

DIGESTIÓN DE LÁMINAS FOLIARES DE *Bromus auleticus* Trin. ex Nees SOMETIDAS A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN RUMINAL

Digestion of *Bromus auleticus* Trin. ex Nees leaves submitted to different ruminal incubation times

Milagros Gasser¹, Julio Ramos¹, Abelardo Vegetti¹ y Juan Carlos Tivano¹ *

ABSTRACT

The decrease in the digestibility of forage is linked with an increase in cell walls and lignification of tissues as they mature. All forages are composed of a heterogeneous group of cell types with particular characteristics that determine the availability of polysaccharides to the rumen's microorganisms. In the present paper the degradation of *Bromus auleticus* Trin. ex Nees leaf tissues was studied at different incubation times in the rumen. Samples were taken in two phenological phases: vegetative and pre-flowering, which were submitted to different digestion times *in situ* on two dry Holando Argentine cows. Simultaneously, leaf blade sections were stained with phloroglucinol acid stain to detect the presence of lignin. Leaf anatomy influenced the degree of tissue digestion, whether due to lignified cell walls or accessibility. After 24 h incubation in the rumen, only the xylem, sclerenchyma and mestome sheath were undigested. The phloem and clenchyma were digested after 18 h in the pre-flowering phase and 24 h in the vegetative phase. The epidermis was partially digested, and the abaxial epidermis was better digested. The accessibility of carbohydrates in cell walls to the microflora of the rumen is limited by the chemistry of cell walls, and thus, highly organized tissues with secondary lignified walls, such as sclerenchyma and xylem, have a double barrier (physical and chemical) which prevent their digestion.

Key words: leaf anatomy, lignin, xylem, sclerenchyma, digestibility.

RESUMEN

La disminución de la digestibilidad en los forrajes está asociada al incremento de la pared celular y lignificación de los tejidos a medida que maduran. Todos los forrajes están compuestos de un conjunto heterogéneo de tipos celulares con características únicas que determinan la disponibilidad de los polisacáridos a los microorganismos del rumen. Este trabajo estudió la degradación de los tejidos foliares de cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trin. ex Nees) a diferentes tiempos de incubación ruminal. Se tomaron muestras de láminas foliares en dos estados fenológicos: vegetativo y prefloración, las cuales fueron sometidas a diferentes tiempos de digestión *in situ* en dos vacas Holando Argentino secas. Paralelamente secciones de láminas foliares fueron teñidas con fluoroglucinol para detectar la presencia de lignina. La anatomía foliar influyó en el grado de digestión de los tejidos, ya sea por la lignificación en las paredes celulares como por su accesibilidad. Luego de 24 h de incubación ruminal, solamente permanecieron indigeridos el xilema, el esclerénquima y la vaina mestomática. El floema y el clorénquima fueron digeridos luego de 18 h en prefloración y 24 h en estado vegetativo. La degradación de la epidermis fue parcial y la abaxial fue digerida en mayor grado. La accesibilidad a los carbohidratos de las paredes celulares por la microflora del rumen está limitada por el arreglo estructural de cada tipo de tejido, y por la química de las paredes celulares, así, tejidos altamente ordenados y de paredes secundarias lignificadas como el esclerénquima y el xilema tienen una doble barrera (física y química) que impide su digestión.

Palabras clave: anatomía foliar, lignina, xilema, esclerénquima, digestibilidad.

Trabajo subsidiado por Curso de Acción para la Investigación y el Desarrollo (C.A.I.+D.).

¹ Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Agrarias. Kreder 2805, CP 3080 Esperanza, Santa Fe, Argentina.

E-mail: jctivano@unl.edu.ar *Autor para correspondencia.

Recibido: 31 de marzo de 2003. Aceptado: 16 de septiembre de 2003.

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes obtienen de los forrajes la energía necesaria para su metabolismo por fermentación microbiana de los tejidos vegetales (Akin, 1982). Altas producciones de leche o elevadas ganancias diarias de peso vivo requieren de un gran consumo de forrajes y alta digestibilidad de las paredes celulares. La organización estructural de los tejidos que integran los órganos de las plantas influyen sobre el consumo a través de su efecto sobre la tasa de pasaje por el rumen, del tamaño y naturaleza de la partícula producida, y además afecta la digestibilidad de la materia seca (MS) por medio de las características de la pared celular, las que determinan la disponibilidad de sus polisacáridos para los microorganismos del rumen (Wilson, 1993; Jung *et al.*, 1996).

Todos los forrajes están compuestos de un conjunto heterogéneo de tipos celulares, cada uno de los cuales tiene una pared celular con características únicas. En las hojas, las células están organizadas en tejidos especializados que definen tres sistemas: el dérmico, que comprende a la epidermis, una envoltura protectora externa que recubre el cuerpo de la planta; el vascular, compuesto por el xilema como conductor de agua y el floema como conductor de savia; y el fundamental, que incluye los tejidos básicos de la planta con distintos grados de especialización como es el caso del clorénquima y el esclerénquima. Este último, junto al xilema son los principales tejidos de sostén, con paredes gruesas y lignificadas (Esau, 1982). La disminución de la digestibilidad en los forrajes está asociada al incremento de pared celular y a la lignificación de los tejidos a medida que maduran (Chesson, 1993; Jung *et al.*, 1996; Wilson y Hatfield, 1997). Las paredes celulares muy delgadas (0,1 a 0,2 μm), primarias y no lignificadas del clorénquima y el floema, no constituyen un problema para su digestión (Wilson, 1993). El xilema y el esclerénquima, tienen paredes celulares secundarias (de 1 a 3 μm de espesor), lignificadas, y representan un obstáculo para su degradación en el rumen (Wilson, 1997).

La proporción de los tejidos foliares, el espesor de las paredes celulares y el grado de lignificación pueden ser modificados por factores ambientales y el manejo agronómico. Se ha observado que

el adelanto de las fechas de siembras (Masciángelo *et al.*, 2002), la fertilizaciones nitrogenadas (Van Arendonk *et al.*, 1997; Garnier *et al.*, 1999), y el adecuado suministro de agua (Buxton, 1996), tienen una relación positiva con la cantidad de tejidos no lignificados y la digestibilidad de los forrajes.

La cebadilla chaqueña (*Bromus auleticus* Trin. ex Nees) es una especie C_3 , perenne, nativa del centro de Argentina con potencial de ser utilizada como forrajera invernal (Zuloaga *et al.*, 1994) por la calidad y cantidad de forraje producido (Olmos, 1993).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la degradación de los tejidos foliares de cebadilla chaqueña en diferentes tiempos de incubación ruminal en dos estados fenológicos: vegetativo y prefloración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se cultivaron plantas de una población de *B. auleticus* de Lehmann (Departamento Castellanos, Provincia de Santa Fe, Argentina, 31°32'lat. Sur; 61°32'long. Oeste); el ensayo se realizó en 1994, en el Jardín Botánico de la Facultad de Ciencias Agrarias de Esperanza, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Departamento Las Colonias, Santa Fe, Argentina.

Se tomaron muestras de láminas foliares de *B. auleticus* en dos momentos: uno en el mes de mayo, cuando la planta se encontraba en estado vegetativo (vegetativo), y el segundo en octubre sobre un rebrote de 20 días de crecimiento, estando las plantas inducidas para florecer (prefloración).

Pruebas de digestión *in situ*

El forraje cosechado fresco se cortó con tijeras en fracciones de 1,5 a 2,5 cm (Frecentese y Stritzler, 1985). Posteriormente 5 g de las muestras se colocaron en cada bolsa de poliéster de 10 x 20 cm, con poros de $50 \pm 15 \mu\text{m}$ para ser incubadas dentro del rumen de dos vacas Holando Argentino secas provistas de cánulas.

Las vacas se alimentaron con heno de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con 17% de proteína bruta (PB) y 60% de digestibilidad de MS *in vitro* (DIVMS). Se realizaron dos incubaciones por

animal durante 4, 8, 16 y 24 h al estado vegetativo, y 6, 12, 18 y 24 h al estado de prefloración.

Observación con microscopio electrónico

Luego del tiempo de incubación, de cada muestra se tomaron secciones de aproximadamente 2 mm cortadas a mano, se montaron sobre platinas y se colocaron en estufa a 65°C, durante 12 h. Posteriormente, las muestras se recubrieron con una película de oro utilizando un evaporador de laboratorio (Veeco Instruments Inc., modelo VE-300, Plainview, Long Island, NY, USA), en atmósfera de argón para su observación y obtención de microfotografías con microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-35C, Tokio, Japón) a 25 kV. Sobre éstas se determinó el grado de degradación de los tejidos según el estado de las paredes celulares. Se establecieron cuatro categorías: D: altamente digerido, el tejido está ausente; AD: digestión avanzada, se observan restos de paredes sin digerir; P: parcialmente digerido, las paredes muestran escasa digestión; I: indigerido, las paredes no presentan signos de digestión y están intactas.

Análisis histoquímico

Las láminas muestreadas que no se incubaron en el rumen, se conservaron refrigeradas a 4°C, luego se prepararon secciones transversales cortadas con micrótopo de congelación (Leitz 1310, Wetzlar, Germany), las que se sometieron al test de fluoroglucina y ácido clorhídrico para detectar lignina (Jensen, 1962). La reacción positiva al test se manifiesta por una coloración roja o ro-

sada según sea el proceso de lignificación más o menos intenso, respectivamente. Una reacción negativa con fluoroglucinol, permanecen incolores, generalmente marca aquellas partes del parénquima que muestran una amplia degradabilidad (Ohlde *et al.*, 1992).

RESULTADOS

La intensidad de la degradación microbiana sobre cada tejido foliar a diferentes tiempos de incubación en el rumen se observa en el Cuadro 1.

Estado vegetativo

En láminas foliares con 4 y 8 h de incubación ruminal no se observó digestión apreciable de los tejidos vegetales, tanto de los fácilmente digestibles (clorénquima y floema), como de los pobre o lentamente digestibles (xilema, esclerénquima, vaina mestomática, vaina parenquimática y epidermis).

Luego de 16 h de incubación ruminal de las muestras al estado vegetativo, la desaparición del mesófilo fue avanzada pero no se completó, y el floema comenzó a ser digerido en algunos haces. La vaina parenquimática de los haces vasculares permaneció intacta o apenas digerida en los haces mayores, mientras que en los haces menores su desaparición fue más importante. La epidermis adaxial apareció intacta y en las zonas en que estaba ausente se debió a su desprendimiento, mientras que la abaxial presentó algún

Cuadro 1. Grado de digestión *in vivo* de tejido foliar en estados vegetativo y prefloración de *Bromus auleticus* con distintos períodos de digestión ruminal.

Table 1: Degree of digestion *in vivo* of the *Bromus auleticus* leaf tissues in vegetative and pre-flowering states with different ruminal digestion times.

	Tiempo de digestión ruminal							
	Estado vegetativo				Estado prefloración			
	4 h	8 h	16 h	24 h	6 h	12 h	18 h	24 h
Xilema	I	I	I	I	I	I	I	I
Floema	I	P	AD	D	P	AD	D	D
Vaina mestomática	I	I	I	I	I	I	I	I
Vaina parenquimática	s.i.	s.i.	P	AD	s.i.	P	AD	s.i.
Esclerénquima	I	I	I	I	I	I	I	I
Clorénquima	P	P	AD	D	P	AD	D	D
Epidermis	I	P	P	P	I	P	P	AD

AD: digestión avanzada, D: digerido, I: indigerido, P: parcialmente digerido, s.i.: sin información.

grado de digestión quedando en algunas células sólo sus paredes tangenciales externas y otras sin degradar. En el extremo marginal de la lámina se pudo observar parte del mesófilo (Figura 1 A y B).

Al cabo de 24 h de incubación ruminal, los únicos tejidos que permanecieron indigeridos fueron el xilema, esclerénquima y vaina mestomática.

Estado prefloración

Después de 6 h de incubación ruminal de las láminas (Cuadro 1), las paredes celulares del mesófilo estaban colapsadas. Los haces vasculares, la vaina mestomática, y los casquetes de esclerénquima permanecieron intactos debido a sus paredes lignificadas, mientras que la vaina parenquimática se encontró colapsada. Además, en ciertas regiones desapareció el mesófilo, especialmente en zonas cercanas a la epidermis abaxial y a la de los haces mayores. El floema fue digerido en algunos haces vasculares.

Luego de 12 h de digestión, el mesófilo y el floema de las muestras al estado de prefloración desaparecieron completamente. En la epidermis abaxial, las paredes tangenciales internas de las células más grandes habían desaparecido. La vaina parenquimática de los haces fue parcialmente digerida, quedando como remanentes las paredes tangenciales internas, posiblemente debido al alto grado de lignificación de la laminilla media que une dichas células con las de la vaina mestomática que permaneció intacta (Figura 1 C). Los estomas no sufrieron degradación.

La epidermis adaxial del tejido prefloración se desprendió completamente después de 18 h de incubación, conjuntamente con los casquetes de esclerénquima asociados a la misma. Esto se debió a que algunas células de tipo parenquimático, interpuestas entre el casquete adaxial y la vaina mestomática, al ser digeridas permitieron la separación de los casquetes de esclerénquima adaxiales y su correspondiente epidermis. Algunas células de la vaina parenquimática permanecieron unidas a la mestomática, en la zona adyacente a los casquetes de esclerénquima que se desprendieron. En algunas regiones estaban ausentes las paredes tangenciales internas de la epidermis abaxial.

Solamente permanecieron los tejidos xilemáticos rodeados por su vaina mestomática y casquete de esclerénquima abaxial al cabo de 24 h de digestión *in situ*. Dichas unidades de tejido se mantuvieron unidas por las paredes tangenciales externas de la epidermis abaxial (Figura 1 D). Se observaron agujones epidérmicos intactos.

Respecto al test con fluoroglucinol (Cuadro 2), el xilema mostró una reacción positiva fuerte en ambas ocasiones, la vaina mestomática dió reacción fuertemente positiva en prefloración y menor en el estado vegetativo, con lo que se dedujo una progresiva lignificación de la misma. El esclerénquima en ambas muestras presentó reacción intermedia entre el xilema y el resto de los tejidos. Además, se observó un grupo de células parenquimáticas incoloras, correspondientes a la vaina de parénquima que no se tiñeron con fluoroglucinol, que se encuentran entre la vaina mestomática del haz vascular y el casquete de esclerénquima de la cara adaxial.

DISCUSIÓN

La composición y organización molecular de las paredes celulares es el determinante mayor en la tasa y extensión de la degradación de las paredes celulares de células aisladas; sin embargo, ese comportamiento no se observa *in vivo* (Chesson, 1993), debido a que las células integran tejidos y la estructura de éstos pueden tener más influencia en su degradación en el rumen que la propia composición química de sus paredes (Chesson, 1993; Wilson y Hatfield, 1997).

Sleper y Roughan (1984), luego de 3 h de incubación de lámina foliar de *Phleum pratense* L., encontraron que el mesófilo, la epidermis y el floema estaban altamente degradados, y sólo quedaban la cutícula, el esclerénquima y el xilema; mientras que chéptica (*Agrostis capillaris* L.) casi no evidenciaba digestión luego de 6 h de incubación, a pesar de ser ambas C₃. La mayor velocidad de desaparición de *P. pratense* se relacionó a la mayor proporción de espacios intercelulares.

Con respecto a la degradación ruminal de los tejidos foliares en estado vegetativo y prefloración,

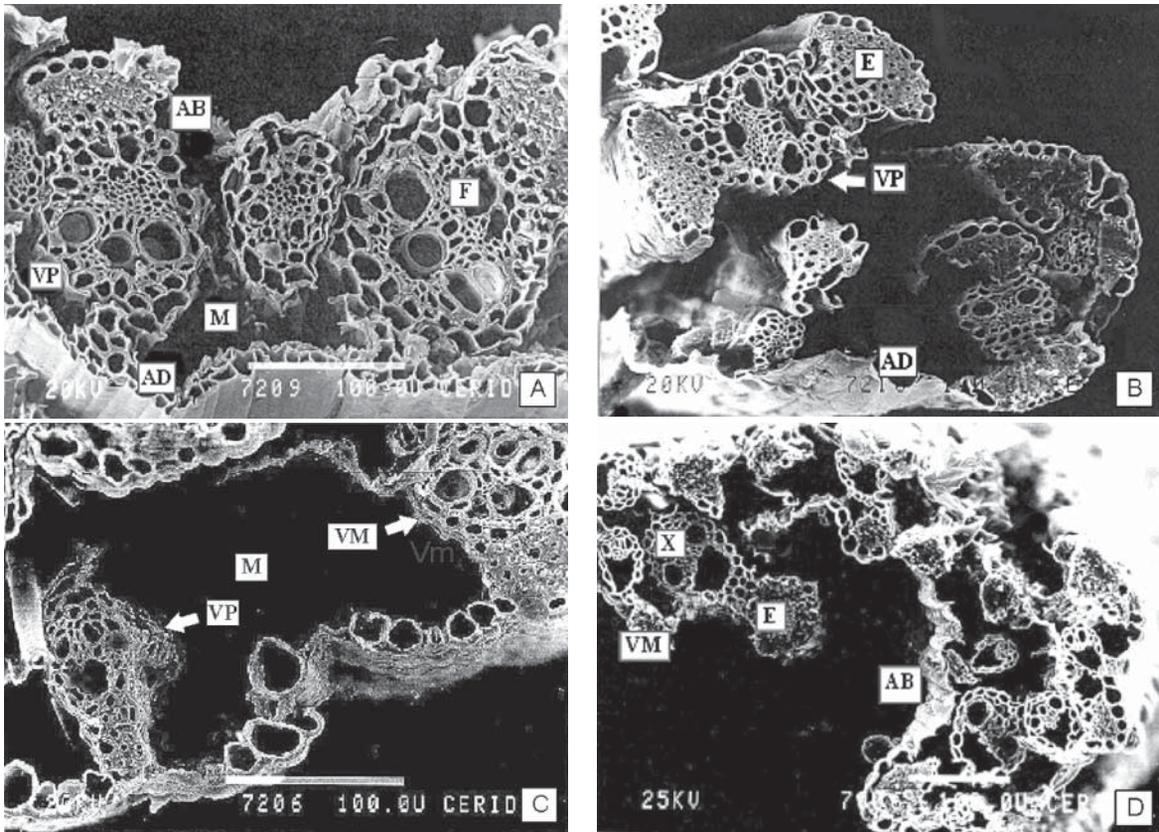


Figura 1. Microfotografías de barrido de láminas de *Bromus auleticus*: A y B: en estado vegetativo sometidas a 16 h de digestión ruminal; C: en estado de prefloración sometidas a 12 h de digestión ruminal; D: en estado de prefloración sometidas a 24 h de digestión ruminal.

Figure 1. Scanning microphotographs of *Bromus auleticus* blades: A and B: vegetative stage submitted to 16 h of ruminal digestion; C: pre-flowering stage submitted to 12 h of ruminal digestion; D: pre-flowering phase submitted to 24 h of ruminal digestion.

AB: epidermis abaxial; AD: epidermis adaxial; E: esclerénquima; F: floema; M: mesófilo; VM: vaina mestomática; VP: vaina parenquimática y X: xilema. La escala mide 100 μ m.

Cuadro 2. Reacción al test de fluoroglucinol para detección de lignina en distintos tejidos foliares: vegetativo y prefloración al estado fresco.

Table 2: Reaction to the fluoroglucinol test to detect lignin in different leaf tissues at the vegetative and pre-flowering stages.

Tejido foliar	Coloración					
	Rojo		Rosado		Incoloro	
	V	PF	V	PF	V	PF
Xilema	*	*				
Floema					*	*
Vaina mestomática		*	*			
Vaina parenquimática					*	*
Esclerénquima			*	*		
Clorénquima					*	*
Epidermis					*	*

* : Indica color o lectura que corresponda.

V: vegetativo; PF: prefloración.

B. auleticus siguió el patrón característico de las gramíneas: mesófilo y floema (rápidamente degradados) > epidermis y vaina parenquimática del haz (lentamente degradados) > esclerénquima (lentamente a no degradado) > cutícula y tejidos vasculares lignificados (no degradados) (Akin y Burdick, 1975; Magai *et al.*, 1994).

Determinadas características de la anatomía foliar influyeron en el grado de digestión de los tejidos, ya sea por su lignificación o por su accesibilidad. Como se vio anteriormente, las costillas que permanecen entre los surcos de la hoja están en estrecha relación con los haces vasculares, y tienen tamaño similar independiente del orden de haz vascular que contenga, mientras que no hay desarrollo de costillas y surcos en la cara abaxial. Esto provocó la digestión diferencial de las epidermis, siendo rápidamente digerida la abaxial, probablemente debido a un menor grado de cutinización y lignificación.

Todos los haces vasculares de cebadilla criolla poseen doble vaina, una mestomática continua y una parenquimática, que se encuentra interrumpida en la zona abaxial en los haces vasculares de primer y segundo orden, donde se presentan extensiones de la vaina del haz que comunican el esclerénquima abaxial con la vaina del haz. Dichas células de características parenquimáticas, y que según el test con fluoroglucinol no estaban lignificadas, al ser digeridas permitieron la separación de los casquetes de esclerénquima adaxiales y su correspondiente epidermis. Esto permitió el acceso a la vaina parenquimática del haz y al parénquima del protoxilema, quedando indigerido el metaxilema.

El mesófilo, el floema, la vaina parenquimática y la epidermis se digirieron más rápidamente en las muestras en prefloración que en estado vegetativo. Probablemente este comportamiento se deba a que la muestra de láminas en prefloración corresponde a un rebrote de 20 días de crecimiento. Se observó que el xilema, el esclerénquima y la vaina mestomática del haz siempre permanecieron indigestibles, coincidiendo con las determinaciones de lignina con fluoroglucinol. Grenet y Jamot (1989) observaron

en raigrás o ballica (*Lolium multiflorum* Lam.) que el esclerénquima de las láminas, que había dado reacción positiva con fluoroglucinol, permaneció indigerido luego de 8 h de incubación, junto con el xilema y la cutícula que permanecieron intactos.

La pared secundaria lignificada en gramíneas no es completamente indigestible, puede ser digerida cuando se facilita el acceso de los microorganismos del rumen a ellas. La pobre digestibilidad observada se debe a los límites impuestos por la estructura. El conjunto formado por la laminilla media (LM) y la pared primaria (PP), es el sitio donde comienza la deposición de lignina, que es indigestible (Wilson, 1993), y constituye una de las limitantes mayores a la digestión de las gruesas paredes secundarias lignificadas. A su vez, la LM cementa las células adyacentes, consecuentemente las fibras forman grandes partículas multicelulares, muchas de las cuales no tienen extremos rotos, por lo que resultan completamente indigestibles.

La accesibilidad a los carbohidratos de las paredes celulares por la microflora del rumen está limitada por el arreglo estructural de cada tejido y por la química de las paredes celulares (Wilson, 1993); de esta manera, tejidos altamente ordenados y de paredes secundarias lignificadas como el esclerénquima y el xilema, tienen una doble barrera física y química que impide su digestión (Wilson y Hatfield, 1997). Esto parece ocurrir en los tejidos lignificados de la cebadilla chaqueña. De acuerdo a las pruebas histoquímicas, el esclerénquima en los estados vegetativos y prefloración está menos lignificado que el xilema y la vaina mestomática, sin embargo, luego de 24 h de digestión *in situ* permaneció indigerido al igual que éstos.

CONCLUSIÓN

En *B. auleticus*, las paredes secundarias del xilema y la vaina mestomática se lignificaron más que las del esclerénquima, tanto en estado vegetativo como en prefloración. A pesar de esta lignificación diferencial, estos tejidos permanecieron intactos después de 24 h de digestión.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a la Ingeniero Agrónomo M. Sci. Mirian Gallardo, del Instituto Nacional de Tec-

nología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria de Rafaela, que permitió la realización de las pruebas de digestibilidad.

LITERATURA CITADA

- Akin, D.A. 1982. Section to slide technique for study of forage anatomy and digestion. *Crop Sci.* 22:444-446.
- Akin, D.A., and D. Burdick. 1975. Percentage of tissues types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. *Crop Sci.* 15:661-668.
- Buxton, D.R. 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:37-49.
- Chesson, A. 1993. Mechanistic models of forage cell wall degradation. p. 347-375. *In* H.G. Jung *et al.* (eds.). Forage cell wall structure and digestibility. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- Esau, K. 1982. Anatomía de las plantas con semillas. 512 p. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Frecentesse, M.A., y N.P. Stritzler. 1985. Ataque diferencial de la flora ruminal bovina sobre los tejidos foliares de gramíneas estivales. *Rev. Arg. Prod. Anim. (Argentina)* 5:531-540.
- Garnier, E., J.L. Salager, G. Laurent, and L. Sonié. 1999. Relationships between photosynthesis, nitrogen and leaf structure in 14 grass species and their dependence on the basis of expression. *New Phytol.* 143:119-129.
- Grenet, E., and J. Jamot. 1989. Kinetic study of the rumen microbial degradation of lucerne and Italian ryegrass observed by scanning electron microscopy. *In* R. Jarrige (ed) XVI International Grassland Congress. 4-11 October. French Grassland Society, Nice, France.
- Jensen, W.A. 1962. Botanical histochemistry. Principles and practice. 408 p. W.H. Freeman & Company, San Francisco, California, USA.
- Jung, H., D.R. Buxton, R.D. Hatfield, D.R. Mertens, J. Ralph, and P.J. Weimer. 1996. Genetic manipulation of cell wall. Informational conference with dairy and forage industries. US Dairy Research Center. Available in: http://www.dfrc.wisc.edu/Research_Summaries/ind_meet/dfrc2.pdf Accessed 17 December 2002.
- Magai, M.M., D.A. Sleper, and P.R. Beuselinck. 1994. Degradation of three warm season grasses in a prepared cellulase solution. *Agron. J.* 86:1049-1053.
- Masciángelo, P., J.C. Tivano, y J.C. Ramos. 2002. Influencia de la fecha de siembra en la anatomía cuantitativa foliar de un híbrido de maíz para silo. VII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Octubre de 2002. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Ohlde, G.W., D.E. Akin, K. Becker, L.L. Kigsby, and C.E. Lyon. 1992. Differences in rumen bacterial degradation of morphological fractions in eight cereal straws and the effect of digestion on different types of tissues and mechanical properties of straw stalks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 36:173-186.
- Olmos, F. 1993. *Bromus auleticus*. 30 p. Serie Técnica N° 35. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Montevideo, Uruguay.
- Sleper, D.A., and P.G. Roughan. 1984. Histology of several cool-season forage grasses digested by cellulase. *N.Z. J. Agric. Res.* 27:161-79.
- Van Arendonk, J.J., G.J. Nieman, J.J. Boon, and H. Lambers. 1997. Effects of nitrogen supply on the anatomy and chemical composition of leaves of four grass species belonging to the genus *Poa*, as determined by image-processing analysis and pyrolysis-mass spectrometry. *Plant Cell Environ.* 20:881-897.
- Wilson, J.R. 1993. Organisation of forage plant tissues. p. 1-32. *In* H.G. Jung *et al.* (eds.). Forage cell wall structure and digestibility. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- Wilson, J.R. 1997. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. p. 173-208. *In* J.A. Gomide (ed.) Anais do simpósio internacional sobre produção animal em pastejo. Departamento de Zootecnia. Universidade Federal de Viçosa. 4-6 november 1997. Brasil.
- Wilson, J.R., and R.D. Hatfield. 1997. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: Consequence for fibre degradation rumen microflora. *Aust. J. Agric. Res.* 48:165-180
- Zuloaga, F.O., E.G. Nicora, Z.E. Rúgolo, O. Morrone, J. Pensiero, y A.M. Cialdella. 1994. Catálogo de la familia Poaceae en la República Argentina. 178 p. Missouri Botanical Garden, Saint Louis, Missouri, USA.