

استفاده از آلکانهای واکسی گیاهان به عنوان نشانگر در مطالعات تغذیه‌ای

عباسعلی ناصریان و رضا ولی‌زاده، اعضای هیأت علمی گروه علوم دامی دانشکده

کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده:

عملکرد نشخوارکنندگان در مرتع تابعی از احتیاجات آنها به مواد مغذی مختلف و میزان فراهمی این مواد در علوفه قابل برداشت است. از این رو مطالعات کمی به منظور پی بردن به مقدار و تغییرات مواد مغذی در گیاهان مرتعی برای تدوین مدل‌های پیش‌بینی عملکرد دامها در مراتع از اهمیت کاربردی ویژه‌ای برخوردار است. میزان آگاهی‌ها از نیازهای دامها در طی سه دهه گذشته به نحو مؤثری افزایش یافته و به‌طور مشخص منجر به تهیه جدول‌های ارزشمند استانداردهای تغذیه‌ای شده است. اما به‌رغم این موفقیت‌های قابل توجه، به نظر می‌رسد که درک ما در بخش تأمین این نیازهای دامها هنوز در سطح مطلوب نمی‌باشد و به ویژه در سه حوزه اساسی نیاز به مطالعات گسترده‌ای می‌باشد. ۱- ایجاد روش دقیق اندازه‌گیری مقدار علوفه‌ای که حیوان از مرتع به دست می‌آورد. ۲- تعیین ترکیب‌های گونه‌های گیاهان به ویژه در مراتع مخلوط (گندمیان - بقولات) وجود دارند و با عملکرد حیوان همبستگی مثبت دارند ۳- اندازه‌گیری مقدار مواد مغذی که در حقیقت برای جذب، در دسترس حیوان‌های چراکننده قرار می‌گیرد. از آنجایی که اندازه‌گیری مقدار مواد مغذی مصرف شده به وسیله دامها در مراتع دشوار است، روش‌های غیر مستقیم استفاده از نشانگرها مورد توجه و کاربرد قرار گرفته‌اند. هدف این مقاله مطالعه تحلیلی بر روی چگونگی استفاده از آلکانهای واکسی گیاهان در اندازه‌گیری مواد مغذی مصرفی و حرکت مواد در

دستگاه گوارشی است. آلکانهایی که در سطح گیاهان مرتعی وجود دارند دارای طول زنجیره متفاوت می‌باشند (C₂₅ - C₃₅) و نتایج رضایت بخشی در مطالعات مرتعی نشان داده‌اند و این امکان را قوت بخشیده‌اند که در آینده از آلکانهای حاصل از کوتیکول گیاهان به‌عنوان نشانگر برای تخمین میزان خوراک مصرفی دامها به‌طور وسیع‌تر استفاده شود و از بین ترکیبهای مختلف آلکانها C₃₂ - C₃₃ در تخمین مصرف خوراک نتایج بهتری نشان داده‌اند، بنابراین چنین به نظر می‌رسد که آلکانهای موجود در واکس پوششی گیاهان می‌تواند به‌عنوان نشانگر جهت تعیین مصرف خوراک و قابلیت هضم مواد مغذی در دامهایی که بر روی مرتع چرا می‌کنند مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی:

invitor، آلکانها، نشخوار کنندگان و قابلیت هضم.

مقدمه:

عملکرد دامها در مراتع تابعی از میزان نیازها و مقدار مواد مغذی در دسترس آنها است. درک تغییرات مواد مغذی در گیاهان متناسب با وضعیت تغذیه‌ای دامها در مراتع حائز اهمیت است. روشهای مناسب ارزیابی کیفیت گیاهان مرتعی متناسب با نیاز دامهای چرا کننده اطلاعات مفیدی را در دسترس متخصصان قرار خواهد داد. این داده‌ها به ویژه جهت استفاده در ارائه مدلهای پیش‌بینی کننده عملکرد دامهای استفاده کننده از مراتع بسیار سودمند می‌باشند (۱). اطلاعات تغذیه‌ای در رابطه با نیازهای دامها به‌طور کلی در سه دهه گذشته به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است (۲ و ۳) اما آگاهی از احتیاجات دامها در مراتع و حدود تأمین آنها هنوز در سطح مطلوبی قرار ندارد و به نظر می‌رسد که در این حوزه سه حالت مشخص وجود داشته باشد.

۲- نوع و ترکیب گونه‌های گیاهی که به وسیله دامها در مرتع انتخاب می‌شوند، از جمله در مراتع مخلوط گندمیان - بقولات که به‌طور معمول حیوانات از عملکرد بالاتری برخوردار می‌باشند (۴).

۳- اندازه‌گیری مقدار واقعی مواد مغذی که برای جذب در دستگاه گوارش حیوان فراهم می‌باشند.

مشکلی که به‌طور مشترک در هر سه حوزه وجود دارد اشکال در اندازه‌گیری مستقیم عوامل مورد نیاز است. به همین لحاظ توجه به روشهای غیر مستقیم به ویژه بر مبنای نشانگرهای مختلف معطوف شده است (۵). بر اساس مطالعات صورت گرفته یک نشانگر مطلوب باید از ویژگیهای خاص زیر برخوردار باشد:

- ۱) به لحاظ شیمیائی باید طوری باشد که به راحتی قابل تشخیص باشد.
- ۲) غیر قابل هضم در دستگاه گوارش دامها باشد (۶ و ۷). موضوع مورد بحث در این مقاله واکسهای کوتیکولی گیاهان به ویژه هیدروکربنهای آلیفاتیک اشباع شده (آلکانها) می‌باشد که برای تخمین مصرف غذا توسط دامها در مراتع و برآورد حدود قابلیت هضم علوفه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸). دقت همراه با ضریب اصلاح بالای آلکانهای C₃₅ (۰/۹۵ تا ۰/۹۷) سبب شد تا آلکان به عنوان یک نشانگر داخلی بالقوه برای تخمین قابلیت هضم در حیوانهایی که در مرتع چرا می‌کنند مورد استفاده قرار گیرد (۹). در مقابل به دلیل اینکه ضریب اصلاح متغیر در آلکانهای زنجیر کوتاهتر است (C₂₉ - C₃₁) استفاده از آنها به‌عنوان نشانگر داخلی محدود می‌باشد.

تخمین ترکیب گونه‌های مختلف گیاهان و همین‌طور مطالعه حرکت مواد هضمی در دستگاه گوارش از دیگر موارد مورد استفاده این نشانگرهای طبیعی هستند (۱۰).

مواد و روشها:

تخمین علوفی مصرفی

از راه بر آورد مقدار فراهمی گیاه قبل و بعد از چرا (۱۱)، اندازه‌گیری میزان چرا و اندازه جوشها (۱۲) و یا تغییرات وزن حدود مصرف غذا تخمین زده می‌شود. این روشها برای مطالعات کوتاه مدت چرا به روش چرخشی و نواری و مطالعات رفتاری مناسب هستند. روش دیگر براساس ماده خشک یا ماده آلی مدفوع و استفاده از فرمول تعیین هضم ماده خشک و آلی می‌باشد. معادله مربوط براساس میزان مدفوع دفع شده

$$F = \frac{P}{1-D}$$

F: مصرف غذا، P: مدفوع خارج شده، D: قابلیت هضم

در این روش جمع‌آوری کل مدفوع در مزرعه‌کاری نیرو بر و دشوار است که می‌تواند رفتار چرای حیوان را نیز متأثر سازد که در غالب اوقات به‌منظور دوری از موارد فوق از غلظت نشانگرها استفاده می‌شود. نشانگر معمول در این مطالعات اکسید کروم (Cr_2O_3) می‌باشد که به روشهای گوناگون به حیوان داده می‌شود. اشکال عمده این روش تنوع روزانه در غلظت نشانگر مدفوع می‌باشد. اگر چه امروز از وسایلی استفاده می‌شود که بتوانند به‌طور یکنواخت نشانگر را به مدت ۳ تا ۴ هفته در شکمبه آزاد نماید و این منبع خطا را بهبود دهد. یکی از اجزاء این معادله تخمین قابلیت هضم نیز از روشهای آزمایشگاهی *invitro* مانند روش (Tilley and Terry) و جمع‌آوری نمونه از طریق فیستولای مری (Oesophageal fistula) سود برده می‌شود (۱۳). در این روش نیز سه منبع خطا وجود دارد:

۱- ارتباط بین تخمین قابلیت هضم *invivo* و *invitro* برای حیوانات این آزمایش کاربرد ندارد زیرا تابعیت *invitro* از *invivo* اغلب در حیوانات بالغ در سطح نگهداری

محاسبه می‌شود. بنابراین کاربرد آن برای حیوانهای شیرده و یا در حال رشد در مراتع سؤال برانگیز است.

۲- افزودن مکمل غذایی یا کاربرد سطوح مختلف مصرف نتایج را با اشکال اساسی مواجه خواهد نمود.

۳- حیوان تحت آزمایش در انتخاب گیاهان ممکن است همانند آنچه از طریق فیستول مری به دست آمده عمل نکنند.

بروز خطاها هر چند کم در محاسبه قابلیت هضم سبب ایجاد تغییرات خواهد شد و حتی ممکن است حیوانهایی که توان ژنتیکی بالا در مصرف مغذی دارند انتخاب نگردند. استفاده از آلکانهای واکسی گیاهان برای تعیین مصرف خوراک می‌تواند بر این مشکلات فایده آید.

ترکیبات واکسهای کوتیکولی گیاهان

در نیمه اول قرن گذشته (Chibnall et al. 1934) به‌طور مشخص وجود n- آلکانها در واکسهای کوتیکولی گیاهان نشان داده شدند (۱۴). اجزاء مهم واکسهای کوتیکولی غیر صابونی در جدول شماره (۱) آمده است.

مطالعه ترکیب آلکانهای گیاهان مرتعی مناطق معتدله و گرمسیری نشان داده است که بر اساس طول زنجیر آلکانهای اصلی به‌طور معمول در دامنه C₂₅ (پنتاکوزان‌ها) تا C₃₅ (پنتاتری آکونتان) می‌باشند. اگر چه آلکانها با طول زنجیر کوتاهتر نیز وجود دارند ولی مقدار آنها بسیار ناچیز می‌باشد. در گونه‌های زیادی آلکانهای با زنجیر کربنه منفرد در کمیت بیشتری در مقایسه با زنجیر کربنه زوج وجود دارند. به علاوه C₂₉ (نان اکوزان)، C₃₁ (هنتری آکونتان) و C₃₃ (تری آکونتان) آلکانهای غالب در گونه‌های گیاهی می‌باشند.

جدول شماره (۱): اجزاء عمومی واکسهای کوتیکولی غیر صابونی شده گیاهان*

اجزاء	موجود	سطوح متداول (% واکس) در خانواده poaceae
n- آلکانها	از کم تا زیاد	۳-۴۰
مونواسترها	از کم تا زیاد	۵-۲۰
آلکانهای نوع اول	از کم تا زیاد	۲-۷۰
اسیدهای چربی بلند زنجیر	کم	اغلب < ۱۰
آلکانهای نوع دوم و کتونها	از کم تا زیاد	-----
بتا- دی کتونها	از کم تا زیاد	۵-۷۰
هیدروکسی یا اکسی بتا دی کتونها	از کم تا زیاد	۳-۵۰

* منبع: Tulloch (1976) (۱۵).

چگونگی استفاده از آلکانها برای تخمین مصرف گیاهان

اورو و همکاران نشان دادند که یک شباهت نزدیک بین ویژگیهای آلکانهای دفعی در مدفوع گاو و ویژگیهای آلکانهای گیاهان مصرفی (*Medicago arabica*) وجود دارد (۱۶). اگر چه اهمیت این یافته به منظور مطالعه میزان مصرف حیوانات در مطالعات مرتعی مورد توجه قرار نگرفت اما بعداً بودی و هانسن در مطالعاتشان به یک ارتباط بین بخشهای دیگر واکس کوتیکولی در ری گراس دائمی و مدفوع گوسفند دست یافتند (۱۷). گریس و بودی پیشنهاد کردند که این اجزاء می‌توانند به عنوان نشانگر داخلی غیر قابل هضم مورد استفاده قرار گیرد. به نظر می‌رسد که در منابع این اولین مطالعه است که پیشنهاد می‌کند از اجزاء واکس کوتیکولی می‌توان به عنوان یک نشانگر در مطالعات تغذیه‌ای استفاده نمود (۱۸). اولین کسانی که امکان استفاده از آلکانها را به عنوان نشانگر مورد مطالعه قرار دادند مایر و لمب بودند (۱۹). آنها در مطالعات بعدی خود پیشنهاد کردند که از آلکانهای کربن زوج به عنوان نشانگر خارجی به منظور

تخمین مدفوع دفعی استفاده شود. بنابراین بر اساس معادله زیر می‌توان مصرف غذا را

$$\text{به صورت زیر تخمین زد:} = \frac{\left(\frac{F_i}{F_j}\right) \cdot D_j}{H_i - \left(\frac{F_i}{F_j}\right) \cdot H_j} = \text{مصرف روزانه علوفه (کیلوگرم در روز)}$$

F_i, H_i : غلظت آلکان زنجیر منفرد

F_j, H_j : غلظت آلکان زنجیر زوج

D_j : میزان روزانه آلکان کربن زوج سنتتیک داده شده به عنوان نشانگر

از آلکانهای سنتتیک برای محاسبه آلکانهای زوج استفاده می‌شود ولی باید به این

نکته توجه داشت که از این آلکانها در کمیت کم نیز در علوفه و غذای مکمل کنسانتره

ممکن است وجود داشته باشد. این کمیتهای ناچیز نیز باید در محاسبه منظور شوند.

بنابراین عبارت H_j, C_j برای معادله زیر استفاده می‌شود:

$$\text{مصرف روزانه علوفه (کیلوگرم در روز)} = \frac{\left(\frac{F_i}{F_j}\right) \cdot (D_{j+1} \cdot C_i) - (1 \cdot C_i)}{H_i - \left(\frac{F_i}{F_j}\right) \cdot H_j}$$

C_i : میزان آلکان با کربن منفرد در علوفه

C_j : میزان آلکان با کربن زوج در علوفه

H_j : میزان آلکان با کربن زوج در کنسانتره

تخمین میزان مصرف علوفه از طریق غلظت آلکانهای دفعی به فاکتورهای

متعددی بستگی دارد که مورد بحث قرار می‌گیرند.

نتایج و بحث:

نمونه‌گیری از علوفه مصرفی و دقت در توزیع آلکانهای سنتتیک

نمونه‌ای که برای بررسی اخذ می‌شود از نظر اینکه شباهتی با علوفه مصرفی به وسیله حیوان تحت آزمایش داشته باشد بسیار مهم خواهد بود. در مراتعی که فقط یک گیاه رشد می‌کند ممکن است برداشت نمونه از یک منطقه قابل قبول باشد اگرچه ممکن است غلظت آلکانها در قسمت‌های مختلف گیاه یکسان نباشد و سبب عدم کارایی این روش نمونه‌برداری شود. اما در مراتعی که گیاهان متنوع رویش می‌کنند دقت نمونه‌گیری به روش بالا به شدت کاهش می‌یابد. لذا توصیه شده است که حیوان حاوی فیستول مری برای نمونه‌گیری استفاده شود. کمیت نمونه‌ها نیز باید به میزان کافی برای تعیین قابلیت هضم به روش invitro باشد.

آلکانها به صورت نشانگر خارجی را می‌توان به صورت پلت‌های کاغذی با آلکانها به حیوان داد که در این حالت میزان تنوع در داده‌ها بین ۲ تا ۵٪ می‌باشد، چنانچه آلکانها از طریق کپسولهای ژلاتینی به حیوان داده شود میزان تنوع بین ۱ تا ۱٪ خواهد بود. در برخی آزمایشها نتایج هر دو روش یکسان بوده و بدین مفهوم است که از هر دو روش می‌توان سود جست جدول شماره (۲).

جدول شماره (۲): مقایسه علوفه مصرفی با روش تخمین آلکان سنتتیک خارجی C₃₂و طبیعی گیاهی C₃₃

منبع	حیوان و شرایط تغذیه‌ای	میزان تعیین شده (کیلوگرم در روز)	اختلاف (کیلوگرم در روز)	مصرف شناخته شده و تخمین زده شده (%)
Mayes et al. (1984)	بره ۳۰ کیلویی علوفه تازه	۰/۵۷۹	%	%
Mayes et al. (1986)	بره ۱۰ هفته‌ای شیر + علوفه تازه	۰/۱۱۲-۰/۲۷۳	%-۰/۰۰۴	-----
Dillon and Stakelum (1989)	گاو شیری آخر شیردهی - علوفه تازه	۱۴-۱۸	%-۰/۰۹	%-۰/۰۶
Dillon and Stakelum (1990)	گاو شیری آخر شیردهی - علوفه تازه	۱۳-۲۷	%-۱۰	%-۰/۸

نمونه‌گیری از مدفوع

نتایج نشان می‌دهند که در گوسفند بعد از دادن نشانگر خارجی آلکانها ۵ تا ۶ روز طول می‌کشد تا مقدار نشانگر در مدفوع به تعادل برسد. ممکن است این سؤال پیش آید که آیا در خروج نشانگر آلکانی نیز تنوع در میزان خروج در طول روز وجود دارد (۶). در گوسفندهایی که در قفسهای انفرادی نگهداری می‌شدند و روزانه یک نوبت نشانگر آلکانی دریافت می‌کردند نشان داد که تنوع روزانه در خروج آلکان از مدفوع مشاهده نشد اما داو و همکاران یک تنوع روزانه در خروج آلکانهای C₃₆-C₃₅ مشاهده نمودند (۲۰). در یک آزمایش دیگر بر روی حیوانات در مرتع تنوع روزانه در خروج آلکانها قابل توجه نبود، بنابراین پیشنهاد شده است که ممکن است این تنوع در دامنه ۵٪ ± باشد. در عین حال به نظر می‌رسد در این رابطه نیاز به انجام آزمایشهای

بیشتری باشد. روش معمول برای استخراج واکس کوتیکولی از گیاهان (۱۵) استفاده از روش خشک کردن انجمادی و استفاده از یک آلکان C₃₄ به عنوان استاندارد داخلی معمول می‌باشد (۱۹).

استفاده از آلکانها به عنوان نشانگر برای تعیین ترکیبهای بوتانیکی گیاهان مصرف شده از آنجایی که در گونه‌های مختلف گیاهی غلظت هر کدام از آلکانها متفاوت است بنابراین می‌توان ترکیب گیاهان مصرف شده به وسیله حیوان را مشخص نمود. نتایج به صورت جدول شماره (۳) آمده است.

جدول شماره (۳): نسبت غلظت آلکانهای موجود در مراتع گندمیان و بقولات

C ₃₁ : C ₃₃	C ₂₉ : C ₃₃	C ₂₉ : C ₃₁	گونه‌ها
گندمیان			
۱/۵۲	۰/۷۷	۰/۵۱	<i>Lolium perenne</i>
۵/۸۱	۶/۰۵	۱/۰۴	<i>L. multiflorum</i>
۶/۳۳	۴/۱۵	۰/۶۶	<i>L. rigidum</i>
۱/۰۷	۰/۵۸	۰/۵۴	<i>Chloris gayana</i>
۰/۵۴	۰/۱۰	۰/۱۸	<i>Brachiaria decumbens</i>
بقولات			
۹/۷۵	۱۵/۵۰	۱/۶۳	<i>Trifolium repens</i>
۵/۸۰	۳۷/۹۰	۷/۱۶	<i>T. pratense</i>
۷/۷۴	۲۶/۰۸	۳/۳۷	<i>T. subterraneum</i>
۶/۱۴	۱۱/۶۵	۱/۹۰	<i>T. balansae</i>
۱۵/۴۳	۹/۶۲	۰/۶۲	<i>Medicago sativa</i>

برای تخمین ترکیب گیاهان نسبت‌های متفاوت از گیاهان مخلوط و میزان آلکانهای آنها استخراج گردیده‌اند. بعد بر اساس آن داده‌ها معادله‌هایی طراحی شده‌اند که به وسیله این معادله‌ها می‌توان به ترکیب نمونه‌های حقیقی گیاهان در آزمایشهای انجام شده دست یافت. نتایج نشان داده‌اند که آلکانهای کوتیکولی جایگزین بسیار مناسبی برای روشهای جدا کردن فیزیکی گیاهان مراتع مخلوط نیز می‌باشند.

استفاده از آلکانها به‌عنوان نشانگر در مطالعات مربوط به حرکت مواد هضمی در دستگاه

گوارش

شواهد موجود نشان داده است که آلکانهای گیاهی نشانگرهای رضایت بخشی در مطالعات مربوط به زمان ماندگاری و حرکت مواد هضمی نمی‌باشند، دلیل آن نیز احتمالاً عدم استحکام کافی با هیچکدام از حالت‌های مایع یا جامد است (۱۰). در هر صورت آلکانهای طبیعی با ویژگیهای مطلوب با بخش جامد مواد هضمی و میزان تصحیح (Recovery) برای چگونگی حرکت بخش جامد مواد هضمی وجود دارد. به‌طور کلی برای میزان حرکت مواد هضمی در نواحی مختلف دستگاه گوارش نشانگر باید به‌طور کامل قابل تصحیح کردن باشد. از آنجایی که آلکانها همبستگی قابل قبولی با حالت جامد دارند لذا آلکانها می‌توانند به عنوان نشانگر در حالت جامد مورد استفاده قرار گیرند اگر چه به نظر می‌رسد که هنوز در این رابطه تحقیق به منظور اثبات این پیشنهاد صورت نگرفته است.

به‌طور کلی چنین به نظر می‌رسد که آلکانها می‌توانند جهت مشخص نمودن گونه گیاهان مصرف شده توسط حیوان، تخمین مصرف غذا در حیوان، همین‌طور چگونگی حرکت مواد هضمی در دستگاه گوارش مورد استفاده قرار گیرند. نتایج حاصل از آزمایشهای مختلف نشان می‌دهند که آلکانها از ضربه اصلاحی پایدار نیز برخوردارند و همانند اکسید گرم استفاده از وسایلی که به‌طور یکنواخت و مداوم مقدار مشخصی از

آلکان را در شکمبه آزاد می‌کند سبب افزایش دقت در تخمین‌های مورد نظر می‌گردند. همین‌طور این امکان وجود دارد که هر قسمت از گیاه مرتعی چرا شده را به وسیله یک دام از راه اثر انگشت در واکس کوتیکولی مشخص و پیگیری نمود.

منابع:

- 1- GrazFeed.1990. A nutritional management system for grazing animal. (CSIRO/Horizon Agriculture: Sydney).
- 2- Agricultural Research Council,1980. The Nutrient Requirement of Ruminant Livestock. (Commonwealt Agriculture Bureaux : Farnham Royal)
- 3- Thomson, D.J, 1982. The nitrogen supplied by and the supplementation of fresh or grazed forage. In Forage protein in Ruminant Animal Production. (Eds D.J. Thomson, D.E. Beever and R.G. Gunn.) pp. 53-66 (Occasional Publication no.6, BSAP: Thames Ditton).
- 4- Kotb, A.R., and Luckey, T.D, 1972. Markers in nutrition. Nutr. Abs. Rev.42,813-45.
- 5- Faichney, G.J. 1975. The use of markers to partition digestion within the gasro-intestinal tract of ruminant. In digestion and Metabolism in the Ruminant. (Eds I.W.McDonald and A.C.I.Warner.) pp. 277-91. (University of New England: Armidale).
- 6- 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.Mc Donald and A.C.I.Warner.) pp.320-32. (University of New England: Armidale).

- 7- Mayes, R.W., & Lamb, C.S., and Colgrove, P.M., 1986. The use of dose and herbage n- alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J. Agric. Sci., Camb.* 107,161-70.
- 8- Dove, H., Milne, J.A., and Mayes, R.W. 1990. Comparison of herbage intakes estimated from in vitro oralkane-based digestibilities. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Proc.* 50, 457-9.
- 9- Mayes, R.W., Lamb, C.S., and 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 Feb.* pp. 159-63.
- 10- Walters, R.J.K., and Evans, E.M. 1979. Evakuation of a sward sampling technique for estimating herbage intake by grazing sheep. *J.Br. Grassl and Soc.* 34, 37-44.
- 11- Fobes, T.D.A, and Hodgson, J, 1985. Comparative studies of the influence of sward condition on the ingestive behaviour of cows and sheep. *Grass and Forage Sci.* 40,69-77.
- 12- Tilley J.M.A., Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for the invitro digestion of forage crops. *J.Br Grassl and Soc.* 18, 104-11.
- 13- Chibnall, A.C., piper, S.H., Pollard, A., Williams, E.F., and Sahai, P.M. 1934. The constituti present in the plant and insect waxes. *Biochem. J.* 28, 2189-2208.
- 14- Tulloch, A. P, 1976. Chemistry of waxes of higher plants. In *hemisty and Biochemistry of Natural Waxes* . (Ed. P. E. Kolattukudy.) pp. 235-87. (Elsevier: Amesterdam).
- 15- Oro, J., D. W., and Wikstrom, S. A, 1965. Paraffinic hydrocarbones in pasture plants. *Science* 147, 870-3.

- 16- Body, D. R., and Hansen, R. P, 1978. The occurrence of C₁₃ to C₃₁ alkanes of fed rye grass, and of C₁₂ to C₃₄ normal acids in both the faeces and the rye grass. J. Sci. Fd Agric. 29, 107-14.
- 17- Grace, N. D., and Body, D. R, 1981. The possible use of long chain (C₁₉-C₃₂) fatty acids in herbage as an indigestible faecal marker. J. Agric. Sci. Camb. 97, 743-5.
- 18- Mayes, R. W., and Lamb, C. S, 1984. herbage as indigestible faecal markers. Proc. Nutr. Soc. 43, 39A.
- 19- Dove, H., Mayes, R. W., Lamb, C. S, Ellis, K. J. 1991. Evaluation of using synthetic and plant cuticular wax alkanes. Proc. 3rd Int. Sump. Nutr. Herbivores.
- 20- Dillon, P., and Stakelum, G. 1989. Herbage and dosed alkanes as a grass measurement technique for dairy cows. Irish J. Agric. Res. 28, 104 (abstract).
- 21- Dillon, P., and Stakelum, G, 1990. Dosed and herbage alkanes for predicting silage intake with dairy cows: The effect concentrate type and level of feeding. Proc. VII Eur. Grazing Workshop (Wageningen, The Netherlands) October 1990.