreaban, caminaban o ayunaban

ítem	Tratamientos ¹			ESM ²	Contrastes ortogonales ³	
	Pas	C _{5km}	Ayu		Pas vs. C _{5km} +Ayu	C _{5km} vs. Ayu
<i>CMS, kg/día</i>						
Pastura mezcla	14,6	15,7	15,0	0,740	0,823	0,270
Cascarilla de soja	3,0	3,2	2,9	0,254	0,502	0,508
Total	17,6	18,9	17,9	0,846	0,665	0,227
<i>Consumo de nutrientes, kg/día</i>						
MO	16,1	17,3	16,3	0,805	0,608	0,252
FDN	7,2	7,7	7,2	0,358	0,593	0,239
Proteína cruda	3,2	3,5	3,3	0,163	0,619	0,266
<i>Digestibilidad, %</i>						
MS	64,8	65,6	65,6	0,734	0,118	0,253
MO	67,3	70,4	66,5	2,099	0,324	0,246
FDN	51,5	58,8	44,6	2,084	<0,001	0,015
Proteína cruda	66,1	69,6	65,9	2,376	0,505	0,311
<i>Tasa de pasaje⁴</i>						
K1, h ⁻¹	0,04	0,04	0,04	0,003	0,522	0,694
K2, h ⁻¹	0,40	0,23	0,31	0,094	0,941	0,227
TMRR, h	22,1	24,7	23,2	1,824	0,913	0,259
TMRC, h	3,4	4,5	4,8	0,557	0,155	0,134
TT, h	8,0	7,5	8,5	0,513	0,159	0,488
TMRT, h	37,1	41,1	40,3	1,764	0,593	0,100

¹Pas = pastoreo, las vacas tenían acceso al pasto inmediatamente después del ordeño de la mañana y permanencia en el pasto hasta inmediatamente empezar el ordeño de la tarde. C_{5km} = Caminata, las vacas caminaban 2,5 km para acceder al pasto después del ordeño de la mañana y caminaban 2,5 km previo al ordeño de la tarde, totalizando una caminata extra de 5 km/día para acceder a la pastura. Ayu = Ayuno, las vacas se mantuvieron en un corral sin acceso a alimento ni agua durante el tiempo que el grupo C_{5km} caminó.

²Error estándar de la media.

³Contrastes ortogonales para separar los grupos que ayunaron de los que no lo hicieron (Pas vs. C_{5km}+Ayu) y para separar el grupo que caminó (y ayunó) del efecto exclusivo del ayuno (C_{5km} vs. Ayu).

⁴k1 es la tasa de pasaje desde el retículo rumen, k2 es la tasa de pasaje desde el ciego-colon, TMRR es el tiempo medio de retención en retículo-rumen, TMRC es el tiempo medio de retención en ciego-colon, TT es el tiempo del tránsito, TMRT es el tiempo medio de retención total.

Tabla 7. Producción y composición de la leche de vacas que pastoreaban, caminaban o ayunaban

ítem	Tratamientos ¹			ESM ²	Contrastes ortogonales ³	
	Pas	C _{5km}	Ayu		Pas vs. C _{5km} +Ayu	C _{5km} vs. Ayu
<i>Producción</i>						
Producción de leche, kg/día	19,3	19,5	17,8	1,163	0,259	0,014
LCG ⁴ 4%, kg/día	20,6	19,7	19,0	0,681	0,093	0,415
LCS ⁵ 4%, kg/día	20,3	20,6	19,2	0,748	0,562	0,093
NE _L en leche ⁶ , Mcal/día	15,9	14,9	14,6	0,506	0,035	0,573
Grasa, %	4,09	4,32	3,98	0,247	0,779	0,138
Proteína, %	3,37	3,32	3,44	0,064	0,786	0,014
Lactosa, %	4,98	4,98	4,97	0,033	0,946	0,627
Grasa, kg/día	0,83	0,81	0,74	0,041	0,235	0,108
Proteína, kg/día	0,70	0,68	0,65	0,023	0,102	0,153
Lactosa, kg/día	1,05	0,97	0,96	0,039	0,021	0,781
Nitrógeno ureico, mg/dL	15,1	17,5	16,3	0,745	<0,001	0,045
CCS Log ₁₀ ⁷ , 1000 cel/mL	2,07	2,14	2,16	0,048	0,040	0,707
<i>Eficiencia alimentaria</i>						
N en leche / N ingerido (g/día)	0,21	0,19	0,19	0,007	0,325	0,156
LCG 4% / CMS (kg/día)	1,06	1,10	1,15	0,058	0,393	0,496
LCS 4% / CMS (kg/día)	1,16	1,10	1,07	0,054	0,366	0,455

¹Pas = pastoreo, las vacas tenían acceso al pasto inmediatamente después del ordeño de la mañana y permanencia en el pasto hasta inmediatamente empezar el ordeño de la tarde. C_{5km} = Caminata, las vacas caminaban 2,5 km para acceder al pasto después del ordeño de la mañana y caminaban 2,5 km previo al ordeño de la tarde, totalizando una caminata extra de 5 km/día para acceder a la pastura. Ayu = Ayuno, las vacas se mantuvieron en un corral sin acceso a alimento ni agua durante el tiempo que el grupo C_{5km} caminó.

²Error estándar de la media.

³Contrastes ortogonales para separar los grupos que ayunaron de los que no lo hicieron (Pas vs. C_{5km}+Ayu) y para separar el grupo que caminó (y ayunó) del efecto exclusivo del ayuno (C_{5km} vs. Ayu).

⁴La producción de leche corregida por grasa a 4% fue calculada de acuerdo con el NRC (2001), como: LCG 4% = (0,4 × kg de leche por día) + [15 × (grasa % /100) × kg de leche por día].

⁵La producción de leche corregida por sólidos a 4% fue calculada de acuerdo con Tyrrell and Reid (1965) como, LCS 4% = [(12,24 × kg de grasa por día) + (7,10 kg de proteína por día) + (6,35 × kg de lactosa por día) – 0,0345 × kg de leche por día].

⁶La energía secretada en leche fue calculada de acuerdo con el NRC (2001) como, NE_L en leche, Mcal/día = (0,0929 × kg de grasa por día) + (0,0547 × kg de proteína por día) + (0,0395 × kg de lactosa por día).

⁷Concentración de células somáticas. Datos con transformación logarítmica (Phyn et al., 2014).

Se encontró interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P < 0,001$) para el comportamiento. Mientras que la mayor actividad de pastoreo se observó durante las primeras horas después del ordeño matutino y vespertino para los grupos C_{5km} y Pas, las vacas del tratamiento Ayu dedicaron más tiempo al pastoreo justo antes del ordeño matutino y dos horas después del período de ayuno matutino (Figura 3A). Por la mañana, luego del período de ayuno, las vacas del grupo Ayu continuaron rumiando, a pesar de tener acceso al pasto (Figura 3B). Las vacas C_{5km} permanecieron menor

proporción del tiempo de pie que las vacas Ayu (0,08 vs. 0,15, ESM = 0,013, $P < 0,001$ para C_{5km} vs. Ayu) y las vacas que Ayu permanecieron más tiempo rumiando de pie que las vacas C_{5km} (0,06 vs. 0,11, ESM = 0,009, $P < 0,001$ para C_{5km} vs. Ayu).

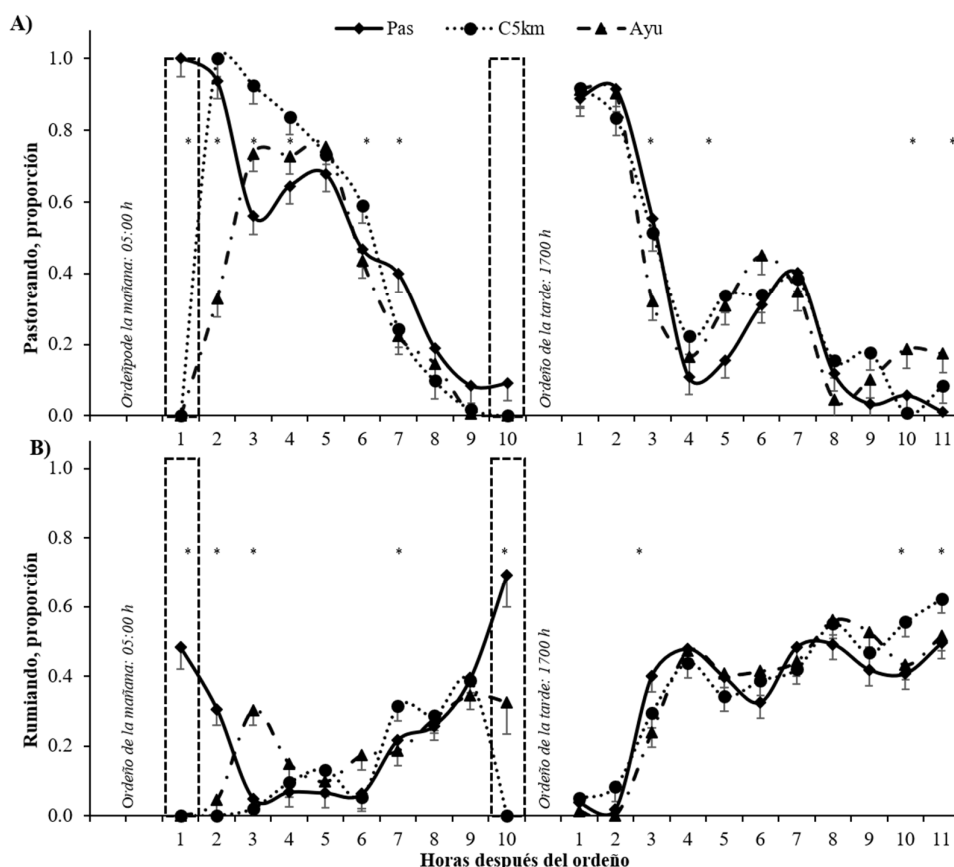


Figura 3. Comportamiento (expresado como proporción del total de observaciones) de vacas lecheras que, Pas = pastoreo, las vacas tenían acceso al pasto inmediatamente después del ordeño de la mañana y permanencia en el pasto hasta inmediatamente empezar el ordeño de la tarde. C_{5km} = Caminata, las vacas caminaban 2,5 km para acceder al pasto después del ordeño de la mañana y caminaban 2,5 km previo al ordeño de la tarde, totalizando una caminata extra de 5 km/día para acceder a la pastura. Ayu = Ayuno, las vacas se mantuvieron en un corral sin acceso a alimento ni agua durante el tiempo que el grupo C_{5km} caminó. Los momentos de los tratamientos son presentados en línea punteada. T = tratamiento (Pas, C_{5km} y Ayu), H = hora del día, $T \times H$ = Interacción tratamiento por hora del día. (A) Pastoreando, (T, $P = 0,018$; H, $P < 0,001$; $T \times H$, $P < 0,001$). (B) Rumiando (T, $P = 0,003$; H, $P < 0,001$; $T \times H$, $P < 0,001$). Los asteriscos (*) indican al menos una diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos en cada punto de tiempo, cuando T y $T \times H \leq 0,05$.

Tabla 8. Flujo de nitrógeno microbiano de vacas que pastoreaban, caminaban o ayunaban

ítem	Tratamientos ¹			ESM ²	Contrastes ortogonales ³	
	Pas	C _{5km}	Ayu		Pas vs. C _{5km} +Ayu	C _{5km} vs. Ayu
<i>Derivados de purinas, mmol/día</i>						
Derivados de purina totales, mmol/día	362,8	320,3	272,8	36,35	0,125	0,330
Alantoína, mmol/día	202,0	160,4	139,7	20,70	0,106	0,106
Ácido úrico, mmol/día	160,8	159,9	133,1	24,47	0,372	0,974
Flujo de N microbiano, g/día	240,5	210,1	174,9	25,74	0,114	0,325
N microbiano / MO digestible, g/kg	21,5	16,9	21,3	4,01	0,661	0,387

¹Pas = pastoreo, las vacas tenían acceso al pasto inmediatamente después del ordeño de la mañana y permanencia en el pasto hasta inmediatamente empezar el ordeño de la tarde. C_{5km} = Caminata, las vacas caminaban 2,5 km para acceder al pasto después del ordeño de la mañana y caminaban 2,5 km previo al ordeño de la tarde, totalizando una caminata extra de 5 km/día para acceder a la pastura. Ayu = Ayuno, las vacas se mantuvieron en un corral sin acceso a alimento ni agua durante el tiempo que el grupo C_{5km} caminó.

²Error estándar de la media.

³Contrastes ortogonales para separar los grupos que ayunaron de los que no lo hicieron (Pas vs. C_{5km}+Ayu) y para separar el grupo que caminó (y ayunó) del efecto exclusivo del ayuno (C_{5km} vs. Ayu).

La excreción urinaria de derivados de purinas, el flujo de proteínas microbianas y la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana en el rumen fueron similares para todos los tratamientos (Tabla 8). En promedio para todos los tratamientos se sintetizó 124 g de proteína microbiana/kg de MO ingerida ($P > 0,05$). La concentración sérica de urea fue mayor para las vacas C_{5km} en comparación con las vacas lecheras Ayu (12,5 vs. 11,4 mM, ESM = 0,42 mM, $P = 0,009$, para C_{5km} vs. Ayu). No se encontró interacción entre tratamientos y hora para la concentración sérica de urea ($T \times H$, $P > 0,05$). El score de condición corporal no se vio afectado por los tratamientos (3,1, ESM = 0,13, Pas vs. C_{5km} + Ayu $P = 0,11$, C_{5km} vs. Ayu $P = 0,719$).

Las vacas del grupo Ayu mostraron mayor concentración de AGVs y menor pH ruminal (Figura 4A). El menor pH ruminal y la mayor concentración de AGVs del grupo Ayu fue dado en el período de nocturno de pastoreo (entre las 23:00 y 04:00 h) (Figura 4B). De manera general, las proporciones de los AGVs representaron, en promedio, 68, 21 y 11% para el ácido acético, propiónico y butírico respectivamente.

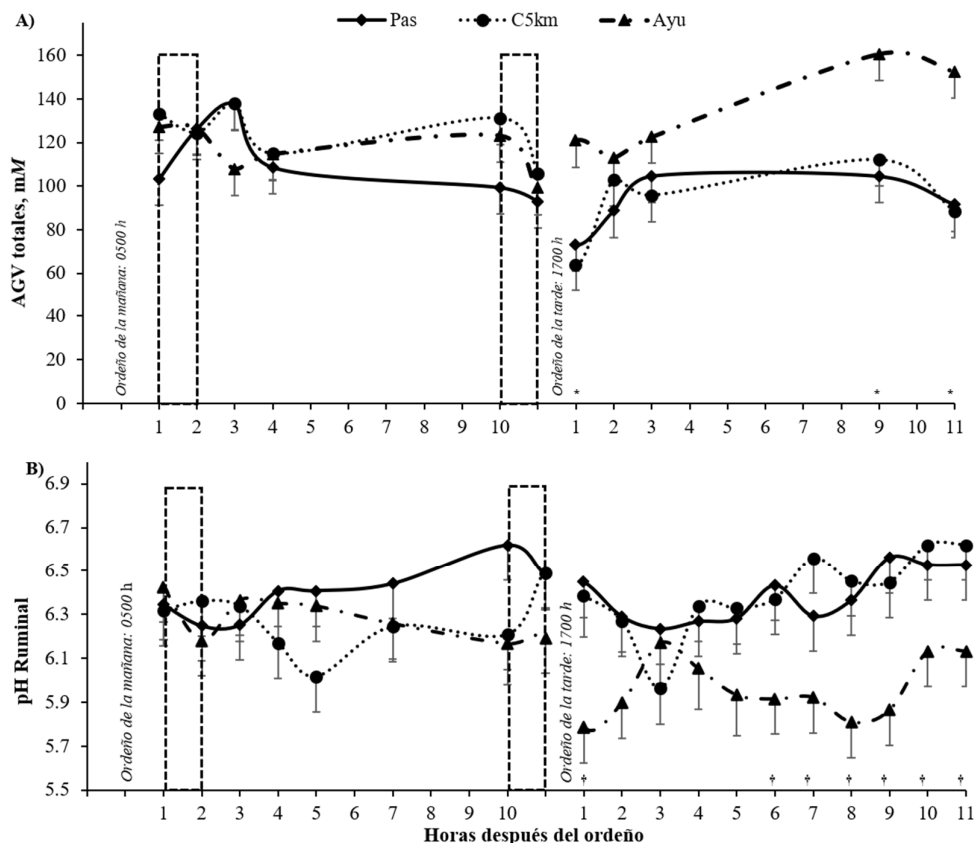


Figura 4. Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y pH ruminal de vacas lecheras que, Pas = pastoreo, las vacas tenían acceso al pasto inmediatamente después del ordeño de la mañana y permanencia en el pasto hasta inmediatamente empezar el ordeño de la tarde. C_{5km} = Caminata, las vacas caminaban 2,5 km para acceder al pasto después del ordeño de la mañana y caminaban 2,5 km previo al ordeño de la tarde, totalizando una caminata extra de 5 km/día para acceder a la pastura. Ayu = Ayuno, las vacas se mantuvieron en un corral sin acceso a alimento ni agua durante el tiempo que el grupo C_{5km} caminó. Los momentos de los tratamientos son presentados en línea punteada. T = tratamiento (Pas, C_{5km} y Ayu), H = hora del día, T × H = Interacción tratamiento por hora del día. **(A)** AGV, mM (T, $P < 0,001$; H, $P < 0,001$; T × H, $P = 0,015$). **(B)** pH ruminal (T, $P < 0,001$; H, $P = 0,369$; T × H, $P = 0,254$). Los asteriscos (*) indican al menos una diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos en cada punto de tiempo, cuando T y T × H $\leq 0,05$. Las cruces (†) indican al menos una diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre tratamientos en cada punto de tiempo, cuando T × H $> 0,05$.

Capítulo 7. Experimento III

Los objetivos de este estudio fueron investigar los efectos inmediatos y a largo plazo de uno vs. dos ordeños diarios durante la lactancia temprana en la producción de leche, el consumo de alimento y el estatus energético de las vacas lecheras primíparas, alimentadas con pastura y RPM. Adicionalmente, a partir de los datos del presente experimento se evaluó la relación entre el balance energético y las concentraciones séricas AGNE y β HB durante la lactancia temprana de vacas lecheras primíparas, y empleamos el set de muestras de inicio de lactancia de ensayo III para contribuir al desarrollo de esta idea.

7.1 Materiales y métodos

7.1.1 Diseño Experimental, Tratamientos y Animales

El experimento se realizó en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en Colonia, Uruguay, y cumplió con las regulaciones del Comité de Bioética del Instituto (Protocolo: INIA 2015.42). Para el experimento se seleccionaron 20 vacas primíparas Holstein-Friesian 2 semanas antes de la fecha esperada de parto y se bloquearon según la fecha de parto (entre marzo y abril de 2014), peso vivo de $605 \pm 67,2$ kg (media a la semana $-2 \pm$ desviación estándar), espesor de grasa subcutánea de $3,6 \pm 1,49$ cm y score de condición corporal de $3,6 \pm 0,29$, escala de 1 a 5 (Edmonson et al., 1989). Las vacas fueron asignadas, al tercer día de lactancia, a (i) un ordeño diario (**UOD**) o (ii) dos ordeños diarios (**DOD**) hasta la semana 8 de lactación (período de tratamiento). Después del período de tratamiento, todas las vacas se ordeñaron 2 veces al día hasta la semana 43 de lactancia (período posterior al tratamiento). Las vacas se ordeñaron a las 0600 horas (UOD) o a las 0600 y 1700 horas (DOD). Durante el ordeño de la tarde, las vacas UOD no ingresaron a la sala de ordeño y fueron mantenidas en un corral a 50 m de la sala de ordeño, sin acceso a comida ni agua.

7.1.2 Manejo de la alimentación durante el período experimental

Todas las vacas recibieron la misma dieta durante todo el experimento. Antes del parto (-28 días), las vacas fueron alimentadas una RTM, formuladas para cumplir con los requerimientos de vaquillonas de 590 kg (NRC, 2001). Durante el período de manejo preparto, el CMS fue de $8,2 \pm 0,34$ kg/día. En el postparto, la dieta se formuló para suplir los requerimientos de vacas que pesan 520 kg y producían 30

kg de leche/día. El 70% del CMS estimado (NRC, 2001) se ofreció individualmente como una RPM (15,2 ± 1,2 kg MS/vaca por día), después del ordeño de la mañana. Después del ordeño de la tarde, todas las vacas pastorearon avena (*Avena sativa* L.; var. INIA Halley), con un tamaño de parcela ajustado para proporcionar 12 kg de MS/vaca por día (calculado a una altura de 0 cm). Después de la semana 13 de lactancia, los animales permanecieron con la misma dieta, pero se ofreció la RPM y el pasto para todas las vacas juntas. La Tabla 9 presenta los ingredientes de la dieta, así como la composición química de la RTM, RPM y de la pastura durante las primeras 13 semanas de lactación. Durante el período experimental el ensilaje de maíz, el fardo de trigo y el grano húmedo de maíz presentaron en promedio 26,0, 74,9 y 66,9% de MS, 8,3, 5,1 y 8,9% de proteína cruda, y 47,0, 83,6 y 6,5% de FDN.

Tabla 9. Ingredientes y composición media de nutrientes (desviación estándar entre paréntesis) de los componentes de la dieta (% MS, a menos que se indique lo contrario) durante el período experimental

ítem	Preparto ¹	Postparto ⁴	
<i>Ingredientes de la dieta, % da MS</i>			
Ensilaje de maíz	59,7	49,7	
Grano húmedo de maíz	10,0	37,8	
Harina de soja	16,4	7,33	
Heno de paja de trigo	12,3	2,13	
Urea	0,4	0,48	
Premix vitamínico y mineral ²	1,2	2,56	
<i>Composición nutricional</i>			
	RTM	RPM	Pastura
MS, % del total de dieta	35,4 (1,11)	38,0 (3,04)	14,6 (4,02)
MO	91,4 (0,56)	93,4 (0,41)	88,9 (1,46)
FDN	41,3 (0,68)	32,4 (2,72)	43,6 (4,35)
FDA	21,4 (0,46)	16,4 (1,59)	21,5 (3,35)
Extracto etéreo	3,2 (0,19)	3,0 (0,05)	4,1 (0,44)
Proteína cruda	14,0 (1,48)	13,0 (0,92)	17,4 (1,83)
NE _L ³ , Mcal/kg de MS	1,61	1,66	1,73

¹Inicio a la tercera semana previa al parto, siendo ofertada una ración totalmete mezclada.

²Aportando en preparto (por kg de MS de premix vitamínico mineral): 3 g de sal, y un producto comercial conteniendo (por kg de MS): 50 g de Ca, 50 g de P, 220 g de Mg, 1.600 mg de Cu, 4.900 mg de Zn, 25 mg de Se, 2.900 mg de Mn, 65 mg de I, 10 mg de Co, 178.000 IU de vitamina A, 35.000 IU de vitamina D3, 7.200 IU de vitamina E y 1,3 g de Monensina (Rumensin®200, Elanco Animal Health). Aportando en posparto (por kg de MS de premix vitamínico mineral): 3 g de sal, 1,9 g de bicarbonato de sodio, 1,9 g de carbonato de calcio y un producto comercial conteniendo (por kg de MS): 140 g de Ca, 14 g de P, 30 g de Mg, 150 g de Na, 110 g de Cl, 874 mg de Cu, 2.668 mg de Zn, 9 mg de Se, 1.090 mg de Mn, 23 mg de I, 3 mg de Co, 65.707 IU de vitamina A, 13.141 IU de vitamina D3, 298 IU de vitamina E y 1 g de Monensina (Rumensin®200, Elanco Animal Health).

³Calculado de acuerdo con el NRC (2001).

⁴70% del CMS estimado (NRC, 2001) fue individualmente ofrecido como una ración parcialmente mezclada (15,2 ± 1,2 kg MS/vaca por día). Adicionalmente las vacas pastoreaban avena (*Avena sativa* L.; var. INIA Halley) con una disponibilidad de 12 kg MS/vaca por día (calculado a una altura de 0 cm).

7.1.3 Determinaciones y muestreos

El consumo de pastura y de la RPM se midió semanalmente durante las primeras 13 semanas de lactancia durante tres días consecutivos por semana. El pasto se manejó bajo pastoreo en franjas, con dos vacas de cada tratamiento por parcela. El consumo de la pastura se estimó como la diferencia entre la masa de forraje previa y posterior al pastoreo en cada parcela (Haydock y Shaw, 1975). La masa del forraje se estimó antes y después del pastoreo (50 mediciones cada una), utilizando un medidor de placa ascendente automático (Filip's Manual Folding Plate Meter, JENKIP, New Zealand), que se calibró semanalmente. Para la calibración, se realizaron cinco mediciones en la pastura antes y después del pastoreo, cortando el forraje a nivel del suelo (0,1 m²) en el local de la medición con el plato. El forraje se secó en estufa de aire forzado a 55°C durante al menos 48 horas y se pesó. Se crearon dos ecuaciones con los puntos de medición de calibración (una para la condición previa al pastoreo y otra para la condición posterior al pastoreo). El consumo de la RPM se determinó individualmente pesando la cantidad ofrecida y rechazada una vez al día. El CMS total se calculó como la suma de consumo de pastura y RPM de cada unidad experimental (2 vacas por unidad).

La producción de leche individual se registró automáticamente en cada ordeño durante 43 semanas de lactancia, utilizando DairyPlan C21® (GEA Farm Technologies, Düsseldorf, Alemania). Se recolectaron muestras de leche individuales en ordeños consecutivos, dos veces por semana durante las primeras 13 semanas de lactancia y dos veces por mes hasta el final de la lactancia. En cada ordeño se recolectaron dos muestras de leche (50 mL cada una), una con el conservante bronopol (almacenada a -4°C hasta su análisis) y otra sin conservante (almacenada a -20°C hasta su análisis).

El peso vivo, el score de condición corporal y el espesor de grasa subcutánea se registraron después del ordeño matutino (período posparto) y antes de la alimentación de la mañana, en las semanas -2, -1, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 26, 37, y 43 (parto = 0). El peso vivo se determinó con una balanza digital. El score de condición corporal fue estimado por el mismo observador usando intervalos de 0,25 unidades en una escala de 1 a 5 (Edmonson et al., 1989). El espesor de grasa subcutánea se determinó en la región sacral con evaluación ecográfica (Aloka SSD-500, Aloka Ltd., Tokio, Japón) utilizando un transductor lineal a una frecuencia de 5,0 MH (Schröder y Staufenbiel, 2006). Se excluyó el grosor de la piel en la medición ecográfica.

Las estimaciones del contenido de proteínas corporales y del contenido de grasa corporal se realizaron mediante la técnica de dilución de urea (Agnew et al., 2005) a las -1, 4, 8 y 12 semanas (parto = 0). Para ello, las vacas se pesaron después del ordeño matutino (período posparto) y antes de la alimentación por la mañana, y se tomó una muestra de sangre de 4 mL de la vena yugular para determinar la concentración sérica de urea. Posteriormente, se infundió una solución de urea (200 g/L), previamente filtrada en un

filtro de nitrocelulosa de 45 μm , en la vena yugular durante un período de hasta 2 min. El volumen inyectado se calculó para proporcionar 130 mg de urea por kg de peso vivo. Doce minutos después del final de la infusión, se tomó otra muestra de sangre de la vena yugular para determinar la concentración sérica de urea (como se describe más adelante).

Se recolectaron tres muestras de sangre en las semanas -2, -1, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11 y 12 (parto = 0) de la vena yugular, una en tubos sin anticoagulante, una con heparina sódica y una en tubos que contiene fluoruro de sodio más oxalato de potasio. Las muestras sin anticoagulantes se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora, se colocaron en heladera a 4°C durante 2 horas, se centrifugaron (2.800 \times g, 10 min a temperatura ambiente) y luego se almacenó el suero a -20°C hasta su análisis. Las muestras que contenían anticoagulante se centrifugaron (2.800 \times g, 10 min a temperatura ambiente) y el plasma se almacenó a -20°C hasta su análisis.

7.1.4 Análisis laboratoriales

El contenido de MS se determinó mediante secado a 105°C durante al menos 16 horas (Método ID 934.01; AOAC, 1990). La ceniza se determinó mediante la combustión a 600°C durante 3 horas y la MO mediante la diferencia de masa (Método ID 942.05; AOAC, 1990). El nitrógeno total se analizó con el método Kjeldahl (Method ID 984.13; AOAC, 1990) y la proteína cruda fue calculada como nitrógeno total \times 6,25. La concentración de extracto de éter se determinó en un sistema de reflujo (Soxtherm 2000 S 306 M, Gerhardt; Königswinter, Alemania) con éter etílico a 180°C durante 2 horas (Method ID 920.39; AOAC, 1990). El NDF incluyó cenizas y se analizó según los procedimientos descritos por Mertens (2002) con el uso de α -amilasa termoestable y sin sulfito, y la concentración de ADF se analizó secuencialmente según el Método ID 973.18 de AOAC (AOAC, 1990), excepto que las muestras se pesaron en bolsas de filtro de poliéster (porosidad de 16 μm) y se trataron con detergente neutro y ácido en una autoclave a 110°C durante 40 min (Senger et al., 2008).

Se utilizaron muestras de leche individuales con el conservante bronopol para determinar grasa, proteína, caseína total, lactosa y urea mediante análisis de espectroscopia infrarroja (Bentley Model 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN), y células somáticas utilizando un contador celular automatizado (Foss A/S eléctrico). Se analizaron muestras de leche individuales sin conservante para determinar la conductividad eléctrica utilizando un medidor Orion 105.

Para el análisis metabólico de plasma y suero, se utilizó un auto analizador Vitalab Selectra-2 (Vital Scientific, Dieren, Países Bajos) junto con los estándares Standatrol y Randox Hn1530. Se analizaron los metabolitos plasmáticos y séricos: glucosa, AGNE, β HB y urea con sus respectivos kits comerciales

(Liquid Enzymatic Glycemia AA, Wiener Laboratories SAIC Riobamba, Rosario, Argentina; Wako NEFA-HR (2), Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japón; d-3-hidroxibutirato, Randox Laboratories, Crumlin, Reino Unido, y urea UV cinética líquida, Wiener Laboratories SAIC Riobamba, Rosario, Argentina). El coeficiente de variación intra e inter ensayo de todas las determinaciones fue igual o inferior al 6,5%.

7.1.5 Cálculos

El balance energético se estimó en las semanas 1, 3, 4, 6, 8, 11 y 12 de lactancia, utilizando información de cada animal, como: balance energético (Mcal NE_L/día) = consumo de energía (Mcal de NE_L/día) - [requerimiento de mantenimiento (Mcal de NE_L/día) + requerimiento de crecimiento (Mcal de NE_L/día) + requerimiento de lactancia (NE_L en leche, Mcal/día)]. Para las estimaciones se consideró una distancia total de caminata entre la sala de ordeño y la parcela de pastura de 1000 m/día. El consumo de energía de la RPM y de la pastura se calculó como CMS × concentración de NE_L (Mcal/kg MS). Los requerimientos de energía se estimaron de acuerdo con NRC (2001). El requerimiento para mantenimiento se calculó como 0,08 × peso vivo^{0,7}. Los requerimientos de crecimiento se calcularon como 0,0635 × peso en vacío equivalente, kg^{0,75} × ganancia de peso en vacío, kg/día^{1,097}. La energía secretada en leche fue calculada de acuerdo con el NRC (2001) como: NE_L en leche, Mcal/día = (0,0929 × kg de grasa por día) + (0,0547 × kg de proteína por día) + (0,0395 × kg de lactosa por día).

La producción de leche corregida por grasa fue calculada de acuerdo con el NRC (2001), como: LCG 4% = (0,4 × kg de leche por día) + [15 × (grasa % /100) × kg de leche por día]. Leche corregida por sólidos fue calculado de acuerdo con Tyrrell and Reid (1965) como: LCS 4% = [(12,24 × kg de grasa por día) + (7,10 kg de proteína por día) + (6,35 × kg de lactosa por día) - 0,0345 × kg de leche por día].

La eficiencia para el uso del nitrógeno se calculó como nitrógeno de la leche (g/día) / nitrógeno ingerido (g/día). La eficiencia del uso de la energía ingerida fue calculada como NE_L en leche (Mcal/día) / NE_L consumida (Mcal/día). La eficiencia alimentaria para la producción de leche se calculó como LCG 4% (kg/día) y LCS 4% / CMS (kg/día).

El contenido de proteína y grasa corporal se calcularon de acuerdo con las ecuaciones de Agnew et al. (2005) como: contenido de proteína corporal, kg = 5,0 + (0,036 × VEU₁₂) + (0,105 × peso vivo), donde VEU₁₂ es el volumen de espacio de urea, calculado dividiendo la cantidad de urea infundida (mg) por la diferencia en la concentración sérica de urea (mg/L) antes y después de la infusión (a los 12 min) y, el contenido de grasa corporal, kg = -41 + (-0,036 × (VEU₁₂ / PCV)) + (0,192 × peso vivo) + (-1,32 × kg de leche) + (11,19 × score de condición corporal), donde PCV es el peso corporal en vacío, calculado

como: $PCV, \text{ kg} = -28,6 + (0,143 \times \text{VEU}_{12}) + (0,677 \times \text{peso vivo}) + (-1,03 \times \text{kg de producción de leche}) + (12,72 \times \text{escore de condición corporal})$. Para las determinaciones de grasa y proteína corporal fueron utilizadas las ecuaciones con mejor ajuste (mejor coeficiente de determinación, R^2) recomendado por Agnew et al. (2005).

7.1.6 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (versión 9.1; SAS® Institute Inc., Cary, NC). Se analizaron las variables para el período de tratamiento, el período posterior al tratamiento y el período completo. Los valores preparto se utilizaron como covariables en sus respectivos análisis de datos. Las mediciones repetidas se analizaron como estructura de covarianza autorregresiva de primer orden AR(1) cuando los intervalos de tiempo estaban espaciados uniformemente (producción de leche), y la potencia espacial SP(POW) cuando las variables no estaban espaciadas uniformemente (composición de la leche, consumo, corporales y variables metabólicas). Se utilizó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador. Se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + FO_i + S_j + B_k + (FO_i \times S_j) + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es la variable dependiente, FO_i es el efecto fijo de la frecuencia de ordeño ($i = \text{UOD}$ o DOD), S_j es el efecto fijo de la semana ($j = 1$ a $12, 13$ o 43), B_k es el efecto aleatorio del bloque ($k = 1$ a 10), $FO_i \times S_j$ es el efecto fijo de la interacción tratamiento y semana, y ε_{ijk} es el error residual.

Los datos de la producción total y rendimiento de sólidos de leche se analizaron como:

$$Y_{ij} = \mu + FO_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

donde Y_{ij} es la variable dependiente, FO_i es el efecto fijo de la frecuencia de ordeño ($i = \text{UOD}$ o DOD), B_j es el efecto aleatorio del bloque ($k = 1$ a 10) y ε_{ij} es el error residual. Se utilizó el procedimiento de Kenward-Rogers para ajustar los grados de libertad del denominador.

Antes del análisis, se analizó la distribución normal de los residuos con el test de Shapiro-Wilk (cuando había menos de 50 observaciones) o de Kolmogorov-Smirnov (cuando había más de 50 observaciones), utilizando el PROC UNIVARIATE. Cuando los datos no mostraron una distribución normal, se utilizó el proceso BOX-COX para transformar el conjunto de datos. El contenido de grasa de la leche, el rendimiento de proteína de la leche y la urea en sangre se transformaron en raíces cuadradas y la

concentración de células somáticas se transformó logarítmicamente antes de los análisis estadísticos (Phyn et al., 2014). Las medias de los mínimos cuadrados se compararon mediante el test de Tukey y las diferencias se declararon en $P \leq 0,05$. Los resultados se presentaron como la media \pm ESM.

Adicionalmente, para evaluar la relación lineal entre balance energético, AGNE y β HB se analizó el procedimiento PROC MIXED de SAS (versión 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC) utilizando un modelo de covarianza varianza en el que la frecuencia de ordeño (UOD o DOD) se incluyó como un efecto fijo. Este análisis generó un error cuadrático medio (RMSE) de la relación lineal, un índice de la precisión con la que la ecuación predice el dependiente (Y) basado en valores independientes (X).

7.2 Resultados

El CMS de la pastura, de la RPM, así como el consumo total durante las primeras 13 semanas de lactancia no difirieron entre los tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10. Consumo hasta la semana 13 de lactación de vacas primíparas ordeñadas una o dos veces al día durante las primeras 8 semanas de lactación

	Semana ¹	Tratamiento ²			P-Valor ⁴		
		UOD	DOD	ESM ³	FO	S	FO \times S
<i>CMS, kg/día</i>							
RPM ⁵	1 a 8	12,4	12,6	0,314	0,733	0,002	0,658
	9 a 13	12,7	12,4	0,251	0,326	0,006	0,716
Pastura ⁶	1 a 8	7,1	7,4	0,506	0,652	0,619	0,837
	9 a 13	5,4	5,0	0,604	0,549	0,003	0,988
Total ⁷	1 a 8	19,8	19,7	0,594	0,855	0,148	0,160
	9 a 13	18,5	17,6	0,620	0,246	<0,001	0,829
<i>Consumo de nutrientes, kg/día</i>							
MO	1 a 8	18,1	17,9	0,44	0,771	0,228	0,280
	9 a 13	16,4	16,1	1,02	0,811	0,264	0,943
FDN	1 a 8	7,3	7,2	0,26	0,900	0,488	0,452
	9 a 13	6,4	6,3	0,50	0,828	0,383	0,971
Proteína cruda	1 a 8	2,9	2,9	0,10	0,899	0,487	0,452
	9 a 13	2,6	2,5	0,20	0,828	0,384	0,971

¹Semana 1 a 8 = período de tratamiento; semana 9 a 43 = período post tratamiento. Después del período de tratamiento todas las vacas fueron ordeñadas dos veces al día hasta el final de la lactación.

²UOD = un ordeño diario. DOD = dos ordeños diarios.

³Error estándar de la media.

⁴FO = Frecuencia de ordeño, S = semana de lactancia, FO \times S = interacción FO por S.

⁵Ración parcialmente mezclada. UOD: $n = 10$ y DOD: $n = 10$.

⁶Consumo de pastura. UOD: $n = 5$ y DOD: $n = 5$ (2 animales/unidad experimental).

⁷CMS total. UOD: $n = 5$ y DOD: $n = 5$ (2 animales/unidad experimental).

De manera general, hasta la semana 8 de lactación, las vacas UOD produjeron 534 kg menos de leche. La producción total de leche hasta la semana 8 de lactación fue 822 vs. 1356 kg, ESM = 43,7 kg, $P < 0,001$. Adicionalmente se observó menor producción de leche para las vacas UOD durante 13 semanas posttratamiento (Figura 5). La producción total de leche en el total de la lactación fue menor para las vacas UOD (5.530 vs. 6.502, ESM = 247,8 kg, $P = 0,018$). De manera general las vacas UOD presentaron mayor concentración de grasa y proteína en la leche (Tabla 11). La producción total en kg de proteína fue menor para las vacas UOD en contraste a las vacas en DOD (187,5 vs. 210,6 kg, ESM = 4,8 1 kg, $P = 0,007$), sin embargo, en kg de grasa no hubo diferencias (208 kg, ESM = 11,0 kg, $P = 0,919$). La NE_L en leche (Mcal/día) durante el período de tratamiento fue aproximadamente un 30% menor para las vacas UOD.

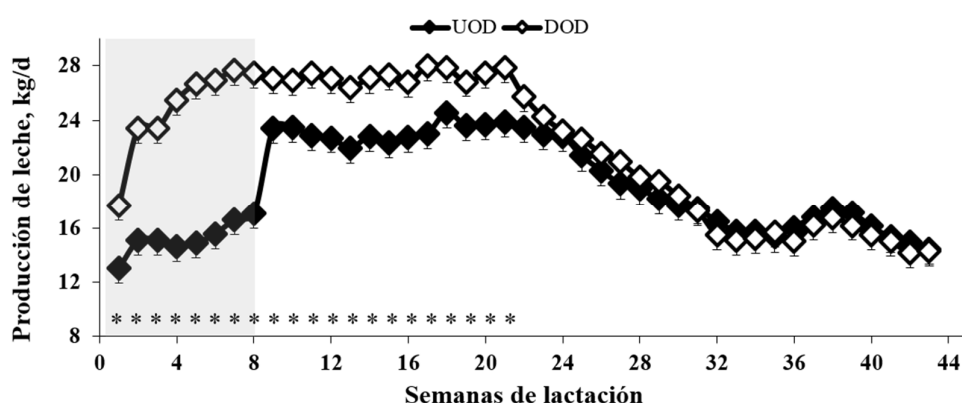


Figura 5. Producción de leche de vacas primíparas en régimen de UOD = un ordeño diario o, DOD = dos ordeños diarios durante las primeras 8 semanas de lactación. Después del período de tratamiento todas las vacas fueron ordeñadas dos veces al día hasta el final de la lactación (semana 43). FO = frecuencia de ordeño, S = semana, FO \times S = interacción entre FO y S. Producción de leche, kg/día, (FO, $P < 0,001$; S, $P < 0,001$; FO \times S, $P < 0,001$). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos en cada semana, cuando FO \times S $\leq 0,05$.

La concentración de células somáticas de la leche fue mayor para las vacas UOD durante toda la lactancia. La concentración del nitrógeno ureico en la leche fue mayor para las vacas UOD durante el período de tratamiento (25,3 vs. 23,2, ESM = 1,14 mg/dL, $P = 0,039$ para el efecto de tratamiento), sin diferencias después de la semana 8 a la 13 de lactación (22 mg/dL, ESM = 1,32 mg/dL, $P > 0,05$). La conductividad eléctrica de la leche (4,69, ESM = 0,08 mS, $P > 0,05$), y concentración de caseína (2,58, ESM = 0,03%, $P > 0,05$) no fueron diferentes entre los tratamientos. Durante el período de tratamiento las vacas UOD tuvieron aproximadamente 28, 45 y 50% menor eficiencia para el uso de la energía, del nitrógeno y de los kg de MS consumido, respectivamente. En el post tratamiento (semana 9 a 13 de lactación) las vacas UOD tuvieron, en promedio, 15,5% menor eficiencia que las vacas DOD (Tabla 11).

Tabla 11. Producción y composición de la leche, en vacas Holstein primíparas, ordeñadas una o dos veces al día durante las primeras 8 semanas de lactación

Item	Semana ¹	Tratamiento ²			P-Valor ⁴		
		UOD	DOD	ESM ³	FO	S	FO × S
<i>Producción de leche</i>							
Producción de leche, kg/día	1 a 8	15,3	24,9	0,381	<0,001	<0,001	0,002
	9 a 43	19,9	21,5	0,243	<0,001	<0,001	0,002
LCG ⁵ 4%, kg/día	1 a 8	17,1	22,7	0,535	<0,001	<0,001	0,012
	9 a 43	13,6	14,2	0,523	0,222	<0,001	0,876
LCS ⁶ 4%, kg/día	1 a 8	17,0	24,1	0,900	<0,001	0,009	0,129
	9 a 43	19,9	21,2	0,726	0,001	<0,001	0,379
NE _L en leche ⁷ , Mcal/día	1 a 8	12,8	18,1	0,368	<0,001	<0,001	0,003
	9 a 43	14,9	15,7	0,306	0,010	<0,001	0,300
Lactosa, %	1 a 8	4,78	5,07	0,039	<0,001	0,350	0,635
	9 a 43	4,92	5,00	0,021	<0,001	<0,001	0,948
Grasa, %	1 a 8	4,83	3,74	0,137	<0,001	0,001	0,495
	9 a 43	3,51	3,12	0,074	0,001	<0,001	0,975
Proteína, %	1 a 8	3,36	3,34	0,028	0,361	<0,001	0,073
	9 a 43	3,37	3,28	0,029	0,002	0,001	0,881
Lactosa, kg/día	1 a 8	0,72	1,23	0,019	<0,001	<0,001	<0,001
	9 a 43	1,01	1,17	0,020	<0,001	<0,001	0,005
Grasa, kg/día	1 a 8	0,73	0,87	0,029	<0,001	0,007	0,046
	9 a 43	0,72	0,71	0,020	0,781	<0,001	0,982
Proteína, kg/día	1 a 8	0,50	0,80	0,012	<0,001	<0,001	<0,001
	9 a 43	0,70	0,76	0,011	<0,001	<0,001	0,015
CCS Log ₁₀ ⁸ , 1000 cel/mL	1 a 8	2,19	1,75	0,062	<0,001	0,036	0,679
	9 a 43	2,23	1,83	0,064	<0,001	0,003	0,848
<i>Eficiencia alimentaria</i>							
N leche / N ingerido (g/día)	1 a 8	0,16	0,29	0,019	<0,001	0,361	0,534
	9 a 13	0,31	0,37	0,025	0,048	0,188	0,668
NE _L leche / NE _L ingerido, Mcal/día	1 a 8	0,43	0,60	0,024	<0,001	0,430	0,218
	9 a 13	0,61	0,72	0,029	0,005	0,567	0,702
LCG 4% / CMS (kg/día)	1 a 8	0,79	1,40	0,128	<0,001	0,393	0,794
	9 a 13	1,10	1,29	0,162	0,103	0,277	0,626
LCS 4% / CMS (kg/día)	1 a 8	0,75	1,42	0,120	<0,001	0,234	0,715
	9 a 13	1,13	1,36	0,149	0,019	0,373	0,638

¹Semana 1 a 8 = período de tratamiento; semana 9 a 43 = período post tratamiento. Después del período de tratamiento todas las vacas fueron ordeñadas dos veces al día hasta el final de la lactación.

²UOD = un ordeño diario. DOD = dos ordeños diarios.

³Error estándar de la media.

⁴FO = Frecuencia de ordeño, S = semana de lactancia, FO × S = interacción FO por S.

⁵La producción de leche corregida por grasa a 4% fue calculado de acuerdo con el NRC (2001), como: LCG 4% = (0,4 × kg de leche por día) + [15 × (grasa % /100) × kg de leche por día].

⁶Leche corregida por sólidos a 4% fue calculado de acuerdo con Tyrrell and Reid (1965) como, LCS 4% = [(12,24 × kg de grasa por día) + (7,10 kg de proteína por día) + (6,35 × kg de lactosa por día) – 0,0345 × kg de leche por día].

⁷La energía secretada en leche fue calculada de acuerdo con el NRC (2001) como NE_L en leche, Mcal/día = (0,0929 × kg de grasa por día) + (0,0547 × kg de proteína por día) + (0,0395 × kg de lactosa por día).

⁸Concentración de células somáticas. Datos con transformación logarítmica (Phyn et al., 2014).

El escore de condición corporal (3,5 vs. 3,3, ESM = 0,05, $P = 0,032$) y el espesor de grasa subcutánea (2,0 vs. 1,7 cm, ESM = 0,06 cm, $P = 0,043$) fueron mayores a lo largo de toda lactancia para los animales UOD (Figura 6). El peso vivo (530 kg, ESM = 7,5 kg, $P > 0,05$) no difirió entre los tratamientos a lo largo de toda la lactación. De la semana 1 a la 12 de lactación, el contenido de proteína corporal fue igual entre los tratamientos (64 kg, ESM = 1,1 kg, $P > 0,05$), pero las vacas UOD tuvieron 14% más de grasa corporal que las vacas DOD (61 vs. 48 kg, ESM = 3,2 kg, $P = 0,005$ para efecto de frecuencia de ordeño).

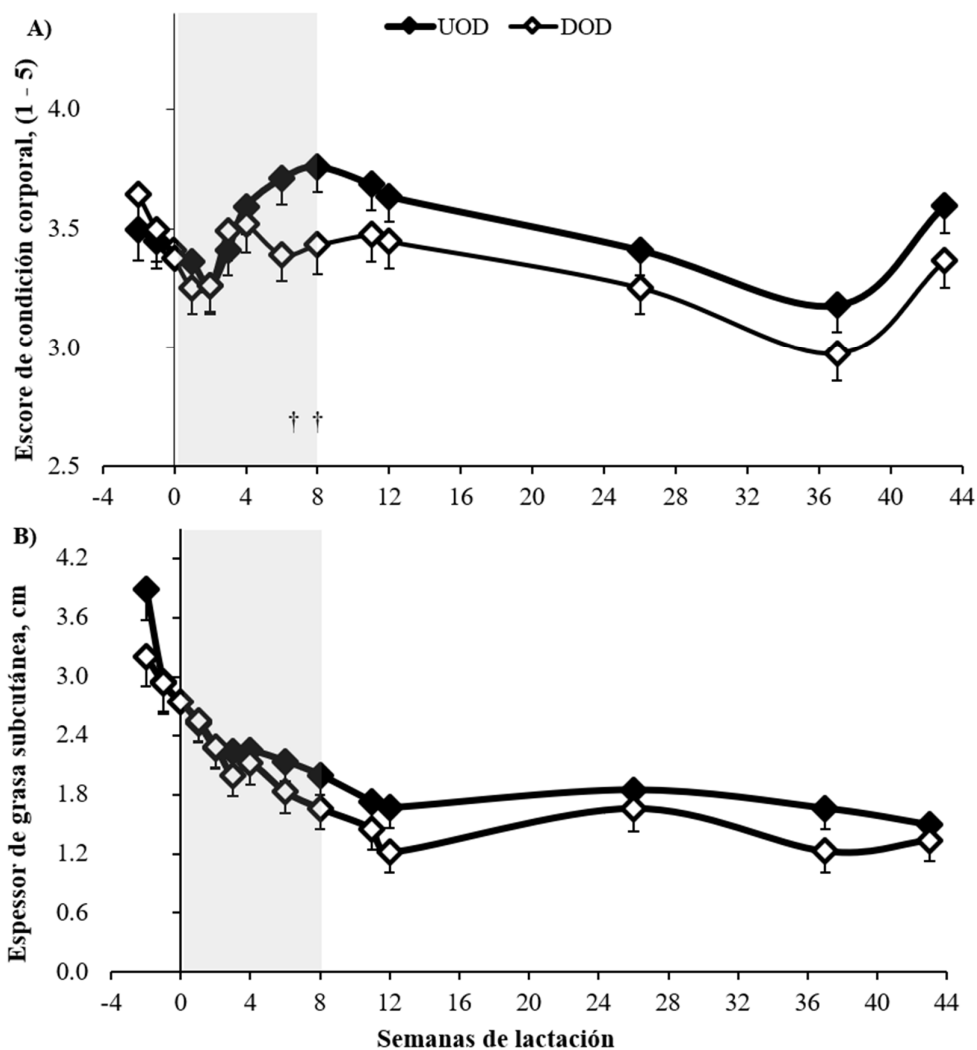


Figura 6. Variables corporales de vacas primíparas en régimen de UOD = un ordeño diario o, DOD = dos ordeños diarios durante las primeras 8 semanas de lactación. Después del periodo de tratamiento todas las vacas fueron ordeñadas dos veces al día hasta el final de la lactación (semana 43). FO = frecuencia de ordeño, S = semana, FO × S = interacción entre FO y S. **(A)** Escore de condición corporal, 1 a 5 (FO = 0,002, S < 0,001, FO × S = 0,743). **(B)** Espesor de grasa subcutánea, cm (FO = 0,011, S < 0,001, FO × S = 0,972). Las cruces (†) indican diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre tratamientos en cada semana, cuando FO × S > 0,05.

Durante la semana 1 a la 12 de lactancia, la concentración sérica de urea fue similar para ambos tratamientos, mientras que las vacas UOD mostraron una mayor concentración de glucosa plasmática (3,81 vs. 3,67, ESM = 0,037 mmol/L, $P = 0,002$ para el efecto de frecuencia de ordeño). Hubo interacciones entre tratamiento y la semana para β HB y AGNE, pero el efecto del tratamiento no fue significativo para estas variables. De manera general las concentraciones de AGNE (0,70 mmol/L, ESM = 0,002, $P > 0,05$ para efecto de frecuencia de ordeño) y β HB (0,33 mmol/L, ESM = 0,11 mMol/L, $P > 0,05$ para efecto de frecuencia de ordeño) fueron similares entre los tratamientos durante el período evaluado. El balance energético fue mayor para las vacas UOD hasta la semana 12 de lactación (6,4 vs. 0,6 Mcal/día, ESM = 1,63 Mcal/día, $P = 0,002$ para efecto de frecuencia de ordeño).

Adicionalmente al estudiar las relaciones entre AGNE, β HB y balance energético fueron estudiadas, se observó que las concentraciones de β HB aumentaron linealmente con los aumentos de AGNE, pero con una precisión del 43% (Figura 7A). El balance energético fue lineal y negativamente relacionado con las concentraciones de AGNE (Figura 7B) y β HB (Figura 7C), pero con valores de precisión del 30 y 40% respectivamente.

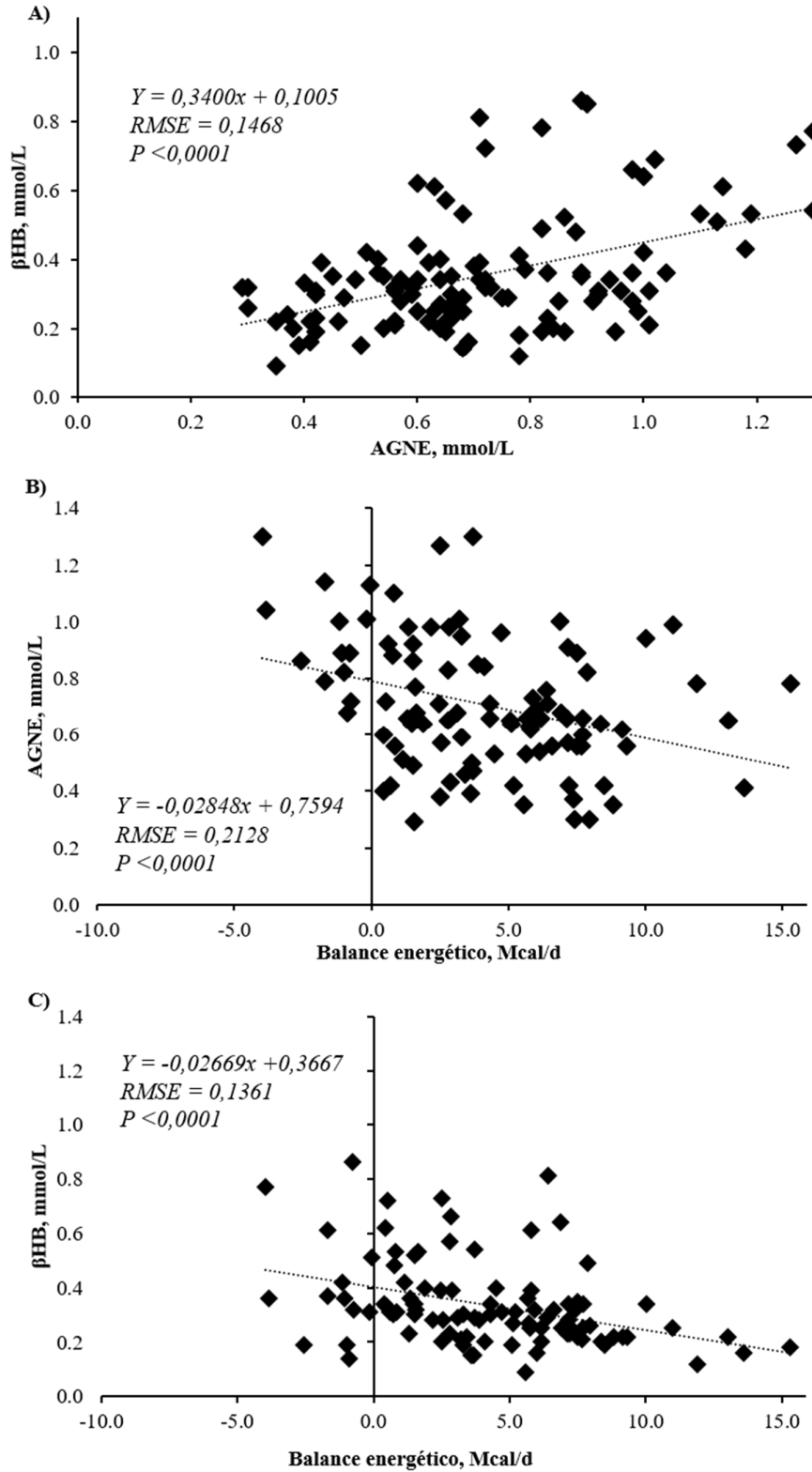


Figura 7. Relación entre las concentraciones séricas de AGNE = ácidos grasos no esterificados mmol/L, β HB = β -hidroxibutirato mmol/L, y balance energético Mcal de NE_L /día en vacas Holstein primíparas durante las primeras 8 semanas de lactación. (A) AGNE vs. β HB ($n = 115$). (B) AGNE vs. balance energético ($n = 98$). (C) β HB vs. balance energético ($n = 98$). RMSE = error cuadrático medio.

Capítulo 8. Discusión general

En concordancia con la hipótesis general, en la presente tesis se demostró que ciertos manejos impuestos a los animales impactan sobre la eficiencia del uso de los alimentos. Se observó que factores como la estrategia de alimentación, la genética animal, el ayuno alimentario afectaron la producción de leche a través de afectar principalmente el aprovechamiento de los nutrientes ingeridos, y la menor frecuencia de ordeño redujo los *outputs* de nutrientes.

En el experimento I, en que evaluamos dos niveles de forraje cosechado en forma directa por vacas de distinto origen genético, fue observado un similar CMS entre los tratamientos, pero la estrategia de alimentación que tuvo cantidad fija de pastura (PasFix) resultó en mayor consumo de energía. Sin embargo, no se detectaron diferencias de producción entre las estrategias de alimentación, resultando en una menor eficiencia del uso de la energía consumida para la producción de leche para el grupo PasFix. Diferente de lo encontrado en el presente trabajo, Bargo et al. (2002b) describen que vacas en pastoreo suplementadas con RPM produjeron 13% más leche que vacas que recibieron concentrado como suplemento, pero en este caso el mayor CMS fue el responsable. En nuestro trabajo, una posible explicación para la similitud de producción entre las estrategias de alimentación podría ser que los tratamientos que recibieron RPM como suplemento tuvieron menor digestibilidad de la proteína. Como la estrategia de alimentación PasFix recibió reservas en la RPM, y sabiendo que las pasturas conservadas como reservas presentan un aumento de la fracción indegradable del nitrógeno y una disminución de la fracción soluble de la proteína (Repetto et al., 2005), posiblemente eso resultaría como una limitante para la producción de leche. Dado que la eficiencia se calculó también en base a la proteína digerida, la menor cantidad de proteína digerida resultó en mayor eficiencia el uso del nitrógeno. Sin embargo, a pesar de menor digestibilidad de la proteína para la estrategia PasFix, fue observado mayores valores de nitrógeno ureico en leche, y esto estaría de acuerdo con lo comentado por Liu y VandeHaar (2020), que describen que no siempre una mayor concentración de nitrógeno ureico en leche significa una empeora de la eficiencia del uso del nitrógeno ingerido.

Adicionalmente, de acuerdo con Powell et al. (2010), generalmente la eficiencia del uso del nitrógeno es menor en sistemas pastoriles de producción de leche y eso se da principalmente, por dos factores: (1) por la relación proteína energía de la pastura, y (2) debido a la asincronía los nutrientes de la pastura y del concentrado. Según Cabrita et al. (2006), en las pasturas la celulosa no promueve un uso efectivo del nitrógeno debido a la baja proporción de celulosa que se hidroliza rápidamente. Por lo tanto, en un sistema basado en pastoreo, aunque con suplementación con concentrado, las asincronías entre el nitrógeno del pasto y el almidón del concentrado podrían ser limitantes para una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno en contraste a un sistema de alimentación que utiliza RPM

en la dieta. Por otra parte, en un sistema de producción de leche de base pastoril es más difícil controlar la proteína del alimento ya que las pasturas son generalmente más altas en proteínas que el requerimiento de las vacas lecheras, y además la proteína de la pastura es generalmente de alta degradabilidad (NRC, 2001). Así posiblemente la producción de leche podría haber sido limitada en los grupos PasFix debido a la menor digestibilidad de la proteína y en los tratamientos PasMax, debido la asincronía entre la energía y el nitrógeno. Sin embargo, cuando miramos los datos de eficiencia de producción de leche por kg de MS consumido fue observado que el grupo PasFix presentó aproximadamente 14% mayor eficiencia. Eso posiblemente fue debido a un mayor valor absoluto en la producción media de 1,2 litros/día (sin diferencia estadística) para este grupo en contraste con la estrategia de alimentación PasMax.

Se observó también que las vacas NA en comparación a las vacas NZ tuvieron aproximadamente 10% mayor producción de leche corregida, resultando en cerca de 11% mayor eficiencia de producción por kg de MS consumido para las vacas NA. Estos valores son más altos que los descritos por Coleman et al. (2010), quienes comunican eficiencias semejantes entre ambas genéticas de 1,2 litros de leche/kg de MS. Sin embargo, en nuestro trabajo cuando la producción de sólidos por vaca/día fue evaluada, únicamente en kg de lactosa las vacas NA fueron superiores, y eso se da simplemente por la mayor producción.

Paralelamente, de manera general, las vacas manejadas con la estrategia de alimentación PasMax dedicaron más tiempo al pastoreo y más tiempo a la rumia, posiblemente por ingerir partículas de mayor tamaño en comparación a las vacas que consumieron gran parte de la dieta como RPM. También se vio que las vacas NZ presentaron un consumo más repartido a lo largo del tiempo, ya que en los momentos dedicados al consumo fueron más distribuidos a lo largo del día, principalmente en el tratamiento PasMax. Esa mayor distribución del tiempo de consumo podría alterar los aspectos de la fermentación del rumen, la digestibilidad y la respuesta animal. Por ejemplo, a las 4 horas de inicio de la comida de la tarde (donde todos los tratamientos pastoreaban) las vacas PasMax NZ tuvieron las mayores concentraciones de AGVs y $\text{NH}_3\text{-N}$ en el rumen, demostrando que posiblemente estos animales tuvieron mayor sustrato para la fermentación ruminal, y esto podría estar relacionado con una mayor selección de la pastura. Adicionalmente, esto podría ser corroborado con una menor ingestión de la FDA para este grupo, que fue posiblemente resultado de una mayor selección de la pastura, ya que el consumo de MS total no fue afectado. También fue observado que los grupos PasFix estuvieron más tiempo paradas (sin rumiar) durante el turno en que recibieron la RPM y tal comportamiento podría ser resultado del piso donde estaban las vacas. Durante el período de comida de la mañana las vacas del grupo PasFix permanecieron en el corral de piso de tierra, y a pesar de las buenas características climáticas durante el experimento, el piso estaba húmedo y posiblemente las vacas optaron por no hecharse en este lugar. Tal hecho podría resultar en un cambio en el proceso de

descanso en la madrugada, pero, sin embargo, en el turno en que todas las vacas estaban en la pastura fue observado que apenas el grupo PasFix NA dedicó mayor proporción del tiempo a estar echadas (sin rumiar y rumiando).

En el experimento II, donde evaluamos el ejercicio para el traslado a la parcela de pastura, no hubo diferencias en la eficiencia de la utilización del nitrógeno, o de producción de leche por kg de MS consumido. Sin embargo, un resultado a destacar fue que el impacto del ayuno es mayor cuando no se asoció al ejercicio. A pesar de que el tiempo de acceso a la pastura entre los tratamientos en que las vacas caminaban y sólo ayunaban fueran los mismos, se observaron cambios comportamentales que afectaron al grupo que exclusivamente ayunaba. Los cambios comportamentales observados incluyeron menor proporción del tiempo pastoreando y mayor proporción del tiempo rumiando. Adicionalmente, como el CMS no fue afectado, posiblemente el grupo ayuno aumentó su tasa de ingestión, a fin de compensar el menor tiempo de pastoreo. De acuerdo con Beauchemin (2018) y Chilibroste et al. (2007), cuando las vacas aumentan la tasa de consumo, hay una reducción en la selección de la pastura y adicionalmente hay un aumento de la ingestión de partículas de mayor tamaño. Además, es descrito por Beauchemin, (2018) que la rumia se estimula por la ingestión de partículas largas de fibra. Así, planteamos la hipótesis de que las vacas que exclusivamente ayunaron aproximadamente 50 min posteriores al ordeño de la mañana y 50 min previo al ordeño de la tarde, tuvieron entre los ordeños de la mañana y tarde una menor selectividad de los componentes de la pastura, y simultáneamente tuvieron una ingestión de partículas de mayor tamaño. La ingestión de partículas de mayor tamaño probablemente promovió un mayor tiempo destinado a la rumia y la menor selección de la pastura, y éste podría ser uno de los factores para la menor digestibilidad de la FDN, afectando negativamente la eficiencia de utilización de la fibra ingerida.

Sin embargo, a pesar de que el grupo que exclusivamente ayunaba presentó mayor tiempo destinado a la rumia este mismo tratamiento tuvo menor pH ruminal. A pesar de que el aumento del tiempo de rumia esté asociado con una mayor producción de saliva y un mayor poder buffer en el rumen (Beauchemin 2018), el grupo que exclusivamente ayunó presentó una disminución de los valores de pH ruminal. Lo interesante fue que la disminución de los valores de pH en el rumen se dio en el turno posterior al ayuno. Adicionalmente, fue observado que en el mismo momento que hubo disminución de los valores del pH del rumen, hubo un aumento de las concentraciones de AGVs en el rumen, lo cual no puede interpretarse como una mejora en los procesos fermentativos del rumen ya que la síntesis de proteína microbiana no se vio aumentada. De acuerdo con Storm y Kristensen (2010), la presencia de partículas de mayor tamaño en el rumen disminuye la movilidad del contenido ruminal, lo que retrasa la absorción de AGVs. Así, la bajada de pH ruminal posterior a la aplicación del tratamiento podría ser debida a factores como una menor capacidad buffer del rumen y/o un mayor acumulo de AGVs. Paralelamente, esta disminución de pH podría haber afectado el crecimiento de

bacterias celulíticas, dificultando con ello la digestión de la fracción FDN de la dieta. Todo lo descrito anteriormente es consistente con la disminución de la producción de leche observada en el grupo que exclusivamente ayunaba.

Por otra parte, y diferente de lo esperado, la caminata de 5 km/día no disminuyó la producción de leche. Para este grupo, como el CMS no fue afectado por la caminata, se puede hipotetizar que las vacas que caminaron 5 km/día tuvieron una mayor movilización de reservas corporales. De acuerdo con las estimaciones del NRC (2001), durante todo el período experimental evaluado, las vacas que caminaron los 5 km/día podrían haber movilizado una cantidad equivalente a 4 kg de reserva corporal. Sin embargo, no pudimos visualizar cambios en el score de condición corporal acordes con esta diferencia, probablemente por su reducida magnitud. Por fin, a diferencia de lo esperado, la caminata asociada con el período de ayuno parece haber revertido los efectos negativos de este último sobre la digestión, la fermentación ruminal y la producción de leche, no siendo totalmente clara la explicación para este fenómeno. Sin embargo, hipotetizamos que las vacas que caminaron presentaron una mayor tasa de pasaje de la fracción líquida del rumen (Benedetti et al., 1990), y eso podría haber conducido a una mayor eliminación de los AGVs del rumen y consecuentemente atenuaría el impacto negativo sobre el pH del rumen, sobre la digestibilidad de la fibra y la producción de leche.

Finalmente, en el experimento II, aproximadamente 20% del nitrógeno consumido fue usado para la producción de leche. Estos valores de eficiencia de uso del nitrógeno se consideran bajos, y son menores de los 25 a 30% descritos Powell et al. (2010) para sistemas de producción de leche. En nuestro trabajo, el hecho de que la alimentación estuvo constituida por más de 80% de forraje como pastura, y que no se ofreció un suplemento almidonoso como aporte de energía, puede haber sido la causa de la baja eficiencia del uso del nitrógeno. Cabe resaltar que el grupo que exclusivamente ayunaba presentó una mayor concentración de proteína en leche respecto al que caminaba, pero no hubo diferencias entre tratamientos en los kg de proteína producidos ya que la producción de leche fue menor.

En el experimento III, donde evaluamos la reducción de la frecuencia de ordeño al inicio de la lactancia observamos que las vacas que fueron ordeñadas una vez al día fueron menos eficientes en convertir el alimento en leche respecto a las de dos ordeños, tanto durante el período de tratamiento como en las semanas posterior a él. En términos generales se observó una disminución aproximada de 40% en la producción de leche de las vacas ordeñadas una vez al día durante las primeras ocho semanas de lactación, resultando finalmente en una disminución de 15% en la producción de leche acumulada en estas vacas. El efecto global en la lactancia se dio principalmente por una diferencia muy importante entre grupos durante el período de tratamiento, y también porque el efecto de la

menor producción se extendió durante varias semanas después del período de frecuencia de ordeño reducido. Esta reducción en la producción de leche observada en nuestro trabajo debido a la menor frecuencia de ordeño fue mayor a la descrita por otros autores (Kay et al., 2013; Phyn et al., 2014; McNamara et al., 2008). Posiblemente esto esté relacionado con dos aspectos. El primero es el hecho de que las vacas eran primíparas, con una fisiología de glándula mamaria diferente a la de vacas adultas. De acuerdo con Knight y Dewhurst (1994) las vacas primíparas presentan mayor almacenaje de la leche en el compartimento alveolar de la glándula mamaria, y eso podría haber afectado en mayor grado la producción de leche. Adicionalmente a este aspecto se suma el mayor tiempo de reducción de la frecuencia de ordeño respecto a otros trabajos. Cuanto mayor es el tiempo de la frecuencia de ordeño reducida mayor será la reducción en la producción de leche respecto al potencial (Grala et al., 2011).

Además, las vacas ordeñadas una vez al día tuvieron una composición diferente de leche. La reducción de la frecuencia de ordeño aumentó las concentraciones de grasa y lactosa sin afectar la concentración de proteína. Lo importante a destacar es que, a pesar de los aumentos de concentración, la producción acumulada de proteína y lactosa de los animales que fueron ordeñados una vez al día durante el período inicial de lactación fue aproximadamente 13% menor que los animales ordeñados dos veces al día. Esta menor producción, con niveles de consumo muy similares, resultó en una menor eficiencia de alimentación en las vacas que fueron manejadas en un régimen de menor frecuencia de ordeño. La eficiencia del uso del nitrógeno y de la energía consumida fue 45 y 28% menor, respectivamente, para las vacas manejadas en régimen de UOD. O sea que de manera resumida para las vacas en UOD la menor eficiencia del uso del nitrógeno y de la energía consumida se dio debido a la menor producción de leche, que resultó en menor producción de kg de proteína por vaca por día y menor NE_L secretada vía leche. La eficiencia siguió siendo menor para el grupo ordeñando sólo una vez, luego de que los dos grupos experimentales estuviesen siendo ordeñados dos veces al día. Así, en el grupo de menor frecuencia de ordeño, entre la semana 9 a 13 de lactación, la reducción fue de aproximadamente 16% en la eficiencia del uso del nitrógeno, de la energía, y de producción de LCS 4% por CMS, respecto al grupo con dos ordeños diarios. Las vacas ordeñadas una vez al día mostraron un mejor estatus energético, lo cual es lógico dado que la salida de energía vía leche fue menor que los animales ordeñados dos veces al día, mientras que el CMS no se vio afectado. Vale destacar que la mejora del estatus energético observado en las vacas en régimen de menor frecuencia de ordeño no impidió que el grupo de vacas movilizaran grasa y proteína corporal durante el inicio de lactación. Sin embargo, tanto la curva de score de condición corporal como la curva de espesor de grasa subcutánea muestra que los animales que fueron ordeñados una vez al día terminaron la lactación en mejor estado corporal que las vacas que fueron ordeñadas dos veces al día. Aunque escapa a los objetivos del trabajo ya que se estudió una sola lactancia, se señala que este hecho podría ser beneficioso para la lactación siguiente.

Adicionalmente, de la evaluación de las relaciones entre concentraciones sanguíneas de metabolitos y el balance energético durante el inicio de la lactancia podemos extraer algunas consideraciones. Hemos observado una pobre relación entre AGNE y β HB, algo que ya había sido descrito en estudios previos (McCarthy et al., 2015). De manera general, esto demuestra que no siempre un aumento de la concentración de AGNE repercute en un aumento de las concentraciones de β HB, y que no siempre un aumento sérico del β HB es resultado de la movilización de grasa corporal. A pesar de que el β HB es usado como indicativo de cetosis en vacas lecheras (Ospina et al., 2010), hay reportes de que la concentración sérica de β HB puede aumentar debido a factores metabólicos como el aumento del butirato en el rumen (Krehbiel et al., 1992), nutricionales con dietas ricas en almidón (Duske et al., 2009), o incluso debido al aumento de la ingesta total de alimento (Bermingham et al., 2008). Adicionalmente, a pesar de que fue observado una mejora en el balance energético de vacas primíparas ordeñadas una vez al día en lactación temprana, eso no evitó que movilizaran reservas corporales. Tal como describió Friggens et al. (2007), la movilización de reservas corporales en vacas lecheras puede ser genéticamente dirigida, por lo que mejoras en el estatus energético no necesariamente reducirán la movilización en vacas lecheras en lactación temprana. Así, los hallazgos del estudio de relación entre las variables metabólicas y el balance energético ponen en cuestionamiento el uso del β HB como indicador de BEN en vacas lecheras durante el inicio de lactación.

Para finalizar con la discusión de la tesis, cuando comparamos los datos de eficiencia alimentaria de nuestros trabajos con datos de la literatura podemos realizar las siguientes puntualizaciones:

(1) Tanto la estrategia de alimentación con mayor proporción ofrecida como una RPM (PasFix) como las vacas NA tuvieron una eficiencia alimentaria alta (mayor que 1,6) según el criterio reportado por Guinguina et al. (2020b), y animales con alta inclusión de pastura en la dieta (PasMax) y vacas NZ tuvieron la eficiencia alimentaria en valores medianos (próximos a 1,5), según los mismos autores. Esto se dio básicamente por diferencia en producción de leche, ya que el CMS no difirió entre los tratamientos. Cabe resaltar que los valores de eficiencia son superiores al promedio de los tambos de Uruguay (1,2 litros/kg de MS consumido) reportado por Fariña y Chilibroste (2019). Los mayores valores encontrados en nuestro trabajo son dados principalmente por una mayor producción de las vacas debido a un mayor aporte de nutrientes. Adicionalmente, la estrategia PasFix presentó mayores eficiencias del uso del nitrógeno ingerido (32%) en comparación al PasMax (27%), posiblemente debido a la mejor sincronía entre la energía y la proteína de la dieta. Sin embargo, el grupo con mayor inclusión de pastura en la dieta usó de manera más eficiente la energía consumida en comparación a las vacas que consumían menos pastura como cosecha directa (58 vs. 53% de la energía consumida se destinó para la producción de leche).

(2) No se observaron diferencias en el aprovechamiento de la energía o la proteína de la dieta entre los grupos genéticos evaluados (NA vs. NZ). Sin embargo, las vacas NA fueron más eficientes en el uso de los kg de MS consumido debido básicamente al hecho de que a medida que la producción aumenta, la eficiencia alimentaria también aumenta (Bach et al., 2020). En contraposición, Guinguina et al. (2020a), en una revisión describieron que cuando las vacas alcanzan una producción aproximadamente 5 veces mayor a los requerimientos de mantenimiento, los aumentos marginales en la eficiencia comienzan a estabilizarse debido a la disminución de la digestibilidad de la energía, asociada con una alta tasa de pasaje ruminal a niveles elevados de ingesta. Así, condiciones de mayor producción de leche ya no conducirá a aumentos sustanciales en la eficiencia alimentaria. Con eso, sería de esperar que en mayor producción de leche los datos de eficiencia alimentaria podrían ser diferentes de los encontrados en nuestro trabajo.

(3) En el experimento de ejercicio/ayuno se verificaron bajas eficiencias para producción de leche por kg de MS ingerido (menores a 1,15 considerados bajos por Guinguina et al., 2020b). Este resultado se expresó debido a una baja producción de leche posiblemente como consecuencia del estadio de lactación en que se encontraban las vacas (estadio medio-tardío), y a que el CMS no se vio afectado. Es de comentar que el uso del nitrógeno para todos los animales del experimento II fue menor a 20% (nivel muy bajo según lo descrito por Powell et al., 2010). Este bajo valor de eficiencia del uso de nitrógeno consumido podría ser debido, entre otras cosas, a que el suplemento ofrecido fue cascarilla de soja, por lo que podría faltar alguna fuente de energía almidonosa en la dieta.

(4) Vacas Holstein primíparas presentaron eficiencia intermedia de producción por kg de MS consumido según el criterio reportado por Guinguina et al. (2020b) (aproximadamente 1,4) y una eficiencia de 29% del uso del nitrógeno, valor intermedio de acuerdo con Powell et al. (2010). Los menores valores de eficiencia en comparación a una vaca adulta podrían ser por el mayor requerimiento de crecimiento, lo que podría haber disminuido la disponibilidad de nutrientes para la producción de leche. Sumado a esto, la menor frecuencia de ordeño en vacas primíparas resultó en valores de eficiencia alimentaria muy bajos (menores a 0,8 para producción por kg de MS consumido), y solo 16% del nitrógeno ingerido fue aprovechado para producción de leche. Eso básicamente sería explicado por la menor producción de leche debido al manejo de la reducción de la frecuencia de ordeño, sin cambios en el consumo de nutrientes.

Finalmente, los datos de eficiencia utilizados en la presente tesis doctoral se basan principalmente en la relación entre la cantidad de leche producido relativo a la cantidad de alimento consumido (L/kg de MS). Sin embargo a pesar de que hemos usado distintas alternativas para los cálculos de eficiencia (NE_L en leche por NE_L consumido, producción de proteína de la leche sobre la proteína consumida), tal como indican Bach et al. (2020), resaltamos que son necesarios más trabajos, que estudien en

profundidad otros momentos del ciclo de producción, ya que intentar extraer conclusiones sobre todo el ciclo a partir de determinaciones de eficiencias alimentarias en períodos cortos de tiempo puede llevar a interpretar erróneamente el impacto global de los manejos (Prendiville et al., 2010). En los ensayos I y II, trabajamos con animales con aproximadamente 100 días de lactación, y no sabemos cómo se afectaría la producción y el consumo en un período previo, o posterior. Por ejemplo, la eficiencia alimentaria en el período inicial de lactación es habitualmente superior al período final de lactación (Bach et al., 2020), por lo que el impacto del tratamiento en esta etapa podría ser diferente. Por otra parte, y además de todo lo descrito, es importante conocer como cada manejo impacta en la eficiencia alimentaria (si es por disminuir el CMS y/o por aumentar la producción). Eso es importante principalmente por dos motivos: (1) mayor producción de leche a un mismo CMS puede significar que produjeron más a costas de movilizar reservas corporales, y eso puede ir contra a los aspectos reproductivos (Roche et al., 2007); (2) puede ser que los animales consuman más, pero producen menos y están almacenando reservas corporales (y no necesariamente es algo negativo para el sistema). Por fin destacamos que cuando usamos la relación producción y consumo para los cálculos de eficiencia alimentaria debemos mirar detalladamente los valores por detrás del cálculo ya que, en un mismo valor de eficiencia, se pueden observar consumos y producciones diferentes.

Capítulo 9. Consideraciones finales

Experimento I: La estrategia de alimentación con menor inclusión de pastoreo directo, y las vacas NA, tuvieron una mayor eficiencia alimentaria en relación a la estrategia de alimentación con alta inclusión de pastura como cosecha directa y en relación a las vacas NZ.

Experimento II: La caminata de 5 km/día para acceder a la pastura no afectó la respuesta productiva de vacas lecheras. El ayuno alimentario corto, con las vacas en el corral, empeoró los procesos digestivos, afectando la producción de leche, pero la caminata revirtió el efecto negativo del ayuno alimentario.

Experimento III: Vacas lecheras primíparas ordeñadas una vez al día durante el inicio de lactación mostraron una menor producción de leche durante la lactancia completa que las vacas ordeñadas dos veces al día. La frecuencia del ordeño no afectó el CMS durante la lactancia temprana y, como consecuencia, las vacas presentaron mayor deposición de reservas corporales al final de la lactancia. Además, la relación entre las variables metabólicas y el balance energético ponen en cuestionamiento el uso del β HB como indicador de BEN en vacas lecheras primíparas durante el inicio de lactación.

Por fin, en concordancia con la hipótesis general, en la presente tesis se demostró que ciertos manejos impuestos a los animales impactan sobre la eficiencia del uso de los alimentos, por afectar el resultado productivo. De manera general la estrategia de alimentación con aproximadamente 40% de la dieta consumida como pastoreo directo presentó mayor eficiencia del uso de los kg de MS y de del nitrógeno de la dieta en comparación a la estrategia PasMax. Además, las vacas NA presentaron mayor eficiencia alimentaria de producción de leche (L de leche por kg de MS consumido). Paralelamente, cuando el ejercicio previo al pastoreo fue evaluado, no fueron observadas diferencias en la eficiencia de la utilización del nitrógeno o de producción de leche por kg de MS consumido, pero fue observado que el ayuno disminuyó el aprovechamiento de la fracción fibrosa de la dieta, resultando en una menor producción de leche. Por último, la reducción de la frecuencia de ordeño durante la lactación temprana disminuye la producción de leche, mejorando el estatus energético de los animales, pero tal manejo disminuyó entre 30 a 50% la eficiencia del uso de la energía y del nitrógeno para la producción de leche.

Capítulo 10. Implicaciones prácticas e investigaciones futuras

En esta tesis se demostró la importancia de evitar ayunos alimentarios, por los impactos negativos que este genera en la digestión, que puede repercutir en la producción animal (por ejemplo, salas de ordeño subdimensionadas). Mientras tanto, es necesario realizar más investigaciones a fin de comprender mejor el efecto del ejercicio moderado (como las caminatas) en vacas lecheras. Posiblemente estos efectos sean menos severos de lo que creíamos.

A pesar de que el manejo de la reducción de la frecuencia de ordeño sea algo atractivo, resaltamos que la utilización de un ordeño diario en vacas durante el inicio de lactación puede no ser un manejo recomendado. Sin embargo, estudiar el impacto de la reducción de la frecuencia de ordeño, sobre el consumo y deposición de reservas corporales en otros momentos de la lactación, sus efectos en la reproducción o y el impacto de la reducción de la frecuencia de ordeño en la lactación siguiente, pueden ser los próximos pasos de interés.

Por fin, hemos observado en la presente tesis que las estrategias de producción evaluadas cambian la posición y la proporción del tiempo que los animales destinan a la rumia. Así, entender mejor los efectos de la posición de la rumia (echada o en pie) será un próximo paso que dar, ya que eso podría afectar la fisiología digestiva y consecuentemente la respuesta animal.

Referencias bibliográficas

Adams RF, Jones RL, Conway PL. (1984). High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *J. Chromatogr.* 336:125-137.

Agnew RE, Yan T, McCaughey WJ, McEvoy JD, Patterson DC, Porter MG, Steen WRJ. (2005). Relationships between urea dilution measurements and body weight and composition of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:2476-2486.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

Audist MJ, Marett LC, Greenwood JS, Hannah M, Jacobs JL, Wales WJ. (2013). Effects of different strategies for feeding supplements on milk production responses in cows grazing a restricted pasture allowance. *J. Dairy Sci.* 96:1218-1231.

Bach A, Terre M, Vidal M. (2020). Symposium review: Decomposing efficiency of milk production and maximizing profit. *J. Dairy Sci.* 103:5709-5725.

Bargo F, L Muller D, Delahoy JE, Cassidy TW. (2002a). Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J. Dairy Sci.* 85:1777-1792.

Bargo F, Muller LD, Delahoy JE, Cassidy TW. (2002b). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85:2948-2963.

Beauchemin KA. (2018). Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:4762-4784.

Beever DE. (2006). The impact of controlled nutrition during the dry period on dairy cow health, fertility and performance. *Anim. Reprod. Sci.* 96:1, 212-226.

Beltran IE, Gregorini P, Daza J, Balocchi OA, Morales A, Pulido RG. (2019). Diurnal Concentration of Urinary Nitrogen and Ruminal Ammonia Are Modified by Timing and Mass of Forage Allocation. *Animals.* 9:961.

Bender RW, Cook DE, Combs DK. (2016). Comparison of in situ versus in vitro methods of fiber digestion at 120 and 288 hours to quantify the indigestible neutral detergent fiber fraction of corn silage samples. *J. Dairy Sci.* 99:5394-5400.

Benedetti E, Silva HM, Rocha RP. (1990). Walking trials with dairy cows: Effect on voluntary water intake. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 42:39-48.

Bermingham EN, Nozière P, Vernet J, Lapierre H, Léger S, Sauvant D, Ortigues-Marty I. (2008). The relationships between intake and net portal fluxes of energy metabolites in ruminants: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Tech.* 143:27-58.

Bramley E, Lean IJ, Fulkerson WJ, Stevenson MA, Rabiee AR, Costa ND. (2008). The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates. *J. Dairy Sci.* 91:308-321.

Broderick GA, Stevenson MJ, Patton RA. (2009). Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:2719-2728.

- Cabrita ARJ, Dewhurst RJ, Abreu JMF, Fonseca AJM. (2006). Evaluation of the effects of synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows – a review. *Anim. Res.* 55:1-24.
- Caja G, Ayadi M, Knight CH. (2004). Changes in cisternal compartment based on stage of lactation and time since milk ejection in the udder of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2409-2415.
- Charton C, Larroque H, Robert-Granie C, Leclerc H, Friggens NC, Guinard-Flament J. (2016). Individual responses of dairy cows to a 24-hour milking interval. *J. Dairy Sci.* 99:3130-3168.
- Chen XB, Gomes MJ. (1992). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ.* Rowett Research Institute, Aberdeen, UK.
- Chilibroste P, Gibb MJ, Soca P, Mattiauda D.A. (2015). Behavioural adaptation of grazing dairy cows to changes in feeding management: do they follow a predictable pattern? *Animal Production AScience.* 55:328-338.
- Chilibroste P, Soca P, Mattiauda DA, Bentancur O, Robinson PH. (2007). Short term fasting as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 47:1075-1084.
- Clark DA, Phyn CVC, Tong MJ, Collis SJ, Dalley DE. (2006). A Systems Comparison of Once-Versus Twice-Daily Milking of Pastured Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 89:1854–1862.
- Coleman J, Berry DP, Pierce KM, Brennan A, Horan B. (2010). Dry matter intake and feed efficiency profiles of 3 genotypes of Holstein-Friesian within pasture-based systems of milk production. *J. Dairy Sci.* 93:4318–4331.
- Coppock CE, Bath DL, Harris B. (1981). From feeding to feeding systems. *J. Dairy Sci* 64: 1230-1249.
- Coulon JB, Pradel P, Cochard T, Poutrel B. (1998). Effect of extreme walking conditions for dairy cows on milk yield, chemical composition, and somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 81:994-1003.
- Davidson JA, Beede DK. (2003). A system to assess fitness of dairy cows responding to exercise training. *J. Dairy Sci.* 86:2839–2851.
- Davis BS, Farr VC, Coperman JAP, Carruthers VR, Knight CH, Stelwagen K. (1998). Partitioning of milk accumulation between cisternal and alveolar compartments of the bovine udder: Relationship to production loss during once daily milking. *J. Dairy Res.* 65:1-8.
- Delagarde R, Valk H, Mayne CS, Rook AJ, Gonzalez-Rodriguez A, Baratte C, Faverdin P, Peyraud JL. (2011). GrazeIn: a model of herbage intake and milk production for grazing dairy cows. 3. Simulations and external validation of the model. *Grass Forage Sci.* 66, 61-77.
- Delamaire E, Guinard-Flament J. (2006). Longer milking intervals alter mammary epithelial permeability and the udder’s ability to extract nutrients. *J. Dairy Sci.* 89:2007-2016.
- Dewhurst RJ, Knight CH. (1993). An investigation of the changes in sites of milk storage in the bovine udder over two lactations. *Anim. Prod.* 57:379-384.
- Dhanao MS, Siddons RC, France J, Gale DL. (1985). A multicompartamental model to describe marker excretion patterns in ruminant faeces. *Br. J. Nutr.* 53:663–671.

- Dillon P, Berry DB, Evans RD, Buckley F, Horan B. (2006). Consequences of genetic selection for increased milk production in European seasonal pasture-based systems of milk production. *Livest. Prod. Sci.* 99, 141–158.
- Doyle PT, Francis SA, Stockdale CR. (2005). Associative effects between feeds when concentrate supplements are fed to grazing dairy cows: A review of likely impacts on metabolisable energy supply. *Aust. J. Agric. Res.* 56:1315–1329.
- Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.* 92:571-580.
- Duske K, Hammon HM, Langhof AK, Bellmann O, Losand B, Nurnberg K, Nurnberg G, Sauerwein H, Seyfet MH, Metges CC. (2009). Metabolism and lactation performance in dairy cows fed a diet containing rumen-protected fat during the last twelve weeks of gestation. *J. Dairy Sci.* 92:1670-1684.
- Dutreuil M, Guinard-Flament J, Boutinaud M, Hurtaud C. (2016). Effect of duration of milk accumulation in the udder on milk composition, especially on milk fat globule. *J. Dairy Sci.* 99:3934-3944.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.
- Fajardo M, Mattiauda DA, Motta G, Genro TC, Meikle A, Carriquiry M, Chilibruste P. (2015). Use of mixed rations with different access time to pastureland on productive responses of early lactation Holstein cows. *Livest. Sci.* 181:51-57.
- Fariña S, Chilibruste P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agricultural Systems.* 176:1-9.
- Fariña SR, Garcia SC, Fulkerson WJ, Barchia IM. (2011). Pasture-based dairy farm systems increasing milk production through stocking rate or milk yield per cow: pasture and animal responses. *Grass Forage Sci.* 66:316–332.
- Felix A, Repetto JL, Hernandez N, Pérex-Ruchel A, Cajarville C. (2017). Restricting the time of Access to fresh forage reduces intake and energy balance but does not affect the digestive utilization of nutrients in beef heifers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 226:103-112.
- Fraley SE, Hall MB, Nennich TD. (2015). Effect of variable water intake as mediated by dietary potassium carbonate supplementation on rumen dynamics in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:3247–3256.
- Friggens NC, Berg P, Theilgaard P, Korsgaard IR, Ingvarsten KL, Løvendahl P, Jensen J. (2007). Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: evidence of genetically driven body energy change. *J. Dairy Sci.* 90:5291-5305.
- Fulkerson WJ, Davison TM, Garcia SC, Hough G, Goddard ME, Dobos R, Blockey M. (2008). Holstein-Friesian dairy cows under a predominantly grazing system: Interaction between genotype and environment. *J. Dairy Sci.* 91:826–839.
- Gallo L, Carnier P, Cassandro M, Mantovani R, Bailoni L, Contiero B, Bittante G. (1996). Change in body condition score of holstein cows affected by parity and mature equivalent milk yield. *J. Dairy Sci.* 79:1009-1015.
- Gill M. (1979). The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass For. Sci.* 34:155-161.

- Glindemann T, Tas BM, Wang C, Alvers S, Susenbeth A. (2009). Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 152:186-197.
- Golazo MG, Hayirli A, Doepel L, Ambrose DJ. (2009). Reproductive performance of dairy cows is influenced by prepartum feed restriction and dietary fatty acid source. *J. Dairy Sci.* 92:2562-2571.
- Grala TM, Phyn CVC, Kay JK, Rius AG, Littlejohn DM, Snell RG, Roche JR. (2011). Temporary alterations to milking frequency, immediately post-calving, modified the expression of genes regulating milk synthesis and apoptosis in the bovine mammary gland. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 71:3-8.
- Grala TM, Roche JR, Kay JK, Rius AG, White HM, Donkin SS, Littlejohn MD, Snell RG, Phyn CVC. (2014). The expression of genes involved in hepatic metabolism is altered by temporary changes to milking frequency. *J. Dairy Sci.* 97:838-850.
- Gregorini P, Gunter SA, Beck PA. (2008). Matching plant and animal processes to alter nutrient supply in strip grazed cattle: timing of herbage and fasting allocation. *J. Anim. Sci.* 86:1006-1020.
- Gregorini P. (2012). Diurnal grazing pattern: its physiological basis and strategic management. *Anim. Prod. Sci.* 52:416-430.
- Grovum WL, Williams VJ. (1973). Rate of passage of digesta in sheep. *British Journal of Nutrition*, 30(02), 313.
- Guinguina A, Yan T, Bayat AR, Lund P, Huhtanen P. (2020b). The effects of energy metabolism variables on feed efficiency. *J. Dairy Sci.* 103:7983-7997.
- Guinguina A, Yan T, Lund P, Bayat AR, Hellwing ALF, Huhtanen P. (2020a). Between-cow variation in the components of feed efficiency. *J. Dairy Sci.* 103:7968-7982.
- Harris BL, Kolver ES. (2001). Review of holsteinisation on intensive pastoral dairy farming in New Zealand. *J. Dairy Sci.* 84:E56–E61.
- Haydock KP, Shaw NH. (1975). The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 15:663-670.
- Hegardt FG, (1999). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Journal of Biochemistry.* 338:569-582.
- Horan H, Faverdin P, Delaby L, Rath M, Dillon P. (2006). The effect of strain of Holstein-Friesian dairy cow and pasture-based system on grass intake and milk production. *Anim. Sci.* 82:435-444.
- Horan, B., P. Dillon, P. Faverdin, L. Delaby, F. Buckley, and M. Rath. (2005). The interaction of strain of Holstein-Friesian cows and pasture-based feed systems on milk yield, body weight, and body condition score. *J. Dairy Sci.* 88:1231–1243.
- Huhtanen P, Kaustell K, Jaakkola S. (1994). The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:211-227.
- Instituto Nacional de la Leche. (2014). Encuesta lechera INALE 2014. Disponible en: <http://www.inale.org/innovaportal/v/4086/4/innova.front/primeros-resultados-de-la-encuesta-lechera-inale-2014.html>.

- Kaşikçi G, Çetin O, Bingöl EB, Gündüz MC. (2012). Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36:49-55.
- Kay JK, Phyn CVC, Rius AG, Morgan SR, Grala TM, Roche JR. (2013). Once-daily milking during a feed deficit decreases milk production but improves energy status in early lactating grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:6274-6284.
- Kennedy J, Dillon P, Delaby L, Faverdin P, Stakelum G, Rath M. (2003). Effect of genetic merit and concentrate supplementation on grass intake and milk production with Holstein Friesian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:610–621.
- Knight CH, Dewhurst RJ. (1994). Once daily milking of dairy cows: relation between yield loss and cisternal milk storage. *J. Dairy Res.* 61:441-449.
- Kolver ES, Muller LD. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81:1403-1411.
- Kolver ES, Roche JR, de Veth MJ, Thorne P, Napper AR. (2002). Total mixed ration versus pasture diets: Evidence of a genotype diet interaction. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 62:246–251.
- Komaragiri MVS, Casper DP, Erdman RA. (1998). Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 2. Effect of dietary fat on mobilization of body fat and protein. *J. Dairy Sci.* 81:169-175
- Krehbiel CR, Harmon DL, Schnieder JE. (1992). Effect of increasing ruminal butyrate on portal and hepatic nutrient flux in steers. *J. Dairy Sci.* 70:904-914
- La Federación Uruguaya de Centros Regionales de Experimentación Agropecuaria. (2017). Disponible en: <http://fucreea.org/#carousel-slide-main>.
- Lacy-Hulbert SJ, Woolford MW, Nicholas GD, Prosser CG, Stelwagen K. (1999). Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. *J. Dairy Sci.* 82:1232-1239.
- Liu E, VandeHaar MJ. (2020). Low dietary protein resilience is an indicator of the relative protein efficiency of individual dairy cows. *J. Dairy Sci.* 103: 11401-11412.
- McCarthy MM, Mann S, Nydam DV, Overton TR, McArt JAA. (2015). Concentrations of nonesterified fatty acids and B-hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *J. Dairy Sci.* 98:6284-6290
- McCarthy S, Horan B, Rath M, Linnane M, O'Connor P, Dillon P. (2007). The influence of strain of Holstein-Friesian dairy cow and pasture-based feeding system on grazing behaviour, intake and milk production. *Grass Forage Sci.* 62:13–26.
- McNamara S, Murphy JJ, O'mara FP, Rath M, Mee JF. (2008). Effect of milking frequency in early lactation on energy metabolism, milk production and reproductive performance of dairy cows. *Livest. Sci.* 117:70-78.
- Mendoza A, Cajarville C, Repetto JL. (2016). Digestive response of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 99:8779–8789.
- Mertens, D.R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing beakers or crucibles: A collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217-1240.

- Milner P, Page KL, Walton A, Hillerton JE. (1996). Detection of clinical mastitis by changes in electrical conductivity of foremilk before visible changes in milk. *J. Dairy Sci.* 79:79-83.
- Myers WD, Ludden PA, Nayigihugu V, Hess BW. (2004). Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Dairy Sci.* 82:179-183.
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington DC.
- Nelson DL, Cox M. (2011). *Principios de bioquímica de Lehninger*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed. 1274p
- Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton T R. (2010). Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.* 93:546-554.
- Overton TR, McArt JAA, Nydam DV. (2017). A 100-year review. metabolic health indicators and management of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100:10398-10417
- Pastorini M, Pomies N, Repetto JL, Mendoza A, Carjaville C. (2019). Productive performance and digestive response of dairy cows fed different diets combining a total mixed ration and fresh forage. *J. Dairy Sci.* 102:4118–4130.
- Patton J, Kenny DA, Mee JF, O'Mara FP, Wathes DC, Cook M, Murphy JJ. (2006). Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1478-1487.
- Phyn CVC, Kay JK, Rius AG, Morgan SR, Roach CJ, Grala TM, Roche JR. (2014). Temporary alterations to postpartum milking frequency affect whole-lactation milk production and the energy status of pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67:6850-6868.
- Phyn CVC, Kay JK, Rius AG, Morgan SR, Roach CJ, Grala TM, Roche JR. (2014). Temporary alterations to postpartum milking frequency affect whole-lactation milk production and the energy status of pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67:6850-6868.
- Powell JM, Gourley CJP, Rotz C., Weaver DM. (2010). Nitrogen use efficiency: a measurable performance indicator for dairy farms. *Environ. Sci. Policy* 13:217–228.
- Prendiville R, Lewis E, Pierce KM, Buckley F. (2010). Comparative grazing behavior of lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey \times Holstein-Friesian dairy cows and its association with intake capacity and production efficiency. *J. Dairy Sci.* 93:764-774.
- Pulido RG, Leaver JD. (2001). Quantifying the influence of sward height, concentrate level and initial milk yield on the milk production and grazing behaviour of continuously stocked dairy cows. *Grass Forage Sci.* 56:57–67.
- Rabaza A, Banchemo G, Cajarville C, Zunino P, Britos A, Repetto JL, Fraga M. (2019). Effects of feed withdrawal duration on animal behaviour, rumen microbiota and blood chemistry in feedlot cattle: implications for rumen acidosis. *Anim.* 14:66-77.
- Rauw WM, Kanis E, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ. (1998). Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest. Prod. Sci.* 56:15–33.
- Rémond B, Coulon JB, Nicloux M, Levieux D. (1999). Effect of temporary once-daily milking in early lactation on milk production and nutritional status of dairy cows. *Ann. Zootech.* 48:341-352.

- Repetto JL, Cajarville C, D'alessandro J, Curbelo A, Soto C, Garín D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Anim. Res.* 54:73–80.
- Roche JR, Berry DP, Kolver ES. (2006). Holstein-Friesian strain and feed effects on milk production, body weight, and body condition score profiles in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:3532–3543.
- Russell JB, Wilson D B. (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79:1503–1509.
- Schröder UJ, Staufenbiel R. (2006). Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness. *J. Anim. Sci.* 89:1-14.
- Senger CCD, Kozloski GV, Bonnacarrère Sanchez LM, Mesquita FR, Alves TP, Castagnino DS. (2008). Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146:169-174.
- Sheahan AJ, Gibbs SJ, Roche JR. (2013). Timing of supplementation alters grazing behaviour and milk production response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:477-483.
- Sheahan AJ, Kolver ES, Roche JR. (2011). Genetic strain and diet effects on grazing behavior, pasture intake, and milk production. *J. Dairy Sci.* 94:3583-3591.
- Shen JS, Chai Z, Song LJ, Liu JX, Wu YM. (2012). Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:5978–5984.
- Soca P, Gonzales H, Manterola H, Bruni M, Mattiauda D, Chilibroste P, Grogorini P. (2014). Effect of restricting time at pasture and concentrate supplementation on herbage intake, grazing behaviour and performance of lactating dairy cows. *Livest. Sci.* 170:35-42.
- Spaans OK, Macdonald KA, Lancaster JAS, Bryant AM, Roche JR. (2018). Dairy cow breed interacts with stocking rate in temperate pasture-based dairy production systems. *J. Dairy Sci.* 101:4690–4702.
- Spörndly E, Wredle E. (2004). Automatic Milking and Grazing—Effects of Distance to Pasture and Level of Supplements on Milk Yield and Cow Behavior. *J. Dairy Sci.* 87:1702–15712.
- Stakelum G, Dillon P. (2003). The effect of concentrate type and sward characteristics on herbage intake, diet composition and grazing behaviour of dairy cows. *Irish J. Agr. Food Res.* 42:55–70.
- Steiner S, Neidl A, Linhart N, Tichy A, Gasteiner J, Gallob K, Baumgartner W, Wittek T. (2015). Randomised prospective study compare efficacy of five different stomach tubes for rumen fluid sampling in dairy cows. *Veterinary Record.* 176:50-56.
- Stelwagen K, Davis SR, Farr VC, Eichler SJ. (1994). Effect of once daily milking and concurrent somatotropin on mammary tight junction permeability and yield of cows. *J. Dairy Sci.* 77:2994-3001.
- Stelwagen K, Phyn CVC, Davis SR, Guinard-Flament J, Pomiès D, Roche JR, Kay JK. (2013). Invited review: Reduced milking frequency: Milk production and management implications. *J. Dairy Sci.* 96:3401-3413.
- Stelwagen K. (2001). Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):204-211.
- Storm AC, Kristensen B. (2010). Effects of particle size and dry matter content of a total mixed ration on intraruminal equilibration and net portal flux of volatile fatty acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:4223–4238.

- Thomson NA, Barnes ML. (1993). Extra walking: effect on dairy production. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 53:69-72.
- Titgemeyer EC, Armendariz CK, Bindel DJ, Greenwood RH, Loest CA. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *J. Anim. Sci.* 79:1059-1063.
- Tyrrell HF, Reid JT. (1965). Prediction of the energy value of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 48:1215-1223.
- Udén P, Colucci PE, Van Soest PJ. (1980). Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digest. Rate of passage studies. *Journal Society Food Agricola.* 31:625-632.
- Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, Clayton MK. (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 82:2686-2696.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Van Weyenberg S, Sales J, Janssens GPP. (2006). Passage rate of digesta through the equine gastrointestinal tract: A review. *Livest. Sci.* 99:3-12.
- Vibart RE, Fellner V, Burns JC, Huntington, GB, Green Jr JT. (2008). Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. *J. Dairy Res.* 75:471-480.
- Weatherburn, MW. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39:971-974.
- Williams CH, David DJ, Iismaa O. (1962). The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci. (Camb).* 59:381-385.
- Yang L, Zhang Y, Wang S, Zhang W, Shi R. (2014). Decreased liver peroxisomal β -oxidation accompanied by changes in brain fatty acid composition in aged rats. *Neurological Sciences.* 35:289-293.

Anexos

Anexo I: Experimento I

Capelesso A, Fariña S, Silva G, Cajarville C, Mendoza A. (2020). Effect of strategies for feeding supplements in a grazing system on productive performance of North American and New Zealand Holstein-Friesian. (bajo revision de los autores).

Anexo II: Experimento II

Capelesso A, Repetto JL, Kozloski G, Dayuto J, Mendoza A, Cajarville C. (2020). Extra walking to access the pasture: Effect on digestion and productive performance of dairy cows in a grazing system. J. Dairy Sci. (bajo corrección idiomática final).

Anexo III: Experimento III

Capelesso A, Kozloski G, Mendoza A, Pla M, Repetto JL, Cajarville C. (2019). Reducing milking frequency in early lactation improved the energy status but reduced milk yield during the whole lactation of primiparous Holstein cows consuming a total mixed ration and pasture. J. Dairy Sci. 102:8919-8930.

Anexo IV: Material suplementario del Experimento III

Capelesso A, Kozloski G, Amaro N, Mendoza A, Repetto JL, Cajarville C. (2020). Serum concentrations of non-esterified fatty acids and β -Hydroxybutyrate are poorly 1 correlated with energy balance in primiparous dairy cows. (enviado).

Anexo I

Interpretive Summary

Effect of strategies for feeding supplements in a grazing system on productive performance of North American and New Zealand Holstein-Friesian. Capelesso.

The objectives of this study were to determine the short effect on the productive performance of dairy cows of two genotype Holstein-Friesian and managed in two feeding strategy without changing the amount of nutrient offered. Intake was not different between treatments but milk yield was affected for Gen. Interaction between FS and Gen was observed for same variables, but in general, the FS affected in more extension the feeding behavior and Gen affected in more extension the productive performance.

Running Head: FEEDING STRATEGY AND GENOTYPE HOLSTEIN COWS

Effect of strategies for feeding supplements in a grazing system on productive performance of North American and New Zealand Holstein-Friesian.

A. Capelesso,^{*†} S. Fariña,[‡] G. Silva[§], C. Cajarville,^{*} A. Mendoza,[‡]

^{*}Departamento de Producción Animal – IPAV, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Ruta 1 km 42.5, San José, Uruguay

[†]Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 97105900, Brazil

[‡]Programa de Producción de Leche, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta 50 km 11, 70002, Colonia, Uruguay

[§]Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Alberto Lasplaces 1620, Montevideo, Uruguay

¹Corresponding author: Alsiane Capelesso. Departamento de Producción Animal – IPAV, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1 km 42.5, 80100, San José, Uruguay. Tel/Fax: +598-43407023. E-mail: ascapelesso@gmail.com.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the short effect on the productive performance of dairy cows of two genotype Holstein-Friesian and managed in two feeding strategy without changing the amount of nutrient offered. For this, two FS was studied, *i*) Maximum grazing (MaxGraz): the amount of pasture and concentrate offered to each animal was approximately 70 and 30% of DMI, respectively; and *ii*) Fixed grazing (FixGraz): the amount of grazing pasture, reserves and concentrate, by each animal, was fixed to approximately 33% of total estimated DMI, respectively. Within each FS, 2 Gen were evaluated: *i*) North American Holstein-Friesian (NA); and *ii*) New Zealand Holstein-Friesian (NZ). Thus, four treatments were evaluated: *i*) FixGraz NA; *ii*) FixGraz NZ, *iii*) MaxGraz NA and *iv*) MaxGraz NZ. The treatments were evaluated during a short time, during middle third of lactation. No interaction between FS and Gen was found for DMI or milk yield (kg/d). The DMI was not affected by FS or Gen. In general, nutrient intake was not affected by FS and Gen interaction, except that ADF and starch intake was lower for MaxGraz NZ treatment. Four hours after of a.m. feeding no differences were found for ruminal measurements, but, after 4 hours start the p.m. feeding the NZ cows had lower pH than NA cows, and total VFA and propionic acid concentrations were greater for MaxGrazNZ group compared with the other treatments. Feeding strategy did not affect milk yield, but NA cows produced more milk than NZ dairy cows. Along of day the feeding behavior was affected by FS and Gen. Interaction between FS and Gen was observed for some variables, but in general, the FS affected in more extension the feeding behavior and Gen affected in more extension the productive performance.

Keywords: concentrate, feeding strategy, genotype, TMR.

INTRODUCTION

In pasture-based feeding systems, increasing milk-solids output per cow is limited unless the diet is supplemented using feeds more concentrate in energy or protein (Dillon et al., 1995). For dairy cows, in pasture-based feeding systems, the supplementation generally occurs by two way: (1) as concentrate during milking's or, (2) offered mixed as a TMR. When the concentrate is offered during the milking's the asynchrony between the energy and N source could be decrease then microbial protein synthesis (Cabrita et al., 2006) and effected the efficiency use of N (Powell et al., 2010). In contrast, in a feeding system that includes of TMR on diet is possible decrease the selection of ingredients of diet, controlled the relation N and energy in diet (Gill, 1979; Coppock et al., 1981) and increase DMI and milk yield (Pastorini et al., 2019; Mendoza et al., 2016; Fajardo et al., 2015).

In a grazing feeding system, beyond the milk production be limited by environmental plant and management factors (Dillon, 2006) the ability grazing of the cows is an important factor (Stakelum and Dillon, 2003). For example, North American Holstein-Friesian (NA) were selected by increased

Anexo I

64 milk yield in a predominantly feedlot environment with use of TMR (Rauw et al., 1998; Kolver et al.,
65 2002; Fulkerson et al., 2008). However, these animals when in a grazing feeding system, the milk yield
66 decrease in contrast to NZ dairy cows, due the lower pasture intake ability (Kolver et al., 2002). Thus,
67 possibility dairy cows which have been selected for increased milk production in a predominantly
68 feedlot system may not be best suited to a seasonal grass-based system (Dillon et al., 2005). On one
69 hand, the New Zealand Holstein-Friesian (NZ) were selected by greater solids concentration, greater
70 fertility and greater feed efficiency and survivability for a predominantly grass-based (Harris and
71 Kolver, 2001; Kolver et al., 2002; Fulkerson et al., 2008; Coleman et al., 2010). Additionally,
72 interactions between strain and feeding system have been observed for milk production (Fulkerson et
73 al., 2001; Kolver et al., 2002; Kennedy et al., 2003).

74 The existence of interaction between the genotype and feeding system is very relevant, since the
75 best genotype for one system is not necessarily the best for another. Thus, the existence of strain and
76 feed strategy interactions for production and DM intake indicate that greater knowledge of both
77 genotype and feeding environment is required to predict animal performance (Horan et al., 2005).
78 Furthermore, the genotypes that by the system in which they were originally selected to greater genetic
79 merit for milk production, as NA dairy cows, when they are managed with a restricted feeding plan,
80 their productivity is more markedly reduced compared to cows with less genetic merit, as NZ dairy
81 cows (Horan et al., 2006). Additionally, the feeding strategies previous evaluated generally implied
82 changes in the concentrated supplementation levels, determining different amounts of nutrients
83 offered. Moreover, the information referring to the productive response of animals of different
84 genotypes when managed in feed strategy that, although they do not provide a greater total amount of
85 dry matter, does differ in the proportion of pasture harvested in the diet, is not clear. Thus, the objective
86 of this study was to determine the short effect on the productive performance of dairy cows of two
87 genotype Holstein-Friesian and managed in two feeding strategy without changing the amount of
88 nutrient offered.

89

90

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design, Treatments and Animals

92 The experiment was conducted at the Experimental Station of the Instituto Nacional de
93 Investigación Agropecuaria (INIA) in Colonia, Uruguay (34°20'18.2"S, 57°41'24.2"W), and complied
94 with regulations of the Bioethics Committee of the Institute (INIA 2017.2). This experiment was
95 realized on spring on 2018, during 15 consecutives d, with the first 5 d for adaptation to management.
96 During the experiment, the climate characteristics on average were: temperature 16.1°C (with 21.4°C
97 of maximum and 10.8°C of minimum), ambiental moisture of 87.1% (99.6% of maximum and 70.9%
98 of minimum), 11mm of accumulated rain and 12 hours of natural illumination (0600 to 1800 h).

Anexo I

99 This trial is part of a larger farmlet system study that evaluated two different feeding strategies (**FS**)
100 and two genetic Holstein dairy cows (**Gen**) for 3 years. The two-FS evaluated were: *i*) Maximum
101 grazing (**MaxGraz**): the amount of pasture and concentrate offered to each animal was approximately
102 70 and 30% of DMI, respectively; and *ii*) Fixed grazing (**FixGraz**): the amount of grazing pasture,
103 reserves and concentrate, by each animal, was fixed to approximately 33% of total estimated DMI,
104 respectively. Within each FS, 2 Gen were evaluated: *i*) North American Holstein-Friesian (**NA**): cows
105 with more of 75% of genetic ancestry of North American; and *ii*) New Zealand Holstein-Friesian (**NZ**):
106 composed by cows with more of 75% of genetic ancestry of New Zealand. Thus, four treatments were
107 evaluated: *i*) **FixGraz NA** = fixed grazing with North American Holstein-Friesian ($n = 30$), *ii*) **FixGraz**
108 **NZ** = fixed grazing with New Zealand Holstein-Friesian ($n = 30$), *iii*) **MaxGraz NA** = Maximum
109 grazing with North American Holstein-Friesian ($n = 30$), and *iv*) **MaxGraz NZ** = Maximum grazing
110 with New Zealand Holstein-Friesian ($n = 30$). Each group was managed in independent modules. For
111 this, an area of 60 hectares was divided in 40 paddocks with 1,5 hectares each, and each treatment
112 were managed exclusively in 10 paddocks, distributed according soil characteristics and distance of
113 milking parlor. The stocking rate was 2 and 2,5 cows/ha for the treatments with NA and NZ cows,
114 respectively, resulting in similar comparative stocking rate (kg of BW/ha). Was utilized the same
115 pasture and cultivars and equal agronomic management in each module, aiming to harvest 10000 kg
116 of DM of pasture/ha per year. The average available pasture stock in all paddocks (kg of DM/ha) and
117 the daily growth rate of pasture (kg of DM/d per ha) was weekly estimated according to Fariña et al.
118 (2011). Dry matter intake potential for each Gen was estimated according to NRC (2001), using
119 individual information of BW, milk yield and composition, DIM and BCS. Additionally, was
120 established as maximum to pasture DMI for the treatments MaxGrazNA and MaxGraNZ in 16 and 14
121 kg of DM/cow per day, respectively. With dates of pasture stock, the daily growth rate and maximum
122 pasture intake, weekend the paddocks of each treatment were adjusted according to pasture disponible.

123 Within each treatment, we selected twelve cows (all multiparous) in such a way that groups were
124 balanced for DIM, milk yield, BW, BCS and parity (Table 1). Furthermore, economic breeding index
125 for each treatment was determinate according Veerkamp et al. (2002). Cows within each treatment
126 group were managed together. The pasture plot utilized during experimental period were at maximum
127 800 m from the milking parlor in each treatment, and all paddock the cows had access the fresh water.
128 All cows were milked daily at 0500 h and 1400 and 1500 horas.

129

130 *Feeding Management during experimental period*

131 During the experimental period the DMI potential were 24 and 22 kg of DM/d per cows for NA
132 and NZ in both treatments, respectively. Each treatment was managed separately, inclusively in
133 milking parlor. The FS MaxGraz the cows grazed pasture during of the two turns of feeding

Anexo I

134 (approximately 70% of total DMI) and intake concentrate individually during milking periods
135 (approximately 30% of total DMI). The FS FixGraz the reserves and concentrate were offered mixed
136 as a partial mixed ration (PMR) after a.m. milking, and after p.m. milking the cows grazed a pasture
137 with a paddock adjusted to each cow's intake 33% of total DMI estimated (calculated above 5 cm).
138 For the groups FizGraz were not offered concentrate during milking's. Table 2 shows the pasture,
139 TMR and concentrate offered (kg of DM/cow per d). The pastures utilized for all treatments were
140 composed by alfalfa (*Medicago sativa*) cocksfoot (*Dactylis glomerate*) and tall fescue (*Festuca*
141 *arundinacea*). Table 3 shows the ingredients of the diet, as well as the chemical composition of
142 TMR and pasture.

143

144 *Measurements and Sampling*

145 Intake of pasture was determined using titanium dioxide (TiO₂) as an external marker (Titgemeyer
146 et al., 2001; Glindemann et al., 2009), and indigestible neutral detergent fiber (iNDF) as an internal
147 marker (Huhtanen et al., 1994). For the determination of fecal excretion (kg of DM/cow per d), each
148 animal received a single daily oral dose of 10 g of pure TiO₂ during 10 consecutive days, supplied in
149 gelatin capsules (size #10, Torpac, New Jersey, USA) using a dosing applicator (X-BG03 A, Torpac,
150 New Jersey, USA). During the last 5 days of TiO₂ dosing, approximately 150 g of feces were collected
151 twice daily after each milking directly from the rectum of each cow, and dried in a forced-air oven at
152 60°C for 72 h. Samples were ground to pass through a 1 mm screen and one composite sample per
153 cow was obtained for TiO₂ analysis by mixing equal DM amounts from each subsample. Individual
154 fecal per cows were analyzed for DM, OM, PC, NDF and ADF (as described later) and iNDF. For
155 iNDF fecal analysis, during 2 consecutive days, 4 spot fecal samples were collected (approximately
156 200 g of feces/cow per collection) and processed as previously described. For iNDF determination, 0.5
157 g of feces and feed samples were weighed in duplicates in F57 bags (Ankom Technology Corporation,
158 Macedon, NY, pore size of 25 µm) as described by Bender et al. (2016), with a sample size to surface
159 area ratio approximately of 13 mg/cm². The samples were incubated for 288 consecutive hours into
160 the rumen of 2 nonlactating Holstein cows fed a diet consisting of (DM basis) alfalfa haylage (74.6%),
161 corn grain (10.9%), soybean hulls (10.9%) and soybean meal (3.6%). Following incubation, bags were
162 rinsed with tap water for 30 min and dried in a forced-air oven at 60°C for 48 h and the residues were
163 analyzed for NDF, as is later described. Additionally, feed composite samples were analyzed for iNDF
164 (as previous described) and DM, OM, EE, PC, NDF, ADF, ADL and starch (as described later).

165 Feeding behavior was recorded for 24 h except during milking (2 h in a.m. milking and 1 h in p.m.
166 milking) during 2 consecutive days by trained observers. The individual cow's activity was recording
167 at 10 min intervals (Sheahan et al., 2013), which provided 126 observations/cow per day. The
168 behaviors evaluated were grazing (eating pasture), lying ruminating (chewing regurgitated boluses of

Anexo I

169 feed in position lying), standing ruminating (chewing regurgitated boluses of feed in position
170 standing), lying not ruminating (only lying, not grazing or ruminating), standing not ruminating (only
171 standing, not grazing or ruminating) and others (i.e. not showing any of the other activities). Total
172 ruminating was calculated as sum of lying ruminating and standing ruminating. The proportion of each
173 behavioral event per hour was calculated as a fraction of total observations.

174 Samples of ruminal fluid were taken in 6 animals per treatment in 4 point of day: *i)* previous start
175 a.m. turn of feeding; *ii)* 4 hours after start a.m. turn of feeding; *iii)* previous start the p.m. turn of
176 feeding and; *iv)* 4 hours after start p.m. turn of feeding. An oral stomach tube was used to obtain the
177 rumen samples. The length of the tube was the 360 cm (Steiner et al., 2015) and the tube was inserted
178 to a depth of 200 cm (Shen et al., 2012). The internal and external diameter of the tube had 1.5 and 2.5
179 cm, respectively. A vacuum pump (60 Hz) was used to samples collect into a Büchner flask. The first
180 200 mL of ruminal content was discharged to minimize the contamination of saliva and, when was
181 observed increase of viscosity another sample was collected. Ruminal fluid pH was immediately
182 measured using a digital pH meter (Orion model 230/A, Orion Research Inc., Jacksonville, FL). A 0.5
183 mL sample of ruminal fluid was preserved with of 0.1 M HClO₄ for VFAs, and another 1 mL sample
184 was preserved with 0.02 mL of H₂SO₄ 50% (v/v) for NH₃-N determinations, and were stored at 20°C
185 until analysis.

186 Individual milk yield was recorded automatically at each milking during experimental period, using
187 DairyPlan C21 (GEA Farm Technologies, Düsseldorf, Germany). Individual milk samples were
188 collected with bronopol as preservative, in 6 consecutives milking's and were stored at 4°C until
189 analyzed.

190

191 *Chemical Analysis*

192 Dry matter content was determined by drying at 105°C for at least 16 h (Method ID 934.01; AOAC,
193 1990). Ash was determined by combusting at 600°C for 3 h and OM, by the mass difference (Method
194 ID 942.05; AOAC, 1990). Total nitrogen was assayed with the Kjeldahl method (Method ID 984.13;
195 AOAC, 1990). Ether extract concentration was determined in a reflux system (Soxtherm 2000 S 306
196 M, Gerhardt; Königswinter, Germany) with ethyl ether at 180°C for 2 h (Method ID 920.39; AOAC,
197 1990). The NDF was analyzed according to the procedures described by Mertens (2002), using heat-
198 stable α -amylase and sodium sulfite. The ADF concentration was analyzed according to Method ID
199 973.18 of AOAC (AOAC, 1990). The ADL concentration was analyzed according to Van Soest et al.
200 (1991). The NDF and ADF analysis were realized independently and NDF, ADF and ADL were
201 expressed exclusive of residual ash. The starch content was determined by enzymatic hydrolysis
202 using commercial kits (K-TSTA 07/11, Megazyme International Ireland, Bray, Co. Wicklow, Ireland).
203 The TiO₂ concentration in fecal samples were determined by the method of Myers et al. (2004).

Anexo I

204 For VFA determination samples were thawed at room temperature, centrifuged ($10,000 \times g$ for 15
205 min at 4°C) and analyzed using HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA) as described by Adams
206 et al. (1984), using an Acclaim Rezex Organic Acid H^+ column (8%, Phenomenex, Torrance, CA) of
207 7.8×300 mm, adjusted at 210 nm. Concentrations of acetic, propionic, and butyric acid were reported
208 in concentration units and as molar proportions; total VFA concentration was calculated as the sum of
209 acetic, propionic, and butyric acids concentrations. For $\text{NH}_3\text{-N}$ determination samples were thawed at
210 room temperature, centrifuged ($10,000 \times g$ for 15 min at 4°C) and analyzed using a spectrometer
211 adjusted at 625 nm as described by Weatherburn (1967).

212

213 *Calculations*

214 Fecal output (kg of DM/d per cow) was estimated for each animal by dividing TiO_2 daily intake
215 (mg/d) by the TiO_2 concentration in feces (mg/kg of DM). Daily intake of concentrate and TMR (kg
216 of DM/d per cow) was determined individually by weighing the amount offered and refused.

217

218 Intake of pasture (kg of DM/cow per d) for MaxGraz treatment was calculated as:

219

220 Pasture intake (kg of DM/cow per d) = $\{[(\text{fecal output (kg of DM/day)} \times \text{fecal iNDF (g/kg of DM)}) -$
221 $[(\text{concentrate intake (kg of DM/day)} \times \text{concentrate iNDF (g/kg of DM)})]\} / \text{Pasture iNDF (g/kg of DM)}$.

222

223 Intake of pasture (kg of DM/cow per d) for FixGraz treatment was calculated as:

224

225 Pasture intake (kg of DM/cow per d) = $\{[(\text{fecal output (kg of DM/day)} \times \text{fecal iNDF (g/kg of DM)}) -$
226 $[(\text{TMR intake (kg of DM/day)} \times \text{TMR iNDF (g/kg of DM)})]\} / \text{Pasture iNDF (g/kg of DM)}$.

227

228 Total DMI (kg of DM/d per cow) was calculated as the sum of pasture and TMR or concentrate
229 intake. Intake of DM, OM, PC, NDF, ADF and starch were calculated by multiplying DMI and each
230 nutrient concentration for each ingredient of the diet. Apparent total-tract digestibility coefficient for
231 DM, OM, PC and NDF of diet was obtained as:

232

233 Apparent total-tract digestibility = $\{[(\text{intake (kg/d)} - \text{fecal output (kg/d)}) / \text{intake (kg/d)}] \times 100$.

234

235 Fat corrected milk (FCM 4%) was calculated according to NRC (2001) as:

236

237 $\text{FCM 4\%} = (0.4 \times \text{kg of milk per day}) + [15 \times (\text{fat \%} / 100) \times \text{kg of milk per day}]$.

238

Anexo I

239 Solids-corrected milk yield (SCM 4%) was calculated according to Tyrrell and Reid (1965) as:

240

241 $SCM\ 4\% = [(12.24 \times \text{kg of fat per day}) + (7.10 \text{ kg of protein per day}) + (6.35 \times \text{kg of lactose per day})$
242 $- 0.0345 \times \text{kg of milk per day}]$.

243

244 The efficiency for N use was calculated as milk N (g/d) / intake N (g/d) and milk N (g/d) / N
245 digestible (g/d). Feed efficiency for milk yield was calculated as SCM 4% (kg/d) / DM intake (kg/d).

246

247 *Statistical Analysis*

248 Statistical analyses were performed using the PROC MIXED procedure of SAS (version 9.1; SAS
249 Institute Inc., Cary, NC). Values of pH and VFAs concentration in rumen previous the start of turn of
250 feeding were used as covariates in their respective data analysis. Intake, rumen fermentation, body
251 variables, milk yield and composition, were analyzed as:

252

$$253 Y_{ij} = \mu + FS_i + Gen_j + (FS_i \times Gen_j) + \varepsilon_{ij}$$

254

255 where Y_{ij} is the dependent variable, FS_i is the fixed effect of feeding system ($i = \text{FixGraz}$ and
256 MaxGraz), Gen_j is the fixed effect of the genotype ($k = \text{NA}$ and NZ), $FS_i \times Gen_j$ is the fixed effect of
257 the feeding system and Genotype interaction, and ε_{ij} is the residual error. The Kenward-Rogers
258 procedure was used to adjust the denominator degrees of freedom.

259

260 Traits with repeated measurements (feeding behavior) were analyzed to each session to feeding,
261 and total of day, with the following model:

262

$$263 Y_{ijk} = \mu + FS_i + Gen_j + H_k + (FS_i \times Gen_j) + (FS_i \times H_k) + (Gen_j \times H_k) + (FS_i \times Gen_j \times H_k) + \varepsilon_{ijk}$$

264

265 where Y_{ijk} is the dependent variable, FS_i is the fixed effect of feeding system ($i = \text{FixGraz}$ and
266 MaxGraz), Gen_j is the fixed effect of the genotype ($k = \text{NA}$ and NZ), H_k is the fixed effect of the hour
267 of day, $FS_i \times Gen_j$ is the fixed effect of the feeding system and genotype interaction, $FS_i \times H_k$ is the
268 fixed effect of the feeding system and hour interaction, $Gen_j \times H_k$ is the fixed effect of the genotype
269 and hour interaction, $FS_i \times Gen_j \times H_k$ is the fixed effect of the feeding system, genotype and hour
270 interaction, and ε_{ijk} is the residual error. The Kenward-Rogers procedure was used to adjust the
271 denominator degrees of freedom. Repeated measurements were analyzed with a first-order
272 autoregressive covariance structure AR (1).

Anexo I

273 Residuals were tested for normal distribution using the PROC UNIVARIATE statement, and
274 outliers were eliminated. Least squares mean were compared using the Tukey s test. Differences were
275 declared at $P \leq 0.05$ and trends were discussed at $0.05 < P \leq 0.10$. The results were presented as mean
276 \pm standard error of the mean (SEM).

277

278

RESULTS

279 Intake and nutrient digestibility for all treatments are presented in Table 4. The total DMI was not
280 different between treatments (19.2 kg/d, SEM = 0.47 kg/d, $P > 0.05$). In general, nutrient intake was
281 not affected by FS \times Gen, except that ADF and starch intake was lower for MaxGraz NZ treatment.
282 Energy intake was greater for FixGraz compared with MaxGraz (44.1 vs. 35.7 Mcal/d) and NA
283 compared with NZ (41.4 vs. 38.5 Mcal/d), respectively. The ADF digestibility was lower for MaxGraz
284 NZ and CP digestibility was lower for FixGraz in contrast with MaxGraz (70.1 vs. 77.2%).

285 Four hours after of a.m. feeding no differences were found for ruminal measurements (Figure 1A).
286 Four hours after p.m. feeding the total VFA (108.5 vs. 88.6 mM) and propionic acid concentrations
287 (24.2 vs. 17.9 mM) were greater for MaxGrazNZ group compared with the other treatments (Figure
288 1B). The NH₃-N ruminal concentration was not different after 4-hour a.m. feeding between treatments
289 (10.5 mg/100mL, SEM = 3.96 mg/100mL, $P > 0.05$) but was greater for MaxGraz NZ, for both FS
290 NA cows and for FixGraz NZ, respectively (17.7 vs. 11.7 vs. 7.4 mg/100mL, $P = 0.002$ for FS and
291 Gen interaction) dates no showed in tables or figures. The ruminal pH was not different 4 hours after
292 start a.m. feeding (pH = 6.8, SEM = 0.2, $P > 0.05$), but, after 4 hours start the p.m. feeding the NZ
293 cows had lower pH that NA cows (6.4 vs. 6.7; $P = 0.028$ for Gen effect) dates no showed in tables or
294 figures.

295 Results of milk yield, milk composition and feed efficiency are shown in Table 5. Feeding strategy
296 did not affect milk yield, but NA cows produced more milk that NZ dairy cows. Greater milk NE_L
297 output was found for NA in contrast with NZ dairy cows. The yield components of milk were not
298 affected by FS but lactose yield was lower for NZ that NA dairy cows. Additionally, milk protein
299 content was greater for NZ that NA dairy cows (3.65 vs. 3.3%). The concentration of Milk urea N in
300 milk was greater for FixGraz in contrast with MaxGraz (26.8 vs. 23.5 mg/dL). In general, the FS
301 FixGraz presented greater values for feed efficiency that MaxGraz.

302 Triple interaction was found for feeding behavior (FS \times Gen \times H, $P < 0.05$). In general, along of
303 day the feeding behavior was affected by FS and Gen (Figure 2 and 3). During a.m. session the in order
304 to greater to lower to feeding the treatment MaxGraz NA, MaxGraz NZ, FixGraz NZ and FixGraz NA
305 dedicated respectively 0.50, 0.44, 0.28 and 0.21, SEM = 0.02, $P < 0.001$ for FS Gen interaction effect.
306 During the p.m. session feeding, not difference was found between treatments for time spend feeding
307 (0.30, SEM = 0.11; $P = 0.795$, for FS \times Gen interaction), but NZ dedicated more proportion of time

Anexo I

308 feeding that NA dairy cows (0.31 vs. 0.28, EM = 0.11, $P < 0.001$ for Gen effect). Furthermore, for
309 total ruminating during a.m. session feeding the treatment MaxGraz NZ speeded more time in contrast
310 others treatments (0.39 vs. 0.30, SEM = 0.021, $P < 0.001$ for FS \times Gen effect) and during p.m. session
311 feeding the FixGraz NA dedicated lower time ruminating in contrast others treatments (0.27 vs. 0.38,
312 SEM = 0.013, $P < 0.001$ for FS \times Gen effect). For standing ruminating not triple or doble interaction
313 was found, but during a.m. feeding session the FixGraz (0.24 vs. 0.11) and the NA cows (0.21 vs. 0.14)
314 had greeter's values in contrast to MaxGraz and NZ cows respectively ($P < 0.001$, for FS and Gen
315 effect). During a.m. feeding session, the MaxGraz NZ, MaxGraz NA, FixGraz NZ and FixGraz NA
316 speeded time for lying ruminating respectively 0.30, 0.18, 0.09, and 0.03, SEM = 0.02, $P = 0.048$, for
317 FS \times Gen effect. For lying ruminating during p.m. feeding session not triple interaction was found, but
318 the FixGraz NA had the lower value in contrast with other treatments (0.21 vs. 0.32, SEM = 0.014, P
319 < 0.001 for FS and Gen interaction). When all period measured was evaluated, both FS MaxGraz
320 dedicated equal proportion of time to feeding and, FixGraz NA and FixGraz NZ dedicated respectively
321 0.36, 0.31 and 0.26, SEM = 0.012, $P = 0.012$ to FS \times Gen interaction effect. For total ruminating during
322 all period evaluated the MaxGraz dedicated more time in contrast to FixGraz (0.37 vs. 0.31, SEM =
323 0.10, $P < 0.001$ for FS effect) and the NZ dedicated more time in contrast the NA dairy cows (0.36 vs.
324 0.32, SEM = 0.010, $P < 0.001$ for Gen effect). For just standing, during a.m. feeding session the
325 FixGraz had greater values to MaxGraz (0.25 vs. 0.08, SEM = 0.05, $P < 0.001$ for FS effect), and the
326 NA cows had greater values to NZ cows (0.20 vs. 0.14, SEM = 0.05, $P < 0.001$ for Gen effect). For
327 just lying, during p.m. feeding session the FixGraz had greater values to MaxGraz (0.25 vs. 0.08, SEM
328 = 0.05, $P < 0.001$ for FS effect), and the NA cows had greater values to NZ cows (0.20 vs. 0.14, SEM
329 = 0.05, $P < 0.001$ for Gen effect).

330

331

DISCUSSION

332 This study was conducted mainly to evaluate how the FS and Gen affect the nutrition, productive
333 performance and behavior of dairy cows. Horan et al. (2006) describe that NZ dairy cows have greater
334 intake capacity as proportion of BW in contrast with NA dairy cows. The same authors described that
335 the greater intake as a proportion of size will result in a greater proportion of total intake for milk yield.
336 However, in ours study, the DMI per 100 kg of BW was not different between treatments and on
337 average was 3.3%. Furthermore, as expected, in the present study, the intake of pasture was different
338 between the FS, represented approximately 39 and 75% of total DMI for the FS FixGraz and MaxGraz
339 respectively. Furthermore, the intake of concentrate represented 25 and 19.2% of DMI for MaxGraz
340 and FixGraz respectively. The proportion of intake of pasture was greater than expected, possible due
341 the lower offer of concentrate and TMR that we had as objective. Additionally, in average the
342 allowance of pasture was greater that we had as objective for the treatments. However, despite the

Anexo I

343 lower supply of concentrate and greater allowance of pasture in present study, the intake of pasture not
344 increased. It describes that the increase of pasture allowance increase the pasture intake (Bargo et al.,
345 2002a; Delagarde et al., 2011) but when cows consume concentrate as part of diet, the changes in
346 pasture intake due the greater herbage allowance could be lower. According Delagarde et al. (2011)
347 cows' that consumed approximately 6 kg of concentrate per day, the changes in pasture intake due the
348 greater herbage allowance of 16 to 22 kg/cow per day was lower than 0.5 kg of pasture intake. Similar
349 results were found in present study, and despite the differences in supply, DMI was not affected. Thus,
350 we conclude that the DMI of pasture in our study were result of FS system and not by difference of
351 allowance. As expected, the FS FixGraz intake greater energy in the diet. The greater NE_L intake for
352 FixGraz could be due greater energy intake by TMR and lower intake of starch for MaxGraz treatment.
353 However, although of greater NE_L intake for both treatments FixGraz, the milk yield not increased.
354 Additionally, on average the efficiency the use the energy intake for energy output in milk was 5%
355 lower for FixGraz that MaxGraz. Differently, the Gen affected the milk yield. The NA cows had
356 approximately 11% more milk yield that NZ dairy cows. As showed in present study, the NA cow's
357 intake more NE_L that NZ dairy cows but the NE_L feed efficiency was not affected by Gen.
358 Consequently, the greater milk yield for NA cows could be due greater supply and intake of concentrate
359 and TMR for cows and not necessarily due better feed efficiency. In the present study, neither FS or
360 Gen affected the DMI or milk yield during the experimental period. However, when whole lactation it
361 will be evaluated, different results could be found for FS and Gen effects in intake and milk yield.

362 Additionally, ruminal environment of dairy cows consuming high-quality pasture exclusively or
363 pasture plus concentrate is characterized by greater concentrations of N-NH₃ (Van Vuuren et al., 1986;
364 Khalili and Sairanen, 2000). In ours study, different as expected, after 4 hours start a.m. session feeding
365 not difference was found by N-NH₃ concentration, but after 4 hours start p.m. session feeding, the N-
366 NH₃ was greater for MaxGraz NZ treatment. Additionally, simultaneous to greater N-NH₃
367 concentration, the MaxGraz NZ had greater VFAs concentration. The greater VFA concentration in
368 rumen showed an improvement of ruminal fermentation for MaxGraz NZ dairy cows, but the same
369 results was not observed to MaxGraz NA. As the cow's intake the same concentrate and grazed a
370 similar pasture, possibly the feeding behavior could be responsible by deference in rumen
371 fermentation. Was observed that 4 hours after start p.m. session feeding the MaxGraz NZ dairy cows
372 dedicated approximately 50% of time to grazing in contrast to 25% for MaxGraz NA. In this moment
373 of day, the MaxGraz NA dedicated 65% of time too ruminating. Thus, we theorized that during the
374 first 4 hours of p.m. feeding session, possibly the NZ dairy cows dedicated more time to selecting
375 pasture. The selection of components more nutritive of pasture, result in greater subtract to ruminal
376 fermentation, increasing VFAs concentration what decrease the ruminal pH. Additionally, the selection
377 of components of pasture could result in a greater N soluble intake, what increase the N-NH₃ in rumen.

Anexo I

378 Additional to greater VFA values after 4 hours start p.m. feeding session, in ours study, the NZ cows
379 had lower ruminal pH. Thus, possibly the differences in feeding behavior could be responsible by
380 ruminal fermentation differences for cows NA and NZ in MaxGraz FS.

381 Is described that, when dietary N intake increased, the efficiency of N utilization for milk production
382 linearly decreased (Gourley et al., 2012; Castillo et al., 2000). Thus, although similar N intake between
383 FS, the lower digestibility of PC and the greater protein content in milk for FixGraz possibly resulted
384 in better N efficiency than MaxGraz. Although FS FixGraz had greater N efficiency, we emphasize
385 the lower N efficiency for MaxGraz FS. Generally, the efficiency of N use is lower on grazing-based
386 dairy farms (Powell et al., 2010). According Chase et al. (2003) N efficiency between 30 and 35% is
387 greater, but values between 25 to 30% is a typical range for farms. In the present study, for the MaxGraz
388 only 27% of N intake was utilized to N milk. The lower N efficiency could be due: (1) the asynchrony
389 between energy and protein nutrient (Cabrita et al., 2006) or (2) characteristics of pasture (Powell et
390 al., 2010). According Cabrita et al. (2006), in pastures the cellulose not promote an effective use of N
391 due the low proportion of cellulose that is rapidly hydrolyzed. Thus, in grazing-based system, the
392 asynchronies between N of pasture and starch of concentrate could be limitans to greater efficiency
393 use of N. Additionally, Powell et al. (2010) described that in grazing system is more difficulty
394 controlling feed protein because pastures are typically higher in protein than the requirement of dairy
395 cows, and additionally pasture protein is generally more highly degradable (NRC, 2001). In contrast,
396 in a system with greater includes of TMR on diet, generally with the information of aliments of diet
397 the levels of N in diet could be more controlled. Furthermore, was found lower CP digestibility for
398 FixGraz than MaxGraz. According Repetto et al. (2005), pastures preserved as silage presented greater
399 values of undegradable N fraction and lower values for soluble protein than the fresh pasture. Thus,
400 the 7% lower CP digestibility for FixGraz could be due the use of haylage and corn silage on diet.
401 Additionally, for FS FixGraz the lower digestibility the protein of diet could be limiting for greater
402 milk yield. Though the NE_L intake was greater for FizGrax, possibility the lower digestible protein
403 content in diet could stanch the energy use for milk synthesis. Thus, in present study, for FS FixGraz
404 the lower CP digestibility could be responsible by the not increase in milk yield, and for FS MaxGraz
405 the asynchronies between N and energy possibly limited a greater milk yield. Additionally, MaxGraz
406 NZ dairy cows consumed 40% lower ADF in contrast to others treatments. Furthermore, the ADF
407 digestibility was 60% lower for MaxGraz NZ that other treatments. With this, we hypothesized that
408 the group MaxGraz NZ dedicated more time to selection during grazing. As observed in our study, the
409 MaxGraz treatments dedicated more proportion of time to grazing, but just the NZ cows had lower
410 intake and lower digestibility of ADF. Thus, beyond the time to grazing other factors could be related
411 with lower ADF intake and digestibility for MaxGraz NZ cows. Although the pasture composition
412 used in all treatments was similar, the treatment MaxGraz NZ had more tall fescue proportion on diet

Anexo I

413 during the experimental period, and this could be affected the results a short-time. Furthermore, was
414 observed that the FixGraz had greater values of milk urea N in both turn of feeding. As described
415 previous, possibly two factors were responsible to greater milk N urea for FixGraz treatments: (1) the
416 greater non-protein nitrogen in TMR due silage and urea supplementation and, (2) the asynchrony
417 between N and energy during grazing. Although that generally the silage presented present greater
418 values of undegradable N fraction (Repetto et al., 2005) is descried also greater ammonia concentration
419 in tropical grasses (Bernardes et al., 2018), and could be increase N in urine, rumen and milk (Beltran
420 et al., 2019).

421 On average the intake the TMR was approximately 1.8 and 1.5 kg per hour of access to TMR for
422 NA and NZ cows respectively. However, according the dates of feeding behavior the FixGraz cows
423 dedicated to eating principally during the first 4 hour of session of feeding. Furthermore, for the
424 FixGraz NZ cows, was observed a second peak of eating in hour 6. With the decrease less pronounced
425 in proportion of time feeding and the double peak for eating for FixGraz NZ cow's possibility NZ
426 dairy cows dedicated more time feeding during TMR session feeding, in contrast to FixGraz NA dairy
427 cows. Thus, we hypothesized that the intake rate for NZ cows was lower than NA dairy cows during
428 TMR session of feeding. Furthermore, even when is divided the kg of TMR intake by hour that cows
429 dedicated eating during a.m. session, the FixGraz intake approximately 8.4 and 5.5 kg of TMR/h
430 respectively for NA and NZ dairy cows. The similar compartment was observed for p.m. session
431 feeding. During p.m. feeding session for FixGraz was observed that NZ cows after entering the
432 paddock not grazed in same proportion as NA dairy cows, and was lower that MaxGraz treatments.
433 Furthermore, FixGraz had double and triple peak grazing at night, for NA and NZ dairy cows
434 respectively. Thus, although this adaptation, the rate pasture intake was on average 1.9 kg of DM/h
435 that cows dedicated to grazing for FixGraz.

436 In general, in ours study cows in MaxGraz FS dedicated more time to grazing and more time to
437 ruminating that FixGraz. These results are similar with Bargo et al. (2002b). The authors described
438 that cows in grazing system spend more time eating in contrast with cows that consume TMR as part
439 of diet. Is described that in grazing system concentrate supplementation reduced the intake drive of
440 dairy cows both in terms of the duration and intensity (Pulido and Leaver, 2001; Balocchi et al. 2002;
441 McCarthy et al. 2007). Similarly, as described by Bargo et al. (2002a) cows exclusively feed with
442 pasture, as grazing, dedicated approximated 42% of the day for grazing and 18% of day for ruminating,
443 but when the cows receded 35% of DMI as concentrate on the diet, the time for grazing and ruminating
444 decrease to approximately 36% and 11% respectively. Although the pasture is similar in NDF and
445 ADF, in our study the cows dedicated more proportion of time to ruminating. In studies that estimate
446 the time of ruminating (min/d) of dairy cows, the particle size and the amount of NDF in the food
447 ingested have a great impact on the time that the animals ruminate throughout the day (Alen, 1997;

Anexo I

448 Zebeli et al., 2006; Tafaj et al., 2007; Byskocv et al., 2015). However, as there was no difference in
449 NDF consumption between the experimental groups, we suggest that the greater particle size intake of
450 pasture in MaxGraz treatment resulted in greater time ruminating. Similar result was found by
451 McCarthy et al. (2007), that describe greater rumination time associated with cows that grazed in
452 contrast with cow's intake concentrate as part of diet, possibility due the greater particle size.

453 Is described that in tie-stalls system, the higher-yielding cows spent 10 min less lying and spend 7
454 min more ruminating while standing per each liter of milk yield (Norrington et al., 2012). In our study,
455 the NA dairy cows produced in average 3 kg more of milk in contrast of NZ cows, but contrary the
456 expected the NA cows remained equivalent to 40 min more lying and 25 min lower ruminating
457 standing. Furthermore, is described that rumination time is more frequent during periods of lying
458 (Schirmann et al., 2012; Beauchemin et al., 2028). In our study, for the treatments that ruminating
459 more during p.m. session feeding proportionally ruminate more in position lying. However, for a.m.
460 session feeding, the FixGraz FS and the NA cows dedicated more time ruminating standing.
461 Additionally, the FixGraz during a.m. session remained more time just standing. The preference to
462 ruminate standing and just standing during a.m. session feeding could be due the characteristics of the
463 plot when were the cows. During the a.m. session the FixGraz consumed TMR, and the cows remained
464 in paddock of earth floor, and despite the good climatic characteristics during the experiment, the floor
465 was humid and possibly the cows chose not lying in this place. For the MaxGraz during the a.m. session
466 the cows spend more proportion of time ruminating in position lying. Therefore, the FixGraz NA that
467 remained more time standing during the session when was offered TMR, dedicated more time to just
468 lying during p.m. session feeding. Thus, as expected the increased of time spend ruminating to
469 MaxGraz treatment was in lying position principally at night.

470

471

CONCLUSIONS

472 Interaction between FS and Gen was observed for same variables, but in general, the FS affected in
473 more extension the feeding behavior and Gen affected in more extension the productive performance.

474

475

ACKNOWLEDGMENTS

476 The authors thank C. Piovano, F. Brun and A. Porcal (UTU Escuela Agraria Sarandí Grande,
477 Universidad del Trabajo del Uruguay, Uruguay); the staff from the Instituto Nacional de Investigacion
478 Agropecuaria-La Estanzuela, Uruguay; the CAP-UdelaR (Comisión Académica de Posgrado from the
479 Universidad de la Republica); the Maria Viñas grant program (FMV_1_2017_1_136417) and the
480 Armand'Ugon. D. *in memoriann* for help in the description of feeding system.

481

482

REFERENCES

Anexo I

- 483 Adams, R. F., R. L. Jones, and P. L. Conway. 1984. High-performance liquid chromatography of
484 microbial acid metabolites. *J. Chromatogr.* 336:125-137.
- 485 Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the
486 requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447–1462.
- 487 AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists,
488 Arlington, VA.
- 489 Balocchi, O. L., R. G. Pulido, and J. V. Fernandez. 2002. Grazing behaviour of dairy cows with and
490 without concentrate supplementation. *Agricultura Tecnica*, 62, 87-98.
- 491 Bargo, F., L. D. Muller, J. E. Delahoy, and T. W. Cassidy. 2002a. Milk response to concentrate
492 supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J. Dairy Sci.*
493 85:1777–1792.
- 494 Bargo, F., L. D. Muller, J. E. Delahoy, and T. W. Cassidy. 2002b. Performance of high producing dairy
495 cow with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.*
496 85:2948-2963.
- 497 Beauchemin K. A. 2018. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in
498 dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:4762-4784.
- 499 Beltran, I. E., P. Gregorini, J. Daza, O. A. Balocchi, A. Morales, and R. G. Pulido. 2019. Diurnal
500 Concentration of Urinary Nitrogen and Rumen Ammonia Are Modified by Timing and Mass of
501 Herbage Allocation. *Animals* 9, 961.
- 502 Bender, R. W., D. E. Cook, and D. K. Combs. 2016. Comparison of in situ versus in vitro methods of
503 fiber digestion at 120 and 288 hours to quantify the indigestible neutral detergent fiber fraction of
504 corn silage samples. *J. Dairy Sci.* 99:5394-5400.
- 505 Bernardes, T. F., J. L. P. Daniel, A. T. Adesogan, T. A. McAllister, P. Drouin, L. G. Nussio, P. Huhtanen,
506 G. F. Tremblay, G. Bélanger, and Y. Cai. 2018. Silage review: Unique challenges of silages made in
507 hot and cold regions. *J. Dairy Sci.* 101:4001–4019.
- 508 Byskov, M. V., E. Nadeau, B. E. O. Johansson, and P. Nørgaard. 2015. Variations in automatically
509 recorded rumination time as explained by variations in intake of dietary fractions and milk
510 production, and between-cow variation. *J. Dairy Sci.* 98:3926–3937.
- 511 Cabrita, A. R., R. J. Dewhurst, J. M. F. Abreu, and A. J. M. Fonseca. 2006. Evaluation of the effects of
512 synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy
513 cows - a review. *Animal Research*, 55(1):1-24.
- 514 Castillo, A. R., E. Kebreab, D. E. Beaver, and J. France. 2000. A review of efficiency of nitrogen
515 utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *J. Anim. Feed*
516 *Sci.* 9:1–32.

Anexo I

- 517 Chase, L.E., 2003. Nitrogen utilization in dairy cows – what are the limits of efficiency? In: Proc.
518 Cornell Nutr. Conf. Syracuse, NY, pp. 233–244.
- 519 Coleman, J., D. P. Berry, K. M. Pierce, A. Brennan, and B. Horan. 2010. Dry matter intake and feed
520 efficiency profiles of 3 genotypes of Holstein-Friesian within pasture-based systems of milk
521 production. *J. Dairy Sci.* 93:4318–4331.
- 522 Coppock, C. E., D. L. Bath, and B. Harris. 1981. From feeding to feeding systems. *J. Dairy Sci* 64:
523 1230-1249.
- 524 Delagarde, R., H. Valk, C. S. Mayne, A. J. Rook, A. Gonzalez-Rodriguez, C. Baratte, P. Faverdin and
525 J. L. Peyraud. 2011. GrazeIn: a model of herbage intake and milk production for grazing dairy cows.
526 3. Simulations and external validation of the model. *Grass and Forage Science*, 66, 61-77.
- 527 Dillon P. 2006. Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. En: Elgersma
528 A, Tamminga S. Fresh herbage for dairy cattle. Ed. Springer. Dordrecht, Cap. 1, pp.1-26.
- 529 Dillon P., Berry D.B., Evans R.D., Buckley F. and B. Horan. 2006. Consequences of genetic selection
530 for milk production in European seasonal pasture-based systems of milk production. *Livestock
531 Production Science*, 99, 141–158.
- 532 Dillon, P., S. Crosse, G. Stakelum, and F. Flynn. 1995. The effect of calving date and stocking rate on
533 the performance of spring calving dairy cows. *Grass Forage Sci.* 50:286–299.
- 534 Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition scoring
535 chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.
- 536 Fariña, S. R., S.C. Garcia, W. J. Fulkerson, and I. M Barchia. 2011. Pasture-based dairy farm systems
537 increasing milk production through stocking rate or milk yield per cow: pasture and animal
538 responses. *Grass and Forage Science*, 66, 316–332.
- 539 Fulkerson, W. J., J. Wilkins, R. C. Dobos, G.M. Hough, M. E. Goddard, and T. Davidson. 2001.
540 Reproductive performance in Holstein-Friesian cows in relation to genetic merit and level of
541 feeding when grazing pasture. *J. Anim. Sci.* 73:397–406.
- 542 Fulkerson, W. J., T. M. Davison, S. C. Garcia, G. Hough, M. E. Goddard, R. Dobos, and M. Blockey.
543 2008. Holstein-Friesian dairy cows under a predominantly grazing system: Interaction between
544 genotype and environment. *J. Dairy Sci.* 91:826–839.
- 545 Gill, M. 1979. The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass For Sci*
546 34:155-161.
- 547 Glindemann, T., B. M. Tas, C. Wang, S. Alvers, and A. Susenbeth. 2009. Evaluation of titanium
548 dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Anim. Feed Sci.
549 Technol.* 152:186-197.
- 550 Gourley, C.J.P., S. R. Aarons, and J.M. Powell. 2012. Nitrogen use e_iciency and manure management
551 practices in contrasting dairy production systems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 147:73–81.

Anexo I

- 552 Harris B.L., and E.S. Kolver. 2001. Review of holsteinisation on intensive pastoral dairy farming in
553 New Zealand. *Journal of Dairy Science*, 84, E56–E61.
- 554 Horan, B., P. Dillon, P. Faverdin, L. Delaby, F. Buckley, and M. Rath. 2005. The interaction of strain
555 of Holstein-Friesian cows and pasture-based feed systems on milk yield, body weight, and body
556 condition score. *J. Dairy Sci.* 88:1231–1243.
- 557 Horan, H., P. Faverdin, L. Delaby, M. Rath and P. Dillon. 2006. The effect of strain of Holstein-Friesian
558 dairy cow and pasture-based system on grass intake and milk production. *Animal Science*, 82:435-
559 444.
- 560 Huhtanen, P., Kaustell, and K., S. Jaakkola, 1994. The use of internal markers to predict total
561 digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci.*
562 *Technol.* 48:211-227.
- 563 Kennedy J, Dillon P, Delaby L, Faverdin P, Stakelum G, Rath M. 2003a. Effect of genetic merit and
564 concentrate supplementation on grass intake and milk production with Holstein Friesian dairy cows.
565 *J. Dairy Sci.* 86:610–621.
- 566 Khalili, H., and A. Sairanen. 2000. Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk
567 production of cows at pasture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 84:199–212.
- 568 Kolver, E. S., J. R. Roche, M. J. de Veth, P. Thorne, and A. R. Napper. 2002. Total mixed ration versus
569 pasture diets: Evidence of a genotype diet interaction. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 62:246–251.
- 570 Fajardo, M., D. A. Mattiauda, G. Motta, T. C. Genro, A. Meikle, M. Carriquiry and P. Chilibroste.
571 2015. Use of mixed rations with different access time to pastureland on productive responses of
572 early lactation Holstein cows. *Livestock Science.* 181:51-57.
- 573 McCarthy, S., B. Horan, M. Rath, M. Linnane, P. O'Connor, and P. Dillon. 2007. The influence of
574 strain of Holstein-Friesian dairy cow and pasture-based feeding system on grazing behaviour, intake
575 and milk production. *Grass Forage Sci.* 62:13–26.
- 576 Mendoza A., C. Cajarville, and J. L. Repetto. 2016. Digestive response of dairy cows fed diets
577 combining fresh forage with a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 99:8779–8789.
- 578 Mertens, D.R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with
579 refluxing beakers or crucibles: A collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217-1240.
- 580 Myers, W. D., P. A. Ludden, V. Nayigihugu, and B. W. Hess. 2004. Technical Note: A procedure for
581 the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Dairy Sci.* 82:179-183.
- 582 National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press,
583 Washington DC.
- 584 Norring, M., A. Valros, and L. Munksgaard. 2012. Milk yield affects time budget of dairy cows in tie-
585 stalls. *J. Dairy Sci.* 95:102-108.

Anexo I

- 586 Pastorini, M., N. Pomies, J. L. Repetto, A. Mendoza, and C. Carjaville. 2019. Productive performance
587 and digestive response of dairy cows fed different diets combining a total mixed ration and fresh
588 forage. *J. Dairy Sci.* 102:4118–4130.
- 589 Powell, J.M., Gourley, C.J.P., Rotz, C.A., Weaver, D.M., 2010. Nitrogen use efficiency: a measurable
590 performance indicator for dairy farms. *Environ. Sci. Policy* 13,217–228.
- 591 Pulido R.G., and J. D. Leaver. 2001. Quantifying the influence of sward height, concentrate level and
592 initial milk yield on the milk production and grazing behaviour of continuously stocked dairy cows.
593 *Grass and Forage Science*, 56, 57-67.
- 594 Rauw W. M., E. Kanis, E. N. Noordhuizen-Stassen, and F. J. Grommers. 1998. Undesirable side effects
595 of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science*,
596 56:15-33.
- 597 Repetto, J. L., C. Cajarville, J. D'alessandro, A. Curbelo, C. Soto, and D. Garín. 2005. Effect of wilting
598 and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Anim. Res.* 54:73–
599 80.
- 600 Schirmann, K., N. Chapinal, D. M. Weary, W. Heuwieser, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2012.
601 Rumination and its relationship to feeding and lying behavior in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*
602 95:3212–3217.
- 603 Sheahan, A. J., S. J. Gibbs, and J. R. Roche. 2013. Timing of supplementation alters grazing behaviour
604 and milk production response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:477-483.
- 605 Shen J. S., Z. Chai, L. J. Song, J. X. Liu, and Y. M. Wu. Insertion depth of oral stomach tubes may
606 affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:5978–
607 5984. 2012
- 608 Stakelum G., and P. Dillon. 2003. The effect of concéntrate type and sward characteristics on herbage
609 intake, diet composition and grazing behaviour of dairy cows. *Irish Journal of Agricultural and Food*
610 *Research*, 42, 55-70.
- 611 Steiner, S., A. Neidl, N. Linhart, A. Tichy, J. Gasteiner, K. Gallob, W. Baumgartner, and T. Wittek.
612 2015. Randomised prospective study compare efficacy of five different stomach tubes for rumen
613 fluid sampling in dairy cows. *Veterinary Record*, 176: 50-56.
- 614 Tafaj, M., Q. Zebeli, C. Baes, H. Steingass, and W. Drochner. 2007. A meta-analysis examining effects
615 of particle size of total mixed rations on intake, rumen digestion and milk production in highyielding
616 dairy cows in early lactation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 138:137–161.
- 617 Titgemeyer, E. C., C. K. Armendariz, D. J. Bindel, R. H. Greenwood, and C. A. Loest. 2001. Evaluation
618 of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *J. Anim. Sci.* 79:1059-1063.
- 619 Tyrrell, H. F., and J. T. Reid. 1965. Prediction of the energy value of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 48:1215–
620 1223.

Anexo I

- 621 Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent
622 fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- 623 Van Vuuren, A. M., C. J. van der Koelen, and J. Vroons de Bruin. 1986. Influence of level and
624 composition of concentrate supplements on rumen fermentation patterns of grazing cows. *Neth. J.*
625 *Agric. Sci.* 34:457–467.
- 626 Veerkamp, R. F., P. Dillon, E. Kelly, A. R. Cromie, and A. F. Groen. 2002. Dairy cattle breeding
627 objectives combining yield, survival and calving interval for pasture-based systems in Ireland under
628 different milk quota scenarios. *Livestock Production Science* 76:137–151.
- 629 Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical*
630 *Chemistry*, 39:971-974.
- 631 Zebeli, Q., M. Tafaj, H. Steingass, B. Metzler, and W. Drochner. 2006. Effects of physically effective
632 fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed
633 rations. *J. Dairy Sci.* 89:651–668.

Anexo I634 **Table 1.** Animal characteristics in during experimental period (standard deviation in parentheses)

Item	FixGraz ¹		MaxGraz ²	
	NA ³	NZ ⁴	NA	NZ
DIM, d	133 (21)	129 (19)	138 (16)	136 (19)
BW, kg	575 (46)	523 (49)	544 (34)	511 (37)
BCS, (1 to 5 scale, Edmonson et al., 1989)	3.0 (0.4)	3.0 (0.5)	2.7 (0.4)	2.6 (0.2)
Parity ⁵	3.4 (1.0)	3.1 (1.0)	3.0 (0.7)	3.2 (1.0)
Economic Breeding Index ⁶	111.3 (9.1)	120.3 (6.2)	105.1 (14.2)	128.1 (9.5)

635 ¹FixGraz = grazing fixed, the cow's intake pasture (approximately 30% of total DMI) after p.m.
636 milking until a.m. milking and intake TMR (approximately 70 % of total DMI) after a.m. milking until
637 p.m. milking.

638 ²MaxGraz = maximum grazing, the cow's intake pasture during of the two turns of feeding
639 (approximately 70% of total DMI) and intake concentrate during milking periods (approximately 30%
640 of total DMI).

641 ³NA = North American Holstein-Friesian.

642 ⁴NZ = New Zealand Holstein-Friesian.

643 ⁵Only multiparous dairy cows were used.

644 ⁶Determinate according Veerkamp et al. (2002).

Anexo I

645 **Table 2.** Pasture, TMR and concentrate offered (kg of DM/cow per d) during experimental period

Item	FixGraz ¹		MaxGraz ²	
	NA ³	NZ ⁴	NA	NZ
<i>DMI estimated, kg/cow per d</i>				
Pasture	8.5	7.4	17	15
TMR	15	13	-	-
Concentrate	-	-	6.3	5.5
Total	23.5	20.4	23.3	20.5
<i>Offered, kg of DM/cow per d</i>				
Pasture	15.2	9.6	22.8	15.9
TMR	12.5	10.9	-	-
Concentrate	-	-	5.3	4.6
Total	27.7	20.5	28.1	20.5

646 ¹FixGraz = grazing fixed, the cow's intake pasture (approximately 30% of total DMI) after p.m.
 647 milking until a.m. milking and intake TMR (approximately 70 % of total DMI) after a.m. milking until
 648 p.m. milking.

649 ²MaxGraz = maximum grazing, the cow's intake pasture during of the two turns of feeding
 650 (approximately 70% of total DMI) and intake concentrate during milking periods (approximately 30%
 651 of total DMI).

652 ³NA = North American Holstein-Friesian.

653 ⁴NZ = New Zealand Holstein-Friesian.

Anexo I

654 **Table 3.** Ingredients and mean nutrient composition (standard deviation in parentheses) of TMR,
655 concentrate and mixed pasture (% DM, unless otherwise indicated) during the experimental period

Item	TMR	Concentrate	Pasture ¹
<i>Nutrient composition</i>			
DM, % of as fed	50.7 (0.06)	89.9 (0.01)	19.2 (0.04)
OM	91.7 (0.10)	92.0 (0.42)	88.1 (0.18)
NDF	42.1 (0.93)	28.6 (0.42)	55.7 (2.22)
ADF	18.1 (0.18)	8.3 (0.09)	23.1 (1.54)
ADL	3.93 (0.40)	1.7 (0.11)	3.85 (1.13)
Ether extract	2.53 (0.14)	2.93 (0.05)	3.05 (0.21)
CP	15.0 (0.38)	17.7 (0.30)	16.9 (0.29)
Starch	29.4 (0.48)	38.9 (0.45)	-
NE _L ² , Mcal/kg of DM	1.51	1.81	1.39
<i>Ingredients of TMR, % of DM</i>			
Corn silage	42.9		
Pasture haylage ³	25.0		
Corn grain	14.0		
Wheat bran	8.4		
Soybean meal	7.9		
Sodium bicarbonate	0.5		
Magnesium Oxide	0.4		
Urea	0.3		
Vitamin and mineral premix ⁴	0.3		
Dicalcium phosphate	0.2		
Yeast	0.018		

656 ¹Mixed pasture composed by Alfalfa (*Medicago sativa*), cocksfoot (*Dactylis glomerata*) and tall
657 fescue (*Festuca arundinacea*)

658 ²Calculated according NRC (2001).

659 ³Alfalfa (*Medicago sativa*), cocksfoot (*Dactylis glomerata*) and tall fescue (*Festuca arundinacea*)

660 ⁴Provided (per kg of DM of vitamin-mineral mix): 3 g of salt, 1.9 g of sodium bicarbonate, 1.9 g of
661 calcium carbonate, and a commercial product (content per kg of DM): 140 g of Ca, 14 g of P, 30 g
662 of Mg, 150 g of Na, 110 g of Cl, 874 mg of Cu, 2,668 mg of Zn, 9 mg of Se, 1,090 mg of Mn, 23
663 mg of I, 3 mg of Co, 65,707 IU of vitamin A, 13,141 IU of vitamin D3, 298 IU of vitamin E.

664

Anexo I

665 **Table 4.** Intake and nutrient intake and digestibility of dairy cows with different genetic in two different feeding strategy

Item	FS ¹		Gen ²		FS × Gen				SEM ³	P-value ⁴		
	FixGraz	MaxGraz	NA	NZ	FixGraz		MaxGraz			FS	Gen	FS × Gen
					NA	NZ	NA	NZ				
<i>DMI, kg/d</i>												
Pasture ⁵	7.5 ^b	14.4 ^a	10.7	11.1	7.2	7.8	14.3	14.5	1.05	<0.001	0.564	0.871
TMR	-	-	6.2 ^a	5.4 ^b	12.4	10.8	-	-	0.05	-	<0.001	-
Concentrate	-	-	2.6 ^a	2.3 ^b	-	-	5.3	4.5	0.04	-	<0.001	-
Total	19.1	19.3	19.6	18.8	19.6	18.6	19.6	19.0	1.07	0.807	0.289	0.787
As % BW	3.19	3.43	3.22	3.40	3.07	3.32	3.38	3.48	0.28	0.093	0.208	0.600
<i>Nutrient intake, kg/d</i>												
OM	17.3	17.2	17.6	16.9	17.7	16.8	17.5	17	1.06	0.948	0.273	0.784
NDF	9.0	8.5	8.8	8.8	9.1	8.8	8.4	8.7	0.60	0.227	0.960	0.402
ADF	3.7	3.0	3.7	3.0	3.7 ^x	3.7 ^x	3.8 ^x	2.2 ^y	0.26	<0.001	<0.001	<0.001
CP	3.0	3.2	3.2	3.0	3.1	2.9	3.3	3.2	0.20	0.103	0.169	0.769
Starch	3.4	1.9	2.8	2.5	3.6 ^x	3.2 ^x	2.1 ^y	1.8 ^y	0.04	<0.001	<0.001	<0.001
ENL ⁶ , Mcal/d	44.1 ^a	35.7 ^b	41.4 ^a	38.5 ^b	46.0	42.3	36.8	34.7	1.51	<0.001	0.007	0.416
<i>Digestibility, %</i>												
DM	67.8	70.7	71.0	67.5	68.9	66.7	73.1	68.2	2.26	0.138	0.070	0.489
OM	71.1	73.5	73.9	70.8	72.1	70.1	75.6	71.5	2.06	0.170	0.079	0.539
NDF	65.9	64.8	66.3	64.5	67.1	64.6	65.4	64.3	3.10	0.693	0.495	0.774
ADF	54.7	40.4	56.0	39.1	51.2 ^x	58.2 ^x	60.8 ^x	20.0 ^y	4.90	0.001	<0.001	<0.001
CP	70.1 ^b	77.2 ^a	74.9	72.4	71.2	69.1	78.6	75.7	1.83	<0.001	0.108	0.770

666 ¹FS = feeding strategy. FixGraz = grazing fixed, the cows intake pasture (approximately 30% of total DMI) after p.m. milking until a.m. milking and
667 intake TMR (approximately 70 % of total DMI) after a.m. milking until p.m. milking; MaxGraz = maximum grazing, the cows intake pasture during of
668 the two turns of feeding (approximately 70% of total DMI) and intake concentrate during milking periods (approximately 30% of total DMI).

669 ²Gen = genotype; NA = North American Holstein-Friesian; NZ = New Zealand Holstein-Friesian.

670 ³Greatest standard error of the means.

671 ⁴FS = feeding strategy; Gen = genotype; FS × Gen = feeding strategy-by-genetic interaction. ^{x-y}Significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments
672 when $FS \times Gen \leq 0.05$. ^{a-b}Significant differences ($P \leq 0.05$) when $FS \times Gen > 0.05$.

673 ⁵Mixed pasture composed by Alfalfa (*Medicago sativa*), cocksfoot (*Dactylis glomerata*), tall fescue (*Festuca arundinacea*).

674 ⁶Calculated according NRC (2001).

Anexo I

675 **Table 5.** Milk yield and composition of dairy cows with different genetic in two different feeding strategy

Item	FS ¹		Gen ²		FS × Gen				SEM ³	P-value ⁴		
	FixGraz	MaxGraz	NA	NZ	FixGraz		MaxGraz			FS	G	FS × Gen
					NA	NZ	NA	NZ				
<i>Milk yield</i>												
Milk yield, kg/d	28.2	27.5	29.7 ^a	26.0 ^b	29.7	26.6	29.7	25.4	2.01	0.618	0.006	0.646
FCM 4% ⁵ , kg/d	28.6	27.0	29.5 ^a	26.2 ^b	30.7	26.5	28.3	25.8	2.62	0.280	0.023	0.535
SCM 4% ⁶ , kg/d	28.4	26.5	28.8 ^a	26.0 ^b	30.3	26.4	27.4	25.6	2.47	0.178	0.042	0.465
Milk NE _L output ⁷ , Mcal/d	21.4	20.0	21.8 ^a	19.7 ^b	22.8	20.0	20.7	19.4	1.87	0.180	0.045	0.470
Fat, %	4.80 ^a	4.40 ^b	4.43	4.77	4.70	4.91	4.16	4.64	0.18	0.029	0.059	0.456
Protein, %	3.54 ^a	3.33 ^b	3.23 ^b	3.65 ^a	3.34	3.74	3.11	3.55	0.16	0.008	<0.001	0.724
Lactose, %	4.84 ^a	4.71 ^b	4.79	4.76	4.89	4.79	4.69	4.74	0.05	0.006	0.547	0.102
Fat, kg/d	1.19	1.09	1.20	1.09	1.28	1.11	1.12	1.07	0.13	0.111	0.094	0.353
Protein, kg/d	0.90	0.85	0.90	0.85	0.93	0.87	0.86	0.84	0.07	0.220	0.286	0.671
Lactose, kg/d	1.28	1.24	1.37 ^a	1.16 ^b	1.40	1.17	1.34	1.15	0.11	0.568	0.004	0.726
Milk urea N, mg/dL	26.8 ^a	23.5 ^b	24.5	25.7	26.0	27.6	23.1	23.9	0.68	<0.001	0.082	0.541
<i>Feed Efficiency</i>												
Milk NE _L / NE _L intake (Mcal/d)	0.53 ^b	0.58 ^a	0.57	0.53	0.56	0.49	0.58	0.57	0.022	0.039	0.121	0.162
Milk N / N intake (g/d)	0.32 ^a	0.27 ^b	0.30	0.29	0.34	0.31	0.27	0.27	0.017	<0.001	0.502	0.330
SCM 4% / DMI (kg/d)	1.67 ^a	1.44 ^b	1.64 ^a	1.47 ^b	1.81	1.53	1.47	1.41	0.086	0.004	0.024	0.135

676 ¹FS = feeding strategy. FixGraz = grazing fixed, the cows intake pasture (approximately 30% of total DMI) after p.m. milking until a.m. milking and
677 intake TMR (approximately 70 % of total DMI) after a.m. milking until p.m. milking; MaxGraz = maximum grazing, the cows intake pasture during of
678 the two turns of feeding (approximately 70% of total DMI) and intake concentrate during milking periods (approximately 30% of total DMI).

679 ²Gen = genotype; NA = North American Holstein-Friesian; NZ = New Zealand Holstein-Friesian.

680 ³Greatest standard error of the means.

681 ⁴FS = feeding strategy; Gen = genotype; FS × Gen = feeding strategy-by-genetic interaction. ^{a-b}Significant differences ($P \leq 0.05$) when FS × Gen >
682 0.05.

683 ⁵Fat corrected milk calculated as NRC (2001), as FCM 4% = $(0.4 \times \text{kg of milk per day}) + (15 \times (\text{fat}\% / 100) \times \text{kg of milk per day})$.

684 ⁶Solids corrected milk calculated as Tyrrell and Reid (1965), as SCM 4% = $[(12.24 \times \text{kg of milk fat yield per day}) + (7.10 \times \text{kg of milk protein yield per}$
685 $\text{day}) + (6.35 \times \text{kg of milk lactose yield per day})] - (0.0345 \times \text{kg of milk yield per day})$.

686 ⁷Milk NEL output calculated as NRC (2001), as Milk NEL output, Mcal/d = $(0.0929 \times \text{kg of fat per day}) + (0.0547 \times \text{kg of protein per day}) + (0.0395 \times$
687 $\text{kg of lactose per day})$.

Anexo I

688 **Figure 1.** Volatile fatty acids (VFAs) of dairy cows with different genetic (NA and NZ) in two
689 different feeding strategy (FixGraz and MaxGraz), when: NA = North American Holstein-Friesian;
690 NZ = New Zealand Holstein-Friesian; FixGraz = grazing fixed, the cows intake pasture
691 (approximately 30% of total DMI) after p.m. milking until a.m. milking and intake TMR
692 (approximately 70 % of total DMI) after a.m. milking until p.m. milking; MaxGraz = maximum
693 grazing, the cows intake pasture during of the two turns of feeding (approximately 70% of total
694 DMI) and intake concentrate during milking periods (approximately 30% of total DMI). **(A)** Total
695 VFAs, mM (FS, $P = 0.585$; Gen, $P = 0.390$; FS \times Gen, $P = 0.232$); Acetic acid, mM (FS, $P = 0.368$;
696 Gen, $P = 0.438$; FS \times Gen, $P = 0.249$); Propionic acid, mM (FS, $P = 0.112$; Gen, $P = 0.526$; FS \times
697 Gen, $P = 0.298$); and Butyric acid, mM (FS, $P = 0.319$; Gen, $P = 0.307$; FS \times Gen, $P = 0.197$), all
698 measured 4 after a.m. feeding; **(B)** Total VFA, mM (FS, $P = 0.527$; Gen, $P = 0.021$; FS \times Gen, $P =$
699 0.040); Acetic acid, mM (FS, $P = 0.236$; Gen, $P = 0.026$; FS \times Gen, $P = 0.065$); Propionic acid, mM
700 (FS, $P = 0.688$; Gen, $P = 0.010$; FS \times Gen, $P = 0.018$); and Butyric acid, mM (FS, $P = 0.215$; Gen,
701 $P = 0.142$; FS \times Gen, $P = 0.036$), all measured 4 after p.m. feeding. ^{a-b}Significant differences ($P \leq$
702 0.05) between treatments when FS or Gen, and FS \times Gen ≤ 0.05 .

703

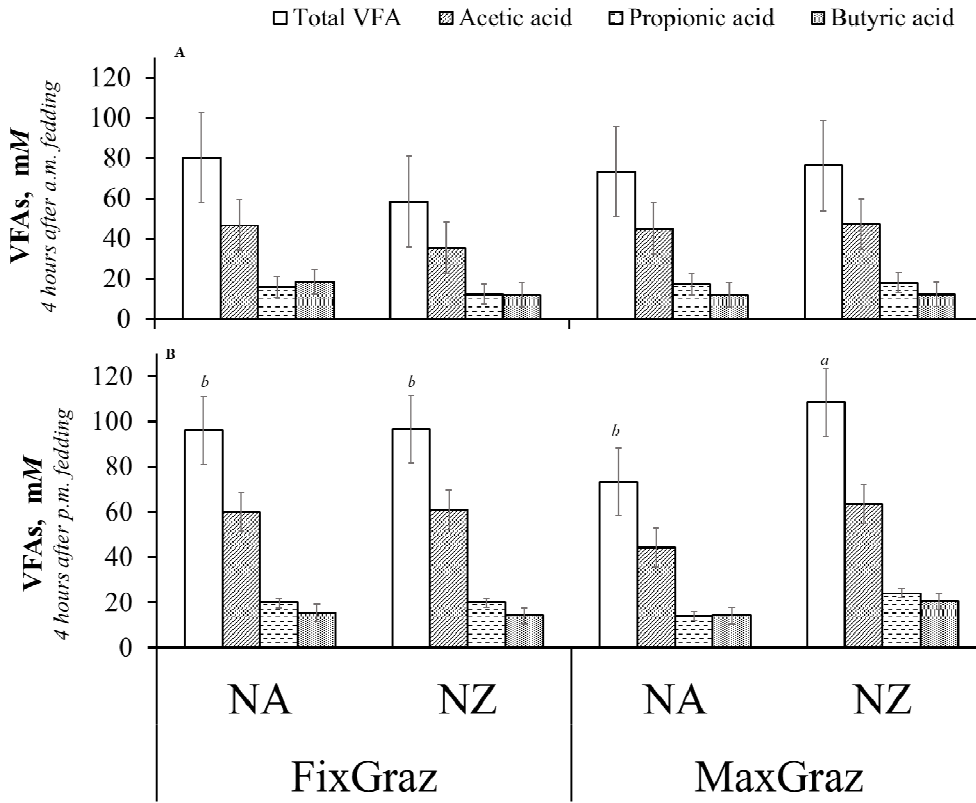
704 **Figure 2.** Feeding behavior (expressed as proportion of total observations) of dairy cows with
705 different genetic (NA and NZ) in two different feeding strategy (FixGraz and MaxGraz), when: NA
706 = North American Holstein-Friesian; NZ = New Zealand Holstein-Friesian; FixGraz = grazing
707 fixed, the cows intake pasture (approximately 30% of total DMI) after p.m. milking until a.m.
708 milking and intake TMR (approximately 70 % of total DMI) after a.m. milking until p.m. milking;
709 MaxGraz = maximum grazing, the cows intake pasture during of the two turns of feeding
710 (approximately 70% of total DMI) and intake concentrate during milking periods (approximately
711 30% of total DMI). The milking's periods of day are represented as gray area. FS = feeding strategy;
712 Gen = Genotype; H = hour; FS \times H = feeding strategy-by-hour interaction; Gen \times H = Genotype-
713 by-hour interaction; FS \times Gen \times H = feeding strategy-Genotype-hour interaction. **(A)** Feeding, after
714 a.m. milking to p.m. milking (FS, $P < 0.001$; Gen, $P = 0.654$; FS \times Gen, $P < 0.001$; H, $P < 0.001$;
715 FS \times H, $P < 0.001$; Gen \times H, $P < 0.001$; FS \times Gen \times H, $P < 0.001$), after p.m. milking to a.m. milking
716 (FS, $P = 0.429$; Gen = 0.007 ; FS \times Gen, $P < 0.795$; H, $P < 0.001$; FS \times H, $P < 0.001$; Gen \times H, $P <$
717 0.001 ; FS \times Gen \times H, $P = 0.006$); **(B)** Total Ruminating, after a.m. milking to p.m. milking (FS, P
718 $= 0.008$; Gen, $P = 0.420$; FS \times Gen, $P = 0.002$; H, $P < 0.001$; FS \times H, $P < 0.001$; Gen \times H, $P <$
719 0.001 ; FS \times Gen \times H, $P = 0.002$), after p.m. milking to a.m. milking (FS, $P < 0.001$; Gen, $P < 0.001$;
720 FS \times Gen, $P < 0.001$; H, $P < 0.001$; FS \times H, $P < 0.001$; Gen \times H, $P < 0.001$; FS \times Gen \times H, $P =$
721 0.015); **(C)** Standing not ruminating, after a.m. milking to p.m. milking (FS, $P < 0.001$; Gen, $P <$
722 0.001 ; FS \times Gen, $P = 0.744$; H, $P < 0.001$; FS \times H, $P = 0.444$; Gen \times H, $P = 0.014$; FS \times Gen \times H,

Anexo I

723 $P < 0.001$), after p.m. milking to a.m. milking (FS, $P = 0.171$ 0.001; Gen, $P = 0.171$; FS \times Gen, $P =$
724 0.232; H, $P < 0.001$; FS \times H, $P = 0.035$; Gen \times H, $P = 0.041$; FS \times Gen \times H, $P = 0.103$); (**D**) Lying
725 not ruminating, after a.m. milking to p.m. milking (FS, $P < 0.001$; Gen, $P = 0.037$; FS \times Gen, $P =$
726 0.965; H, $P < 0.001$; FS \times H, $P = 0.003$; Gen \times H, $P = 0.001$; FS \times Gen \times H, $P = 0.009$), after p.m.
727 milking to a.m. milking (FS, $P < 0.001$; Gen, $P < 0.001$; FS \times Gen, $P < 0.001$; H, $P < 0.001$; FS \times
728 H, $P = 0.039$; Gen \times H, $P < 0.001$; FS \times Gen \times H, $P = 0.009$). ^{a-b}Significant differences ($P \leq 0.05$)
729 between treatments when FS, Gen, or hour and FS \times Gen \times H ≤ 0.05 .

Anexo I

730 Capelesso. Figure 1.

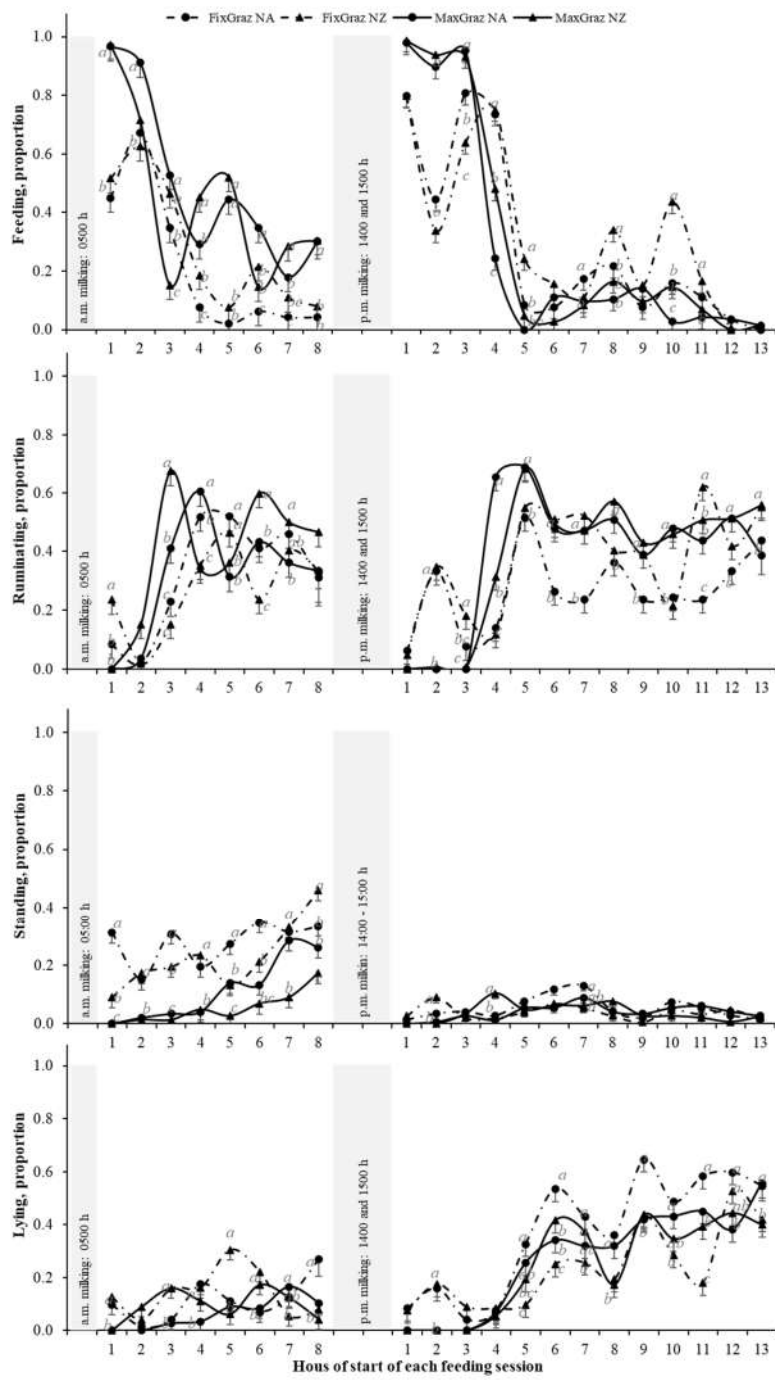


731

Anexo I

732 Capelesso. Figure 2.

733



734

Anexo I

Supplementary material. Capelesso.

Table 1. Feeding Behaviour of dairy cows with different genetic in two different feeding strategy

Proportion of total observation	Period ¹	FS ²		Gen ³		FS × Gen				SEM ⁴	P-value ⁵		
		FixGraz	MaxGraz	NA	NZ	FixGraz		MaxGraz			FS	Gen	FS × Gen
						NA	NZ	NA	NZ				
Feeding	a.m.	0.25 ^b	0.47 ^a	0.36	0.36	0.21 ^z	0.28 ^y	0.50 ^w	0.44 ^x	0.02	<0.001	0.654	<0.001
	p.m.	0.30	0.29	0.28 ^b	0.31 ^a	0.29	0.32	0.28	0.31	0.01	0.429	0.007	0.795
<i>Ruminating</i>													
Total ruminating	a.m.	0.30 ^b	0.35 ^a	0.32	0.33	0.32 ^x	0.28 ^x	0.31 ^x	0.39 ^w	0.02	0.008	0.420	0.002
	p.m.	0.32 ^b	0.39 ^a	0.33 ^b	0.38 ^a	0.27 ^x	0.37 ^w	0.38 ^w	0.39 ^w	0.01	<0.001	<0.001	<0.001
Standing ruminating	a.m.	0.24 ^a	0.11 ^b	0.21 ^a	0.14 ^b	0.29	0.19	0.13	0.09	0.02	<0.001	<0.001	0.074
	p.m.	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06	0.01	0.553	0.659	0.692
Lying ruminating	a.m.	0.06 ^b	0.24 ^a	0.11 ^b	0.19 ^a	0.03 ^w	0.09 ^x	0.18 ^y	0.30 ^z	0.02	<0.001	<0.001	0.048
	p.m.	0.26 ^b	0.32 ^a	0.26 ^b	0.32 ^a	0.21 ^x	0.32 ^w	0.32 ^w	0.32 ^w	0.01	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Position</i>													
Standing, not ruminating	a.m.	0.25 ^a	0.08 ^b	0.20 ^a	0.14 ^b	0.28	0.23	0.11	0.05	0.01	<0.001	<0.001	0.744
	p.m.	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.01	0.171	0.171	0.232
Lying, not ruminating	a.m.	0.13 ^a	0.08 ^b	0.09 ^b	0.12 ^a	0.11	0.14	0.06	0.10	0.01	0.001	0.037	0.965
	p.m.	0.31 ^a	0.26 ^b	0.32 ^a	0.24 ^b	0.37 ^w	0.24 ^x	0.27 ^x	0.24 ^x	0.01	<0.001	<0.001	<0.001
Other ⁶	a.m.	0.07 ^a	0.02 ^b	0.04	0.04	0.07	0.07	0.02	0.02	0.01	<0.001	0.696	0.420
	p.m.	0.025 ^a	0.017 ^b	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.01	0.016	0.298	0.023

¹Period: a.m. = 06:00 at 13:00 h of day; p.m. = 16:00 at 05:00 h of day.

²FS = feeding strategy. FixGraz = grazing fixed, the cows intake pasture (approximately 30% of total DMI) after p.m. milking until a.m. milking and intake TMR (approximately 70 % of total DMI) after a.m. milking until p.m. milking; MaxGraz = maximum grazing, the cows intake pasture during of the two turns of feeding (approximately 70% of total DMI) and intake concentrate during milking periods (approximately 30% of total DMI).

³Gen = genotype; NA = North American Holstein-Friesian; NZ = New Zealand Holstein-Friesian.

⁴Greatest standard error of the mean.

Anexo I

⁵FS = feeding strategy; Gen = genotype; FS × Gen = feeding strategy-by-genetic interaction. ^{w-x-y-z}Significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments when FS × Gen ≤ 0.05 . ^{a-b}Significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments when FS × Gen > 0.05 .

⁶Not showing any of the other activities.

Anexo II

Interpretive Summary

Extra walking to access the pasture: Effect on digestion and productive performance of dairy cows in a grazing system. Capelesso

The objectives of this study were to investigate the effect of walking to access the pasture, on intake, behavior rumen fermentation and milk production of dairy cows in a grazing system. Furthermore, while walking, cows are under a fasting period and this effect was also studied. Intake was not different between treatments but milk yield, feed behavior and rumen fermentation and were more affected fasting than walking. Thus, the short fasting of 'approximately 100 min/d' impact to a greater extent than the walk of 5 km/d to access the pasture of dairy cows in the middle third of lactation in a grazing system.

Running Head: WALKING AND FASTING IN DAIRY COWS

Extra walking to access the pasture: Effect on digestion and productive performance of dairy cows in a grazing system

A. Capelesso,*†¹ J. L. Repetto,* G. Kozloski,† J. Dayuto,* A. Mendoza, ‡ C. Cajarville*

*Departamento de Producción Animal – IPAV, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Ruta 1 km 42.5, San José, Uruguay

†Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 97105900, Brazil

‡Programa de Producción de Leche, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta 50 km 11, 70002, Colonia, Uruguay

¹Corresponding author: Alsiane Capelesso. Departamento de Producción Animal – IPAV, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1 km 42.5, 80100, San José, Uruguay. Tel/Fax: +598-43407023. E-mail: ascapelesso@gmail.com

ABSTRACT

29
30 To investigate whether the effects of walking to access the pasture of dairy cows are due by walking
31 'per se' or by the fasting associated to the walking activity, 30 crossbred Holstein x Jersey cows (12
32 cows provided with ruminal catheters) were assigned in a randomized complete block design to one
33 of 3 treatments: *i*) grazing (**GRA**), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking
34 until previous p.m. milking, *ii*) walking (**W_{5km}**), the cows walked 2.5 km before and after grazing at
35 the pasture totalizing a walk of 5 km/d, and *iii*) fasting (**FAS**), the cows fasted in a paddock without
36 food and water while W_{5km} group walked, and afterwards accessed to the pasture. After p.m. milking
37 all groups acceded the pasture at same time, remaining until the early a.m. milking. In both grazing
38 turns, all cows grazed a mixed pasture, with a minimum allowance of 30 kg of DM/cow per day, and
39 fed 3.6 kg of DM/cow per day of soybean hulls at the milking parlor. During the trial, variables of
40 intake, digestion, rumen fermentation, feeding behavior and productive performance were measured.
41 Preplanned orthogonal contrasts were used to separate the effect of permanent grazing and fasting
42 (GRA vs. W_{5km}+FAS), and only fasting effect form walking (which included fasting, W_{5km} vs. FAS).
43 There were no differences between treatments on intake, passage rate of large particles and microbial
44 N flow, but the NDF digestibility was lower for the fasting effect. The cows with immediate access to
45 the pasture (GRA) group had to a greater proportion of time expended for grazing activity, and the
46 proportion of time for ruminating was higher for the only fasted cows (FAS). The cows that only fasted
47 (FAS) had average lower rumen pH and also had different dynamics of pH and VFA values in contrast
48 with other two groups. Milk yield was lower for FAS cows respect to W_{5km} cows. In conclusion, in a
49 situation where pasture availability is not limiting, seems that the possible effect of walking would be
50 more produced by fasting than by walking exercise. The short-time fasting for dairy cows changed the
51 feeding behavior that affected the ruminal parameters and the milk yield. Moreover, the walk of 5km/d
52 during mid-lactation for dairy cows in grazing system reversed the negative effect to FAS treatment.

53

54 **Keywords:** pasture dairy system, milk yield, short fasting

55

INTRODUCTION

56
57 In grazing dairy systems, the distance to the grasslands is frequently viewed as a problem because
58 the cows need walking to access the pasture every day. The walking to access the pasture in a dairy
59 system constitutes an energy-expensive process that could decrease milk yield for dairy cows. In NE_L,
60 the energy required for walking is 0.00045 Mcal of NE_L/kg of BW per horizontal kilometer (NRC,
61 2001). Thus, for example, assuming the cows walked to the pasture 4 times/d, even if the pasture plot

Anexo II

62 is 500m, cows would decrease approximately 0.5 to 0.8 kg of milk per day in a grazing system.
63 Moreover, previous studies conducted with dairy cattle showed that an extra walk between 2 to 9.6
64 km/d besides decreasing approximately between 10 to 22% the milk yield and changed milk
65 composition, could decrease DMI (Thomson and Barnes, 1993; Coulon et al., 1998; Spörndly and
66 Wredle, 2004).

67 Further the energy expenditure, the exercise in dairy cows have effects on physiology (Davidson
68 and Beede, 2003) and possibly on digestive function. Previous studies conducted with dairy cows
69 showed that the exercise increase water intake (Benedetti et al., 1990). The increased in water intake
70 has been associated with increased rumen passage of liquid, that could have a negative effect in ruminal
71 parameters (Fraley et al., 2015). Additionally, the in horses the exercise increase the intestinal transit,
72 limit enzymatic digestion and microbial fermentation that result in decrease on digestibility of the diet
73 (Van Weyenberg et al., 2006). Thus, despite there is evidence that walking could be affect the digestive
74 process in dairy cows, no studies have been found that assess the impact on ruminal fermentation and
75 digestion of dairy cows that walk to ascend the pasture.

76 Furthermore, while walking, cows are under a fasting period. It is known that a short fasting period
77 for dairy cows can affect the ingestive behavior, the feed intake (Beauchemin, 2018), the rumen
78 parameters (Rabaza et al., 2019;) and this could have consequences on digestibility (Gregorini et al.,
79 2008). This way, despite the evidences of the potential negative impact of walking on productive
80 performance of dairy cows, it is not known which is the contribution of the exercise or of the fasting
81 during the walking period. Thus, we hypothesized that the effect of walking is not only a result of
82 energy expenditure, but also due to digestive processes. Therefore, the objective of this study was to
83 investigate the digestive and productive effects of walking 5km between the milking parlor and the
84 pasture plot in a grazing system, separating the effect of walk itself from the fasting associated to walk.

85

MATERIALS AND METHODS

87 Animals, Experimental Design and Treatments

88 The experiment was conducted at the Animal Production Department of the Veterinary Faculty
89 (IPAV-Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay) in Libertad, San José, Uruguay
90 (34°40'S, 56°32'W), on spring of 2017. During the period of present experiment, on average, the
91 temperature was 17.7°C (with 24.2°C of maximum and 11.5°C of minimum) with 13 hours of natural
92 illumination (0600 to 1900 h). The experiment was conducted in accordance with regulations
93 governing the use of animals in experimentation, education, and investigation established by the
94 Committee on Animal Experimentation of the Uruguayan University (Comisión Honoraria de

Anexo II

95 Experimentación Animal, UdelaR, protocol: 606/17). Thirty crossbred Holstein × Jersey dairy cows
96 were selected from a dairy herd, blocked according to DIM (96 ± 54 d, mean \pm standard deviation),
97 milk yield (22.1 ± 4.1 kg), BW (446 ± 76.8 kg), BCS (3.0 ± 0.35 , 1 to 5-point scale; Edmonson et al.,
98 1989) and parity (2 ± 1). In each treatment 4 cows (all multiparous) had ruminal catheters (8 mm
99 diameter and 120 cm length). The cows were assigned to the following treatments between a.m.
100 milking and p.m. milking: *i*) grazing (**GRA**), the cows had access to the pasture immediately after a.m.
101 milking until p.m. milking; *ii*) walking (**W_{5km}**), the cows walked 2.5 km after a.m. milking before
102 getting access to the pasture and before p.m. milking, totalizing extra walk to access the pasture of 5
103 km/d and *iii*) fasting (**FAS**), the cows were kept in a pen without access to food or water during the
104 time the W_{5km} group walked. The pasture plot (9 ha) was located between 100 to 500 m from the
105 milking parlor. The cows on W_{5km} treatment walked in a closed circuit of 500 m (dirt floor, slope
106 approximately of 0.5%), in a paddock located close to the pasture, and the pen for FAS cows had 250
107 m². During walking, cows were accompanied by the two people remaining at least 2 m behind the last
108 cow. Cows were not allowed to eat or drink during walking. All cows were milked daily at 0500 to
109 0600 h and 1700 h. All cows drank water before milking's and before to access the pasture paddock.
110 The experiment was performed during 33 d, with 12 d of adaptation and 21 d of measurements. The
111 distance of walk of 5 km/d was defined by the average size of 250 ha of the dairy farms in grazing
112 system in Uruguay.

113

114 ***Feeding Management***

115 All the cows grazed the on the same mixed pasture composed by annual ryegrass (*Lolium*
116 *multiflorum*), white clover (*Trifolium repens*), birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and lucerne
117 (*Medicago sativa*). The cows of each treatment grazed in paddocks separated by electric fences,
118 entering in a new paddock in each grazing session. Daily the size of each paddock was adjusted to
119 provide a minimum 15 kg DM/cow (at ground level). Forage mass was estimated by cutting 3
120 samples per day (0.25 m² each) at ground level, dried in a forced-air oven at 55°C for at least 48 h
121 and weighed. On overage during the experimental period the pasture mass was 2750 ± 445 kg of
122 DM/ha. In each milking, the cows were supplemented individually with 1.8 kg of DM of soybean
123 hulls, offering 3.6 kg of DM of soybean hulls/cow per day. Additionally, only at the a.m. milking,
124 the cows were supplied with vitamin-mineral premix (150 g/cow per d, containing per kg of DM,
125 325 g NaCl, 160 g Ca, 70 g P, 10 g Mg, 200 mg Cu, 5000 mg Zn, 15 mg Se, 40 mg I, 8 mg Co,
126 80,000 IU vitamin A, 8,000 IU vitamin D₃, 80 IU vitamin E) and ethoxylated alcohols to prevent
127 the bloat (50 g/cow per d, Phibro, Animal health corporation™, New Jersey, USA). Samples of

Anexo II

128 soybean hulls and mixed pasture (cutting at a height 5 cm) were dried in a forced-air oven at 55°C
129 for at least 48 h and ground to pass through a 1 mm screen. One composite sample of mixed pasture
130 was obtained by mixing equal DM amounts from each subsample and analyzed for OM, CP, EE,
131 NDF and ADF (Table 1).

132

133 *Measurements and Sampling*

134 Intake of pasture was determined using titanium dioxide (TiO₂) as an external marker (Titgemeyer
135 et al., 2001; Glindemann et al., 2009), and indigestible neutral detergent fiber (iNDF) as an internal
136 marker (Huhtanen et al., 1994). For the determination of fecal excretion (kg of DM/cow per d) during
137 10 consecutive days, from day 1 of measurement period, each animal received daily a single oral dose
138 of 10 g of pure TiO₂, supplied in gelatin capsules (size #10, Torpac New Jersey, USA) using dosing
139 applicator (X-BG03 A, Torpac New Jersey, USA). During the last 5 days of TiO₂ dosing,
140 approximately 150 g of feces were collected twice daily after milking direct from the rectum of each
141 cow and dried in a forced-air oven at 60°C for 72 h. Samples were ground to pass through a 1 mm
142 screen and one composite sample per cow was obtained for TiO₂ analysis by mixing equal DM
143 amounts from each subsample. Individual fecal per cows were analyzed for DM, OM, PC and NDF
144 and iNDF. For iNDF fecal analysis, during 2 consecutive days, 4 spot fecal samples were collected
145 (approximately 200 g of feces/cow per collection) and processed as fecal TiO₂ samples. For iNDF
146 determination, approximately 0.5 g of feces and feed samples were weighed in duplicates in F57 bags
147 (Ankom Technology Corporation, Macedon, NY, pore size of 25 µm) as described by Bender et al.
148 (2016) with a sample size/surface area ratio of 13 mg/cm² approximately. The samples were incubated
149 for 288 consecutive hours into the rumen of 2 nonlactating Holstein cows fed a diet consisting of (DM
150 basis) alfalfa haylage (74.6%), corn grain (10.9%), soybean hulls (10.9%) and soybean meal (3.6%).
151 Following incubation, bags were rinsed with tap water for 30 min and dried in a forced-air oven at
152 60°C for 48 h and the residues were analyzed for NDF.

153 The passage rate of large particles was estimated using Cr-mordanted NDF prepared from alfalfa
154 hay according to Udén et al. (1980). After the a.m. milking of day 15 of the measurement period, a
155 single dose of 150 g of Cr-mordanted was orally administered to 8 cows per treatment. Fecal samples
156 were collected from the rectum at 0, 6, 9, 12, 24, 30, 34, 38, 42, 48, 60, 72, 96, 120, and 144 h after
157 dosing the marker. Fecal samples were dried in a forced-air oven at 60°C and ground to pass through
158 a 1 mm screen for analysis.

159 Feeding behavior was recorded for 24 h except during milking (2 h in a.m. milking and 1 h in p.m.
160 milking) during 3 days by trained observers. The individual cow's activity was recording at 10 min

Anexo II

161 intervals (Sheahan et al., 2013), which provided 126 observations/cow per day. The behaviors
162 evaluated were grazing (eating pasture), lying ruminating (chewing regurgitated boluses of feed in
163 position lying), standing ruminating (chewing regurgitated boluses of feed in position standing), lying
164 not ruminating (only lying, not grazing or ruminating), standing not ruminating (only standing, not
165 grazing or ruminating) and others (i.e. not showing any of the other activities). Total ruminating was
166 calculated as sum of lying ruminating and standing ruminating. The time that cows W_{5km} walked was
167 included in the category 'others'. The proportion of each behavioral event per hour was calculated as a
168 fraction of total observations.

169 Samples of ruminal fluid were taken hourly for 24 consecutive hours, except at hour 12 and 14 of
170 day and during milking's (2 h for a.m. milking and 1 h for p.m. milking). Ruminal fluid pH was
171 immediately measured using a digital pH meter (EW-05991-36, Cole Parmer, Vernon Hills, IL). A
172 0.5 mL sample was preserved with 0.5 mL of 0.1 M HClO₄ and stored at 20°C until analysis. For
173 calculate microbial N flow, spot urine samples were collected twice daily on days 6 and 7 from 8 cows
174 per treatment after the a.m. and p.m. milking's, and 15 mL of fresh urine was acidified with 60 mL of
175 0.072 N H₂SO₄ and stored at 20°C (Broderick et al., 2009). Urine samples were later thawed at room
176 temperature, and equal parts of each of the 4 samples were mixed to obtain a composite sample, which
177 was used for analyses.

178 Individual milk yield was recorded, and milk samples were collected at each milking during 3
179 consecutive days per week during the measurement period. Milk samples (50 mL) were collected with
180 bronopol as preservative and were stored at 4°C until analyzed. Individual milk samples were
181 analyzed for fat, protein, lactose, and urea by mid-infrared spectroscopy analysis (Bentley Model 2000,
182 Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). Analysis of SCC was realized using an automated cell counter
183 (Foss Electric A/S, Hillerod, Denmark).

184 The BCS was estimated by the same observer using 0.25-unit intervals using a scale from 1.0 to 5.0
185 (Edmonson et al., 1989) previous and at the end of the experiment, after milking and before feeding in
186 the morning. Blood samples were collected from 6 cows per treatment at h 8, 11, 14 and 19 h of day
187 12 of measurements, from the jugular vein in tubes without anticoagulant for urea analysis. The
188 samples were kept at room temperature for 1 h, placed in a refrigerator at 4°C for 2 h, and centrifuged
189 (2800 × g for 10 min at 20 °C), and then serum was stored at -20°C until analysis.

190

191 *Chemical Analysis*

192 Dry matter content was determined by drying at 105°C for at least 16 h (Method ID 934.01; AOAC,
193 1990). Ash was determined by combusting at 600°C for 3 h (Method ID 942.05; AOAC, 1990) and

Anexo II

194 OM was determined as the difference between DM and ash content. Total nitrogen was assayed with
195 the Kjeldahl method (Method ID 984.13; AOAC, 1990). Ether extract concentration was determined
196 in a reflux system (Soxtherm 2000 S 306 M, Gerhardt; Königswinter, Germany) with ethyl ether at
197 180°C for 2 h (Method ID 920.39; AOAC, 1990). The NDF was analyzed according to the procedures
198 described by Mertens (2002), using heat- stable α -amylase and sodium sulfite. The ADF concentration
199 was analyzed according to Method ID 973.18 of AOAC (AOAC, 1990). The NDF and ADF analysis
200 were performed independently and were expressed exclusive of residual ash.

201 The TiO_2 concentration in fecal samples were determined by the method of Myers et al. (2004).
202 Fecal Cr concentrations were determined using atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer 3300,
203 Perkin Elmer, Wellesley, MA) according to the method of Williams et al. (1962).

204 For VFA determination, samples taken at 2, 4, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 19 y 20 h were analyzed.
205 Samples were thawed at room temperature, centrifuged ($10,000 \times g$ for 15 min at 4°C) and analyzed
206 using HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA) as described by Adams et al. (1984), using an
207 Acclaim Rezex Organic Acid H^+ colum (8%, Phenomenex, Torrance, CA) of 7.8×300 mm, adjusted
208 at 210 nm. Concentrations of acetic, propionic, and butyric acid were reported in concentration units
209 and as molar proportions, total VFA concentration was calculated as the sum of acetic, propionic, and
210 butyric acids concentrations. Urine samples were thawed at room temperature, centrifuged ($10,000 \times$
211 g for 15 min at 4°C), pooled by animal and analyzed for purine derivatives (PD; i.e., allantoin and uric
212 acid) using HPLC (Dionex Ultimate 3000) as described by Balcells et al. (1992), using an Acclaim
213 C18 (Phenomenex) column of 205 nm, $5 \mu\text{m}$, 4.6×250 mm. For creatinine concentration in urine and
214 urea concentration in blood, a Vitalab Selectra-2 autoanalyzer (Vital Scientific, Dieren, Netherlands)
215 was used together with Standatrol and Randox Hn1530 standards. Serum concentration of urea and
216 urine creatinine concentration were analyzed with respective commercial kits; Liquid kinetic UV urea,
217 Wiener Laboratories S.A.I.C. Riobamba, Rosario, Argentina and picric acid, Wiener Laboratories
218 S.A.I.C. Riobamba, Rosario, Argentina. Intra-assay and inter-assay CV of all determinations were
219 equal or less than 10%.

220

221 *Calculations*

222 Fecal output (kg of DM/d per cow) was estimated for each animal by dividing TiO_2 daily intake
223 (mg/d) by the TiO_2 concentration in feces (mg/kg of DM). Daily intake of soybean hulls (kg of DM/d)
224 was determined individually by weighing the amount offered and refused at each milking. The iNDF
225 intake of soybean hulls (g/d) was obtained by multiplying the intake of soybean hulls (kg of DM/d)

Anexo II

226 and the iNDF concentration in soybean hulls (g/kg of DM). Intake of pasture (kg of DM/cow per d)
227 was calculated as:

228

229 Pasture intake (kg of DM/cow per d) = $\{[(\text{fecal output (kg of DM/day)} \times \text{fecal iNDF (g/kg of DM)}) -$
230 $[(\text{concentrate intake (kg of DM/day)} \times \text{concentrate iNDF (g/kg of DM)})]\} / \text{Pasture iNDF (g/kg of DM)}$.

231

232 Total DMI (kg of DM/d per cow) was calculated as the sum of pasture and soybean hulls intake.
233 Intake of DM, OM, PC and NDF were calculated by multiplying DMI and each nutrient concentration
234 for each ingredient of the diet. Apparent total-tract digestibility coefficient for DM, OM, PC and NDF
235 of diet was obtained as:

236

237 Apparent total-tract digestibility = $\{[(\text{intake (kg/d)} - \text{fecal output (kg/d)}) / \text{intake (kg/d)}] \times 100$.

238

239 Individual fecal Cr excretion curves were fitted to the multi-compartmental model proposed by
240 Dhanoa et al. (1985):

241

242 $Y = A \times (\exp(-k_1 \times (t - TT)) \times \exp(-n - 2) \exp(-k_2 - k_1) \times (t - TT))$

243

244 where Y (mg/kg of DM) is the fecal marker concentration at time t (h); t = fecal marker concentration
245 at time t, TT = transit time or time delay (h) between marker administration and its first appearance in
246 feces; k₁ (h⁻¹) is the passage rate from reticulorumen; k₂ (h⁻¹) is the passage rate from cecum-
247 proximal colon; A is a scale parameter dependent on k₁; and n is the number of compartments in the
248 model (2 in this case, the reticulorumen and the cecum-proximal colon). Mean retention times in the
249 reticulorumen (RMRT) and the cecum-proximal colon (CMRT) were calculated as 1/k₁ and 1/k₂,
250 respectively. Total mean retention time (TMRT) was calculated as TMRT = RMRT + CMRT + TT
251 (Grofum and Williams, 1973).

252 Urinary excretion of PD (mmol/d) was calculated as the ratio of the concentrations (mmol/L) of
253 PD:creatinine in the spot sample times in relation to the expected creatinine excretion (mmol/d), which
254 was estimated assuming a daily creatinine excretion rate of 29 mg/kg of BW (Valadares et al., 1999).
255 Duodenal flow of microbial N (g/d) was calculated according to Chen and Gomes (1992), except that

Anexo II

256 a 0.134 purine N/microbial N ratio was used (Valadares et al., 1999). The microbial N synthesis by
257 OM digestible was calculated as:

258

259 Microbial N synthesis by OM digestibility, g/kg = (g of microbial N synthesis / kg of OM digestible).

260

261 Solids-corrected milk yield (SCM 4%) was calculated according to Tyrrell and Reid (1965) as:

262

263 $SCM\ 4\% = [(12.24 \times \text{kg of fat per day}) + (7.10 \text{ kg of protein per day}) + (6.35 \times \text{kg of lactose per day})$
264 $- 0.0345 \times \text{kg of milk per day}]$.

265

266 The efficiency for N use was calculated as milk N (g/d) / intake N (g/d). Feed efficiency for milk
267 yield was calculated as SCM 4% (kg/d) / DMI (kg/d).

268

269 *Statistical Analysis*

270 Statistical analyses were performed using the PROC MIXED procedure of SAS (version 9.1; SAS
271 Institute Inc., Cary, NC). Values of milk composition previous the start of experiment were used as
272 covariates in their respective data analysis. Intake, passage rate, microbial N flow, body variables, milk
273 yield and composition, were analyzed as:

274

$$275 Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

276

277 where Y_{ij} is the dependent variable, T_i is the fixed effect of treatment ($i = \text{GRA, } W_{5km} \text{ and FAS}$), B_j is
278 the random effect of the block ($k = 1 \text{ to } 10$), and ε_{ij} is the residual error. The Kenward-Rogers procedure
279 was used to adjust the denominator degrees of freedom.

280

281 Traits with repeated measurements (feeding behavior, rumen fermentation and urea in serum) were
282 analyzed with the following model:

283

$$284 Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + B_k + T_i \times H_j + \varepsilon_{ijk}$$

Anexo II

285

286 where Y_{ijk} is the dependent variable, T_i is the fixed effect of treatment ($i = \text{GRA}, W_{5\text{km}}$ and FAS), H_j
287 is the fixed effect of the hour ($j = 1$ to 24), B_k is the random effect of the block ($k = 1$ to 10), $T_i \times H_j$ is
288 the fixed effect of the treatment and hour interaction, and ε_{ijk} is the residual error. The Kenward-Rogers
289 procedure was used to adjust the denominator degrees of freedom, and the covariance structure used
290 was SP(POW).

291 Residuals were tested for normal distribution using the PROC UNIVARIATE statement. Outliers
292 were eliminated and when data did not show normal distribution, the BOX-COX process was tested to
293 transform the data set. The concentration of butyric acid (mM) was inverse transformed, and SCC was
294 logarithmically transformed before statistical analyses (Phyn et al., 2014). Preplanned orthogonal
295 contrasts were used to compare the fasting effect (GRA vs. $W_{5\text{km}}+\text{FAS}$) and to separate the effect of
296 walking (which includes the concomitant fasting) from the only fasting effect ($W_{5\text{km}}$ vs. FAS).
297 Furthermore, repeated measurements were examined using the tukey s test and the dates curves were
298 presented in figures. All the results were presented as least squares mean \pm standard error of the mean
299 (SEM) and differences were declared at $P \leq 0.05$ and trends were discussed at $0.05 < P \leq 0.10$.

300

301

RESULTS

302 Total DMI, nutrient intake and passage rate of large particles was not affected by the $W_{5\text{km}}$ or FAS
303 (Table 2). The NDF digestibility was lower for the fasting effect ($P < 0.05$, Table 2). On average, GRA
304 cows expended a greater proportion of time grazing (GRA vs. $W_{5\text{km}}+\text{FAS}$, $P < 0.05$, Table 3) and FAS
305 cows ruminating ($P < 0.001$, Table 3, Figure 1B) than $W_{5\text{km}}$ cows ($P < 0.001$, Table 3). Interaction
306 between treatment and time was found ($P < 0.001$) for behavior (Figure 1). While the greater grazing
307 activity was observed during the first hours after the morning and afternoon milking for GRA and
308 $W_{5\text{km}}$, the FAS cows grazed more just before the morning milking and two hours after the morning
309 fasting period (Figure 1A). In the afternoon, the fasting period was just before milking, and all cows
310 had a second grazing peak immediately after being milked (Figure 1A). In the morning, after fasting
311 period FAS cows continued ruminating, despite of having access to the pasture (Figure 1B). The cows
312 of treatment $W_{5\text{km}}$ remained lower time standing than FAS cows ($P < 0.001$; Table 3, Figure 1C) and
313 the cows of treatment FAS remained more time ruminating standing ($P < 0.001$; Table 3, Figure 2A).

314 Cows that fasted showed, on average, greater VFA concentration and lower pH (Table 4, Figure 3),
315 and interaction between treatment and time was found ($P \leq 0.023$) for VFA (Figure 3) at the times
316 before the morning milking. In general, the concentration of acetic, propionic and butyric acids was
317 greater for the cows that fasted ($P < 0.001$; Table 4) and interaction between treatment and time was

Anexo II

318 found in same hours that total VFA, except to propionic acid that presented also interaction between
319 treatment and time in hour 6 and 8 of day (dates no showed in figure).

320 Urinary excretion of creatinine was on overage 111.4 ± 2.47 mmol/d for the all treatments. Urinary
321 excretion of PD, rumen microbial protein supply and efficiency of rumen microbial protein synthesis
322 were similar for all treatments ($P > 0.05$, Table 5). Serum urea N concentration was greater for W_{5km}
323 cows compared with FAS dairy cows ($P = 0.009$, 12.5 vs. 11.4 mM, SEM = 0.42 mM) data not shown
324 in tables or figures. No interaction between treatments by time was found for serum urea N
325 concentration ($T \times H$, $P > 0.05$, dates no showed in figures). Milk urea N was greater for W_{5km} group
326 (W_{5km} vs. FAS, $P = 0.045$, Table 6) and was lower to GRA group (GRA vs. $W_{5km}+FAS$, $P < 0.001$,
327 Table 6).

328 Milk yield was not affected by fasting (GRA vs. $W_{5km}+FAS$, $P > 0.05$, Table 6), but milk yield was
329 lower for FAS cows in contrast with W_{5km} cows (17.8 vs. 19.5 kg/d, SEM = 1.163 kg, $P = 0.014$). A
330 tendency ($P = 0.093$) and tendency of lower SCM 4% was found for FAS in contrast to W_{5km} (W_{5km}
331 vs. FAS, $P = 0.092$, Table 6). Milk concentration of fat and lactose were similar for all treatments
332 whereas protein concentration was greater in FAS than in W_{5km} (3.44 vs. 3.32%, SEM = 0.064%, $P =$
333 0.014). Production of milk fat and protein were not affected by treatments whereas GRA cows
334 produced more milk lactose than fasting cows (GRA vs. $W_{5km}+FAS$, $P < 0.05$, Table 6). The SCC in
335 milk was lower for GRA than for fasting cows (GRA vs. $W_{5km}+FAS$). Feed efficiency was not affected
336 by treatments ($P > 0.05$, Table 6).

337 Mean BCS was not affected by treatments (3.1, SEM = 0.13, P -value for GRA vs. $W_{5km}+FAS =$
338 0.113 and W_{5km} vs. FAS = 0.719).

339

340

DISCUSSION

341 This study was conducted mainly to evaluate how much either the walking activity or fasting during
342 the walking period between the milking parlor and the pasture plot would affect the behavior and,
343 consequently the nutrition and productive performance of dairy cows in a grazing system. On average
344 during of walk periods the cows walked 0.9 m/s, similar to described by Phillips and Morris (2001).
345 Additionally, despite the induced fasting period was relatively short with approximately 100 min/d,
346 behavior, digestive and productive changes were observed.

347 After entering the paddock, there was like a lag time for FAS to reach the similar grazing activity
348 of the GRA cows. The fact that FAS cows increased the grazing activity just before the morning
349 milking possibly result in an increased ruminating activity after fasting period in the morning. Different
350 from FAS, the fasting period associated with walk activity during the morning, induced W_{5km} cows to

Anexo II

351 graze immediately when entered the pasture plot. As the W_{5km} cows increased the ruminating activity
352 just before the morning milking, the change behavior possibly resulted in an increased grazing activity
353 after a.m. walk period. Additionally, the FAS cows showed greater ruminating activity before the
354 afternoon milking than cows of other treatments. The greater time spend for ruminating between a.m.
355 and p.m. milking's are according to Stone et al. (2017). For the authors, when rumination time
356 increases, proportionally less rumination occurs at night or when cows are lying. There is not a clear
357 explanation for difference in ruminating activity immediately after the morning and before afternoon
358 milking for FAS group, but could be related with intake rate. As described by Beauchemin (2018) and
359 Chilibroste et al. (2007), at increased bite rate grazing cows reduce grazing selectivity and increase the
360 ingestion of long herbage particles. Thus, as ruminating activity is stimulated by the ingestion of long
361 fiber particles (Beauchemin, 2018), we hypothesized that lower time spend grazing between a.m. and
362 p.m. milking resulted in a lower selectivity and greater ingestion of large particles of pasture for FAS
363 cows.

364 Furthermore, although the increase of time spends for rumination decreased the particle size, the
365 lower selection of pasture possibly caused the lower NDF digestibility for FAS cows. Additional to
366 selection of pasture, others factors could decrease the digestibility of diet: (1) the greater passage rate
367 of particles of diet (Bach et al., 1985) and (2) imbalance in the rumen environment (Rabaza et al., 2019;
368 Gregorini et al., 2008). As in ours study the passage rate of particles of diet was not affected by fasting,
369 possibly the FAS affected negatively the ruminal parameters. Is described that the rumen buffering
370 increased during the ruminating activity (Beauchemin 2018) and although the FAS cows increased the
371 ruminating activity in ours study, the ruminal pH decreased. Previous authors reported that rumen pH
372 at values below 6 usually inhibits growth and activity of cellulolytic bacteria (Russell and
373 Dombrowski, 1980). Thus, possibly the lower values of pH for FAS treatment decreased the NDF
374 digestibility. In addition, although the ruminal fermentation was affected by fasting the rumen
375 microbial protein synthesis was not affected. Additionally, in a grazing system are observed that pH
376 of rumen fluid decrease and the VFAs increase after 3 to 4 hours of a start eating, but in the present
377 study the fasting affected the rumen fermentation between p.m. and a.m. milking. Furthermore, despite
378 the FAS cows spend more ruminating time on the day shift, only at night the cows showed greater
379 VFA concentration and lower pH values of rumen fluid. The explanation for the effect of FAS
380 treatment in rumen fermentation during at night is not totally clear, but we theorize that the intake of
381 large particles could be responsible. According Storm and Kristensen (2010), the presence of large
382 particle in rumen decrease the turnover of the particle of medial to ventral poll of rumen resulting in
383 delaying the absorption of VFA. Furthermore, the ruminating increases the saliva secretion resulting
384 in greater buffer capacity in the rumen (Bailey and Balch, 1961). Moreover, for FAS cows, the

Anexo II

385 ruminating activity was between a.m. and p.m. milking, and the rumen buffer capacity at night
386 possibility was lower. Thus, the lower pH and greater values for VFA in rumen during at night no
387 necessary represent to improvement in fermentation in this moment. Furthermore, we expected that
388 the exercise could be increase the passage rate of diet (Van Weyenberg et al., 2006). Is described that
389 walk increase he water intake for dairy cows (Benedetti et al., 1990) and the greater intake of water
390 could be increasing the liquid and solid passage from the rumen (Fraley et al., 2015). The increase of
391 diet passage effect negatively the ruminal fermentation, with lower VFA concentration and greater
392 ruminal pH (Fraley et al., 2015). However, different of expected, the walk associated with fasting
393 period reversed the negative effects on ruminal fermentation digestion in contrast with FAS cows and
394 explanation for this is not clear.

395 Is described that rumination time is more frequent during periods of lying (Schirmann et al., 2012),
396 moreover different the ruminating increase in standing position in ours study, and the explain for this
397 is not clear. Cows that ruminate more spent less time eating (Schirmann et al., 2012) that could
398 decrease DMI. Moreover, in the present study, although the FAS cows increased of time spend for
399 rumination and decreased the time for feeding, the DMI was not lower. However, in condictiones as
400 greater time of fasting, greater milk yield and lower pasture allowance, effects different in DMI could
401 be found (Chilibroste et al., 2007, Gregorini et al., 2008). Furthermore, for dairy cows in mid-lactation
402 each km of walk decrease on average 0.18 kg of DMI of the diet (Coulon et al., 1998) but differently,
403 in the present study the walk of 5 km/d no affected the intake. Thus, although in the present study no
404 difference was found for DMI for cows that walked 5 km/d or fasted 100 min/d, in extreme walks or
405 lower pasture allowance different answers can be found (Schirmann et al., 2012; Motupalli et al.,
406 2014).

407 The group FAS decrease approximated 9% milk yield and tended to lower SCM in contrast to W_{5km}
408 cows. Although we don't know the exact cause to lower production, we theorize that for FAS cows,
409 the changes in intake feeding behavior affected negatively the ruminal parameters that caused decrease
410 the milk yield. Additionally, different of expected the walk of 5 km/d no affected the milk yield. In
411 previous works with dairy cows, is described decrease in 0.2 to 1.4 L of milk per km walked (Thomson
412 and Barnes, 1993; Coulon et al., 1998; Spörndly and Wredle, 2004). As described for the authors, a
413 longer distance does not always have a greater decrease in milk yield, and factor as elevation of
414 walking, pasture allowance and previous milk yield may account for the different responses. According
415 to the NRC (2001), the increase in energy requirement for walking 5 km/d in flat terrain corresponding
416 approximately 0.91 Mcal of NE_L/d that could result in decrease approximate of 1.3 kg of milk per day.
417 Thus, as intake was not affected in ours study and milk yield not decreased, we theorize that W_{5km}
418 cows mobilized reserves to maintain the milk yield. In the present study, the energy expended for

Anexo II

419 walking during the experimental period was equivalent to 4 kg of body reserves (NRC, 2001).
420 Although not differences were found in BCS between treatments, the effect of long-term walks in the
421 mobilization of body reserves may be different from that found in this work. Similar results were
422 described to Anderson et al. (1979). The authors found lower BW in cows that walked in contrast with
423 cows that no walked, suggesting that body reserves were used for exercise. Thus, although in the
424 present study no difference was found for milk yield for cows walked 5 km/d, we hypostatize that the
425 milk yield could be lower when animals with greater production or lower body reserves is used.

426 Furthermore, contrary to described in previous studies, in the present study the walk no affected the
427 milk composition, except for increasing the milk urea N. According Coulon et al. (1998) the walking
428 in dairy cows result in increase of protein concentration without increase casein content. In present
429 study, just cows that exclusively fasted had greater milk protein content in milk in contrast with cows
430 also walked. As the protein yield was not affected in ours study, the increase in milk protein
431 concentration may be partially explained by a lower milk yield effect. Farther, cows that walked
432 present increase in SCC concentration (Thomson and Barnes, 1993; Coulon et al., 1998). The increase
433 of SCC in milk described by the authors, could be partially explicated by concentration effect and
434 principally by traumatic, noninfectious inflammation induced by walking. However, different as
435 expected in this study just the fasting increased the SCC in milk. In present study neither the lower
436 milk yield or the walking effect can explain the greater SCC in milk, thus other factors no studies could
437 be responsible to greater SCC in cows that fasted.

438 The cows that walked had greater milk urea N and serum urea concentration. The greater values
439 could indicate that cows of this treatment either ingested higher levels of rumen degradable protein or
440 mobilized higher amounts of amino acids from tissues than cows of other treatments. The second
441 hypothesis is less probably once the DIM was on average three month, a period where lactating cows
442 store instead mobilize tissues. In fact, despite of not reaching statistical significance, W_{5km} cows
443 ingested 0.2 to 0.3 kg of CP more than cows of FAS and GRA treatments, respectively, most of them
444 from herbage which usually shows high rumen degradability (i.e. above 70%). Furthermore, the 5 km
445 walk or 100 min fasting for dairy cows not affected the feeding efficiency. The similar feeding
446 efficiency was due that DMI and SCM was not differ between treatments, moreover, studies with
447 different condition this work, lower short-time feeding efficiency could be found. Although the
448 treatments not affected the N efficiency, in our study the cows secreted on average just 20% of total N
449 intake as protein in milk. This date is lower that 25 to 35% described for NRC (2001). As described
450 by Cabrita et al. (2014), the lower relation N intake and milk N possibility was the cause greater
451 degradable N in the mixed pasture and the lower energy fermentable in the diet.

452

453

CONCLUSIONS

454 The short-time fasting for dairy cows changed the feeding behavior that affected the ruminal
455 parameters and the milk yield. Moreover, the walk of 5km/d during mid-lactation for dairy cows in
456 grazing system reversed the negative effect to FAS treatment and explanation for this is not clear.

457

458

ACKNOWLEDGMENTS

459 The authors thank G. Alonso, G. Alonso, J. Arambillete, D. La Llana and J. Barreto (UTU Escuela
460 Agraria Sarandí Grande, Universidad del Trabajo del Uruguay, Uruguay); D. Viera, M. Araras, S.
461 Ferreira, C. Cabrera (Veterinary Faculty, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay); the
462 staff from Instituto de Producción Animal Veterinario (Veterinary Faculty, Universidad de la
463 República, Uruguay) and the CAP-UdelaR (Comisión Académica de Posgrado from the Universidad
464 de la Republica) grant program.

465

466

REFERENCES

- 467 Adams, R. F., R. L. Jones, and P. L. Conway. 1984. High-performance liquid chromatography of
468 microbial acid metabolites. *J. Chromatogr.* 336:125-137.
- 469 Anderson, M.J., R. C: Lamb, and J. L. Walters. 1979. Effect of Prepartum Exercise on Feed Intake and
470 Milk Production of Multiparous Cows. *J. Dairy Sci.* 62:1420-1423.
- 471 AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists,
472 Arlington, VA.
- 473 Bach, C.C. Factors Affecting the Utilization of Food by Dairy Cows. 1. The Rate of Passage of Food
474 through the Digestive Tract. *British Journal of Nutrition.* 4:361-388.
- 475 Bailey, C. B., and C. C. Balch. 1961. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. *Br. J. Nutr.*
476 15:383-402.
- 477 Balcells, J., J. A. Guada, and J. M. Peiro. 1992. Short communication: Simultaneous determination of
478 allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J.*
479 *Chromatogr. A* 515:153-157.
- 480 Beauchemin K. A. 2018. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in
481 dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:4762-4784.

Anexo II

- 482 Bender, R. W., D. E. Cook, and D. K. Combs. 2016. Comparison of in situ versus in vitro methods of
483 fiber digestion at 120 and 288 hours to quantify the indigestible neutral detergent fiber fraction of
484 corn silage simples. *J. Dairy Sci.* 99:5394-5400.
- 485 Benedetti, E., H. M. Silva, and R. P. Rocha. 1990. Walking trials with dairy cows: Effect on voluntary
486 water intake. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 42:39-48.
- 487 Broderick, G. A., M. J. Stevenson, and R. A. Patton. 2009. Effect of dietary protein concentration and
488 degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*
489 92:2719-2728.
- 490 Cabrita, A. R. J., A. J. M. Fonseca, and J. Dewhurst. 2014. Short communication: Relationship between
491 the efficiency of utilization of feed nitrogen and 15N enrichment in casein from lactating dairy
492 cows. *J. Dairy Sci.* 97:7225-7229.
- 493 Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based
494 on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit,*
495 *Occasional Publ. Rowett Research Institute, Aberdeen, UK.*
- 496 Chilibroste, P., P. Soca, D. A. Mattiauda, O. Bentancur, and P. H. Robinson. 2007. Short term fasting
497 as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review. *Australian Journal*
498 *of Experimental Agriculture* 47:1075-1084.
- 499 Coulon, J. B., P. Pradel, T. Cochard, and B. Poutrel. 1998. Effect of extreme walking conditions for
500 dairy cows on milk yield, chemical composition, and somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 81:994-1003.
- 501 Davidson, J. A., and D. K. Beede. 2003. A system to assess fitness of dairy cows responding to exercise
502 training. *J. Dairy Sci.* 86:2839-2851.
- 503 Dhanoa, M. S., R. C. Siddons, J. France, and D. L. Gale. 1985. A multicompartamental model to
504 describe marker excretion patterns in ruminant faeces. *Br. J. Nutr.* 53:663-671.
- 505 Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition scoring
506 chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.
- 507 Freley, S. E., M. B. Hall, and T.D.Nennich. 2015. Effect of variable water intake as mediated by dietary
508 potassium carbonate supplementation on rumen dynamics in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*
509 98:3247-3256.
- 510 Glindemann, T., B. M. Tas, C. Wang, S. Alvers, and A. Susenbeth. 2009. Evaluation of titanium
511 dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. *Anim. Feed Sci.*
512 *Technol.* 152:186-197.

Anexo II

- 513 Gregorini, P., S.A. Gunter, and P. A. Beck. 2008. Matching plant and animal processes to alter nutrient
514 supply in strip grazed cattle: timing of herbage and fasting allocation. *J. Anim. Sci.* 86:1006-1020.
- 515 Grovum, W. L., & Williams, V. J. (1973). Rate of passage of digesta in sheep. *British Journal of*
516 *Nutrition*, 30(02), 313. doi:10.1079/bjn19730036.
- 517 Huhtanen, P., Kaustell, and K., S. Jaakkola, 1994. The use of internal markers to predict total
518 digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. *Anim. Feed Sci.*
519 *Technol.* 48:211-227.
- 520 Mertens, D.R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with
521 refluxing beakers or crucibles: A collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217-1240.
- 522 Motupalli, P. R., L. A. Sinclair, G. L. Charlton, E. C. Bleach, and S. M. Rutter. 2014. Preference and
523 behavior of lactating dairy cows given free access to pasture at two herbage masses and two
524 distances. *J. Anim. Sci.* 92:5175-5184.
- 525 Myers, W. D., P. A. Ludden, V. Nayigihugu, and B. W. Hess. 2004. Technical Note: A procedure for
526 the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Dairy Sci.* 82:179-183.
- 527 National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press,
528 Washington DC.
- 529 Phillips, C. J. C., and I. D. Morris. 2001. The locomotion of dairy cows on floor surfaces with different
530 frictional properties. *J. Dairy Sci.* 84:623-628.
- 531 Phyn, C. V. C., J. K. Kay, A. G. Rius, S. R. Morgan, C. J. Roach, T. M. Grala, and J. R. Roche. 2014.
532 Temporary alterations to postpartum milking frequency affect whole-lactation milk production and
533 the energy status of pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67:6850-6868.
- 534 Rabaza, A., G. Banchemo, C. Cajarville, P. Zunino, A. Britos, J. L. Repetto, and M. Fraga. 2019. Effects
535 of feed withdrawal duration on animal behaviour, rumen microbiota and blood chemistry in feedlot
536 cattle: implications for rumen acidosis. *Anim.* 14:66-77.
- 537 Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose
538 at low pH? *J. Dairy Sci.* 79:1503–1509.
- 539 Schirmann, K., N. Chapinal, D. M. Weary, W. Heuwieser, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2012.
540 Rumination and its relationship to feeding and lying behavior in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*
541 95:3212–3217.
- 542 Sheahan, A. J., S. J. Gibbs, And J. R. Roche. 2013. Timing of supplementation alters grazing behaviour
543 and milk production response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:477-483.

Anexo II

- 544 Spörndly, E., and E. Wredle. 2004. Automatic Milking and Grazing—Effects of Distance to Pasture
545 and Level of Supplements on Milk Yield and Cow Behavior. *J. Dairy Sci.* 87:1702–15712.
- 546 Stone, E. A., B. W. Jones, C. A. Becker, and J. M. Bewley. 2017. Influence of breed, milk yield, and
547 temperature-humidity index on dairy cow lying time, neck activity, reticulorumen temperature, and
548 rumination behavior. *J. Dairy Sci.* 100:2395-2403.
- 549 Storm, A. C., and B. Kristensen. 2010. Effects of particle size and dry matter content of a total mixed
550 ration on intraruminal equilibration and net portal flux of volatile fatty acids in lactating dairy cows.
551 *J. Dairy Sci.* 93:4223–4238.
- 552 Thomson, N. A., and M. L. Barnes. 1993. Extra walking: effect on dairy production. *The Proceedings*
553 *of the New Zealand Society of Animal Production.* 53:69-72.
- 554 Titgemeyer, E. C., C. K. Armendariz, D. J. Bindel, R. H. Greenwood, and C. A. Loest. 2001. Evaluation
555 of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *J. Anim. Sci.* 79:1059-1063.
- 556 Udén, P., Colucci, P. E., and Van Soest, P. J. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as
557 markers in digest. Rate of passage studies. *Journal Society Food Agricola.* 31:625-632.
- 558 Valadares, R. F. D., G. A. Broderick, S. C. Valadares Filho, and M. K. Clayton. 1999. Effect of
559 replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from
560 excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 82:2686-2696.
- 561 Van Weyenberg, S., J. Sales, and G. P. P Janssens. 2006. Passage rate of digesta through the equine
562 gastrointestinal tract: A review. *Livest. Sci.* 99:3-12.
- 563 Williams, C. H., David, D. J., Iismaa, O. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples
564 by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci. (Camb).* 59:381-385.
- 565

Anexo II

566 **Table 1.** Nutrient composition (standard deviation in parentheses) of
567 diet (% DM, unless otherwise indicated) during the measurements
568 experimental period

<i>Nutrient composition, % of DM</i>	Mixed Pasture ¹	Soybean hulls
DM, % as fed	24.5 (0.82)	92.0 (0.15)
OM	90.3 (0.57)	95.3 (0.08)
NDF	36.4 (0.79)	61.3 (0.20)
ADF	23.7 (1.02)	45.0 (0.50)
EE	1.9 (0.21)	2.0 (0.23)
CP	20.9 (1.01)	14.4 (0.20)

569 ¹Mixed pasture composed by annual ryegrass (*Lolium*
570 *multiflorum*), white clover (*Trifolium repens*), birdsfoot trefoil
571 (*Lotus corniculatus*) and lucerne (*Medicago sativa*).
572

Anexo II

573 **Table 2.** Intake and nutrient intake, digestibility and passage rate of dairy cows in a grazing system
 574 that grazed, walked or fasted

Item	Treatments ¹			SEM ²	Orthogonal contrasts ³	
	GRA	W _{5km}	FAS		GRA vs. W _{5km} +FAS	W _{5km} vs. FAS
<i>DMI, kg/d</i>						
Mixed Pasture	14.6	15.7	15.0	0.740	0.823	0.270
Soybean hulls	3.0	3.2	2.9	0.254	0.502	0.508
Total	17.6	18.9	17.9	0.846	0.665	0.227
<i>Nutrient intake, kg/d</i>						
OM	16.1	17.3	16.3	0.805	0.608	0.252
CP	3.2	3.5	3.3	0.163	0.619	0.266
NDF	7.2	7.7	7.2	0.358	0.593	0.239
<i>Digestibility, %</i>						
DM	64.8	65.6	65.6	0.734	0.118	0.253
OM	67.3	70.4	66.5	2.099	0.324	0.246
CP	66.1	69.6	65.9	2.376	0.505	0.311
NDF	51.5	58.8	44.6	2.084	<0.001	0.015
<i>Passage Rate⁴</i>						
K1, h ⁻¹	0.04	0.04	0.04	0.003	0.522	0.694
K2, h ⁻¹	0.40	0.23	0.31	0.094	0.941	0.227
RMRT, h	22.1	24.7	23.2	1.824	0.913	0.259
CMRT, h	3.4	4.5	4.8	0.557	0.155	0.134
TT, h	8.0	7.5	8.5	0.513	0.159	0.488
TMRT, h	37.1	41.1	40.3	1.764	0.593	0.100

575 ¹Grazing (GRA), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking until previous p.m.
 576 milking; Walking (W_{5km}), the cows walked 2.5 km after a.m. milking before getting access to the
 577 pasture and before p.m. milking, in a closed circuit of 500 m, located close to the pasture, totalizing a
 578 walk of 5 km/d and Fasting (FAS), the cows were kept in a paddock without access to food or water
 579 during the time the W_{5km} group walked.

580 ²Standard error of the mean.

581 ³Orthogonal contrasts were used to compare the fasting effect (GRA vs. W_{5km}+FAS) and to separate
 582 the effect of walking (which includes the concomitant fasting) from the only fasting effect (W_{5km} vs.
 583 FAS).

584 ⁴k1 is the passage rate from the reticulorumen; k2 is the passage rate from cecum-proximal colon;
 585 RMRT = mean retention time in the reticulorumen; CMRT = mean retention time in the cecum-
 586 proximal colon; TT = transit time; TMRT = total mean retention time.

Anexo II

587 **Table 3.** Feeding behavior of dairy cows in a grazing system that grazed, walked or fasted

Item	Treatments ¹			SEM ²	P-Value ³			Orthogonal contrasts ⁴	
	GRA	W _{5km}	FAS		T	H	T × H	GRA vs. W _{5km} +FAS	W _{5km} vs. FAS
<i>Proportion of total observation</i>									
Grazing	0.41	0.40	0.36	0.016	0.018	<0.001	<0.001	0.005	0.671
Ruminating	0.28	0.26	0.31	0.122	0.003	<0.001	<0.001	0.720	<0.001
Standing	0.12	0.08	0.15	0.013	<0.001	<0.001	<0.001	0.903	<0.001
Lying	0.15	0.13	0.14	0.015	0.373	<0.001	<0.001	0.542	0.207
Other ⁵	0.04	0.13	0.03	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Ruminating position⁶</i>									
Standing ruminating	0.07	0.06	0.11	0.009	<0.001	<0.001	<0.001	0.039	<0.001
Lying ruminating	0.22	0.20	0.21	0.014	0.509	<0.001	<0.001	0.991	0.246

588 ¹Grazing (GRA), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking until previous p.m. milking; Walking (W_{5km}), the cows walked 2.5
589 km after a.m. milking before getting access to the pasture and before p.m. milking, in a closed circuit of 500 m, located close to the pasture, totalizing a
590 walk of 5 km/d and Fasting (FAS), the cows were kept in a paddock without access to food or water during the time the W_{5km} group walked.

591 ²Standard error of the mean.

592 ³T = treatment (GRA, W_{5km} or FAS); H = hour of day; T × H = Treatment-by-hour interaction.

593 ⁴Orthogonal contrasts were used to compare the fasting effect (GRA vs. W_{5km}+FAS) and to separate the effect of walking (which includes the concomitant
594 fasting) from the only fasting effect (W_{5km} vs. FAS).

595 ⁵Not showing any of the other activities. For W_{5km} group the time spend for walk was added as other, represented 0.095 of total observation of other.

596 ⁶Fraction of total ruminating.

597

Anexo II

598 **Table 4.** Total volatile fatty acids (VFA) concentrations and ruminal pH and of dairy cows in a grazing
599 system that grazed, walked or fasted

Item	Treatments ¹			SEM ²	P-Value ³			Orthogonal contrasts ⁴	
	GRA	W _{5km}	FAS		T	H	T × H	GRA vs. W _{5km} +FAS	W _{5km} vs. FAS
<i>VFA, mM</i>									
Acetic acid	70.6	74.6	83.4	2.35	0.001	0.001	0.017	<0.001	0.231
Propionic acid	21.5	23.4	26.7	0.88	<0.001	<0.001	0.004	0.002	0.131
Butyric acid	10.6	12.1	14.3	0.54	<0.001	<0.001	0.023	<0.001	0.004
Total	102.8	110.1	124.5	3.67	<0.001	0.001	0.015	0.002	0.163
<i>VFA, mol/100 mol</i>									
Acetic acid	68.9	68.0	66.8	0.30	<0.001	0.013	0.002	<0.001	0.033
Propionic acid	20.7	21.0	21.7	0.19	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.338
Butyric acid	10.4	11.0	11.5	0.19	<0.001	<0.001	0.366	0.001	0.074
Ruminal pH	6.4	6.4	6.1	0.04	<0.001	0.369	0.254	<0.001	<0.001

600 ¹Grazing (GRA), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking until previous p.m.
601 milking; Walking (W_{5km}), the cows walked 2.5 km after a.m. milking before getting access to the
602 pasture and before p.m. milking, in a closed circuit of 500 m, located close to the pasture, totalizing a
603 walk of 5 km/d and Fasting (FAS), the cows were kept in a paddock without access to food or water
604 during the time the W_{5km} group walked.

605 ²Standard error of the mean.

606 ³T = treatment (GRA, W_{5km} or FAS); H = hour of day; T × H = Treatment-by-hour interaction.

607 ⁴Orthogonal contrasts were used to compare the fasting effect (GRA vs. W_{5km}+FAS) and to separate
608 the effect of walking (which includes the concomitant fasting) from the only fasting effect (W_{5km} vs.
609 FAS).

Anexo II

610 **Table 5.** Microbial N flow in dairy in a grazing system that grazed, walked or fasted

Item	Treatments ¹			SEM ²	Orthogonal contrasts ³	
	GRA	W _{5km}	FAS		GRA vs. W _{5km} +FAS	W _{5km} vs. FAS
<i>Urinary PD⁴, mmol/d</i>						
Total PD, mmol/d	362.8	320.3	272.8	36.35	0.125	0.330
Allantoin, mmol/d	202.0	160.4	139.7	20.70	0.106	0.106
Uric Acid, mmol/d	160.8	159.9	133.1	24.47	0.372	0.974
Microbial N flow, g/d	240.5	210.1	174.9	25.74	0.114	0.325
N microbial / OM digestible ⁵ , g/kg	21.5	16.9	21.3	4.01	0.661	0.387

611 ¹Grazing (GRA), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking until previous p.m.
 612 milking; Walking (W_{5km}), the cows walked 2.5 km after a.m. milking before getting access to the
 613 pasture and before p.m. milking, in a closed circuit of 500 m, located close to the pasture, totalizing a
 614 walk of 5 km/d and Fasting (FAS), the cows were kept in a paddock without access to food or water
 615 during the time the W_{5km} group walked.

616 ²Standard error of the mean.

617 ³Orthogonal contrasts were used to compare the fasting effect (GRA vs. W_{5km}+FAS) and to separate
 618 the effect of walking (which includes the concomitant fasting) from the only fasting effect (W_{5km} vs.
 619 FAS).

620 ⁴Purine derivatives.

621 ⁵Calculated as, g of microbial N synthesis / kg of OM digestible.

Anexo II

622 **Table 6.** Milk yield and composition in dairy cows in a grazing system that grazed, walked or fasted

Item	Treatments ¹			SEM ²	Orthogonal contrasts ³	
	GRA	W _{5km}	FAS		GRA vs. W _{5km} +FAS	W _{5km} vs. FAS
<i>Milk yield</i>						
Milk yield, kg/d	19.3	19.5	17.8	1.163	0.259	0.014
SCM ⁵ , 4%	20.3	20.6	19.2	0.748	0.562	0.093
Fat, %	4.09	4.32	3.98	0.247	0.779	0.138
Protein, %	3.37	3.32	3.44	0.064	0.786	0.014
Lactose, %	4.98	4.98	4.97	0.033	0.946	0.627
Fat, kg/d	0.83	0.81	0.74	0.041	0.235	0.108
Protein, kg/d	0.70	0.68	0.65	0.023	0.102	0.153
Lactose, kg/d	1.05	0.97	0.96	0.039	0.021	0.781
Milk urea N, mg/dL	15.1	17.5	16.3	0.745	<0.001	0.045
SCC Log ₁₀ , 1000 cel/mL	2.07	2.14	2.16	0.048	0.040	0.707
<i>Feed efficiency</i>						
Milk N / Intake N (g/d)	0.21	0.19	0.19	0.007	0.325	0.156
SCM ⁴ , 4% / DMI (kg/d)	1.16	1.10	1.07	0.054	0.366	0.455

623 ¹Grazing (GRA), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking until previous p.m.
 624 milking; Walking (W_{5km}), the cows walked 2.5 km after a.m. milking before getting access to the
 625 pasture and before p.m. milking, in a closed circuit of 500 m, located close to the pasture, totalizing a
 626 walk of 5 km/d and Fasting (FAS), the cows were kept in a paddock without access to food or water
 627 during the time the W_{5km} group walked.

628 ²Standard error of the mean.

629 ³Orthogonal contrasts were used to compare the fasting effect (GRA vs. W_{5km}+FAS) and to separate
 630 the effect of walking (which includes the concomitant fasting) from the only fasting effect (W_{5km} vs.
 631 FAS).

632 ⁴Solids-corrected milk yield calculated as SCM 4% = [(12.24 × kg of fat per day) + (7.10 kg of protein
 633 per day) + (6.35 × kg of lactose per day) – 0.0345 × kg of milk per day] (Tyrrell and Reid, 1965).

Anexo II

634 **Figure 1.** Feeding behavior (calculated as a fraction of total observations) of dairy cows, in a grazing
635 system that: grazed (GRA), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking until
636 p.m. milking, remaining in the paddock pasture until W_{5km} cows ended the walk; walked (W_{5km}), the
637 cows walk 2.5 km after a.m. milking before getting access to the pasture and before p.m. milking, in a
638 closed circuit of 500 m, located close to the pasture, totalizing a walk of 5 km/d and; fasted (FAS), the
639 cows were kept in a paddock without access to food or water during the time the W5km group walked.
640 The milking's periods of day are represented as gray area, and the treatments moment are represented
641 as dotted area. (A) Grazing, proportion of total observation; (B) Ruminating, proportion of total
642 observation and (C) Standing, proportion of total observation. Asterisks (*) indicate at least one
643 significant difference ($P \leq 0.05$) among the treatments at each time-point, when T and $T \times H \leq 0.05$.

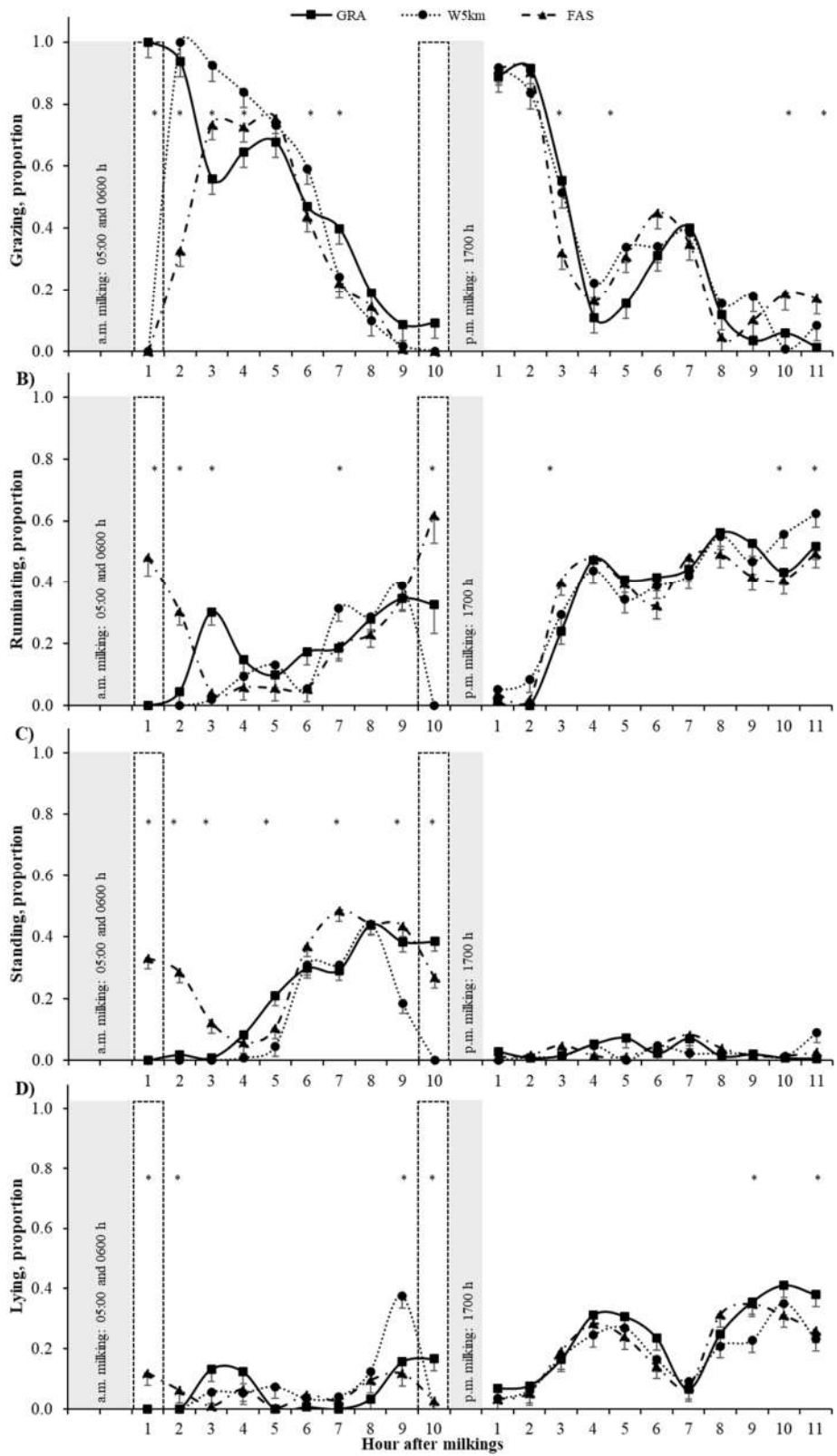
644

645 **Figure 2.** Position of ruminating (calculated as a fraction of total ruminating) of dairy cows, in a
646 grazing system that: grazed (GRA), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking
647 until p.m. milking, remaining in the paddock pasture until W_{5km} cows ended the walk; walked (W_{5km}),
648 the cows walk 2.5 km after a.m. milking before getting access to the pasture and before p.m. milking,
649 in a closed circuit of 500 m, located close to the pasture, totalizing a walk of 5 km/d and; fasted (FAS),
650 the cows were kept in a paddock without access to food or water during the time the W5km group
651 walked. The milking's periods of day are represented as gray area, and the treatments moment are
652 represented as dotted area. (A) Standing ruminating, fraction of total ruminating; (B) Lying ruminating,
653 fraction of total ruminating. Asterisks (*) indicate at least one significant difference ($P \leq 0.05$) among
654 the treatments at each time-point, when T and $T \times H \leq 0.05$.

655

656 **Figure 3.** Total volatile fatty acids (VFAs) concentrations and ruminal pH of dairy cows in a grazing
657 system that: grazed (GRA), the cows had access to the pasture immediately after a.m. milking until
658 p.m. milking, remaining in the paddock pasture until W_{5km} cows ended the walk; walked (W_{5km}), the
659 cows walk 2.5 km after a.m. milking before getting access to the pasture and before p.m. milking, in a
660 closed circuit of 500 m, located close to the pasture, totalizing a walk of 5 km/d and; fasted (FAS), the
661 cows were kept in a paddock without access to food or water during the time the W5km group walked.
662 The milking's periods of day are represented as gray area, and the treatments moment are represented
663 as dotted area. (A) Total VFA, mM; (B) Ruminal pH. Asterisks (*) indicate at least one significant
664 difference ($P \leq 0.05$) among the treatments at each time-point, when T and $T \times H \leq 0.05$. Crosses (†)
665 indicate at least one significant difference ($P \leq 0.05$) between treatments at each time-point, when $T \times$
666 $H > 0.05$.

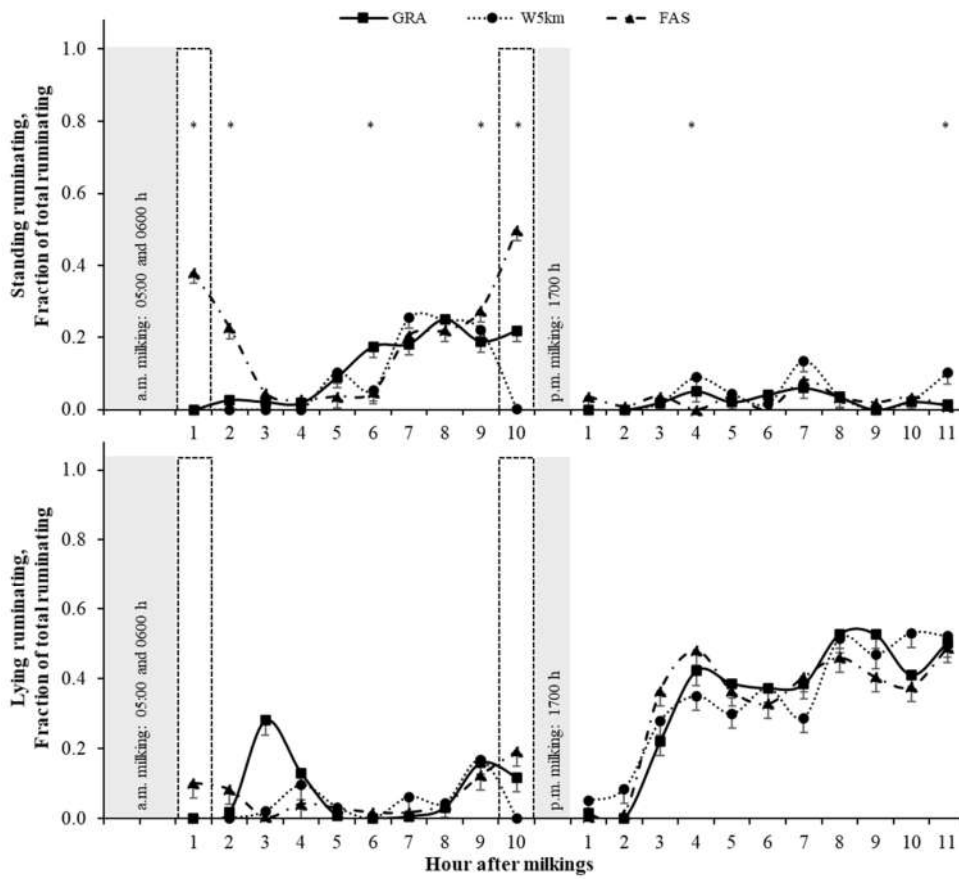
667



Anexo II

670 Capelesso. Figure 2.

671

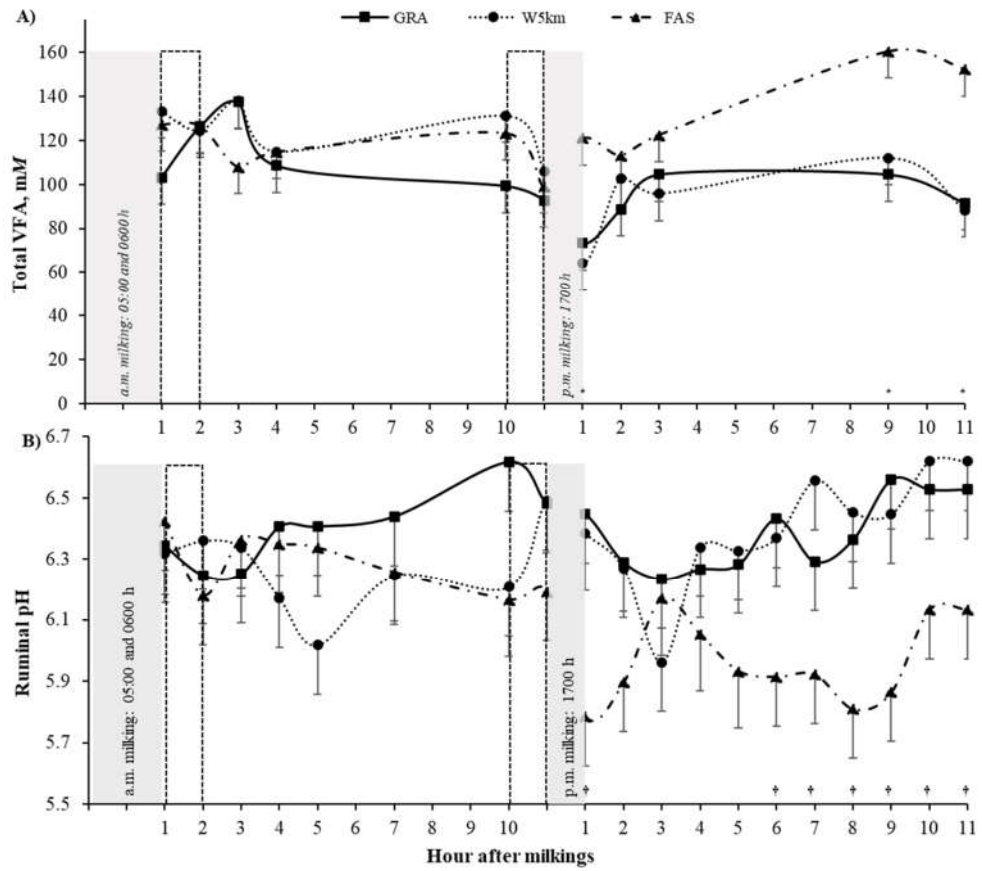


672

673

Anexo II

674 **Capelleso. Figure 3.**



675

676



Reducing milking frequency in early lactation improved the energy status but reduced milk yield during the whole lactation of primiparous Holstein cows consuming a total mixed ration and pasture

A. Capelesso,^{1,2} G. Kozloski,² A. Mendoza,³ M. Pla,³ J. L. Repetto,⁴ and C. Cajarville^{1*}

¹Departamento de Nutrición Animal, Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Ruta 1 km 42.5, San José, Uruguay ²Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 97105900, Brazil ³Programa de Producción de Leche, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta 50 km 11, 70002, Colonia, Uruguay ⁴Departamento de Producción de Bovinos, Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Ruta 1 km 42.5, San José, Uruguay

ABSTRACT

To investigate the immediate and long-term performance effects of milking frequency during early lactation of primiparous dairy cows consuming a total mixed ration and pasture, 20 Holstein cows were assigned in a randomized block design to either once-daily (1×) or twice-daily (2×) milking during the first 8 wk of lactation (treatment period). After the treatment period, all cows were milked 2× until wk 43 of lactation. Cows were fed a total mixed ration (approximately 15 kg of DM/cow per day) and allowed to graze an oat pasture (*Avena sativa*). Dry matter intake was 19.1 kg of DM/cow per day on average and was not affected by treatments. Milk yield was 40% lower in cows milked 1× during the treatment period, and a carryover effect existed until wk 21 of lactation, resulting in a final reduction of 15% of milk yield in the whole lactation. Milk lactose concentration decreased, whereas fat and protein concentrations increased for cows milked 1×. Mobilization of energy reserves during the treatment period occurred in both groups, but cows milked 1× showed greater body condition score and greater backfat thickness. In conclusion, milking 1× during the first 8 wk of lactation resulted in immediate and carryover negative effects on milk and milk solid yield without affecting feed intake, resulting in the improved energy status of primiparous dairy cows.

Key words: dairy cows, grazing, once-daily milking

INTRODUCTION

Once-daily milking of dairy cows is a strategy used on dairy farms to decrease labor demand in milking parlors, reduce walks in hilly terrains or long distances, or prevent heat stress in hot climate conditions (Stelwagen et al., 2013). Previous studies conducted with Holstein multiparous cows showed that decreased milk frequency reduces milk yield without changes in feed intake (Rémond et al., 1999; Kay et al., 2013), having the potential of alleviating the negative energy balance in early lactation (Patton et al., 2006; Kay et al., 2013; Grala et al., 2014). Improvement in energy balance could be relevant for reproductive performance of dairy cows.

A more severe negative energy balance during early lactation extends the interval to first ovulation and impairs reproductive performance (Lucy et al., 1992; Morales Piñeyría et al., 2018). Therefore, an improvement of the energy status during early lactation of primiparous dairy cows could be advantageous. Furthermore, in systems where pasture represents an important part of the diet, the lower feed intake may intensify the negative energy balance (Bargo et al., 2002), and once-daily milking could be an important management strategy.

Additionally, the DMI of primiparous dairy cows does not peak as early in lactation and varies little afterward, compared with multiparous cows (NRC, 2001). Therefore, intake response of primiparous cows to reduced milking frequency could be different from that of multiparous cows. Despite the possible benefit of improved energy balance of primiparous cows, the immediate and carryover effects of decreasing milking frequency during early lactation and throughout the whole lactation have not been evaluated in primiparous dairy cows. Therefore, the objectives of this study were to determine the immediate and carryover effects of decreasing milking frequency during early lactation on the productive performance and energy status of primi-

Received March 15, 2019.

Accepted June 21, 2019.

*Corresponding author: cajarville@gmail.com

parous Holstein dairy cows consuming a TMR and pasture.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Experimental Design, and Treatments

The experiment was conducted at the Experimental Station of the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) in Colonia, Uruguay (34°20'18.2"S, 57°41'24.2"W) between March 2014 and January 2015 and complied with regulations of the Bioethics Committee of the Institute. Twenty primiparous HolsteinFriesian cows were selected 2 wk before the expected date of calving and blocked according to calving date (between March and April of 2014), BW (605 ± 67.2 kg; mean at wk 2 \pm standard deviation), backfat thickness (**BFT**; 3.6 ± 1.49 cm), and BCS (3.6 ± 0.29 , 1 to 5 scale; Edmonson et al., 1989). The cows were assigned, from the third day of lactation, to once-daily (1 \times) or twice-daily (2 \times) milking up to wk 8 of lactation (treatment period). After the treatment period, all cows were milked 2 \times until wk 43 of lactation (posttreatment period). The cows were milked at 0600 h (1 \times) or at 0600 and 1700 h (2 \times). During the afternoon milking, the 1 \times

cows did not enter the milking parlor and were kept in a paddock close to the milking parlor, without access to food or water.

Feeding Management

All cows received the same diet throughout the experiment. Before calving (28 d), the cows were fed only with TMR, formulated to meet the requirements of heifers weighing 590 kg (NRC, 2001), which was the average weight 4 wk before calving. During the management prepartum period, DMI was 8.2 ± 0.34 kg/d on average. In the postpartum period, the diet was formulated to meet the requirements of cows weighing 520 kg and producing 30 kg of milk/d. Seventy percent of the estimated DMI (NRC, 2001) was individually offered as a TMR (15.2 ± 1.2 kg of DM/cow per day), after the morning milking until wk 43 of lactation. After the afternoon milking, all cows grazed oats (*Avena sativa* L.; var. INIA Halley) with a paddock size adjusted to provide 12 kg of DM/cow per day (calculated at a height of 0 cm). After wk 13 of lactation, the animals remained with the same diet, but the TMR and pasture

Table 1. Ingredients and mean nutrient composition (SD in parentheses) of TMR and pasture (*Avena sativa*; % DM, unless otherwise indicated) prepartum and the first 13 wk of lactation

Item	Prepartum ¹		Postpartum ²
Ingredients of diet, % of DM			49.7
Ground corn grain	10.0		37.8
Soybean meal	16.4		7.33
Wheat straw	12.3		2.13
Urea	0.4		0.48
Vitamin-mineral mix ³	1.2		2.56
	TMR	TMR	Pasture
Nutrient composition			
DM, % of as fed	35.4 (1.11)	38.0 (3.04)	14.6 (4.02)
OM	91.4 (0.56)	93.4 (0.41)	88.9 (1.46)
NDF	41.3 (0.68)	32.4 (2.72)	43.6 (4.35)
ADF	21.4 (0.46)	16.4 (1.59)	21.5 (3.35)
Ether extract	3.2 (0.19)	3.0 (0.05)	4.1 (0.44)
CP	14.0 (1.48)	13.0 (0.92)	17.4 (1.83)
NE _L , ⁴ Mcal/kg of DM	1.61	1.66	1.73

¹Started 3 wk before parturition.

²Seventy percent of the estimated DMI (NRC, 2001) was individually offered as a TMR (15.2 ± 1.2 kg of DM/cow per day). In addition, cows grazed oat (*Avena sativa* L., var. INIA Halley) with an allowance of 12 kg of DM/cow per day (calculated at a height of 0 cm).

³Provided prepartum (per kg of DM of vitamin-mineral mix): 3 g of salt and a commercial product (content per kg of DM): 50 g of Ca, 50 g of P, 220 g of Mg, 1,600 mg of Cu, 4,900 mg of Zn, 25 mg of Se, 2,900 mg of Mn, 65 mg of I, 10 mg of Co, 178,000 IU of vitamin A, 35,000 IU of vitamin D₃, 7,200 IU of vitamin E, and 1.3 g of monensin (Rumensin 200, Elanco Animal Health, Indianapolis, IN). Provided postpartum (per kg of DM of vitamin-mineral mix): 3 g of salt, 1.9 g of sodium bicarbonate, 1.9 g of calcium carbonate, and a commercial product (content per kg of DM): 140 g of Ca, 14 g of P, 30 g of Mg, 150 g of Na, 110 g of Cl, 874 mg of Cu, 2,668 mg of Zn, 9 mg of Se, 1,090 mg of Mn, 23 mg of I, 3 mg of Co, 65,707 IU of vitamin A, 13,141 IU of vitamin D₃, 298 IU of vitamin E, and 1 g of monensin (Rumensin 200, Elanco Animal Health).

⁴Calculated according to the NRC (2001).

Anexo III

were offered for all cows together. Table 1 shows the ingredients of the diet, as well as the chemical composition of TMR and pasture.

Measurements and Sampling

Intake of pasture and TMR was measured weekly during the first 13 wk of lactation for 3 consecutive days per week. The pasture was managed under stripgrazing, with 2 cows of the same treatment and calving date per paddock. Pasture intake was estimated as the difference between pre- and postgrazing forage mass in each paddock (Haydock and Shaw, 1975). Forage mass was estimated before and after grazing (50 measurements each), using an automatic rising plate meter (Filip's Manual Folding Plate Meter, Jenquip, Feilding, New Zealand), which was calibrated weekly. For calibration, 5 measurements were made of all pasture in the plate area (circular ring of 0.1 m²) at before and after grazing by cutting the forage at ground level. Forage was dried in a forced-air oven at 55°C for at least 48 h and weighed. Two equations were created with the calibration measurement points (one for the pre- and one for the postgrazing condition). The intake of TMR was determined individually by weighing the amount offered and refused once daily. Total DMI was calculated as the sum of pasture and TMR intake of each experimental unit (2 cows per unit).

Individual milk yield was recorded automatically at each milking for 43 wk of lactation, using DairyPlan C21 (GEA Farm Technologies, Düsseldorf, Germany). Individual milk samples were collected in consecutive milkings, twice per week during the first 13 wk of lactation and approximately twice per month until the end of lactation. Two milk samples (50 mL each) were collected in each milking, one with the preservative bronopol (stored at 4°C until analyzed) and one without preservative (stored at 20°C until analyzed).

BW, BCS, and BFT were recorded after the milking (postpartum period) and before feeding in the morning, at wk 2, 1, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12, 26, 37, and 43 postpartum. Body weight was determined with a digital scale. The BCS was estimated by the same observer using 0.25-unit intervals on a scale from 1.0 to 5.0 (Edmonson et al., 1989). The BFT was determined in the sacral region with ultrasound evaluation (Aloka SSD-500, Aloka Ltd., Tokyo, Japan) using a linear transducer at a frequency rate of 5.0 MHz (Schroder and Staufenbiel, 2006). The skin thickness was excluded in the ultrasound measurement. The interval from calving to first ovulation was determined for each cow through transrectal ovarian ultrasonography (5.0 MHz, Aloka SSD-500, Aloka Ltd.) from d 7 to 60 postpartum, at 3-d intervals. Conception was also confirmed by ultrasonography at 30 d after insemination.

Estimates of body protein content and body fat content were performed using the urea dilution technique (Agnew et al., 2005) at 1, 4, 8 and 12 wk postpartum. For this purpose, cows were weighed after the milking (postpartum period) and before feeding in the morning, and a 4-mL blood sample was collected from the jugular vein to determine serum urea concentration. Thereafter, a urea solution (200 g/L), previously filtered through a 45- μ m nitrocellulose filter, was infused into the jugular vein for a period of up to 2 min. The volume injected was calculated to provide 130 mg of urea per kilogram of BW. Twelve minutes after the end of infusion, another blood sample was collected from the jugular vein to determine serum urea concentration (as is later described).

Three blood samples were collected at wk 2, 1, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, and 12 postpartum from the jugular vein: one in tubes without anticoagulant, one with sodium heparin, and one in tubes containing sodium fluoride plus potassium oxalate. The samples without anticoagulants were kept at room temperature for 1 h, placed in a refrigerator at 4°C for 2 h, and centrifuged (834 \times g for 10 min at 20°C), and then, serum was stored at 20°C until analysis. The samples containing anticoagulant were centrifuged (834 \times g for 10 min at 20°C), and plasma was stored at 20°C until analysis.

Chemical Analysis

Dry matter content was determined by drying at 105°C for at least 16 h (method no. 934.01; AOAC, 1990). Ash was determined by combusting at 600°C for 3 h, and OM was determined by the mass difference (method no. 942.05; AOAC, 1990). Total nitrogen was assayed with the Kjeldahl method (method no. 984.13; AOAC, 1990). Ether extract concentration was determined in a reflux system (Soxtherm 2000 S 306 M, Gerhardt, Königswinter, Germany) with ethyl ether at 180°C for 2 h (method no. 920.39; AOAC, 1990). The NDF included ashes and was analyzed according to the procedures described by Mertens (2002) with the use of heat-stable α -amylase and without sulfite, and ADF concentration was analyzed sequentially according to method no. 973.18 of AOAC (1990), except that the samples were weighed into polyester filter bags (porosity of 16 μ m) and treated with neutral and acid detergent in an autoclave at 110°C for 40 min (Senger et al., 2008). Individual milk samples with the preservative bronopol were used to determine fat, protein, total casein, lactose, and urea by infrared spectroscopy analysis (Bentley Model 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN) and SCC, using an automated cell counter (Foss Electric A/S, Hillerød, Denmark). Individual milk samples without preservative were analyzed for electric conductivity

Anexo III

using an Orion 105 (Orion Research Inc., Jacksonville, FL). For plasma and serum metabolic analysis, a Vitalab Selectra-2 autoanalyzer (Vital Scientific, Dieren, the Netherlands) was used together with Standatrol and Randox Hn1 530 standards. Plasma and serum metabolites, glucose, nonesterified fatty acids, BHB, and urea, were analyzed with their respective commercial kits (Liquid Enzymatic Glycemia AA, Wiener Laboratories S.A.I.C. Riobamba, Rosario, Argentina; Wako NEFA-HR(2), Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan; d-3-hydroxybutyrate, Randox Laboratories, Crumlin, UK; and Liquid Kinetic UV Urea, Wiener Laboratories S.A.I.C. Riobamba). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation of all determinations were equal or less than 6.5%.

Calculations

The NE_L concentration of the diets was calculated based on chemical composition analyses, DMI, and individual characteristics of cows during the trial period according to NRC (2001). Energy balance (**EB**) was estimated at wk 1, 3, 4, 6, 8, 11, and 12 of lactation, using information from each animal, as

$$\begin{aligned} \text{EB (Mcal of } NE_L/\text{d)} &= \text{energy intake (Mcal of } NE_L/\text{d)} \\ & \quad [\text{maintenance requirement (Mcal of } NE_L/\text{d)} \\ & \quad + \text{growth requirement (Mcal of } NE_L/\text{d)} \\ & \quad + \text{lactation requirement (milk } NE_L \text{ output, Mcal/d)}]. \end{aligned}$$

A total walking distance between milking parlor and grazing paddock of 1,000 m/d was considered for the estimates. Energy intake was calculated as $DMI \times NE_L$ concentration in the diet (Mcal/kg of DM). Energy requirements were estimated according to the NRC (2001). Maintenance requirement was calculated as $0.08 \times BW^{0.7}$. Growth requirement was calculated as $0.0635 \times \text{equivalent empty BW, kg}^{0.75} \times \text{empty BW gain, kg/d}^{1.097}$. Lactation requirements (milk NE_L output, Mcal/d) were calculated using the average milk composition in each week as

$$\begin{aligned} \text{Milk } NE_L \text{ output, Mcal/d} &= (0.0929 \times \text{kg of fat per} \\ & \text{day}) + (0.0547 \times \text{kg of protein per day}) + (0.0395 \times \\ & \text{kg of lactose per day}). \end{aligned}$$

Fat-corrected milk (FCM 4%) was calculated according to the NRC (2001) as

$$\begin{aligned} \text{FCM 4\%} &= (0.4 \times \text{kg of milk per day}) \\ & + [15 \times (\text{fat \%}/100) \times \text{kg of milk per day}]. \end{aligned}$$

Feed efficiency was calculated as $FCM \text{ 4\% yield (kg/d)}/DMI \text{ (kg/d)}$.

Estimates of body protein content (EBP) and body fat content (EBF) were calculated using, in each case, the equation with best R^2 recommended by Agnew et al. (2005) as

$$\begin{aligned} \text{EBP, kg} &= 5.0 + (0.036 \times \text{USV}_{12}) \\ & + (0.105 \times \text{live weight}), \end{aligned}$$

where USV_{12} is urea space volume, calculated by dividing the amount of urea infused (mg) by the difference in serum urea concentration (mg/L) before and after infusion (at 12 min).

$$\begin{aligned} \text{EBF, kg} &= 41 + [0.036 \times (\text{USV}_{12}/\text{EBW})] \\ & + (0.192 \times \text{live weight}) + (1.32 \times \text{kg of milk yield}) \\ & + (11.19 \times \text{BCS}), \end{aligned}$$

where EBW is empty BW, calculated as

$$\begin{aligned} \text{EBW, kg} &= 28.6 + (0.143 \times \text{USV}_{12}) \\ & + (0.677 \times \text{live weight}) + (1.03 \times \text{kg of milk yield}) \\ & + (12.72 \times \text{BCS}). \end{aligned}$$

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the PROC MIXED procedure of SAS (version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC). Variables were analyzed for the treatment period, post-treatment period, and whole period. Prepartum values were used as covariates in their respective data analysis. Repeated measurements were analyzed as first-order autoregressive covariance structure AR (1) when time intervals were evenly spaced (milk yield), and the spatial power SP(POW) was used for variables that were not evenly spaced (milk composition, intake, body, and metabolic variables). The Kenward-Roger procedure was used to adjust the denominator degrees of freedom. The following model was used:

$$Y_{ijk} = \mu + MF_i + W_j + B_k + MF_i \times W_j + \varepsilon_{ijk},$$

where Y_{ijk} is the dependent variable, μ is the mean, MF_i is the fixed effect of the milking frequency (**MF**; $i = 1 \times$ or $2 \times$), W_j is the fixed effect of the week (**W**; $j = 1$ to 12 , 13 or 43), B_k is the random effect of the block ($k = 1$ to 10), $MF_i \times W_j$ is the fixed effect of the treatment and week interaction, and ε_{ijk} is the residual error.

Anexo III

Data of total milk yield and interval from calving to first ovulation or conception (1×: n = 10 and 2×: n = 10) were analyzed as

$$Y_{ij} = \mu + MF_i + B_j + \varepsilon_{ij},$$

where Y_{ij} is the dependent variable, μ is the mean, MF_i is the fixed effect of milking frequency ($i = 1\times$ or $2\times$), B_j is the random effect of the block ($j = 1$ to 10), and ε_{ij} is the residual error. The Kenward-Roger procedure was used to adjust the denominator degrees of freedom.

Before analysis, residuals were tested for normal distribution with the Shapiro-Wilk test (when less than 50 observations existed) or the Kolmogorov-Smirnov test (when more than 50 observations existed), using the PROC UNIVARIATE statement. When data did not show normal distribution, the Box-Cox process was used to transform the data set. Milk fat content, milk protein yield, and urea in blood were square-root transformed, and SCC was logarithmically transformed before statistical analyses (Phyn et al., 2014). Least squares means were compared using Tukey's test, and differences were declared at $P \leq 0.05$. The results were presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Up to wk 8, cows milked 1× produced 534 kg less milk (total milk yield until wk 8 was 822 vs. 1,356, SEM = 43.7 kg, $P < 0.001$), which represented 366 kg of FCM 4% ($P < 0.05$), than cows milked 2× (Figure 1A and 1B). For cows milked 1×, milk yield remained lower until wk 21 (Figure 1A) and total milk yield until wk 43 was lower (5,530 vs. 6,502 kg, SEM = 247.8 kg, $P = 0.018$) relative to 2× cows. During the treatment period, cows milked 1× had greater milk fat concentration (4.83 vs. 3.74%, SEM = 0.21%, $P < 0.001$ for milking frequency effect) and lower milk lactose concentration (4.78 vs. 5.07%, SEM = 0.06%, $P < 0.001$ for milking frequency effect) and tended to have greater milk protein concentration compared with 2× cows (Figure 2), and no interactions of MF \times W were detected. The milk NE_L output during the treatment period was approximately 30% lower in 1× compared with 2× cows (Figure 1C, 12.8 vs. 18.3 Mcal/d, SEM = 0.69 Mcal/d, $P < 0.001$ for milking frequency effect). During the post-treatment period (wk 9 to 43), milk composition was similar for both treatments. The daily yield of milk fat, lactose, and protein was lower for 1× cows up to wk 8 (Figure 2D, 2E, and 2F, respectively). After that, there were differences

between treatments up to wk 23 and 27 only for milk lactose and protein yield, respectively. Total lactose and protein yield during the whole lactation was also lower for 1× compared with 2× cows, with a decrease of 52 kg (267.8 vs. 319.3 kg, SEM = 12.07 kg, $P = 0.007$) and 24 kg (186.1 vs. 210.7 kg, SEM = 6.62 kg, $P = 0.005$), respectively, whereas total fat (206.0 vs. 207.1 kg, SEM = 13.55 kg, $P = 0.947$) yield did not differ between treatments. Milk SCC was greater for 1× cows throughout the whole lactation (Figure 2G). Milk urea concentration was greater for 1× compared with 2× cows during the treatment period (4.21 vs. 3.86 mmol/L, SEM = 0.19 mmol/L, P -value: MF = 0.039, W = 0.025, MF \times W = 0.931), with no differences after wk 8 (3.66 vs. 3.71 mmol/L, SEM = 0.22 mmol/L, P -value: MF = 0.867, W = 0.872, MF \times W = 0.872). Electric conductivity of milk (4.74 vs. 4.63 mS, SEM = 0.08 mS, P -value: MF = 0.080, W = 0.061, MF \times W = 0.819) and casein concentration (2.58 vs. 2.59%, SEM = 0.03%, P -value: MF = 0.658, W < 0.001, MF \times W = 0.269) were not different between 1× and 2× (data not shown in tables or figures).

The DMI of pasture and TMR, as well as total DMI during the first 13 wk of lactation, were similar for both treatments (Table 2). During the treatment period (up to wk 8), feed efficiency was 44% lower in 1× compared with 2× cows (Table 2).

Mean BCS and BFT were greater ($P < 0.05$) for 1× than 2× cows during the whole lactation (Figure 3), and BW was greater during the post-treatment period (559.3 vs. 541.6 kg, SEM = 6.1 kg, $P = 0.007$ for milk frequency effect). From wk 1 to 12, body protein content was not different between treatments, but on average, cows milked 1× had 14% more body fat than cows milked 2× (61.4 vs. 48.1 kg, SEM = 3.2 kg, $P = 0.005$, Figure 4A and 4D). During wk 1 to 12 of lactation, serum urea concentration was similar for both treatments, whereas cows milked 1× showed greater plasma glucose concentration (3.81 vs. 3.67 mmol/L, SEM = 0.037 mmol/L, $P = 0.002$ for milk frequency effect, Figure 4F). Significant interactions existed between treatment and week for BHB and nonesterified fatty acids, but the treatment effect was nonsignificant for these variables (Figure 4B and 4C.) Energy balance was greater for cows calving to 4C) milked 1× compared with 2× during early lactation (Figure 4G).

Calving to conception interval did not differ between treatments (126 vs. 111 d, SEM = 15 d, $P = 0.449$, 1×: n = 9 and 2×: n = 9), but the interval from

Anexo III

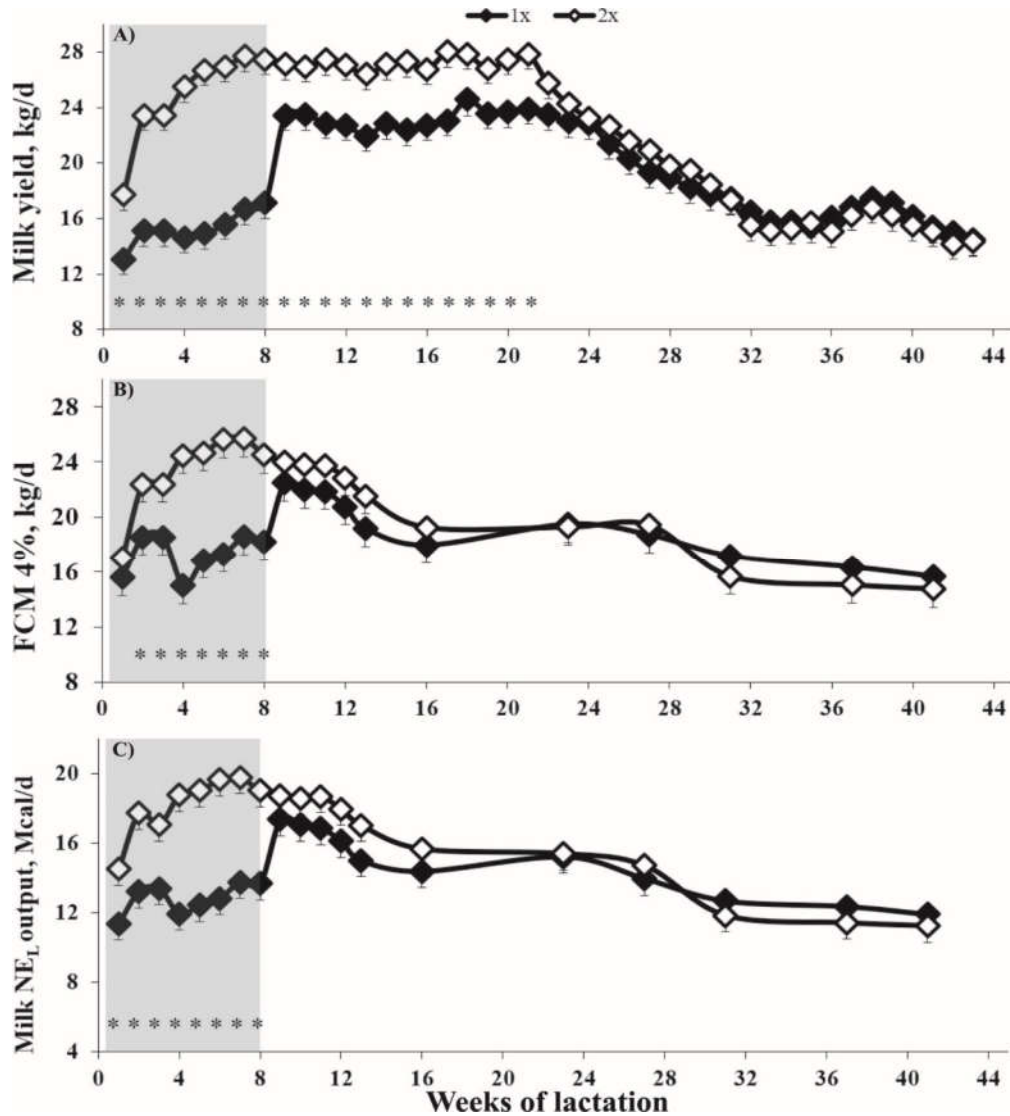


Figure 1. Daily milk production of cows milked once daily (1×;) or twice daily (2×;) for 8 consecutive weeks of lactation (the gray area is the treatment period during the first 8 wk of lactation). Following the treatment period, all cows were milked twice daily. MF = milking frequency; W = week; MF × W = MF-by-week interaction. (A) Milk yield, kg/d (MF, $P < 0.001$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P < 0.001$); (B) FCM 4%, kg/d (MF, $P < 0.001$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P < 0.001$); (C) milk NE_L output, Mcal/d (MF, $P < 0.001$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P < 0.001$). *Significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments at each time point, when MF × W ≤ 0.05 .

first luteal activity tended to be shorter in 1× cows than in 2× cows (25 vs. 32 d, SEM = 3 d, $P = 0.072$, 1×: n = 8 and 2×: n = 9).

DISCUSSION

When primiparous cows were milked 1× during the first 8 wk of lactation, a reduction of 39% in milk yield was found, which is greater than previously reported.

Kay et al. (2013), Phyn et al. (2014), and McNamara et al. (2008) have reported reductions of 14 to 21% and 25% in 25% in milk yield when multiparous cows were milked 1× during the first 3, 6, and 4 wk of lactation, respectively. The greater effect on milk yield in our work compared with multiparous cows could be because of 2 factors: (1) the greater sensitivity of the udder during the first lactation, which is still developing (Knight and Wilde, 1993), and (2) the longer period under 1× milking relative to other authors, which may

Anexo III

have decreased the secretory ability of the mammary gland (Grala et al., 2011).

The negative effect of decreased milking frequency on milk yield was not completely recovered, meaning that 36 wk of the same diet and milking regimen was not enough to neutralize the differences caused in the first 8 wk. In fact, the reduction of 15% in cumulative milk yield in the whole lactation (43 wk) was explained by the lower milk yield during the treatment but also by a lower milk yield during the first 13 wk after the

ending of the treatment. Decreasing milking frequency decreases the secretory ability of the mammary gland (Knight and Dewhurst, 1994; Grala et al., 2011), the storage capacity of the alveolar compartment (Dewhurst and Knight, 1993; Davis et al., 1998; Caja et al., 2004; Charton et al., 2016), and the hepatic metabolic rate (Grala et al., 2014). The results of the present study indicate that the physiological or metabolic processes do not have the potential to respond in a compensatory

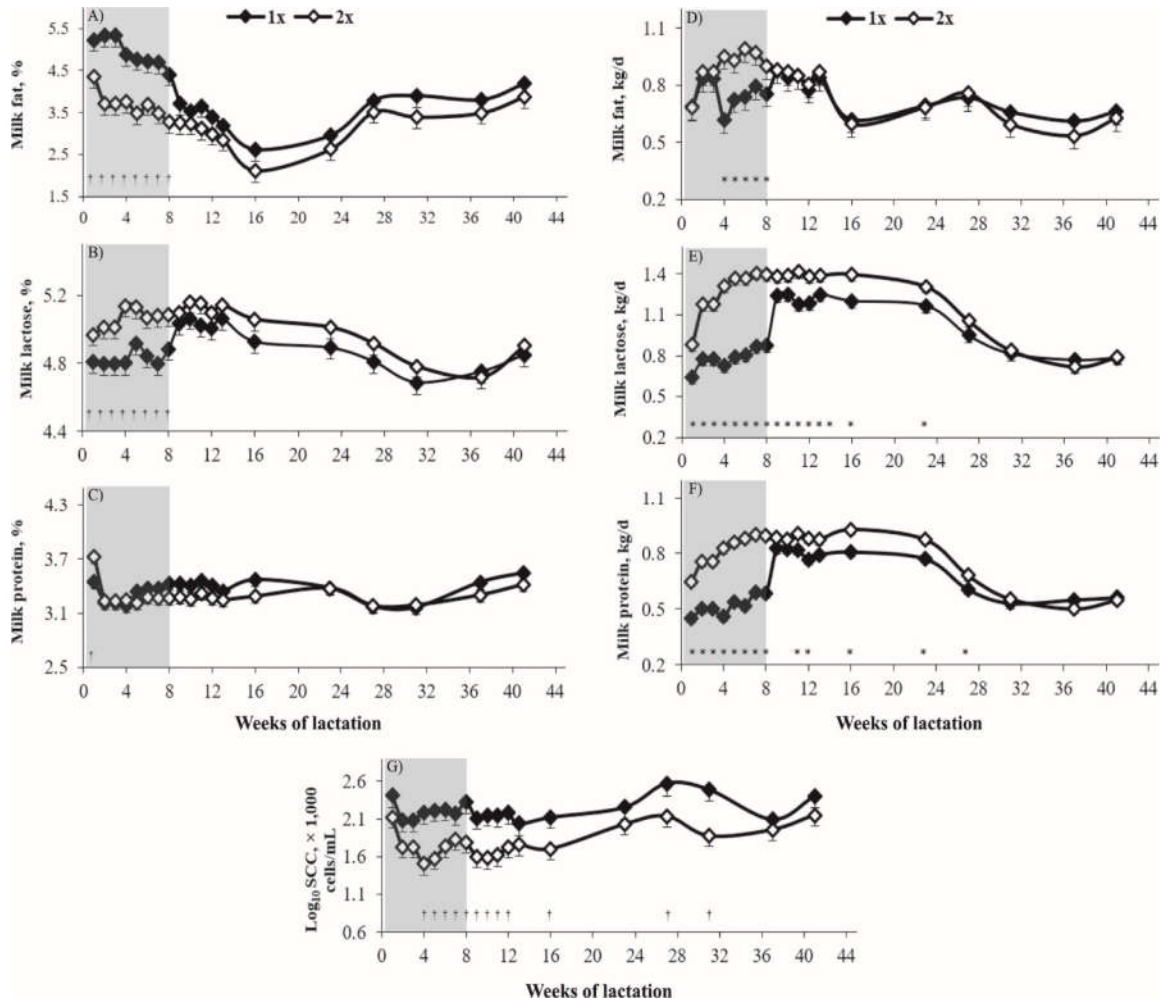


Figure 2. Daily milk composition of cows milked once daily (1x; ●) or twice daily (2x; ◇) for 8 consecutive weeks of lactation (the gray area is the treatment period during the first 8 wk of lactation). Following the treatment period, all cows were milked twice daily. MF = milking frequency; W = week; MF × W = MF-by-week interaction. (A) Fat, % (MF, $P < 0.001$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P = 0.070$); (B) lactose, % (MF, $P < 0.001$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P = 0.286$); (C) protein, % (MF, $P = 0.004$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P = 0.136$); (D) fat, kg/d (MF, $P = 0.001$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P = 0.005$); (E) lactose, kg/d (MF, $P < 0.001$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P < 0.001$); (F) protein, kg/d (MF, $P < 0.001$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P < 0.001$); (G) \log_{10} SCC, $\times 1,000$ cells/mL (MF, $P < 0.001$; W, $P = 0.001$; MF × W, $P < 0.909$). *Significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments at each time point, when MF × W ≤ 0.05 . †Significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments at each time point, when MF × W > 0.05

Anexo III

Table 2. Intake and feed efficiency during the first 13 wk of lactation in primiparous dairy cows milked once (1×) or twice (2×) daily for 8 wk in early lactation and 2× thereafter

Item	Week ¹	Milking Frequency		SEM	P-value ²		
		1×	2×		MF	W	MF × W
DMI, kg/d							
TMR ³	1 to 8	12.4	12.6	0.314	0.733	0.002	0.658
	9 to 13	12.7	12.4	0.251	0.326	0.006	0.716
Pasture ⁴	1 to 13	12.6	12.5	0.220	0.684	<0.001	0.619
	1 to 8	7.1	7.4	0.506	0.652		0.837
Total ⁵	9 to 13	5.4	5.0	0.604	0.549	0.003	0.988
	1 to 13	6.4	6.5	0.378	0.947	<0.001	0.148
Total ⁵	1 to 8	19.8	19.7	0.594	0.855		0.160
	9 to 13	18.5	17.6	0.620	0.246	<0.001	0.829
Total ⁵	1 to 13	19.3	18.9	0.337	0.371	<0.001	0.846
	Feed efficiency ⁶						
Total ⁵	1 to 8	0.79	1.40	0.128	<0.001	0.393	0.794
	9 to 13	1.10	1.29	0.162	0.103	0.277	0.626
Total ⁵	1 to 13	0.92	1.36	0.128	<0.001	0.196	0.046

¹Week 1 to 8 = treatment period (once- or twice-daily milking); wk 9 to 13 = post-treatment period; wk 1 to 13 = whole period.

²MF = milking frequency; W = week; MF × W = MF-by-week interaction.

³TMR intake. 1×: n = 10 and 2×: n = 10.

⁴Pasture intake. 1×: n = 5 and 2×: n = 5 (2 animals per experimental unit).

⁵Total DMI. 1×: n = 5 and 2×: n = 5 (2 animals per experimental unit).

⁶Feed efficiency was calculated as FCM 4% yield (kg/d)/DMI (kg/d).

way when milking frequency is increased again to 2× after a decrease to 1× in early lactation. Our study confirms that this lack of compensation is particularly important in primiparous cows. The effect on subsequent lactation is unknown.

Although the increase in fat concentrations may be an indirect consequence of reduction in milk yield (Dutreuil et al., 2016), explanation for the reduction in lactose concentration is not clear. The decreased milking frequency may have decreased the expression of the genes associated with mammary lactose synthesis, as reported by Grala et al. (2011). Alternatively, tight junction integrity between mammary epithelium cells may have been partially disrupted as a result of an increased alveolar distension, increasing the exchange of components between milk and interstitial fluids, as reported by other authors (Stelwagen et al., 1994; Lacy-Hulbert et al., 1999; Stelwagen, 2001; Delamaire and Guinard-Flament, 2006). Consequently, there could have been an outflux of lactose from milk to blood and an influx of proteins from blood to milk. However, the opening of the tight junctions should have also increased the influx of ions from blood to milk, increasing the electric conductivity of milk (Milner et al., 1996; Kaşikçi et al., 2012), and this was not found in the present study. In addition, the fact that electrical conductivity of milk does not differ suggests that the increase in SCC was a concentration effect, due to a lower milk yield. The increase in the protein content of milk may be desirable, especially because 1× milking has been reported

to increase total casein content (Lacy-Hulbert et al., 1999), but in our study, casein concentration did not differ between treatments. Therefore, the increase in milk protein concentration may be partially explained by a lower milk yield effect.

The lower plasma glucose concentration found in cows milked 2× up to wk 8 was expected, considering the greater demand for lactose synthesis in these cows. Mobilization of energy reserves occurred in both groups, with the serum nonesterified fatty acid concentration greater than 0.6 mmol/L, which was indicative of mobilization of body fat according to Ospina et al. (2010). However, even with body mobilization, we have not found evidence of subclinical ketosis during early lactation in the animals of this experiment, because the BHB values were lower than 1.0 mmol/L, which is considered as the limit by Duffield et al. (2009) and Ospina et al. (2010). As reported by other authors (Komaragiri and Erdman, 1997; Komaragiri et al., 1998), dairy cows mobilize body fat and, to a limited extent, body protein during early lactation. In our trial, we found that the greater amount of body tissue loss occurred between -1 and 4 wk postpartum, and during the period when treatment was applied, cows mobilized 46.5 kg of body fat and 12.6 kg of body protein, which is similar to the amounts described by Komaragiri et al. (1998) for cows in early lactation. However, between 4 and 12 wk postpartum, with the urea infusion technique, only small changes in body protein and fat mass were observed.

Anexo III

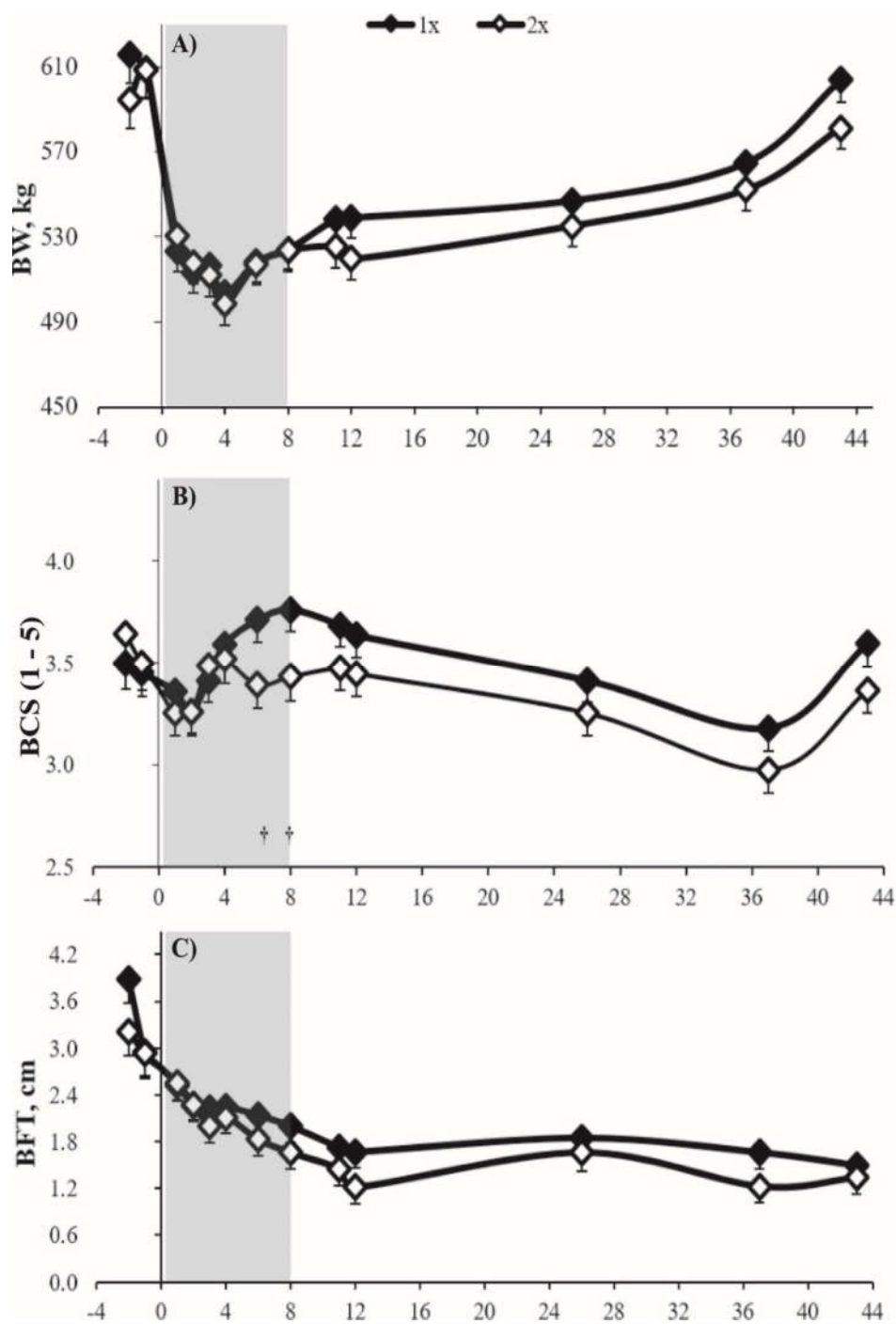


Figure 3. Body variables of cows milked once daily (1x; \blacklozenge) or twice daily (2x; \diamond) for 8 consecutive weeks of lactation (the gray area is the treatment period during the first 8 wk of lactation). Following the treatment period, all cows were milked twice daily. MF = milking frequency; W = week; MF \times W = MF-by-week interaction. (A) Body weight, kg (MF, $P = 0.085$; W, $P < 0.001$; MF \times W, $P = 0.887$); (B) BCS (1 to 5 scale; MF, $P = 0.002$; W, $P < 0.001$; MF \times W, $P = 0.743$); (C) backfat thickness (BFT), cm (MF, $P = 0.011$; W, $P < 0.001$; MF \times W, $P = 0.972$). The skin thickness was excluded in the ultrasound measurement. †Significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments at each time point, when MF \times W > 0.05 .

Anexo III

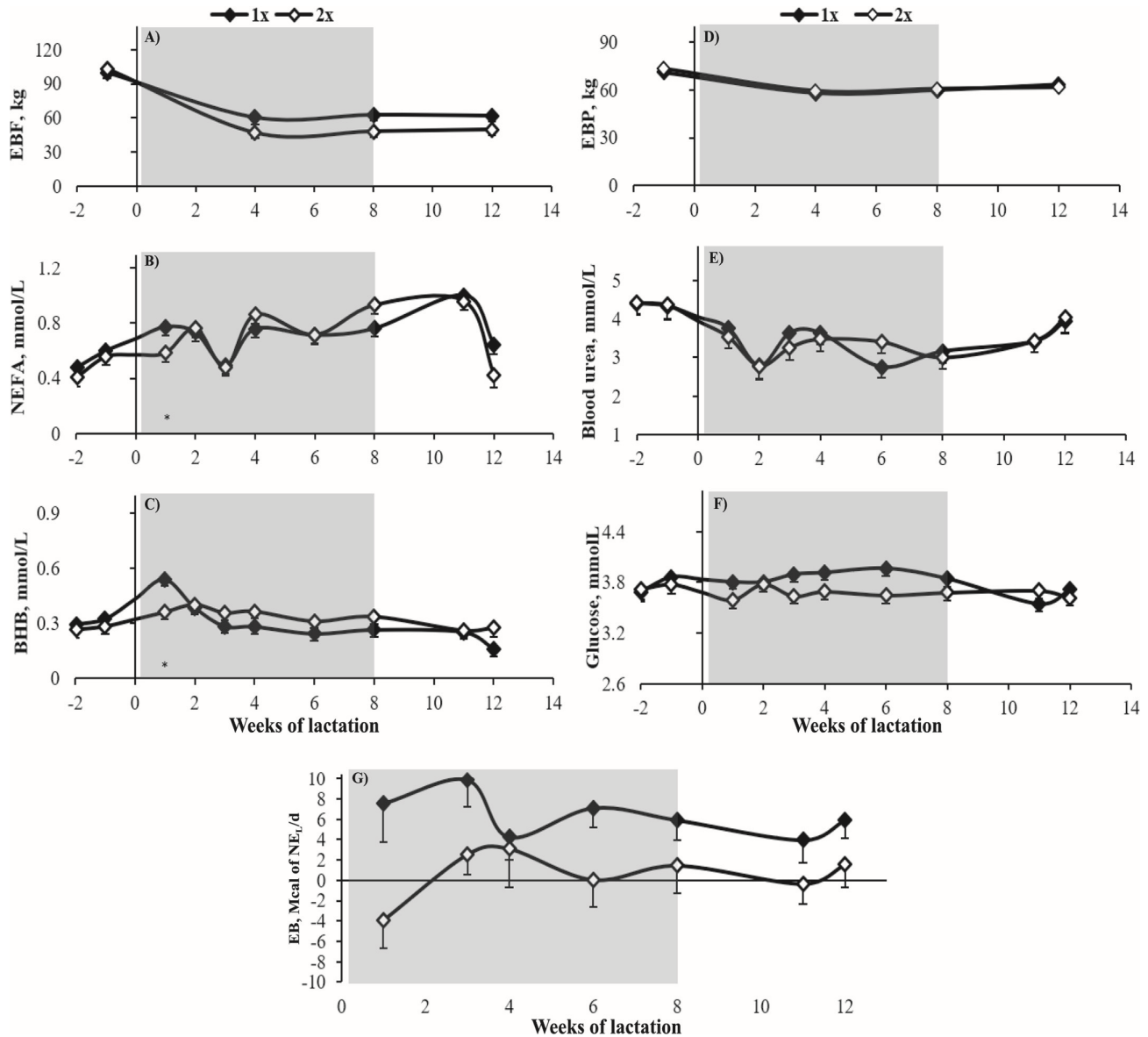


Figure 4. Body reserves, concentrations of metabolites, and energy balance of cows milked once daily (1×; ●) or twice daily (2×; ◇) for 8 consecutive weeks of lactation (the gray area is the treatment period during the first 8 wk of lactation). Following the treatment period, all cows were milked twice daily. MF = milking frequency; W = week; MF × W = MF-by-week interaction. (A) Estimates of body fat content (EBF), kg (MF, $P = 0.005$; W, $P = 0.907$; MF × W, $P = 0.971$); (B) nonesterified fatty acids (NEFA), mmol/L (MF, $P = 0.519$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P = 0.011$); (C) BHB, mmol/L (MF, $P = 0.098$; W, $P < 0.001$; MF × W, $P = 0.001$); (D) estimates of body protein content (EBP), kg (MF, $P = 0.946$; W, $P = 0.009$; MF × W, $P = 0.289$); (E) blood urea, mmol/L (MF, $P = 0.893$; W, $P = 0.009$; MF × W, $P = 0.780$); (F) glucose, mmol/L (MF, $P = 0.002$; W, $P = 0.250$; MF × W, $P = 0.140$); (G) energy balance (EB), Mcal of NE₁/d (MF, $P = 0.002$; W, $P = 0.496$; MF × W, $P = 0.657$). *Significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments at each time point, when MF × W ≤ 0.05 .

Cows milked 1× produced less milk and milk components than cows milked 2× during early lactation, and because DMI did not differ between treatments, cows milked 1× had a lower short-term feed efficiency than 2× cows. Although they did not report results of feed efficiency, other studies also observed that DMI was not affected by a 1× milking during early lactation (Rémond et al., 1999; Patton et al., 2006), so it can be inferred that feed efficiency

should have been less in cows managed under such a strategy compared with 2× milking. Neither the present study nor the aforementioned ones involved a long-term efficiency analysis. The reduced negative energy balance could lead to positive responses over the lifetime of the animal (Friggens et al., 2017).

The greater retained energy (i.e., EB), the greater BCS, and the greater BFT of cows milked 1× were a

Anexo III

consequence of a similar total feed intake coupled with a decreased milk yield during early lactation. In fact, the difference in EB between the groups during the treatment period is approximately the difference in NE_L for milk yield. Moreover, based on the results of whole lactation for BFT and BCS of cows milked 1×, most of the energy that exceeded the level required for milk synthesis was stored as reserves. During the post-treatment period, cows milked 1× had greater BCS (0.24 units) and greater BFT (2.2 mm), representing around 10 kg more in the reserves according to Schröder and Staufenbiel (2006). The greater BCS and BFT found in cows milked 1× could be favorable to current fertility and milk yield during the subsequent lactation (Gallo et al., 1996). For example, although we did not have convincing responses in reproductive performance because of the low number of animals that were used in the experiment, the tendency for reduction in the interval from calving to first luteal activity is consistent with the improvement in EB for 1× cows, as described by Lucy et al. (1992). Furthermore, Edwards (2018) described better reproductive performance in cows milked 1×, which he attributed to an increase in BCS, and an improved longer-term efficiency.

In our work, 1× milking did not prevent cows from mobilizing body reserves, which considering the positive energy balance of the cows, is consistent with the concept that mobilization of body tissues is genetically driven, as described by Friggens et al. (2007).

CONCLUSIONS

Primiparous dairy cows milked 1× for 8 wk after calving showed a lower milk yield during the current lactation than cows milked 2×. Milking frequency did not affect feed intake during early lactation and, as a consequence, cows milked 1× during the early lactation showed greater BCS and BFT at the end of lactation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank N. Amaro, G. Silva, A. Ferreira, M. Cabrera, E. Alfonso, E. Pietro, E. Olhagaray, and G. Ruprecht (Veterinary Faculty, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay); the staff from the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-La Estanzuela, Uruguay; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Programa de Proyectos Conjuntos de Investigación en el Mercosur program (Brasília, Brazil); the CAP-UdelaR (Comisión Académica de Posgrado from the Universidad de la

República) grant program; and H. M. N. Ribeiro Filho (Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brazil) for help in the experimental design and data analysis of DMI at pasture.

REFERENCES

- Agnew, R. E., T. Yan, W. J. McCaughey, J. D. McEvoy, D. C. Patterson, M. G. Porter, and W. R. J. Steen. 2005. Relationships between urea dilution measurements and body weight and composition of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:2476–2486.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Bargo, F., L. D. Muller, J. E. Delahoy, and T. W. Cassidy. 2002. Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85:2948–2963.
- Caja, G., M. Ayadi, and C. H. Knight. 2004. Changes in cisternal compartment based on stage of lactation and time since milk ejection in the udder of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2409–2415.
- Charton, C., H. Larroque, C. Robert-Granie, H. Leclerc, N. C. Friggens, and J. Guinard-Flament. 2016. Individual responses of dairy cows to a 24-hour milking interval. *J. Dairy Sci.* 99:3103–3112.
- Davis, S. R., V. C. Farr, J. A. P. Coperman, V. R. Carruthers, C. H. Knight, and K. Stelwagen. 1998. Partitioning of milk accumulation between cisternal and alveolar compartments of the bovine udder: Relationship to production loss during once daily milking. *J. Dairy Res.* 65:1–8.
- Delamaire, E., and J. Guinard-Flament. 2006. Longer milking intervals alter mammary epithelial permeability and the udder's ability to extract nutrients. *J. Dairy Sci.* 89:2007–2016.
- Dewhurst, R. J., and C. H. Knight. 1993. An investigation of the changes in sites of milk storage in the bovine udder over two lactations. *Anim. Prod.* 57:379–384.
- Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K. E. Leslie. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.* 92:571–580.
- Dutreuil, M., J. Guinard-Flament, M. Boutinaud, and C. Hurtaud. 2016. Effect of duration of milk accumulation in the udder on milk composition, especially on milk fat globule. *J. Dairy Sci.* 99:3934–3944.
- Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68–78.
- Edwards, J. P. 2018. Comparison of milk production and herd characteristics in New Zealand herds milked once or twice a day. *Anim. Prod. Sci.* 59:570–580.
- Friggens, N. C., P. Berg, P. Theilgaard, I. R. Korsgaard, K. L. Ingvarsen, P. Løvendahl, and J. Jensen. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation:

Anexo III

- Evidence of genetically driven body energy change. *J. Dairy Sci.* 90:5291–5305.
- Friggens, N. C., F. Blanc, D. P. Berry, and L. Puillet. 2017. Review: Deciphering animal robustness. A synthesis to facilitate its use in livestock breeding and management. *Animal* 11:2237–2251.
- Gallo, L., P. Carnier, M. Cassandro, R. Mantovani, L. Bailoni, B. Contiero, and G. Biltante. 1996. Change in body condition score of Holstein cows as affected by parity and mature equivalent milk yield. *J. Dairy Sci.* 79:1009–1015.
- Grala, T. M., C. V. C. Phyn, J. K. Kay, A. G. Rius, D. M. Littlejohn, R. G. Snell, and J. R. Roche. 2011. Temporary alterations to milking frequency, immediately post-calving, modified the expression of genes regulating milk synthesis and apoptosis in the bovine mammary gland. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 71:3–8.
- Grala, T. M., J. R. Roche, J. K. Kay, A. G. Rius, H. M. White, S. S. Donkin, M. D. Littlejohn, R. G. Snell, and C. V. C. Phyn. 2014. The expression of genes involved in hepatic metabolism is altered by temporary changes to milking frequency. *J. Dairy Sci.* 97:838–850.
- Haydock, K. P., and N. H. Shaw. 1975. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 15:663–670.
- Kaşıkçı, G., O. Çetin, E. B. Bingöl, and M. C. Gündüz. 2012. Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36:49–55.
- Kay, J. K., C. V. C. Phyn, A. G. Rius, S. R. Morgan, T. M. Grala, and J. R. Roche. 2013. Once-daily milking during a feed deficit decreases milk production but improves energy status in early lactating grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:6274–6284.
- Knight, C. H., and R. J. Dewhurst. 1994. Once daily milking of dairy cows: Relation between yield loss and cisternal milk storage. *J. Dairy Res.* 61:441–449.
- Knight, C. H., and C. J. Wilde. 1993. Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livest. Prod. Sci.* 35:3–19.
- Komaragiri, M. V. S., D. P. Casper, and R. A. Erdman. 1998. Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 2. Effect of dietary fat on mobilization of body fat and protein. *J. Dairy Sci.* 81:169–175.
- Komaragiri, M. V. S., and R. A. Erdman. 1997. Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 1. Effect of dietary protein on mobilization of body fat and protein. *J. Dairy Sci.* 80:929–937.
- Lacy-Hulbert, S. J., M. W. Woolford, G. D. Nicholas, C. G. Prosser, and K. Stelwagen. 1999. Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. *J. Dairy Sci.* 82:1232–1239.
- Lucy, M. C., C. R. Staples, W. W. Thatcher, P. S. Erickson, R. M. Cleale, J. L. Firkins, J. H. Clark, M. R. Murphy, and B. O. Brodie. 1992. Influence of diet composition, dry-matter intake, milk production and energy balance on time of postpartum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim. Prod.* 54:323–331.
- McNamara, S., J. J. Murphy, F. P. O'mara, M. Rath, and J. F. Mee. 2008. Effect of milking frequency in early lactation on energy metabolism, milk production and reproductive performance of dairy cows. *Livest. Sci.* 117:70–78.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing beakers or crucibles: A collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217–1240.
- Milner, P., K. L. Page, A. Walton, and J. E. Hillerton. 1996. Detection of clinical mastitis by changes in electrical conductivity of foremilk before visible changes in milk. *J. Dairy Sci.* 79:83–86.
- Morales Piñeyrúa, J. T., S. R. Fariña, and A. Mendoza. 2018. Effects of parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 191:9–21.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington DC.
- Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.* 93:546–554.
- Patton, J., D. A. Kenny, J. F. Mee, F. P. O'Mara, D. C. Wathes, M. Cook, and J. J. Murphy. 2006. Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1478–1487.
- Phyn, C. V. C., J. K. Kay, A. G. Rius, S. R. Morgan, C. J. Roach, T. M. Grala, and J. R. Roche. 2014. Temporary alterations to postpartum milking frequency affect whole-lactation milk production and the energy status of pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:6850–6868.
- Rémond, B., J. B. Coulon, M. Nicloux, and D. Leveux. 1999. Effect of temporary once-daily milking in early lactation on milk production and nutritional status of dairy cows. *Ann. Zootech.* 48:341–352.

Anexo IV

1 **Short communication: Serum concentrations of non-esterified fatty acids and β -**
2 **Hydroxybutyrate are poorly correlated with energy balance in primiparous dairy cows**
3 **during early lactation.** Capelesso

4

5 The objectives of this study were to investigate the relationship between energy balance
6 (EB), non-esterified fatty acids (NEFA) and β -Hydroxybutyrate (BHB) serum concentration
7 in primiparous dairy cows, during early lactation.

8 In conclusion, the concentrations of NEFA and BHB in serum of primiparous dairy cows
9 during early lactation were poorly correlated with EB

10

11 Running Head: ENERGY STATUS IN PRIMIPAROUS DAIRY COWS

12

13 **Short Communication: Serum concentrations of non-esterified fatty acids and β -**
14 **Hydroxybutyrate are poorly correlated with energy balance in primiparous dairy cows**
15 **during early lactation.**

16 A. Capelesso,*† G. Kozloski,† A. Mendoza,‡ N. Amaro, * J. L. Repetto,§ C. Cajarville*1

17

18 *Departamento de Nutrición Animal, Universidad de la República, Facultad de Veterinaria,
19 Ruta 1 km 42.5, San José, Uruguay

20 †Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul,
21 97105900, Brazil

22 ‡Programa de Producción de Leche, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta
23 50 km 11, 70002, Colonia, Uruguay

24 §Departamento de Producción de Bovinos, Universidad de la República, Facultad de
25 Veterinaria, Ruta 1 km 42.5, San José, Uruguay

26

27 ¹Corresponding author: Gilberto Kozloski. Departamento de Zootecnia, Universidade
28 Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil,
29 97105-900. E-mail. gilberto.kozloski@ufsm.br

Anexo IV

ABSTRACT

30
31 To investigate the relationship between energy balance (EB), non-esterified fatty acids
32 (NEFA) and β -Hydroxybutyrate (BHB) serum concentration during early lactation, 20
33 primiparous Holstein cows fed total mixed ration and allowed to graze an oat pasture were
34 assigned to either treatment once or twice-daily milking during the first 8 weeks of lactation.
35 Energy balance was estimated at week 1, 3, 4, 6 and 8 of lactation and blood samples were
36 collected from the jugular vein at week 1, 2, 3, 4, 6 and 8 of lactation. Linear relationship
37 between variables were developed and root mean square error (RMSE) was generated in
38 each association. The serum concentration of BHB increased linearly ($P < 0.05$, RMSE =
39 0.147) with increased concentrations of NEFA. The EB was linearly and negatively related
40 to both NEFA ($P < 0.05$, RMSE = 0.213) and BHB concentrations ($P < 0.05$, RMSE = 0.136).
41 In conclusion, the concentrations of NEFA and BHB in serum of primiparous dairy cows
42 during early lactation were poorly correlated with EB, raising a question on the reliability of
43 using either serum variable as a practice indicator of the nutritional status of dairy cows.

44

45 **Keywords:** blood metabolites, milking frequency, negative energetic balance

46

Short Communication

47
48 Under negative energy balance (NEB), dairy cows mobilize body reserves and there are
49 changes in the concentration of key blood metabolites. Adipose tissue mobilization leads to
50 an increase in the blood concentration of non-esterified fatty acids (NEFA) which are
51 partially oxidized to ketone bodies (i.e. acetoacetate and BHB) in the liver (Emery et al.
52 1992; Van Der Drift et al. 2012). Serum concentrations of NEFA and BHB are used as
53 indicative of tissue mobilization and ketosis, respectively (Duffield et al. 2009; Ospina et al.
54 2010). However, Overton et al. (2017) reported that BHB is the predominant ketone body in
55 the serum of cows, but the ratio of BHB to total ketone bodies decreases when the serum

Anexo IV

56 concentration of total ketone bodies increases, suggesting that BHB would not be the
57 predominant ketone body during severe negative energy balance. Furthermore, the serum
58 BHB concentration in ruminants is also a product of butyrate metabolism in the rumen
59 epithelium, and its blood concentration is also increased by infusing butyrate into the rumen
60 (Krehbiel et al. 1992). Therefore, increased BHB concentrations in serum of dairy cows can
61 also be the result of increased ingestion of starch-rich feedstuffs (Sutton et al. 1985; Duske
62 et al. 2009) or even due increased total feed intake (Bermingham et al., 2008; Zarrin et al.
63 2017). Thus, as serum concentration of BHB have been used in practice as an indicator of
64 the degree of NEB in dairy cows, the aim of our study was to evaluate the relationship
65 between energy balance (EB) and serum concentrations of NEFA and BHB during early
66 lactation of primiparous cows.

67 This trial was part of a larger experiment that evaluated the effect of reduced milking
68 frequency of primiparous dairy cows during early lactation. A more detailed description of
69 the cows, treatments, and experimental design was previously reported (Capelesso et al.
70 2019).

71 The experiment was approved by the Ethics Commission on the use of experimental
72 animals of the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), in Colonia,
73 Uruguay (Protocol 2015.42). Twenty primiparous Holstein-Friesian cows were selected two
74 weeks before the expected date of calving and blocked according to calving date, body
75 weight (BW; 605 ± 67.2 kg, mean \pm standard deviation), backfat thickness (3.6 ± 1.49 cm),
76 and body condition score (3.6 ± 0.29 , in a 1 to 5 point-scale, Edmonson et al. 1989), and
77 assigned to either treatment once or twice-daily milking up to the week 8 of lactation. The
78 cows were milked at 0600 h or at 0600 h and 1700 h for once and twice-daily milking,
79 respectively. During the afternoon milking, the cows milked once a day did not enter the
80 milking parlor and were kept in a paddock without access to food or water. All cows received
81 the same diet throughout the experiment. Before calving (-28 d), the cows were fed total

Anexo IV

82 mixed ration (TMR), formulated to meet the requirements of heifers weighing 590 kg (NRC,
83 2001). In the postpartum period, the diet was formulated to meet the requirements of cows
84 weighing 520 kg and producing 30 kg of milk per day. Seventy percent of the estimated DM
85 intake (NRC, 2001) was individually offered as TMR (approximately 15.2 ± 1.2 kg of
86 DM/cow per day) after the morning milking. After the afternoon milking, all cows grazed
87 an oat (*Avena sativa L.*, var. INIA Halley) pasture with a paddock size adjusted to provide
88 12 kg of DM/cow per day. Intake of pasture and TMR was measured at week 1, 3, 4, 6 and
89 8 of lactation for 3 consecutive days per week. The intake of TMR was determined
90 individually by weighing the amount offered and refused once daily. Pasture intake was
91 estimated as the difference between pre- and post-grazing forage mass (Haydock and Shaw,
92 1975). Forage mass was estimated using an automatic rising plate meter (Filip's Manual
93 Folding Plate Meter, New Zealand). Total DMI was calculated as the sum of pasture and
94 TMR intake. Feed samples of pasture and TMR were collected during DMI measurement.
95 Samples were dried in a forced-air oven at 60°C for 72 h, ground to pass through a 1 mm
96 screen, and 1 composite sample of TMR and pasture per week was obtained by mixing equal
97 DM amounts from each subsample. Detailed description of diet ingredients and chemical
98 composition were previously presented by Capelesso et al. (2019). Individual milk yield was
99 recorded automatically at each milking, using DairyPlan C21 (GEA Farm Technologies,
100 Düsseldorf, Germany). Individual milk samples were collected in consecutive milkings,
101 twice per week, for analysis of fat, protein, casein and lactose by infrared spectroscopy
102 analysis (Bentley Model 2000, Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). The net energy of
103 lactation (NEL) concentration of the diets was calculated based on chemical composition
104 analyses, DMI, and individual characteristics of cows during the trial period according to
105 NRC (2001). Energy balance (EB) was estimated at week 1, 3, 4, 6, and 8 of lactation using
106 information from each animal, as $EB \text{ (Mcal of NEL/d)} = \text{energy intake (Mcal of NEL/d)}$
107 $[\text{maintenance requirement (Mcal of NEL/d)} + \text{growth requirement (Mcal of NEL/d)} +$

Anexo IV

108 lactation requirement (milk NEL output, Mcal/d)]. A total walking distance between the
109 milking parlor and the grazing paddock of 1,000 m/d was considered for the estimates.
110 Energy intake was calculated as $DMI \times NEL$ concentration in the diet (Mcal/kg of DM).
111 Maintenance requirement was calculated as $0.08 \times BW^{0.7}$. Growth requirement was
112 calculated as $0.0635 \times$ equivalent empty BW, $kg^{0.75} \times$ empty BW gain, $kg/d^{1.097}$. Lactation
113 requirements (milk NEL output, Mcal/d) were calculated using the average milk
114 composition in each week as milk NEL output, $Mcal/d = (0.0929 \times$ kg of fat per day) +
115 $(0.0547 \times$ kg of protein per day) + $(0.0395 \times$ kg of lactose per day). Blood samples were
116 collected from the jugular vein, in tubes without anticoagulant, at weeks 1, 2, 3, 4, 6 and 8
117 of lactation. The samples were kept at room temperature for 1 h, placed in a refrigerator at
118 $4^{\circ}C$ for 2 h, and centrifuged ($834 \times g$, for 10 min at $20^{\circ}C$) and stored at $20^{\circ}C$ until analysis.
119 The serum concentrations of NEFA and BHB were analyzed with respective the commercial
120 kits: Wako NEFA-HR(2), Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan, and D-3-
121 hydroxybutyrate, Randox Laboratories, Crumlin, United Kingdom. The intra- and inter-
122 assay coefficients of variation of all determinations were equal or less than 6.5%. The linear
123 relationship between variables was analyzed with the PROC MIXED procedure of SAS
124 (version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC) using a variance-covariance model in which the
125 milking frequency (once or twice-daily) was included as a fixed effect. This analysis
126 generated a root mean square error (RMSE) of the linear relationship, an index of how
127 accurately the equation predicts the dependent (i.e. Y) based on independent (i.e. X) values.

128 The serum concentration of BHB increased linearly ($P < 0.05$, $RMSE = 0.147$) with
129 increased concentrations of NEFA (Figure 1A). The EB (mean = 1.61, $SEM = 0.044$ Mcal
130 of NEL/d) was linearly and negatively related to both NEFA ($P < 0.05$, mean = 0.71, SEM
131 $= 0.030$ mmol/L, $RMSE = 0.213$, Figure 1B) and BHB concentration ($P < 0.05$, mean = 0.34,
132 $SEM = 0.022$ mmol/L, $RMSE = 0.136$, Figure 1C). The $RMSE$ of the prediction of BHB
133 based on NEFA concentration represented, on average, approximately 43% of the mean

Anexo IV

134 BHB concentration, suggesting that increased concentrations of BHB were not direct
135 consequence of increased concentrations of NEFA. Similarly, in a study with 269
136 multiparous dairy cows, McCarthy et al. (2015) found low correlation between NEFA and
137 BHB ($r = 0.26$) concentrations during early lactation. In the same way, the RMSE of the
138 prediction of NEFA or BHB concentration based on EB values, represented approximately
139 30% and 40% of the mean NEFA or BHB values, respectively. Despite the increase of NEFA
140 and BHB concentration during early lactation have usually been related to mobilization of
141 body fat (Van Der Drift et al. 2012; Barletta et al. 2017; Gärtner et al. 2019), in the present
142 study, even some cows with positive EB had high levels of NEFA and BHB (Figure 1B and
143 C). The impact of diet on tissue mobilization in cows during the early lactation has been
144 consistently reported (Komaragiri and Erdman 1998; Komaragiri et al. 1998). However,
145 tissue mobilization by these cows might be also a genetically driven process, independent of
146 energy or protein status (Friggens et al. 2007; Weber et al. 2013).

147 In conclusion, the concentrations of NEFA and BHB in serum of primiparous dairy cows
148 during early lactation were poorly correlated with EB, raising a question on the reliability of
149 using either serum variable as a practice indicator of the nutritional status of dairy cows.

150

151

ACKNOWLEDGMENTS

152 The authors thank G. Silva, A. Ferreira, M. Cabrera, E. Alfonso, E. Pietro, E. Olhagaray,
153 and G. Ruprecht (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo,
154 Uruguay); the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES,
155 Brasília, Brazil) and the CAP-UdelaR (Comisión Académica de Posgrado from the
156 Universidad de la República) for scholarship support.

- 158 Barletta, R.V., M. Maturana Filho, P. D. Carvalho, T. A. Del Valle, A. S. Netto, F. P. Rennó,
159 R. D. Mingoti, J. R. Gandra, G. B. Mourão, P. M. Fricke, R. Sartori, E. H. Madureira, and
160 M. C. Wiltbank. 2017. Association of changes among body condition score during the
161 transition period with NEFA and BHB concentrations, milk production, fertility, and
162 health of Holstein cows. *Theriogenology*. 104:30-36.
- 163 Bermingham, E. N., P. Nozière, J. Vernet, H. Lapierre, S. Léger, D. Sauvant, and I. Ortigues-
164 Marty. 2008. The relationships between intake and net portal fluxes of energy metabolites
165 in ruminants: A meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 143:27-58.
- 166 Capelesso, A., G. Kozloski, A. Mendoza, M. Pla, J. L. Repetto, and C. Cajarville. 2019.
167 Reducing milking frequency in early lactation improved the energy status but reduced
168 milk yield during the whole lactation of primiparous Holstein cows consuming a total
169 mixed ration and pasture. *J. Dairy Sci.* 102:8919-8930.
- 170 Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K.E. Leslie. 2009. Impact of
171 hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.*
172 92:571-580.
- 173 Duske, K., H. M. Hammon, A. K. Langhof, O. Bellmann, B. Losand, K. Nurnberg, G.
174 Nurnberg, H. Sauerwein, M. H. Seyfet, and C. C. Metges. 2009. Metabolism and lactation
175 performance in dairy cows fed a diet containing rumen-protected fat during the last twelve
176 weeks of gestation. *J. Dairy Sci.* 92:1670-1684.
- 177 Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition
178 scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.
- 179 Emery, R.S., J. S. Liesman, and T. H. Herdt. 1992. Metabolism of long chain fatty acids by
180 ruminant liver. *J. Nutr.* 122:832-837.
- 181 Friggens, N. C., P. Berg, P. Theilgaard, I. R. Korsgaard, K. L. Ingvarsten, P. Løvendahl, and
182 J. Jensen. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation:
183 evidence of genetically driven body energy change. *J. Dairy Sci.* 90:5291-5305.
- 184 Gärtner, T., E. Gernand, J. Gottschalk, and K. Donat. 2019. Relationships between body
185 condition, body condition loss, and serum metabolites during the transition period in
186 primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 102:9187-9199.
- 187 Haydock, K. P., and N. H. Shaw. 1975. The comparative yield method for estimating dry
188 matter yield of pasture. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husbandry*. 15:663-670.

Anexo IV

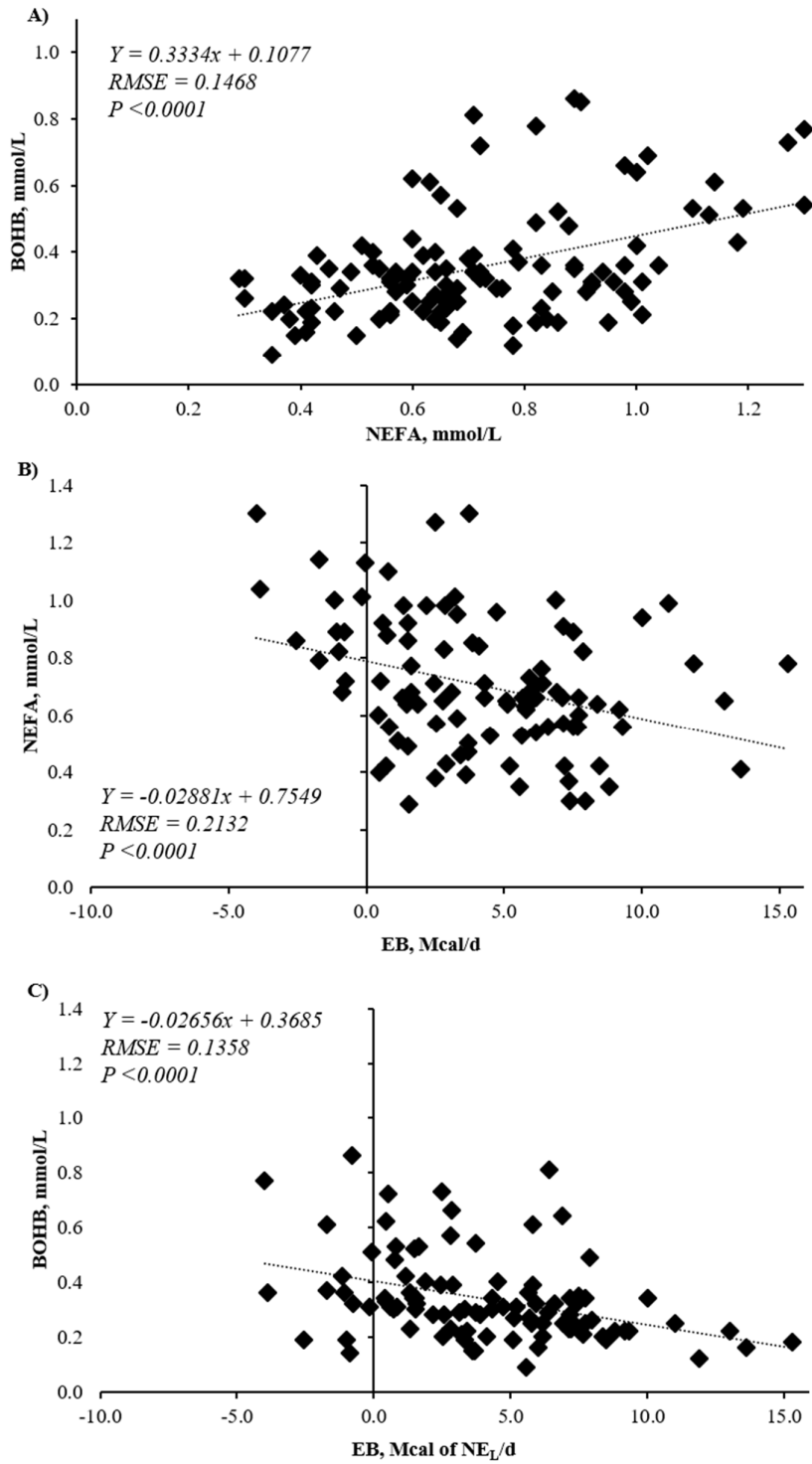
- 189 Komaragiri, M. V. S., and R. A. Erdman. 1998. Factors affecting body tissue mobilization in
190 early lactation dairy cows. 1. Effect of dietary protein on mobilization of body fat and
191 protein. *J. Anim. Sci.* 80:929-937.
- 192 Komaragiri, M. V. S., D. P. Casper, and R. A. Erdman. 1998. Factors affecting body tissue
193 mobilization in early lactation dairy cows. 2. Effect of dietary fat on mobilization of body
194 fat and protein. *J. Anim. Sci.* 81:169-175.
- 195 Krehbiel, C.R., D. L. Harmon, and J. E. Schnieder. 1992. Effect of increasing ruminal
196 butyrate on portal and hepatic nutrient flux in steers. *J. Dairy Sci.* 70:904-914.
- 197 McCarthy, M.M., S. Mann, D. V. Nydam, T. R. Overton, and J. A. A. McArt. 2015.
198 Concentrations of nonesterified fatty acids and B-hydroxybutyrate in dairy cows are not
199 well correlated during the transition period. *J. Dairy Sci.* 98:6284-6290.
- 200 National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl.
201 Acad. Press, Washington DC.
- 202 Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Evaluation of nonesterified
203 fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United
204 States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci.* 93:546-554.
- 205 Overton, T. R., J. A. A. McArt, and D. V. Nydam. 2017. A 100-year review. metabolic health
206 indicators and management of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100:10398-10417.
- 207 Sutton, J. D. 1985. Digestion and absorption of energy substrates in the lactating cow. *J.*
208 *Dairy Sci.* 68:3376-3393.
- 209 Van Der Drift, S. G. A., M. Houweling, J. T. Schonewille, A. G. M. Tielens, and R. Jorritsma.
210 2012. Protein and fat mobilization and associations with serum β -hydroxybutyrate
211 concentrations in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:4911-4920.
- 212 Weber, C., C. Hametner, A. Tuchscherer, B. Losand, E. Kanitz, W. Otten, H. Sauerwein, R.
213 M. Bruckmaier, F. Becker, W. Kanitz, and H. M Hammon. 2013. Hepatic gene expression
214 involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effect on fat mobilization
215 during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. *J. Dairy*
216 *Sci.* 96:5670-5681.
- 217 Zarrin, M., L. Grossen-Rösti, R. M. Bruckmaier, and J. J. Gross. 2017. Elevation of blood
218 β -hydroxybutyrate concentration affects glucose metabolism in dairy cows before and
219 after parturition. *J. Dairy Sci.* 100:2323-2333.

Anexo IV

220 **Figure 1.** Relationship between blood metabolites (non-esterified fatty acids (NEFA) and β -
221 hydroxybutyrate (BHB), mmol/L) and energy balance (EB, Mcal of net energy of
222 lactation/day) in primiparous dairy cows during the first 8 weeks of lactation. A) NEFA vs.
223 BHB (n = 115). B) NEFA vs. EB (n = 98). C) BHB vs. EB (n = 98). RMSE, root mean
224 square error.

Anexo IV

225 Capelesso. Figure 1.



226