

ALGUNAS TÉCNICAS MICROHISTOLÓGICAS UTILIZADAS EN LA DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN BOTÁNICA DE DIETAS DE HERBÍVOROS

Some microhistological techniques utilized in the determination of the botanical composition of herbivore diets

Giorgio Castellaro G.^{1*}, Fernando Squella N.², Tamara Ullrich R.³, Felipe León C.⁴ y Alberto Raggi S.⁵

ABSTRACT

This work describes different microhistological techniques, to study wild and domestic herbivore diets. The methods to obtain epidermal tissue were applied to the main vegetal species of the Mediterranean and high plain pastures, to evaluate the degree of resolution in their identification and characterization. In most grasses and grass-like species, the epidermal tissue was obtained easily by scraping without complications, identifying species based on specific characteristics of the cellular wall, cell size and shape, presence and shape of cork and silica cells, and presence and shape of trichomes. In some poaceas with very hard epidermis, prior treatment with ether and nitric acid was necessary before scraping. In wood and wide leaf herbaceous species, the diafanization method was the most efficient way to obtain the epidermis, and species identification was based on cell and trichome shape, and in some cases, on stomas shape, but, in some genera, species differentiation was not possible. The microhistological technique proved to be a useful tool to obtain epidermis of plant species, being an accurate method to identify and characterize this structure. Some wide leaf herbaceous species showed a strong sensitivity to diafanization, so this technique should be improved.

Key words: genus identification, species identification, highland ranges, Mediterranean annual ranges, microhistological technique, epidermis tissue.

RESUMEN

En este trabajo se describen diferentes técnicas microhistológicas para estudiar la dieta de herbívoros silvestres y domésticos. Los métodos de obtención de epidermis se aplicaron a las principales especies vegetales de praderas mediterráneas y altiplánicas, evaluando el grado de resolución en la identificación y caracterización de ellas. En la mayoría de las especies poáceas y graminoides, la obtención de la epidermis se realizó mediante raspado y no presentó complicación, siendo posible la identificación a nivel de especie basándose en las características de la pared celular, el tamaño y forma celular, presencia y forma de las células de corcho y de sílice, y presencia y forma de los tricomas. En poáceas de epidermis muy duras fue necesario un tratamiento previo con éter de petróleo y ácido nítrico antes de someterlas al raspado. En las especies arbustivas y en herbáceas latifoliadas, el método de diafanización fue el más eficiente en la obtención de la epidermis, y la identificación de especies se basó en la forma celular, la de los tricomas y en algunos casos, la forma de los estomas, pero en algunos géneros no fue posible la diferenciación de especies. La técnica microhistológica resultó ser una herramienta útil en la obtención de epidermis de las especies vegetales, siendo un método preciso en la identificación y caracterización de esta estructura. Algunas especies de latifoliadas herbáceas mostraron una gran sensibilidad a la diafanización, por lo que convendría mejorar esta técnica.

Palabras clave: identificación de géneros, identificación de especies, praderas altiplánicas, pradera mediterránea anual, técnica microhistológica, tejido epidérmico.

¹ Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Casilla 1004, Santiago, Chile.

E-mail: gicastel@uchile.cl *Autor para correspondencia.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Rayentué, Centro Experimental Hidango, Casilla 3, Litueche, Chile. E-mail: fsquella@inia.cl

³ Actividad Privada. Pedro Lagos 258, Río Tranquilo, Aysén, Chile.

⁴ Bayer S.A., Longitudinal Sur km 92, Los Lirios, Rancagua, Chile.

⁵ Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Casilla 2 - Correo 15, Santiago, Chile.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas microhistológicas han sido ampliamente utilizadas para estudiar la dieta de herbívoros silvestres y domésticos (Sparks y Malechek, 1968; Colomés, 1978; Holechek *et al.*, 1982; De Carolis, 1987; Bonino y Pelliza, 1991a; b; Klee *et al.*, 2000; Holechek *et al.*, 2001; Castellaro *et al.*, 2004). Esta técnica consiste en la obtención de tejidos epidérmicos vegetales desde una o más estructuras morfológicas de las principales especies que participan del medio en que los animales se desenvuelven, con el objeto de disponer de patrones de comparación, que permitan la determinación de la composición botánica de la dieta de los herbívoros, mediante el análisis de sus fecas, contenido ruminal o fístula esofágica, siendo posible en consecuencia, la identificación de estos patrones en los fragmentos de las epidermis de las diferentes plantas (Ortega *et al.*, 1993).

El objetivo de este trabajo fue describir e implementar algunos de los métodos de preparación de epidermis vegetales, comúnmente utilizados en las técnicas microhistológicas, como asimismo, evaluar el grado de resolución en la identificación y caracterización de las principales especies de plantas, representativas del pastizal mediterráneo localizado en la zona subhúmeda del país y de ecosistemas de praderas altiplánicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de los patrones de comparación de epidermis, se herborizaron y se identificaron botánicamente diferentes especies vegetales provenientes de un pastizal mediterráneo, localizado en el Centro Experimental Hidango, dependiente del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), VI Región (34°06' lat. Sur, 71°47' long. Oeste, 296 m.s.n.m.), y de formaciones vegetales pertenecientes a ecosistemas de praderas altiplánicas, I Región (18°10' lat. Sur, 69°20' long. Oeste, 4.400 m.s.n.m.). Posteriormente, se procedió a la extracción del tejido epidérmico de las hojas y vainas de las diferentes plantas, siguiendo diferentes metodologías según el tipo de especie a tratar. Las metodologías usadas fueron las siguientes:

Raspado

Es un método que se utiliza principalmente en especies poáceas (gramíneas) y graminoides (térmi-

no que agrupa a especies de las familias *Cyperaceae* y *Juncaceae*). Siguiendo el procedimiento sugerido por Metcalfe (1960), la lámina y la vaina humedecida de la hoja se dispuso sobre un portaobjeto, de tal forma que la cara a observar quedara hacia abajo (cara abaxial). Posteriormente se raspó suavemente con un bisturí con el propósito de retirar el tejido mesofilar. Durante este proceso se aplicó hipoclorito de sodio al 30% (cloro comercial) sin diluir para aclarar el tejido. Una vez finalizado este procedimiento, y cuando el tejido epidérmico se tornó transparente, se lavó con abundante agua en una placa de Petri, cuidando que la epidermis no se invirtiera. Posteriormente, se procedió a montar la muestra sobre un portaobjeto, cuidando que quedara hacia arriba la parte superior de la epidermis. A continuación se aplicó el medio de montaje (gelatina glicerizada) y la muestra se cubrió por un cubreobjeto de 24 x 24 mm. El material herborizado debió ser previamente hidratado hirviéndolo en agua por unos minutos. En el caso de especies con epidermis más resistentes a este tratamiento, las muestras se trataron previamente con éter de petróleo al 96% por 24 h, y posteriormente con ácido nítrico al 22% por 48 h. Luego se hirvió el material por un lapso de 3 min, y con un pincel se retiraron los restos del tejido mesofilar (Martín y Aguilar, 1994).

Diafanización

Este método se basa en el propuesto por Stittmatter y Dizeo (1973) y se aplicó a la mayoría de las especies latifoliadas herbáceas (hierbas). El material se hirvió en alcohol al 96% durante 10 min. Posteriormente, se volvió a hervir en una solución acuosa (1:1) de alcohol al 96% y de hidróxido de sodio al 5%, por otros 10 min. El tiempo de ebullición y la proporción de la solución variaron según la dureza del material. Para lograr dicho efecto, es conveniente usar en esta etapa del proceso una plancha caliente a 400°C bajo una campana, para evitar posibles inflamaciones del alcohol y la inhalación de gases. A continuación, el material así tratado se depositó en una placa Petri y se lavó con agua corriente hasta limpiarlo de reactivos. Después las muestras se lavaron dos veces con agua destilada. Luego se les aplicó una solución de hipoclorito de sodio al 50% y se las dejó reposar el tiempo suficiente para que se tornaran transparentes (de pocos minutos a una hora), vigilando permanentemente este proceso. Una vez aclarado el material, se pasó cinco veces por agua destilada (5 min cada cam-

bio) y se mantuvo en una solución de hidrato cloral al 5% con el propósito de quitarle opacidad. El material así tratado se mantuvo en dicha solución por 5 a 10 min, hasta el momento del montaje. Al igual que en el procedimiento anterior, la muestra se depositó sobre un portaobjeto, cuidando que la cara a observar quedara hacia arriba. Posteriormente se aplicó el medio de montaje (gelatina glicerina-da) cubriendo la muestra con un cubreobjeto de 24 x 24 mm.

Macerado

Este método se aplicó en aquellas especies cuyos tejidos mostraron demasiada sensibilidad a la diafanización y debido al escaso material disponible en el herbario, se procedió a la maceración de algunas hojas en un mortero, agregando hipoclorito de sodio hasta que el material quedara blanco. Luego, los tejidos se lavaron sobre un tamiz de 80 mesh con agua corriente. El montaje se realizó esparciendo el material sobre un portaobjeto con gelatina glicerina-da y luego se cubrió con un cubreobjeto de 24 x 50 mm.

Molido de planta

Otro método utilizado es el molido de la planta entera o de partes de ella. El material se seca en una estufa a 60°C durante 24 horas, se muele a través de una malla a 1 mm, se decolora con hipoclorito de sodio y se enjuaga en un tamiz de 100 mesh con agua corriente, para luego ser montado de igual forma que en el método de macerado.

Preparación del medio de montaje (gelatina glicerina-da)

Como medio de montaje se utilizó gelatina glicerina-da. Para la preparación de 250 cm³ de este medio de montaje, se usaron 15 g de gelatina sin sabor, la cual se preparó disolviéndola en 90 cm³ de agua tibia a una temperatura de aproximadamente 35°C. Luego se agregaron 105 cm³ de glicerina y 1,5 g de fenol. Posteriormente, la mezcla se filtró mientras estuviese caliente, a través de un algodón localizado en un embudo. Al utilizar la gelatina, ésta debió ser licuada en una fuente con agua tibia (35 a 37°C) (baño maría) antes de realizar el montaje de los patrones.

Luego de realizado el montaje, se seleccionaron las mejores preparaciones por especie y se sellaron, utilizando para ello, esmalte para uñas transparente, con el objeto de asegurar una mejor conservación

del patrón. El patrón de la epidermis así obtenido, se etiquetó indicando el nombre científico de la especie vegetal, lugar y fecha de recolección y la parte anatómica de la planta de la cual se obtuvo.

Por último, se observaron los preparados de las epidermis en un microscopio (Olympus, modelo BX41), el cual fue equipado con una cámara fotográfica digital (Sony modelo Hyper HAD TS-6020-12), la cual se conectó a un computador para observar las epidermis en la pantalla del mismo. Se tomaron fotografías de todos los patrones obtenidos para tener un respaldo del trabajo. A las especies poáceas y gramínoideas (juncáceas y ciperáceas) se les fotografió tanto las láminas como las vainas, utilizando para ello un aumento de 100x. Por su parte, las especies de herbáceas dicotiledóneas, se fotografiaron con aumentos de 400x, en orden a asegurar una mejor visualización de sus características histológicas. Las especies arbustivas se visualizaron bajo aumentos de 40x y 200x. Las fotografías permiten un mejor estudio y visualización de las características de cada especie, para su posterior reconocimiento en preparados de muestras de fecas, rumen o extrusas del animal, utilizadas en la determinación de la composición botánica de su dieta.

Las especies tratadas por el método de raspado fueron las siguientes:

a) Zona Central: *Aira caryophyllea*, *Avena barbata*, *Briza minor*, *Bromus hordeaceus*, *Cynosurus echinatus*, *Hordeum berteroanum*, *Lolium rigidum*, *Piptochaetium stipoides*, *Stipa manicata* (tres tipos: una pubescente y dos glabras), *Vulpia bromoides*, *Phalaris aquatica*, *Stipa papposa*. Al ser las hojas de estas especies compuestas por lámina y vaina, se realizaron preparados de ambas partes en cada una.

b) Altiplano: *Agrostis toluensis*, *Deschampsia caespitosa*, *Deyeuxia antoniana*, *D. curvula*, *D. jamesonii*, *Festuca nardifolia*, *Poa lilloi*, *Stipa leptostachya*, *Carex incurva*, *Distichia muscoides*, *Oxychloe andina*, *Eleocharis albibracteata*, *Juncus* sp., *Scirpus* sp. La especie *Festuca orthophylla* debió ser tratada previamente con éter de petróleo (96%) y ácido nítrico (22%), debido a la dureza del material.

Las especies tratadas mediante diafanización fueron las siguientes:

a) Zona Central: *Carduus pycnocephalus*, *Carthamus lanatus*, *Hypochaeris glabra*, *H. scorzonerae*, *Malacothrix chevelandii*, *Silene gallica*, *Convolvulus arvensis*, *Dichondra sericea*, *Medicago polymorpha*, *Trifolium campestre*, *Vicia sativa*, *Sisyrinchium chilense*, *Stachys albicaulis*, *Linum usitatissimum*, *Oenothera acaulis*, *Plantago lanceolata*, *Rumex crispus*, *Anagallis foemina*, *Sherardia arvensis*, *Acacia caven* y *Rubus ulmifolius*. Sólo estas dos últimas especies son de carácter leñoso. Las muestras correspondientes a las especies *Trifolium angustifolium* y *T. dubium*, debido a su alta sensibilidad al método de diafanización, debieron ser hervidas por 5 min en alcohol (96%) e inmersas por 5 min en una solución 1:0,5 de alcohol (96%) y NaOH (5%).

b) Altiplano: *Aa nervosa*, *Alchemilla diplophylla*, *Astragalus* sp., *Arenaria rivularis*, *Cotula mexicana*, *Gentiana prostrata*, *Lilaeopsis andina*, *Myriophyllum acuaticum*, *Patria repens*, *Ranunculus uniflorus*. A otras especies como *Plantago barbata*, *Werneria popposa*, *W. pygmaea*, *W. sphatulata* e *Hypochaeris etcheagarayii*, se les debió modificar también el proceso de diafanización, debido a la alta sensibilidad del tejido. Para tal efecto, se hirvieron sólo por 5 min en alcohol (96%) y posteriormente, por 5 min en una solución 1:0,5 de alcohol (96%) y NaOH (5%).

Las especies tratadas por macerado fueron: Zona Central: *Torolis nodosa*, *Orthocarpus australis*, *Rumex acetosella*, *Trifolium subterraneum* y *T. striatum*.

Las especies tratadas por molido de planta fueron: Altiplano: *Parastrephia lucida* (especie leñosa baja).

Una de las características celulares mediante las cuales se identificaron las especies, destacó la disposición general de las células, que diferenció a poáceas y gramínoideas del resto de las otras familias herbáceas. A su vez, las poáceas se diferenciaron por las características de la pared celular (puntiagudas, profundas, superficiales, homogéneas o heterogéneas), el tamaño y la forma celular (rectangular, cuadradas, hexagonales), la presencia, forma y ubicación de las células de corcho y sílice (redondas, en forma de hueso, de H, multinodulares), y la presencia y forma de pelos o tricomas (unicelulares, multicelulares, lisos, ramificados, rectos, curvos, estrellados). En el resto de las familias herbáceas, la forma celular, la forma de los tricomas y

en algunos casos, la forma de los estomas (planos, ovales, cuadrados) permitió la identificación de las diferentes especies.

RESULTADOS

Para su caracterización, los diferentes patrones de la epidermis de las plantas seleccionadas fueron agrupados por familias y géneros. Al observar bajo el microscopio, y a pesar que las poáceas de la zona mediterránea presentaron características celulares similares, fue posible diferenciarlas entre sí. Las especies *Vulpia bromoides* y *Hordeum berteroanum*, aparentemente muy similares, se distinguieron en sus vainas, por el tipo de pared celular, siendo esta estructura más profunda en la primera especie. También estas dos especies presentaron diferencias en el tamaño de las células de la zona intermedia, las células de corcho y la forma de los estomas. En las láminas de estas especies, las diferencias fueron percatadas principalmente por la forma de los tricomas (Figuras 1 y 2). Las especies *V. bromoides* y *Lolium rigidum* (Figuras 1 y 3), aparentemente muy similares, se distinguieron en sus vainas por la forma de las células de corcho en los haces vasculares y distribución de los estomas, mientras que en sus láminas se diferenciaron por la presencia de estomas y el tamaño celular. Las especies *Stipa manicata* y *Bromus hordeaceus* (Figuras 4 y 5) se diferenciaron principalmente, tanto en vaina como en lámina, por la presencia de grandes tricomas (característica de *B. hordeaceus*) y la forma de las células de corcho (característica de *S. manicata*). Los distintos tipos de *S. manicata* (dos glabras y una pubescente) no se logró diferenciarlas, dadas sus características microhistológicas muy similares. Con relación a las especies de la familia *Fabaceae*, si bien la disposición, el tamaño y la forma celular permitieron diferenciar claramente este grupo de otras familias, las diferentes especies observadas mostraron una gran similitud, hecho que impidió la diferenciación de las diferentes especies (Figuras 6, 7 y 8).

Las especies leñosas de la zona mediterránea, *Rubus ulmifolius* y *Acacia caven*, se diferenciaron dado que la primera presenta tricomas multicelulares en forma de estrella muy singulares, mientras que *A. caven* se caracteriza por presentar estructuras foliares pequeñas en forma ovoide con pequeños tricomas en los bordes, las cuales fueron visibles con un menor aumento (Figuras 9 y 10).

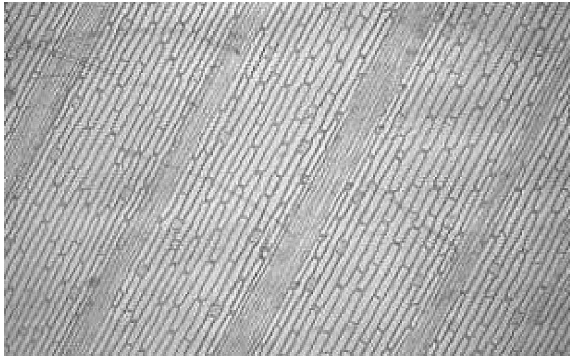


Figura 1. Epidermis de la vaina de *Vulpia bromoides*, obtenida mediante método de raspado. Aumento 100x.

Figure 1. Sheath epidermis of *Vulpia bromoides*, obtained by scraping method. Increment 100x.

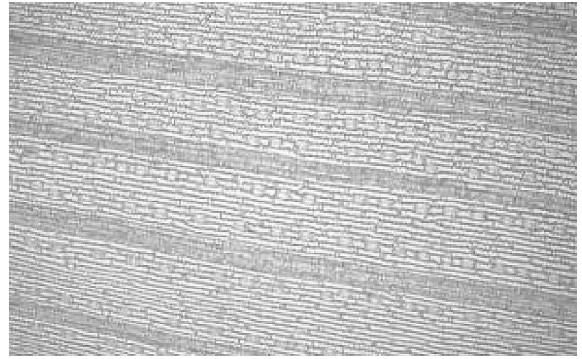


Figura 2. Epidermis de la vaina de *Hordeum berteroanum*, obtenida mediante método de raspado. Aumento 100x.

Figure 2. Sheath epidermis of *Hordeum berteroanum*, obtained by scraping method. Increment 100x.



Figura 3. Epidermis de la vaina de *Lolium rigidum*, obtenida mediante método de raspado. Aumento 100x.

Figure 3. Sheath epidermis of *Lolium rigidum*, obtained by scraping method. Increment 100x.

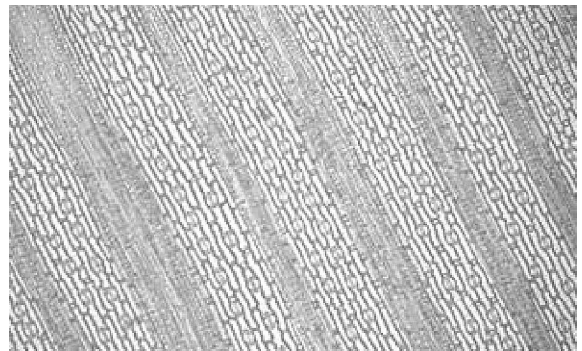


Figura 4. Epidermis de la lámina de *Stipa manicata*, obtenida mediante método de raspado. Aumento 100x.

Figure 4. Lamina epidermis of *Stipa manicata*, obtained by scraping method. Increment 100x.

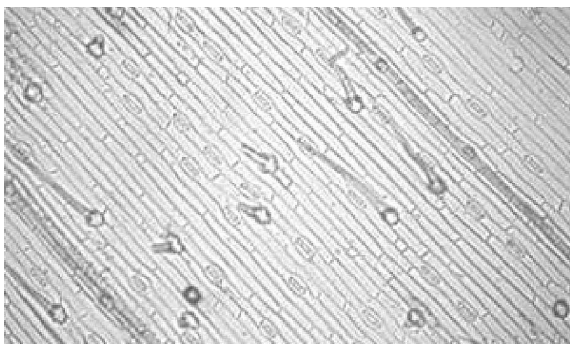


Figura 5. Epidermis de la lámina de *Bromus hordeaceus*, obtenida mediante método de raspado. Aumento 100x.

Figure 5. Lamina epidermis of *Bromus hordeaceus*, obtained by scraping method. Increment 100x.

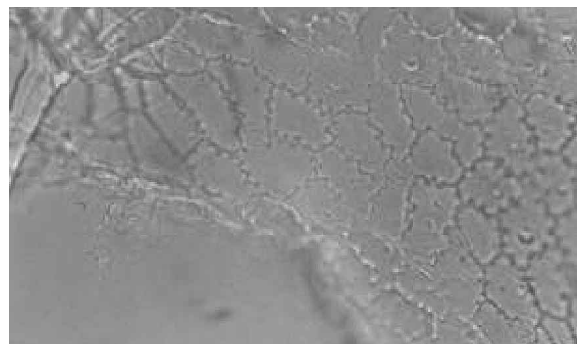


Figura 6. Epidermis de la lámina de *Trifolium subterraneum*, obtenida mediante método de diafanización. Aumento 400x.

Figure 6. Lamina epidermis of *Trifolium subterraneum*, obtained by diafanization method. Increment 400x.

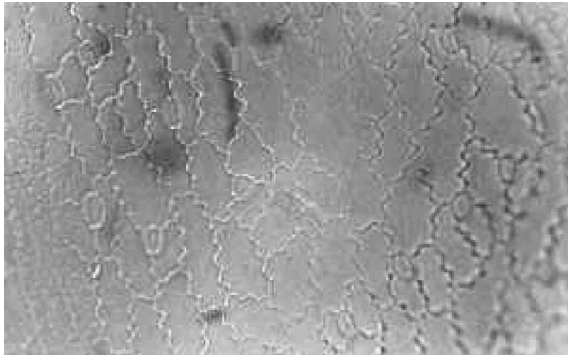


Figura 7. Epidermis de la lámina de *Trifolium campestre*, obtenida mediante método de diafanización. Aumento 400x.

Figure 7. Lamina epidermis of *Trifolium campestre*, obtained by diafanization method. Increment 400x.

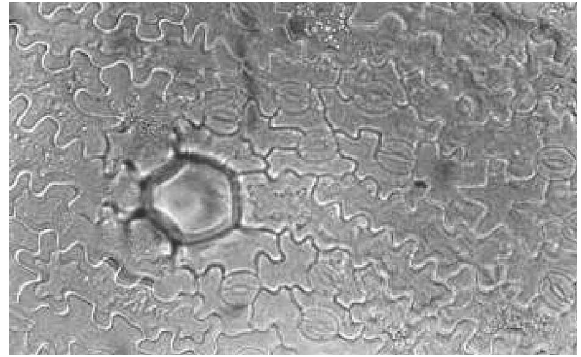


Figura 8. Epidermis de la lámina de *Vicia sativa*, obtenida mediante método de diafanización. Aumento 400x.

Figure 8. Lamina epidermis of *Vicia sativa*, obtained by diafanization method. Increment 400x.

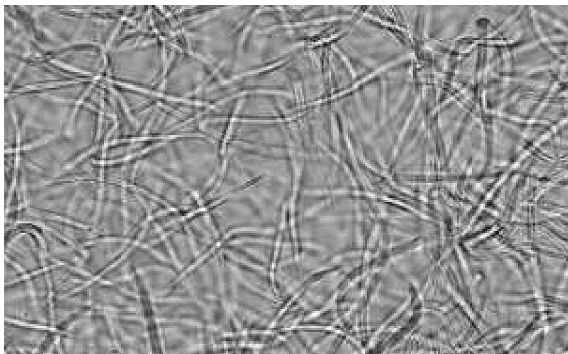


Figura 9. Epidermis de la lámina de *Rubus ulmifolius*, obtenida mediante método de diafanización. Aumento 200x.

Figure 9. Lamina epidermis of *Rubus ulmifolius*, obtained by diafanization method. Increment 200x.

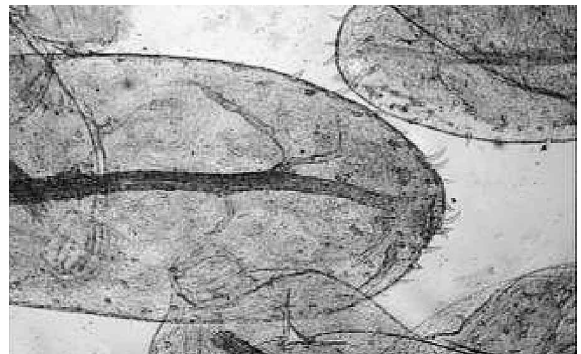


Figura 10. Epidermis de la lámina de *Acacia caven*, obtenida mediante método de diafanización. Aumento 40x.

Figure 10. Lamina epidermis of *Acacia caven*, obtained by diafanization method. Increment 40x.

Dentro de las poáceas y gramíneas del altiplano, en especies de distinto género como en el caso de *Deyeuxia jamesonii* y *Oxychloe andina*, respectivamente, la diferenciación se basó principalmente en la forma y tamaño de las células de la vaina y la lámina. *D. jamesonii* presentó en la vaina células rectangulares de bordes suaves, mientras que la vaina de *O. andina* presentó células hexagonales de bordes puntiagudos. En la lámina, a pesar que ambas presentaron células rectangulares, éstas fueron de diferentes dimensiones. Además, *D. jamesonii* presentó paredes celulares gruesas y profundas con una alta densidad de pelos, mientras que *O. andina*, presentó paredes celulares delgadas, menos profundas y con alta densidad de estomas de forma redondeada (Figuras 11 y 12). Las especies poáceas altiplánicas *Festuca orthophy-*

lla y *F. nardifolia* (Figuras 13 y 14), a pesar de ser del mismo género, se diferenciaron por la forma de la pared celular, tanto en la vaina como en la lámina. *F. orthophylla* presentó células epidérmicas rectangulares más anchas y cortas, de paredes más profundas y delgadas, en comparación a lo observado en *F. nardifolia*. Las especies latifoliadas herbáceas de esta zona fueron claramente diferenciables de otros grupos, a través de la observación de la disposición general de las células epidérmicas. Dentro de este grupo y a modo de ejemplo, las especies *Hypochaeris etchegarayii* y *Ranunculus uniflorus*, pudieron ser diferenciadas entre sí principalmente por la forma de las células epidérmicas. *H. etchegarayii* presentó células de forma hexagonal, mientras que en *R. uniflorus* la forma de las células fue redondeada (Figuras 15 y 16).

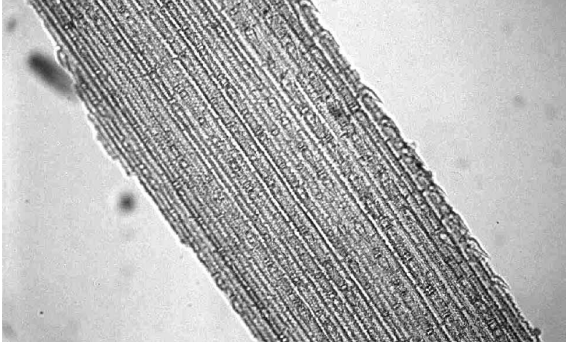


Figura 11. Epidermis de la lámina de *Deyeuxia jamesonii*, obtenida mediante método de raspado. Aumento 100x.
Figure 11. Lamina epidermis of *Deyeuxia jamesonii*, obtained by scraping method. Increment 100x.

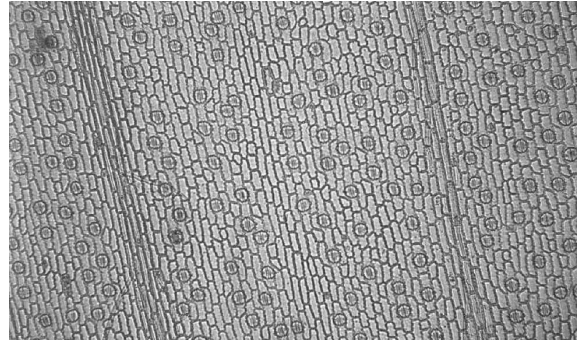


Figura 12. Epidermis de la lámina de *Oxychloe andina*, obtenida mediante método de raspado. Aumento 100x.
Figure 12. Lamina epidermis of *Oxychloe andina*, obtained by scraping method. Increment 100x.

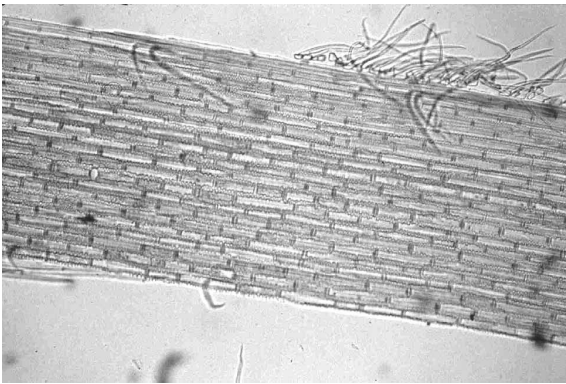


Figura 13. Epidermis de la lámina de *Festuca orthophylla*, obtenida mediante método de raspado, previo tratamiento con éter de petróleo y ácido nítrico. Aumento 100x.

Figure 13. Lamina epidermis of *Festuca orthophylla*, obtained by scraping method, prior treatment with ether and nitric acid. Increment 100x.

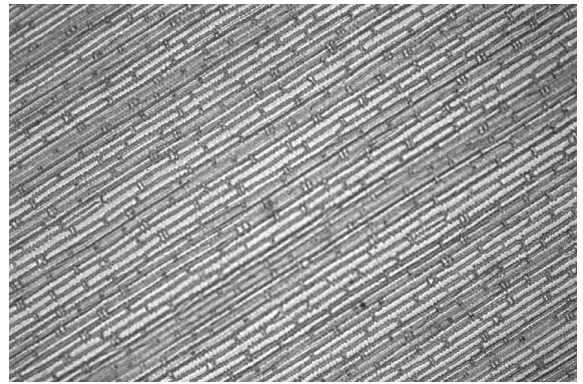


Figura 14. Epidermis de la lámina de *Festuca nardifolia*, obtenida mediante método de raspado. Aumento 100x.

Figure 14. Lamina epidermis of *Festuca nardifolia*, obtained by scraping method. Increment 100x.

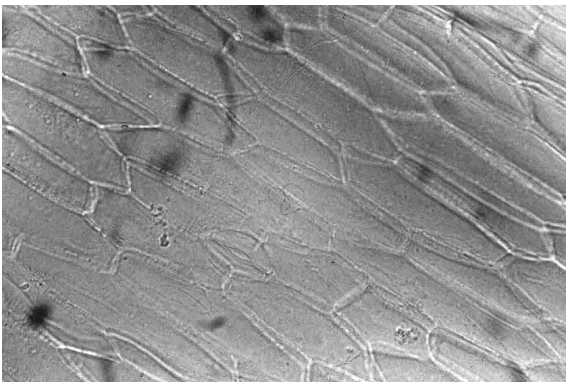


Figura 15. Epidermis de la lámina de *Hypochaeris etchegarayii*, obtenida mediante método de diafanización. Aumento 400x.

Figure 15. Lamina epidermis of *Hypochaeris etchegarayii*, obtained by diafanization method. Increment 400x.

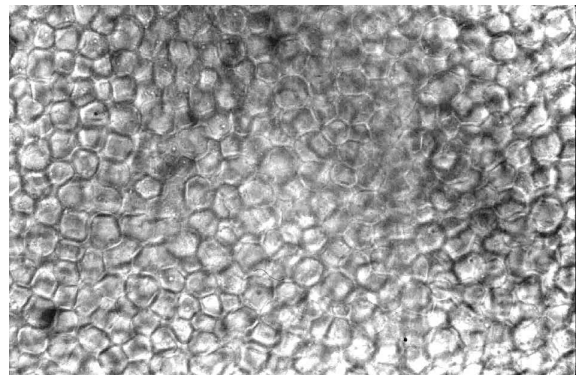


Figura 16. Epidermis de la lámina de *Ranunculus uniflorus*, obtenida mediante método de diafanización. Aumento 400x.

Figure 16. Lamina epidermis of *Ranunculus uniflorus*, obtained by diafanization method. Increment 400x.

CONCLUSIONES

Los procedimientos de extracción de epidermis descritos resultaron adecuados para la mayoría de las especies utilizadas, permitiendo la identificación y caracterización de este tejido.

En poáceas y graminoides es posible diferenciar fácilmente familias y géneros, e incluso, en algunos casos, identificar las diferentes especies.

Es posible diferenciar las poáceas del pastizal mediterráneo, aunque presentan gran similitud, mediante un análisis detallado de algunas de las características histológicas de su epidermis.

En poáceas de epidermis duras, como la *Festuca orthophylla*, se requiere un tratamiento con éter de petróleo (96%) y ácido nítrico (22%) previo al proceso de raspado.

La diferenciación de géneros dentro de la familia *Fabaceae* resultó más difícil debido a que presentaron características de la epidermis muy similares.

Algunas especies de latifoliadas herbáceas muestran una gran sensibilidad a la diafanización, por lo que conviene modificar esta técnica según el comportamiento individual de cada especie.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Proyecto FONDECYT N^o 1949292 y fondos proporcionados por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias para la realización de este trabajo. La identificación de las diferentes especies utilizadas en este estudio, fue realizada por el Ingeniero Agrónomo Sr. Luis Faúndez Y. académico de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

LITERATURA CITADA

- Bonino, N., y A. Pelliza Sbriller. 1991a. Composición botánica de la dieta del guanaco (*Lama guanicoe*) en dos ambientes contrastantes de Tierra del Fuego, Argentina. *Ecología Austral* 1:97-102.
- Bonino, N., y A. Pelliza Sbriller. 1991b. Comparación de las dietas del guanaco, ovino y bovino en Tierra del Fuego, Argentina. *Turrialba* 41(4):452-457.
- Castellaro, G., T. Ullrich, B. Wackwitz, y A. Raggi. 2004. Composición botánica de la dieta de alpacas (*Lama pacos* L.) y llamas (*Lama glama* L.) en dos estaciones del año, en praderas altiplánicas de un sector de la provincia de Parinacota, Chile. *Agric. Téc. (Chile)* 64:353-364.
- Colomé, G.A. 1978. Biología y ecología del huemul chileno (*Hippocamelus bisulcus*). Estudio de sus hábitos alimentarios. 73 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Escuela de Agronomía, Santiago, Chile.
- De Carolis, G. 1987. Descripción del sistema ganadero y hábitos alimentarios de camélidos domésticos y ovinos en el bofedal de Parinacota. 261 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Santiago, Chile.
- Holechek, J., M. Vavra, and R. Pieper. 1982. Botanical composition determination of range herbivore diets: A review. *J. Range Manage.* 35:309-315.
- Holechek, J.L., R.D. Pieper, and C.H. Herbel. 2001. Range management. Principles and practices. 587 p. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Johnson, M.K., H. Wofford, and H.A. Pearson. 1983. Microhistological techniques for food habits analyses. Research Paper SO-199. 40 p. USDA, Forest Service, New Orleans, Louisiana, USA.
- Klee, G., R. Pulido, y J. Chavarría. 2000. Selectividad de ovejas en la utilización de rastrojo de trigo como alimento. *Agric. Téc. (Chile)* 60:361-369.
- Martín, G.O. (h), y M.G. Aguilar 1994. Contribución a la metodología de extracción de epidermis vegetales para estudios de hábitos dietarios. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol. 14 Sup. 1. p. 83.
- Metcalf, C.R. 1960. Anatomy of monocotyledons. I. Gramineae. 731 p. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Ortega, I.M., M.I. Berger, y M. Flores. 1993. Manual de técnica microhistológica. 48 p. IBTA 113/Textos y Manuales 04/Rumiantes Menores (SR-CRSP) 05/1993. La Paz, Bolivia.
- Sparks, D., and J. Malechek. 1968. Estimating percentage dry weight in diets using a microscopic technique. *J. Range Manage.* 21:264-265.
- Stittmatter, C.G., y D.E. Dizeo. 1973. Nueva técnica de diafanización. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 15:126-129.