

# Determinación de compuestos hidrocarbonados en la pared celular de *P. maximum* y *L. leucocephala* en silvopastoreo

## Determination of hydrocarbonated compounds in the cell wall from *P. maximum* and *L. leucocephala* under silvopastoral system conditions

Tania Sánchez<sup>1</sup>, R. Pedraza<sup>2</sup>, B. Mayes<sup>3</sup> y B. Øskorv<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"

Central España Republicana CP 44280, Matanzas, Cuba

<sup>2</sup>CEDEPA, Universidad de Camagüey, Cuba

<sup>3</sup>Instituto de Investigación de Macaulay, Escocia  
E-mail: [tania.sanchez@indio.atenas.inf.cu](mailto:tania.sanchez@indio.atenas.inf.cu)

### Resumen

Con el objetivo de determinar la concentración de *n*-alcanos y alcoholes de cadena larga en la pared celular de *Panicum maximum* cv. Likoni y *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham, se realizó un estudio en una asociación de gramíneas mejoradas y leucaena de 10 años de establecida, la cual ocupa un área de 1,6 ha. Se seleccionaron dichas especies por ser las más representativas en la composición florística. Las muestras se colectaron de enero a diciembre del 2005 y se secaron. La concentración de *n*-alcanos de cadena impar fue de 167,97 y 222,96 mg/kg de MS y 134,11 y 137,27 mg/kg de MS para guinea y leucaena, en el período poco lluvioso y en el lluvioso, respectivamente. A su vez la concentración de alcoholes de cadena par para la leucaena presentó un valor mayor (2 754,60 y 3 830,18 mg/kg de MS para el período poco lluvioso y lluvioso, respectivamente), que en la guinea (2 571,73-3 679,65 mg/kg de MS para cada período, respectivamente). Se concluye que la concentración de *n*-alcanos de cadena larga impar fue baja para *P. maximum* y *L. leucocephala* en ambos períodos del año; sin embargo, presentaron concentraciones elevadas de alcoholes de cadena larga par, que pudieran ser utilizados como marcadores naturales en las dos especies.

Palabras clave: Alcoholes, *L. leucocephala*, *n*-alcanos, *P. maximum*, pared celular

### Abstract

With the objective of determining the concentration of *n*-alkanes and long-chain alcohols in the cell wall of *Panicum maximum* cv. Likoni and *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham, a study was conducted in an association of improved grasses and leucaena ten years after being established, which occupies an area of 1,6 ha. Such species were selected for being the most representative ones in the floristic composition. The samples were collected from January to December, 2005 and were dried. The concentration of odd-chain *n*-alkanes was 167,97 and 222,96 mg/kg DM and 134,11 and 137,27 mg/kg DM for Guinea grass and leucaena in the dry and rainy season, respectively. In turn, the concentration of even-chain alcohols for leucaena showed a higher value (2 754,60 and 3 830,18 mg/kg DM for the dry and rainy season, respectively), than in Guinea grass (2 571,73-3 679,65 mg/kg DM for each season, respectively). The concentration of long odd chain *n*-alkanes was concluded to be low for *P. maximum* and *L. leucocephala* in both seasons; however, they showed high concentrations of long even chain alcohols, which could be used as natural markers in both species.

Key words: Alcohols, *L. leucocephala*, *n*-alkanes, *P. maximum*, cell wall

### Introducción

En las asociaciones de gramíneas y leucaena, la medición de la composición botánica de la dieta y el consumo de los rumiantes en pastoreo, con exactitud, sin provocar daños físicos a los animales, es una tarea difícil. Se hace necesario promover métodos que empleen las heces, las cuales se recolectan sin afectar la integridad de estos.

Según Mayes (2001) las heces de los herbívoros están constituidas por residuos de material indigestible de las plantas, el cual contiene un grupo de compuestos hidrocarbonados que se pueden emplear como marcadores naturales y estimar la composición botánica de la dieta, el consumo y su digestibilidad. Estos compuestos se miden con exactitud por cromatografía gaseosa; no obstante, para emplearse con este fin es preciso realizar una caracterización inicial de su concentración en las plantas.

La mayoría de las plantas contienen en su pared celular, hidrocarburos saturados de cadena larga, que tienen entre 21 y 35 carbonos, dentro de los que se encuentran los *n*-alcanos de cadena. En la literatura internacional aparece reportado la concentración de *n*-alcanos de un grupo de gramíneas y leguminosas, entre las que se pueden señalar *Chloris gayana*, *Cenchrus ciliaris*, *Stylosanthes guianensis*, *Agrostis capillaris*, *Betula pendula* y *Vaccinium myrtillus* (Dawson *et al.*, 2000; Mayes, 2001; Ali *et al.*, 2005).

Uno de los primeros estudios que se reportó en Cuba fue el de Delgado *et al.* (2000), quienes evaluaron 17 especies de plantas forrajeras tropicales: seis gramíneas, ocho leguminosas y tres arbóreas pertenecientes a otras familias, para caracterizar la composición de *n*-alcanos de cadena larga presentes en la pared celular.

Por otra parte, en las plantas existen otros compuestos que se están investigando como marcadores, entre los que se hallan los alcoholes y ácidos grasos de cadena larga, que resultan de particular importancia para aquellas que tienen bajos contenidos de *n*-alcanos y es una alternativa en dietas con más de dos especies (Kelman *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2004). De ahí que el objetivo del trabajo fuera determinar la concentración de *n*-alcanos y alcoholes de cadena larga en la pared celular de *Panicum maximum* y *Leucaena leucocephala*, en un sistema asociado.

### Materiales y Métodos

**Localización.** Las muestras se recogieron de una asociación de gramíneas mejoradas y *L. leucocephala* cv. Cunningham de 10 años de establecida en la EEPF "Indio Hatuey", la cual se encuentra situada a los 22°48'7" de latitud norte y los 81°1' de longitud oeste, a 19,01 m sobre el nivel del mar.

**Clima.** La temperatura media anual fue de 23°C, con una media de 21°C y 27°C en invierno y en verano, respectivamente. La precipitación anual fue de 1 300 mm, con una variación de 1 000-1 200 mm en el período lluvioso (PLL) y de 200-400 mm en el período poco lluvioso (PPLL).

**Suelo.** El experimento se desarrolló en un suelo Ferralítico Rojo lixiviado del subtipo nodular ferruginoso (Hernández *et al.*, 1999). Este se caracteriza por poseer un pH moderadamente ácido (5,6), medianamente abastecido de nitrógeno (0,18%) y materia orgánica (3,20%), niveles bajos de fósforo asimilable (2,43 mg/100 g), el calcio como elemento predominante entre los cationes cambiables (Ca<sup>++</sup> 11,84 meq/100 g) y una capacidad de intercambio catiónico considerada de moderada a baja (19,21 meq/100 g).

**Composición florística del pastizal.** A pesar de que se detectaron otras especies (*Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Teramnus labialis*, *S. guianensis* y *Centrosema molle*), la gramínea *P. maximum* cv. Likoni y la leguminosa arbórea *L. leucocephala* cv. Cunningham, aprobadas como variedades comerciales (Machado y Seguí, 1997), se encontraron en mayor porcentaje en los potreros muestreados (superior al 80% en ambos casos).

*Manejo del pastizal.* La asociación comprendía un área de 1,6 ha y se empleó una carga global de 1,5 UGM/ha, con 33 y 66 días de reposo y un tiempo de estancia de 1,5 y 3 días por cuartón, para el período lluvioso y el poco lluvioso, respectivamente.

*Cuantificación de n-alcanos y alcoholes.* Se colectaron muestras de las especies más representativas dentro del pastizal: *P. maximum* cv. Likoni y *L. leucocephala* cv. Cunningham, en el período comprendido entre enero y diciembre del 2005, con una muestra representativa por cada mes, las cuales fueron secadas en una estufa a 60°C, durante tres días. Para analizar el efecto de la época, se agruparon las muestras en función de las dos estaciones del año definidas en Cuba: período lluvioso de mayo-octubre (PLL) y el poco lluvioso de noviembre-abril (PPLL). Después con el material seco de ambas especies se prepararon cinco proporciones de guinea y leucaena (100-guinea; 70-guinea y 30-leucaena; 60-guinea y 40-leucaena; 50-guinea y 50-leucaena; 100-leucaena), tomando en consideración los resultados de Hernández *et al.* (2001). En las muestras secas para *n*-alcanos y los alcoholes se empleó el procedimiento propuesto por Ali *et al.* (2004), el cual tiene como base el método de Mayes *et al.* (1986). La cuantificación de la concentración de *n*-alcanos y alcoholes de cadena larga se realizó por cromatografía gaseosa. Las determinaciones se hicieron en el laboratorio de la IFRU, Instituto de Macaulay, Escocia.

*Análisis matemático.* Las proporciones de cada especie en la mezcla se calcularon utilizando un procedimiento de optimización de mínimos cuadrados (Hameleers y Mayes, 1998), donde la suma del cuadrado de las diferencias entre las proporciones reales del marcador y las predichas en la mezcla fue minimizada utilizando la función Solver en Microsoft Excel Windows XP®.

### Resultados y Discusión

En la tabla 1 se muestran los patrones de concentración de *n*-alcanos de cadena impar de las especies evaluadas. Estas fueron de 167,97 y 222,96 mg/kg de MS para *P. maximum* y 134,11 y 137,27 mg/kg de MS para *L. leucocephala*, en el período poco lluvioso y el lluvioso, respectivamente.

Tabla 1. Concentración de *n*-alcanos de cadena impar (mg/kg de MS) en *L. leucocephala* cv. Cunningham y *P. maximum* cv. Likoni.

Table 1. Concentration of odd-chain *n*-alkanes (mg/kg DM) in *L. leucocephala* cv. Cunningham and *P. maximum* cv. Likoni.

<i>n</i> -alcanos	PPLL		PLL	
	<i>P. maximum</i>	<i>L. leucocephala</i>	<i>P. maximum</i>	<i>L. leucocephala</i>
C <sub>21</sub>	3,83	4,25	3,33	4,96
C <sub>23</sub>	4,11	4,40	4,91	5,59
C <sub>25</sub>	6,93	9,30	9,42	9,12
C <sub>27</sub>	9,68	16,08	17,52	15,20
C <sub>29</sub>	25,79	48,47	50,34	50,35
C <sub>31</sub>	62,48	33,50	83,29	31,22
C <sub>33</sub>	47,41	15,60	48,25	15,69
C <sub>35</sub>	7,68	2,51	7,57	5,16
Total	167,92	134,11	222,96	137,27

PPLL-Período poco lluvioso PLL- Período lluvioso

Los valores son bajos si se comparan con los de otras gramíneas y leguminosas evaluadas por Ali *et al.* (2005), al caracterizar la concentración de *n*-alcanos de 25 especies de plantas usadas en el pastoreo de herbívoros en Sudán. En este sentido, se alcanzaron concentraciones de 478, 571 y 406 mg/kg de MS para *C. gayana*, *C. ciliaris* (florecido) y *S. guianensis*, respectivamente.

Los resultados de la presente investigación también son inferiores a los alcanzados en Cuba por Delgado *et al.* (2000), al caracterizar la composición de *n*-alcanos de cadena larga presentes en la pared celular de guinea y de leucaena.

Las mayores diferencias interespecies se encontraron en el  $C_{31}$  (69-83 y 31-33 mg/kg de MS para la gramínea y la leguminosa, respectivamente) y el  $C_{33}$  (48 y 16 mg/kg de MS para la guinea y la leucaena, respectivamente).

Por otra parte, los mayores valores de *n*-alcanos de cadena impar se obtuvieron para la gramínea en el  $C_{31}$  y  $C_{33}$ , y para la leguminosa en el  $C_{29}$  y  $C_{31}$ . Este comportamiento fue similar al informado por Delgado *et al.* (2000) al cuantificar los *n*-alcanos de *P. maximum* y *L. leucocephala*.

Al analizar el efecto de la época del año no se hallaron diferencias entre las especies, lo cual difiere de lo reportado por Corte *et al.* (2005), quien evaluó la técnica de *n*-alcanos para estimar la composición de las mezclas de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* durante dos momentos del año. Estos autores encontraron concentraciones más altas de *n*-alcanos, especialmente de  $C_{29}$  y de  $C_{31}$ , en el período I (mayo) que en el período II (julio) para ambas plantas; dichas diferencias pueden deberse a las condiciones propias de las investigaciones, aspecto que se debe tomar en consideración en estudios futuros.

En la figura 1 se muestra la concentración de *n*-alcanos de las cinco mezclas evaluadas. En general, hubo bajas concentraciones de *n*-alcanos para todas las proporciones en estudio y no se apreciaron diferencias marcadas entre tratamientos.

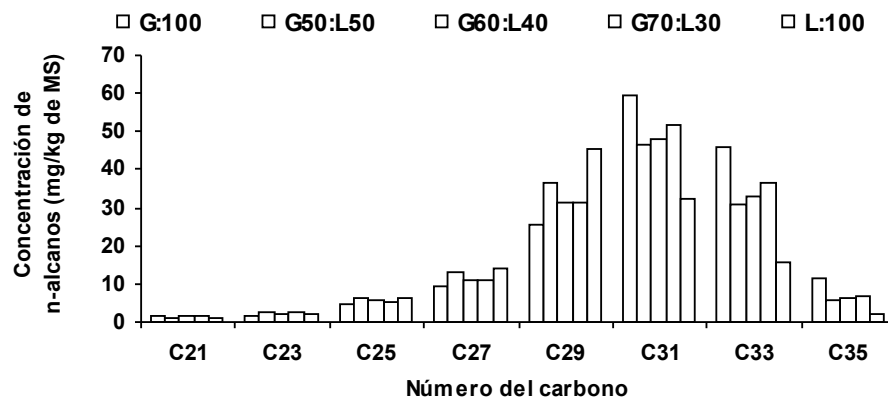


Fig. 1. Concentración de *n*-alcanos en las dietas estudiadas (G: gramínea y L: leucaena).

Fig. 1. Concentration of *n*-alkanes in the studied diets (G: grass and L: leucaena).

La determinación del consumo a través de la técnica de *n*-alcanos es válida en dietas formadas por dos plantas; en este sentido, la veracidad del método declina a medida que aumenta el número de especies en la dieta (Mayes, 1998). De ahí la importancia de estudiar otros compuestos naturales como posibles marcadores; se han identificado con este fin los alcoholes y los ácidos grasos de cadena larga.

Por otra parte, la determinación de estos compuestos también se considera necesaria para aquellas plantas que tienen una baja concentración de *n*-alcanos, como en el caso de la presente investigación.

En la tabla 2 se muestra el contenido de alcoholes de cadena par para la especie *L. leucocephala*, la cual presentó una mayor concentración (2 754,60 y 3 830,18 mg/kg de MS para el período poco lluvioso y el lluvioso, respectivamente) que *P. maximum* (2 571,73 y 3 679,65 mg/kg de MS para cada período, respectivamente).

Las mayores diferencias se encontraron en el  $C_{26}$ , con valores de 173,74-188,86 y 298,92-406,36 mg/kg de MS, y en el  $C_{28}$  con concentraciones de 322,11-410,99 y 1 012,11-1 401,83 mg/kg de MS para la gramínea y leguminosa, respectivamente.

Se hallaron altas concentraciones de alcoholes, con diferencias entre especies, lo cual corrobora lo planteado por Ali *et al.* (2005), quienes llegaron a la conclusión que los patrones de alcoholes de la pared

celular de las plantas se pueden emplear como marcadores para estimar la composición de la dieta de herbívoros cuando existen diferencias marcadas interespecies.

Tabla 2. Concentración de alcoholes de cadena par (mg/kg de MS) en *L. leucocephala* cv. Cunningham y *P. maximum* cv. Likoni.

Table 2. Concentration of even-chain alcohols (mg/kg DM) in *L. leucocephala* cv. Cunningham and *P. maximum* cv. Likoni.

Alcohol	PPLL		PLL	
	<i>P. maximum</i>	<i>L. leucocephala</i>	<i>P. maximum</i>	<i>L. leucocephala</i>
C <sub>22</sub>	119,75	92,45	192,21	214,95
C <sub>24</sub>	103,71	102,61	99,05	159,64
C <sub>26</sub>	173,74	298,92	188,86	406,36
C <sub>28</sub>	322,11	1 012,43	410,99	1 401,83
C <sub>30</sub>	967,91	1 120,08	1 467,94	1 497,24
C <sub>32</sub>	884,51	128,11	1320,60	150,16
Total	2 571,73	2 754,60	3 679,65	3 830,18

PPLL-Período poco lluvioso      PLL-Período lluvioso

Por otra parte, *L. leucocephala* presentó una mayor concentración de alcoholes de cadena par en el 1-C<sub>28</sub>-ol y 1-C<sub>30</sub>-ol; mientras que *P. maximum* tuvo los mayores valores en el 1-C<sub>30</sub>-ol y 1-C<sub>32</sub>-ol.

Al determinar los alcoholes de cadena par de las cinco mezclas (fig. 2), se encontraron altas concentraciones para todas las proporciones evaluadas. Los valores más altos se hallaron en el 1-C<sub>28</sub>-ol en todos los tratamientos (1 405,58-1 654 mg/kg de MS). A su vez las concentraciones más bajas fueron en 1-C<sub>24</sub>-ol (77,38-93,87 mg/kg de MS).

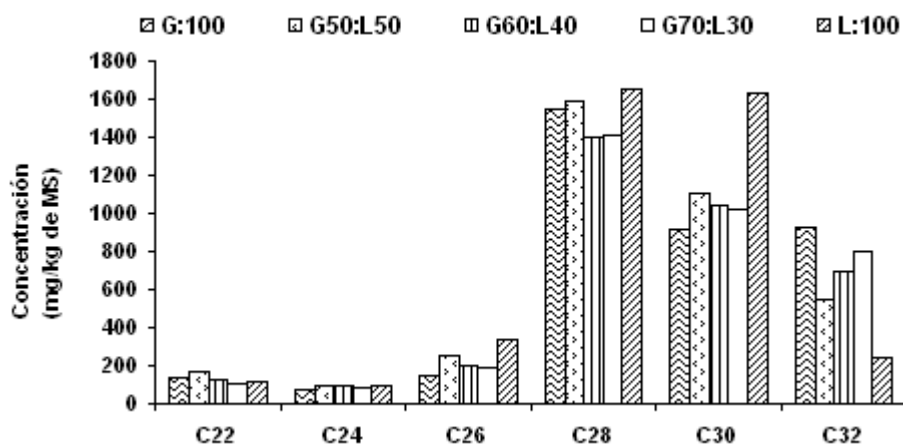


Fig. 2. Concentración de alcoholes de cadena par en las dietas estudiadas (G: gramínea y L: leucaena).

Fig. 2. Concentration of even-chain alcohols in the studied diets (G: grass and L: leucaena).

Por otra parte, hubo diferencias intratratamientos. De ahí que se pueda emplear los alcoholes de cadena larga (par) en el futuro como un marcador natural para estimar el consumo y la composición botánica de la dieta en raciones que contengan diferentes proporciones de estas dos especies (guinea y leucaena).

Se concluye que las concentraciones de *n*-alcanos de cadena larga fueron bajas para *P. maximum* y *L. leucocephala* en ambos períodos del año. Sin embargo, presentaron concentraciones elevadas de alcoholes de cadena larga (par), que pudieran ser utilizados como marcadores naturales en las dos especies.

### Referencias bibliográficas

- Ali, H.A.M. *et al.* 2004. The potential of long-chain fatty alcohols and long-chain fatty as diet composition markers: development of methods for quantitative analysis and faecal recoveries of these compounds in sheep fed mixed diets. *Journal of Agricultural Science*. 142:71
- Ali, H.A.M. *et al.* 2005. Assessment of *n*-alkanes, long-chain fatty and long-chain fatty acids as diet composition markers: The concentrations of these compounds in rangeland species from Sudan. *Animal Feed Science and Technology*. 12:257
- Corte, C. *et al.* 2005. Species composition of ryegrass (*Lolium perenne*) and tall fescue (*Festuca arundinacea*) mixtures using various combinations of *n*-alkanes. *Grass and Forage Science*. 60:254
- Dawson, L.A. *et al.* 2000. Root hydrocarbons as potential markers for determining species composition. *Plant, Cell and Environment*. 23:743
- Delgado, Denia C. *et al.* 2000. Composición de *n*-alcanos cuticulares en plantas tropicales. Su potencialidad como marcadores para estimar consumo y selección de rumiantes en pastizales. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 34 (2):151
- Hameleers, A. & Mayes, R.W. 1998. The use of *n*-alkanes to estimate herbage intake and diet composition by dairy cows offered a perennial ryegrass/white clover mixture. *Grass and Forage Science*. 53:164
- Hernández, A. *et al.* 1999. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Ministerio de la Agricultura. La Habana. p. 26
- Hernández, D. *et al.* 2001. Composición botánica de gramíneas y leguminosas seleccionadas por vacas que pastorearon en un sistema silvopastoril multiasociado. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 35 (3):221
- Kelman, W.M. *et al.* 2003. Cuticular wax alkanes and alcohols used as markers to estimate diet composition of sheep (*Ovis aries*). *Biochemical Systematics and Ecology*. 31:919
- Machado, R. & Seguí, Esperanza. 1997. Introducción, mejoramiento y selección de variedades comerciales de pastos y forrajes. *Pastos y Forrajes*. 20:1
- Mayes, R.W. 1998. New potential markers for determining diet composition. Proc. of the IX<sup>th</sup> European Intake Workshop held at the Institute of Grassland and Environmental Research. North Wyke, UK. p. 63
- Mayes, R.W. 2001. The application of biological markers: a Macaulay Institute success story. *Research Advances*. p.14
- Mayes, R.W. *et al.* 1986. The use of dosed and herbage *n*-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J. of Agric. Sci. Cambridge* 107:161

## Determination of hydrocarbonated compounds in the cell wall from *P. maximum* and *L. leucocephala* under silvopastoral system conditions

### Abstract

With the objective of determining the concentration of *n*-alkanes and long-chain alcohols in the cell wall of *Panicum maximum* cv. Likoni and *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham, a study was conducted in an association of improved grasses and leucaena ten years after being established, which occupies an area of 1,6 ha. Such species were selected for being the most representative ones in the floristic composition. The samples were collected from January to December, 2005 and were dried. The concentration of odd-chain *n*-alkanes was 167,97 and 222,96 mg/kg DM and 134,11 and 137,27 mg/kg DM for Guinea grass and leucaena in the dry and rainy season, respectively. In turn, the concentration of even-chain alcohols for leucaena showed a higher value (2 754,60 and 3 830,18 mg/kg DM for the dry and rainy season, respectively), than in Guinea grass (2 571,73-3 679,65 mg/kg DM for each season, respectively). The concentration of long odd chain *n*-alkanes was concluded to be low for *P. maximum* and *L. leucocephala* in both seasons; however, they showed high concentrations of long even chain alcohols, which could be used as natural markers in both species.

Key words: Alcohols, *L. leucocephala*, *n*-alkanes, *P. maximum*, cell wall

### Introducción

In the associations of grasses and leucaena, the measurement of the botanical composition of the diet and the intake by grazing ruminants, accurately, without causing physical damage to the animals, is a difficult task. It is necessary to promote methods that use feces, which are collected without affecting their integrity.

According to Mayes (2001) the feces of herbivores are constituted by residues of indigestible plant material, which contains a group of hydrocarbonated compounds that can be used as natural markers and estimate the botanical composition of the diet, intake and digestibility. These compounds are accurately measured by gaseous chromatography; nevertheless, in order to be used for this purpose, it is necessary to make an initial characterization of their concentration in plants.

Most plants contain in their cell wall long-chain saturated hydrocarbons, which have between 21 and 35 carbons, among which are chain *n*-alkanes. In international literature there are reports of the concentration of *n*-alkanes in a group of grasses and legumes, among which *Chloris gayana*, *Cenchrus ciliaris*, *Stylosanthes guianensis*, *Agrostis capillaris*, *Betula pendula* and *Vaccinium myrtillus* can be mentioned (Dawson *et al.*, 2000; Mayes, 2001; Ali *et al.*, 2005).

One of the first studies reported in Cuba was the one conducted by Delgado *et al.* (2000), who evaluated 17 tropical forage species: six grasses, eight legumes and three trees belonging to other families, in order to characterize the composition of long-chain *n*-alkanes present in the cell wall.

On the other hand, there are other plant compounds that are being researched as markers, including long-chain alcohols and fatty acids, which are particularly important for those plants with low contents of *n*-alkanes and this is an alternative in diets with more than two species (Kelman *et al.*, 2003; Ali *et al.*, 2004). Hence the objective of this work was to determine the concentration of *n*-alkanes and long-chain alcohols in the cell wall of *Panicum maximum* and *Leucaena leucocephala*, in an associated system.

## Materials and Methods

*Location.* The samples were collected from an association of improved grasses and *L. leucocephala* cv. Cunningham, 10 years after being established at the EEPF "Indio Hatuey", which is located at 22°48'7" latitude north and 81°1' longitude west, 19,01 m above sea level.

*Climate.* Annual mean temperature was 23°C, with a mean of 21°C and 27°C in winter and summer, respectively. Annual rainfall was 1 300 mm, with a variation of 1 000-1 200 mm in the rainy season (RS) and 200-400 mm in the dry season (DS).

*Soil.* The trial was conducted on a lixiviated Red Soil of the ferruginous nodular subtype (Hernández *et al.*, 1999). It has a moderately acid pH (5,6), with a moderate supply of nitrogen (0,18%) and organic matter (3,20%), low levels of assimilable phosphorus (2,43 mg/100 g), calcium as prevailing element among exchangeable cations (Ca<sup>++</sup> 11,84 meq/100 g) and a cation exchange capacity considered moderate to low (19,21 meq/100g).

*Floristic composition of the pastureland.* Although other species were detected (*Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Teramnus labialis*, *S. guianensis* and *Centrosema molle*), the grass *P. maximum* cv. Likoni and the tree legume *L. leucocephala* cv. Cunningham, approved as commercial varieties (Machado and Seguí, 1997), were found in higher percentage in the sampled paddocks (higher than 80% in both cases).

*Pastureland management.* The association comprised an area of 1,6 ha and a global stocking rate of 1,5 animals/ha was used, with 33 and 66 resting days and an occupation time of 1,5 and 3 days per paddock, for the rainy and dry season, respectively.

*Quantification of n-alkanes and alcohols.* Samples of the most representative species within the pastureland, *P. maximum* cv. Likoni and *L. leucocephala* cv. Cunningham, were collected in the period between January and December, 2005, with a representative sample for each month, which were dried in an oven at 60°C, during three days. In order to analyze the seasonal effect, the samples were grouped regarding the two seasons defined in Cuba: rainy season from May to October (RS) and dry season from November to April (DS). Afterwards, with the dry material of both species, five proportions of Guinea grass and leucaena were prepared (100-Guinea grass; 70-Guinea grass and 30-leucaena; 60 Guinea grass and 40-leucaena; 50 Guinea grass and 50 leucaena; 100-leucaena), taking into consideration the results obtained by Hernández *et al.* (2001). In the dry samples for *n*-alkanes and alcohols the procedure proposed by Ali *et al.* (2004), which is based on the method suggested by Mayes *et al.* (1986), was used. The quantification of the concentrations of *n*-alkanes and long-chain alcohols was made by gaseous chromatography. The determinations were carried out at IFRU's laboratory, Macaulay Institute, Scotland.

*Mathematical analysis.* The proportions of each species in the mixture were calculated following a least squares optimization procedure (Hameleers and Mayes, 1998), where the sum of the square of the differences between the real proportions of the marker and those predicted in the mixture was minimized using the Solver function in Microsoft Excel Windows XP®.

## Results and Discussion

Table 1 shows the concentration patterns of odd-chain *n*-alkanes in the evaluated species. They were 167,97 and 222,96 mg/kg DM for *P. maximum* and 134,11 and 137,27 mg/kg DM for *L. leucocephala* in the dry and rainy season, respectively.

The values are low, if compared to those of other grasses and legumes evaluated by Ali *et al.* (2005), when characterizing the concentration of *n*-alkanes of 25 plant species used for herbivore grazing in Sudan. In this sense, concentrations of 478, 571 and 406 mg/kg DM were reached for *C. gayana*, *C. ciliaris* (flowered) and *S. guianensis*, respectively.

The results of this study are also lower than the ones obtained in Cuba by Delgado *et al.* (2000), when characterizing the composition of long-chain *n*-alkanes present in the cell wall of Guinea grass and leucaena.



The highest differences between species were found in  $C_{31}$  (69-83 and 31-33 mg/kg DM for the grass and the legume, respectively) and  $C_{33}$  (48 and 16 mg/kg DM for Guinea grass and leucaena, respectively).

On the other hand, the highest values of odd-chain *n*-alkanes were obtained for the grass in  $C_{31}$  and  $C_{33}$ , and for the legume in  $C_{29}$  and  $C_{31}$ . This behavior was similar to the one reported by Delgado *et al.* (2000) when quantifying the *n*-alkanes of *P. maximum* and *L. leucocephala*.

When analyzing the seasonal effect no differences were found between the species, which differs from the reports by Cortes *et al.* (2005), who evaluated the *n*-alkanes technique to estimate the composition of the mixtures of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea* during two moments of the year. These authors found higher concentrations of *n*-alkanes, especially of  $C_{29}$  and  $C_{31}$ , in period I (May) than period II (July) for both plants; such differences can occur due to the conditions of the studies, aspect that must be considered in future research.

Figure 1 shows the concentration of *n*-alkanes of the five evaluated mixtures. In general, there were low concentrations of *n*-alkanes for all the proportions under study and no remarkable differences were observed among treatments.

The determination of intake through the *n*-alkanes technique is valid in diets formed by two plants; in this sense, the veracity of the method declines as the number of species in the diet increases (Mayes, 1998). Hence the importance of studying other natural compounds as possible markers; with this purpose long-chain alcohols and fatty acids have been identified.

On the other hand, the determination of these compounds is also considered necessary for those plants that have low concentrations of *n*-alkanes, as in the case of this research.

Table 2 shows the content of even-chain alcohols for the species *L. leucocephala*, which had a higher concentration (2 754,60 and 3 830,18 mg/kg DM for the dry and rainy season, respectively) than *P. maximum* (2 571,73-3 679,65 mg/kg DM for each period, respectively).

The highest differences were found in  $C_{26}$ , with values of 173,74-188,86 and 298,92-406,36 mg/kg DM, and in  $C_{28}$  with concentrations of 322,11-410,99 and 1 012,11-1 401,83 mg/kg DM for the grass and the legume, respectively.

High alcohol concentrations were found, with differences between species, which corroborates the statements made by Ali *et al.* (2005), who arrived at the conclusion that the alcohol patterns of the cell wall of plants can be used as markers to estimate the composition of the diet of herbivores when there are remarkable interspecies differences.

On the other hand, *L. leucocephala* showed a higher concentration of even-chain alcohols in the 1- $C_{28}$ -ol and 1- $C_{30}$ -ol; while *P. maximum* had the highest values in the 1- $C_{30}$ -ol and 1- $C_{32}$ -ol.

When determining the even-chain alcohols of the five mixtures (fig. 2), high concentrations were found for all the evaluated proportions. The highest values were found in 1- $C_{28}$ -ol in all treatments (1 405,58-1 654 mg/kg DM). In turn, the lowest concentrations occurred in 1- $C_{24}$ -ol (77,38-93,87 mg/kg DM).

On the other hand, there were differences among treatments. Hence, long (even)-chain alcohols can be used in the future as a natural marker to estimate the intake and botanical composition of the diet in rations that contain different proportions of these two species (Guinea grass and leucaena).

The concentrations of long-chain *n*-alkanes were concluded to be low for *P. maximum* and *L. leucocephala* in both seasons. However, they showed high concentrations of long (even)-chain alcohols, that can be used as natural markers in the two species.