ITEA (1997), Vol. **93A N.º 3,** 193-208

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LOS N-ALCANOS EN ESTUDIOS DE INGESTIÓN Y SELECCIÓN DE DIETA DE LOS RUMIANTES EN PASTOREO: REVISIÓN

M. Oliván
K. Osoro

Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria (CIATA)
Apdo. 13-33300 Villaviciosa (Asturias)

RESUMEN

El desarrollo de sistemas sostenibles de producción animal, basados en el aprovechamiento de los recursos pastables, requiere el conocimiento de la respuesta de los animales y de la vegetación cuando son sometidos a distintas estrategias de manejo. El estudio de esta interacción pasto x animal precisa del desarrollo de metodologías adecuadas, que permitan obtener información sobre la ingestión, la digestibilidad y la composición de la dieta seleccionada por los animales. Durante los últimos años se ha desarrollado la técnica de los n-alcanos, que ofrece numerosas posibilidades para la investigación en ecología del pastoreo. En esta revisión se describe dicha técnica: su metodología, desarrollo, posibilidades y limitaciones.

Palabras clave: Alcanos, Ingestión, Digestibilidad, Selección de dieta.

SUMMARY
UTILIZATION OF N-ALKANE TECHNIQUE TO STUDY INTAKE AND DIET SELECTION BY GRAZING RUMINANTS: A REVIEW

The development of sustainable animal production systems based on pastures requires the knowledge of animal and vegetation responses to the different management strategies. The study of pasture x animal interaction needs the development of appropriate methodologies to obtain information about intake, digestibility and composition of the diet selected by grazing animals. During the last few years the n-alkane technique has been developed and it gives numerous possibilities for research in grazing ecology. This review describes this technique: its methodology, development, possibilities and limitations.

Key words: Alkane, Intake, Digestibility, Diet selection.

Introducción

La producción animal obtenida en condiciones de pastoreo es el resultado de una serie de complejas interacciones entre las características y el manejo de la vegetación y de los animales.

Dichas interacciones son especialmente complejas en el caso de los pastos naturales

de montaña o de zonas desfavorecidas, donde los animales tienen acceso a cubiertas vegetales heterogéneas. La recuperación y conservación de dichas zonas, donde el abandono de la actividad ganadera, en las últimas décadas, ha ocasionado una acumulación de biomasa leñosa, pérdida de biodiversidad e incremento del riesgo de incendios, requiere el conocimiento de la conducta de pastoreo de los animales, tanto domésticos como salvajes, en las distintas cubiertas vegetales existentes.

El conocimiento de la interacción pasto x animal precisa el desarrollo de metodologías que permitan la estimación de la cantidad de pasto ingerida por los animales en las distintas cubiertas vegetales y condiciones de manejo, así como las especies y partes vegetales consumidas. Los métodos disponibles hasta ahora presentaban ciertas limitaciones, tanto por su falta de precisión como por la dificultad de aplicarlos en los sistemas de producción animal extensivos.

La técnica más utilizada para estimar la *ingestión* se basa en el cálculo de la producción fecal (mediante un marcador externo indigestible) y la digestibilidad de la dieta (análisis de la digestibilidad in vitro). El marcador más utilizado ha sido el óxido crómico, aunque plantea problemas al no ser totalmente indigestible y presentar variaciones diurnas en su excreción en heces (KOTB y LUCKEY, 1972; LANGLANDS, 1975; PRIGGE *et al.*, 1981).

El cálculo de la *digestibilidad de la dieta* es aún más delicado, ya que pequeñas desviaciones en su estimación pueden ocasionar graves errores en el cálculo de la ingestión (LANGLANDS, 1975 y 1987). El análisis de la digestibilidad in vitro, (TILLEY y TERRY, 1963), presenta el inconveniente de que estima un valor de digestibilidad único para cada alimento, sin tener en cuenta las posibles diferencias en la eficiencia digestiva entre distintos animales. Otro problema es la recogida de muestras de dieta, que puede ser manual o utilizando animales fistulados en el esófago (VAN DYNE y TORREL, 1964; MCMANUS, 1981). La utilización de animales fistulados asume que éstos realizan la misma selección de dieta que los no fistulados, pero lo cierto es que el manejo de los animales en el momento de recogida de las muestras puede afectar a la selección de dieta: se mantiene a los animales hambrientos, lo cual les impide ser selectivos y tienden a consumir las especies más abundantes (JUNG y KOONG, 1985); se limita el pastoreo a una pequeña zona, con lo cual la variación espacial en la distribución de las plantas puede no quedar representada; se utilizan pocos animales, etc. El método asume también que las extrusas recogidas en un muestreo de 15-30 minutos reflejan el global de la dieta diaria, lo cual en el caso de pastos heterogéneos no es cierto, ya que se ha comprobado que la composición botánica de las muestras de extrusa va variando a lo largo del día (OBIHOA, 1970; NEWMAN *et al.*, 1994; PARSONS *et al.*, 1994). Otro método alternativo es la recogida manual de muestras de pasto simulando la conducta de pastoreo mostrada por los animales (LE DU y PENNING, 1982), aunque en pastos heterogéneos este método es solo cualitativo, pues se basa en la identificación y recogida del material vegetal consumido, pero no aporta información sobre la proporción de los distintos componentes en la dieta.

Respecto a la estimación de la *composición de la dieta* de los herbívoros en pastoreo, la mayor parte de los métodos hasta ahora utilizados sólo permiten estimaciones cualitativas de las especies vegetales consumidas. Los datos obtenidos por observación de la conducta de pastoreo de los animales pueden ser inexactos cuando el pasto es he-

terogéneo (SANDERS *et al.*, 1980), debido a la dificultad de distinguir los componentes vegetales que están siendo seleccionados, incrementándose el riesgo de error en los casos en que los animales pastan de noche. El análisis del contenido del rumen, utilizado fundamentalmente en el estudio de animales salvajes (MARTÍNEZ *et al.*, 1985; HERALDOVA, 1990), conlleva el sacrificio del animal. Otra técnica es el análisis microhistológico de las heces, mediante la identificación de los fragmentos de cutícula de las distintas especies vegetales (MCINNIS *et al.*, 1983), método cualitativo que presenta ciertos problemas debido a la digestión diferencial entre especies y partes vegetales (VAVRA y HOLECHEK, 1980) y a la dificultad de reconocimiento de determinados restos vegetales (SANDERS *et al.*, 1980).

El método más utilizado ha sido el análisis de las extrusas obtenidas con animales fistulados en el esófago (MCMANUS, 1981; FORBES y BEATTIE, 1987; HODGSON *et al.*, 1991), dado que los fragmentos vegetales están menos degradados que en el rumen o en las heces y la identificación de las especies es más fácil. Pero ya hemos comentado los inconvenientes del uso de fistulados para equiparar la muestra con la dieta seleccionada por el resto de animales.

Debido a la problemática que ofrecen todas estas técnicas, recientemente se ha orientado la investigación hacia la utilización de los n-alcanos como marcadores fecales para estimar la ingestión y la composición de la dieta. El objetivo de la presente revisión es poner en conocimiento de los investigadores la metodología de los n-alcanos, iniciada en la década de los 80, sus posibilidades, limitaciones y últimas novedades.

Alcanos: definición y localización

Los n-alcanos son hidrocarburos alifáticos saturados que se representan con la fórmula C_nH_{2n+2}. Suponen entre un 3 y un 20 % del total de compuestos de las ceras insaponificadas de la cutícula de las plantas y, como regla general en todas las especies, los alcanos de cadena impar están presentes en cantidades mucho mayores que los de cadena par. Los más abundantes son los comprendidos entre el C25 (pentacosano, con una cadena hidrocarbonada de 25 átomos de carbono) y el C35 (pentatriacontano, de 35 átomos de carbono), siendo el C29 (nonacosano), C31 (hentriacontano) y C33 (tritriacontano) los dominantes en todas las especies.

Los alcanos, al igual que el resto de los componentes de la cutícula, presentan diferentes concentraciones según las especies vegetales, plantas y partes de la misma planta (HERBIN y ROBINS, 1969; TULLOCH, 1976 y 1981; BAKER, 1980; MALOSSINI *et al.*, 1990; DOVE y MAYES, 1991; LAREDO *et al.*, 1991; DOVE *et al.* 1996). Incluso se han observado diferencias en el contenido de alcanos entre plantas en distinto grado de madurez y sometidas a condiciones climáticas diferentes (LAREDO *et al.*, 1991; DOVE *et al.*, 1996).

Estimación de la ingestión

Los n-alcanos no se comportan como marcadores ideales ya que no son completamente indigestibles, sino que se produce cierta absorción de los mismos a su paso por el intestino delgado (MAYES *et al.*, 1988). En realidad su recuperación en heces varía en función de la longitud de cadena, desde valores en torno al 40% para el C25 hasta el 94% para el C36.

A pesar de ello, MAYES *et al.* (1986a) propusieron su utilización como marcadores para estimar la ingestión, al comprobar que dos alcanos de longitud de cadena consecutiva (C32 y C33) presentaban la misma recuperación fecal. Dichos autores desarrollaron un método para estimar la ingestión, consistente en la utilización simultánea de un alcano presente en las plantas (C33) como marcador interno para estimar la digestibilidad de la dieta y un alcano dosificado (C32) como marcador externo para estimar la producción fecal.

De forma que se calcula la ingestión (I) como:

$$I = \frac{D32}{\frac{H32 \times P33 - P32}{H33}} \qquad \text{(ec.1)}$$

donde:

I= ingestión diaria (kg MS)
D32= cantidad de C_{32} dosificada diariamente (mg)
H32= concentración de C_{32} en heces (mg/kg MS)
H33= concentración de C_{33} en heces (mg/kg MS)
P32= concentración de C_{32} en el pasto (mg/kg MS)
P33= concentración de C_{33} en el pasto (mg/kg MS)

Dosificación de los alcanos sintéticos

Para estimar la ingestión es preciso dosificar diariamente a los animales con el alcano C32 como marcador externo. Si se quiere estimar también la digestibilidad de la dieta, se dosifica un alcano de alta recuperación fecal (C36) como marcador externo para calcular la producción fecal.

Se dosifican los alcanos durante 6 días en el caso de los ovinos y 7 días en los vacunos, hasta que se estabiliza su nivel en el tracto digestivo. A partir de ese momento se sigue dosificando durante cuatro días más, tomándose muestras de heces del recto. A lo largo del período de estudio deben tomarse muestras de la dieta consumida por los animales.

La dosis diaria de alcano sintético se calcula en relación con el nivel de ingestión previsible que van a obtener los animales, de manera que la concentración de alcanos presente en las heces no sea muy diferente entre el alcano natural (C33) que proviene de la dieta y el dosificado (C32), con el fin de minimizar posibles errores en el análisis cromatográfico. Es preciso evitar la dosificación de cantidades excesivas del alcano externo, ya que debido a su naturaleza cérea podría no disolverse correctamente en el tracto digestivo (VULICH *et al.*, 1991), produciéndose un error en la estimación de la ingestión.

Existen diversos métodos de dosificación. Inicialmente MAYES *et al.* (1986a) dosificaron los animales con pellets hechos con tiras de papel, previamente impregnado con alcanos. Posteriormente DOVE *et al.* (1988) y VULICH (1990) propusieron la utilización de cápsulas de gelatina que contienen los alcanos impregnados en polvo de celulosa. Se ha comprobado que ambos métodos de dosificación son igual de precisos (DOVE *et al.*, 1989b), siendo la preparación de las cápsulas de gelatina menos trabajosa. No obstante, al dosificar los alcanos en una matriz muy fina se disuelven con demasiada rapidez, con lo cual es necesario dosificar dos veces al día para obtener una excreción uniforme del marcador, lo que complica el manejo de los animales e incluso puede interferir en la actividad de pastoreo. En cambio, los pellets liberan los alcanos más len-

tamente y es suficiente con dosificar una vez al día, por lo que de momento se siguen aconsejando su utilización.

Otro método en experimentación es la utilización de un dispositivo intraruminal para la liberación continua y uniforme de los alcanos en la digesta, basado en el desarrollado por LABY (1981) para dosificar oxido crómico (ELLIS *et al.*, 1981; LABY *et al.*, 1984; FURNIVAL *et al.*, 1990 a y b; PARKER *et al.*, 1990). Dicho dispositivo es introducido en el rumen y libera los alcanos de forma continuada durante un período de 20-30 días (MAYES *et al.*, 1991; DOVE y MAYES, 1993), lo cual simplifica el manejo de los animales, aumenta la precisión de la técnica y facilita su utilización en el caso de los animales salvajes.

Precisión de la estimación de la ingestión

El método se ha contrastado en estudios realizados en jaula metabólica tanto con ovino (MAYES *et al.*, 1986a; BECHET y TULLIEZ, 1990; MAYES *et al.*, 1991; VULICH *et al.*, 1991; DOVE y MAYES, 1993) como con vacuno (MAYES *et al.*, 1986b; DILLON y STAKELUM, 1988; OHAJURUKA y PALMQUIST, 1991; ROBAINA *et al.*, 1993; OLIVÁN y OSORO, 1995b), con animales en distintos estados fisiológicos y distintos tipos de dieta, incluso recibiendo alimentación suplementaria (MAYES *et al.*, 1986a; DOVE *et al.*, 1995; DOVE y OLIVAN, 1997), obteniéndose buenas estimaciones de la ingestión, con diferencias máximas del 3 % en ovino (VULICH *et al.*, 1991) y 11 % en vacuno (OLIVÁN y OSORO, 1995b).

En condiciones de pastoreo, donde la ingestión real es desconocida, sólo pueden compararse ingestiones estimadas por el método de los alcanos con las estimadas por otros métodos, como el del óxido crómico y la digestibilidad in vitro. Comparando ambos métodos en ganado ovino utilizando pastos de *Phalaris aquatica* y *Trifolium subterraneum* (DOVE *et al.*, 1989a) y raigrás y trébol (HEPP, 1989) se obtuvieron datos aparentemente más fiables por el método de los alcanos.

La precisión de la estimación de la ingestión depende fundamentalmente de las siguientes variables:

• Concentración del alcano natural en la dieta. El forraje ingerido por el animal debe tener una concentración mínima del marcador interno C33, de manera que pueda ser cuantificada con suficiente precisión. CASSON *et al.* (1990) sugirieron que esta cantidad debería ser de 50mg/kg MS, aunque la concentración crítica dependerá de la precisión analítica del laboratorio y de la exactitud requerida en la estimación de la ingestión.

• Obtención de una muestra representativa del pasto consumido. Dado que se precisa conocer la cantidad de C32 y C33 ingerida por el animal en su dieta para poder estimar la ingestión, es importante que la muestra de pasto recogida sea representativa de la dieta.

Debido a las dificultades para obtener dicha muestra, particularmente en pastos heterogéneros, es aconsejable observar la conducta de pastoreo y muestrear a mano las distintas especies seleccionadas por los herbívoros en las comunidades vegetales de que disponen. Se analiza el contenido en alcanos (C32 y C33) de los distintos componentes vegetales utilizados por el animal, se estima la proporción de cada uno de ellos en la dieta (x, y, z en la ec. 7) y se calcula la concentración de alcanos C32 y C33 ingerida por el animal (P32 y P33 en la ec. 1). Este cálculo se realiza individualmente para cada uno de los animales en estudio, con lo

cual se obtendrá una estimación individual y precisa de la ingestión y digestibilidad de su dieta.

• Patrón de excreción de los alcanos en heces. Al igual que ocurría con el óxido crómico, se han observado variaciones en la excreción fecal de los alcanos a lo largo del día (DOVE y MAYES, 1991). Esto plantea el problema de la obtención de una muestra fecal que sea representativa de la media diaria. No obstante, se ha comprobado que la relación fecal C32/C33 es constante a lo largo del día, siempre que se dosifique una vez al día con pellets de papel (MAYES *et al.*, 1986a), o dosificando dos veces al día con cápsulas de gelatina (DOVE *et al.*, 1989b) con lo cual la precisión de la estimación de la ingestión no se ve afectada.

Estimación de la digestibilidad

Como ningún alcano natural presenta altas recuperaciones en heces, el cálculo de la digestibilidad se realiza indirectamente (ec. 2) a partir de la estimación de la ingestión (mediante el par de alcanos C32-C33, ec. 1) y de la producción fecal, determinada por la recogida total de heces o mediante la dosificación de un marcador externo (el óxido crómico o un alcano de alta recuperación fecal como el C36, ec. 3).

$$Digestibilidad = \frac{Ingestión - Producción\ fecal}{Ingestión} \qquad \text{(ec. 2)}$$

Si se dosifica C36 como marcador externo, se estima la producción fecal a partir de la cantidad de C36 dosificada y la concentración encontrada en heces (corregida respecto a su recuperación fecal):

$$Producción\ fecal = \frac{D36}{\frac{H36}{Rec.\ fecal}} \qquad \text{(ec. 3)}$$

siendo:

D36= cantidad de C36 dosificada diariamente (mg)

H36= concentración de C36 en heces (mg/kg MS)

En condiciones de campo no puede calcularse la recuperación fecal absoluta del C36, por lo cual se asume la media obtenida en estudios realizados en jaula metabólica con ovino (0,94) y vacuno (0,85).

Precisión de la estimación de la digestibilidad

DOVE y COOMBE (1992), en un estudio realizado en jaula metabólica con ovinos, comprobaron que los alcanos C31 y C33, utilizados como marcadores internos, permiten estimar con precisión la digestibilidad de la dieta. También en jaula metabólica con ovinos, DOVE y OLIVÁN (1997) obtuvieron buenas estimaciones de la digestibilidad a partir del cálculo de la producción fecal (dosificando C36 como marcador externo) y de la ingestión (con el par de alcanos C31/C32 o C32/C33), según las ecuaciones 2 y 3.

Estimación de la composición de la dieta

La técnica de los alcanos ofrece posibilidades para el estudio de la composición de la dieta seleccionada por los animales en pastoreo, permitiendo estimar la proporción en la dieta de componentes del pasto que presenten un patrón de alcanos muy diferente, como es el caso de gramíneas y legumi-

nosas o herbáceas y leñosas. En el Cuadro 1 se muestra el patrón de alcanos de distintas especies vegetales.

El método consiste en comparar la concentración de alcanos encontrada en las heces de los animales con el contenido de alcanos de los posibles componentes de la dieta. Se establecen sistemas de ecuaciones en las que se iguala la cantidad de alcano estimada en la dieta "*E*"(cantidad consumida de cada especie vegetal, incógnita, por su concentración de un alcano) con la cantidad de alcano que realmente se ingirió en la dieta "*R*" (concentración de alcanos en heces corregida respecto a la recuperación fecal):

$$E = R$$
$$xAi + yBi + zCi = Hi \qquad \text{(ec. 4)}$$

siendo:

x = proporción del componente vegetal A en la dieta

y= proporción del componente vegetal B en la dieta

z= 1-x-y= proporción del componente vegetal C en la dieta

Ai= concentración del alcano i en el componente A

Bi= concentración del alcano i en el componente B

Ci= concentración del alcano i en el componente C

Hi= concentración en heces del alcano i/recuperación fecal.

Es necesario corregir la concentración de alcanos en heces respecto a la recuperación

CUADRO 1
CONCENTRACIÓN DE ALCANOS (mg/kg MS) EN DISTINTAS ESPECIES VEGETALES
TABLE 1
ALKANE CONCENTRATION (mg/kg DM) IN DIFFERENT PLANT SPECIES

Alcanos	Agrostis-Festuca	Nardus stricta	Calluna vulgaris	Ulex galli	Erica vagans	Erica cinerea	Erica umbellata	Genista hispanica
C21	1,1	1,3	8,9	0,3	1,5	2,7	2,1	35,7
C23	3,8	11,6	9,1	0,5	8,8	7,2	3,4	85,8
C24	3,0	4,4	4,4	2,1	7,2	6,1	6,1	14,1
C25	14,4	19,9	15,8	4,7	18,1	18,0	17,6	171,7
C26	2,8	5,0	9,9	3,6	12,5	7,1	7,7	13,7
C27	22,7	73,1	75,4	22,1	60,5	45,1	51,2	322,7
C28	5,4	18,1	26,6	10.2	25,6	12,9	12,9	46,1
C29	136,6	535,9	289,9	68,4	257,3	215,6	239,7	845,2
C30	9,3	26,3	35,1	16,7	58,2	38,7	30,9	17,6
C31	272,1	647,9	939,8	189,3	1542,1	1196,7	580,6	194,2
C32	7,3	17,5	58,8	6,4	94,4	59,4	35,9	4,4
C33	115,1	243,5	685,5	14,3	709,3	493,4	235,7	6,7
C35	11,9	5,5	20,1	1,0	2,5	2,8	1,9	0,7
C36	1,8	2,5	1,7	2,4	0,8	2,2	3,1	1,4

fecal. Si no, el cálculo de estimación de la composición de la dieta se desviará hacia las especies vegetales que contengan mayores concentraciones de alcanos de longitud de cadena larga (los de mayor recuperación fecal).

Para conseguir una solución única, el número de ecuaciones que pueden establecerse (y por tanto de alcanos en los que se puede basar el cálculo) debe ser igual al número de especies vegetales en la dieta. Pero dado que se dispone de mayor número de alcanos que de especies vegetales en el cálculo, se utilizan métodos de optimización de mínimos cuadrados (DOVE *et al.*, 1993; SALT *et al.*, 1994; MAYES *et al.*, 1994, 1997; NEWMAN *et al.*, 1995; DOVE y MOORE, 1996) que calculan las incógnitas minimizando las desviaciones al cuadrado entre el patrón de alcanos observado en las heces (R) y el estimado en la dieta (E).

$$\sum[R - E]^2_{alc:1...n} \qquad \text{(ec. 5)}$$

Siendo A, B y C los posibles componentes mayoritarios de la dieta se calcula su proporción en la dieta seleccionada por cada animal (x, y, z) como:

$$\sum[Hi - (xAi + yBi + zCi)]^2_{alc:1...n} \qquad \text{(ec. 6)}$$

La concentración total de alcanos es mayor en las heces que en los componentes de la dieta, debido al proceso de digestión. Por ello MAYES *et al.* (1997) aconsejan expresar las cantidades de alcanos relativas a la concentración total de alcanos, tanto en las heces como en la dieta:

$$\sum\left[\frac{Hi}{Ht} - \frac{xAi + yBi + zCi}{xAt + yBt + zCt}\right]^2_{alc:1...n} \qquad \text{(ec. 7)}$$

donde:

x= proporción del componente vegetal A en la dieta

y= proporción del componente vegetal B en la dieta

$z=1-x-y$= proporción del componente vegetal C en la dieta

Ai= concentración del alcano i en el componente A

Bi= concentración del alcano i en el componente B

Ci= concentración del alcano i en el componente C

At= concentración total de alcanos en A

Bt= concentración total de alcanos en B

Ct= concentración total de alcanos en C

Hi= concentración en heces del alcano i/recuperación fecal

Ht= concentración total de alcanos en heces/recuperación fecal

Sin embargo, DOVE y MOORE (1996) proponen utilizar las concentraciones absolutas de alcanos, en lugar de las proporciones relativas de cada uno respecto a la concentración total, lo cual tiene la ventaja de que el cálculo permite también estimar la digestibilidad total de la dieta.

Precisión de la estimación de la composición de la dieta

Este método ha sido comprobado satisfactoriamente en ovinos y caprinos en jaula metabólica, alimentados con dos especies vegetales diferentes: gramíneas (Agrostis/Festuca) y Calluna (brotes verdes), raigrás inglés y trébol blanco, raigrás inglés y junco (MAYES *et al.*, 1997).

Los estudios en pastoreo han dado resultados muy satisfactorios (MAYES *et al.*, 1994; SALT *et al.*, 1994; OLIVÁN, 1995; OLIVAN *et al.* 1997a y b), aplicándose incluso al estudio de la selección de dieta de animales salvajes, como el rebeco en la montaña central asturiana (PÉREZ-BARBERÍA *et al.*, 1997).

La precisión de la estimación de la composición de la dieta en estudios de campo depende fundamentalmente de dos factores:

• Cálculo de la recuperación fecal de todos los alcanos estudiados (desde el C21 hasta el C36) con el fin de corregir los valores encontrados en las heces, para estimar la concentración de alcanos ingerida en la dieta (término *Hi* en ecuación 4 y 7). Dicha corrección puede obtenerse de estudios en jaula metabólica o dosificando a los animales una mezcla de alcanos sintéticos de distinta longitud de cadena (p.ej. C24, C28, C32 y C36) para estimar la recuperación fecal de todos ellos por interpolación (OLIVÁN, 1995; MAYES *et al.*, 1997). No se conoce con precisión si factores como la composición de la dieta o el nivel de ingestión afectan al porcentaje de recuperación fecal de los alcanos. Como precaución es conveniente estimar la recuperación de los alcanos en heces en las condiciones particulares de cada estudio.

• Identificación de los componentes vegetales consumidos (especies y partes vegetales). La técnica de los alcanos permite estimar la proporción de distintos componentes vegetales en la dieta, pero es necesario conocer con precisión los componentes que consume el animal. Dichos componentes serán analizados y su patrón de alcanos será introducido en el análisis matemático. Para ello es preciso realizar una observación cuidadosa del comportamiento ingestivo de cada especie animal en estudio.

Manejo de las muestras

Las muestras de pasto y heces se conservan congeladas a -20°C, hasta que se procede a su secado y molienda. Respecto al secado, se ha aconsejado desde un principio liofilizar las muestras, ya que en ciertas pruebas preliminares se observó que el secado en estufa reducía la concentración de alcanos estimada en algunas especies vegetales, probablemente debido a un aumento de la dificultad de extracción más que por evaporación de los alcanos (DOVE y MAYES, 1991). No obstante, OLIVÁN y OSORO (1995a) comprobaron que el secado de muestras de heces y heno en estufa a 40°C no afecta a la extracción de los alcanos de cadena larga (del C31 al C36) con lo cual puede utilizarse este método de secado cuando se quiere estimar la ingestión y digestibilidad de la dieta. En cambio, el secado en estufa parece afectar a la extracción de alcanos de cadena corta (del C21 al C30), con lo cual si se pretende estimar la composición de la dieta sería necesario liofilizar la muestra. Una vez secas, las muestras se muelen, evitando cualquier calentamiento del molino, y se pasan por un tamiz de 1 mm.

Posteriormente se conservan las muestras en bolsas herméticas para evitar la humedad. Para conservación a largo plazo es conveniente envasarlas al vacío.

Analisis y determinacion de alcanos en las muestras

Extracción de alcanos de la muestra

1. Muestras de pasto y heces

MAYES *et al.* (1986a) desarrollaron la metodología de extracción de los alcanos de las muestras. En un comienzo, se realizaba

una extracción Soxhlet de la muestra (de heces o de pasto), seguida de una saponificación y posterior extracción de los alcanos con heptano. En la actualidad se obtienen buenas extracciones realizando una saponificación de la muestra (0,5 g de heces ó 1,5 g de hierba + 200 mg de estándar interno) en KOH 1M en etanol (7 ml para heces, 14 ml para pasto) durante 14 h. (según los autores oscila entre 3 h. y 16 h: DILLON y STAKELUM, 1990; VULICH *et al.*, 1991; DOVE, 1992). A continuación se deja enfriar la muestra y se continúa el proceso de extracción con n-heptano (7 ml heces, 14 ml pasto). OLIVÁN *et al.* (1994b) y OLIVÁN y OSORO (1997) encontraron que dicha extracción debe realizarse sobre la muestra caliente (a 65 °C), de lo contrario la extracción de los alcanos de cadena larga resulta incompleta.

Tras la extracción con heptano, la muestra es filtrada por una columna de silica gel de 5 ml de volumen, para retirar pigmentos, alcoholes y lípidos. En ocasiones algunos pigmentos no son retenidos por la columna, pero esto no afecta al análisis de la muestra. Tras el paso por la columna, la muestra se recupera con heptano y se concentra a 500 µl para proceder al análisis cromatográfico.

2. Muestras de pellets

El contenido de alcanos en los pellets se determina por extracción Soxhlet con éter de petróleo (60-80°) durante dos horas. Se analiza el pellet completo en el caso de pellets de ovino o caprino (1,6 g) o una submuestra de 1 g en el caso de pellets de vacuno (9 g para vacas, 4,5 g para terneros) a la que se añade una cantidad de los estándar internos C22 y C34 (70 mg ovino, 100 mg vacuno), para el posterior análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico

El análisis de la muestra se realiza por cromatografía en fase gaseosa. Se obtienen buenos resultados inyectando 0.5 ml de la muestra por inyección on-column en una columna DB-1 megabore de 15 m x 0,530 mm, empleando un inyector de temperatura programable con autoinyección. El flujo de gas portador (He) es de 15 ml/min. El inyector sigue un programa de temperatura (80°C durante 0,2 min, 200°C/min hasta 380°C), la columna también (200°C durante 1 min, 6°C/min hasta 300°C, 6 min a 300°C), y el detector FID se mantiene a 350°C.

Se calculan las concentraciones con el método del estándar interno, añadiendo a la muestra un alcano prácticamente inexistente en ella (generalmente se utiliza C34) al comienzo del proceso de extracción. Dado que el proceso de extracción puede ser incompleto, a pesar de realizarlo en caliente, es recomendable utilizar dos estándar internos (C22 y C34), que cubran el rango de alcanos a estudiar. Así se puede comprobar que la extracción ha sido completa y corregir las áreas de todos los alcanos según la relación obtenida entre ambos estándar internos (OLIVÁN y OSORO, 1997).

Es aconsejable evitar la utilización de viales cromatográficos con tapón de goma y silicona, ya que tras el primer pinchazo la muestra se va contaminando de hidrocarburos (OLIVÁN, no publicado).

Otras utilidades del método

Estimación de la composición botánica de mezclas vegetales

El método de los alcanos se puede utilizar para estimar la composición botánica de

mezclas vegetales y de extrusas obtenidas mediante fístulas esofágicas, evitando el laborioso trabajo de separación manual. Para ello se analiza el contenido de alcanos en cada una de las especies puras y el de la mezcla. Posteriormente se plantean ecuaciones simultáneas para cada uno de los alcanos estudiados o se utiliza el método de los mínimos cuadrados (sin necesidad de aplicar ninguna corrección respecto a la recuperación fecal) para estimar la proporción de cada especie en la mezcla. DOVE (1992) consiguió buenas estimaciones de la composición de una mezcla de especies vegetales compuesta por gramíneas (Lolium perenne y Holcus lanatus) y leguminosas (Trifolium subterraneum).

Consumo de partes vegetales

Las diferencias en concentración de alcanos existentes entre distintas partes vegetales (hojas, vainas, tallos y flores) (LAREDO *et al.*, 1991; BAKER y KLEIN, 1994; DOVE *et al.*, 1996) permite utilizar esta técnica para estimar su proporción en la dieta.

No se ha determinado el número máximo de componentes de la dieta (especies o partes vegetales) que podrían distinguirse, aunque los estudios realizados sugieren que es posible discriminar entre 6 a 10 componentes (MAYES *et al.*, 1995).

Otros marcadores fecales

Se están investigando las posibilidades de utilización de otros componentes de las ceras cuticulares (alquenos, alcoholes de cadena larga) como marcadores para estimar la composición de la dieta (DOVE y OLIVÁN, no publicado). Dichos compuestos también muestran distintas concentraciones según las especies y partes vegetales y podrían obtenerse en el mismo proceso analítico. Su utilización conjunta con los alcanos permitiría ampliar el rango de componentes vegetales que podrían ser distinguidos en la dieta.

Aplicación de la técnica de los alcanos con herbívoros no rumiantes

Recientemente se ha investigado la aplicación del método de los alcanos para estimar la ingestión en herbívoros no rumiantes como caballos y ponies (CUDDEFORD y MAYES, no publicado) y cerdos (GANNON y MAYES, no publicado), con resultados satisfactorios. Dichos autores han observado que la recuperación fecal de los alcanos en estos animales no presenta variaciones en relación a la longitud de cadena, tal como ocurre en los rumiantes.

También se ha utilizado esta metodología para estimar la composición de la dieta en herbívoros silvestres como la liebre de montaña *(Lepus timidus)* (HULBERT, 1993) y el wombat australiano *(Lasiorhinus krefftii)* (WOOLMOUGH *et al.*, 1994), obteniéndose una información valiosísima sobre la utilización de los recursos por estos animales.

Conclusiones

El desarrollo del método de los alcanos ha permitido mejorar la precisión en la estimación de la ingestión obtenida por los animales en pastoreo respecto a las técnicas tradicionalmente utilizadas, ya que calcula la digestibilidad de la dieta obtenida por cada animal en estudio (lo cual evita las desviaciones ocasionadas por diferencias en la digestibilidad de la dieta obtenida por

animales de diferente edad, estado fisiológico o nivel de ingestión) y se soluciona el problema derivado de la recuperación fecal incompleta del marcador externo, pues se basa en la relación alcano interno/alcano externo encontrada en las heces.

La estimación de la composición de la dieta es más delicada, ya que deben identificarse y muestrearse con precisión las especies vegetales o partes de las plantas que los animales ingieren y es necesario calcular en cada ocasión las recuperaciones fecales de alcanos. No obstante, comparado con la utilización de animales fistulados en el esófago, el método de los alcanos permite estimar la composición de la dieta que los animales seleccionan a lo largo de todo el día, sin factores que afecten a su comportamiento, e incluso parece presentar la posibilidad de estimar qué partes vegetales está seleccionando el animal.

El método ya está siendo utilizado en condiciones de campo, para estimar la ingestión y composición de la dieta en ovinos (VULICH *et al.*, 1991; SALT *et al.*, 1992 y 1994; OLIVÁN, 1995; OLIVÁN *et al.* 1997b), vacunos (OSORO *et al.*, 1993; OLIVÁN *et al.*, 1994a, 1997a; ROOK *et al.*, 1994; FERRER CAZCARRA y PETIT, 1995; FERRER CAZCARRA *et al.*, 1995; MALOSSINI *et al.*, 1995) y caprinos (MERCHANT y RIACH, 1994; OLIVÁN *et al.* 1997b) en todo tipo de pastos.

Todavía se continúa investigando sobre las posibilidades de la técnica y quedan numerosos interrogantes sobre su utilización, sus ventajas e inconvenientes. No obstante, este método ha cubierto buena parte de las deficiencias que presentaban las metodologías utilizadas para la estimación de la ingestión y selección de dieta de los rumiantes en pastoreo, posibilitando mejorar el conocimiento de la interacción pasto x animal.

Agradecimientos

Agradecemos a R.W. Mayes la valiosa ayuda prestada durante el tiempo dedicado al aprendizaje de la técnica de los n-alcanos y los interesantes comentarios y discusiones aportados sobre todos los aspectos relacionados con su utilización.

Al M.E.C. por la concesión de una beca de F.P.I. a M. Oliván que le permitió la estancia en el M.L.U.R.I. (Escocia) adquiriendo conocimientos sobre esta metodología. Y al INIA la concesión de una beca de reciclaje de personal investigador a M. Oliván para realizar una estancia en el C.S.I.R.O. (Australia), durante la cual colaboró en distintos trabajos experimentales que permitieron obtener información sobre nuevas posibilidades de la técnica.

Bibliografía

BAKER E.A., 1980. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In "The Plant Cuticule".Eds. D.F. Cutler, K.L. Alvin and C.E. Price. pp. 139-65. Academic Press, London.

BAKER S.K., KLEIN L., 1994. Potential to use n-alkanes in plant cuticular waxes to discriminate plant parts of subterranean clovers eaten by ruminants. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 20: 419.

BECHET G., TULLIEZ J., 1990. Estimation of grass intake by lambs using n-alkanes as markers. VIème Journées de Recherche sur l'Alimentation et la Nutrition des Herbivores. Paris.

CASSON T., ROWE J.B., THORN C.W., HARRIS D. 1990. The use of natural n-alkanes in medic and clover as indigestible markers. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod., 18. pp. 462.

DILLON P., STAKELUM G., 1988. The use of n-alkanes and chromic oxide as markers for determining feed intake, faecal output and digestibility in dairy cows. Proc. 12th Gen. Meeting Eur. Grasslds Fed. Dublin, Ireland. pp. 154-8.

DILLON P., STAKELUM, G. 1990. Dosed and herbage alkanes for predicting silage intake with dairy cows: The effect of concentrate type and level of feeding. Proc. VII Eur. Grazing Workshop. Wageningen. The Netherlands.

DOVE H., 1992. Using the n-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixtures. Aust. J. Agric. Res., 43, 1711-24.

DOVE H., COOMBE J.B., 1992. A comparison of methods for estimating supplement intake and diet digestibility in sheep. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. Vol 19, 239-241.

DOVE H., MAYES R.W., 1991. The use of plant wax alkanes as markers substances in studies of the nutrition of herbivores: A review. Aust. J. Agric. Res., 42, pp. 913-57.

DOVE H., MAYES R.W., 1993. Evaluation of an Intraruminal device for the controlled release of an alkane marker for intake estimation in sheep. In "The alkane workshop. Harnessing Technology for the Beef Industry", pp. 9-10. University of New England. Armidale.

DOVE H., MOORE A.D., 1996. Using a least-squares optimisation procedure to estimate diet composition based on the alkanes of plant cuticular wax. Aust. J. Agric. Res. 46: 1535.

DOVE H., OLIVÁN M., 1997. Using synthetic or non-plant alkanes for estimating supplement intake in sheep. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. (in press).

DOVE H., FOOT J.Z., FREER M., 1989a. Estimation of pasture intake in grazing ewes, using the alkanes of plant cuticular waxes. Proc. XVI Int. Grasslds Cong. Nice, France, pp. 1091-1092.

DOVE H., FREER M., FOOT J.Z., 1988. Alcane capsules for measuring pasture intake. Proc. Nutr. Soc. Aust., 13, pp. 131.

DOVE H., FREER M., MOORE A.D. 1993. Using plant wax alkanes to estimate diet selection in sheep. In: Recent Advances in Animal Nutrition in Australia. ed. D.J. Farrell. p. 5A. University of New England, Armidale, Australia.

DOVE H., MAYES R.W., FREER M. 1995. Using cuticular wax alkanes to estimate herbage intake in animals fed supplements. Ann. Zootech. 44, Suppl., 237.

DOVE H., MAYES R.W., FREER M., 1996. Effects of species, plant part and age on the n-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. Aust. J. Agric. Res. 47: 1333.

DOVE H., MAYES R.W., FREER M., COOMBE J.B., 1989b. Faecal recoveries of the alkanes of plant cuticular waxes in penned and in grazing sheep. Proc. XVI Int. Grasslds Cong. Nice, France. pp. 1093-4.

ELLIS K.J., LABY R.H., BURNS R.G., 1981. Continuous controlled-release administration of chromic oxide to sheep. Proc. Nutr. Soc. Aust., 6, 145.

FERRER CAZCARRA R., PETIT M., 1995. The influence of animal age and sward height on the herbage intake and grazing behaviour of Charolais cattle. Animal Science 61: 497-506.

FERRER CAZCARRA R., PETIT M., D'HOUR P., 1995. The effect of sward height on grazing behaviour and herbage intake of three sizes of Charolais cattle grazing cocksfoot (Dactylis glomerata) swards. Animal Science 61: 511-518.

FORBES T.D.A., BEATTIE M.M., 1987. Comparative studies of ingestive behaviour and diet composition in oesophageal-fistulated and non-fistulated cows and sheep. Grass and Forage Sci., 42, 79-84.

FURNIVAL E.P., CORBETT J.L., INSKIP M.W., 1990a. Evaluation of controlled release devices for administration of chromium sesquioxide using fistulated grazing sheep. I. Variation in marker concentration in faeces. Aust. J. Agric. Res. 41: 969-975.

FURNIVAL E.P., ELLIS K.J., PICKERING F.S., 1990b. Evaluation of controlled release devices for administration of chromium sesquioxide using fistulated grazing sheep. II. Variation in rate of release from the device. Aust. J. Agric. Res. 41: 977-986.

HEPP. C., 1989. Interactions between sward conditions and the intake and grazing behaviour of sheep in the autumn. MPhil. University of Edinburgh.

HERALDOVA M., 1990. The diet of sika deer (Cervus nippon) outside the growing season, with a snow cover. Folia Zoologica., 39(3), 197-206.

HERBIN G.A., ROBINS P.A., 1969. Patterns of variation and development in leaf wax alkanes. Phytochem., 8, 1985-98.

HODGSON J., FORBES T.D.A., ARMSTRONG R.H., BEATTIE M.M., HUNTER E.A., 1991. Comparative studies of the ingestive behaviour and herbage intake of sheep and cattle grazing indigenous hill plant

communities. Journal of Applied Ecology. 28. 205-227.

HULBERT I., 1993. The effects of upland afforestation on the ecology of lagomorphs with different feeding strategies. PhD Tesis. University of Edinburgh. Scotland.

JUNG H.G., KOONG L.J., 1985. Effects of hunger satiation on diet quality by grazing sheep. J. Range Management. 38. 303-306.

KOTB A.R., LUCKEY T.D., 1972. Markers in Nutrition. Nutr. Abs. Rev., 42. 813-845.

LABY R.H., 1981. Australian Patent No. 555998.

LABY R.H., GRAHAM C.A., EDWARDS S.R., KAUTZNER B., 1984. A controlled release intraruminal device for the administration of fecal dry-matter markers to the grazing ruminant. Can. J. Anim. Sci. 64, Suppl., pp. 337-338.

LANGLANDS J.P., 1975. Techniques for estimating nutrient intake and its utilization by the grazing ruminant. In: Digestion and Metabolism in the Ruminant. eds. I.W. MacDonald y A.C.I. Warner. pp. 320-332. Armidale: University of New England. Australia.

LANGLANDS J.P., 1987. Assessing the nutrient status of ruminants. In: The Nutrition of Herbivores. Eds. J.B. Hacker y J.H. Ternouth. pp. 363-390. Academic Press. Sydney. Australia.

LARDO M.A., SIMPSON G.D., MINSON D.J., ORPIN C.G., 1991. The potential for using n-alkanes in tropical forages as markers for the determination of dry matter intake by grazing ruminants. J. Agric. Sci., Camb., 117. pp. 355-61.

LE DU Y.L.P., PENNING P.D., 1982. Animal based techniques for estimating herbage intake. In: Herbage intake handbook. Ed. J.D. Leaver. pp. 37-75. B.G.S., U.K.

MALOSSINI F., PIASANTIER E., BOVOLENTA S., 1990. N-alkane content of some forages. J. Sci. Food Agric., 53. pp. 405-409.

MALOSSINI F., BOVOLENTA S., PIRAS C., VENTURA W., 1995. Effect of concentrate supplementation on herbage intake and milk yield of dairy cows grazing an alpine pasture. Livestock Production Science 43: 119-128.

MARTÍNEZ T., MARTÍNEZ E., FANDOS P., 1985. Composition of the food of the Spanish wild goat in Sierras de Cazorla and Segura, Spain. Acta Theriol., 30 (29), pp. 461-494.

MAYES R.W., BERESFORD N.A., LAMB C.S., BARNETT C.L., HOWARD B.J., JONES B-E.V., ERIKSSON O., HOVE K., PEDERSEN ϕ., STAINES B.W., 1994. Novel approaches to the estimation of intake and bioavailability of radiocaesium in ruminants grazing forested areas. Sci. Total Environ. 157: 289-300.

MAYES R.W., DOVE H., CHEN X.B., GUADA J.A., 1995. Advances in the use of faecal and urinary markers for measuring diet composition, herbage intake and nutrient utilisation in herbivores. In: Recent Developments in the Nutrition of Herbivores. Eds. M. Journet, E. Grenet, M-H. Farce, M. Theriez, C. Demarquilly. Proc. 4th Int. Symp. Nutr. Herbivores. pp. 381-406.

MAYES R.W., DOVE H., LAMB C.S., ELLIS K.J., 1991. Evaluation of an intraruminal device for the controlled release of an alkane marker for intake estimation in sheep. Proc. of the 42nd Annual Meeting of the EAAP, Berlin. 1. p.457.

MAYES R.W., DUNCAN A.J., SIBBALD A.M., LAMB C.S., 1997. The use of plant n-alkanes for determining the composition of the diet of grazing herbivores. J. Agric. Sci., Camb.: in press.

MAYES R.W., LAMB C.S., COLGROVE P.M. 1986a. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. J. Agric. Sci., Camb., 107. pp. 161-170.

MAYES R.W., LAMB C.S., COLGROVE P.M., 1988. Digestion and metabolism of dosed even-chain and herbage odd-chain n-alkanes in sheep. Proc. 12th. Gen. Meeting Eur. Grasslds Fed., pp. 159-63.

MAYES R.W., WRIGHT I.A., LAMB C.S., MCBEAN A., 1986b. The use of long-chain alkanes as markers for estimating intake and digestibility of herbage in cattle. Anim. Prod., 42, 457 (Abstr.).

MCMANUS W.R., 1981. Oesophageal fistulation technique as an aid to diet evaluation of the grazing ruminant. In: Forage Evaluation: Concepts and Techniques. Ed. J.L. Wheeler, R.D. Mochrie, Kentucky, USA/Melbourne, Australia: AFGC/CSIRO. pp. 249-260.

MCINNIS M.L., VAVRA M., KRUEGER W.C., 1983. A comparison of four methods used to determine the diets of large herbivores. J. Range Management, 36(3), pp. 302-306.

MERCHANT M., RIACH D.J., 1994. The intake and performance of cashmere goats grazing sown swards. Grass and Forage Sci., 49, pp. 429-437.

NEWMAN J.A., PENNING P.D., PARSONS A.J., HARVEY A., ORR R.J., 1994. Fasting affects intake behaviour and diet preference by grazing sheep. Animal Behaviour 47: 185-193.

NEWMAN J.A., THOMPSON W.A., PENNING P.D., MAYES R.W., 1995. Least-squares estimation of diet composition from n-alkanes in herbage and faeces using matrix mathematics. Aust. J. Agric. Res. 46: 793-805.

OBIHOA F.C., 1970. Sources of variation in chemical composition of forage ingested by oesophageal fistulated cattle. J. Range Management. 23, pp. 133-136.

OHAJURUKA O.A., PALMQUIST D.L., 1991. Evaluation of n-alkanes as digesta markers in dairy cows. J. Anim. Sci., 69, pp. 1726-32.

OLIVÁN M., 1995. Pastoreo de Comunidades de Montaña por Vacuno y Ovino. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.

OLIVÁN M., OSORO K., 1995a. The effect of drying treatment on the n-alkane analysis. IV International Symposium on Herbivore Nutrition. Clermont-Ferrand. Annales de Zootechnie 44 (Suppl. 1): 238.

OLIVAN M., OSORO K., 1995b. The use of n-alkanes for estimating feed intake in beef cows. IV International Symposium on Herbivore Nutrition. Clermont-Ferrand. Annales de Zootechnie 44 (Suppl. 1): 239.

OLIVÁN M., OSORO K., 1997. The effect of temperature on alkane extraction from faeces and herbage. J. Agric. Sci. Camb. (en prensa).

OLIVÁN M., OSORO K., CELAYA R., 1994a. Ingestión y selección de dieta de vacuno en pastos de montaña constituidos por comunidades de Agrostis/Festuca/Nardus y Calluna. XXXIV Reunión Científica de la SEEP. Santander.

OLIVÁN M., OSORO K., CELAYA R., 1997a. Diferencias entre las razas vacunas de carne asturianas en el comportamiento ingestivo en pastos de montaña. AIDA-ITEA, VII Jornadas sobre Producción Animal, Vol extra nº 18, tomo I, pp. 269-271.

OLIVÁN M., OSORO K., CELAYA R., 1997b. Selección de dieta del ovino y caprino en comunidades de brezal-tojal parcialmente mejoradas. AIDA-ITEA, VII Jornadas sobre Producción Animal, Vol extra nº 18, tomo I, pp. 278-280.

OLIVÁN M., OSORO K., MARTÍNEZ M.J. 1994b. Effect of temperature on alkanes extraction from faeces and pasture. 45th Meeting of the EAAP. pp 148. Edimburgo.

OSORO K., OLIVÁN M., MARTÍNEZ A., BARRIADA M., 1993. Ingestión, conducta de pastoreo y crecimiento compensatorio en vacunos añojos de raza Asturiana de Valles. ITEA-AIDA V Jornadas sobre Producción Animal, 12, 45-47.

PARKER W.J., MORRIS S.T., GARRICK D.J., VINCENT G.L., MCCUTCHEON S.N., 1990. Intraruminal chromium controlled release capsules for measuring herbage intake in ruminants - a review. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 50: 437-442.

PARSONS A.J., NEWMAN J.A., PENNING P.D., HARVEY A., ORR R.J., 1994. Diet preference of sheep: effects of recent diet, physiological state and species abundance. J. Animal Ecology 63: 465-478.

PÉREZ-BARBERÍA F.J., OLIVÁN M., OSORO K., NORES C., 1997. Sex, seasonal and spatial differences in the diet of Cantabrian chamois Rupicapra pyrenaica parva. Acta Theriologica 42: 37-46.

PRIGGE E.C., VARGA G.A., VICINI J.L., REID R.L., 1981. Comparison of ytterbium chloride and chromium sesquioxide as fecal indicators. J. Anim. Sci., 53 (6), pp. 629-1633.

ROBAINA A., GRAINGER C., MOATE P., DAVIS L., 1993. The use of n-alkanes for estimating diet digestibility and silage intake of stall-fed dairy cows. In "The alkane workshop. Harnessing Technology for the Beef Industry", p. 7. University of New England. Armidale.

ROOK A.J., HUCKLE C.A., PENNING P.D., 1994. Effects of sward height and concentrate supplementation on the ingestive behaviour of spring-calving dairy cows grazing grass-clover swards. Applied Animal Behaviour Science, 40, pp. 101-112.

SALT C.A., MAYES R.W., ELSTON D.A., 1992. Effects of season, grazing intensity and diet composition on the radiocaesium intake by sheep on re-seeded hill pasture. Journal of Applied Ecology, 29, pp. 378-387.

SALT C.A., MAYES R.W., COLGROVE P.M., LAMB C.S., 1994. The effect of season and diet composition on the radiocaesium intake by sheep grazing on heat-

her moorland. Journal of Applied Ecology, 31, pp. 125-136.

SANDERS K.D., DAHL B.E., SCOTT G., 1980. Bite-count vs. fecal analysis for range animal diets. J. Range Management, 32, pp. 146-149.

TILLEY J.M.A., TERRY R.A., 1963. A two-stage technique for the "in vitro" digestion of forage crops. J. Br. Grassld. Soc., 18, pp. 104-111.

TULLOCH A.P., 1976. Chemistry of waxes of higher plants. In "Chemistry and Biochemistry of natural waxes". Ed. Kolattukudy. pp. 235-87. Elsevier, Amsterdam.

TULLOCH A.P., 1981. Composition of epicuticular waxes from 28 genera of Graminae: differences between subfamilies. Can. J. Bot., 59, pp. 1213-21.

VAN DYNE G.M., TORELL D.T., 1964. Development and use of oesophageal fistula: a review. J. Range Management, 17, 7-19.

VAVRA M., HOLECHEK J.L., 1980. Factors influencing microhistological analyses of herbivore diets. J. Range Management, 33, pp. 371-374.

VULICH S.A., 1990. Preparation of capsules for the dosing of n-alkanes used to estimate feed intake in sheep. Animal Production Research Report. 1988-1999, Teagasc, Dublin.

VULICH S.A., O'RIORDAN E.G., HANRAHAN J.P., 1991. Use of n-alkanes for the estimation of herbage intake in sheep: accuracy and precision of the estimates. J. Agric. Sci., Camb., 116, pp. 319-23.

WOOLNOUGH A.P., DOVE H., FOLEY W.J., JOHNSON C.N., 1994. New techniques for herbivore diet analysis and their application to the conservation of the Northern Hairy-nosed wombat. En: "Wombats in Australia: Biology, History, Art and Literature", 23, Adelaida, Australia.

(Aceptado para publicación el 3 de octubre de 1997)