

Estudio inicial del contenido y patrón de alcanos en especies forrajeras con diferente nivel de preferencia por los ovinos en la estepa patagónica, Santa Cruz, Argentina

Initial study of the content and pattern of alkanes in forage species with different level of preference by sheep in the patagonian steppe, Santa Cruz, Argentina

Cesa, A.^{1,3} y Bakker, M.²

¹Área de Producción Animal, INTA, EEA, Santa Cruz, Argentina. ³Universidad Nacional de la Patagonia Austral, Unidad Académica Río Gallegos. E-mail: acesa@correo.inta.gov.ar

²Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina. E-mail: bakker@vet.unicen.edu.ar

Resumen

La estimación de la composición de la dieta y el consumo de forraje en ovinos en pastoreo extensivo es un tema de gran importancia para el mejoramiento continuo de los sistemas de asignación de carga. La técnica microhistológica puede complementarse con el método de los *n*-alcanos para una estimación cuantitativa del consumo. En las estepas gramíneas y gramíneo-arbustiva de la zona sur de Santa Cruz, Argentina, se recolectaron 10 especies de forrajeras, comprendiendo gramíneas cortas (estrato intercoironal) y altas (estrato coironal), hierbas y un arbusto, que difieren en el nivel de preferencia por los ovinos. Se analizó el contenido y patrón de *n*-alcanos impares (C₂₃-C₃₅) en planta entera o distintas partes de planta en las gramíneas (hojas vivas, secas y espigas) y el arbusto (brotes del año, hojas, leño y flores). Se observó un alto contenido total de *n*-alcanos (~250-6000 mg/kgMS) con una alta proporción de C₂₉ (~40-85% del total) en casi todas las especies, y diferencias marcadas en el patrón de *n*-alcanos entre la mayoría de las especies, y aún entre partes vegetativas y reproductivas. Estos resultados preliminares indican un horizonte promisorio para la aplicación del método de los *n*-alcanos para estimar la composición de la dieta y el consumo en los ovinos de esta región.

Palabras clave: alcanos, intercoironal, coironal, arbustos, estepa Patagónica.

Abstract

The estimation of diet composition and forage intake in sheep under extensive grazing is a subject of great importance for the continuous improvement of grazing systems with stocking rate assignment. The microhistological technique may be complemented with the *n*-alkanes method for a quantitative estimation of the intake. Ten forage species were collected from the graminaceous and graminaceous-shrubby steppes of the southern part of Santa Cruz, Argentina, comprising short (intercoironal stratum) and tall (coironal stratum) grasses, herbs and a shrub, with different level of preference by sheep. The content and pattern of odd *n*-alkanes (C₂₃-C₃₅) were analysed in whole plant or different plant parts in grasses (live leaf, dead leaf and spikes) and the shrub (one-year bud, leaves, wood, flowers). In most species, the total content of *n*-alkanes was high (~250-6000 mg/kgMS) with a high proportion of C₂₉ (40-85% of total), and there were marked differences in the pattern of *n*-alkanes among species and, further, between vegetative and reproductive plant parts. These results encourage the use of the *n*-alkanes method for the estimation of diet composition and intake in the sheep of this region.

Key words: alkanes, intercoironal, coironal, shrubs, Patagonian steppe.

Introducción

La estimación de la composición de la dieta y el consumo de forraje en ovinos en pastoreo extensivo es un tema de gran importancia para el mejoramiento continuo de los sistemas de asignación de carga. En las estepas gramíneas y gramíneo-arbustiva de la zona sur de Santa Cruz, Argentina, las especies forrajeras que integran el estrato intercoironal (gramíneas cortas y hierbas), el coironal (gramíneas altas), y los arbustos, difieren en el nivel de preferencia por los ovinos, mientras que el desarrollo de los métodos de evaluación de los pastizales de la zona se ha basado solamente en la determinación de la biomasa del intercoironal, dominado por gramíneas cortas como *Poa duseinii* (.). El estudio cualitativo de la composición de la dieta con la técnica microhistológica puede complementarse con el método de los *n*-alcanos para generar las bases para una estimación cuantitativa del consumo (Mayes y Dove, 2000).

Los *n*-alcanos son compuestos que están presentes en la cutícula cerosa de la parte aérea de las plantas, junto con alcoholes, cetonas y ésteres, incluyendo además triterpenoides, esteroides y flavonoides en

menor cantidad, y las características físicoquímicas de la cera cuticular determinan funciones vitales para las plantas como la reducción de la pérdida de agua no estomática, reducción del depósito de polvo, polen y contaminantes ambientales, protección contra la radiación ultravioleta, bacterias y hongos, y participación en una variedad de interacciones con los insectos (Post-Beittenmiller, 1996; Kunst y Samuels, 2003).

Los *n*-alcanos más abundantes en la mayoría de las plantas superiores son los de cadena larga y número impar de carbonos, en el rango de C₂₃ a C₃₅, y tanto el contenido como la proporción de los mismos o “patrón de *n*-alcanos” pueden diferir marcadamente entre distintas especies de plantas, aunque también se han observado importantes diferencias en el contenido y patrón de *n*-alcanos entre distintas partes morfológicas de una misma planta, y variaciones relacionadas con la edad, el desarrollo, y las condiciones ambientales (Dove y Mayes, 1991; Dove y Mayes, 1996; Dove et al., 1996; Chen et al., 1998; Piasentier et al., 2000; Alvarado et al., 2001 (a y b); Bakker et al., 2001; Smith et al., 2001; Zhang et al., 2004; Lee y Nolan, 2003; Bakker y Alvarado, 2006). Los *n*-alcanos de cadena larga son prácticamente indigestibles para la mayoría de los mamíferos herbívoros, y se excretan cuantitativamente en las heces, de manera que el contenido y el patrón de *n*-alcanos de las plantas y de las heces permiten estimar el consumo y las proporciones de distintas especies y partes de plantas en la dieta de los animales que las ingieren, técnica conocida como “método de los *n*-alcanos” (Mayes y Dove, 2000).

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio inicial del contenido y patrón de *n*-alcanos en una selección de especies forrajeras del intercoironal, coironal, y un arbusto de la estepa patagónica de la provincia de Santa Cruz, Argentina, con el propósito de evaluar los alcances del método de los *n*-alcanos para estimar la composición de la dieta y el consumo de forraje en los ovinos. En el caso particular del arbusto, es de gran interés poder diferenciar entre las partes de planta, dado que los ovinos consumen el brote del año en forma diferencial. Los resultados que se presentan en este trabajo son originales y muestran los primeros valores de alcanos conocidos para estas especies en esta región.

Materiales y Métodos

Se seleccionaron en una primera etapa 9 especies, que fueron recolectadas en distintos sitios de la zona sur de la provincia de Santa Cruz (Figura 1) en el mes de noviembre del 2006, posteriormente se agregó otra especie de gramínea, resultando un total de 10 especies. Las especies corresponden a la estepa Magallánica (Oliva et al., 2001), dominada por *Festuca gracilima*, y caracterizada por formar una matriz de coirones (*Festuca gracilima* y *Stipa crisophyla*) con espacios intercoironales ocupados por gramíneas cortas y hierbas, dominado por *Poa dusenii*. Por otra parte, la estepa magallánica se relaciona con el matorral de un arbusto denominado “mata negra” (*Junellia tridens*), dado que no existe un límite neto entre ambas, sino que el arbusto avanza en forma de lenguas en la estepa, en la zona sur de la provincia. La última especie recolectada corresponde al pastizal subandino, pero está presente en las zonas más secas de los mallines (áreas bajas con mayor humedad o periféricas a los ríos).

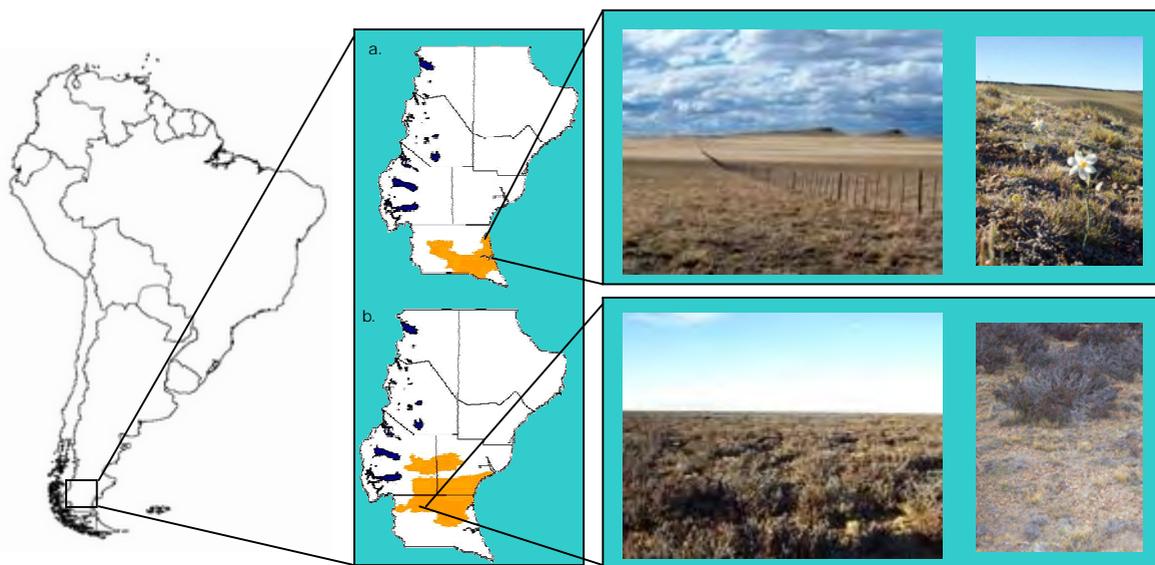


Figura 1. Distribución y fisonomía de la estepa Magallánica (a) y de la mata negra (*Junellia tridens*) (b)

Las especies seleccionadas fueron: *Poa dusenii* (gramínea intercoironal), *Rhytidosperra virescens* (gramínea intercoironal), *Carex andina* (graminoide intercoironal), *Hordeum comosum* (gramínea intercoironal), *Festuca pirogea* (gramínea intercoironal), *Festuca gracilima* (gramínea coironal), *Festuca pallascens* (gramínea coironal, pastizal subandino), *Stipa crisophyla* (gramínea coironal), *Lathyrus magellanicus* (leguminosa intercoironal) y *Junellia tridens* (arbusto-matorral de mata negra). Las muestras de las especies fueron recolectadas en cercanías de la localidad de Río Gallegos, y a 100 km, en el campo experimental Potrok Aike (51° 55' LS y 70° 25' LO), en forma manual, y acondicionadas en un contenedor refrigerado hasta el sitio donde se realizó el análisis (FCV, Tandil). En todos los casos se recolectó solo la parte aérea, eliminando si fuera necesario las raíces.

Las gramíneas fueron separadas en hojas verdes, hojas secas y espigas, si estaban presentes. La única hierba (*Lathyrus magellanica*), dada su estructura, no fue separada en partes de planta. El arbusto fue separado en brotes del año, flores y ramas, y las ramas fueron separadas a su vez en hojas y leño. Las muestras separadas se secaron en estufa a 65 °C y luego se molieron con un molinillo eléctrico. De cada muestra molida, una alícuota (~0,10-0,75 g, según muestra) se pesó en un tubo de borosilicato para la extracción de *n*-alcanos, y otra alícuota (~1 g) se pesó en un crisol para determinar el contenido de materia seca (MS). La extracción y purificación de los *n*-alcanos se realizó según el método de Mayes et al. (1986), con las modificaciones que se presentan en detalle en Hatt et al. (2002).

El análisis de los *n*-alcanos se realizó mediante cromatografía gas-líquido capilar con un equipo HP 6890 con inyector automático y detector de ionización de llama. Se usó una columna DB-1 (J&W) (15 m x 0,53 mm d.i., 1 µm de espesor del film) y helio como gas portador a 10 ml/min con flujo constante. El extracto purificado se rediluyó en 400 µl de *n*-heptano (MERCK) y se inyectaron 0,5 µl, sin división de flujo. Las condiciones de corrida cromatográfica y la validación del método cromatográfico se presentan en detalle en Bakker y Alvarado (2006). Se cuantificaron solo los *n*-alcanos con número impar de carbonos desde C₂₃ hasta C₃₅.

Resultados y Discusión

Los resultados muestran importantes diferencias en el contenido y patrón de *n*-alcanos entre las distintas especies, e incluso entre distintas partes de planta dentro de la misma especie. El contenido de *n*-alcanos (mg/kg MS) se muestra en la Tabla 1. En general, en todas las especies se observó un alto contenido total de *n*-alcanos (suma de todos los *n*-alcanos cuantificados) en comparación con los valores publicados para numerosas especies forrajeras de origen templado y tropical (Dove y Mayes, 1991; Alvarado, 2001). Fue muy notable el alto contenido total de *n*-alcanos en *Junellia tridens* (~500-6000 mg/kgMS), *Rhytidosperra virescens* (~3100 mg/kgMS), *Poa dusenii* (~2400-3200 mg/kgMS), *Stipa crisophyla* (~1400-1800 mg/kgMS) y *Festuca pirogea* (~1100-2000 mg/kgMS).

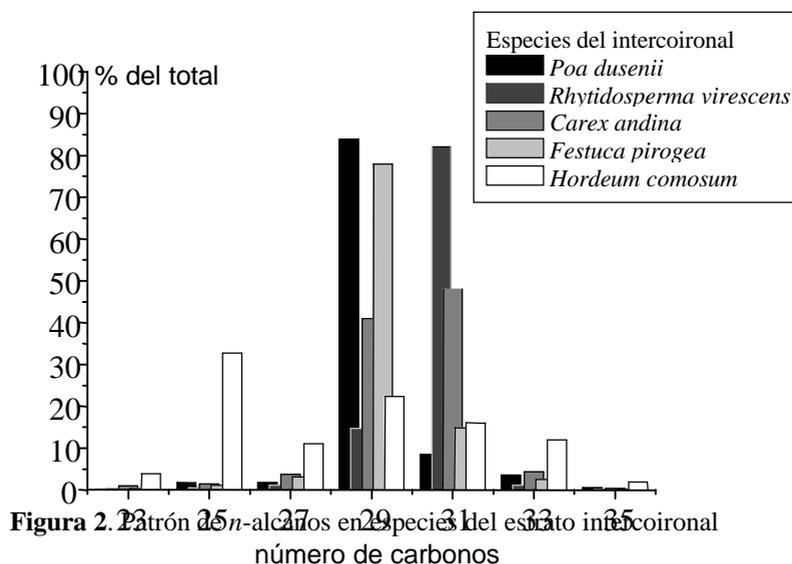
Las hojas secas de las gramíneas tuvieron un contenido total de *n*-alcanos semejante o levemente mayor que las hojas verdes en *Poa dusenii*, *Festuca pirogea* y *Stipa crisophyla*, en forma similar a lo observado en *Lolium perenne* (Bakker et al., 2001), en cambio, en *Festuca gracilima* y *Festuca pallascens* se observó lo contrario. En *Junellia tridens*, el mayor contenido total de *n*-alcanos estuvo en las hojas (~6000 mg/kgMS), seguido por las flores (~3200 mg/kgMS) y los brotes del año (~2200 mg/kgMS). Todas las especies de gramíneas presentaron un alto contenido de C₂₉ en comparación con los valores publicados para gramíneas de zonas templadas y húmedas de varias partes del mundo (Dove y Mayes, 1991; Alvarado, 2001). En comparación con otras especies del mismo género, los contenidos de *n*-alcanos observados en *Festuca gracilima* y *F. pallascens* se asemejan al de *Festuca arundinacea* (Alvarado et al. 2001a), pero *Festuca pirogea* tiene un contenido de *n*-alcanos de un orden de magnitud superior. En el caso del *Hordeum comosum*, la gramínea más mesofítica dentro del grupo de especies analizadas, se observó que el contenido de *n*-alcanos se asemeja al del *Hordeum vulgare* procedente de Sudán, que fue informado por Ali et al. (2005).

En general, en todas las gramíneas analizadas, con excepción de *Hordeum comosum* y *Rhytidosperra virescens*, se destacó la elevada proporción de C₂₉ (40-85% del total), lo cual es una característica inusual, ya que en la mayoría de las gramíneas de origen templado y tropical predominan normalmente el C₃₁ y C₃₃, y el C₂₉ es muy abundante solamente en las leguminosas (Dove y Mayes, 1991; Alvarado, 2001c). *Hordeum comosum* y *Rhytidosperra virescens* tuvieron una elevada proporción de C₂₅ (30%) y C₃₁ (80%), respectivamente. Se observaron diferencias marcadas en el patrón de *n*-alcanos entre las especies que integran el estrato intercoironal (Figura 2). La especie más contrastante dentro de este grupo fue *Hordeum comosum*, que tuvo mayores proporciones de C₂₅ y C₂₇ y menores proporciones de los *n*-alcanos con mayor número de carbonos que el resto de las especies. Por otro lado, *Poa dusenii* y *Festuca pirogea* se diferenciaron de *Rhytidosperra virescens* y *Carex andina* por tener una mayor proporción de C₂₉ en relación a C₃₁ (C₂₉>C₃₁), mientras que en estas dos últimas especies ocurre lo contrario (C₂₉<C₃₁). Dado que estas especies participan en la dieta de los ovinos en distinto grado (Pelliza et al., 1997; Cesa y Suárez, en prensa),

este resultado es muy alentador para la aplicación del método de los *n*-alcanos en el estudio cuantitativo de la composición de la dieta.

Tabla 1. Contenido de *n*-alcanos de número impar de carbonos en una selección de especies forrajeras de la estepa patagónica, Santa Cruz, Argentina (se indica el estrato al cual pertenece la especie)

estrato	especie y parte de planta	contenido de <i>n</i> -alcanos (mg/KgMS)							Total
		C ₂₃	C ₂₅	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₁	C ₃₃	C ₃₅	
intercoironal	<i>Poa duseonii</i> hojas verdes	2,1	40,5	41,5	2035	205	86,1	12,9	2424
	<i>Poa duseonii</i> hojas secas	4,2	54,5	55,1	2587	363	129	23,1	3217
	<i>Poa duseonii</i> espigas	31,7	77,6	187	1909	394	92,3	8,0	2701
	<i>Festuca pirogea</i> hojas verdes	5,1	18,7	49,0	1224	232	39,3	2,2	1571
	<i>Festuca pirogea</i> hojas secas	4,6	22,0	54,2	1568	307	56,0	3,4	2017
	<i>Festuca pirogea</i> espigas	12,0	79,5	135	619	216	15,4	1,8	1079
	<i>Hordeum comosum</i> hojas verdes	12,2	102	34,4	70,0	50,0	37,5	5,8	312
	<i>Rhynchospora virescens</i> hojas verdes	13,5	14,2	36,4	461	2576	36,0	1,1	3140
	<i>Carex andina</i> planta entera	6,0	8,4	21,7	240	280	25,5	2,1	583
	<i>Lathyrus magellanicus</i> planta entera	2,9	23,0	95,1	182	64,2	9,1	1,5	378
coironal	<i>Stipa crisophylla</i> hojas verdes	5,8	10,3	113	1073	158	17,5	2,8	1381
	<i>Stipa crisophylla</i> hojas secas	7,5	18,9	120	1158	250	32,7	5,6	1593
	<i>Stipa crisophylla</i> espigas	98,6	87,6	207	1252	89,9	12,6	4,7	1754
	<i>Festuca gracilima</i> hojas verdes	5,9	21,9	29,8	123	72,1	34,4	7,1	294
	<i>Festuca gracilima</i> hojas secas	2,4	10,6	22,3	109	65,3	29,0	5,2	244
	<i>Festuca pallescens</i> no pastoreada hojas verdes	3,5	19,0	35,8	219	68,7	21,9	5,0	374
	<i>Festuca pallescens</i> pastoreada hojas verdes	5,3	19,7	69,6	414	88,2	35,1	8,0	640
	<i>Festuca pallescens</i> pastoreada hojas secas	1,6	7,8	29,8	238	52,9	17,4	4,8	352
arbustivo	<i>Junellia tridens</i> brotes del año	5,7	6,8	93,5	746	767	529	21,7	2170
	<i>Junellia tridens</i> hojas	20,3	12,2	263	1484	2215	1836	69,8	5903
	<i>Junellia tridens</i> leño	5,7	6,8	93,2	746	767	529	21,7	2170
	<i>Junellia tridens</i> flores	119	110	276	1414	561	658	44,6	3186



No se observaron diferencias marcadas entre las especies de gramíneas que integran el estrato de coirones (Figura 3). Si bien las dos especies de *Festuca* tuvieron un patrón de *n*-alcanos muy semejante entre sí, *Stipa crisophylla* tuvo una mayor proporción de C₂₉ y menor proporción de C₃₁ en comparación con las *Festucas*. Si se comparan las dos especies de *Festuca* del estrato coironal con la *Festuca pirogea* del estrato intercoironal, se observa que esta última parece tener una mayor proporción de C₂₉ y menor proporción de

C₃₁. Sería de interés poder diferenciar entre las especies de *Festuca*, ya que con la técnica microhistológica, actualmente no pueden ser diferenciadas (Pelliza, comunicación personal).

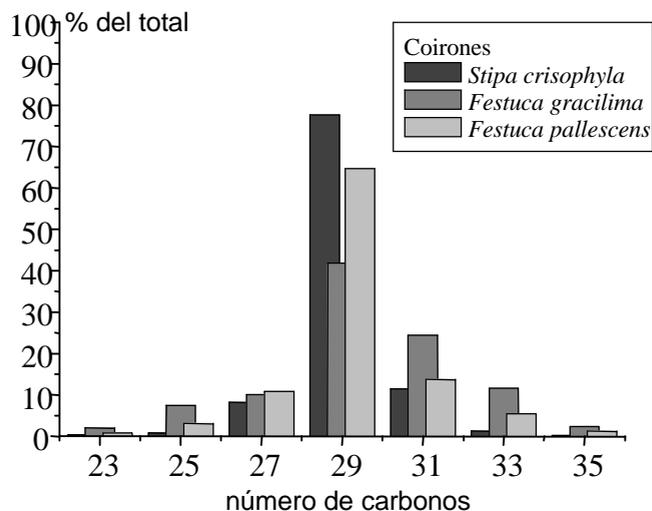


Figura 3. Patrón de n-alcenos en especies de gramíneas del estrato coironal

Se observaron algunas diferencias en el patrón de n-alcenos entre distintas partes de planta dentro de la misma especie, pero las mismas no fueron tan marcadas como el observado entre las distintas especies. En *Junellia tridens*, las flores tuvieron una mayor proporción de C₂₉ y C₂₇ y menor proporción de C₃₁ y C₃₃ que el resto de las partes de planta, pero no hubo diferencias marcadas entre brotes, hojas y leño (Figura 4, a). En las especies de gramíneas, las espigas tuvieron una mayor proporción de C₂₃, C₂₅ y C₂₇ y menores proporciones de los n-alcenos con mayor número de carbonos, pero no hubo diferencias marcadas entre hojas vivas y secas (Figura 4, b).

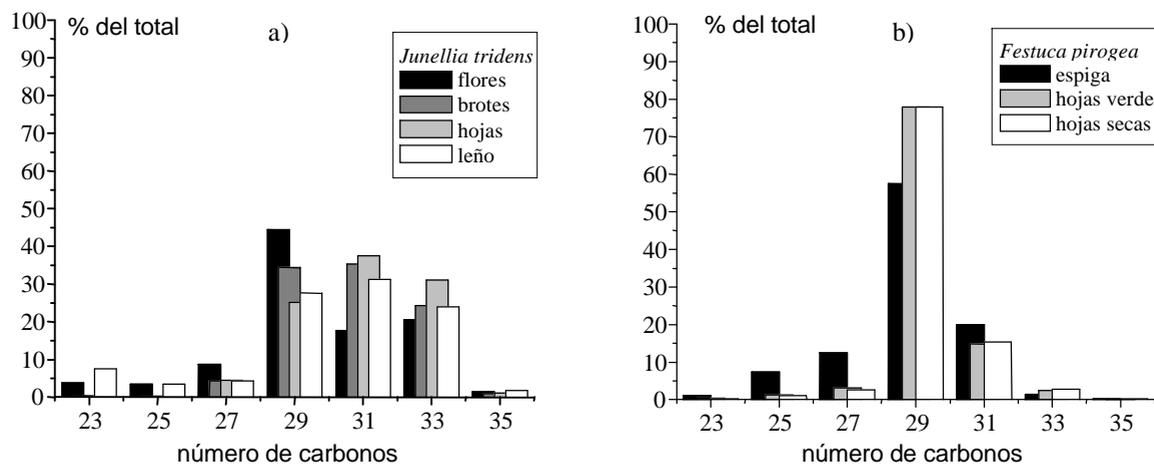


Figura 4. Patrón de n-alcenos en distintas partes de planta de a) *Junellia tridens* y b) *Festuca pirogea*

En la Figura 5 se contrastan los patrones de n-alcenos de algunas especies del estrato intercoironal, como las gramíneas *Poa Dusenii* y *Hordeum comosum* y la hierba *Lathyrus magellanicus*, que son preferidas por los ovinos, con gramíneas del estrato coironal, como *Stipa crisophyla* y *Festuca gracilima*, que son consumidas casi exclusivamente en invierno, y los brotes del año de *Junellia tridens*, que son consumidos en primavera o en los inviernos muy duros. Se puede observar que las especies del estrato intercoironal tienen patrones de n-alcenos muy contrastantes con aquellos de las especies del estrato coironal, particularmente *Hordeum comosum* y *Lathyrus magellanicus* y, por lo tanto, existiría una buena posibilidad de discriminar

entre ambos estratos y también entre especies dentro de cada estrato, aunque para el caso del coironal, como ya se mostró anteriormente en la Figura 3, esta posibilidad esté más restringida.

Los brotes del año de *Junellia tridens* tienen un patrón de *n*-alcanos que puede resultar contrastante con el resto de las especies, ya que poseen mayores proporciones de C_{31} y C_{33} y menores proporciones de los *n*-alcanos de menor número de carbonos, por lo tanto, existiría también la posibilidad de discriminar este componente, particularmente de las especies del intercoironal. La discriminación entre especies dentro de cada estrato es un aspecto muy relevante para la estimación del consumo con el método de los *n*-alcanos, en la medida en que el contenido del *n*-alcano que se utiliza para estimar el consumo difiera mucho entre las especies dentro de cada grupo de especies que puede ser discriminado. Por esta razón es necesario seguir avanzando en esta metodología, y explorar la posibilidad de agregarle a los alcanos otros marcadores naturales, como los alcoholes y los ácidos grasos de cadena larga, para aumentar la capacidad de discriminación.

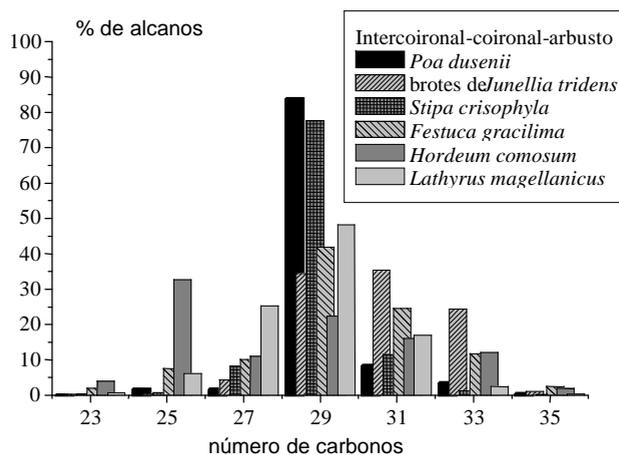


Figura 5. Patrón de *n*-alcanos en especies del intercoironal, el coironal, y los brotes del año de un arbusto

Conclusiones

Los resultados que se presentan en este trabajo son originales y muestran los primeros valores de contenido y patrón de *n*-alcanos publicados para estas especies en la región de la estepa patagónica. La presencia de un aceptable contenido de *n*-alcanos junto con las marcadas diferencias que existen en el patrón de *n*-alcanos entre grupos de especies, y aún entre especies dentro de estos grupos, indican que es posible la aplicación del método de los *n*-alcanos para estimar el consumo y la composición de la dieta en los ovinos de esta región. Los alcances del método de los *n*-alcanos para distinguir entre las especies dentro de los grupos de especies son, sin embargo, más restringidos, y habría que explorar la posibilidad de agregarle a los alcanos otros marcadores naturales, como los alcoholes y los ácidos grasos de cadena larga, para aumentar la capacidad de discriminación. Este aspecto puede ser muy relevante para la estimación del consumo con el método de los *n*-alcanos, en la medida en que el contenido del *n*-alcano que se utiliza para estimar el consumo difiera mucho entre las especies dentro de cada grupo de especies que puede ser discriminado. Los patrones de *n*-alcanos observados se convierten en un horizonte promisorio para avanzar en la determinación de la composición de la dieta de los ovinos que pastorean la zona sur de Santa Cruz, Argentina, y permite pensar en llegar en un futuro a mejorar la evaluación del consumo.

Literatura Citada

- Alvarado, P. I. 2001. Consumo, digestibilidad y composición botánica de la dieta de ovinos de genotipos diferentes en pastoreos primaverales de pasturas polifíticas, estimados con el método de los *n*-alcanos. Tesis de Magister Scientiae en Producción Animal. UNMdP. INTA-Balcarce, Argentina. 103 páginas. Disponible en línea en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/catedras/Alimentos/tesis/Tesis.pdf>
- Alvarado, P. I., M. L. Bakker, M. A. Brizuela y M. S. Cid. 2001a. Contenido de *n*-alcanos en las principales especies de plantas de pasturas cultivadas del sudeste de Buenos Aires. Rev. Arg. Prod. Anim. 21(1):155.

- Alvarado, P. I., M. A. Brizuela, M. L. Bakker y M. S. Cid. 2001b. Consumo y digestibilidad *in vivo* de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*) en ovinos estimados con el método de los *n*-alcanos. Memorias de la XVII Reunión Latinoamericana de Producción Animal (ALPA) y IX Reunión de la Asociación Cubana de Producción Animal (ACPA). 19-21 de noviembre de 2001. La Habana, Cuba. pp. 2475-2479.
- Bakker, M. L., P. I. Alvarado, H. L. Gonda, L. G. Hidalgo, M. H. Wade, D. E. Dalla Valle, M. C. Inza, M. J. Otero, y M. M. Yuño. 2001. Contenido de *n*-alcanos en distintas partes de planta de raigrás perenne y lotus corniculatus. Rev. Arg. Prod. Anim. 21(1):157.
- Bakker, M. L. y P. I. Alvarado. 2006. Alcanos de la cera cuticular de hojas de *Populus alba*, *Populus deltoides* (Salicaceae), *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), *Ulmus pumila* (Ulmaceae) y *Fraxinus americana* (Oleaceae) en Tandil, Buenos Aires, Argentina. Darwiniana. 44(1):58-63.
- Cesa, A. y D. Suárez (en prensa). *Junellia tridens*, un estudio de caso: debe ser considerada como item forrajero en las estepas arbustivo graminosas del sur de Santa Cruz ?. Presentado en el IV Congreso Argentino de Manejo de Pastizales y I Congreso del MERCOSUR Sobre Manejo de Pastizales Naturales, Agosto 2007, San Luis, Argentina.
- Chen, W., R. D. B. Lefroy, J. M. Scott y G. J. Blair. 1998. Field variations in alkane signatures among plant species in 'degraded' and perennial pastures on the Northern Tablelands of New South Wales. Aust. J. Agric. Res. 49:263-268.
- Dove, H. y R. W. Mayes. 1991. The use of plant wax alkanes as markers substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. Aust. J. Agric. Res. 42:913-952.
- Dove, H. y R. W. Mayes. 1996. Plant wax components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. J. Nutr. 126:13-26.
- Dove, H. R., W. Mayes y M. Freer. 1996. Effect of species, plant part, and plant age on the *n*-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. Aust. J. Agric. Res. 47:1333-1347.
- Hatt, J.M., R. Gisler, R.W. Mayes, M. Lechner-Doll, M. Clauss, A. Liesegang, y M. Wanner. 2002. The use of dosed and herbage *n*-alkanes as markers for the determination on intake, digestibility, mean retention time and diet selection in Galapagos tortoises (*Geochelone nigra*). Herpetol. J. 12:45-54.
- Kunst, L. y A. L. Samuels. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. Progr. Lipid Res. 42:51-80.
- Lee, G. J. y J. V. Nolan. 2003. Sources of variation in *n*-alkane concentrations in the cuticular wax of two-species of pasture plants. Aust. J. Agric. Res. 54:21-26.
- Mayes, R. W., C. S. Lamb y P. M. Colgrove. 1986. The use of dosed and herbage *n*-alkanes as markers for the determination of herbage intake. J. Agric. Sci. (Cambridge). 107:161-170.
- Mayes, R. W. y H. Dove. 2000. Measurement of dietary nutrient intake in free ranging mammalian herbivores. Nutr. Res. Rev. 13:107-138.
- Piasentier, E., S. Bovolenta y F. Malossini. 2000. The *n*-alkane concentrations in buds and browsed broadleaf trees. J. Agric. Sci. (Cambridge). 135:311-320.
- Pelliza, A., P. Willems, V. Nakamatsu y A. Manero. 1997. Atlas dietario de herbívoros patagónicos. PRODESAR-INTA-FAO. R. Somlo (Ed.). 108 páginas.
- Post-Beittenmiller, D. 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. Annual Rev. Pl. Physiol. Pl. Molec. Biol. 47:405-430.
- Smith, D. G., R.W. Mayes y J. G. Raats. 2001. Effect of species, plant part, and season of harvest on *n*-alkane concentrations in the cuticular wax of common rangeland grasses from southern Africa. Aust. J. Agric. Res. 52:875-882.
- Zhang, Y., Y. Togamura y K. Otsuki. 2004. Study on the *n*-alkane patterns in some grasses and factors affecting the *n*-alkane patterns. J. Agric. Sci. (Cambridge). 142:469-475.