

Determinação de descritores foliares para a identificação micro-histológica de espécies forrageiras

Jumaida Maria Rosito¹ e Enio Marchezan^{2*}

¹Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, e-mail: jumaida@ccne.ufsm.br ²Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: emarch@ccr.ufsm.br

RESUMO. Esse trabalho teve por objetivo identificar descritores epidérmicos foliares para a discriminação micro-histológica de espécies forrageiras. As espécies avaliadas *Lolium multiflorum* Lam., *Trifolium repens* L. *Paspalum urvillei* Steud., *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. var. *crusgalli*, *E. crusgalli* (L.) Beauv. var. *cruspavonis*, *E. colona* (L.) Link., tratadas como *Echinichloa* spp., e *Setaria geniculata* (Lam.) Beauv., foram coletadas em uma pastagem cultivada localizada no Campus da Universidade Federal de Santa Maria (RS-Brasil). A eficiência do avaliador foi testada através da identificação de cinco misturas de composição conhecida pelo teste de χ^2 . O grau de similaridade entre a composição real e estimada das misturas foi calculado pelo Índice de Similaridade de Kulczynski. Os principais descritores identificados, padrão estomático e dos corpos silicosos, presença de papilas e cristais e tamanho de células intercostais, foram considerados instrumentos eficientes na identificação botânica de misturas, pela técnica micro-histológica.

Palavras-chave: micro-histologia, determinação de dieta, padrões epidérmicos, plantas forrageiras.

ABSTRACT. Leaf descriptors to use in microhistological discrimination of some forage species. The aim of this paper was to identify efficient descriptors on leaf epidermis to use in microhistological discriminations of some forage species. The species were collected in a cultivated pasture located at the campus of *Universidade Federal de Santa Maria* (Federal University of Santa Maria, state of *Rio Grande do Sul*, Brazil): *Lolium multiflorum* Lam., *Trifolium repens* L. *Paspalum urvillei* Steud., *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. var. *crusgalli*, *E. crusgalli* (L.) Beauv. var. *cruspavonis*, *E. colona* (L.) Link. (*Echinichloa* spp.) and *Setaria geniculata* (Lam.) Beauv. The efficiency of the observer to identify the species studied was conducted by the χ^2 test and the degree of similarity between real and estimated composition of the mixtures were calculated by Kulczynski Similarity test. The main descriptors to identify botanical mixtures by the microhistological technique were: stomata and silica-bodies patterns, crystal type and length of intercoastal long-cells.

Key words: microhistology, diet composition, leaf epidermis, forage plants.

Introdução

A técnica micro-histológica de identificação botânica de fragmentos vegetais está baseada no uso de descritores cito ou histológicos previamente estabelecidos.

Essa metodologia é uma ferramenta importante para ciências como a Antropologia e a Paleontologia, na identificação de materiais fossilizados; pode, da mesma forma, auxiliar na determinação da composição botânica de misturas vegetais oriundas de cortes em uma pastagem, de um fardo comercial, de misturas farmacêuticas, além de subsidiar a Botânica Sistemática. Do ponto de vista ecológico e/ou econômico, contudo, é provável que a aplicação

mais importante do reconhecimento microscópico de restos vegetais seja a identificação da composição botânica da dieta de herbívoros atuais (Pelliza, 1993). A determinação da dieta de herbívoros é um primeiro passo no estudo do processo de seleção.

A epiderme é o tecido que recobre a superfície de todos os órgãos vegetais, formando uma capa contínua, interrompida, apenas, nos estômatos. Esse tecido é recoberto pela cutícula, camada resistente que inibe a digestão do mesofilo, no caso de folhas, pelo bloqueio à passagem de microorganismos do trato digestivo de herbívoros para os tecidos internos do órgão vegetal. Quando o crescimento dos tecidos abaixo dela se completa, a cutícula torna-se um filme endurecido, moldando o contorno das células. As

próprias paredes celulares podem ser impregnadas, tanto que, quando a cutícula é separada da folha, mecânica ou quimicamente, leva consigo um molde, e às vezes pedaços, de células da epiderme. Assim, muitas vezes, a cutícula pode ser observada desprendida da epiderme, mas conservando suas características morfológicas, servindo, portanto, à identificação microscópica (Stevens *et al.*, 1987; Pelliza, 1993). A identificação de fragmentos vegetais pela técnica micro-histológica está baseada em características micro-anatômicas dessa cutícula indigerível e de células subjacentes a ela que escapam à digestão.

Os trabalhos de Metcalfe (1960), sobre anatomia de mono e dicotiledôneas e de Ellis (1979), que inclui chaves descritivas, definições e diagramas que objetivam a uniformização e a simplificação de descrições anatômicas da epiderme de lâminas de gramíneas são referenciais. No trabalho de Ellis (1979) foram incluídos 340 caracteres da epiderme e suas variações.

De acordo com Johnson *et al.* (1983), a forma das células epidérmicas varia entre famílias, gêneros, espécies e partes da mesma planta. Sua forma é afetada por fatores como intensidade luminosa e umidade atmosférica. Assim, o tamanho, a forma e as características de paredes de células epidérmicas podem variar de ano para ano, lugar para lugar. Para os autores, apesar dessa variação, as características das células epidérmicas são muito úteis para a identificação de fragmentos vegetais.

Trabalhos como os de Jones e Slater (1986), Pelliza (1993), Martín e Nicosia (1992) e Cid *et al.* (2002) trazem importantes contribuições para o conhecimento da técnica micro-histológica e sua utilização na determinação de dieta.

Esse trabalho tem por objetivo identificar descritores epidérmicos foliares para a discriminação micro-histológica de espécies forrageiras em misturas de composição botânica conhecida. Os descritores, por seu caráter eminentemente prático, deverão ser utilizados em estudos de determinação de dieta que utilizem a técnica micro-histológica.

Material e métodos

As lâminas de referência foram elaboradas utilizando-se o meio de montagem Permout, com a utilização de fragmentos das faces superior e inferior do limbo e da bainha foliar, obtidos por raspagem com lâmina de barbear. As espécies avaliadas foram *Lolium multiflorum* Lam., azevém, *Trifolium repens* L., trevo branco, *Paspalum urvillei* Steud., *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. var. *crusgalli*, *E. crusgalli* (L.) Beauv. var. *cruspavonis*, *E. colona* (L.)

Link., tratadas como *Echinochloa spp.*, e *Setaria geniculata* (Lam.) Beauv. Os segmentos resultantes do procedimento de raspagem foram mergulhados em hipoclorito de sódio (de uso doméstico) por aproximadamente 15 minutos e, após lavagem em água, foram acondicionados em frascos com F.A.A. (formol/ácido acético/álcool, na proporção de 1:1:18ml) para fixação e posterior processamento, segundo a rotina usual de preparo de material botânico.

A escolha dessas espécies foi baseada na sua participação significativa em termos de matéria seca; e/ou frequência de ocorrência, numa área de pastagem cultivada com as duas primeiras espécies citadas, forrageiras de inverno. As demais, nativas da área, compunham a flora de sucessão que se estabeleceu, posteriormente. Todas, potencialmente, poderiam fazer parte, de forma significativa, da dieta selecionada pelos bovinos em pastejo na área.

A área, de três hectares, está localizada no Campus da Universidade Federal de Santa Maria (RS-Brasil) e pertence ao Departamento de Fitotecnia (Centro de Ciências Rurais).

As lâminas permanentes montadas a partir das técnicas descritas acima foram analisadas em microscópio binocular da marca Meiji, em aumentos de 125 X, para a elaboração dos padrões epidérmicos de cada espécie.

As características de diferenciação entre as espécies adotadas foram escolhidas em função de sua praticidade; são descritores facilmente identificáveis e que não levam o observador a interromper o trabalho em função de medições ou comparações frequentes.

Para testar a eficiência do avaliador na utilização da técnica micro-histológica, foram elaboradas cinco misturas de composição conhecida (misturas-teste), a partir de diferentes proporções de material referente a folhas das espécies de interesse. Esse material, coletado na área experimental, foi seco em estufa e moído em moinho tipo Willey com peneira de 1mm (Quadro 1).

Quadro 1. Percentagem de contribuição para o peso seco total de cinco espécies em cinco misturas-teste submetidas à análise micro-histológica. Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. 2002.

Espécies	Misturas (%)				
	1	2	3	4	5
<i>Lolium multiflorum</i>	15	25	10	50	60
<i>Paspalum urvillei</i>	60	25	10	30	10
<i>Setaria geniculata</i>	15	10	50	0	10
<i>Echinochloa sp.</i>	10	30	10	20	10
<i>Trifolium repens</i>	0	10	20	0	10

A partir de cada mistura, tomada ao acaso, foram elaboradas 5 lâminas que foram, a seguir, submetidas à análise em microscópio binocular, conforme procedimento descrito por Sparks e Malechek (1968).

Ao mesmo tempo em que serviu à calibração do avaliador, a determinação da composição das misturas-teste permitiu que fossem testados procedimentos de quantificação da análise micro-histológica, segundo descrito por Holechek e Gross (1982).

Dessa maneira, foram comparados três procedimentos para a estimativa da composição em peso seco de cada mistura: cálculo da **densidade real** de cada componente (número de fragmentos identificáveis de cada componente, em todos os campos, dividido pelo número total de fragmentos identificáveis de todos os componentes); **conversão da frequência em densidade** (através da tabela de conversão de Fracker e Brischle (1944), conforme discutido por Sparks e Malechek (1968), **adição de frequências** (frequência de cada componente dividida pelo somatório da frequência de todos os componentes).

Na conversão da frequência em densidade, percentagens de frequência (o número de campos nos quais uma espécie ocorre, num total de 100 locações) foram tabuladas para cada espécie na mistura. Essas percentagens foram convertidas em densidade de partículas, por campo, pela tabela de Fracker e Brischle (1944), e a densidade relativa, expressa como a percentagem de cada espécie na mistura, foi calculada. A densidade relativa de uma espécie é usada para estimar a percentagem de peso seco dessa espécie na mistura (Sparks e Malechek, 1968).

O teste de χ^2 foi empregado para comparar os valores obtidos de participação dos componentes na dieta, através das diferentes formas de cálculo. Esse teste, ao comparar duas misturas (composição real X estimada), subsidia a escolha do melhor método para o cálculo da percentagem de contribuição de cada componente. Para estimar o grau de similaridade entre a composição das misturas-teste e a composição real, foi calculado o **Índice de Similaridade de Kulczynski, IS_K** (Oosting, 1956).

Resultados e discussão

1. Padrões epidérmicos

O primeiro critério de diferenciação foi baseado no reconhecimento do tipo de estômato e células epidérmicas, entre os táxons. Estômatos com células-guarda halteriformes caracterizam as gramíneas e as

separam de *T. repens*, o trevo, com células-guarda tipicamente reniformes (Figura 1).

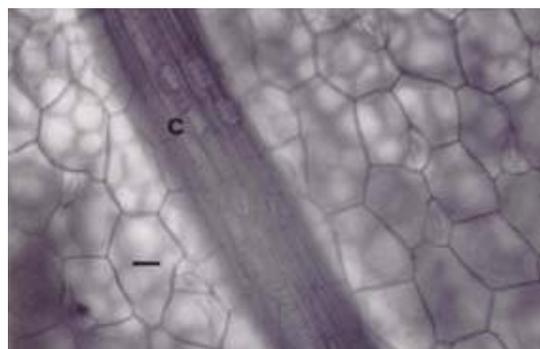


Figura 1. Face abaxial da epiderme foliar de *Trifolium repens* (X400): cristais ao longo de uma nervura (c). Barra 10 μ m.

Ainda para o trevo, um critério importante é a presença de cristais solitários de oxalato de cálcio, ao longo das nervuras. Essa característica é observada nas lâminas de referência, porque o procedimento de raspagem descrito não elimina, totalmente, as células do mesofilo. Dessa forma, as nervuras são visíveis através da epiderme.

Os cristais estão localizados na bainha parenquimática que envolve os feixes vasculares, como acontece com outras leguminosas (Zindler-Frank, 1994; Kuo-Huang e Zindler-Frank, 1998).

Se a análise do padrão estomático indicar uma gramínea, *Lolium multiflorum* pode ser reconhecido, facilmente, por ser a única das espécies analisadas com células subsidiárias dispostas de forma paralela, dando ao complexo estomático uma forma alongada, horizontalmente (Figura 2).

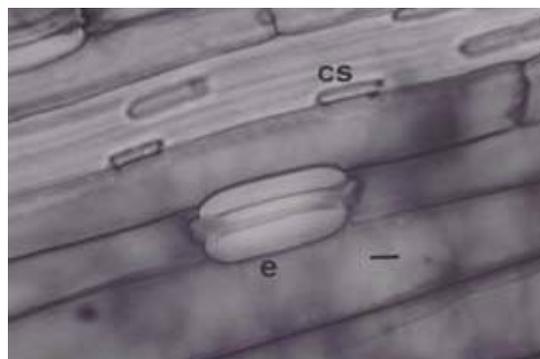


Figura 2. Face abaxial da epiderme foliar de *Lolium multiflorum* (X400): estômato com células subsidiárias paralelas (e); corpos silicosos alongados (cs). Barra = 10 μ m.

L. multiflorum, nas preparações para o uso da técnica micro-histológica, pode ser reconhecido, também, pelo aspecto de seus corpos silicosos, alongados e com contornos lisos.

As demais espécies de gramíneas analisadas apresentam estômatos e corpos silicosos de formas semelhantes, não sendo esse, portanto, um bom critério de discriminação entre elas.

Echinochloa spp. distingue-se das demais pelo grande número de papilas na epiderme, tornando os fragmentos dessa espécie facilmente reconhecíveis; outras características como célula-basal do micropêlo reta e alongada, corpos silicosos e estômatos pequenos, podem ser usadas para complementar o reconhecimento (Figura 3).

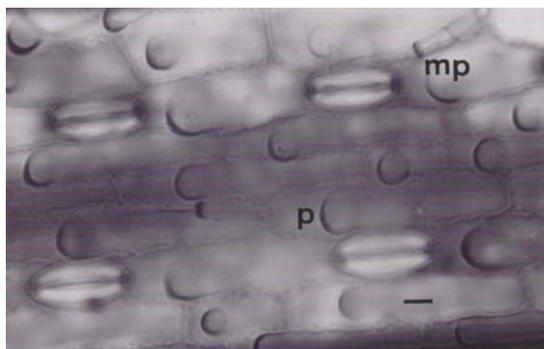


Figura 3. Face abaxial da epiderme foliar de *Echinochloa* sp. (X400): papilas (p) e micro-pêlo (mp). Barra = 10µm.

Se o fragmento não apresentar um grande número de papilas epidérmicas, outras características das células intercostais devem ser analisadas.

Quando as células forem muito longas, sendo possível observar apenas duas ou três, por campo, em uma mesma fileira, em 400X, o fragmento pode pertencer à *Setaria geniculata*. Nesse caso, os estômatos também serão grandes (3 a 4, por campo, em uma mesma fileira, com aumento de 400X). Além disso, a célula basal do micropêlo dessa espécie é alongada (Figura 4).

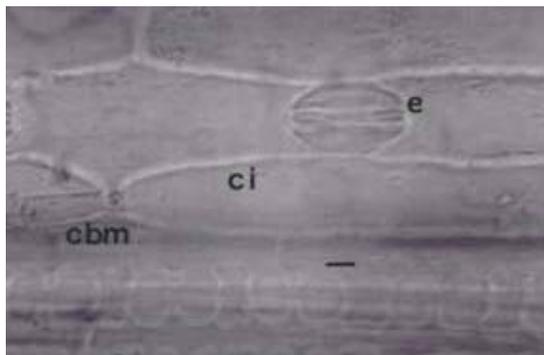


Figura 4. Face abaxial da epiderme foliar de *Setaria geniculata* (X400): células intercostais (ci); célula basal do micro-pêlo (cbm); estômato (e). Barra = 10µm.

Paspalum urvillei pode ser reconhecida pela forma de "gancho de telefone" que as células subsidiárias

assumem, na preparação das lâminas, e pela presença de numerosos pêlos em forma de ganchos, muitos deles não completamente desenvolvidos, destacando a base anelada da célula (Figura 5).

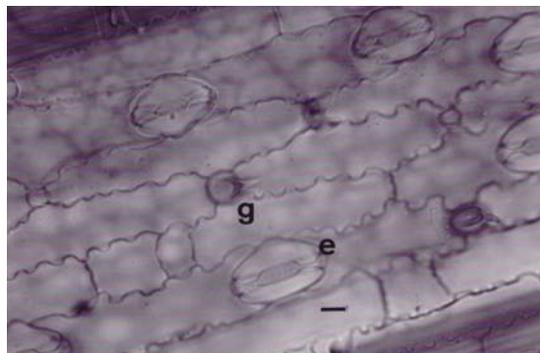


Figura 5. Face abaxial da epiderme foliar de *Paspalum urvillei* Steud. (X400): gancho (g); estômato (e). Barra = 10µm.

As características referidas podem ser resumidas na chave analítica apresentada no Quadro 2.

Quadro 2. Caracteres utilizados para diferenciação microhistológica epidérmica das espécies avaliadas na determinação da dieta. Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. 2002.

A. Estômatos com células-guarda reniformes; presença de cristais solitários ao longo das nervuras.....	Trifolium repens.
A'. Estômatos com células-guarda halteriformes; ausência de cristais.	
B. Células subsidiárias paralelas; corpos silicosos alongados horizontalmente, contornos lisos e terminações arredondadas.....	Lolium multiflorum.
B'. Células subsidiárias triangulares ou de formas semelhantes; corpos silicosos sem as características anteriores.	
C. Papilas numerosas em ambas as faces da epiderme foliar.....	Echinochloa spp.
C'. Papilas ausentes ou raras.	
D. Células intercostais curtas (6 ou mais por campo, numa mesma fileira, em 400 X); 5 a 6 estômatos por campo, em média, numa mesma fileira (400 X); célula basal do micropêlo curta e larga; muitos ganchos (aspecto de anéis), na zona intercostal.....	Paspalum urvillei.
D'. Células intercostais muito longas (em média 2 a 3 por campo, numa mesma fileira, em 400 X); 3 a 4 estômatos por campo, em média, numa mesma fileira (400 X); célula basal do micropêlo reta e delgada; ganchos raros ou ausentes.....	Setaria geniculata.

2. Aferição do avaliador

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na determinação da composição botânica das misturas-teste pela técnica micro-histológica, e a contribuição real dos componentes para o peso seco total.

Com relação à aptidão do avaliador, a Tabela 1 mostra que na mistura 2 o observador estimou com eficiência a participação dos componentes avaliados ($P > 0,05$), independentemente do procedimento de cálculo empregado. Nas demais, a similaridade entre o estimado e o real esteve diretamente relacionada a um ou outro procedimento.

Tabela 1. Contribuição (%) dos componentes de cinco misturas-teste de composição conhecida (real) para o peso seco total e composição estimada através dos métodos da densidade (densidade), conversão da frequência em densidade (freq./dens) e adição de frequência (adição), valor de χ^2 calculado e índice de similaridade (IS, fórmula de de Kulczynski). Santa Maria, RS. 2002.

	contribuição real (%)	contribuição estimada (%)		
		Densidade	freq./dens	Adição
mistura 1				
L. multiflorum	15	13	14	21
P. urvillei	60	53	66	47
S. geniculata	15	23	8	13
Echinochloa spp.	10	11	12	19
χ^2		5,45 ^{ns}	4,33 ^{ns}	13,58*
IS		0,91	0,92	0,85
mistura 2				
L. multiflorum	25	21	20	21
P. urvillei	25	25	31	28
S. geniculata	10	6	6	9
Echinochloa spp.	30	35	32	29
T. repens	10	13	11	13
χ^2		3,97 ^{ns}	4,27 ^{ns}	2,03 ^{ns}
IS		0,92	0,91	0,94
mistura 3				
L. multiflorum	10	10	9	12
P. urvillei	10	21	18	21
S. geniculata	50	31	43	32
Echinochloa spp.	10	16	11	14
T. repens	20	22	19	21
χ^2		23,13*	7,63 ^{ns}	20,63*
IS		0,81	0,91	0,82
mistura 4				
L. multiflorum	50	45	42	38
P. urvillei	30	34	36	35
Echinochloa spp.	20	21	22	27
χ^2		1,08 ^{ns}	2,68 ^{ns}	6,16*
IS		0,95	0,92	0,88
mistura 5				
L. multiflorum	60	56	55	39
P. urvillei	10	14	13	17
S. geniculata	10	9	7	10
Echinochloa spp.	10	8	10	14
T. repens	10	13	15	20
χ^2		3,27 ^{ns}	4,71 ^{ns}	23,86*
IS		0,93	0,92	0,79

* frequências observadas diferem significativamente da frequência esperada, pelo teste χ^2 em nível de 5% de probabilidade de erro.

^{ns} frequências observadas não diferem da frequência esperada.

Na mistura 3, o avaliador estimou com eficiência ($P>0,05$) a contribuição dos componentes apenas no procedimento de transformação de frequência em densidade. Nas demais misturas, o estimado foi semelhante ao real ($P<0,05$) em pelo menos dois dos procedimentos de cálculo adotados.

Pelo teste de χ^2 , o melhor desempenho do avaliador foi obtido através da adoção da conversão de frequência em densidade, e o pior foi através da adição de frequências, uma vez que apenas na amostra 2 a diferença entre o estimado e o real não foi significativa ($P>0,05$).

A Tabela 1 apresenta, ainda, os Índices de Similaridade (IS) calculados para os valores estimados, dentro de cada procedimento, comparados aos valores reais, em cada mistura-teste. Faz-se necessário destacar que valores acima de 85% são considerados indicadores de muita semelhança entre duas amostras (Bauer *et al.*, 2000). Sob esse aspecto, na mistura 3, o avaliador não obteve bons

resultados, em relação à densidade e à adição de frequências.

Esse resultado pode estar ligado ao elevado índice de participação de *Setaria geniculata*, 50%. Em função da maior dificuldade de identificação, é possível que fragmentos dessa espécie tenham sido atribuídos à *Paspalum urvillei*, que guarda uma certa semelhança com aquela espécie, em algumas características epidérmicas. Note-se que, quando *S. geniculata* contribuiu com percentuais reduzidos (misturas 2 e 5), sua participação estimada foi muito próxima da real.

A Tabela 1 mostra que, nas misturas onde o avezém contribuiu com 10%, 15% ou 25% para o peso seco total, as estimativas, em todos os procedimentos de cálculo foram próximas ao valor real (misturas 1, 2 e 3). Nas misturas 4 e 5, onde o componente contribuiu com 50% e 60% para o peso seco real, houve uma tendência de ser subestimativa, especialmente no procedimento de adição de frequências.

Entre as misturas, a que apresentou um menor IS médio foi a de número 3, com 88% de similaridade, o que fortalece o resultado do teste de χ^2 . Os melhores índices foram obtidos para as misturas 2 e 4, com 92% de similaridade entre o estimado e o real, embora, pelo teste de significância, apenas na mistura de número 2 tenha havido uma estimativa semelhante à real ($p > 0,05$), para os três procedimentos.

Independentemente do melhor desempenho de um ou de outro procedimento, na média geral, o avaliador teve uma eficiência de 89% em estimar a composição das misturas; ao ser considerado o método de densidade, 90% e para conversão de frequência em densidade e adição de frequências, 92% e 86%, respectivamente.

Os resultados da aplicação dos Índices de Similaridade apontam, portanto, para o procedimento de conversão de frequência em densidade como o de melhor desempenho, o que está em consonância com os resultados do teste de χ^2 .

Esse resultado difere daquele de Holechek e Gross (1982), os quais referem a adição de frequências como o melhor método, com uma similaridade de 92% com a composição real.

Johnson e Pearson (1981) destacam a importância de avaliadores bem treinados, que desenvolvem auto-confiança e habilidade para quantificar composição de misturas. Na avaliação dos autores, os técnicos estavam aptos para estimar composição de misturas, com exatidão, ao estimarem as amostras-controle com uma semelhança de $87 \pm 1\%$.

Os resultados apresentados na tabela 1 contribuem, ainda, para a discussão de um ponto bastante polêmico, ou seja, a estimativa de participação de trevo branco.

Em valores absolutos, a porcentagem de contribuição do trevo branco, em todas as misturas-teste, de maneira geral, foi superior à real. Esse resultado vai de encontro ao verificado na literatura, que refere sub-estimativas, para o caso das Leguminosas em geral, por efeito da digestibilidade diferenciada.

A análise fecal, para Jones e Slater (1986), não parece ser o método mais eficiente para determinação da dieta no caso de participação de *Trifolium repens*, *Macroptilium atropurpureum* e *Desmodium intortum*, todas Leguminosas. Segundo eles, nessas espécies, a epiderme parece ser completamente digerida. Opinião semelhante é compartilhada por Bauer *et al.* (2000), para quem espécies com epidermes delgadas e tecidos frágeis,

como a alfafa, foram subestimadas após a digestão, independentemente de seu grau de participação na mistura.

Por outro lado, Stevens *et al.* (1987) afirmam que, em dietas com componentes de cutícula frágil como a alfafa em baixa proporção de espécies lenhosas, a análise cuticular é um método viável para a determinação da dieta. É interessante destacar que os autores fazem referência à destruição das características cuticulares de fragmentos foliares de trevo branco, quando submetidos à ação de agentes clarificadores. Esse procedimento é, normalmente, utilizado na preparação de lâminas para a análise micro-histológica de fezes de ovinos. Portanto, há que ser considerado o efeito da preparação laboratorial do material a ser submetido à análise na subestimativa da composição botânica.

Em seu trabalho com identificação de dieta por análise fecal, Rosito (2002) verificou, na realidade, uma destruição quase total da epiderme de trevo. Os poucos fragmentos epidérmicos encontrados dessa espécie foram visualizados, no microscópio óptico, descaracterizados, como imagens distorcidas; por outro lado, os fragmentos que continham os cristais usados como elementos descritores foram facilmente identificados.

Johnson *et al.* (1983) são bastante otimistas com relação ao sucesso da técnica micro-histológica. Eles acreditam que a digestão não afeta, significativamente a composição botânica. Os autores concluem, corroborando os resultados de Holechek e Gross (1982), que o fator realmente importante seria o treinamento do observador. Se esse pré-requisito for cumprido de maneira satisfatória, a estimativa de dieta através de amostras fecais é uma técnica bastante confiável.

Conclusão

1. Para o conjunto de espécies avaliadas, os descritores foliares considerados são instrumentos eficientes na identificação botânica de misturas, pela técnica micro-histológica.
2. O critério de praticidade adotado para a escolha dos descritores é passível de ser utilizado na diferenciação das espécies consideradas, uma vez que as mesmas diferem bastante entre si.
3. Uma vez que a presença de cristais, em *Trifolium repens*, não está diretamente associada à epiderme e sim ao mesofilo, são necessárias avaliações desse descritor associado ao processo de digestão, na determinação mais precisa de sua eficiência.

Referências

- BAUER, M. de O. *et al.* Avaliação da composição botânica de misturas de espécies forrageiras preestabelecidas, pela técnica micro-histológica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa – MG. *Anais...Viçosa: Soc. Bras. de Zootecnia*, 2000.
- CID, M.S. *et al.* (Ed.). Selección de dieta por grandes herbívoros mamíferos: procesos y escalas. In: TALLER DE SELECCIÓN DE DIETA POR GRANDES HERBÍVOROS MAMÍFEROS: Procesos y escalas, I., 2002, Buenos Aires. *Actas...* Buenos Aires: Inta Balcarce, MACN, Inta Bariloche, FAA Santiago del Estero, 2002. 239 p.
- ELLIS, R.P. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view. *Bothalia*, Pretoria, v. 12, n. 4, p. 641-671, 1979.
- FRACKER, S.B.; BRISCHLE, H.A. Measuring the local distribution of the ribes. *Ecology*, Durham, v. 25, n. 3, p. 283-303, 1944.
- HOLECHEK, J.L.; GROSS, B.D. Evaluation of different calculation procedures for microhistological analysis. *J. Range Manag.*, Denver, v. 35, n. 6, p. 721- 723, 1982.
- JOHNSON, M.K.; PEARSON, H.A. Esophageal, fecal and enclosure estimates of cattle diets on a longleaf pine-bluestem range. *J. Range Manag.*, Denver, v. 34, n. 3, p. 232-234, 1981.
- JOHNSON, M.K. *et al.* *Microhistological techniques for food habits analyses*. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1983. (Res. Pap. SO-199).
- JONES, R.J.; SLATER, J. The use of epidermal hairs of the legume Siratro recovered in the faeces to estimate the proportion of Siratro in the diet of ruminants. *Aust. J. Exp. Agric.*, Parkville, v. 26, p. 557-566, 1986.
- KUO-HUANG, L.L.; ZINDLER-FRANK, E. Structure of crystal cell and influences of leaf development on crystal cell development and vice versa in *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae). *Bot. Acta*, Stuttgart, v. 111, p. 337-345, 1998.
- MARTÍN, G.O.; NICOSIA, M. G. Caracteres epidérmicos foliares de dos gramíneas naturalizadas de la Provincia de Tucumán: *Cynodon dactylon* (L.) Pers. y *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Revista Argentina de Producción Animal*, Buenos Aires, v. 12, n. 3, p. 259-264, 1992.
- METCALFE, C.R. *Anatomy of Monocotyledons*. I. Gramineae. Oxford: Clarendon Press, 1960.
- OOSTING, H.J. *The study of plant communities*. San Francisco: W. H. Freeman and Co., 1956.
- PELLIZA, A. *Acerca de la microhistología*. Bariloche: Estación Experimental Agropecuaria Bariloche – Inta, 1993. 92 p. (Comunicación técnica n.32).
- ROSITO, J. M. *Dinâmica da composição botânica da dieta selecionada por bovinos em uma pastagem cultivada em área de várzea*. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.
- SPARKS, D.R.; MALECHEK, J. C. Estimating percentage dry weight in diets using a microscopic technique. *J. Range Manag.*, Denver, v. 21, p. 264-265, 1968.
- STEVENS, E. *et al.* Procedure for fecal cuticle analysis of herbivore diets. *J. Range Manag.*, Denver, v. 40, n. 2, 1987.
- ZINDLER-FRANK, E. Calcium, calcium oxalate crystals, and leaf differentiation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bot. Acta*, Stuttgart, v. 108, p. 144-148, 1994.

Received on January 08, 2002.

Accepted on May 16, 2003.