



UNIVERSIDAD DE JAÉN
**FACULTAD CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
ANIMAL, VEGETAL Y ECOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**VALIDACIÓN Y USO DE ESPECTROSCOPIA
DE INFRARROJO CERCANO (NIRS) PARA EL
ESTUDIO DE LA ALIMENTACIÓN DE CIERVO
(*Cervus elaphus*) Y GAMO (*Dama dama*) EN
ECOSISTEMAS MEDITERRÁNEOS**

**PRESENTADA POR:
MARÍA SIERRA TELLADO RUIZ**

**DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. CONCEPCIÓN AZORIT CASAS**

JAÉN, 24 DE JULIO DE 2015

ISBN 978-84-8439-944-5

Esta Memoria de Trabajo doctoral ha sido realizada en el Área de Zoología del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Jaén, bajo la dirección de la Dra. Concepción Azorit Casas y en colaboración con el Grupo de Investigación de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén. Parte de los resultados obtenidos han sido presentados en el XXXth IUGB Congress (International Union of Game Biologists) and Perdix XIII en Barcelona, 2011 y publicados en revistas como Animal Production Science y Rangeland Ecology y Management.

Para la realización de este trabajo se ha contado con la financiación de los Proyectos **RNM-03087** (Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía), fondo **FEDER** (Fondo Europeo de Desarrollo Regional de la Comisión Europea) y **CGL-2011-23919** (Ministerio de Ciencia e Innovación), Grupo de Investigación **PAI RNM-175** y con la colaboración de los Centros de Lugar Nuevo y Selladores Contadero, del Organismo Autónomo de Parques Nacionales (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino) y el CICT (Centro de Instrumentación científico Técnica) de la Universidad de Jaén.

AGRADECIMIENTOS

Para mí, la página de agradecimientos es el lugar perfecto para decir, con toda sinceridad, que en la vida me sería imposible prosperar solo con mi propia fuerza y habilidades. Puede que esta Tesis tenga una única autora, pero esta autora no habría sido capaz de hacer gran cosa sin las siguientes personas. Así que, con eso en mente:

Quiero empezar mis agradecimientos a mi directora de tesis la doctora Concepción Azorit Casas, por dedicarme su tiempo y su paciencia.

Al doctor Javier Moro Valverde por creer en la investigación como una herramienta más de gestión y hacer posible este trabajo. A Ramón Gutiérrez, por introducirme en el equipo de los guardas forestales de las fincas de Lugar Nuevo y Selladores Contadero

Al Catedrático Sebastián Sánchez Villaclaras, por acogerme en el laboratorio de Ingeniería Química e introducirme en su grupo, haciendo posible la mayoría de los análisis de esta tesis. A mis compañeros de laboratorio Juan Gabriel Puentes y Rafael Órpez por prestarme su ayuda y ser un gran apoyo durante el análisis de las muestras.

A Macarena López, Ricardo Oya y Baltasar Deudor del Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén por la ayuda en el manejo de los distintos equipos.

A Oscar López y Beatriz Mateo por esos buenos momentos que hemos pasado formando un gran grupo dentro y fuera del laboratorio y por estar echándome una mano cuando lo he necesitado.

A mis “compañeros” los guardas forestales de Selladores Contadero y Lugar Nuevo: Lucinio, Pablo, Eufrasio, Paco Cubilla, Manolo Castilla, Juan Salas, Valeriano, Antonio Navarro, Luisma, Francisco Guerrero, Francisco Novoa, Gregorio; A Maxi y Antonio de Tragsa, y por último, pero no menos importante a Rafael Carrasco. Me gustaría darle las gracias a todos ellos por su ayuda en la recogida de muestras ya que gracias a ellos ha sido uno de los mejores momentos del proceso de esta tesis, siendo en algunos momentos toda una aventura, en toda la amplitud de su significado, que nunca lo olvidaré.

Luego está la “trupe” del departamento de Biología experimental y agregados: Ana Isabel, Pedro, Anabel, Luis, Juan Carlos, Inma, Jaime, Anto, Capilla, María, Bea, Sebas, Paquito, Marta,

Mariola, Vero, Ángel, Lina, Jose Rafa, M^a del Mar, Abel que me han acogido como a una más, compartiendo penas y glorias (con o sin tarta de chocolate).

A Débora, esa catalana con la que compartí inolvidables momentos, ánimos mutuos y charlas durante esta etapa de mi vida.

A mis amigos jienenses Jose, Carmen, Terry, Juanma, Fronzo y egabrenses Virginia, Laura, Silvia, Juanan García, Juanan Nuñez, Sergio, María, Antonio, America, Victor, Carmen, Fernando, M^a Carmen, Santi y Macarena por hacerme desconectar de la rutina, darme su apoyo y estar siempre cuando los he necesitado. Especialmente a Fabián, con el que he pasado durante la escritura de esta tesis momentos inolvidables.

A Ismael, por estar siempre a mi lado, no solo queriéndome de una forma extraordinaria, dándome fuerzas y en los momentos más estresantes contagiándome de su tranquilidad, sino por los difíciles momentos de agobio y estrés, por leerse y ayudarme con los borradores de esta tesis y por enfrentarse con toda la paciencia del mundo a mí, la mujer con prisas y por último sin ser lo menos importante, por ser mi asiduo confidente y haber hecho más fácil el avance diario de esta tesis.

A mi familia, por apoyarme y estar siempre ahí preocupándose por el día a día de este trabajo. Especialmente a mi hermana Inma, que se ha leído, sin entender de qué iba la cosa, los apartados de esta tesis que le he ido confiando.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	7
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	11
1.1 Especies y área de estudio.....	13
1.2 Alimentación y dieta de cérvidos en ambiente mediterráneo.....	19
1.3 Análisis laboratoriales de parámetros para estudios de alimentación.....	22
1.3.1 Celulosa.....	24
1.3.2 Hemicelulosa.....	24
1.3.3 Lignina.....	25
1.3.4 Fibra ácido detergente (ADF) y Fibra neutro detergente (NDF).....	27
1.3.5 Azúcares.....	28
1.3.6 Relación carbono/ nitrógeno (C:N).....	29
1.3.7 Digestibilidad enzimática (EDOM) y de la pared celular (CWD).....	30
1.3.8 Composición botánica.....	31
1.4 Espectroscopia de infrarrojo cercano: historia y procedimientos.....	33
1.4.1 Fundamentos teóricos de la espectroscopía NIR.....	34
CAPITULO 2: OBJETIVOS y JUSTIFICACIÓN	39
CAPITULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1 Recogida de muestras en el campo y procesamiento.....	47
3.2 Análisis de rumen: Procedimientos químicos convencionales para la obtención de resultados de referencia.....	48
3.2.1 Determinación de Fibra ácido detergente (ADF).....	48
3.2.2 Determinación de Fibra neutro detergente (NDF).....	49
3.2.3 Determinación de Lignina.....	49
3.2.4 Relación carbono / nitrógeno: (C:N).....	51
3.2.5 Determinación de la Digestibilidad enzimática (EDOM).....	52
3.2.6 Índice de la Digestibilidad de la pared celular (CWD).....	53
3.2.7 Determinación de la Celulosa.....	54
3.2.8 Determinación de la Hemicelulosa.....	54

3.2.9 Estudio del contenido en Azúcares.....	54
3.3 Análisis de rumen: Análisis de la composición botánica de la dieta.....	58
3.4 Procedimiento para la espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano.....	59
3.4.1 Tratamiento de las muestras de heces.....	59
3.4.2 Medidas espectrales y tecnología utilizada.....	60
3.4.3 Análisis quimiométrico y métodos de calibración.....	60
3.4.4 Valoración de precisión y fiabilidad.....	61
3.4.5 Validación externa.....	63
CAPITULO 4: RESULTADOS.....	65
4.1 VALIDACIÓN PARA ADF, NDF, LIGNINA, RELACIÓN C:N, EDOM:.....	67
4.1 (A) Comunicación a congreso.....	69
4.1 (B) Art. 1 Fecal-FT-NIRS como herramienta no invasiva para la evaluación de calidad de la dieta de los ciervos del Mediterráneo.....	71
4.2 VALIDACIÓN PARA CWD: Art. 2 Un análisis integral para cuantificar la calidad nutricional de la dieta seleccionada de dos cérvidos silvestres mediterráneos por FECAL-FT-NIRS.....	95
4.3 VALIDACIÓN DE CELULOSA, HEMICELULOSA Y AZUCARES: Art. 3 El uso de NIRS como una herramienta no invasiva para la evaluación de compuestos de la dieta en dos especies de ciervos mediterráneos.....	111
4.4 COMPOSICIÓN BOTÁNICA DE LA DIETA: Art. 4 Variaciones estacionales y de dieta en poblaciones simpátricas de ciervo y gamo del sur de España: una primera aproximación al comportamiento alimentario.....	131
CAPITULO 5: DISCUSIÓN GENERAL.....	151
CAPITULO 6: CONCLUSIONES GENERALES.....	159
BIBLIOGRAFIA.....	163
ANEXO I: Tamaño de partícula en las muestras de heces.....	185

ANEXO II: Fecal-FT-NIRS as a Noninvasive Tool for Assessing Diet Quality of Mediterranean Deer.....	189
ANEXO III: An integrative assay to quantify the nutritional quality of the selected diet of two Mediterranean free-living deer by faecal-FT-NIRS.....	199
ANEXO IV: Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain: a preliminary approach to feeding behavior.....	207
ANEXO V: Currículum Vitae.....	217

RESUMEN

A lo largo de los años, la determinación de la calidad nutricional de la dieta de rumiantes silvestres ha sido uno de los aspectos más difíciles de abordar. El presente estudio expone una herramienta diagnóstica con capacidad de evaluar la calidad nutricional de la dieta de manera indirecta, rápida y precisa a través de las heces. Desarrollando la puesta a punto y validación de un método de espectroscopía de reflectancia en la región del infrarrojo cercano (NIRS), para determinar la calidad de la dieta en cérvidos mediterráneos en fincas donde el aprovechamiento cinegético es el principal recurso económico. Aportando información sobre los índices que informan sobre la calidad de la dieta del ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y gamos (*Dama dama*) en su hábitat, estos índices son: el contenido de fibra ácido detergente (ADF) y fibra neutro detergente (NDF), el contenido de lignina, el índice de carbono/nitrógeno (C:N), la digestibilidad enzimática (EDOM) y de la pared celular (CWD), la cantidad de celulosa y hemicelulosa, la cuantificación de azúcares y por último, la composición botánica de la dieta. El material utilizado fue el contenido ruminal y de heces procedentes de 149 ciervos y 111 gamos abatidos durante cacerías a rececho y caza selectiva en Sierra Morena de Jaén. Esta investigación combina procedimientos laboratoriales de análisis químicos convencionales con procedimientos NIRS, los cuales requieren análisis matemáticos y estadísticos complejos.

En primer lugar se procedió a la recogida y procesamiento de las muestras. A continuación, en las muestras de rumen se analizaron los distintos índices de la calidad de la dieta mediante métodos químicos tradicionales: determinando la fibra ácido detergente (FAD) y la fibra neutro detergente (FND) mediante el método de Van Soest y Wine (1967); la lignina siguiendo el método desarrollado por la norma Tappi T222 om-88 (1978); el contenido de C:N mediante el analizador elemental (Thermo Finnigan Flash EA1112); la digestibilidad enzimática (EDOM) se determinó usando un método indirecto utilizando celulasas (McLeod y Minson, 1978); el índice de la digestibilidad de la pared celular (CWD) se obtuvo siguiendo la ecuación descrita por Codron et al. (2007); el contenido en azúcares se cuantificó mediante el método de DNS propuesto por Miller (1959) y finalmente la composición botánica de la ingesta se analizó de forma similar a Nugent (1983) y McCullough (1985), clasificando el rumen en frutos, hierbas y arbustos como Gebert y Verheyden-Tixier (2001).

A continuación, se obtuvieron espectros de absorción en el NIRS de las muestras de heces previamente liofilizadas y trituradas a un tamaño de partícula homogéneo. Los espectros de infrarrojos se registraron con un espectrómetro de infrarrojo cercano FT-NIR Antaris (MDS) de Nicolet equipado con un detector InGaAs.

Posteriormente, se obtuvo ecuaciones de calibración con capacidad de predicción mediante el llamado análisis quimiométrico, es decir, mediante la correlación de los valores resultantes de los análisis ruminales con procedimientos tradicionales con los espectros de NIRS de las heces. Para ello se utilizó un ajuste por mínimos cuadrados parciales (PLS) mediante el programa TQ Analyst 6.1.1. software de Thermo Nicolet Corp. Realizando tratamientos previos de los datos (entre ellos la primera y segunda derivada), se testaron diferentes regiones del espectro por lo que se obtuvieron diferentes ecuaciones de calibrado. Seguidamente se valoró la precisión y capacidad predictiva a partir del coeficiente de correlación (r), la raíz cuadrada del error estándar de calibración (RMSEC), y la raíz cuadrada del error estándar de validación cruzada (RMSECV). Para la valoración de la fiabilidad del método también se usó la raíz cuadrada del error de predicción (RMSEP). Finalmente se realizó una validación extra de muestras de ciervo y gamo, no introducidas en la calibración, en la que se utilizaron las ecuaciones de predicción con mejores índices de bondad, donde los valores de referencia (resultado de los análisis químicos tradicionales) se comparan con los obtenidos a partir del NIRS utilizando programas estadísticos como SPSS, SAS o Statgraphics Centurion XV.

Obteniendo una serie de ecuaciones predictivas fiables para predecir los índices que determinan la calidad de la dieta, como manifiesta la bondad de ajuste con $r > 0.8$, los demás indicadores estadísticos (RER, RMSEC, RMSECV, RMSEP) y los resultados de la validación externa. Resultando unas ecuaciones conjuntas fiables para la predicción de NDF, lignina, CWD, hemicelulosa y azúcares de muestras de ciervo y de gamo indistintamente y unas ecuaciones específicas para cada especie que determinan ADF, EDOM, C:N y celulosa.

En general ambas especies de cérvidos fueron arbustivos o ramoneadores en dos períodos: al final del invierno y del verano. El resto del año fueron predominantemente herbáceos, con la excepción del otoño y comienzo del invierno cuando los frutos (principalmente bellotas) fueron el recurso más seleccionado. Así, las épocas con la dieta más nutritiva fueron la primavera, con mayor cantidad de herbáceas ricas en nitrógeno y finales de otoño - principios de invierno, con un aumento del consumo de frutos. No obstante, se detectaron diferencias inter-específicas en la dieta de las especies estudiadas. El ciervo consumió dietas menos digestibles que el gamo, con índices CWD y EDOM más bajos. Probablemente consecuencia de un comportamiento más ramoneador en el caso del ciervo y más frugívoro en el caso del gamo. Los menores índices de CWD de final del invierno coinciden con niveles altos de ramoneo en ambas especies, debido a la mayor cantidad de lignina de este tipo de vegetación. Y a finales de verano se detectan mayores

índices C:N y menores concentraciones de azúcares coincidiendo con el consumo de pasto seco. Las concentraciones generales de ADF y NDF, junto con la de lignina, fueron menores en gamos que en ciervos en los meses de primavera, cuando eran más herbáceos.

Los resultados indican que, una vez desarrollada y validada, la técnica NIRS resulta satisfactoria para la determinación fiable de parámetros nutricionales a partir de heces. Esta técnica, se muestra como una herramienta de excepción para el monitoreo de animales silvestres de forma indirecta, rápida y no invasiva.

ABSTRACT

Throughout the years, the nutritional quality of deer diet has been difficult to study. This study explains a diagnostic tool capable of evaluation of nutritional quality in deer diet with an indirect, fast and accurate method using feces. We developed and validated a method using near infrared reflectance spectroscopy, for the analysis of diet quality of mediterranean deer in an enclosed official estate, where hunting is the main economic resource. Indicators which provide information on diet quality of red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and fallow deer (*Dama dama*) in their habitat are: acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), lignin, C:N ratio, enzymatic digestibility of organic matter (EDOM), cell wall digestibility (CWD), cellulose, hemicellulose, sugar and botanical composition of diet. The material used in this study consisted of rumen content and feces, which were collected from 149 deer and 111 fallow deer in a selective hunt in Sierra Morena, Jaén. This study combines conventional chemical procedures with NIRS procedures, which need complex mathematical and statistical analysis.

Rumen contents and feces were collected. Ruminal samples were analyzed using traditional chemical methods in order to obtain the following indicators of quality in diet: acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF) following the standard method of Van Soest and Wine (1967); For lignin determination we used the Tappi T222 om-88 norm (1998); the C:N ratio was obtained by Elemental Analyzer (Thermo Finnigan Flash EA1112); the enzymatic digestibility of organic matter was calculated by incubating with a cellulose enzyme solution (McLeod y Minson, 1978); the CWD index was estimated by the equation described by Codron et al. (2007); The sugar concentration was measured with the dinitrosalicylic acid (DNS) method described by Miller (1959); Finally, botanical composition of diet was analyzed similarly to Nugent's (1983) and McCullough's (1985) methods, classifying it into three groups: Browse, Grasses and Fruit, as described by Gebert and Verheyden-Tixier (2001).

Absorption spectra were obtained from feces samples previously lyophilized and milled, controlling particle size. Spectra were acquired using a near-infrared reflectance spectrophotometer FT-NIR Antaris (MDS), equipped with an InGaAs detector.

Calibration equations with prediction capabilities were obtained by chemometric analysis, correlating ruminal content chemical data with feces NIRS spectra. Partial least squares (PLS) calibrations were processed using TQ Analyst 6.1.1. software from the Thermo Nicolet Corp. Several calibrations were performed with different spectral regions and mathematical pre-

treatments of the spectrum, such as first and second derivative, attempting to find the model with the best-fit indices with the highest correlation coefficient (r) values and the lowest root mean-square error of calibration (RMSEC). The predictive ability of the calibration model as well as its accuracy was assessed by calculating the root mean-square error of cross-validation (RMSECV), and the standard error of prediction (RMSEP). Finally, the best equations were tested by predicting values of a few red and fallow deer samples, which were excluded for calibration, using statistical software such as SPSS, SAS and Statgraphics Centurion XV.

Reliable predictive equations were obtained for quality of diet indicators prediction, with all correlation coefficients (r) higher than 0.8, with good values for the remaining statistical indicators (RER, RMSEC, RMSECV, RMSEP) and supported by external validation. Species specific equations were obtained for ADF, EDOM, C:N and cellulose prediction, and broad-based equations were obtained for NDF, lignin, CWD, hemicellulose and sugar prediction.

Both deer species were generally browsers at the end of winter and at the end of summer. The rest of the year both species ate mainly grasses, with the exception of autumn and the beginning of winter, when fruits (mainly acorn) were the most selected resource. The most nutritive diet times were: spring, with higher quantity of nitrogen rich grasses, and the end of autumn – beginning of winter, with an increase of fruit intake. However, inter-specific differences in diet between species were found. Red deer ate less digestive diet than fallow deer, with lower CWD and EDOM indicators, probably a consequence of predominant browser behavior of red deer and a preference for fruit of fallow deer. Lower CWD values at the end of winter coincide with high browser levels in both species, due to the high lignin content of this kind of vegetation. The highest C:N and lowest sugar content values were detected at the end of summer, coinciding with dry grasses intake. ADF, NDF and lignin content were generally lower in fallow deer than in red deer in spring, when fallow deer had more grasses intake than red deer.

Results indicate that, once developed and validated, the NIRS technique offers a reliable determination of nutritional parameters from feces. This technique is shown as an exceptional tool for monitoring wildlife in an indirect, fast and non-invasive way.

**CAPITULO 1:
INTRODUCCIÓN**

1.1 Especies y área de estudio

Los cérvidos son una familia de mamíferos rumiantes que destacan por su importancia cinegética. La actividad cinegética es vital para la actividad económica de algunas zonas rurales de Sierra Morena Oriental. Por ello, es importante un amplio conocimiento de las especies cinegéticas para un buen manejo. La explotación de estas especies, debe ir acompañada de un adecuado plan de gestión que asegure el equilibrio estructural de la población y evite la competencia con otras especies.

Esta tesis doctoral aborda la aplicación de técnicas de espectroscopía de infrarrojo cercano, para el estudio de indicadores de la calidad de la dieta del ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y el gamo (*Dama dama*) en ambiente mediterráneo. A continuación sigue una breve introducción de las dos especies objeto de estudio, dando unas pinceladas históricas de su distribución, características y estado actual.

El *Cervus elaphus* (Linnaeus, 1758) es una de las más de cuarenta especies de cérvidos distribuidos por todo el mundo. La primera aparición del ciervo, tanto en su origen biogeográfico como el origen evolutivo en la región Euroasiática, data del Mioceno y principios del Plioceno hace aproximadamente 20 millones de años (Putman, 1988).

En el sur de la Península Ibérica, más concretamente en la cuenca de Guadix-Baza, se encontraron fósiles de *Cervus elaphus* y *Dama dama* datados del Pleistoceno de hace 120.000 años (Van der Made, 2001). Estos fósiles del yacimiento de *La Solana del Zamborino* suponen una de las primeras citas de la presencia de estos cérvidos en la Andalucía (Soriguer et al., 1994),

Esta región fue usada como refugio glacial por estas especies, originándose la variedad de *Cervus elaphus* característica de la Península Ibérica, *Cervus elaphus hispanicus* (Hilzheimer, 1909).

Durante la última glaciación, el gamo se extinguió prácticamente de toda Europa, indicando que el clima era un factor limitante en su distribución. Dicha distribución se vio reducida hacia las tierras más cálidas de Oriente Medio, donde quedaron acantonados. Su reintroducción en Europa se realizó con ejemplares de esta región mesopotámica de Oriente Medio, de la zona comprendida entre los ríos Tigris y Éufrates (Rodríguez Berrocal, 1993). A partir de estas reintroducciones, en diversas épocas, el gamo volvió a extenderse por toda Europa. En España, fue introducido en la antigüedad, aunque se desconocen los detalles concretos. Existe controversia sobre su aparición en el coto de Doñana de donde hay datos de su existencia durante la edad

media, y aunque no se encontraron evidencias de su desaparición, hay constancia de reintroducciones a principios del siglo XX (Braza, 2002). En Sierra Morena, según comenta Arenzana et al., (1965) esta especie fue introducida por el *Servicio Nacional* de Pesca Fluvial y Caza (SNPFC) en 1956 en algunas fincas.

Las **características morfológicas** del ciervo ibérico son bien diferenciadas del resto de *Cervus elaphus* (Carranza, 2002). Este se diferencia, por los mecanismo de adaptación fenotípica a los ecosistemas mediterráneos. Se caracteriza por un tamaño más pequeño, un color del pelo normalmente pardo en todo el cuerpo salvo en el vientre y los glúteos que es blanquecino, y puede variar la intensidad de su tonalidad según los individuos. Tiene un escudo anal blanco flanqueado por una banda oscura, una cola castaña y corta, y su cráneo es más pequeño que el de los cérvidos centro europeos (Geist, 1998). Por su parte, el escudo anal que posee el gamo es uno de los más elaborados de entre los cérvidos, consistente en una gran mancha blanca que está limitada a cada lado por una línea vertical negra y dividida por la porción superior negra de la cola, la cual es blanca en su cara ventral.

El patrón morfológico y tamaño de ambas especies, con pesos que oscilan entre 67 Y 105 kg en gamos y ciervos respectivamente en la Península Ibérica (Braza, 2011; Carranza, 2007) siguen la regla de Bergman, que dice que los ecotipos más pequeños de una especie suelen vivir en zonas de menor latitud y con una mayor temperatura, encontrando en Andalucía ciervos y gamos de pesos inferiores (66 y 37 Kg respectivamente) (Soriguer et al., 1994; Azorit et al., 2012). Así, existe un gradiente latitudinal de tamaño a lo largo de la Península Ibérica, en los bosques templados del norte son generalmente animales más altos que los del sur en bosque mediterráneo. Estas especies presentan un dimorfismo sexual muy acentuado, sobre todo cuando alcanzan la edad adulta, ya que sólo los machos tienen cuernas. Pero además, estas diferencias, debidas a la latitud, son más pronunciadas en machos que en hembras, y por lo tanto, el dimorfismo sexual y el tamaño de las astas es menor en los animales que habitan el sur de España tanto para ciervos (Carranza, 2004) como en el caso de los gamos (Braza 2002).

Las cuernas comienzan a crecer durante el primer año de la vida y se renuevan anualmente. El tamaño de las astas está influido por el medio ambiente y la densidad de población (Azorit et al., 2002c; Fierro et al., 2002).

Respecto a la **distribución**, estas especies se extienden actualmente por casi toda la Península Ibérica, aunque las mayores densidades se dan en el centro y sur del país. Esto es reflejo

de la expansión en las últimas décadas favorecida por introducciones y reintroducciones con fines cinegéticos (Muñoz-Cobo, 1991; Azorit, 1999; Gortázar et al., 2000). Al ciervo lo podemos encontrar por casi todo el territorio peninsular, y en la mayoría de hábitats, excepto en la parte más occidental de Galicia y la costa levantina (**Figura 1**) (Carranza, 2007), siendo especialmente abundantes en las áreas de transición entre zonas de bosque o matorral que le ofrece refugio y zonas de pastizal que le ofrecen alimento (Acevedo et al., 2008). El gamo ha ocupado numerosas áreas pequeñas y aisladas, pero debido al manejo cinegético desarrollado principalmente en fincas particulares, se encuentra actualmente en expansión (Azorit et al., 2007) (**Figura 1**). De hecho sus poblaciones coinciden en muchos casos con la de otros ungulados, principalmente en terrenos generalmente cercados, requiriendo un cuidado especial para evitar competencias de los recursos alimenticios, con las especies autóctonas (Braza, 2002).

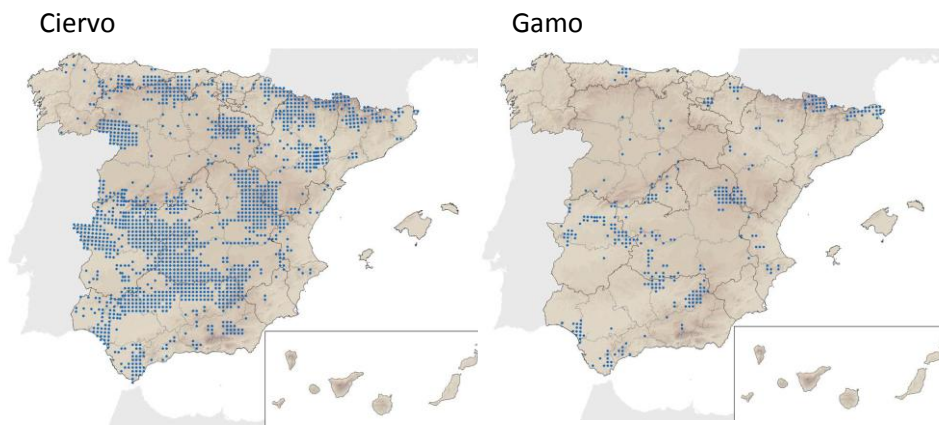


Figura 1: Distribución actual de las poblaciones de ciervo y gamo en España. (Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, 2007).

En cuanto al **Área de estudio**, ésta se localiza en Sierra Morena Oriental. Secularmente ha sido un enclave poco conocido, poco visitado, casi deshabitado y escasamente explotado. Su economía de tipo marginal ha estado basada en usos tradicionales, pero la gran superficie forestal ha sido dedicada principalmente a la caza siendo el ciervo la especie cinegética más apreciada (Azorit, 2005). Las montañas de Sierra Morena, y concretamente las fincas en donde se desarrollan los muestreos, constituyen uno de los pocos enclaves en donde se mantuvieron poblaciones naturales de ciervos a principios del siglo XX (Cabrera, 1914). De hecho, fue de aquí de donde procedían muchos de los ciervos utilizados en las repoblaciones oficiales y particulares realizadas a partir de los años 50 en nuestro país (Arenzana et al., 1965).

Estas fincas son Lugar Nuevo y Selladores Contadero, adscritas al OAPN (Organismo Autónomo de Parques Nacionales) y situadas en el Parque Natural de la Sierra de Andújar (**Figura 2**), en la provincia de Jaén, con unas superficies de 9.233,55 Has. y 10.455,89 Has respectivamente ($38^{\circ} 9' N 4^{\circ} 3' W$ y $38^{\circ} 21' N 3^{\circ} 52' W$).

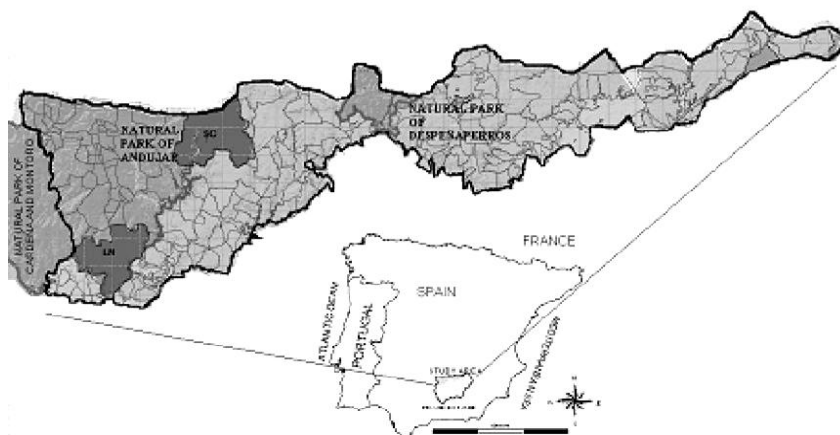


Figura 2: Fincas de Lugar Nuevo (LN) y Selladores Contadero (SC) situadas en el Parque Natural de la Sierra de Andújar, Sierra Morena, Jaén.

Estas zonas se caracterizan por la gran diversidad de sistemas naturales de alto valor ecológico que presentan, por las especies protegidas vegetales y faunísticas que albergan y por sus recursos naturales, que pueden ser aprovechados tanto para el uso público, como para la investigación aplicada. Todo lo anterior necesita una gestión sostenible para su conservación, en la cual deben integrarse diferentes factores, como son los naturales, legales, sociales, económicos e institucionales (Tornero, 2005, 2008).

Las **comunidades vegetales** presentes son las típicas de suelos silíceos y de los ecosistemas mediterráneos, como las "dehesas" constituyendo la parte dominante del sistema agroforestal. Las principales formaciones vegetales existentes en las fincas de estudio son: Monte mediterráneo, matorral, pinar de repoblación, herbazal, monte adeshado, vegetación de ribera, lentiscar-acebuchar. La vegetación mediterránea está dominada por arbusto de hoja perenne y esta especies de árboles que son, en general, más palatables y nutritivos que los de hoja caduca (Castro et al., 1978; Álvarez y Ramos, 1991; Burtney, 1991).

Dentro del monte mediterráneo la encina es la especie principal de la vegetación natural que está presente en la mayor parte de la superficie de ambos montes, ya sea como especie

dominante, como especie acompañante o finalmente como especie dominada. La encina como especie dominante (*Quercus ilex*) no se presenta como encinar cerrado pero sí como encinar abierto en unión con otras especies arbóreas y arbustivas como el pino piñonero (*Pinus pinea*), quejigo (*Quercus faginea*), alcornoque (*Quercus suber*), madroño (*Arbutus unedo*), enebro de la miera (*Juniperus oxycedrus*), acebuche (*Olea europaea ssp. sylvestris*), cornicabra (*Pistacia terebinthus*), lentisco (*Pistacia lentiscus*) y coscoja (*Quercus coccifera*). Además se pueden encontrar las siguientes especies de matorrales: labiérnago (*Phillyrea angustifolia*), agracejo (*Phillyrea latifolia*), romero (*Rosmarinus officinalis*), brezo (*Erica arborea*), jara pringosa (*Cistus ladanifer*), jara cervuna (*Cistus populifolius*), jaguarzo (*Halimium umbellatum*), jaguarzo blanco (*Cistus monspeliensis*), jaguarzo morisco (*Cistus salviifolius*), estepa blanca (*Cistus albidus*) y cantueso (*Lavandula stoechas*). Como especie acompañante aparece en las formaciones de monte mediterráneo, con alcornoques, quejigos, y rebollos. También como especies dominantes en algunas zonas aparecen las formaciones de pinos piñoneros (*Pinus pinea*) y pinos negrales (*Pinus pinaster*). Los alcornoques (*Quercus suber*) están en zonas más húmedas que las encinas, ocupando localizaciones más septentrionales en ambos montes. Los alcornoques tienen aprovechamiento de corcho, y por supuesto de bellota por los unguados. Como representantes de las quercíneas de hoja caducifolia se encuentran presentes los quejigos (*Quercus faginea*) y los rebollos (*Quercus pyrenaica*). Ambas especies tienen unos requerimientos hídricos mayores y resisten mejor las bajas temperaturas, por estos motivos se localizan en laderas de umbría. Hay que destacar la presencia de quejigo andaluz (*Quercus canariensis*) en algunas umbrías de Selladores-Contadero. También hay coscoja (*Quercus coccifera*) como parte de las formaciones arbóreas y está presente también en las manchas de matorral (Tornero, 2005, 2008).

Respecto al resto de formaciones vegetales comentar que el pinar es la formación vegetal que mayor superficie ocupa en los dos montes. La especie principal es el pino piñonero (*Pinus pinea*) aunque también se encuentran manchas de pino negral (*Pinus pinaster*). El origen de los pinares es fundamentalmente el de repoblación, realizada tras la compra de los montes por parte del Estado. El pino negral no se encuentra de forma autóctona, y como ha sucedido con carácter general, se ha adaptado mal y tiende a desaparecer de forma natural. Dependiendo de la densidad y orientación de la masa de pinos, puede aparecer un sotobosque de matas y arbustos (Tornero, 2005).

El Lentiscar - Acebuchar se presenta en ambos montes en las laderas con orientación sur que no han sido repobladas con pinos. Es una formación caracterizada por un matorral abierto de

lentisco (*Pistacia lentiscus*) con un número variable de pies arbóreos de acebuche (*Olea europaea ssp. sylvestris*), así como también pueden encontrarse pinos piñoneros y, en menor medida, encinas (Tornero, 2008).

Los Herbazales provienen de antiguas parcelas agrícolas, generalmente cercanas a casas ahora deshabitadas, donde se ha abandonado los cultivos y están invadidas por el estrato herbáceo. Su origen proviene también de parcelas en las manchas de jarales que se han desbrozado para aumentar las zonas de pastos como alimento para los animales herbívoros. Estas parcelas están repartidas por los montes.

Por último en las galerías fluviales encontramos la vegetación de Ribera. En los márgenes de los ríos que discurren por ambas fincas podemos encontrar álamo (*Populus alba*), chopo (*Populus nigra*), alisos (*Alnus glutinosa*), fresno (*Fraxinus angustifolia*), tarayes (*Tamarix gallica*, *T. canariensis*, *T. africana*), sauces (*Salix purpurea*, *S. atrocinerea*, *S. fragilis*), vid silvestre (*Vitis vinifera*), tamujo (*Secunirega tinctoria*), hiedra (*Hedera helix*), adelfa (*Nerium oleander*). y zarzaparrilla (*Smilax aspera*).. En los cauces del río podemos encontrar gran variedad de plantas acuáticas, entre ellas destacamos la especie *Lemna minor* También nos encontramos en los barrancos con humedad durante todo el año con formaciones de adelfas (*Nerium oleander*) y zarzamoras (*Rubus sp.*). En la zona inundable en los márgenes de los ríos se encuentra cubierto de pastizales (Tornero, 2005, 2008). Como resultado de las lluvias estacionales, el crecimiento de vegetación en el mediterráneo se detiene en verano, debido a los periodos de escasez de agua y la sequía. La biomasa de las plantas forrajeras de verano depende principalmente del agua acumulada en el suelo durante la primavera, y el nuevo crecimiento de biomasa se espera solo después de las primeras lluvias de otoño. Pastos y hierbas muestran un pico en la producción durante la primavera (abril-mayo), y una secundaria en el otoño (octubre-noviembre) (Blanco, 1956; Maisels, 1988). Mientras que el otro de los componentes importantes de la dieta son las bellotas tanto de la encina y quejigo cuya fructificación se produce en Septiembre-octubre (Domínguez et al., 1999), como del alcornoque que se produce un poco más tardío desde Octubre a Noviembre.

1.2 Alimentación y dieta de cérvidos en ambiente mediterráneo

Los mamíferos rumiantes, como las dos especies de este estudio, son herbívoros que poseen un estómago de estructura compleja, compuesto por varios compartimentos: rumen, retículo, omaso y abomaso. El primero, y más voluminoso es el rumen, en el cual los microorganismos fermentadores se desarrollan en un medio no acidificado, al igual que en el retículo y el omaso. Por su parte, el abomaso es el compartimento secretor de ácido y se localiza en una región inmediatamente distal con respecto al rumen. El alimento ingerido experimenta una digestión gástrica convencional al pasar al abomaso.

La característica fundamental de los rumiantes es que presentan la particularidad de remasticar su alimento, lo que se denomina rumia. En estos animales se distinguen claramente diferentes etapas durante el día, en donde los animales están recogiendo alimento (pastoreo y ramoneo), están rumiando o están descansando. Cuando la capacidad del retículo-rumen está colmada, el animal comienza la rumia. Que consiste en regurgitar material del rumen a la boca donde se produce la remasticación. En esta fase de rumia, es más importante que la masticación inicial, y cada bocado que regresa del retículo-rumen a la boca es minuciosamente masticado durante casi un minuto (50 a 70 segundos). El material vegetal consumido por los rumiantes posee poco valor energético por lo que deben comer grandes cantidades para satisfacer sus necesidades energéticas pero con el limitante de que el llenado del retículo-rumen impide que el animal pueda seguir ingiriendo alimento (consumo limitado) (Dumont et al., 2005).

La ventaja principal de los rumiantes sobre otras especies animales, recae en la capacidad de asimilar nutrientes localizados en las paredes celulares de los vegetales. Aunque muchas de las paredes celulares de las plantas se encuentran lignificadas, lo cual le brinda cierta protección a los carbohidratos estructurales ante el ataque microbiano, la clave para la digestión de esta pared celular es el tiempo que pasa en las cámaras de fermentación (Gordon, 2003).

Durante las últimas tres décadas, se han desarrollado varias teorías para explicar por qué las distintas especies de rumiantes difieren en las dietas que consumen, particularmente en relación a las adaptaciones morfológicas y fisiológicas para digerir los diferentes forrajes. Algunas de estas adaptaciones son: el tamaño del sistema digestivo en relación con el peso corporal, el tipo de sistema digestivo, así como el tamaño y forma de la boca (Hanley, 1982). Añadiendo cuestiones de selección de dieta, Hofmann (1989), clasifica a los herbívoros rumiantes en tres grupos principales: *ramoneadores* o rumiantes selectivos, *intermediarios* y *pastoreadores* o consumidores

de gramíneas (**Figura 3**). Los ramoneadores son consumidores principalmente del estrato arbustivo, y en menor medida del herbáceo. Los consumidores de herbáceas comen menos del 25% de ramoneo y el restante 75% está constituido por vegetación herbácea. Los intermediarios, como por ejemplo el ciervo y el gamo, pueden cambiar sus hábitos alimenticios, beneficiándose principalmente de las herbáceas (hierbas silvestres) que tienen generalmente un alto contenido de proteínas, dependiendo de las lluvias y la estacionalidad, y del ramoneo (hojas y ramas de árboles o arbustos) siendo este el componente estable de su dieta, pudiendo constituir hasta el 80% de esta, sobretodo en época estivaes (Rodríguez-Berrocal, 1978; Bugalho y Milne, 2003).

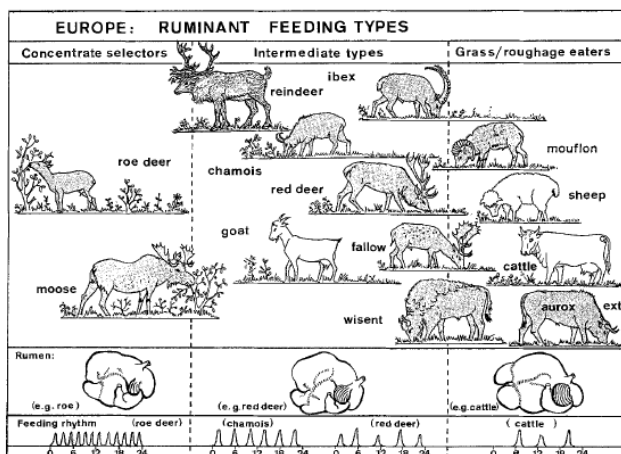


Figura 3: Rumiantes europeos según el tipo de alimentación (Hofmann, 1989).

Algunos autores han justificado las diferencias encontradas en las dietas, como adaptaciones morfológicas y anatómicas para el aprovechamiento de los recursos tróficos (Staines et al., 1982). Los tipos de recursos tróficos van a depender de la selección de hábitat de estos cérvidos, que a su vez está influenciada tanto por la búsqueda de refugio ante la presión cinegética, como por la repartición del hábitat entre diferentes grupos dentro de la población, que corresponden a distinto sexo o dominancia (Hirth, 1977; Clutton-Brock et al., 1982; Douglas et al., 2004). Esta repartición del hábitat podría plantear diferencias intra-poblacionales en la alimentación, tanto en las poblaciones de ciervo, como en las de gamo.

Para una buena gestión de las poblaciones cuando se persigue el equilibrio con su ambiente y para explicar los comportamientos adaptativos de las poblaciones en ambientes cambiantes, estacionales y /o gestionados es importante conocer la dieta de estos ungulados (Otis, 1997) y sus aspectos nutritivos, ya que la nutrición afecta a su reproducción y a su supervivencia

(Álvarez, 1999). El análisis nutritivo de la dieta es importante para conocer si se satisfacen los requerimientos de estas especies, en el área donde viven, y para evaluar la contribución de los diferentes tipos de alimento a la condición nutritiva y a su relación con el hábitat (Olivas et al., 2014). Por lo tanto, conocer la composición química de la dieta, especialmente en estudios de dinámica poblacional de las especies, es necesario para una gestión sostenible de estas especies cuando son consideradas recursos renovables.

En nuestro ambiente mediterráneo hay muy poca información sobre la alimentación del ciervo y el gamo y menos aún sobre la calidad de su dieta. Incluso es escasa la información sobre el valor alimenticio de la vegetación mediterránea disponible o seleccionada por estas especies. La mayor parte de los estudios de dieta o nutrición de cérvidos de vida libre se ha desarrollado en regiones templadas norteñas. En España, se han realizado estudios de composición de dieta en los pirineos (Garin et al. 2001), Doñana (Palacios et al. 1980, Venero, 1984), Sierra Morena (Rodríguez Berrocal 1978; Azorit et al. 2012), Montes de Toledo (Palacios et al. 1989), Quintos de Mora (Álvarez y Ramos, 1991) o Cazorla (García-González y Cuartas 1992). Sin embargo, prácticamente no hay ningún estudio de tipo cualitativo en la Península Ibérica. También, de forma similar, en otras regiones mediterráneas los pocos estudios existentes sobre, por ejemplo, digestibilidad no consideran todas las especies vegetales comunes (Poli et al. 1991; Poli y Ponzetta 1994).

1.3 Análisis laboratoriales de parámetros para estudios de alimentación.

La calidad nutricional de un alimento está determinada por el tipo y cantidad de nutrientes que contiene, mientras que la calidad de la dieta consumida está dada por la calidad nutricional de los alimentos seleccionados por el animal. La habilidad del animal para seleccionar, digerir y utilizar esos nutrientes condicionará su condición nutricional y corporal. El contenido de nutrientes o potencial nutritivo de los alimentos que pueden ser evaluados incluyen los que aportan nutrientes o energía útiles, tales como proteínas, grasas o carbohidratos solubles y los que tiene efectos negativos en el valor nutricional, como los metabolitos secundarios de las plantas.

Los alimentos se pueden dividir en dos clases: Los componentes alimenticios solubles que son fáciles de digerir a través de enzimas del animal y de la digestión ácida tales como las proteínas y azúcares. Y los componentes insolubles como la fracción de fibra en las plantas aunque algunos compuestos de la fibra son solubles y pueden ser clasificados erróneamente (Servello et al., 2005).

Para el análisis de estos nutrientes de la dieta de los cérvidos, se han utilizado diferentes técnicas a lo largo de los años. En la **Tabla 1** se muestra los seis métodos más usados con sus ventajas y sus inconvenientes.

Ninguno de los métodos que se utilizan para el estudio de la dieta es perfecto para detectar en su totalidad las especies vegetales presentes. El análisis del contenido del tracto digestivo ha sido utilizada desde los años 40's (Norris, 1943; Hill, 1946; Martin, 1949) y ha sido empleada en diferentes estudios de composición de la dieta en herbívoros como se muestra en la **Tabla 1**. La ventaja es que provee información sobre las especies de plantas que han sido consumidas y las proporciones relativas. Según Medin (1970), éste método permite hacer tabulaciones de la clase de alimento, volumen y peso del forraje y lo cataloga como un método preciso. Sin embargo, requiere el sacrificio de animales, lo que resulta inconveniente si se trata de especies de población reducida (Holechek et al., 1982b).

Tabla 1: Trabajos realizados por diferentes métodos en la determinación de la composición de la dieta en cérvidos (Olivas et al., 2014).

Metodología	Autores	Ventajas	Desventajas
Observación en campo	Corv (1927); Dixon (1934); Culley (1937); Doran (1943); Hopkins (1951); Hubard (1952); Halls (1954); Green y Thomas (1957); Reppert (1960); Bjugstad et al., (1970); Free et al., (1971); Regelin et al., (1974); Krueger et al., (1974); Dahl y Scott (1980); Sanders et al., (1980); Tixier (1997); Hernández et al., (2001).	-Complementario a los otros métodos -Evaluación inmediata	-Consume mucho tiempo -Entrenamiento necesario para distinguir mordidas en campo
Microhistología	Sparks y Malecheck (1968); Lucich y Hansen (1981); Holechek (1982a); Holechek et al., (1982b); Holechek et al., (1982c); Campbell y Johnson (1983); Johnson y Wofford (1983); Leslie et al., (1983); Kasworm et al., (1984); Holechek y Valdéz (1985); Barker (1986); Green (1987); Quintanilla-González (1989); Gallina (1993); Plumtre (1995); Tixier et al., (1996); Campbell y Johnson (1983); Barker (1986); Alipayo et al., (1992); Ockenfels y Lewis (1997); Smith et al., (1998); Garin et al., (2001); Uvalle-Sauceda (2001); Bugalho y Milne (2003); Mussa et al., (2003); Sepúlveda- Palma et al., (2004); Alcalá (2005); Arceo et al., (2005); Beck y Peek (2005); Sandoval et al., (2005); Castellaro et al., (2007); Catán et al., (2007); Hosten et al., (2007); Frisina et al., (2008); Homolka et al., (2008); Villarreal-Espino et al., (2008); Vila et al., (2010); Villarreal-Espino et al., (2011).	-Método rentable -No invasivo -Posibilidad de obtener gran cantidad de muestras -Permite determinar densidad de géneros, y grupos de plantas	-Limitado a plantas que presentan fragmentos identificables -Entrenamiento necesario
Fistulación esofágica o de rumen	Chamrad y Box (1964); Clemente et al., (2005); de Garine- Wichatitsky et al., (2003); Wichatitsky y Roques-Rogery (2005); Storms (2008).	-Efectivo para determinar taxones como géneros y especies o grupos de plantas	-Alto número de animales requeridos para determinar dieta, -Método invasivo.
Análisis de contenido estomacal	Courtright, 1959; Brown, 1961; Chippendale, 1962; Talbot y Talbot, 1963; Chamrad y Box 1964; Bergerud y Russell, 1964; Anderson et al., 1965; Korschgen, 1966; Chamrad y Box, 1964; McInnis, 1977; Smith y Shandruk, 1979; Vavra y Holechek, 1980; Tixier et al., (1996); Gebert y Verheyden-Tixier (2001).	-Información sobre plantas consumidas y porcentajes -Permite hacer tabulaciones de la clase de alimento, frecuencias, volumen y peso del forraje y se cataloga como un método preciso	-Requiere el sacrificio del animal.
Alcanos lineales (ceras)	Tulloch (1976); Kolattukudy (1976); Mayes et al., (1986); Dove y Mayes (1991); Dove y Mayes (1996); Mayes y Dove (2000); Bugalho et al., (2001); Martins et al., (2002) Y. J. Ru et al., (2002); Ali, et al., (2005); Bugalho et al., (2005); Carnahan (2011).	-Puede llegar a determinar taxones como géneros y especies o grupos de plantas en la dieta	-Entrenamiento necesario.
Espectroscopía infrarroja	Coates (1999); Stewart et al., (2003); Landau et al., (2006); Showers et al., (2006); Li H. et al., (2007); Darr RL 2009; Druckerab et al., (2010).	-Efectivo para medir calidad y porcentaje de forraje -Puede medir materia seca, proteína cruda, y compuestos fenólicos -Muestras no invasivas	-Requiere de calibraciones delicadas y elaboradas. -Costo elevado.

A parte del conocimiento de la composición vegetal del rumen, es importante el estudio de diferentes parámetros para conocer el valor nutritivo de la dieta consumida. Entre los principales parámetros útiles para la caracterización destacan: Materia seca (MS), cenizas (CEN), contenido en carbono, nitrógeno o proteína cruda (PC), fibra ácido detergente (ADF), fibra neutro detergente (NDF), lignina (LIG), digestibilidad (EDOM), carbohidratos no estructurales (CNE) y taninos (TN) entre otros.

1.3.1 Celulosa

Es un polímero lineal de unidades de celobiosa anhidra (dímero de D-glucosa), formando cadenas lineales planas que se unen entre sí, por puentes de hidrógeno y fuerzas de van Der Waals, dando lugar a microfibrillas (Gadd, 2001; Kirk, 1998; Hut, 2004; Cho S, 1997) de gran estabilidad, proporcionando rigidez a la pared celular y su hidrólisis se da principalmente por acción de celulasas procedentes de los microorganismos ruminales (Segura, 2007).

De todos los compuestos naturales del carbono, la celulosa parece ser el más abundante. Es el componente más abundante de la pared celular determinando la morfología básica de las células vegetales (Gadd, 2001) y encontrándose en forma fibrosa, dándole a la pared celular una alta resistencia mecánica. Otra característica que posee es que es insoluble en agua y disolventes orgánicos tales como etanol, benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono, siendo muy poco soluble en disoluciones diluidas de ácidos y álcalis. También es difícilmente degradada por las enzimas. Sólo un 43% de la celulosa puede ser digerida por la flora bacteriana a nivel intestinal (Van Soest, 1982; Hernández, 2010). Por otra parte, es muy soluble en ácido sulfúrico al 72% y en ácidos clorhídrico al 44%. Pudiendo ser digerida en el abomaso, siendo este compartimento del tracto digestivo donde se produce la digestión ácida del rumiante.

1.3.2 Hemicelulosa

Esta fracción de la pared celular de las plantas se encuentran en menor cantidad y su estructura química es de menor tamaño que la de la celulosa. La hemicelulosa representan alrededor de una cuarta parte de la biomasa total (teniendo en cuenta que los troncos de los árboles representan el 90% de toda la biomasa) (Körner, 2003) y por lo tanto es el segundo polisacárido más abundante del planeta. A diferencia de la celulosa, que consiste exclusivamente en 1,4 unidades enlazadas β -D-glucosa, las hemicelulosas son altamente ramificadas y poseen diversos grupos polares en los diferentes azúcares, proporcionándole una mayor solubilidad en

agua al contrario que la celulosa (Machado, 1997; Hut, 2004). Esta tiene una gran variedad de tipos estructurales que se clasifican en función de su tipo de azúcar principal: xilanos, xiloglucanos, mananos y mixtos vinculados a β -glucanos (Ebringerova, 2005). Las hemicelulosas más comunes son los xilanos que componen aproximadamente tres cuartos de la totalidad de la hemicelulosa en las especies de maderas y hierbas, estando presentes en menor cantidad en el resto de tipos funcionales de plantas y tejidos (Schädel, 2009). La hemicelulosa es degradada en el retículo rumen por microorganismos hasta glucosa. La mayor parte de la glucosa se utiliza por las bacterias que generan ácidos carboxílicos volátiles; principalmente ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. Éstos son la principal fuente de energía de los rumiantes, ya que se absorben para metabolizarse dentro del organismo del rumiante.

La hemicelulosa para mejorar la resistencia de la pared celular, se adhieren a la superficie de las microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno a través de los grupos OH de los azúcares, influenciando, como comentan algunos investigadores, en la organización de la lignina (Kirk, 1998). De este modo constituyen una pared rígida que protege a la célula de la presión ejercida sobre esta, por el resto de las células que le rodean. La cantidad y la estructura de hemicelulosas se han estudiado como parte del material lignocelulósico. (Saha, 2003; Pauly y Keegstra, 2008). Las hemicelulosas son bien conocidas en la industria de la pulpa del papel, pero se sabe muy poco sobre sus propiedades ecológicas y fisiológicas, siendo frecuentemente discutida, en estudios ecológicos, la función de estas como almacenes de carbono móviles (Hoch, 2007).

1.3.3 Lignina

El contenido de lignina es un rasgo representativo de la inversión estructural de las plantas, que influyen en sus propiedades físicas a través de su participación en el apoyo estructural y en la defensa de la pared celular (Freschet et al., 2010). Dado que la digestión de los rumiantes está en su mayoría inversamente correlacionada con la cantidad de lignificación (Hatfield y Fukushima, 2005), el estudio de este tema es muy importante porque nos da información útil sobre la calidad de la dieta consumida, la selección de alimento y los niveles de ramoneo.

La lignina es completamente indigerible tanto para monogástricos como para poligástricos, ya que los mamíferos no poseen las enzimas para hidrolizar el enlace β 1-4 de los polisacáridos. Este enlace, se forma cuando la lignina rodea a la hemicelulosa y a la celulosa, actuando como material de unión, contribuyendo en la estructura de la pared celular y restringiendo el acceso a la hemicelulosa y celulosa que sí pueden ser digeribles (**Figura 4**). La

digestibilidad de estos componentes en rumiantes va a depender de la relación simbiótica que tienen con los microorganismos de su tracto gastrointestinal (Van Soest, 1994), y como anteriormente hemos comentado, va a depender también del tiempo que trascurren en contacto con estos microorganismos que van a fermentar estos polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) a nutrientes absorbibles (Gordon, 2003).

La lignina es el polímero orgánico más abundante en el mundo vegetal, después de los polisacáridos y la única fibra no polisacárido que se conoce. Según la norma de 1978 de la asociación técnica de la industria de la pulpa y el papel (TAPPI T 222 os-74)), se define como el constituyente de la pared celular vegetal, que es insoluble en ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72%.

Aunque es prácticamente imposible extraer la lignina en forma pura debido a su naturaleza química (Hatfield y Fukushima, 2005), se han desarrollado distintos métodos para su cuantificación. Estos métodos se pueden englobar en dos grupos: los métodos gravimétricos, que determinan la cantidad de lignina midiendo el peso de la misma con una balanza analítica, como el ADF- Lignina, desarrollado por Van Soest en el 1963 y Allen en 1989. Y los métodos espectrofotométricos, los cuales se fundamentan en la descomposición de la lignina en productos de degradación solubles y en la determinación de su absorbancia en el ultravioleta (UV), entre los que se encuentra el método de bromuro de acetilo (AB) y el método del ácido tioglicólico (TGA) (Morrison, 1972; Bruce y West, 1989). A pesar de la variedad de métodos existentes ninguno de estos se le puede considerar un método estándar para el análisis de todas las muestras (Brinkmann et al., 2002), ya que dependiendo de la naturaleza de la muestra será más conveniente el uso de un método u otro.

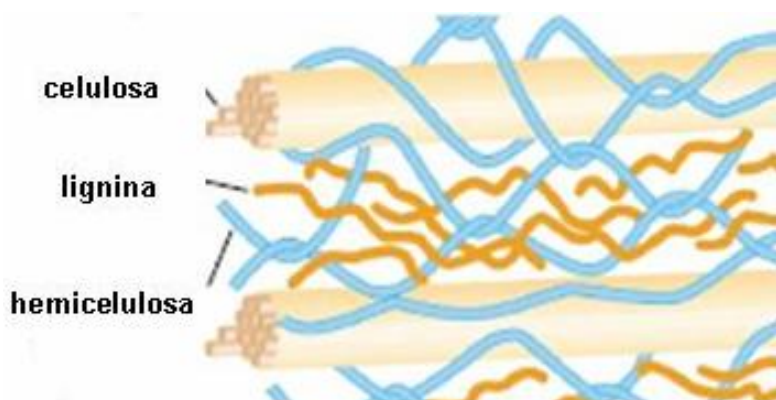


Figura 4: Esquema de la organización de la celulosa, hemicelulosa y lignina en la pared celular.

1.3.4 Fibra ácido detergente (ADF) y Fibra neutro detergente (NDF)

El concepto de fibra, descrito por Servello y colaboradores (2005) como el complejo de hidratos de carbono y otros compuestos que varían en su digestibilidad, así como la cuantificación y la caracterización tanto del contenido total de fibra como del de sus diferentes constituyentes son temas en permanente revisión y discusión (García et al., 2006). Esto se debe tanto, a la compleja organización física y composición química de la pared celular vegetal, como a la diversidad de tipos de células y por tanto de paredes celulares, que componen los distintos tejidos vegetales. Esto hace que no exista ningún método o combinación de métodos analíticos que ofrezcan un análisis cuantitativo completo de todos los componentes de esta fracción a la vez.

Los métodos utilizados hasta los años 60 para la determinación de fibras eran complejos y requerían extracciones secuenciadas con ácido y alcalinos diluidos y posteriores determinaciones gravimétricas del residuo. Van Soest y sus colaboradores desarrollaron un sistema alternativo para caracterizar la porción de fibra del forraje dividiendo la pared celular en fracciones según su solubilidad en solución detergente ácido (ADF) o en detergente neutro (NDF). Constituyendo, según Van Soest y Wine (1967), la fibra neutro detergente (NDF), la porción correspondiente a lignina, celulosa y hemicelulosa, obtenida al someterse la muestra a ebullición lenta con disolución neutro detergente, mientras que la fibra ácido detergente (ADF) se compone básicamente por celulosa y lignina que son insoluble en un detergente ácido. La fracción soluble a estas soluciones está constituida por sustancias fácilmente asimilables como azúcares sencillos y otras materias solubles en agua.

En su momento, el método de Van Soest se convirtió en una alternativa satisfactoria a los métodos tradicionales y en la actualidad es todavía el procedimiento más empleado. (Van Soest, 1963; Van Soest y Wine, 1967; Van Soest et al., 1991). Una variante de este método es el desarrollado por la compañía Ankom que diseñó un equipo para mejorar la filtración, incluyendo la muestra en una bolsa de poliéster y colocándola en una solución detergente (Contreras et al., 1999). Algunos autores recomiendan el sistema de análisis de medición de fibras por detergente (Goering y Van Soest, 1970) para los herbívoros que son capaces de digerirla microbianamente, mientras que otros autores (Robbins 1993) aconsejan los métodos de análisis de fibra total (Prosky et al., 1984) para otras especies (Servello et al., 2005).

A diferencia del nitrógeno, la cantidad de lignina-cutina en el ADF y NDF es el principal factor que afecta a la digestibilidad de la fracción de fibra, por lo tanto la digestibilidad de la fibra y

la calidad del alimento aumentan cuando hay una disminución en el contenido de lignina (Mould y Robbins, 1982; Van Soest, 1994; Haufler y Servello, 1996).

Estas técnicas son aceptadas y muy utilizadas pero tienen las desventajas de que requieren un tedioso análisis químico en el laboratorio, a parte del uso de reactivos químicos contaminantes, y de tratarse de métodos destructivos para las muestras. En general se trata de procedimientos largos, complicados, difíciles de implementar como métodos rutinarios de análisis y finalmente costosos en términos de materiales y de reactivos. Esto impide el estudio de gran cantidad de muestras y limita en gran medida muchas investigaciones. Por todo ello, como complemento de las técnicas tradicionales surge el uso, cada vez más extendido, de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) basada en la aplicación de las matemáticas a la química analítica (quimiométrica).

1.3.5 Azúcares

Los carbohidratos son moléculas formadas por carbono, hidrogeno y oxígeno. Todos los carbohidratos son azúcares pequeños, solubles en agua (glucosa y fructosa, por ejemplo), o bien cadenas, como la celulosa y hemicelulosa, que están formadas por subunidades enlazadas (**Figura 5**) (Audesirk et al., 2003).

Monosacáridos	Pentosas	Xilosa y Arabinosa	Componentes del tejido vegetal
		Ribosa	Componentes de los ácidos nucleicos
	Hexosas	Glucosa	Componentes de los frutos
		Galactosa	Componente del tejido nervioso animal
		Fructosa	Componente de la fruta
Disacáridos y Oligosacáridos		Sacarosa	Componente vegetal; porcentaje predominante de los azúcares
		Lactosa	Componentes de la leche de los mamíferos
Polisacáridos	Homopolisacáridos	Almidón	Sustancia de reserva vegetal
	Heteropolisacáridos	Glucógeno	Sustancia reserva animal

Figura 5: Clasificación sistemática y funcional de los principales carbohidratos.

Los hidratos de carbono situados en las paredes celulares (pectina, hemicelulosa y celulosa) y dentro de la célula vegetal (azúcar y almidón soluble) proporcionan a los cervidos una

energía fácilmente metabolizable, por lo tanto tienden a maximizar el consumo de estas y minimizar el consumo de compuestos anti-nutricionales o tóxicos (Hanley, 1997; Verheyden-Tixier, 2008)

La estimación de la calidad nutricional de la dieta seleccionada en relación con los hidratos de carbono y, especialmente, con la concentración de azúcar es un tema de interés reciente por la ecología, que debe ser estudiado mejor con el fin de obtener una mejor comprensión del comportamiento nutricional y de la investigación de adaptación evolutiva (Verheyden-Tixier et al., 2008).

A lo largo del tiempo se han ido desarrollando diferentes técnicas para analizar los carbohidratos digestibles, englobándose en dos grupos, las técnicas indirectas y las técnicas directas. Dentro de las técnicas indirectas está el método Weende desarrollado por Henneberg y Stohmann en 1867, que consiste en separar, a partir de la MS de la muestra, una serie de fracciones que presentan unas ciertas características comunes de solubilidad o insolubilidad en diferentes reactivos. En las técnicas directas se engloban los métodos que determinan los azúcares por colorimetría, HPLC y Cromatografía de Gases entre otros. En este último grupo de técnicas es donde se encuentra el método de la fotolorimétrica, más concretamente el método del ácido Dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller (1959), que es una de las técnicas utilizadas en este estudio para determinar la concentración de azúcares reductores totales. El método DNS está basado en la reacción entre el grupo reductor aldehído del azúcar (oxidándose) y el reactivo dinitrosalicílico (DNS), que origina un compuesto coloreado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) cuya concentración, y por tanto la del azúcar reductor, puede determinarse mediante un espectrofotómetro.

1.3.6 Relación carbono /nitrógeno (C:N)

El contenido de carbono y nitrógeno de la vegetación es una de las características de la planta de vital importancia en todos los procesos metabólicos para los herbívoros. La importancia del nitrógeno está ligada a que forma parte de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), y de que es uno de los elementos de los aminoácidos que forman las proteínas. Es importante destacar que al formar parte de las proteínas se correlaciona positivamente con la digestibilidad de la dieta (Irwin et al., 1993), siendo utilizado para evaluar la calidad nutricional de la dieta, tanto en rumiantes silvestres (Leslie y Starkey, 1987; Hodgman et al., 1996; Blanchard et al., 2003) como domésticos (Arman et al., 1975; Moore et al., 2004). Y el carbono es primordial en

el metabolismo de los organismos vivos ya que forma parte de la mayoría de los compuestos. La relación C:N puede aumentar debido tanto a reducciones en las concentraciones de nitrógeno, como por un aumento de carbohidratos estructurales (disminuyendo la calidad foliar de las plantas ingeridas) (Couture et al., 2012.). Por lo tanto, a mayor concentración de nitrógeno, menor será la relación C:N y mayor será la calidad de la dieta.

Uno de los métodos más conocidos para la determinación cuantitativa de carbono y nitrógeno es el analizador elemental que es una variante del método Dumas, los cuales se basan en la combustión de la muestra en presencia de oxígeno.

1.3.7 Digestibilidad enzimática (EDOM) y de la pared celular (CWD)

La medición de la digestión es importante para entender la disponibilidad real de los nutrientes y de la energía en un determinado alimento (Servello et al., 2005).

La digestión se puede separar en dos procesos fisiológicos: Los procesos mecánicos y enzimáticos. Se entiende como procesos fisiológicos, los que las macromoléculas que componen la materia seca de los alimentos se transforman en unidades pequeñas y absorbibles, dentro de estos los procesos mecánicos en rumiantes son la masticación, rumia y contracciones del retículo-ruminal y los procesos enzimáticos son los realizados por enzimas producidas por el animal o por los microorganismos presentes en el tracto gastro-intestinal. Para el estudio de estos últimos, hay varios métodos: los métodos directos o in situ, mediante pruebas convencionales que recolectan el total de heces, o mediante técnicas de las proporciones, utilizando indicadores, y métodos indirectos o in vitro que son los utilizados en este trabajo como el método de Van Soest, la utilización de enzimas (McLeod y Minson, 1978).

Las digestiones in vitro, someten las muestras de alimento a un proceso que imita la fermentación y el medio ambiente digestivo en el animal. Este método, es muy usado para el estudio de herbívoros silvestres, ya que permite evaluar indirectamente los nutrientes en los alimentos. Este método es muy apropiado y eficiente cuando se tiene que medir un gran número de muestras para evaluar la calidad del alimento y por lo tanto del hábitat (Campa et al., 1984; Servello et al., 2005).

Los rumiantes son mamíferos fermentadores pregástricos, cuyas poblaciones microbianas contiene una gran diversidad de especies de bacterias, protozoos y hongos en el rumen. Estas poblaciones aunque están en alta concentración, cohabitan en el rumen de manera simbiótica.

La eficiencia de la digestión enzimática la definen: los factores relacionados a las enzimas (cantidad de enzima, actividad de estas, afinidad enzima-sustrato), las características de la partícula-enzima (como el tamaño y composición química de las partículas), el tiempo de contacto partícula-enzima (Gordon, 2003), las condiciones “ambientales” del compartimento digestivo (pH, cantidad de líquido, interacciones) y la cantidad de lignificación (Hatfield y Fukushima, 2005). Ya que al aumentar la lignificación de la pared celular, la digestibilidad de las fibras de las plantas disminuirá (Robbins et al., 1995; Van Soest, 1994; Meissner et al., 1999).

1.3.8 Composición botánica

La variación de la dieta en cérvidos ha sido asociado con factores ambientales como hábitat, época del año (Gebert y Verheyden-Tixier, 2001), y la variación sustancial en las clases de forraje consumido (McCullough, 1985). A medida que va cambiando la vegetación, el comportamiento alimentario de los ciervos también va cambiando considerablemente, pasando de herbívoros a través de alimentarios intermedios a los ramoneadores (Putman y Flueck, 2011). Estas variaciones se han explicado mediante las diferentes estrategias alimentarias basadas en adaptaciones morfológicas (Hofmann, 1989), y del tamaño corporal (Geist, 1974, Illius y Gordon, 1992), ya que los cérvidos más grandes tenderían a consumir más forraje rico en fibra, tales como hierbas de digestión lenta, que los más pequeños. Además los cérvidos pequeños serían menos capaces de aprovechar los forrajes de baja calidad, que los más grandes, debido a la incompatibilidad de los requerimientos metabólicos necesarios (mayor capacidad intestinal) con una disminución del tamaño corporal (Demment y Van Soest, 1985).

Los primeros estudios sobre los hábitos alimentarios de los cérvidos constataron la enorme variabilidad en la preferencia por las distintas especies vegetales, a partir de las cuales se intentó generalizar una clasificación de especies preferidas por el ciervo (Goffin y De Crombrughe, 1976; Kay y Staines, 1981). Así, algunos estudios, tanto de ciervos como de gamos comentaron que eran principalmente ramoneadores desde la primavera hasta el otoño y en invierno se comportaron más como herbáceos (Putman, 1986; Clutton-Brock y Albon, 1989; Verheyden-Tixier et al., 2008). En los pocos estudios realizados en el sur de España, el consumo de herbáceas no solo es en invierno sino que se prolonga hasta principios de primavera, siendo su

proporción de la dieta entre un 20-50 %. (Rodríguez–Berrocal, 1978; Venero, 1984; Álvarez y Ramos, 1991; Garin, 2001).

Aunque se ha estudiado la alimentación del ciervo en las poblaciones de la región mediterránea (Soriguer et al., 1994; Martínez, 1996; Bugalho y Milne, 2003), los datos sobre la variación estacional, la composición y la similitud en la composición de la dieta de las poblaciones de ciervos y gamo, son todavía escasos (Storms et al., 2008). La mayoría de estos estudios no cubren el período de un año entero o la variación intra-específica entre machos y hembras, ni el solapamiento de los ciervos y gamos cuando son poblaciones simpátricas (Martínez, 2002).

1.4 Espectroscopía de infrarrojo cercano: historia y procedimientos

La palabra espectroscopía, deriva de la combinación latina de “spectrum” imagen y del griego “skopia” ver. Se entiende como espectroscopía el estudio de los fenómenos de absorción, emisión y dispersión de la radiación electromagnética producidos por la interacción de ésta con la materia (átomos neutros, iones o moléculas). La radiación electromagnética se distingue en función de su longitud de onda característica. A grandes rasgos, la espectroscopía requiere una radiación procedente de una fuente, un selector de longitud de onda y un detector.

La aplicación de la espectroscopía infrarroja a la química analítica, si bien como primeros balbucesos, surge con los trabajos de Abney y Festing en 1882, que obtienen fotografías de los espectros IR de varias sustancias (Ciurczak y Drennem, 2002). El empuje final a esta disciplina lo realiza W. Coblentz (1873-1962). A partir de este momento, la investigación en el campo de la espectroscopía infrarroja prosigue con éxito.

Es en los primeros años del siglo XIX cuando se comienza a relacionar la naturaleza química de una sustancia con su espectro característico. Desde la década de los setenta, la espectroscopía de reflectancia cercana al infrarrojo (NIRS) se perfila a nivel mundial como una técnica alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales, con muy buen potencial para obtener estimaciones seguras y muy rápidas de la composición química nutricional de forrajes (Givens, 1993; De la Roza, 1993; Pojic et al., 2010). Convirtiéndose NIRS, en uno de los métodos de laboratorio más versátiles en la determinación de análisis nutricionales para herbívoros. Actualmente, ha sido utilizado con éxito para animales domésticos y está en desarrollo para el estudio de fauna silvestre (Olivas et al., 2014)

NIRS se ha convertido en una herramienta importante en el análisis de la materia vegetal y otros materiales orgánicos. NIRS cuantifica los elementos compuestos por la medición de la absorción de la luz del infrarrojo cercano por enlaces químicos que se encuentran en la materia orgánica (Dryden, 2003). Los enlaces que normalmente absorben la luz en el rango de infrarrojo cercano son C-H, N-H, O-H, C-O, y C-C (Stuth et al., 2003). La información de absorción puede ser utilizada para predecir con exactitud las concentraciones de nutrientes basado en la frecuencia de los enlaces químicos en el material.

Este método de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) se ha utilizado ampliamente para analizar el contenido de fibras en el pasto destinado a la alimentación del ganado (Boval et

al., 2004; Dixon y Coates, 2010) ya que es una manera rápida, precisa y económica y no destructiva de analizar muestras, siempre que se sigan los procedimientos adecuados para generar las ecuaciones de predicción requeridas (Marten et al., 1989; Murray, 1993; Garrido et al., 1993). Fue utilizado por primera vez por Shower y colaboradores en 2006 para la predicción de la calidad de la dieta en venado de cola blanca, empleando dietas preparadas

Además, en las últimas décadas está siendo especialmente valorado para la monitorización indirecta de la alimentación. Esto es posible ya que la proteína cruda o nitrógeno, el carbono, fósforo, la digestibilidad, fibras y también los valores energéticos de la dieta han sido satisfactoriamente estimados a partir de heces usando este método (Purnomoadi et al., 1996; Gillon et al., 1999; Woolnough y Foley, 2002). En las últimas décadas ha sido muy utilizado para determinar el contenido de fibra en heces tanto de rumiantes (Landau et al., 2006; Fanchone et al., 2007; Leslie et al., 2008) como de no rumiantes (Van Barneveld et al., 1999), incluso hay ejemplos de su uso satisfactorio en herbívoros pequeños como el conejo (Meineri et al., 2008), y en cérvidos destacan los estudios de Gallagher (1990) y Showers (1997), para ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) los de Brooks et al. (1984) y Keating et al. (2001), para ciervo (*Cervus elaphus*) los de Tolleson et al. (2005) que estudian al igual que nosotros el ciervo y gamo (Dama dama) conjuntamente, o ciervo y otros rumiantes domésticos (Landau et al., 2006). No obstante, este método requiere un desarrollo y puesta a punto del procedimiento para el desarrollo de ecuaciones predictivas fiables en cada caso, como aconsejan los manuales especialmente referidos al uso del NIRS en cérvidos (Dryden, 2003).

1.4.1 Fundamentos teóricos de la espectroscopía NIR

Básicamente se fundamenta en un principio según el cual, al irradiar con un haz de luz monocromática, los materiales orgánicos (en función de la naturaleza de los enlaces y cargas electrostáticas existentes entre sus átomos y moléculas), absorben una determinada cantidad de energía. Este valor puede expresarse en términos de reflectancia a partir de lo cual se logra un espectro característico de cada material que refleja su composición química. Las bandas de absorción en la región NIR del espectro electromagnético (700-2.500 nm), están relacionados con las de la región infrarroja (2.500-25.000 nm), donde se producen las bandas de absorción fundamentales por la vibración de los átomos en las moléculas constituyentes. De las propiedades inherentes a la radiación electromagnética, las más utilizadas para su clasificación en

espectroscopía son la longitud de onda λ y sus magnitudes relacionadas, frecuencia ν y número de onda. En el vacío, se define:

$$\lambda = c/\nu$$

Siendo c la velocidad de la luz ($2,998 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$). Sin embargo, en el campo de la espectroscopía infrarroja se utiliza de forma generalizada la magnitud número de onda, cuya unidad es cm^{-1} . Esta magnitud se define como $1/\lambda$. En la **Figura 6** se indican las diferentes regiones en que se divide el espectro electromagnético, o conjunto continuo de radiaciones electromagnéticas de diferente frecuencia.

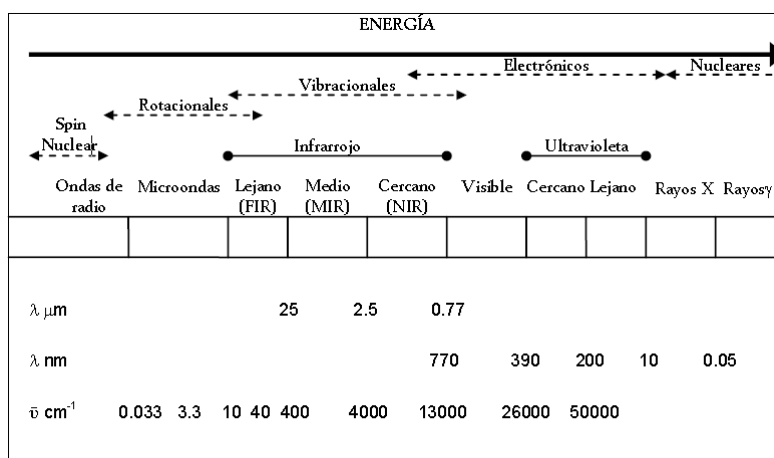


Figura 6: Regiones del espectro electromagnético indicando el tipo niveles energéticos asociados a cada una de las regiones y los límites de éstas según Hollas (2004).

La parte del espectro electromagnético que se corresponde con transiciones vibracionales, denominada infrarrojo (IR), se divide habitualmente en tres regiones como consecuencia de su diferente uso en aplicaciones prácticas, la instrumentación que se requiere para su generación y detección y la naturaleza de las transiciones vibracionales implicadas. Estas tres regiones son: IR cercano entre 13000 y 4000 cm^{-1} (NIR), denominado así porque se encuentra a continuación de la región visible del espectro; IR medio (MIR) entre 4000 y 400 cm^{-1} ; e IR lejano (FIR) entre 400 y 10 cm^{-1} .

Más concretamente, en su aplicación al análisis de la composición de los tejidos vegetales y animales, la técnica se basa en el tipo de enlaces entre átomos o grupos de átomos (grupos de átomos) de los que están compuestos los tejidos. Los grupos funcionales que responden a la radiación en este espectro son C-H, O-H, N-H y probablemente S-H y C=O (Davies y Grant, 1987;

Shenk y Westerhaus, 1993) (**Figura 7**). Estos grupos citados, tienen propiedades de absorción en esta parte del espectro, es decir, entre los 800 y 2500 nm ($12500- 4000 \text{ cm}^{-1}$) según Barton en 1989, que pueden usarse para diferenciar un componente de otro (Norris, 1989).

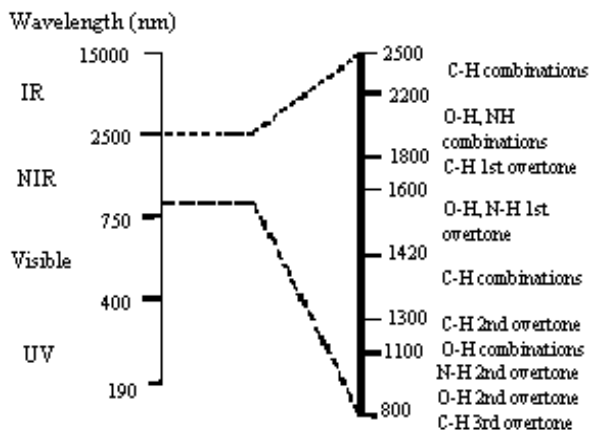


Figura 7: Principales tipos de bandas de absorción de NIR y sus localizaciones según Butkute y Slepetiene (2004).

Cuando la luz incide sobre una muestra (L_i), una parte de los fotones puede transmitirse a través de la muestra (L_t) y el resto es reflejado (L_r), o absorbido (L_a) por algunos enlaces covalentes que actúan como resortes oscilantes que se ajustan con la frecuencia (cm^{-1}) o longitud de onda (nm) exacta de la radiación lumínica (Murray, 1993). Al absorber energía, los enlaces de las moléculas vibran causando estiramientos y flexión. La vibración resultante se disipa, provocando un mero calentamiento de la muestra. La absorción es selectiva y depende de los grupos moleculares involucrados. Así, la absorción de luz se estima por diferencia entre la luz incidente y la reflejada o transmitida. La energía total reflejada por una muestra, es la suma de la reflexión especular (superficial o en forma de espejo) más la reflexión difusa, que es aquella temporalmente absorbida y luego re-emitida por la muestra) (**Figura 8**). Sólo esta última forma (reflexión difusa) entrega información útil acerca de la naturaleza o composición de la muestra (Davies y Grant, 1987), lo que pone de manifiesto el problema de dispersión de luz, que afecta a la reflexión difusa y que depende del tamaño de partícula de la muestra.

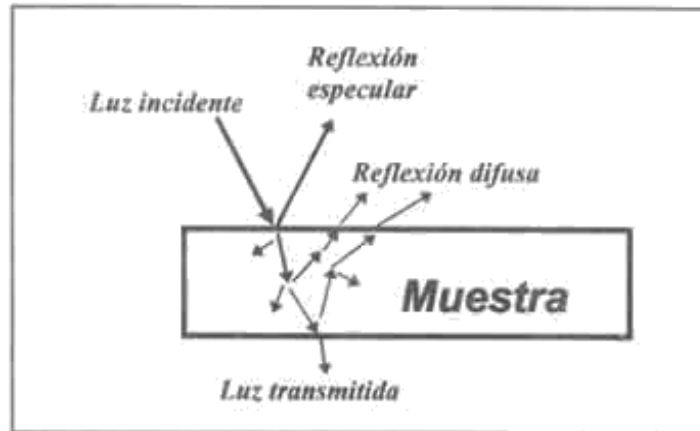


Figura 8: Interacción de la luz con la materia (Davies y Grant, 1987)

Esta luz reflejada es registrada por detectores, normalmente de sulfuro de plomo, amplificada, digitalizada, transformada en $\log 1/R$ y comunicada a un ordenador para su almacenamiento o procesamiento. De forma paralela a la señal digital de luz reflejada, el ordenador recibe una señal que representa la longitud de onda utilizada, de modo que a cada valor de reflectancia almacenado, le corresponde una longitud de onda, lo que permite el posterior procesamiento de los datos (Norris, 1989).

Las bandas de absorción en NIR corresponden a "ecos" o "rebotes" de esas absorciones fundamentales, consistentes en sobre tonos armónicos de las bandas fundamentales de absorción y sus combinaciones, aproximadamente a un medio o un tercio de la longitud de onda en que ellas ocurren (Coleman y Murray, 1993; Davies y Grant, 1987, Barton, 1989). Esto determina que para una muestra de naturaleza química heterogénea, o con numerosos componentes químicos, como sería un forraje, el espectro obtenido en la región NIR, será una compleja combinación de bandas o picos de absorción parciales sobrepuestos o muy cercanos, que suelen confundirse en una línea suavizada en que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombros y que sólo cobran sentido cuando dicha información se puede interpretar con la ayuda de un ordenador.

Para estimar la composición química de una muestra a través de NIRS, se requiere previamente hacer calibraciones, para lo cual se necesita contar con un conjunto amplio de muestras representativas de una misma población, recolectar sus espectros, analizar las muestras mediante un método de referencia confiable, desarrollar las ecuaciones de calibración que relacionen los datos espectrales con los resultados del método de referencia y finalmente, validar

dichas ecuaciones con otras muestras de la misma población general, pero que no formen parte del set de calibración.

Hay tratamientos que permiten eliminar "ruido" en los valores espectrales, a través de suavización de los datos, como es la transformación de Fourier que es el que nosotros utilizamos en nuestro estudio. El método de la transformada de Fourier en la reflectancia del infrarrojo (IR-TF) se utiliza para medir todas las frecuencias infrarrojas simultáneamente, así reduciendo el tiempo de medida de unos minutos a unos segundos, por un interferómetro. Las ventajas de este método de IR-TF son básicamente dos: mejorar la resolución de los espectros y de la mejora de la relación señal/ruido (S/N) por promediación de interferogramas (muestra la información sobre todas las frecuencias de infrarrojos que viene de la fuente). El interferograma no puede ser interpretado directamente, para descifrarlo se utiliza una técnica matemática conocida llamada la Transformación de Fourier, que es realizada por el equipo facilitándole al usuario la información espectral para el análisis. Por otra parte, el principio de la reflectancia total atenuada se basa en el fenómeno de la reflexión total interna y la transmisión de la luz a través de un cristal con un elevado índice de refracción. La radiación penetra (unos μm) más allá de la superficie del cristal donde se produce la reflexión total, en forma de ondas evanescente. Si en el lado exterior del cristal se coloca un material absorbente (muestra), la luz que viaja a través del cristal se verá atenuada (de ahí el nombre de la técnica) y se puede registrar el espectro de la muestra.

CAPITULO 2:
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Desde siempre se ha considerado muy importante el conocimiento de aspectos sobre la nutrición y alimentación de la fauna silvestre para su gestión y manejo. En los años 90 Poli y colaboradores (Poli et al., 1996) hablan de que la poca información sobre la ecología de forrajeo de ungulados del Mediterráneo es el principal problema para el establecimiento de políticas adecuadas de gestión de ecosistemas y de poblaciones de rumiantes de vida silvestre.

Aun hoy en día, 20 años después, las carencias en este campo de conocimiento son manifiestas, probablemente debido a las dificultades intrínsecas de los estudios de especies de vida libre, y también porque, la determinación de la calidad nutricional de la dieta de rumiantes ha sido uno de los aspectos más difíciles de abordar.

Tradicionalmente estos estudios científicos se han basado en observaciones del alimento consumido in situ (Holechek et al., 1982a) y en el uso de fístulas esofágicas o ruminales de forma excepcional con animales estabulados experimentalmente (Ramírez-Lozano, 2004). Más frecuentemente se han utilizado muestras de contenido de rumen conseguidas a partir de animales cazados (Latham et al., 1999, Tomkins y McMeniman, 2006). Este método ha sido el más utilizado en especies cinegéticas, pero las recolecciones de contenido ruminal de animales cazados están a menudo limitadas a ciertos periodos del año y puede ser imposible obtenerlas en áreas protegidas y en las fincas privadas. Pudiendo existir más reticencias a la hora de cazar animales de buena calidad para fines experimentales o científicos. A estas limitaciones hay que sumarle la complejidad de realizar un estudio de nutrición de animales que tienen disponibles diversas comunidades vegetales, con una topografía cambiante, y con unas variaciones anuales en la cantidad y calidad del forraje (Wofford et al., 1985). Por ello, cada vez más, los estudios sobre la calidad de la dieta utilizan indicadores nutricionales fecales, siendo la única técnica con la posibilidad de evaluar el estado nutricional de los animales de pastoreo extensivo, ya que no implica el sacrificio del animal (Everitt y González, 1981). Estos índices fecales se basan en que las características químicas del material fecal, están claramente relacionadas con la cantidad y calidad de alimento ingerido (Leite y Stuth, 1995; Boval et al., 2004; Decruyenaere et al., 2009).

Para el análisis de estos indicadores nutricionales fecales sería especialmente adecuada la utilización de una herramienta diagnóstica con capacidad de evaluar la calidad nutricional de la dieta de manera rápida y precisa. Un ejemplo de esta herramienta es la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS), que permite relacionar valores cuantitativos y cualitativos del alimento ingerido con espectros de reflectancia de heces. Otras ventajas de su utilización son: que es una

técnica no destructiva, que no produce residuos químicos y con la que se pueden realizar múltiples análisis con tan solo 0,2 g de material (Aragonés, 1997). Una vez desarrollada y validada, la técnica NIRS resulta satisfactoria para la determinación fiable de parámetros nutricionales a partir de heces, mostrándose esta técnica como herramienta de excepción para su uso en el monitoreo de la vida silvestre y la investigación ecológica (Foley et al., 1998).

La utilización del método NIRS para el estudio de la calidad de dieta de ciervo y gamo de manera indirecta a través de las heces, es novedoso en estas especies ya que tradicionalmente se ha venido utilizando para el estudio de los ensilados destinados a la alimentación del ganado (Dryden, 2003). De hecho, el primer trabajo encontrado sobre la aplicación de la técnica NIRS al estudio del valor nutritivo de forrajes realizado en España, más concretamente en la Cornisa Cantábrica, data de 1990 y se desarrolló para el estudio de ensilados destinados a la ganadería (Martínez et al., 1990).

Estos procedimientos son novedosos en la Península Ibérica y permitirán el seguimiento del estado nutricional y de alimentación de estas especies cinegética. Aportará información sobre la pertinencia o no de la implementación de programas de alimentación suplementaria en cada caso. Estas cuestiones son muy planteadas por los gestores actuales de fincas cinegéticas en el Parque Natural de la Sierra de Andújar, Jaén. La resolución de estas cuestiones ayudará sin duda a la gestión sostenible de la caza como recurso natural en esta zona preservando su alto valor ambiental.

Por todo ello, hemos pretendido la puesta a punto y validación de un método de espectroscopía de reflectancia en la región del infrarrojo cercano (NIRS), como herramienta de monitoreo no invasivo y fiable de la calidad de la dieta en cérvidos mediterráneos, utilizando heces y ecuaciones predictivas previamente validadas. Se pretende aportar información sobre los índices que informan sobre la calidad de la dieta del ciervo y gamo y composición botánica de la dieta. Esta investigación combina procedimientos laboratoriales de análisis químicos convencionales con procedimientos NIRS, los cuales requieren análisis matemáticos y estadísticos complejos.

Nuestra hipótesis general de trabajo es que es posible obtener ecuaciones predictivas fiables combinando los datos resultantes tras el análisis de las heces en el espectroscopio de infrarrojo cercano (NIRS) con los resultados de los análisis laboratoriales del contenido ruminal. También, que el uso de estas ecuaciones será útil para el estudio de la alimentación de ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y gamo (*Dama dama*) en ecosistemas mediterráneos e igual de válidas

para determinar la calidad de la dieta que los métodos químicos tradicionales. Lo que permitirá la monitorización de la alimentación de forma no invasiva como apoyo a investigaciones futuras sobre condición corporal, estrés nutricional, selección de hábitat o capacidad de carga de los ecosistemas en ambiente mediterráneo. Otra hipótesis inicial que planteamos es que la dieta ingerida fue constante a través de varios días, para tener una buena correlación en la concentración ruminal-fecal.

Por todo ello, los objetivos generales planteados son los siguientes:

1.- Desarrollar y poner a punto un método NIRS (Espectroscopia de Reflectancia en la región del Infrarrojo Cercano), para la determinación de la calidad de la dieta de ciervos y gamos en su hábitat natural.

2.- Validar las ecuaciones predictivas, obtenidas de la quimiometría entre espectros de heces y datos del análisis alimenticio de la ingesta, para la monitorización indirecta y no invasiva de estos cérvidos en ecosistemas mediterráneos.

3.- Obtener resultados preliminares sobre la calidad y composición de la dieta de poblaciones simpátricas del ciervo y el gamo del sur de España y aportar información objetiva para una gestión cinegética sostenible.

Más específicamente:

1.- Desarrollar ecuaciones predictivas FT-NIRS de las heces como herramienta no invasiva para valorar la calidad de la dieta de ciervos y gamos mediante la determinación de parámetros como: FND, FAD, lignina, C:N y digestibilidad enzimática.

2.- Desarrollar un método de análisis Fecal-FT-NIRS basado en un índice global de digestibilidad de la pared celular que permita valorar la calidad nutricional de la dieta seleccionada por ambas especies de una manera integral.

3.- Obtener calibraciones NIRS para cuantificar el contenido en celulosa, hemicelulosa y azúcares del alimento ingerido. Parámetro este último poco estudiado hasta el momento y que puede ayudar en la comprensión del comportamiento nutricional de estos cérvidos.

4.- Obtener información sobre las variaciones estacionales en la composición botánica de la dieta del ciervo y gamo como especies simpátricas en el área de estudio, y detectar posibles competencias inter e intraespecíficas.

**CAPITULO 3:
MATERIAL Y MÉTODOS**

3.1 Recogida de muestras en el campo y procesamiento

Se estudió un número de 260 muestras (contenido ruminal y heces) procedentes de 149 ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) y 111 gamos (*Dama dama*). Los animales seleccionados fueron cazados durante la temporada de caza 2008-9 dentro de un programa para el control de población, para reducir la densidad de ciervos y gamos en dos fincas oficiales de caza cerradas, mencionadas anteriormente Lugar Nuevo (LN) y Selladores Contadero (SC). (ver **Figura 2**).

De cada animal se obtuvo una muestra homogénea de aproximadamente 250 g. de contenido ruminal y una muestra de heces recogidas directamente del recto. Para obtener resultados precisos en los posteriores análisis fue muy importante el buen procesamiento inicial de las muestras mediante los métodos adecuados tanto en el almacenaje como en su preparación. Ya que en este procesamiento puede haber pérdidas de azúcares por conversiones enzimáticas a almidones (Smith, 1973) y otras alteraciones de la muestra. Para reducir estas pérdidas y cambios en el almacenaje, nuestras muestras tanto las del contenido ruminal como de las heces las almacenamos en frío durante el proceso de muestreo, y las congelamos nada más llegar al laboratorio para asegurarnos de obtener posteriormente mediciones exactas de las variables nutricionales como aconsejan autores como (Servello et al., 2005).



3.2 Análisis de rumen: Procedimientos químicos convencionales para la obtención de resultados de referencia.

En primer lugar se procedió al secado del rumen y obtención de la proporción del contenido de humedad y materia seca de la muestra. Para lo cual se pesaron 5 gramos aproximadamente de rumen fresco en crisoles previamente tarados, estas muestras se secaron en un horno a 105 °C hasta que se obtuvo pesada constante, siguiendo los métodos estandarizados por la AOAC 1995 (*association of analytical communities*). Este peso constante se alcanzó aproximadamente a las 72 horas, realizando pesadas cada 24 horas.

El contenido de la humedad se obtuvo mediante la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Y por lo tanto el contenido de materia seca:

$$\% \text{ MS} = 100 - \% \text{ Humedad}$$

Para el cálculo de determinados índices, como la digestibilidad, fue necesario conocer el contenido de materia inorgánica o cenizas. Este se determinó por ignición en un horno mufla Thermolyne mod. 1300, siguiendo la norma TAPPI T15 os-58. El procedimiento se llevó a cabo a partir de los crisoles utilizados para conocer el valor de humedad de la muestra, introduciendo estos en el horno a 575 °C durante 4 horas, obteniendo así el porcentaje de cenizas.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Cenizas}}{\text{Muestra Seca}} \times 100$$

3.2.1 Determinación de Fibra ácido detergente (ADF)

La Fibra Ácido Detergente se determinó mediante el método propuesto por Van Soest y Wine (1967). Este fue el primer método para la determinación de ADF estandarizado y hoy en día sigue siendo usado. El método se basa en la habilidad de la solución detergente para solubilizar componentes no fibrosos y separar la fibra por filtración. Para el procesamiento de las muestras, se preparó el reactivo ácido detergente, disolviendo 20 g de bromuro de N- cetil-N, N, N-trimetil amonio en ácido sulfúrico 1 N enrasando esta mezcla a 1 litro. A 100 ml de este reactivo se le añadió 1 gramo de muestra y algunas gotas de decalina o 1-Pentanol, como antiespumante, sometiéndolo a ebullición durante 2 horas. A continuación, se filtró a través de una placa porosa

(previamente tarada), haciendo uso de un matraz kitasatos conectado a una bomba de vacío. El residuo resultante, se lavó varias veces con agua caliente, haciendo un último lavado con acetona y secándose finalmente en una estufa a 105 °C hasta pesada constante. Este peso del residuo de ADF se comparó con el peso inicial de la muestra y se obtuvo el % de ADF, como a continuación se indica:

$$\% \text{ ADF} = \frac{\text{Peso del residuo}}{\text{Peso de muestra seca}} \times 100$$

3.2.2 Determinación de Fibra neutro detergente (NDF)

El contenido de Fibra Neutro Detergente se obtuvo por el método propuesto por Van Soest y Wine (1967), ya que en nutrición ruminal este método reemplazó el método de Fibra cruda propuesto por Van Soest en el 1963, y actualmente tras varias modificaciones sigue siendo el más aceptado.

Para conocer el contenido de NDF, primero se preparó el reactivo neutro detergente, disolviendo 37.2 g de Ácido Etilendiaminotetraacético Na_2 (EDTA) y 16.2 g de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) en agua ultrapura caliente. Se adicionó a esta mezcla 60 g de Lauril sulfato sódico y 20 ml de etilenglicol. A parte, se disolvió 23 g de fosfato monoácido de sodio ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4$) $12\text{H}_2\text{O}$ enrasándolo todo a 2 litros. Posteriormente se mezcló 0,3 gramos de muestra seca con 30 ml de solución neutro detergente y algunas gotas de decalina o 1-Pentanol, como antiespumante, sometiéndolo a ebullición durante 1 hora. A continuación, se filtró a través de una placa porosa (previamente tarada), haciendo uso de un matraz kitasatos conectado a una bomba de vacío, se lavó varias veces con agua caliente y finalmente con acetona, se dejó secar en una estufa a 105 °C hasta que se obtuvo pesada constante. Obteniendo el peso del residuo de NDF, y con el peso inicial de la muestra, se obtuvo el % de NDF como a continuación se indica:

$$\% \text{ NDF} = \frac{\text{Peso del residuo}}{\text{Peso muestra seca}} \times 100$$

3.2.3 Determinación de Lignina

El contenido de lignina se midió con el método de Klason, que tiene buena correlación con el contenido de lignina determinada por métodos directos, como la pirólisis analítica en elementos leñosos (Alves et al., 2006). Debido al alto contenido de elementos leñosos en la dieta de los ciervos en nuestra zona de muestreo, siendo ramoneadores durante largos períodos

(Bugalho y Milne, 2003; Azorit et al., 2012), elegimos este método de análisis de Klason. Este es el más ampliamente aceptado para determinar el contenido de lignina en componentes leñosos (Carrier et al., 2011), en lugar del método de lignina ácido detergente (ADL).

Así bien, para asegurarnos de utilizar el método más adecuado para nuestras muestras, se analizaron con ambos procedimientos.

La determinación de Klason-lignina se realizó mediante el método desarrollado por la norma Tappi T222 om-88 (1978). En este método, la lignina se definió como el componente insoluble en una solución de ácido sulfúrico al 72%.

El procedimiento se llevó a cabo mediante dos hidrólisis, la hidrólisis primaria en la que se pesó 1 g de rumen seco, tratándose con 15 ml de ácido sulfúrico al 72 % durante 2 h, y tras este tiempo se procedió a una hidrólisis secundaria, en la que se diluyó el ácido con agua, hasta que alcanzó una concentración de ácido sulfúrico del 1,88 %, poniéndolo durante 4 h en ebullición con reflujo, para mantener un volumen constante. Transcurrida esta hidrólisis, el material insoluble (lignina) se dejó precipitar durante 1 h, pasándolo posteriormente a través de una placa filtrante revestida con lana de vidrio. Por último, la lignina se secó en un horno a 105 °C hasta que se obtuvo un peso constante. Este residuo seco insoluble representa el contenido de lignina, que comparándolo con el peso inicial de la muestra, se obtuvo el % de Lignina de la muestra, como a continuación se indica:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Peso del residuo}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100$$

Como anteriormente comentamos también se analizó las muestras con el método ADF-lignina descrito por Van Soest y Wine en 1963, para evaluar si existían diferencias en los resultados del contenido de lignina entre ambos métodos, ya que la ADF-lignina elimina hemicelulosa y proteínas por el lavado en ácido detergente (Benner et al., 1984) y el tratamiento con H₂SO₄ al 72% elimina la celulosa.

El procedimiento de ADF-lignina se realizó pesando 1 g de muestra (P1) que se diluyó en 100 ml de solución de bromuro de N-cetil-N, N, N-trimetil-amonio y unas gotas de agente antiespumante, como el pentanol. Esta mezcla se llevó a ebullición durante 2 horas, se filtró y lavo con agua caliente y con un último lavado con acetona. Se secó en una estufa a 105 °C. Posteriormente se le añadió 10 ml de H₂SO₄ al 72 % a 15 °C a cada muestra, rellenando el drenado

de ácido, para mantener un volumen más o menos constante durante 3 horas. Se filtró, se lavó con agua y se secó a 105 °C. Una vez seco se pesó (P2) y se incineró a 500 °C durante 2 h., se atemperó y se pesó para determinar el contenido de cenizas (P3).

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Peso seco del residuo (P2)} - \text{Peso de las cenizas (P3)}}{\text{Peso inicial de muestra (P1)}} \times 100$$

3.2.4 Relación carbono /nitrógeno: (C:N)

Se prepararon las muestras homogenizadas de rumen introduciéndolas en una estufa a 60 °C, más de 72 horas, hasta que se obtuvo un peso constante de la muestra, de manera similar a otros autores (Waelput et al., 1990; Latham et al., 1999; Boval et al., 2004). Posteriormente se pesó unos 5 mg. de muestras totalmente secas en cápsulas especiales de estaño de 5 mm de diámetro y 9 mm de altura y pesadas en una Microbalanza electrónica Mettler Toledo MX5 de precisión ($\pm 1 \mu\text{g}$). Las muestras fueron analizadas en un Analizador Elemental Thermo Finnigan Flash EA1112 con dispositivo de muestreador automático para 32 muestras MAS200 y un software de interface de usuario Eager 300 para analizar resultados.

El analizador elemental es una variante del método Dumas, los cuales se diferencian únicamente en los distintos subproductos que se generan. El método Dumas genera NO_2 a diferencia del analizador elemental que produce SO_2 a parte de los subproductos comunes en ambos como son CO_2 , H_2O y N_2 . El analizador elemental, fue elegido como método de análisis para los datos de referencia porque nos permite determinar con fiabilidad la cantidad de nitrógeno y carbono total de la muestra, es rápido, no necesita una gran cantidad de muestra para la medida, no produce ningún residuo, y permite obtener no solo los porcentajes del contenido en la muestra de Nitrógeno y Carbono, sino también de Hidrogeno y Azufre presentes en muestras sólidas o líquidas.

El método analítico se basa en la oxidación completa e instantánea de la muestra que transforma todos los compuestos en productos de combustión. Los gases resultantes son transportados mediante He a través de un tubo de reducción y después separados en columnas cromatografías específicas. Finalmente, los gases pasan por un detector de conductividad térmica dando una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes. El Estaño, entrando en contacto con el ambiente extremadamente oxidativo, activa una reacción fuertemente exotérmica. La temperatura aumenta aproximadamente hasta 1.800°C causando la

combustión instantánea de la muestra. Al final del tiempo fijado para la introducción de Oxígeno, las válvulas vuelven a su posición original restaurando el flujo de Helio a través del circuito. Los productos de combustión son transportados a través del reactor, donde la oxidación es completada. Los Óxidos de Nitrógeno y trióxidos de Azufre posiblemente formados son reducidos a nitrógeno elemental y dióxido de azufre y el exceso de oxígeno es retenido en el tubo. La mezcla gaseosa resultante de la combustión (N_2 , CO_2 , H_2O y SO_2) pasa por una columna cromatográfica donde ocurre la separación de los componentes. Los gases separados y eluidos de la columna pasan individualmente al detector de conductividad térmica, el cual genera las señales eléctricas, las cuales son procesadas por la estación de trabajo Eager 300 entregando los datos de porcentajes de Nitrógeno y Carbono contenido en la muestra.

3.2.5 Determinación de la Digestibilidad enzimática (EDOM)

La Digestibilidad se determinó mediante un método indirecto utilizando celulasas (McLeod y Minson, 1978) que parece ser una buena alternativa para evaluar la calidad del forraje y un método que podría ofrecer una alta correlación con los resultados “in vivo” en estudios de digestibilidad (Jones y Theodorou, 2000).

Se utilizó el método descrito por Jones y Hayward en 1975, con algunas modificaciones como la concentración de enzima celulasa (1 g/L), tiempo de incubación (24 h) y el tipo de lavado final (con agua caliente o acetona).

Para realizar este análisis se preparó dos soluciones: una disolución enzimática y un tampón acético-acetato.

La preparación del tampón acético-acetato 0,05 M pH 4,6-4,7, se llevó a cabo pesando 13,6 g de acetato sódico trihidratado, y se puso en un matraz aforado de 1 litro, agitándolo hasta su total disolución por adición de agua ultrapura, posteriormente se aforó a 1 litro. Se midió con una pipeta 5,9 ml de ácido acético glacial con pureza del 100% y se diluyó con agua ultra pura en un matraz aforado hasta un volumen de 1 litro. Finalmente, se puso la disolución de acetato sódico en un vaso de precipitado de 2 litros, en el que se introdujo el electrodo medidor de pH, y se añadió disolución de ácido acético, hasta que el pH estuvo comprendido entre los valores 4,6-4,7. Para la preparación de la disolución enzimática, que se efectuó para grupos de 12 muestras, se pesó en un vaso precipitado 0,3 g de enzima celulasa, y en otro 0,03 g de cloranfenicol, para prevenir el crecimiento microbiano (Boisen y Fernández, 1991). Se disolvió tanto la enzima como el

cloranfenicol por separado en tampón acético- acetato, con una varilla de vidrio. Finalmente se puso el contenido de los 2 vasos en un matraz aforado de 200 ml y se completó hasta el enrase con tampón acético-acetato.

Para este análisis se partió de crisoles que contenían el residuo del NDF (cuyo peso era conocido), a los que se le colocó un globo en la base de cada crisol, para impedir que la solución se filtrase, manteniendo el volumen constante y en contacto con la muestra.

A continuación se le añadió a cada crisol 25 ml de la disolución de enzima anteriormente descrita y se taparon los crisoles con una doble capa de parafilm. Los crisoles se colocaron individualmente en recipientes de vidrio, previamente llenados con agua a 40 °C, estos recipientes tenían la altura justa, para que el agua cubriese la totalidad del crisol sin llegar al borde superior. A continuación, estos recipientes que contienen los crisoles, se colocaron en un agitador vital, a una temperatura de 40 °C y una velocidad de agitación de 20 U, dejándose las muestras en este equipo durante 24 horas. Transcurridas estas, se colocaron los crisoles en un matraz kitasatos conectado a una bomba de vacío, filtrando el contenido del crisol y lavando el mismo con unos 25 ml de agua a 60 °C cinco veces. Una vez lavadas las muestras, se introdujeron los crisoles en la estufa a 105 °C hasta alcanzar pesada constante. Una vez secos, se introdujeron los crisoles con el residuo en el horno mufla, durante 1,5 horas a 550 °C. Pasado este tiempo, y una vez alcanzaron temperatura ambiente, se pesaron los crisoles con el residuo. El % EDOM (Digestibilidad Enzimática de la Materia Orgánica) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{EDOM} = \frac{\text{MO inicial} - [(\text{tara} + \text{residuo incubación}) - (\text{tara} + \text{cenizas incubación})]}{\text{MO inicial}} \times 100$$

Siendo MO inicial (materia orgánica inicial):

$$\% \text{MO inicial} = \frac{(\text{materia seca} - \text{cenizas})}{100} \times \text{Peso muestra (g)}$$

3.2.6 Índice de la Digestibilidad de la pared celular (CWD)

La digestibilidad de la pared celular la calculamos mediante la correlación del contenido de lignina con la digestibilidad total de la fibra (Jung y Deetz, 1993; Van Soest, 1994) de modo que evaluamos la interacción entre los componentes de la pared celular a través de lignina y NDF como el índice que representa la digestibilidad de la pared celular (CWD), siendo este un método adecuado para la estimación de fibra digestible y calidad de la dieta de los rumiantes (Pérez-

Barbería et al., 2004). Cuanto mayor sea la relación lignina / fibra neutro detergente, menor es la digestibilidad de la pared celular del forraje. La CWD ha sido utilizado con éxito como un índice de digestibilidad apropiado para ser comparado con otros enfoques similares, tales como digestibilidad de la materia seca (Codron et al., 2007).

La digestibilidad de la pared celular se calculó, a través de la siguiente ecuación, que varía ligeramente de la utilizada por Codron et al. (2007), ya que se usó la lignina Klason en vez de la ADL, para que se ajustara más a la naturaleza de nuestras muestras:

$$CWD = 100 - \frac{\text{Lignina}}{NDF \times 100}$$

En este enfoque, a mayor índice de CWD mayor digestibilidad de la pared celular del forraje seleccionado por los ciervos. Los niveles más altos de hemicelulosa y celulosa en relación con el contenido de lignina, dan altos índices de CWD, mientras que un mayor contenido de lignina en relación con la hemicelulosa y celulosa da valores inferiores de CWD.

3.2.7 Determinación de la Celulosa

El valor de la celulosa fue determinado con los valores obtenidos del análisis de fibra ácido detergente y lignina. Ya que el valor de ADF está compuesto por la cantidad de celulosa y lignina que hay en la muestra, al restarle el contenido de este último, se consigue el valor de celulosa.

$$\text{Celulosa} = \text{ADF (celulosa + lignina)} - \text{Lignina}$$

3.2.8 Determinación de la Hemicelulosa

Se obtuvo el valor de la hemicelulosa con los datos de la Fibra Neutro Detergente y Fibra Ácido Detergente anteriormente analizados. Debido a que la NDF está compuesta por la lignina, celulosa y hemicelulosa y al restarle los valores de lignina y celulosa (o lo que es lo mismo, el valor de ADF), se obtiene como resultado el valor de hemicelulosa.

$$\text{Hemicelulosa} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

3.2.9 Estudio del contenido en Azúcares

Para la cuantificación de azúcares, se utilizó el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores totales, propuesto por Miller en 1959.

El método del DNS se basa, en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalisílico (el cual se encuentra de color amarillo–naranja), por la glucosa y/o fructosa, al ácido 3-amino- 5-nitrosalisílico (de color rojo oscuro). Beneficiándonos de esta variación de color para su cuantificación, se utilizó un método fotocolorímetro, empleando un espectrofotómetro Thermo modelo Helios gamma. Para realizar el reactivo DNS se disolvió en agua ultrapura, 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 2 g de fenol, 200 g de tartrato sódico-potásico, 0,5 g de sulfito sódico y 0,5 litros de disolución de NaOH al 2%, enrasando todo ello hasta 1 litro.

El procesamiento de las muestra de rumen se llevó a cabo, pesando 2 gramos de muestra seca en un vaso precipitado, al que se le añadió 50 ml de agua ultrapura y llevándolo a 40 °C. Se utilizó un agitador magnético calefactado (marca P-Selecta modelo agimatic- N), para que estuviera en constante movimiento durante una hora. Una vez transcurrida esta, se centrifugo a 9.000 rpm durante 30 minutos, reservándose el sobrenadante. El precipitado se volvió a diluir en otros 50 ml de agua ultrapura a 40 °C, removiéndose continuamente durante 30 minutos, y centrifugándose con las mismas condiciones de la primera vez. Este proceso se repitió una tercera vez, obteniendo finalmente 150 ml de sobrenadante de las tres extracciones realizadas. De esta solución se tomó 2 ml, y se le añadió 3 ml de solución de DNS, calentando la mezcla entre 80-85 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se enfrió en un baño con hielo durante 10 minutos, para detener la reacción. Finalmente, se midió a la solución la absorbancia a 640 nm. Siendo el equipo previamente calibrando con un blanco (preparado con todos los reactivos, excepto la muestra problema).

La concentración de azúcares reductores totales se calculó a partir de una recta patrón realizada previamente con disoluciones de concentraciones conocida. El procedimiento que se siguió consistió en medir la absorbancia de cinco puntos de la recta, los correspondientes a 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 g/l, cada vez que se realizaba una serie de medidas. (**Tabla 2; Figura 9**)

Tabla 2 : Composición de patrones a concentraciones de 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 g/l.

Concentración (g/l)	Patrón (ml)	Agua destilada (ml)	Volumen total (ml)
0,1	10	90	100
0,2	10	40	50
0,3	30	70	100
0,4	40	60	100
0,5	25	25	50

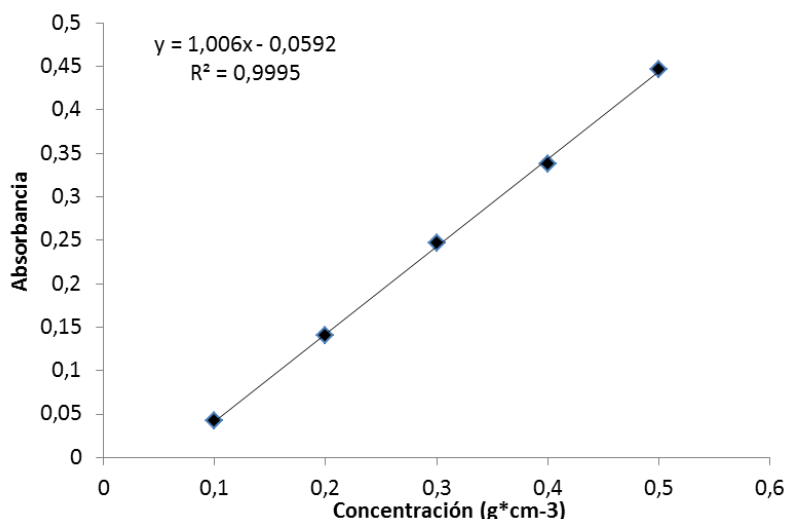


Figura 9: Ejemplo de recta patrón a partir de la cual se calculan las muestras problema.

Este método es válido para concentraciones de azúcares reductores totales comprendidas entre 0,05 y 0,50 g/l, por lo que para concentraciones superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.

Por otro lado, se determinó los tipos de azúcares mayoritarios, que se obtenían del líquido ruminal, utilizando un cromatógrafo líquido iónico de alta resolución (HPLIC) marca Dionex, modelo ICS 3000, equipado con una columna analítica CARBOPAD PA20 (3 X 150 mm) en combinación con una pre-columna de seguridad CARBOPAD PA20 (3 X 30 mm), se utilizó una bomba isocrática con válvula de doble posición y un sistema de detección amperométrica con electrodo de AgCl como referencia. La elución se realizó a 30 °C con 2 mM de NaOH y la regeneración de la columna se llevó a cabo pasando una disolución de NaOH 200 mM durante 15 minutos.

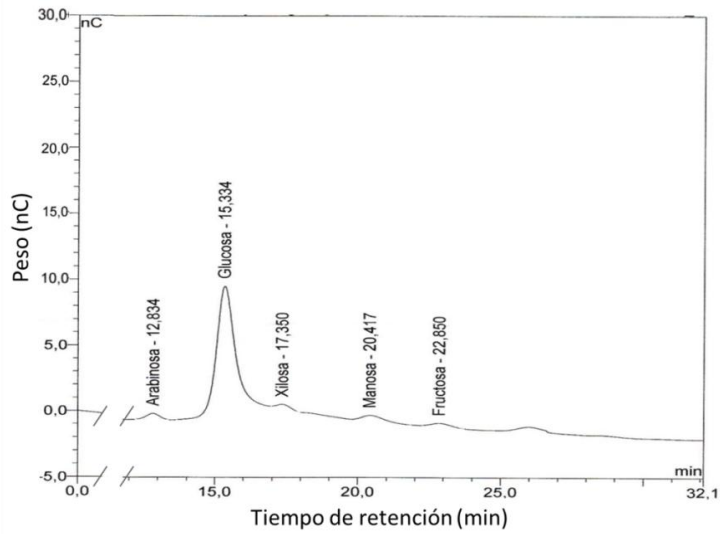


Figura 10: Cromatograma obtenido en el IHPLC de muestra ruminal

Las condiciones utilizadas en el HPLC fueron: El caudal de la fase móvil fue de $10 \text{ cm}^3/\text{min}$, con una presión de seguridad de 4000 psi (28MPa) y una presión de trabajo de 2800 psi, inyectando un volumen de muestra de 1 cm^3 y para el análisis de 10 mm^3 , con un tiempo de análisis de 25 minutos. Con estas se obtuvo un cromatograma como el que se muestra en la **Figura 10** en el que se representa en el eje de abscisas el tiempo de retención por la columna en minutos y en el eje de ordenadas la carga eléctrica de nanocoulombs de cada elemento.

3.3 Análisis de rumen: Análisis de la composición botánica de la dieta

Para el análisis de la composición botánica se han descrito dos metodologías, macroscópicamente o microscópicamente mediante las cutículas de las hojas o de los tallos. En este trabajo hemos realizado un estudio macroscópico, siguiendo el método de Jensen (1968) para poder cuantificar cada una de los grupos botánicos en los que hemos dividido el contenido ruminal. El contenido del rumen se clasificó en tres grupos como es realizado en el trabajo de Rodríguez Berrocal de 1993. En un primer lugar se agrupó el material arbustivo y/o arbóreo donde se englobó madera, hojas de árboles y partes de arbustos, incluyendo hojas verdes, tallos y brotes. En un segundo grupo se incluyeron las herbáceas (gramíneas, monocotiledóneas, plantas acuáticas, y también los hongos y setas), y en un tercer y último grupo se metieron los frutos encontrados, que en su mayoría fueron restos de bellota, aceitunas y otras semillas.

Las muestras del rumen se analizaron volumétricamente por características macroscópicas de las plantas.

En la recolección de la muestra, el contenido ruminal se mezcló y se cogió una porción de 250 g, que fue congelada y almacenada hasta su análisis. Posteriormente estos fueron descongelados y lavados a través de tamices con una luz de malla de 1,0 y de 0,5 cm, siendo identificado y clasificado macroscópicamente. El material retenido por los tamices, tras su identificación, fue dividido en tres grupos descritos anteriormente.

De manera similar al método descrito por Nugent (1983) y McCullough (1985) el material ordenado fue secado en estufa a 80 °C hasta peso constante, llegando a una precisión de miligramo. El porcentaje de la composición de materia seca de cada uno de los tres grupos de forraje fue dado con respecto al peso total de la muestra. Posteriormente se comparó estos porcentajes entre las diferentes especies, sexo y edad a lo largo del año (cada 2 meses).

En términos matemáticos, el porcentaje de peso seco del forraje comido por las especies de ciervo j (p_{ij}) se puede expresar como:

$$p_{ij} = \frac{\sum b_i}{\sum b_{ti}} \times 100$$

Donde b_i es el peso de la muestra de forraje en el rumen y b_{ti} el total del peso de la muestra.

3.4 Procedimientos para la espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano.

Para este procedimiento se utilizaron las muestras de las heces de los mismos individuos a los que mediante métodos tradicionales se les analizó el rumen, para la obtención de los datos de referencia, con los que se relacionó los espectros obtenidos del NIRS. Se utilizaron un total de 149 muestras de ciervos y 111 de gamos.

La **Tabla 3** muestra el número de muestras utilizadas tanto para la calibración como para la validación, separadas por especies.

Tabla 3: Animales estudiados y muestras analizadas en el NIRS

	Procedimiento Quimiométrico	Validación externa	total
Ciervos	127	22	149
Gamos	90	21	111
Total	217	43	260

3.4.1 Tratamiento de las muestras de heces

Una cantidad de 2 a 4 gramos de muestra congelada de heces fue liofilizada en un liofilizador Termo Savant modelo Modulyo D a una temperatura de -40°C y 1 mbar de presión, durante 24 horas de forma similar a lo sugerido por Garnsworthy y Unalt (2004). Transcurrido este tiempo se homogeneizó en una primera fase y se volvió a introducir en el liofilizador durante 24 horas más. Posteriormente cada muestra fue triturada con un molinillo eléctrico para obtener partículas finas y conseguir una muestra lo más homogénea posible.

El tamaño de partícula de la muestra tiene un efecto importante en el espectro de reflectancia NIRS (Casler y Shenk, 1985; Windham, 1987). El incremento del tamaño de partícula, hace aumentar la luz incidente por lo que la medida de reflectancia aumenta también. La finura de las partículas es menos importante que la variabilidad en el tamaño y en muchas muestras no puede o es difícil producirse un tamaño de partícula uniforme (Foley et al., 1998). El tamaño de partícula es tan importante que conviene comprobar la variabilidad de su tamaño dentro de cada muestra y entre muestras (Shenk y Westerhaus, 1993). Por ello se realizó un diseño experimental para analizar estadísticamente las posibles diferencias en tamaño de partícula. Para ello se utilizaron 5 muestras de heces extendidas en un porta objetos de manera que fuera posible medir

20 partículas en 20 campos microscópicos elegidos al azar. En total se midió el tamaño de 100 partículas. Cada muestra se dividió en 4 subgrupos conteniendo cada subgrupo 4 medidas. Para la medición del tamaño se utilizó un microscopio Leica DM 1000 con cámara Leica EC3 conectada al programa informático Leica Application Suite versión 1.6.0. Se comenzó calibrando las imágenes con un micrómetro Leitz Wetzlar de 2 mm con intervalos de 0.01 mm. El análisis de varianza se realizó con el programa SPSS 7.0 después de comprobar la normalidad (test de Shapiro-Wilk W) y homocedasticidad (test de Levene's) de los datos.(Anexo I)

3.4.2 Medidas espectrales y tecnología utilizada

Los espectro de infrarrojos se registraron con un espectrómetro de infrarrojo cercano FT-NIR Antaris (MDS) de Nicolet equipado con una esfera integradora de eficiencia superior al 95% y un detector InGaAs (Indium, Gallium and Arsenide) que permiten trabajar en la región de 12000 a 3800 cm^{-1} (833-2630 nm) con una resolución entre 64 cm^{-1} y 2 cm^{-1} . Las muestras de heces totalmente desecadas fueron dispuestas en el accesorio muestreador, agitándola para su homogenización. Se realizaron dos medidas espectrales para cada muestra, llamadas réplica A y réplica B, para tener una mayor fiabilidad del análisis y para cada réplica se realizaron 160 exploraciones. Posteriormente se realizó una media de estas dos réplicas para obtener un espectro más representativo de la muestra. Los datos ópticos fueron recogidos como $\log 1/\text{Reflectancia}$ ($\log 1/R$). El espectrómetro se purgó continuamente con nitrógeno para asegurar una atmósfera inerte. Después de cada medición, el cristal fue limpiado con agua destilada y secado cuidadosamente. Se analizaron un total de 217 muestras (127 de ciervos y 90 de gamos) para la obtención de las ecuaciones de calibrado, realizando dos réplicas de cada una. Este procedimiento permitió utilizar con una misma muestra la predicción de los distintos índices. Posteriormente se obtendría el espectro de otras 43 muestras independientes (22 de ciervo y 21 de gamo) para la valoración de la eficacia del procedimiento y la fiabilidad de la predicción de las ecuaciones resultantes.

3.4.3 Análisis quimiométrico y método de calibración

Se procedió a la obtención de un modelo de calibración correlacionando los resultados analíticos, con los espectros NIRS de las heces. Para ello se utilizó un ajuste por mínimos cuadrados parciales (PLS) mediante el programa TQ Analyst 6.1.1. Software de Termo Nicolet Corp., implementado en el mismo equipo. La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) está basada en la descomposición del espectro en el que las variables originales son remplazadas por

las llamadas variables latentes, las cuales son una combinación lineal de las variables originales. Para este cálculo, PLS usa el espectro y la información de concentración y maximiza la covarianza entre ellos para conseguir las variables latentes que están directamente relacionadas con los componentes de interés.

Los datos de reflectancia (R), en la forma de $\log 1/R$, es común a la transformación del espectro obtenido con monocromadores de barrido, lo que permite reducir el efecto de tamaño de partícula de la muestra, destacar rasgos del espectro y facilitar el análisis de regresión. La transformación sirve entonces para dos objetivos básicos: Reducir el "ruido" en los datos y aislar o destacar la información espectral que se puede relacionar con los datos químicos (Westerhaus, 1989).

Fueron realizados diversos tratamientos de los datos (entre ellos la primera y segunda derivada) y se testaron diferentes regiones del espectro por lo que se obtuvieron diferentes ecuaciones de calibrado. Fueron probadas seis calibraciones PLS para cada índice estudiado, variando la región del espectro y el número de variables latentes tomadas en cada calibración.

Según Murray (1988), el set de muestras seleccionadas para desarrollar una calibración debe cumplir ciertas condiciones ideales como: representar un rango amplio de composiciones o calidades, tener una distribución uniforme y pareja respecto de la población total, ser típicas de las que se encuentran en la realidad, y contarse con datos precisos de su composición analítica. Además, las ecuaciones de calibración tienden a tener mejor valor predictivo cuando se desarrollan sobre muestras de naturaleza relativamente homogénea o correspondientes a un mismo tipo de producto. En cambio, cuando se intenta desarrollar calibraciones para poblaciones más heterogéneas de base más amplia, la precisión y exactitud tienden a disminuir. Por ello, las ecuaciones de calibración se han desarrollado con los datos de ciervos y gamos conjuntamente, para aumentar la variabilidad de la ecuación pero posteriormente se validó la ecuación separando ambas especies para comprobar para cuál de ellas se ajustaba mejor cada ecuación.

3.4.4 Valoración de precisión y fiabilidad

Las diferentes opciones de tratamientos matemáticos y técnicas de regresión permiten disponer de muchas ecuaciones posibles para cada una de las variables a predecir. Es por este motivo que es necesario seleccionar aquella que sean más fiable. La fiabilidad, se valoró a partir del coeficiente de correlación (r), la raíz media del error estándar de calibración (RMSEC). El

software implementado en el equipo utilizado permite la "Validación Cruzada", y utilizan procedimientos estadísticos como la simulación de Monte Carlo. Este proceso consiste en subdividir el grupo de muestras en varios subgrupos, separando uno como si fuera un grupo de muestras "externas" para validación y generando con el resto una ecuación de calibración. Este proceso se repite hasta que todos los grupos de muestras han sido predichos a partir de los restantes, lo cual permite una mayor fiabilidad en la ecuación generada, ya que limita automáticamente el número de términos en la ecuación. Se obtiene un índice llamado raíz media del error estándar de validación cruzada (RMSECV) y, con los desvíos de los valores predichos respecto de los valores de referencia, se calcula la raíz media del error estándar de predicción (RMSEP) (Shenk y Westerhaus, 1993b). En su manual de revisión Dryden (2003) define a estos estadísticos como se indica a continuación:

Coeficiente de correlación (r): Grado en que los valores del analito y los valores de log (1 / R) a una longitud de onda en particular, se correlacionan.

RMSEC: La variabilidad en la diferencia entre los valores pronosticados y los valores de referencia cuando la ecuación se desarrolló a partir de los datos de calibración.

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{1}{l_c - 1} \sum_{i=1}^{l_c} (\hat{y}_i - y_i)^2}$$

RMSECV: La variabilidad en la diferencia entre los valores predichos y los valores de referencia cuando la ecuación es aplicada a un subgrupo de los datos de calibración.

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 1}}$$

RMSEP: La variabilidad en la diferencia entre los valores de predicción y los valores de referencia cuando la ecuación es aplicada a los datos de validación.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{1}{l_p - 1} \sum_{i=1}^{l_p} (\hat{y}_i - y_i - \text{bias})^2}$$

Donde:

\hat{y}_i = valor predicho

y_i = valor de referencia

l_p = número de observaciones en el grupo de valores de predicción
 l_c = número de observaciones en el grupo de valores de calibración
 n = número de muestras

Aunque no haría falta, ya que disponemos de estos índices de bondad para cada ecuación de calibrado, también hemos querido valorar con muestras externas a nuestro método. Para ello, también se usaron muestras independientes de las utilizadas en la creación de las ecuaciones de predicción. Con esta validación extra sometimos a prueba de forma similar a lo sugerido por Foley et al. (1998). Este análisis se realizó para los distintos índices, separando las muestras de ciervo de las muestras de gamo y utilizando las ecuaciones de predicción con mejores índices de bondad. Los valores de referencia (resultado de los análisis químicos tradicionales) fueron comparados con los obtenidos a partir del NIRS y de las ecuaciones de predicción, a través de comparaciones estadísticas utilizando el programa SPSS 17.0. Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk W y de Levene para verificar la normalidad y la homocedasticidad de los datos. Se evaluó tanto la utilidad de las ecuaciones de predicción conjunta para la determinación de la dieta de ciervo y gamo, así como las ecuaciones específicas. Además, las ecuaciones obtenidas para los datos de ciervos se aplicaron a gamo y viceversa.

3.4.5 Validación externa

Se utilizó un conjunto independiente de muestras de las que también disponíamos los datos de la composición de los diferentes índices. Usamos otras 43 muestras seleccionadas al azar (22 ciervos rojos y 21 gamos) para la validación externa complementaria. Testamos las mejores ecuaciones mediante la predicción de valores del “conjunto de datos de validación independiente”, y los resultados se compararon con los de los resultados del análisis químico a través de la comparación de medias mediante el programa SPSS Statistics 17.0. Shapiro-Wilk W y las pruebas de Levene se utilizaron para comprobar la normalidad y homocedasticidad de los datos. Se evaluaron tanto la predicción de las ecuaciones conjuntas, para determinar la dieta ciervos y gamos, así como las ecuaciones específicas de cada especie. Además, las ecuaciones obtenidas para los datos de los ciervos se aplicaron a gamos y viceversa.

CAPITULO 4:
RESULTADOS



4.1 VALIDACIÓN PARA ADF, NDF, LIGNINA, RELACIÓN C:N, EDOM:

4.1 (A) Comunicación a congreso

Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano Fecal (F-NIRS) para predecir el ADF de la dieta consumida por los ciervos y gamos en el sur de España.

Tellado S., Orpez R., Moro J. and Azorit C

XXXth IUGB Congress (International Union of Game Biologists) and Perdix XIII (2011)

Barcelona

4.1 (B) Art 1 Fecal-FT-NIRS como herramienta no invasiva para la evaluación de calidad de la dieta de los ciervos del Mediterráneo

Tellado S., Orpez R., Muñoz-Cobo J., Azorit C. 2015. Fecal-FT-NIRS as a Noninvasive Tool for Assessing Diet Quality of Mediterranean Deer. *Rangeland Ecology y Management* 68 (2015) 92–99.

4.1 (A) Comunicación a congreso

Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano Fecal (F-NIRS) para predecir el ADF de la dieta consumida por los ciervos y gamos en el sur de España

¹Tellado S., ²Orpez R., ³Moro J. and ¹Azorit C.

¹Dep. Biología Animal, Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén. España.

²Dep. Ingeniería química, ambiental y de los materiales, Universidad de Jaén.

³Ministerio de medio ambiente, medio rural y marino, España.

Desarrollamos y validamos un método de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano en heces, (F- NIRS) para el análisis de la fibra ácido detergente (ADF), como medida de la calidad de la dieta consumida por dos especies simpátricas de ciervos, en una región mediterránea. Utilizamos 121 ciervos rojos (*Cervus elaphus hispanicus*) y 114 gamos (*Dama dama*) abatidos durante la temporada de caza 2008-9 en Sierra Morena, Jaén. El contenido ruminal y las heces se recogieron inmediatamente después de ser cazados, bajo condiciones controladas. El estudio se realizó en cuatro etapas: 1) En primer lugar, en el laboratorio se determinó la ADF de un total de 235 muestras de rumen, a través de análisis químicos tradicionales (Van Soest y Wine, 1967). 2) En segundo lugar, se obtuvieron espectros de absorción de las heces previamente liofilizadas. Las mediciones y registro de los espectros, se realizaron con un espectrómetro de infrarrojo cercano FT-NIR Antaris (MDS), equipado con una esfera integradora con eficiencia del 95 % y un detector InGaAs. 3) En la tercera etapa, se obtiene una ecuación de calibración, capaz de predecir el ADF, mediante la regresión de los resultados analíticos de ADF y los espectros de reflectancia NIRS de heces. Los datos se transformaron previamente por la primera y segunda derivada. Se probaron diferentes regiones del espectro, y se obtuvieron diferentes ecuaciones de calibración utilizando un análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS). 4) Como paso final, se evaluó la precisión de cada ecuación de predicción, a partir del coeficiente de correlación (r), la raíz del error estándar de calibración (RMSEC), la raíz del error estándar de la validación cruzada (RMSECV) y la raíz del error estándar de predicción (RMSEP). Se valoró la fiabilidad de este método utilizando una validación externa con 56 muestras independientes. La ecuación óptima para predecir ADF mostró los siguientes resultados: $r = 0,995$; $RMSEC = 0,61$; $RMSECV = 6,27$; $RMSEP = 4,49$. Los resultados y los modelos matemáticos mostraron que la técnica NIRS fecal fue satisfactoria para la determinación de ADF en ciervo, así como en gamo. Esta técnica se muestra como una herramienta excepcional para el seguimiento de la fauna de una manera indirecta, rápida y no invasiva.

4.1 (B) Art 1. Fecal-FT-NIRS como herramienta no invasiva para la evaluación de calidad de la dieta de los ciervos del Mediterráneo.

1 RESUMEN

Con el fin de evaluar la calidad de la dieta de dos especies de ciervos mediterráneos, desarrollamos y validamos una metodología de espectroscopía de reflectancia difusa en el infrarrojo cercano con transformada de Fourier en las heces, (fecal-FT-NIRS) para la determinación de índices nutricionales como la fibra ácido detergente (ADF), fibra neutro detergente (NDF), la lignina, la relación Carbono-Nitrógeno (C:N) y la digestibilidad enzimática de la materia orgánica (EDOM). Para lo cual, utilizamos contenido ruminal, y muestras fecales de 149 ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) y 111 gamos (*Dama dama*) del sureste de España (n = 520 individuos). Los espectros obtenidos de las heces se asociaron con los resultados de los análisis químicos convencionales que se realizaron a las muestras de rumen, mediante una regresión quimiométrica con mínimos cuadrados parciales (PLS). Esto generó ecuaciones de predicción específicas para los datos de ciervos y de gamos por separado, así como ecuaciones combinadas de todas las muestras de ambas especies de cérvidos. Todas las ecuaciones de predicción generadas tuvieron una alta linealidad con altos coeficientes de correlación ($r = 0,8-0,99$). De todas estas ecuaciones se seleccionaron las que tenían una exactitud más fiable, teniendo en cuenta los errores de predicción (RMSEP), de calibración (RMSEC), y de la validación cruzada (RMSECV) en relación con el rango de valores de cada parámetro para el que se estableció la calibración NIRS. Las ecuaciones conjuntas, para ambas especies, demostraron ser útiles para todas las determinaciones de parámetros nutricionales, tanto para ciervos como para gamos simultáneamente. Las ecuaciones obtenidas de los datos de los ciervos también se aplicaron con éxito para el gamo y viceversa para la determinación de NDF, ADF, C:N y de lignina, mientras que para la evaluación de EDOM se aplicaron con mayor precisión las ecuaciones específicas para cada especie.

Una vez validada, la técnica Fecal-FT-NIRS, puede ser considerada como una herramienta no invasiva adecuada para el control de las variaciones de la calidad de la dieta de los cérvidos en un ambiente mediterráneo.

2 INTRODUCCIÓN

El contenido de Nitrógeno (N) y Carbono (C) en la vegetación es una de las características de la planta de vital importancia para los herbívoros, ya que participa en todos los procesos

metabólicos, así como en la estructura celular. Debido a que el N forma parte de los aminoácidos, que constituyen las proteínas, es el componente más, comunmente utilizado para evaluar la calidad nutricional de la dieta de los rumiantes silvestres (Leslie y Starkey, 1987; Irwin et al., 1993; Hodgman et al., 1996; Blanchard et al., 2003), y los domésticos (Arman et al., 1975; Moore et al., 2004). Así el N es correlacionado positivamente con la digestibilidad de la dieta (Irwin et al., 1993). El aumento de C:N, debido a la reducción de las concentraciones de N y el aumento de los carbohidratos estructurales, conduce a la disminución de la calidad foliar (Couture et al., 2012).

Las fibras, al ser los principales componentes de la pared celular de las plantas, se han estudiado ampliamente desde que se desarrolló su análisis en la década de 1960, por Van Soest y colaboradores (Van Soest, 1963; Van Soest et al., 1967), como indicadores de la calidad del forraje. El contenido de lignina también es un componente de la pared celular que representa la inversión estructural que ha hecho la planta, influyendo su contenido en las propiedades físicas, a través de su participación en el apoyo arquitectónico, y en la defensa de la pared celular (Freschet et al., 2010). La digestión en rumiantes es inversamente correlacionada con la tasa de lignificación (Hatfield y Fukushima, 2005). El estudio de este tema es muy importante porque da información útil sobre la calidad de la dieta consumida. Del mismo modo el uso de celulasas, para el estudio de la digestibilidad del forraje, parece ser una buena alternativa para la evaluación de la calidad de este, y un método que podría ofrecer una alta correlación con los resultados in vivo en estudios de digestibilidad (Jones y Theodorou, 2000).

Sin embargo, todos estos análisis no son adecuados para abordar muchas de las cuestiones ecológicas nutricionales, que involucran grandes cantidades de muestra, porque son demasiado laboriosos y caros. El análisis de la evaluación de la dieta ha implicado tradicionalmente técnicas de química húmeda, que especialmente para la lignina son difíciles y requieren personal cualificado con el fin de lograr resultados exactos y reproducibles. El costo de los productos químicos y del tiempo son altos, cuando se utilizan estos métodos estándar, ya que al ser un volumen grande de análisis, requieren grandes cantidades de productos químicos peligrosos tales como el ácido sulfúrico concentrado (Van Soest et al., 1991).

En contraste, la metodología de la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) ofrece muchas ventajas respecto a los métodos estándar. Emplea métodos sencillos de preparación de la muestra (secado y molienda), y una vez validado, evita los problemas de eliminación de residuos químicos orgánicos y otros, ya que no utiliza reactivos tóxicos o corrosivos (Mark et al., 2002).

Excepto por el alto costo inicial de la adquisición de equipos, es de bajo costo, libre de químicos, rápido y en su análisis no se destruye la muestra (Landau et al., 2004).

La viabilidad de la predicción de la calidad de la dieta mediante el análisis de los espectros de infrarrojo cercano de las heces, denominado "fecal-NIRS", se ha establecido desde hace mucho tiempo (Lyon y Stuth, 1992), considerándose una interesante aplicación la utilización directa de los espectros NIR en heces, para relacionarlos con los atributos de la dieta (Dixon y Coates, 2009). Dado que la composición química se puede predecir a partir de espectros fecales con una mayor precisión que el análisis directo de los alimentos (Landau et al., 2004), la reflectancia en el infrarrojo cercano se ha aplicado ampliamente en la industria agrícola para evaluar la calidad nutricional de los piensos de herbívoros domésticos (Leite et al., 1995; Walker et al., 2002; Boval et al., 2004; Landau et al., 2005, 2006, 2008; Fanchone et al., 2009), así como para controlar el estado nutricional y la ecología de los herbívoros de pastoreo (Dixon y Coates, 2009), incluyendo ciervos silvestres (Dryden, 2003).

Sin embargo, a nuestro conocimiento, no existe ninguna información previa disponible, sobre el uso de técnicas de espectroscopía de infrarrojo en muestras fecales, para predecir la calidad de la dieta de los ciervos silvestres españoles. En cuanto a sus limitaciones, NIRS puede ofrecer altos porcentajes de predicción, sólo cuando las muestras pertenecen a un mismo tipo de población que la utilizada para establecer los modelos de predicción.

Por tanto, el principal objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología NIRS con el fin de monitorear la calidad de la dieta de dos poblaciones de cérvidos españoles en semicautividad. Las ecuaciones predictivas adecuadas para evaluar la calidad de la dieta de ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) y gamos (*Dama dama*) mediante las determinaciones de los índices ADF, NDF, lignina, C:N y de EDOM se realizaron mediante el uso de la espectroscopía de reflectancia difusa de infrarrojo cercano con transformada de Fourier en las heces (fecal-FT-NIRS), junto con los mínimos cuadrados parcial (PLS) como un método de regresión quimiométrico. Con el fin de encontrar una ecuación global útil para determinar la calidad de la dieta en ambas especies, hemos realizado ecuaciones reuniendo muestras de ciervos y gamos conjuntamente, además de probar ecuaciones con las muestras de ambas especies por separado.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Muestreo y área de estudio

El material utilizado en este estudio fue contenido ruminal y heces ($n = 260 \times 2$), que fueron recogidos de 149 ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) y 111 gamos (*Dama dama*) cazados durante 2008 y 2009 en Lugar Nuevo (LN), una finca cerrada situado en el Parque Natural Sierra de Andújar, en el sureste de España ($38^{\circ}9'N$ $4^{\circ}3'W$). Los animales muestreados estaban comiendo cuando fueron cazados, inmediatamente después se recogieron unos 250 g de contenido del rumen y unos 5-10 g de heces directamente del recto. Sólo se tomaron muestras de los individuos con contenido ruminal no macerado, según lo aconsejado por Djordjevic et al. (2006), con el fin de evitar en la medida de lo posible, materiales parcialmente digeridos. Las muestras de contenido ruminal y heces fueron mantenidos bajo refrigeración en los refrigeradores de campo durante menos de una hora y después se mantuvo a $-20^{\circ}C$ hasta su posterior análisis de laboratorio.

3.2 Análisis químicos del contenido ruminal

El contenido ruminal se analizó mediante un sistema desarrollado por Van Soest y sus colaboradores para caracterizar la parte fibrosa de los forrajes (Van Soest, 1963; Van Soest y Wine, 1967). Este sistema divide las paredes celulares en fracciones, insolubles en detergente ácido (ADF) o en soluciones de detergente neutro (FDN). Así que, se siguió el método estándar de Van Soest y colaboradores de 1967. Determinando, lo primero, el contenido de materia seca de las 260 muestras de rumen, las cuales se pusieron en un horno hasta que se obtuvo peso constante mediante métodos estándar (AOAC, 1995), y luego se determinaron tanto el contenido de fibra neutro detergente como el de ácido detergente (NDF y ADF).

La digestibilidad enzimática de la materia orgánica (EDOM) se calculó en dos etapas; primero, la extracción con una solución de neutro detergente, y después le siguió una incubación con una solución de enzima celulasa (McLeod y Minson, 1982). Se utilizó el método de pepsinacelulasa descrito por Jones y Hayward (1975), teniendo en cuenta ciertas modificaciones en la concentración de celulasa (solución 1 g / L), tiempo de incubación (24 o 48 h) y el tipo de lavado final (agua destilada caliente o acetona). La digestión enzimática se llevó a cabo mediante la adición de 25 ml de solución de enzima a cada muestra, con un tiempo de incubación de 24 h a $40^{\circ}C$. Después de la incubación, las muestras se filtraron en vacío y el residuo se lavó con agua destilada caliente, siendo secado en un horno a $105^{\circ}C$ hasta obtener pesada constante. A partir de

entonces, los crisoles fueron incinerados a 550°C durante 1,5 h en un horno mufla eléctrico, posteriormente se enfrió en desecadores a temperatura ambiente y finalmente se volvieron a pesar para obtener la materia orgánica digerible.

Para la determinación de lignina se utilizó la norma Tappi T222 om-88 (1998). En este método, la lignina se define como el componente insoluble en una solución de ácido sulfúrico al 72%. El contenido de lignina que se mide con este método tiene buena correlación con el contenido de lignina determinado por métodos directos como la pirólisis analítica en elementos leñosos (Alves et al., 2006), siendo este el método analítico más ampliamente aceptado para determinar el contenido de lignina en constituyentes leñosos (Carrier et al., 2011). Elegimos este método de ácido sulfúrico en lugar del método de la ácido detergente lignina (ADL) (la más utilizada en herbáceas y en pastoreo de rumiantes) debido al alto contenido de elementos leñosos en la dieta de nuestros cévidos, que son ramoneadores durante largos períodos de restricción de herbáceas (Bugalho et al., 2001; Azorit et al., 2012).

Se utilizó el analizador elemental (Thermo Finnigan flash EA1112), mediante el método de Dumas, para el análisis total de N y C, obteniéndose posteriormente la relación C:N. Las muestras de rumen para estas determinaciones fueron previamente secadas por liofilización en frío y molida hasta estar uniforme.

3.3 Colección de datos de los espectros fecales

Las muestras de heces se liofilizaron, después se mantuvieron secas en un horno a 60°C. Posteriormente, cada muestra fue triturada en un molinillo (Bosch, MKM 6003), controlando el tamaño de partícula (12-18 micras), ya que este tiene un gran efecto sobre los espectros NIR (Casler y Shenk, 1985; Windham, 1987), aunque es más importante la uniformidad del tamaño de las partículas que el tamaño propiamente dicho (Dryden, 2003; Shenk y Westerhaus, 1993a, 1993b). Hemos obtenido espectros utilizando un espectrómetro de reflectancia en el infrarrojo cercano FT-NIR Antaris (MDS) equipado con una esfera integradora con una eficiencia por encima del 95% y un detector InGaAs para trabajar en la región de 833 a 2.630 nm. Las muestras fueron escaneadas en el rango de longitud de onda 1000 - 2500 nm. Después de cada medición, el cristal del muestreador se limpió con agua destilada y se secó cuidadosamente. El número de exploración se optimizó a 160 escaneos, para una adecuada relación señal-ruido, uniéndose estos escaneos en un solo espectro.

3.4 Análisis quimiométrico y desarrollo del modelo de calibración

Los datos espectrales y los datos de los análisis químicos, para la calibración PLS, se procesaron utilizando TQ Analyst 6.1.1 y el software de Thermo Nicolet Corp. El PLS se basa en la descomposición espectral, donde las variables originales se sustituyen por los llamados variables latentes, que son combinaciones lineales de los originales. Para este cálculo PLS, se utilizó la información espectral de las heces y la concentración resultante del análisis químico el contenido ruminal, maximizando la covarianza entre ellos. En la base de datos inicial sólo dos valores fueron eliminados antes de realizar la calibración porque estuvieron fuera del rango del resto de valores, debido a errores detectados durante los análisis químicos estándar. Más tarde, no se detectaron valores atípicos dentro de una distancia estandarizada mínima H de 6.0 del resto de datos (Shenk y Westerhaus, 1993a, 1993b). Se obtuvieron diferentes ecuaciones mediante la combinación de distintas regiones espectrales, y diferentes pre-tratamientos matemáticos del espectro (primera y segunda derivada). El mejor modelo se encontró cuando el coeficiente de correlación (r) fue el valor más alto, y la raíz media del error estándar de la calibración (RMSEC) fue el más bajo. La capacidad predictiva del modelo de calibración, así como su precisión se evaluaron mediante el cálculo de la raíz media del error estándar de la validación cruzada (RMSECV) y del error estándar de predicción (RMSEP). Se evaluó la exactitud de predicción de ADF, NDF, lignina, la relación C:N y de la EDOM a través de ecuaciones obtenidas con los datos de ciervos y gamos por separado, y también conjuntamente.

3.5 Las ecuaciones de predicción: Selección y Validación.

La calidad de la calibración se evaluó a partir del coeficiente de correlación y de la raíz media del error estándar de la calibración. Mientras que la capacidad predictiva del modelo de calibración, así como su precisión, se evaluaron mediante el cálculo de la raíz media del error estándar de la validación cruzada y del error estándar de predicción. El valor de error residual (RER) también fue utilizado como un estadístico de validación. Estos indicadores son estadísticos adimensionales, lo que significa que se pueden comparar en las mismas condiciones entre los diferentes modelos (AACC, 1999; Workman, 2001; Williams, 2001; Feam, 2002). El RMSEP mide la exactitud de la predicción (la diferencia entre los valores reales y estimados). El RER (rango/RMSEP) junto con el RMSECV ofrece la incertidumbre media que se espera para la predicción de las muestras. Cuando los valores de RER son ≥ 4 , la calibración es aceptable para el

cribado de la muestra, cuando es entre 8 y 12, la calibración es aceptable para el control de calidad y si $RER \geq 12$ la calibración es buena para la cuantificación (Millmier et al., 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Análisis de Química húmeda y espectros fecal-FT-NIRS

A través del análisis químico se determinó el contenido de ADF, NDF, lignina, relación C:N y EDOM de las muestras ruminales tanto de ciervos como de gamos y se utilizaron para las calibraciones quimiométricas ($n = 217$) y la validación externa ($n = 43$) (**Tabla 4**). El contenido de ADF global medio fue de $47,1 \pm 5,9$, mientras que el contenido medio de NDF fue $65,1 \pm 7,4$. El contenido de lignina global medio fue de $29,8 \pm 5,3$, la relación C:N fue de $9,8 \pm 2,5$ y la media de la digestibilidad fue de $33,6 \pm 7,6$, considerando la media de las dos especies de cérvidos. Estos conjuntos de muestras, seleccionados aleatoriamente de una población natural durante todo el año, tuvieron un amplio rango de valores apropiados para calibraciones NIRS. Detectamos diferencias estacionales significativas ($P < 0,001$) para todos los componentes de la dieta. El conjunto de muestras de validación tenían medias y SD similares al conjunto de datos, y la variabilidad en la concentración de parámetros en las muestras, también se consideró adecuada para el desarrollo de una calibración NIR.

Tabla 4: ADF, NDF, Lignina, relación C:N y EDOM (% w/w) de ciervo (*Cervus elaphus*) y gamo (*Dama dama*). Análisis de las muestras de rumen por métodos de química húmeda usándolas como referencia para el modelo de calibración PLS y para la validación externa.

	N	ADF		NDF		Lignina		C:N		EDOM	
		media± SD	min-máx	media ± SD	min-máx	media ± SD	min-máx	media ± SD	min-máx	media ± SD	min-máx
Usadas en la calibración quimiométrica y validación cruzada interna											
Ciervo	127	49.7±5.2	35.2-61.5	66.8±6.4	46.3-85.6	31.9±5.5	22.6-78.8	10.6±2.1	7.4-18.1	31.9±7.0	21.3-55.9
Gamo	90	44.4±5.5	26.8-58.9	64.4±8.3	39.8-93.5	27.9±4.3	18.0-38.0	10.7±2.9	6.5-19.4	35.7±8.3	21.3-68.2
Usadas en la validación externa adicional											
Ciervo	22	47.1±4.6	39.9-56.8	63.2±7.8	45.1-74.9	29.7±4.2	23.5-43.7	9.8±1.5	7.4-13.5	34.6±7.5	23.7-51.3
Gamo	21	44.5±5.7	32.1-54.0	61.8±7.2	40.7-72.7	26.2±2.3	22.1-30.4	10.1±2.7	6.9-17.9	34.9±5.4	23.3-44.7
Total	260	47.1±5.9	26.8-61.5	65.1±7.4	39.8-93.5	29.8±5.3	18.0-78.8	9.8±2.5	6.5-19.4	33.6±7.6	21.3-68.3

4.2 Contenido de fibra ácido detergente (ADF)

Se llevó a cabo las estadísticas de calibración PLS y las diferentes ecuaciones de predicción para el modelo de la variabilidad total de ADF. Los resultados más significativos con los modelos de PLS usando diferentes regiones espectrales se resumen en la **Tabla 5**. Se utilizaron en todos los casos, la segunda derivada y los 10 factores PLS. Las ecuaciones fueron seleccionadas, buscando como indicadores de la calidad de la calibración, que la raíz media del error de validación cruzada (RMSECV) fuese mínimo y que el error de calibración fuese bajo (RMSEC). Mientras que la exactitud de la predicción de los modelos se evaluó teniendo en cuenta que el RMSEP debe ser tan bajo como sea posible y similar a RMSECV. Aún teniendo en cuenta todos estos estadísticos, se consideró que el RER fue el mejor estadístico para indicar la calidad del modelo (Millmier et al. 2000). A través de unas regresiones lineales relacionamos los valores predichos por Fecal-FT-NIR y los valores de referencia de las ecuaciones de calibración seleccionadas, tanto de ciervos, de gamos, como de ambas especies conjuntamente (**Figura 11**). Las ecuaciones seleccionados tenían una alta linealidad con coeficientes de correlación (r) alrededor de 0,99 y una precisión fiable teniendo en cuenta los errores de predicción (RMSEP), de calibración (RMSEC) y de validación cruzada (RMSECV) en relación con el rango de valores para el que la calibración NIRS se configuró para cada parámetro. El índice RER varió desde 4,20 hasta 8,67 (**Tabla 5, Figura 11**).

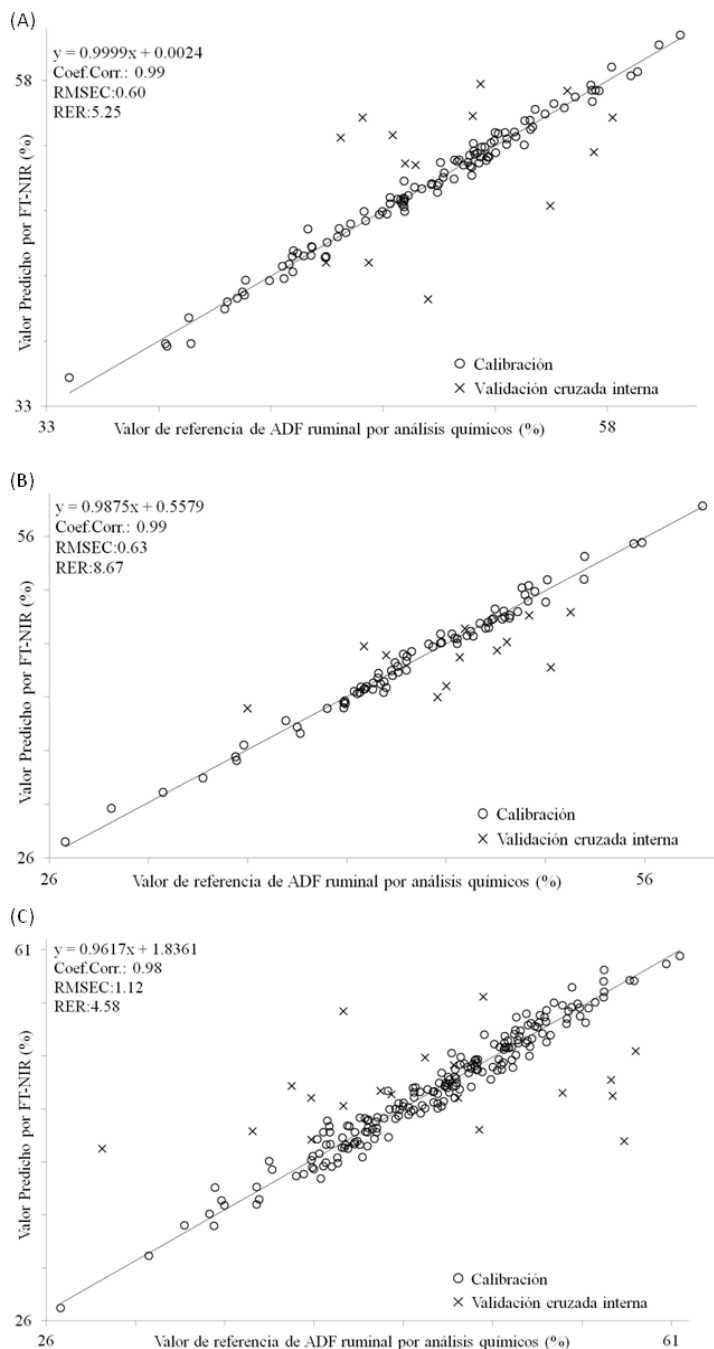


Figura 11: Relación de regresión lineal entre fecal-FT-NIR valores pronosticados y los valores ADF medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) Modelo de calibración ADF del conjunto ciervo rojo (ecuación 1.Cervus). B) modelo de calibración ADF del conjunto gamos (ecuación 3.Dama). C) modelo de calibración ADF de todos los conjuntos de ciervos (ecuación 5.Conjunta).

Table 5: Estadísticos de la calibración PLS de las ecuaciones de predicción de ADF para ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y ambas especies conjuntamente. Se usó la segunda derivada y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Coef. Corr.	Región espectral (nm)
1.Cervus	5.25	0.60	5.01	5.06	0.99	1657.8-2223.7
2.Cervus	5.04	0.56	5.22	4.58	0.99	1377.-2398.1
3.Dama	8.67	0.63	3.7	6.27	0.99	1377-2398.1
4.Dama	8.25	0.51	3.89	6.91	0.99	1657.8-2223.7
5.Conjunta	4.58	1.12	7.56	7.19	0.98	1100-2500
6.Conjunta	4.20	1.22	8.25	7.70	0.98	1000-2500

(Ecuación: 1.Cervus, 3.Dama, 5.Conjunta =Ecuaciones de calibración quimiométrica de ciervo, gamo y conjunto de ambas especies respectivamente). El sombreado gris representa a las mejores ecuaciones de las 6 representadas en la tabla.

¹ Valor del error residual

² Raíz media del error estándar de calibración

³ Raíz media del error estándar de predicción

⁴ Raíz media del error estándar de validación cruzada

4.3 Contenido de fibra neutro detergente (FND)

Las estadísticas de la calibración PLS y el rendimiento de las seis ecuaciones de predicción para la determinación NDF se muestran en la **Tabla 6**. Las ecuaciones seleccionadas para la determinación de la NDF tuvieron una alta linealidad, de los valores de referencia con los valores predichos, con coeficientes de correlación (r) que oscilaban entre 0,80 y 0,98, y una precisión fiable con errores de predicción (RMSEP), de calibración (RMSEC) y de validación cruzada (RMSECV) similar a las desviaciones estándar de los valores de referencia para cada parámetro para el que se estableció la calibración NIRS, así como de su rango. El índice RER varió desde 4,2 hasta 6,24 (**Tabla 6, Figura 12**). La **Figura 12** representa gráficamente las regresiones de las mejores calibraciones.

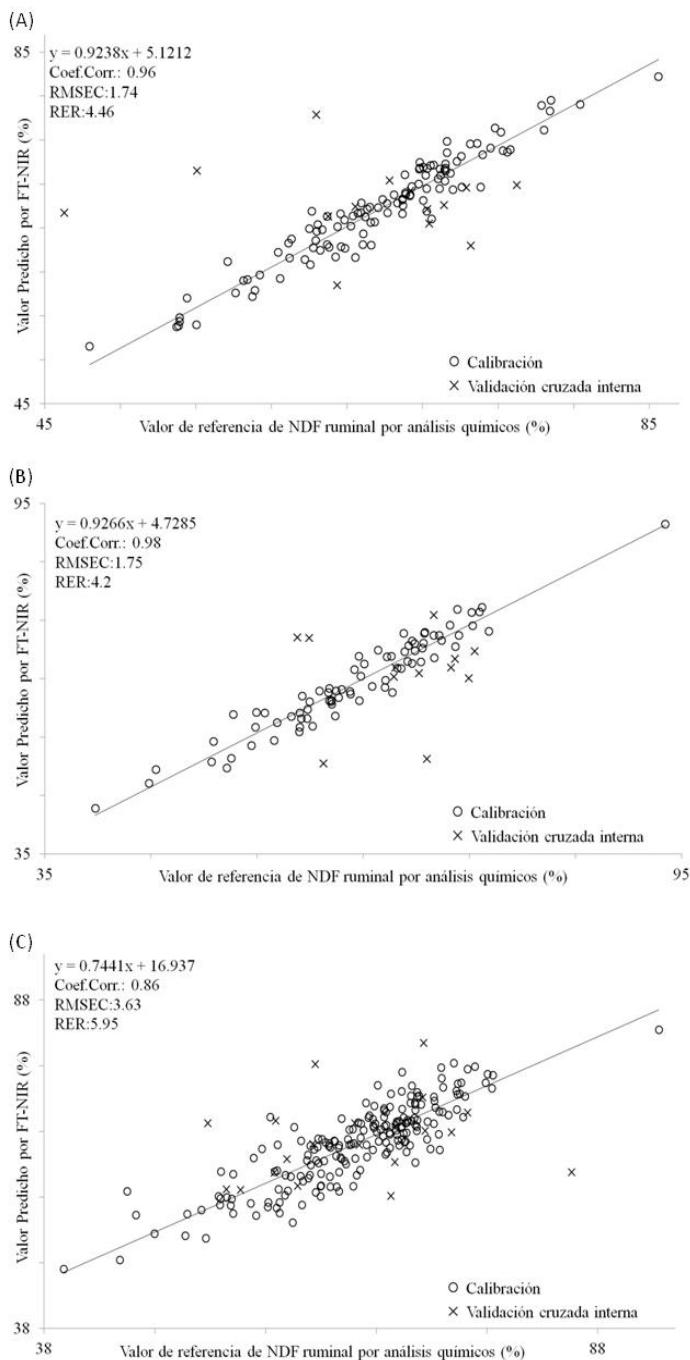


Figura 12: Relación de regresión lineal entre fecal-FT-NIR valores pronosticados y los valores de FDN medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) Modelo de calibración NDF del conjunto ciervo rojo (ecuación 7.Cervus). B) modelo de calibración NDF del conjunto gamos (ecuación 9.Dama). C) modelo de calibración NDF de todos los conjuntos de venado (ecuación 11.Conjunta).

Tabla 6: Estadísticos de la calibración PLS de las ecuaciones de predicción de NDF para ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y ambas especies conjuntamente. Se usó la segunda derivada y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Coef. Corr.	Región espectral (nm)
7.Cervus	4.46	1.74	8.81	8.73	0.96	2083.3-2500
8.Cervus	4.92	2.47	7.98	10.52	0.92	2066.1-2377
9.Dama	4.2	1.75	12.8	9.70	0.98	2083.3-2500
10.Dama	5.67	2.28	9.48	8.99	0.96	2066.1-2377
11.Conjunta	5.95	3.63	9.03	8.97	0.86	2083.3-2500
12.Conjunta	6.24	4.3	8.6	9.22	0.80	2066.1-2377

(Ecuación: 7.Cervus, 9.Dama, 11.Conjunta =Ecuaciones de calibración quimiométrica de ciervo, gamo y conjunto de ambas especies respectivamente). El sombreado gris representa a las mejores ecuaciones de las 6 representadas en la tabla.

1 Valor del error residual

2 Raíz media del error estándar de calibración

3 Raíz media del error estándar de predicción

4 Raíz media del error estándar de validación cruzada

4.4 Modelos de calibración para lignina y sus ecuaciones predictivas

Varias ecuaciones para la predicción de lignina se obtuvieron con los datos de ciervos y gamos independientemente, y también después de la puesta en común de todas las muestras de ambas especies para generar una ecuación conjunta. Las segundas derivadas y los 10 factores PLS se utilizaron en todos los casos. Siguiendo los indicadores estadísticos se seleccionaron seis ecuaciones de predicción para la determinación de lignina. Todos los modelos para la determinación de lignina dieron valores de correlación de coeficiente > 0,96 y un aceptable RMSEC. Las mejores ecuaciones fueron la 14.Cervus, 16.Dama y 18.Conjunta con los valores RMSEP y RMSECV que oscila entre, 2,88-5,08 y 3,85-6,99, respectivamente (Tabla 7, Figura 13).

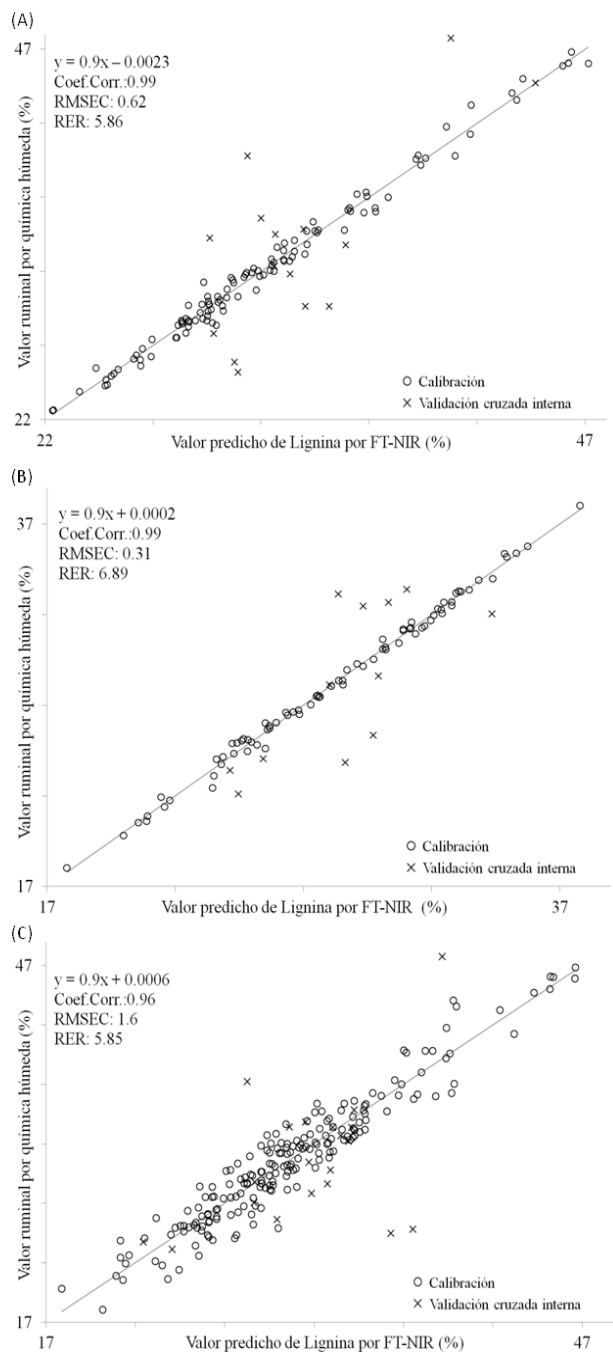


Figura 13: Relación de regresión lineal entre fecal-FT-NIR valores pronosticados y los valores de lignina medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) Modelo de calibración lignina del conjunto ciervo rojo (ecuación 14.Cervus). B) modelo de calibración lignina del conjunto gamos (ecuación 16.Dama). C) La lignina calibración del modelo de todos los conjuntos de ciervos (ecuación 18.Conjunta).

Tabla 7: Estadísticos de la calibración PLS de las ecuaciones de predicción de Lignina para ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y ambas especies conjuntamente. Se usó la segunda derivada y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Coef. Corr.	Región espectral (nm)
13.Cervus	5.54	0.36	4.54	5.32	0.99	2223.7-1374.7
14.Cervus	5.86	0.62	4.29	5.13	0.99	2449.2-1286.5
15.Dama	6.93	0.20	2.88	4.25	0.99	2223.7-1374.7
16.Dama	6.89	0.31	2.90	3.85	0.99	2449.2-1286.5
17.Conjunta	6.49	1.55	4.58	6.99	0.96	1666.6-1333.3
18.Conjunta	5.85	1.6	5.08	5.74	0.96	2449.2-1286.5

(Ecuación: 14.Cervus, 16.Dama, 18.Conjunta =Ecuaciones de calibración quimiométrica de ciervo, gamo y conjunto de ambas especies respectivamente). El sombreado gris representa a la mejor ecuación de las 6 representadas en la tabla.

¹ Valor del error residual

² Raíz media del error estándar de calibración

³ Raíz media del error estándar de predicción

⁴ Raíz media del error estándar de validación cruzada

4.5 Modelo de calibración para la relación C:N

La **Tabla 8** muestra las estadísticas de calibración PLS y el rendimiento de las mejores ecuaciones de predicción del índice C:N. La **Figura 14** muestra los mejores modelos de calibración. La calidad de los modelos de calibración y la alta correlación de los espectros NIR de las muestras, fueron confirmados por un alto coeficiente de correlación en gamos de 0,96 a 0,98 (**Tabla 8, Figura 14**). En este caso las ecuaciones tenían precisión fiable con errores de predicción (RMSEP), calibración (RMSEC) y calibración cruzada (RMSECV) cerca de las desviaciones estándar de los valores de los datos de referencia para el que se creó la calibración NIRS. El índice RER varió desde 4,89 hasta 3,17 (**Tabla 8, Figura 14**).

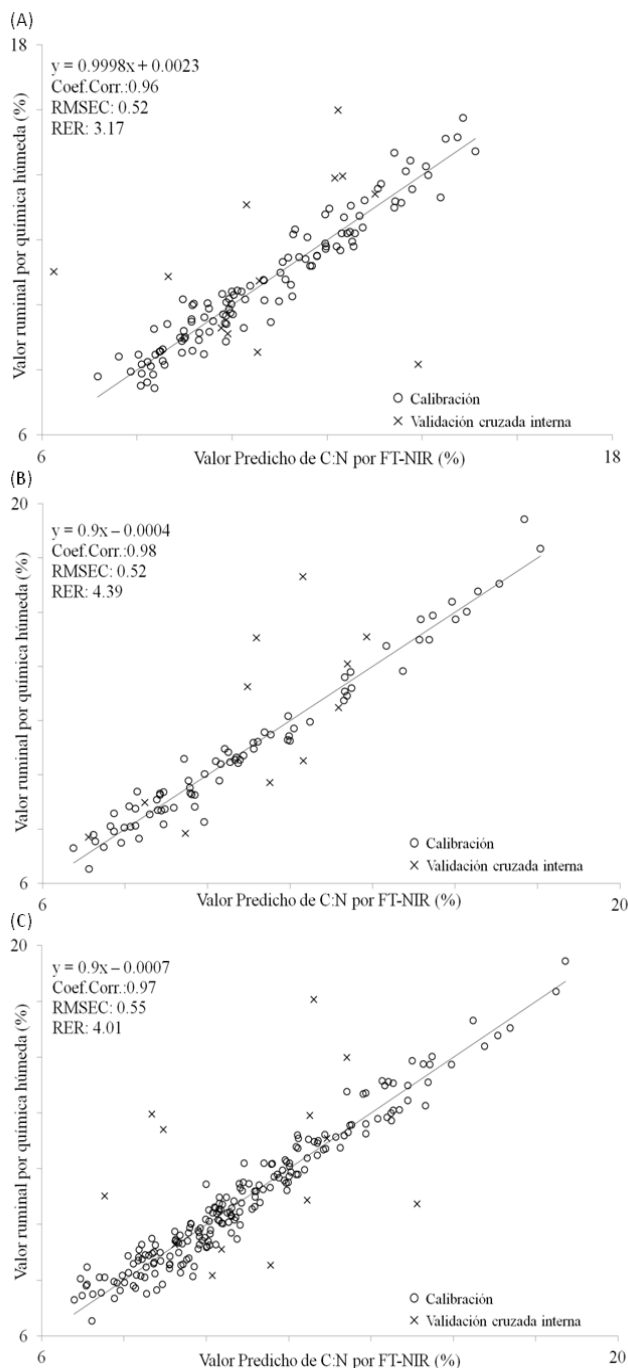


Figura 14: Relación de regresión lineal entre los fecal-FT-NIR valores pronosticados y los valores medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) C:N modelo de calibración del conjunto ciervo rojo (ecuación 20.Cervus). B) C:N modelo de calibración del conjunto gamos (ecuación 22.Dama). C) C:N modelo de calibración de todos los conjuntos de ciervos (ecuación 24.Conjunta).

Tabla 8: Estadísticos de la calibración PLS de las ecuaciones de predicción de C:N para ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y ambas especies conjuntamente. Se usó la segunda derivada y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Coef.Corr.	Región espectral (nm)
19.Cervus	3.69	0.50	2.88	2.18	0.97	1686.9-2376.9
20.Cervus	3.17	0.52	3.35	2.68	0.96	1600-1800.2
21.Dama	4.87	0.97	2.65	3.56	0.94	2500-2200.22
22.Dama	4.39	0.52	2.94	3.36	0.98	1686.9-2376.9
23.Conjunta	4.89	1.59	2.64	3.05	0.80	2190.1-2455.8
24.Conjunta	4.01	0.55	3.22	3.00	0.97	1000-2500

(Ecuación: 20.Cervus, 22.Dama, 24.Conjunta =Ecuaciones de calibración quimiométrica de ciervo, gamo y conjunto de ambas especies respectivamente). El sombreado gris representa a las mejores ecuaciones de las 6 representadas en la tabla.

¹ Valor del error residual

² Raíz media del error estándar de calibración

³ Raíz media del error estándar de predicción

⁴ Raíz media del error estándar de validación cruzada

4.6 Enzimática digestibilidad de la materia orgánica (EDOM)

Las estadísticas de la calibración PLS y los mejores rendimientos de las ecuaciones de EDOM se muestran en la **Tabla 9**. La calidad de los modelos de calibración y la alta correlación de los espectros NIR de las muestras de digestibilidad fueron verificados por un alto coeficiente de correlación de ciervos y gamos de 0,96 - 0.99 (**Tabla 9, Figura 15**). En este caso las ecuaciones de ciervos tuvieron el error estándar más alto de la validación cruzada (RMSECV) y de predicción (RMSEP), en relación con el rango de valores de referencia, por lo que se obtuvo un RER más bajo que en el caso de los gamos y que en la ecuaciones conjuntas (**Tabla 9**).

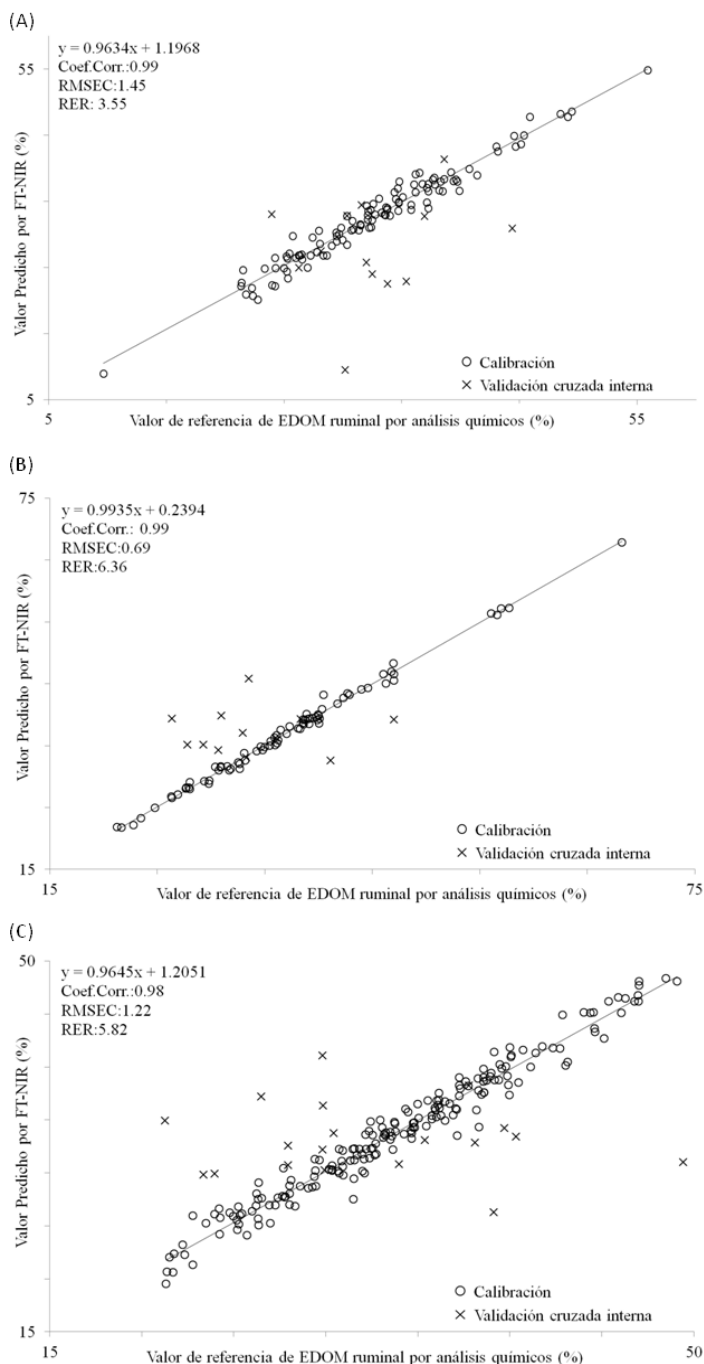


Figura 15: relación de regresión lineal entre fecal-FT-NIR valores pronosticados y los valores EDOM medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) Modelo de calibración EDOM del conjunto ciervo rojo (*Cervus* ecuación 25.). B) modelo de calibración EDOM del conjunto gamos (ecuación 27.Dama). C) modelo de calibración EDOM de todos los conjuntos de venado (ecuación 29.Conjunta).

Tabla 9: Estadísticos de la calibración PLS de las ecuaciones de predicción de EDOM para ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y ambas especies conjuntamente. Se usó la segunda derivada y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Coef. Corr.	Región espectral(nm)
25.Cervus	3.55	1.45	13	20.33	0.99	1000- 2500
26.Cervus	1.86	5.25	24.8	22.59	0.96	2022.6-2416.6
27.Dama	6.36	0.69	7.39	10.89	0.99	1000- 2500
28.Dama	4.86	1.94	9.67	10.26	0.97	2022.6-2416.6
29.Conjunta	5.82	1.22	8.01	8.06	0.98	1000- 2500
30.Conjunta	4.55	1.55	10.3	9.22	0.98	1000- 2500

(Ecuación: 25.Cervus, 27.Dama, 29.Conjunta =Ecuaciones de calibración quimiométrica de ciervo, gamo y conjunto de ambas especies respectivamente). El sombreado gris representa a las mejores ecuaciones de las 6 representadas en la tabla.

¹ Valor del error residual

² Raíz media del error estándar de calibración

³ Raíz media del error estándar de predicción

⁴ Raíz media del error estándar de validación cruzada

4.7 Validación adicional de las ecuaciones predictivas seleccionadas

Se evaluó la exactitud de la predicción de las diferentes ecuaciones de calibración utilizando diferentes muestras no incluidas en el modelo de calibración, estas predicciones se compararon con los valores de las mismas muestras obtenidos de los métodos tradicionales. La **Tabla 10** muestra los resultados estadísticos de las comparaciones entre los valores predichos utilizando las ecuaciones Cervus, Dama y conjuntas y los valores de los métodos tradicionales de los componentes de la dieta ciervos y gamos (ADF, NDF, la lignina, la relación C:N y EDOM). Para la obtención del contenido de ADF en las muestras de ciervo, se utilizó tanto las ecuaciones de la propia especie (1.Cervus), como la de las específicas de gamo (3. Dama) y las conjunta (5.Conjunta) de ambas especies obteniendo resultados fiables de las tres ecuaciones. Lo mismo ocurrió para la determinación de ADF en muestras de gamo utilizando tanto su propia ecuación (3.Dama), la ecuación de ciervo (1.Cervus) como la ecuación conjunta (5.Conjunta). En la comparación de los datos de referencia de NDF con los datos de predicción para ambas especies, se obtuvo el mismo resultado que con la ADF, que no existió diferencias estadísticamente significativas, por lo que se puede predecir tanto las muestras de gamo como de ciervo con cualquiera de las tres ecuaciones seleccionadas para NDF (7.Cervus; 9.Dama; 11. Conjunta). Cuando se comprobó la capacidad de predicción de las ecuación de EDOM para las muestras no incluidas en la calibración de la misma población de cévidos se obtuvo que la predicción de la ecuación conjunta (29.Conjunta) eran buenas, pero las predicciones más precisas se obtuvieron de las ecuaciones específicas de cada

especie (25.Cervus para ciervo y 27.Dama para gamo). Para los los datos resultantes de las ecuaciones de lignina, tampoco hubo diferencias significativas entre los valores de referencia y los valores predichos, por lo que se pueden utilizar indistintamente ya sean muestras de ciervo o gamo cualquiera de los tres tipos de ecuaciones (14.Cervus; 16.Dama; 18. Conjunta). El mejor modelo de calibración para la determinación de la relación de C:N para las muestras de gamo fue la específica de la especie (22.Dama), por el contrario tanto la ecuación de ciervo (20.Cervus) como la ecuación conjunta (24. Conjunta) se pueden utilizar para la predicción indistinta de ambas especies.

Tabla 10. Valores predichos de ADF, NDF, lignina, relación C:N y contenido de EDOM de muestras del rumen de ciervo (*Cervus elaphus*) y gamo (Dama dama) por las ecuaciones NIRS seleccionados. (1, 7, 14, 20 y 25.Cervus = ecuación de calibración quimiométrico de muestras de ciervo; 3, 9, 16, 22 y 27.Dama = ecuación de calibración quimiométrico de muestras de gamo; 5, 11, 18, 24 y 29.Conjunta = ecuación de calibración quimiométrico de muestras de ambas especies).

	ADF				NDF				Lignina				C:N		EDOM	
	n	Ec	media± SD	P-valor	Ec	media± SD	P-valor	Ec	media ± SD	P-valor	Ec	media ± SD	P-valor	Ec	media ± SD	P-valor
Ciervo	22	1	47.8±3.4	0.5 (t=-0.6)	7	64.3±6	0.5(t=-0.7)	14	30.3±2.8	0.5 (t=-0.7)	20	10.2±1.6	0.2(t=-1.2)	25	29.3±9.9	0.2(t=1.3)
		3	45.9±3	0.3(t=0.9)	9	63.9±7.1	0.6(t=-0.5)	16	29.0±2.1	0.5 (t=0.6)	22	11.3±1.6	0.0(t=-3.5)	27	34.5±3.6	0.4(W=36.0)
		5	47.3±3	0.8(t=0.2)	11	61.9±7.4	0.7(t=0.4)	18	30.1±3.1	0.6 (t=-0.5)	24	10.3±1,9	0.2(t=-1.3)	29	33.9±1.3	0.6(W=23.0)
Gamo	21	1	45.8±4	0.35 (t=-0.9)	7	63.7±6.8	0.3(t=-1.1)	14	27.5±2.7	0.0 (t=-1.9)	20	10.9±2	0.2(t=-1.2)	25	29.9±12	0.4(W=-33.5)
		3	43.8 ±3.8	0.7(t=0.4)	9	60.3±10	0.9(t=0.1)	16	27±2.3	0.1 (t=-1.5)	22	10.3±1.7	0.7(t=-0.4)	27	35.2±4.3	0.7(t=-0.4)
		5	45.5±2.9	0.46(t=-0.7)	11	60.6±7.9	0.8(t=0.2)	18	27.1±3.2	0.2 (t=-1.4)	24	10.1±1.6	0.9(t=-0.1)	29	34±0.8	0.1(t=-72)

SD- desviación estandar; Ec- Ecuación; P-valor < 0.05 indica diferencias entre los valores de referencia y los predichos. (t indica el uso de T-test Student, W indica el uso del test no paramétrico de Wilcoxon porque el test de Levene's con p-valor <0.05 indica una diferencia en las varianzas entre los valores comparados.

5 DISCUSIÓN

Las muestras de rumen medidos por análisis de química húmeda de ADF y NDF en ambas especies eran muy similares a los que resultan de los análisis en las cabras (Cerón et al., 1996; Illius et al., 1999) y otras especies de ciervos (Hodgman et al., 1996). Los valores de lignina en las cabras eran inferiores a los encontrados en nuestro estudio, ya que las cabras en las granjas, tienen diferente alimentación que los ciervos de nuestro estudio, porque están en un ambiente cambiante teniéndose que adaptar a la disponibilidad de alimentos en las distintas estaciones. Aunque la variación estacional no se midió, la concentración general de ADF, NDF, y de lignina en rumen fueron menores en gamos que en ciervos, pero la EDOM de ciervo fue menor que los gamos. Esto puede ser debido al hecho de que los ciervos ramonean más que los gamo (Azorit et al., 2012).

El control de la calidad nutricional, el bienestar y la selección de la dieta de los ciervos silvestres son una parte esencial de la gestión de caza desde hace mucho tiempo (Hodgman et al., 1996). Los estudios sobre los índices de la calidad nutricional tales como la variación de fibra en la dieta, así como la eficiencia digestiva también son necesarios para comprender adecuadamente los mecanismos de adaptación en la investigación ecológica (Robbins et al., 1995; Pérez-Barbería et al., 2004; Codron et al., 2007). Pero muchas de las cuestiones ecológicas nutricionales involucran grandes cantidades de muestras de los ciervos silvestres, las cuales son difíciles de obtener en el medio natural. La metodología fecal-NIRS, usando espectros de heces, sin necesidad de análisis químicos de las heces, es una interesante herramienta para la monitorización no invasiva de la calidad de la dieta de los ciervos en el medio natural, permitiendo obtener la cantidad adecuada de datos requeridos en la investigación ecológica. Además, mediante el uso de muestras de rumen, que consisten en la combinación de plantas consumidas por el venado, este estudio, nos permite monitorear directamente la dieta seleccionada por los ciervos.

Hemos desarrollado y validado una metodología de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano, con transformada de Fourier, junto con mínimos cuadrados parciales (PLS) (fecal-FT-NIRS) en las heces, para la evaluación de calidad de la dieta de los cérvidos silvestres españoles. La predicción dietética de ADF, NDF, lignina, relación C:N y EDOM en ciervos y gamos, se pudo lograr a través del análisis NIRS en heces. Los estadísticos de rendimiento de los modelos de predicción (r , RMSEP, RMSEC, RMSECV, RER) son similares a los publicados en la bibliografía, tanto para los rumiantes salvajes y como los domésticos.

El contenido de ADF, NDF, lignina y relación C:N son las propiedades químicas de la dieta y relativamente fáciles de medir. La digestibilidad, por el contrario, es más difícil de determinar, debido a las características e influencia del animal en cuestión; ya que no es sólo un componente químico de la alimentación. Por lo tanto, se deduce que la predicción de la digestibilidad de la dieta con NIRS en heces, sería menos exitosa que la de ADF, NDF, Lignina y relación C:N. Ya que el error inherente asociado con la cuantificación de digestibilidad de la dieta es mayor que la asociada con la fibra de la dieta, la lignina y el nitrógeno. El éxito de una ecuación de predicción NIRS para cualquier constituyente de la dieta dependerá en última instancia de la fiabilidad del método de referencia químico. Esto por supuesto incluye todos los aspectos del proceso, incluido el muestreo, no sólo la técnica química en sí misma.

Las muestras de rumen y heces al ser recogidas directamente del animal, en vez de recolectadas del suelo facilitaron la identificación de las muestras y su conservación, y evitaron la contaminación de estas, así como la degradación de los componentes principales.

La exactitud de las ecuaciones predictivas para fecal-NIRS en comparación con los valores de química húmeda eran buenos, debido al hecho de que todos los modelos dieron valores de coeficientes de correlación mayores a 0,80, tal como se obtiene en cabras (Glasser et al., 2008), considerándose que es excelente (Williams, 2001; Workman, 2001). Además, los bajos valores de RMSECV indicando una precisión satisfactoria, así como el valor obtenido de RMSEC fueron aceptables y el RER en relación con el rango de valores de referencia también indicó la utilidad de Fecal-FT-NIRS para la estimación de parámetros de calidad de la dieta de ciervos y gamos.

La lignina es un componente de la pared celular cuya estructura es muy compleja y variable de acuerdo a la dieta. Se obtuvieron ecuaciones útiles para la determinación de lignina, con errores bajos de calibración que oscilan entre 0,2 y 1,6, menores que los publicados en ciervos por Keating 2005 y con coeficientes de correlación de 0,96 a 0,99, que se consideran excelente (Workman, 2001; Williams, 2001). Estos son superiores a los obtenidos en los pastos (Pullanagari, 2011) y en los forrajes ingeridos por las ovejas (Fanchone et al., 2007), pero similar a la acacia (Yao et al., 2010) y otras determinaciones de lignina en leñosa (Hodge y Woodbridge, 2004). Los valores de RMSEP y de RMSECV fueron ligeramente superiores a los de estudios similares, pero dentro de unos límites aceptables (Dryden, 2003).

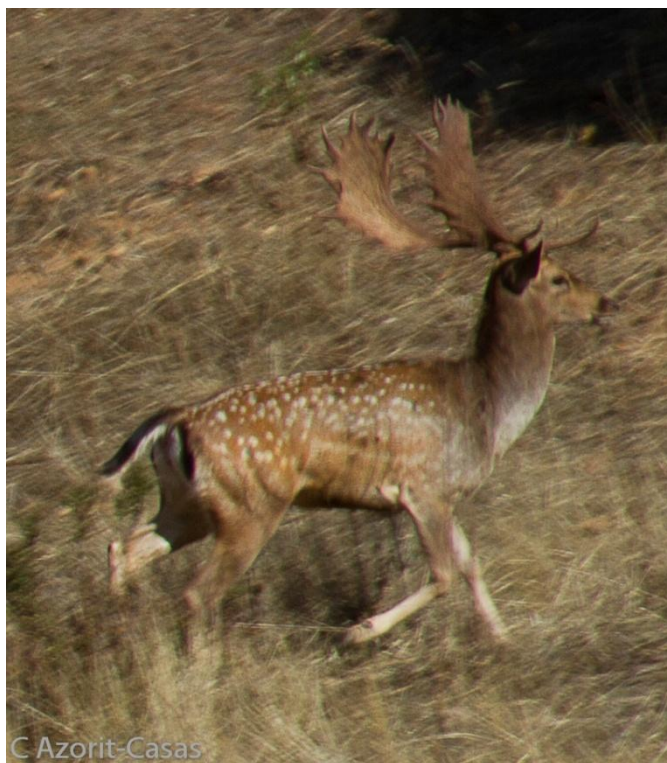
El grado de exactitud y precisión obtenida con fecal-NIRS, para la medición de ADF, NDF, lignina, relación C:N y EDOM en ciervos y gamos, indica que esta técnica podría ser empleada para

obtener evaluaciones en tiempo real tanto de nutrientes, como del estado de los animales y de la calidad de los recursos del forraje.

Aunque se ha encontrado en estudios anteriores incompatibilidades para los modelos de predicción entre especies (Aufrère et al., 1996), nuestras ecuaciones, que combinan tanto muestras de ciervos como de gamos, fueron útiles para la determinación de ADF, NDF, lignina, relación C:N y EDOM en ciervos y gamos a la vez, obteniendo de este modo un único modelo para obtener los valores de ambas especies. Por otra parte, las ecuaciones obtenidas para las predicciones de las muestras de ciervos también se aplicaron con éxito a gamos y viceversa, siendo corroborado por una validación externa, que determinó correctamente las muestras nuevas que no se habían incluido en el conjunto de calibración. En cuanto a los indicadores de calidad estadísticos, las ecuaciones pueden ser clasificados como buenas para el cribado de muestras y control de calidad (Millmier et al., 2000), y lo suficientemente buenas para las determinaciones precisas con el fin de controlar las variaciones en la dieta de cérvidos mediterráneos.

6 IMPLICACIONES

La calibración de las muestras fecales con un espectrómetro de reflectancia infrarroja (NIRS) requiere tiempo, experiencia, y un gran número de muestras con los valores de referencia conocidos con precisión y fiabilidad para cada parámetro analizado. Sin embargo, excepto por el costo inicial de la adquisición de equipos NIRS, el análisis de muestras no es caro. Una vez validado por indicadores estadísticos e incluso por una verificación externa de la capacidad de las ecuaciones de calibración para predecir nuevas muestras de las mismas poblaciones de ciervos, Fecal-FT-NIRS parece ser una herramienta no invasiva para vigilar las variaciones de la calidad de la dieta de dos especies de cérvidos. Permitiendo un rápido análisis de grandes cantidades de muestras fecales, esta técnica debe ser considerada de interés para ser utilizada en el control de las investigaciones ecológicas de ciervos mediterráneos.



4.2 Validación de CWD: Art 2 Un análisis integral para cuantificar la calidad nutricional de la dieta seleccionada de dos cervidos silvestres mediterráneos por FECAL-FT-NIRS

Tellado S, Azorit C. 2014. An integrative assay to quantify the nutritional quality of the selected diet of two Mediterranean free-living deer by Faecal-FT-NIRS. *Animal Production Science*. 55(1) 11-16.

1 RESUMEN

La integración de la interacción entre los componentes de la pared celular como es la relación entre lignina y NDF, como índice de digestibilidad de la pared celular (CWD), proporciona un método adecuado para la estimación de la calidad de la dieta y de la digestibilidad de la fibra. Se desarrollaron ecuaciones predictivas fecal-FT-NIRS útiles para la determinación de CWD como una evaluación integral de la digestibilidad y la calidad de la dieta seleccionada por ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y gamo (*Dama dama*) en el sur de España. Se utilizó una regresión quimiométrica de mínimos cuadrados parciales (PLS) a partir de los espectros de las heces y el análisis químico del contenido del rumen, como datos de referencia. Se evaluaron la precisión y la fiabilidad de las ecuaciones obtenidas para las muestras de ciervos y gamos por separado, así como de todas las muestras de ambas especies conjuntamente. Las ecuaciones predictivas tenía una alta linealidad con coeficientes de correlación (r) que oscilaban entre 0.89 y 0.99, así como una precisión fiable teniendo en cuenta los errores de predicción (RMSEP = 0.57 – 0.87), de calibración (RMSEC = 0.04-0.45) y de validación cruzada (RMSECV = 0.80-1.12), en relación con el rango de valores para el que se establecieron las calibraciones NIRS para cada parámetro, dando índices RER muy buenos, de 7.44 a 13.23. También se evaluó mediante una validación externa, la capacidad de las ecuaciones de calibración para predecir nuevas muestras de las mismas poblaciones de cérvidos. Las ecuaciones obtenidas de los datos de ciervo no sólo fueron aplicadas con éxito para predecir las muestras de ciervos, sino también de gamos, y viceversa. También obtuvimos una determinación viable de CWD para ciervos y gamos usando las ecuaciones conjuntas de ambas especies. Analizamos la variación del índice de CWD durante todo el año y las diferencias entre especies, así como la utilidad de este índice para monitorear la calidad de la dieta en ambientes mediterráneos.

2 INTRODUCCIÓN

La evaluación de la composición nutricional de las plantas es uno de los grandes temas de interés en la ecología, la gestión de la vida silvestre y la investigación sobre adaptación evolutiva, siendo más complicado cuando el control de la calidad nutricional de la dieta seleccionada es para rumiantes silvestres.

Dado que los diferentes componentes de las paredes celulares vegetales determina la digestibilidad del forraje y la calidad de la dieta, Van Soest y colaboradores desarrollaron un sistema para la caracterización de la porción fibrosa del forraje tales como fibra neutro detergente

(NDF), que representa las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de la pared celular de la planta (Van Soest, 1963; Van Soest y Wine, 1967). En primer lugar, el contenido de lignina se correlacionó con la digestibilidad total de la fibra (Jung y Deetz, 1993; Van Soest, 1994), siendo la digestibilidad en los rumiantes, en su mayoría, correlacionada inversamente con la cantidad de lignificación (Hatfield y Fukushima, 2005). Por lo tanto, la digestibilidad de la fibra de la planta se esperó que disminuyera con el aumento de lignificación (Robbins, 1995; Van Soest, 1994; Meissner et al., 1999), de modo que la evaluación de la interacción entre los componentes de la pared celular a través de la lignina y NDF, como índice que representa la digestibilidad de la pared celular (CWD), puede proporcionar un método adecuado para la estimación de fibra digestible y calidad de la dieta de los rumiantes (Pérez-Barbería et al., 2004). Cuanto mayor sea la relación lignina / fibra neutro detergente, menor será la digestibilidad de la pared celular del forraje. La CWD ha sido utilizado con éxito como un índice de digestibilidad apropiado para ser comparado con otros enfoques similares, tales como digestibilidad de la materia seca (Codron et al., 2007).

Sin embargo, el análisis de lignina y NDF ha implicado tradicionalmente técnicas basadas en química húmeda que requieren grandes cantidades de productos químicos peligrosos, como ácido sulfúrico concentrado (Van Soest et al., 1991). Siendo estas técnicas laboriosas, ya que requiere mucho tiempo, dinero y no es adecuado para la investigación ecológica que necesita el estudio de grandes cantidades de muestras. Por el contrario, la técnica de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) es de bajo costo, libre de químicos, rápido y finalmente es un análisis no destructivo para las muestras analizadas (Landau et al., 2004). Por otra parte, el método de espectroscopía de reflectancia de infrarrojo cercano se ha considerado no sólo en la nutrición del ganado, sino también en ecología y gestión, después del establecimiento de la posibilidad de predecir los atributos químicos de la dieta por "fecal-NIRS", analizándose los espectros de infrarrojo cercano de las heces (Lyon y Stuth, 1992). Las ecuaciones predictivas NIRS de las heces se obtienen a través de la regresión multivariante de los datos de la química de referencia realizados en la dieta y los espectros obtenidos de las heces. Una vez validados, las ecuaciones de predicción son una herramienta adecuada, no invasiva de monitorización en el manejo de la vida silvestre (Tolleson et al., 2005). La espectroscopía en el infrarrojo cercano también ha sido ampliamente aplicada en la nutrición de ciervo (Dryden, 2003), pero no hay información disponible sobre el uso de estas técnicas en muestras fecales para predecir la calidad de la dieta del ciervo silvestres españoles. Estos procedimientos deben ser validados y estandarizados cada vez que se utilizan con nuevas especies, otras ubicaciones o equipos diferentes.

En este artículo se desarrollan ecuaciones predictivas fecal-NIRS útiles para la determinación de CWD como una evaluación integral de la digestibilidad y la calidad de la dieta seleccionada por ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y gamo (*Dama dama*) en el sur de España. Se evalúa la precisión y la viabilidad de las ecuaciones obtenidas para las muestras de ciervos y gamos por separado, así como de todas las muestras de ambas especies juntas. Se discuten los intereses de esta técnica en la investigación de la fauna mediterránea y de gestión, así como la variación del índice de CWD durante todo el año y las diferencias entre las especies de ciervo.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Muestreo y área de estudio

El material consistió en muestras del contenido de rumen y de las heces ($n = 260 \times 2$) de 149 ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) y 111 gamos (*Dama dama*), cazados durante la temporada de caza 2008-9 en Lugar Nuevo (LN), en una finca oficial cerrada situada en el Parque Natural Sierra de Andújar, sureste de España ($38^{\circ} 9'N 4^{\circ} 3'W$). Los animales estaban comiendo en el momento de ser abatidos y se recogieron 250 g de contenido de rumen recientemente consumido y 5-10 g de heces directamente cogidas del recto inmediatamente después. Tal como lo plantea Djordjevic et al. (2006), sólo se tomaron muestras de los ciervos con contenido del rumen no macerado. Todas las muestras se mantuvieron en condiciones de refrigeración con refrigeradores de campo y luego a $-20^{\circ}C$ hasta su posterior estudio de laboratorio.

3.2 Análisis químico del contenido ruminal y determinación CWD

La fibra neutro detergente fue estimada (NDF) por el método de Van Soest y Wine (1967). En pocas palabras: se pesó 1 g de contenido ruminal seco para cada análisis, que se trató con 100 ml de solución de neutro detergente y 5 gotas de decahidronaftaleno (decalina), que actuó como un agente antiespumante. La muestra se sometió a ebullición durante una hora y luego se filtró mediante vacío a través de una placa porosa de vidrio tarado, se lavó varias veces con agua caliente y a continuación con acetona, secándolo a $105^{\circ}C$ hasta peso constante.

Para la determinación de lignina se utilizó el método desarrollado por la norma Tappi T222 om-88 (1998). En este método, la lignina se define como el componente insoluble en una solución de ácido sulfúrico al 72%. Para este método pesamos 1 g de rumen seco que se trató con 15 ml de ácido sulfúrico al 72% durante 2 h, esta etapa de hidrólisis primaria le siguió una hidrólisis

secundaria donde se diluyo el ácido con agua dejándolo al 1,88%, durante 4 h, en ebullición con reflujo, para mantener un volumen constante. Transcurrida esta hidrólisis el material insoluble (lignina) se dejó precipitar durante 1 h, pasándolo posteriormente a través de una placa porosa revestida con lana de vidrio. Por último, la lignina se secó en un horno a 105 °C hasta que se obtuvo un peso constante, este residuo insoluble seco representó el contenido de lignina.

La lignina es un componente no-carbohidratado de la pared celular cuya estructura es muy compleja, y variable. De los diversos tipos de métodos disponibles para determinar la lignina en las muestras de plantas, ninguno se le puede considerar un método estándar inequívoco para todas las muestras (Brinkmann et al., 2002). También es prácticamente imposible extraer la lignina en forma pura debido a su naturaleza química (Hatfield y Fukushima, 2005). El contenido de lignina se mide con el método de Klason porque tiene una buena correlación con el contenido de lignina determinado por métodos directos como la pirolisis analítica en elementos leñosos (Alves et al., 2006), siendo el método de análisis más ampliamente aceptado para determinar el contenido de lignina en componentes leñosos (Carrier et al., 2011). Elegimos este método de ácido sulfúrico en lugar del método de lignina ácido detergente (ADL), debido al alto contenido de elementos leñosos en la dieta de los ciervos, ya que son ramoneadores durante los largos períodos de restricción alimenticios de herbáceas (Bugalho y Milne, 2003; Azorit et al., 2012).

Por último, se calculó el índice de digestibilidad de la pared celular como:

$$CWD = 100 - \left(\frac{\text{LIGNINA}}{\text{NDF} \times 10} \right)$$

Esta ecuación varía ligeramente de la utilizada por Codron et al. (2007), ya que se usó la lignina Klason en vez de la ADL. Por lo tanto, a mayor índice de CWD, menor será la digestibilidad de la pared celular del forraje seleccionado por los ciervos. Los niveles más altos de hemicelulosa y celulosa en relación con el contenido de lignina, dan altos índices de CWD, mientras que un mayor contenido de lignina en relación con la hemicelulosa y celulosa da valores inferiores de CWD.

3.3 Colección de datos espectrales

Las muestras fecales fueron liofilizadas, a continuación, se secaron hasta obtener peso constante en un horno a 60 °C. Cada muestra se molió con un molino, controlando una distribución uniforme del tamaño de partícula, porque este tiene un gran efecto sobre los espectros de NIR (Casler y Shenk, 1985; Windham, 1987), más incluso que la finura de las

partículas (Dryden, 2003; Shenk y Westerhaus, 1993a, 1993b). Hemos adquirido espectros usando un espectrómetro de reflectancia en el infrarrojo cercano con una transformada de Fourier, FT-NIR Antaris (MDS) equipada con una esfera integradora con eficacia por encima de 95% y un detector de InGaAs para trabajar en la región de 12000- 3800 cm^{-1} (833-2630 nm). Las muestras se analizaron en el rango de longitud de onda de 4000-10000 cm^{-1} (1000-2500 nm). Después de cada medición, el cristal del muestreador donde se colocó la muestra, se limpió con agua destilada y después, se secó cuidadosamente. El número de exploraciones se optimizó en 160 exploraciones, para tener una relación adecuada de señal-ruido.

3.4 Análisis quimiométricos

Las ecuaciones se obtuvieron de muestras de ciervos y gamos por separado y después de ambas especies conjuntamente. Previamente al análisis quimiométrico, se verificó la normalidad y homocedasticidad de los datos de referencia ruminales utilizando el programa SPSS Statistics 17.0. Los datos espectrales y del análisis quimiométrico para la calibración PLS se procesaron usando TQ Analyst 6.1.1 y el software de Thermo Nicolet Corp. Para la regresión PLS se utilizó los espectros fecales y los análisis químicos ruminales de referencia. Se realizaron diferentes calibraciones con diferentes regiones espectrales y pre-tratamientos matemáticos del espectro tales como primera y segunda derivada, buscando el modelo con los mejores índices de ajuste, con los valores más altos de coeficiente de correlación (r) y con los más bajos de la raíz media del error estándar de calibración (RMSEC). La capacidad predictiva del modelo de calibración, así como su precisión se evaluó mediante el cálculo de la raíz media del error estándar de la validación cruzada (RMSECV), y el error estándar de predicción (RMSEP). Estos indicadores estadísticos son adimensionales, lo que significa que se pueden comparar en las mismas condiciones entre los diferentes modelos (AACC, 1999; Feam, 2002). El RMSECV representa la variabilidad en la diferencia entre los valores predicho y de referencia cuando la ecuación se aplica secuencialmente a los subconjuntos de datos de los datos de calibración (Naes et al., 2002). Todos estos indicadores se consideraron en relación al rango de valores para los que se creó las ecuaciones de calibración NIRS. A continuación, se utilizó el valor de error residual (RER) que es el rango / RMSEP. Siendo considerada la calibración como aceptable para el cribado de la muestra con los valores de $\text{RER} \geq 4$, para el control de calidad cuando el rango de RER está entre 8 al 12, y si $\text{RER} \geq 12$ la calibración es bueno incluso para la cuantificación exacta (Millmier et al., 2000).

3.5 Validación extra de los modelos de calibración

Finalmente, las mejores ecuaciones fueron probados mediante la predicción de valores del "conjunto de datos independientes", que constó de 22 ciervos y 21 gamos cuyas heces fueron escaneadas relacionándolas con sus correspondientes muestras ruminales, para los cuales también se conocían los datos de composición. Los resultados de CWD determinado por las ecuaciones se compararon con los resultados de los análisis químicos, a través de comparaciones estadísticas utilizando el programa SPSS 17.0. De esta manera se evaluaron para la determinación de CWD la utilidad de las ecuaciones de predicción conjuntas para ciervos y gamos, así como las ecuaciones específicas para cada especie. Además, las ecuaciones obtenidas para la determinación de CWD a partir de los datos de ciervos también se aplicaron a gamos y viceversa.

4 RESULTADOS

4.1 CWD de contenido ruminal y espectro fecal FT-NIRS

La **Figura 16** muestra el espectro de infrarojo cercano con la transformada de Fourier de las heces de ciervos y gamos. Los picos espectrales en esta figura indican la absorbancia a unas longitudes de onda determinadas. La **Tabla 11** muestra el contenido de CWD de las muestras ruminales de ciervos y gamos determinados por los análisis químico que se utilizan para ambas calibraciones quimiométricas ($n = 217$) y para la validación adicional ($n = 43$). La **Figura 17** muestra la variación específica y mensual de los valores de CWD determinados a partir de las muestras del contenido ruminal que se basa en la combinación de las plantas que comen los ciervos y gamos. Estos conjuntos de muestras, seleccionados aleatoriamente de una población natural a lo largo de todo el año, tenían una distribución normal de los datos y un amplio rango de valores apropiados para calibraciones NIRS. Los conjuntos de datos de la validación tenían medias y SD similares al conjunto de datos completo, y la variabilidad en la concentración de los parámetros en las muestras también se consideran adecuados para la validación adicional.

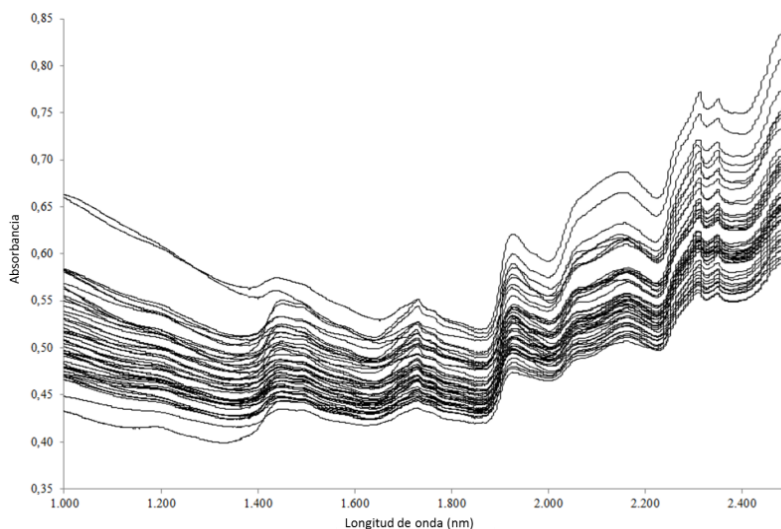


Figura 16: Espectro de infrarrojo cercano con transformada de fourier de muestras fecales de ambos cervidos.

La media global de CWD fue $95,28 \pm 1,09$, pero el gamo mostró mayor CWD que el ciervo (95.58 y 95.05 respectivamente, $F_{1,11} = 30.26$, $p = 0,000$). No hubo diferencias significativas entre meses. Pero se encontró variación en el índice CWD, el cual es más bajo en enero y febrero (94.12 y 94.21 respectivamente), y alcanzando los valores más altos en julio y agosto (96.03 y 96.12, respectivamente) en ambas especies ($F_{1,11} = 18.34$, $p = 0.00$).

Tabla 11: CWD (% w / w) de ciervo (*Cervus elaphus*) y de gamo (*Dama dama*) muestras del rumen medido mediante análisis químico húmedo que se utiliza como referencia para calibración PLS y la validación externa de las ecuaciones obtenidas.

		CWD		
	N	mín-máx	media± SD	rango
Usado en calibración quimiométrica y validación cruzada interna				
Ciervo	127	87.92-97.36	95.05±1.17	9.44
Gamo	90	92.75-97.39	95.58±0.88	4.64
Usado en validación externa adicional				
Ciervo	22	93.53-96.37	95.25±0.78	2.84
Gamo	21	93.34-96.96	95.68±0.77	3.62
Total	260	87.92-97.4	95.28±1.09	9.47

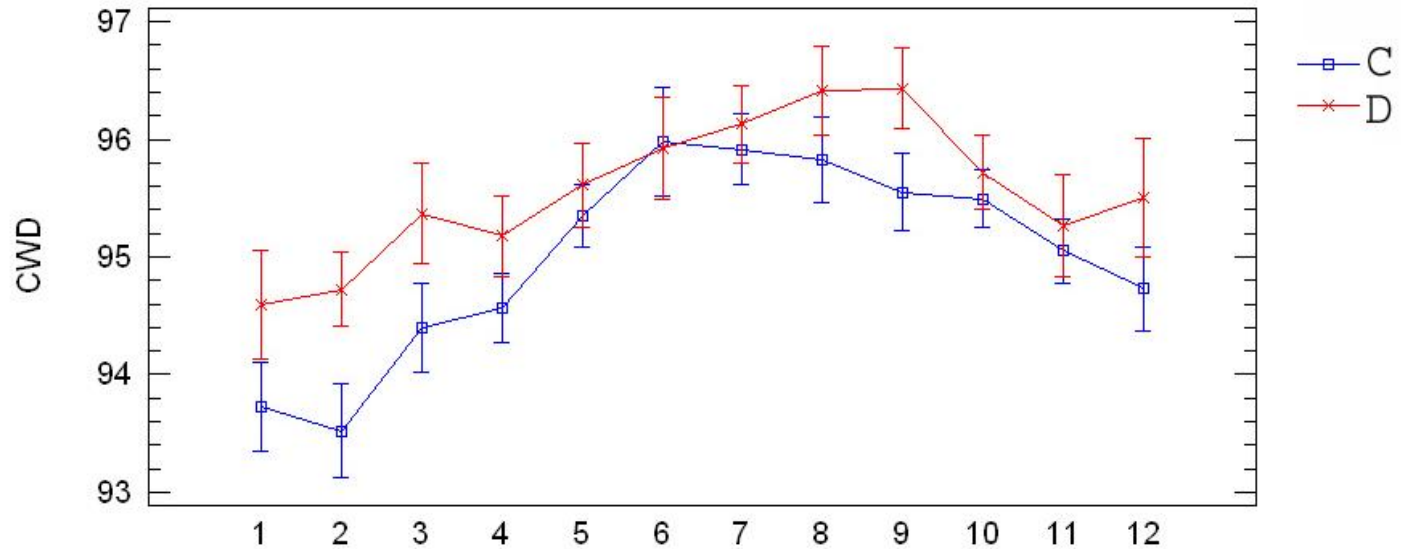


Figura 17: Los valores CWD de contenido ruminal, a lo largo del año, que consiste en la combinación de plantas que comen los ciervos (C) y gamos (D) en Lugar Nuevo, un ambiente mediterráneo del sur de España. (1 = Enero; 2 = Febrero; 3 = Marzo; 4 = Abril; 5 = Mayo; 6 = Junio; 7 = Julio; 8 = Agosto; 9 = Septiembre; 10 = Septiembre; 11 = Noviembre; 12 = Diciembre)

4.2 La mejor ecuación para la determinación de CWD

La **Tabla 12** muestra las estadísticas de calibración PLS y el rendimiento de las mejores ecuaciones de predicción de CWD. Las ecuaciones seleccionados tenían una alta linealidad con coeficientes de correlación (r) que oscilan entre 0.89 y 0.99, y una precisión fiable con errores de predicción (RMSEP), calibración (RMSEC) y calibración cruzada (RMSECV) cercanos a las desviaciones estándar de los datos de referencia de las muestras para los cuales se estableció la calibración NIRS, así como su rango. El RMSEP son muy similares a la RMSECV y el índice RER varió desde 7.44 hasta 13.23 (**Tabla 12, Figura. 18**). Las ecuaciones Cervus y la ecuación 5.Conjunta pueden incluso ser lo suficientemente buenas para la cuantificación exacta (**Tabla 12**). Como muestra la **Tabla 13**, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la CWD determinada para ambas especies por las diferentes ecuaciones de predicción, y entre los valores de referencia de CWD (véase también la **Tabla 11**). El índice de CWD se determinó con precisión, tanto usando la ecuación conjunta como las ecuaciones específicas y encontramos que la determinación de CWD en una especie (ciervo o gamo) mediante la ecuación de predicción construido a partir de la otra especie, no sólo es viable, sino precisa.

Tabla 12: Estadísticos de calibración PLS de las ecuaciones predictivas para CWD de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y las dos especies conjuntas, utilizando segunda derivadas y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Coef. Corr.	Región espectral(nm)
1.Cervus	13.17	0.07	0.72	0.89	0.99	1000-2500
2.Cervus	12.26	0.12	0.77	0.96	0.99	2449.18-1286.50
3.Dama	8.19	0.04	0.57	0.91	0.99	1374.76-2223.70
4.Dama	7.44	0.07	0.62	0.80	0.99	2449.18-1286.50
5.Conjunta	13.23	0.45	0.72	1.12	0.89	2083.33-2500
6.Conjunta	10.91	0.28	0.87	1.11	0.96	1374.76-2223.70
7.Conjunta	11.29	0.30	0.84	0.99	0.95	2449.18-1286.50

(Ecuación: 2.Cervus =Ecuación de calibración quimiométrica de muestras de ciervo; 4.Dama= Ecuación de calibración quimiométrica de muestras gamo; 7.Conjunta= Ecuación de calibración quimiométrica de muestras de ambas especies).

¹ Valor del error residual

² Raíz media del error estándar de calibración

³ Raíz media del error estándar de predicción

⁴ Raíz media del error estándar de validación cruzada

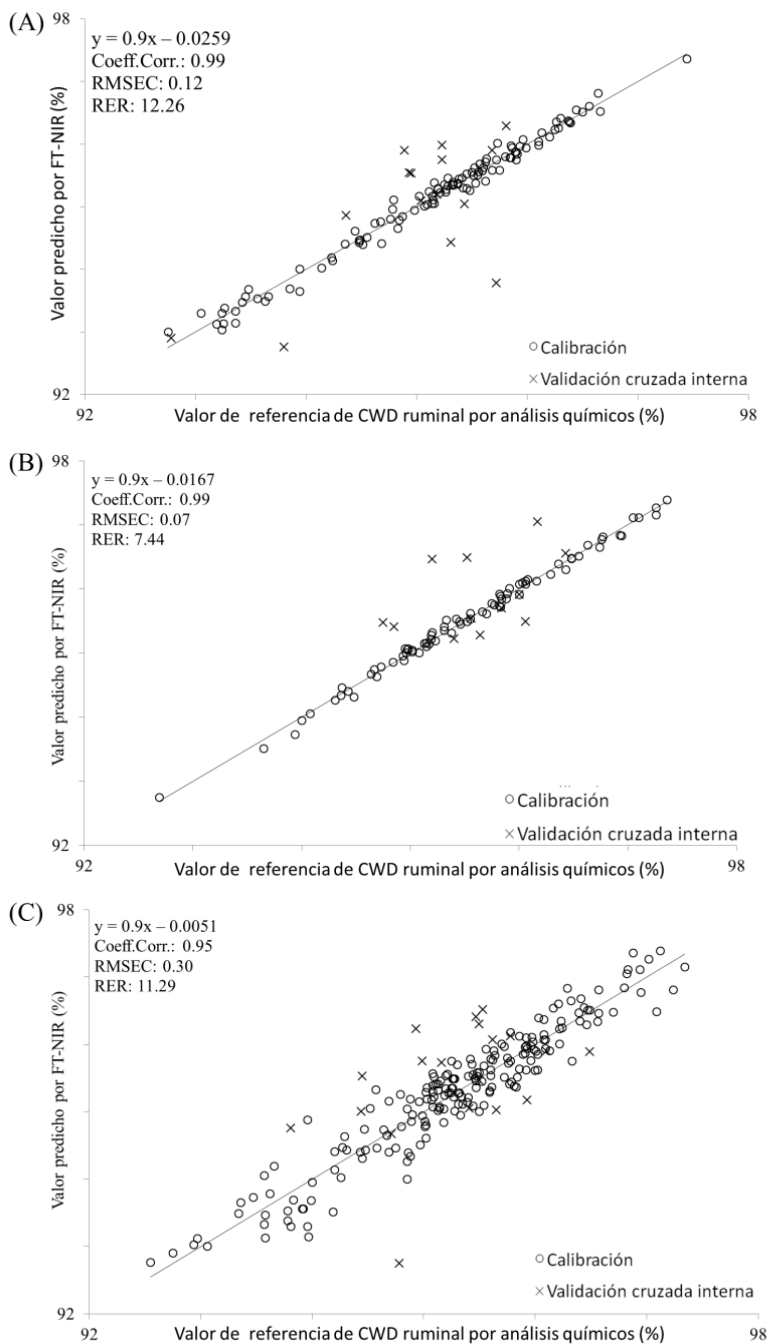


Figura 18: Relación de regresión lineal entre Fecal-FT-NIR y los valores medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) modelo de calibración de CWD para ciervo (ecuación 2.Cervus). B) modelo de calibración de CWD para gamo (ecuación 4.Dama). C) modelo de calibración de CWD para ambos cérvidos (ecuación 7.Conjunta).

Tabla 13: Valores Predichos del contenido de CWD de muestras de rumen de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y gamo (*Dama dama*) por las ecuaciones NIRS seleccionados (2.Cervus = ecuación de calibración quimiométrico de muestras de ciervos; 4.Dama = ecuación de calibración quimiométrico de muestras gamos; 7.Conjunta = ecuación de calibración quimiométrico de ambas muestras de cérvidos).

		CWD			
	n	Ecuación	mín-máx	media± SD	P-valor
Ciervo	22	2.Cervus	94.53-96.42	95.29±0.54	0.85(t=-0.19)
		4.Dama	93.94-96.95	95.28±0.63	0.47(t=-0.73)
		7. Conjunta	94.38-96.14	95.38±0.44	0.82(t=-0.23)
Gamo	21	2.Cervus	94.39-96.47	95.46±0.58	0.70(t=-0.38)
		4.Dama	94.43-96.53	95.76±0.50	0.49(t=0.70)
		7. Conjunta	94.71-96.54	95.54±0.50	0.29(t=1.06)

P-valor < 0.05 indica diferencias entre los valores de referencia y los predichos.

5 DISCUSIÓN

En el sur de España, el pastizal que contribuye como recurso forrajero se ha derivado de los bosques naturales del Mediterráneo después de la eliminación de los árboles y la cubierta de arbustos. El bosque inicial se convierte en el paisaje sabana de la Península Ibérica conocido como "dehesas". Especialmente en esta área, debería ser investigado la relación entre los atributos nutricionales de las plantas y la selección de alimentos, para proporcionar una mejor evaluación de la conducta alimentaria, para conocer las diferencias en la explotación del hábitat, la interacción social, la repartición de recursos y el impacto de los animales en la vegetación (Azorit et al., 2012). Se encontró que la digestibilidad de la dieta seleccionada por los cérvidos varía entre especies y estación, y esta variación fue coherente con la disponibilidad y la dieta consumida. En el área de estudio, el material de planta verde en el estrato de hierba suele estar disponible de mayo a junio, convirtiéndose en forraje y pasto seco en verano, y la nueva producción de la planta verde y hierba suele estar disponible de nuevo en invierno después de las lluvias de otoño. Pero el estrato arbustivo (arbustos y vegetación leñosa ricos en componentes estructurales y lignina) es también una importante fuente de alimento para la dieta de venado, sobre todo en verano y en invierno, donde el ciervo es más ramoneador que el gamo. En este período de restricción, al final del invierno, los recursos son escasos y los ciervos se comportan como ramoneadores (Azorit et al., 2012), por lo que se puede esperar una menor digestibilidad del contenido ruminal debido a un alto nivel de lignina en relación con otras fibras como celulosa y la hemicelulosa. Así encontramos

un explicable índice CWD más alto en gamo que en ciervos, así como un menor índice CWD en enero y febrero en las dos especies.

Por el contrario, al final del verano, cuando el forraje y pasto seco suponer un 75-92% de la dieta (Azorit et al., 2012), los valores más altos de CWD en julio y agosto puede estar en relación con un mayor porcentaje de celulosa la cual es la porción de la fibra "digerible" de la pared celular de las plantas. Nuestros datos muestran los niveles más altos de hemicelulosas en agosto siendo niveles similares a los encontrados en verano en el área mediterránea por Zarovali et al. (2007), mientras que los niveles más bajos de hemicelulosas se encontraron en enero (Tellado et al., en revisión).

En resumen, los índices de CWD varían a lo largo del año y entre especies de cérvidos en relación con una variación en la composición botánica de la dieta consumida. Al final del invierno la dieta fue la menos digestible para ambas especies, y los ciervos consumieron una dieta significativamente más indigerible que los gamos. Las diferencias en la composición de la dieta han sido consideradas como posibles fuentes de incompatibilidad para los modelos de predicción entre especies (Aufrère et al., 1996). Sin embargo, se encontró buenos modelos de calibración donde la RMSEP en todos los casos son muy similares a la RMSECV, y el índice RER alcanzó valores superiores a 12 considerándose la calibración aceptable no sólo para el control de calidad, sino incluso excelente para la cuantificación exacta (Millmier et al., 2000). Además, nuestro ensayo llamado "validación externa" corroboró la determinación correcta de las nuevas muestras de heces a través de las ecuaciones de predicción de CWD en todos los casos. Las ecuaciones conjuntas construidas a partir de muestras de las dos especies combinadas fueron útiles para la determinación de CWD en ciervos y gamos simultáneamente, y las ecuaciones obtenidas para los datos de los ciervos fueron también aplicado con éxito no sólo en ciervo, sino también en la determinación de CWD de gamos.

La composición química de los residuos no digeridos es probable que se correlacione estrechamente con la composición química de la dieta consumida, de manera que las heces deberían contener información sobre las características de la dieta (Coleman et al., 1993). Los índices fecales de la calidad de la dieta pueden ser herramientas útiles para investigar sobre la ecología, comportamiento y manejo de la vida silvestre. Sin embargo, puesto que las heces consisten en residuos de la alimentación, de tejidos de la planta y componentes de origen microbiano y animal, su composición química está más influenciada por la fisiología digestiva del

rumiante, que de la composición química de la dieta ingerida. La heterogeneidad en la composición fecal probablemente refleja la variedad de capacidades digestivas existentes, tan distintas en algunos aspectos debido a las diferencias fisiológicas entre los animales, tales como la estructura, la naturaleza de la flora microbiana y la velocidad de paso por el intestino (Van Soest, 1994). Por lo tanto, las comparaciones directas de los atributos fecales de especies con diferentes capacidades digestivas no debería ser llevado a cabo debido a que estos no proporcionan información útil sobre los componentes de la dieta (Leslie et al., 2008).

La ecuación de predicción NIRS evita estas variaciones inter o intra-específica en la composición fecal causada por diferentes mecanismos digestivos de los ciervos ya que las metodologías NIRS fecal se integran por la regresión de los datos de referencia químicos realizado en un material (dieta ingerida) y espectros obtenidos de otro material como son las heces (sin la necesidad de la determinación de la composición química fecal). Mediante el uso de muestras de contenido ruminal, que consisten en la combinación de plantas consumidas por los cervidos de este estudio, podemos controlar directamente la dieta seleccionada por los ciervos. La integración de las dietas de forma independiente a las capacidades digestivas, permite hacer comparaciones directas de la dieta de las dos especies de venados.

La metodología Fecal-NIRS utilizando espectros de las heces, sin la necesidad de realizar análisis químico húmedo de las heces, es una interesante herramienta para la monitorización no invasiva de la calidad de la dieta en los cervidos mediterráneos. El enfoque multifactorial obtenido en este estudio mejora el control de las variaciones intraespecíficas en la dieta, la calidad de la dieta y la eficiencia digestiva convirtiéndose en una buena herramienta, permitiendo el estudio de la calidad de la dieta seleccionada simultáneamente en dos especies de venado a través de las heces. Pero nuestras ecuaciones son capaces de determinar la digestibilidad de la dieta seleccionada en lugar de la eficiencia de la digestión o la fisiología de cada venado. Hay que tener en cuenta que la digestibilidad de la dieta de los rumiantes no es sólo una característica de la dieta consumida sino que está determinada por factores que cambian (fermentación ruminal y la retención de volumen) dentro del sistema gastrointestinal de ese animal en particular. La velocidad de la digestión puede aparecer como una respuesta a la conducta alimentaria y (o) la dinámica de fluidos en el tracto gastrointestinal. Un mejor conocimiento de las posibles diferencias de capacidades anatómicas y fisiológicas de los procesos gastrointestinales entre las especies de cérvidos también sería un interesante foco de estudios futuros para la utilización eficiente de los pastizales.



4.3 Validación de Celulosa, hemicelulosa y azúcares: Art 3 Uso de NIRS como una herramienta no invasiva para la evaluación de compuestos de la dieta en dos especies de ciervos mediterráneos

Tellado S., Puentes J. G., Orpez R., Azorit C. (en revisión). NIRS as a non-invasive tool for assessing dietary compounds in two Mediterranean deer species. Archives of Animal Nutrition

1 RESUMEN

Desarrollamos unas ecuaciones predictivas, mediante un espectrómetro de infrarrojo cercano en heces (fecal-FT-NIRS), útiles para la determinación de celulosa, hemicelulosa y de azúcar con el fin de evaluar la calidad nutricional de la dieta seleccionada de 127 ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) y 90 gamos (*Dama dama*) en el sur de España. Para ello, utilizamos una regresión quimiométrica, de los espectros de las heces y de los análisis de química húmeda del contenido del rumen, como datos de referencia, junto a un ajuste de mínimos cuadrados parciales (PLS). Evaluamos la precisión y la viabilidad de las ecuaciones obtenidas para las muestras de ciervos y gamos por separado, así como conjuntamente de las muestras de ambas especies. Las ecuaciones predictivas, tenían una alta linealidad con coeficientes de correlación (r) que oscila entre 0,87 y 0,99, así como una exactitud fiable teniendo en cuenta los errores de predicción (RMSEP = 4,01-15,90), de calibración (RMSEC = 0,27 a 2,85) y de la validación cruzada (RMSECV = 5,25-14,83). En relación con el rango de valores para los que se creó la calibración NIRS para cada parámetro, dio muy buenos índices de RER 2,58-6,97. También obtuvimos determinaciones simultáneas útiles en ciervos y gamos usando las ecuaciones conjuntas.

2 INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los hábitos de alimentación y adaptaciones morfológicas para digerir la fibra, los ciervos y gamos se han clasificado en el grupo de rumiantes de “consumidor intermediario” (Hofmann, 1985). Los consumidores intermediarios se adaptan a los cambios estacionales, a la cantidad y la calidad de los alimentos disponibles. El alto consumo de arbustos, en los animales muestreados, les aportó unos niveles más altos de azúcares y proteínas, en comparación con las gramíneas, pero tuvieron también niveles altos de lignina y taninos, los cuales redujeron su digestibilidad (Gordon, 2003).

Los cérvidos parecen seleccionar una dieta que maximice la tasa de consumo de energía digestible o de nutrientes, y reduce al mínimo la ingesta de compuestos anti-nutricionales o tóxicos (Hanley, 1997). Pero el cambio de un ramoneador a un consumidor de herbáceas, también se ha relacionado con un cambio en la disponibilidad de los nutrientes, principalmente azúcares solubles, con independencia de los niveles en compuestos anti-nutricionales del alimento disponible (Verheyden et al., 2008). Estas preferencias positivamente relacionadas con la concentración de azúcares se han encontrado previamente en otros cérvidos (Tixier et al., 1997).

La estimación de la calidad nutricional de la dieta seleccionada en relación con los hidratos de carbono y, especialmente, con la concentración de azúcar es un tema de interés reciente por la ecología, que debe ser estudiado mejor con el fin de obtener una mejor comprensión del comportamiento nutricional y de la investigación de adaptación evolutiva (Verheyden-Tixier et al., 2008). Sin embargo, estas evaluaciones en herbívoros silvestres son una de las tareas más difíciles que enfrenta la ecología o la gestión de la vida silvestre (Putman y Hemmings, 1986). Principalmente, es difícil, debido a la complejidad de obtener un número suficiente de muestras adecuadas y, a continuación debido a las limitaciones metodológicas en la determinación de la calidad de la dieta. Los análisis de la calidad de la dieta han implicado tradicionalmente técnicas de laboratorio de química húmeda, que no son adecuados para hacer frente a un gran número de muestras, ya que es costoso tanto en tiempo como en dinero (Van Soest et al., 1991).

En cuanto al análisis del contenido del rumen es un método directo y ampliamente preciso, utilizado en estudios de botánica (Puglisi et al., 1978; Djordjevic et al., 2006; Ligi y Randveer., 2012) y la composición química de la dieta de los rumiantes (Yalden et al., 1978; Staines et al., 1982; Ikeda y Takatsuki, 1993), requiriéndose el sacrificio del animal. Por este último motivo ha habido un gran número de investigaciones en la búsqueda de métodos no invasivos e indirectos, que han evaluado la correlación entre los componentes de la dieta y las heces (Leslie y Starkey, 1987; Osborn et al., 1997). Los estudios de ecuaciones de regresión entre los contenidos de fibras del rumen y la concentración de fibras en heces en rumiantes, han sido muy importantes (Mann, 1983; Putman y Hemmings, 1986; Jianzhang et al., 1999). Estos estudios han llevado a cabo una calibración ruminal-fecal, utilizando el material fecal y del rumen del mismo animal, como un posible método de corrección de los resultados, para evaluar la influencia de la actividad microbológica en el rumen (Putman, 1984).

En este contexto, las tecnologías fecal-NIRS pueden proporcionar ecuaciones de calibración predictivas y una evaluación de esta relación ruminal-fecal. Hoy en día, se considera una aplicación inusual y emocionante para la espectroscopia NIR, usando directamente los espectros NIR fecales y relacionándolos con los atributos de la dieta (Dixon y Coates, 2009). La composición química puede predecirse a partir de los espectros de las heces, con mayor precisión que con el análisis directo de los alimentos (Lyon y Stuth, 1992; Leite et al., 1995; Landau et al., 2004). La reflectancia en el infrarrojo cercano se ha aplicado ampliamente en la industria agrícola, para evaluar la calidad nutricional de los alimentos que ingieren los herbívoros domésticos (Boval

et al., 2004; Landau et al., 2008; Fanchone et al., 2009), así como para controlar el estado nutricional y la ecología del ganado herbívoro (Dixon y Coates, 2010), incluidos los ciervos silvestres (Dryden, 2003). Este método integrador y no invasivo nos permiten obtener la cantidad adecuada de los datos requeridos en la investigación ecológica de ciervos silvestres (Tellado y Azorit, 2014).

En este estudio evaluamos el método fecal-NIRS por su idoneidad en la estimación de compuestos de la dieta como la celulosa, la hemicelulosa y el azúcar en ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) y gamos (Dama dama) del sur de España. El objetivo principal fue desarrollar y validar ecuaciones de predicción específicas para la evaluación de los hidratos de carbono, con el fin de examinar la selección de la dieta de cérvidos silvestres y su variación en el ambiente mediterráneo.

En los ciervos la tasa máxima de excreción se ha registrado que ocurre en el segundo día tras la ingesta (Kato et al. 1991), y el tiempo de retención medio de la ingesta (MRT) varía desde 25 hasta 37 h (Huston et al., 1986; Mouissie et al., 2005; Schwarm et al., 2010). Este tiempo es más corto que en otros rumiantes (Schafer et al., 1978; Simao Neto et al., 1987; Behrend et al., 2004). Al recurrir al contenido ruminal como base, se asumió que la ingesta era constante y que el animal tenía una dieta razonablemente consistente a lo largo de un par de días. Por lo tanto, si las suposiciones son correctas, las ecuaciones NIRS deben predecir con un buen ajuste de calibración NIRS ruminal-rectal, dándonos unas predicciones razonablemente buenas.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio y muestreo

El material utilizado consistió en el contenido ruminal y de heces tomado de 127 ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) y 90 gamos (Dama dama) cazados estacionalmente, a lo largo de los años 2008-09, en Lugar Nuevo (LN), una finca oficial cerrada, situado en el Parque Natural de Sierra de Andújar, en el sureste de España (38°9'N 4°3'W). Tener muestras a lo largo de todo el año, nos permitió tener una amplia gama de valores de las diferentes dietas consumidas para la calibración (Dryden, 2003), debido a la variabilidad de la composición de la dieta estacional en la zona (Azorit et al., 2012). En ambas especies se registró una dieta anual dominada por herbáceas, alcanzando un máximo en primavera, no obstante al final del invierno y del verano, se observó un aumento importante en el consumo de la porción arbustiva, y en otoño e invierno destacó el consumo de frutos (Azorit et al., 2012).

En esta finca no se les administraba alimentación suplementaria a los animales, por lo que su dieta estaba compuesta exclusivamente por los alimentos que encontraban en su entorno. Los animales tuvieron libre acceso a la vegetación natural de la zona hasta que fueron cazados. Una vez abatidos se recogieron unos 250 g de contenido ruminal y 5-10 g de heces del recto. Sólo fueron muestreados los ciervos cuyo contenido ruminal no estaba macerado, como indica Djordjevic y colaboradores (2006). Todas las muestras se mantuvieron en frío en los refrigeradores de campo y posteriormente a -20 °C hasta su análisis en el laboratorio.

3.2 Análisis químicos para la determinación del contenido ruminal

La celulosa se estimó como la diferencia entre la fibra ácido detergente (ADF) y la lignina. La hemicelulosa, siendo en rumiantes menos digerible que la celulosa (Bach y Calsamiglia, 2006), se calculó como la diferencia entre la fibra ácido detergente (ADF) y la fibra neutro detergente (NDF). La lignina se determinó por el método de la norma TAPPI T222OS-74 (Asociación para Pulp and Paper Industry Standard, 1978). El método descrito por Van Soest y Wine (1967) se utilizó para la fibra ácido detergente (ADF) y la fibra neutro detergente (NDF). La concentración de azúcar se midió con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), utilizando la glucosa como azúcar estándar como aconseja Hou (2011). El color del producto resultante se midió en un espectrofotómetro (modelo Helios gamma de Thermo) a 640 nm, y tuvo un rango de absorbancia final entre 0,1 y 0,5. La concentración total de azúcar reductor se calculó a partir de una recta patrón, previamente realizada con soluciones de concentraciones conocidas. El procedimiento consistió en medir la absorbancia de los cinco puntos de la recta patrón, cada vez que se tomaba una serie de medidas. (Véase ejemplo en la **Figura 9**)

El método del ácido dinitrosalicílico para la determinación del total de los azúcares reductores se basa en la reacción entre el aldehído del azúcar y el reactivo dinitrosalicílico (DNS). Este método es válido para las concentraciones de azúcares reductores totales que oscilan entre 0,05 y 0,50 g dm⁻³, por lo que las concentraciones de azúcar más elevadas deben diluirse. Con el fin de caracterizar los monosacáridos también utilizamos la cromatografía líquida de intercambio iónico de alta resolución (IHPLC), para obtener el perfil de monómeros que normalmente se encuentran en el líquido ruminal (fructosa, glucosa y sacarosa).

Las muestras de fluidos ruminales seleccionados se analizaron por IHPLC con un equipo de marca Dionex, ICS modelo 3000, equipado con una columna analítica CARBOPADPA20 (3 x 150 mm), en combinación con un pre-columna de PA20CARBOPAD (3 x 30 mm), utilizando una bomba

isocrática con doble posición de la válvula, y un sistema de detección amperométrica con un electrodo de AgCl como referencia. La elución se realizó a 30 °C con una solución de NaOH₂ mM como fase móvil. La regeneración de la columna anterior se llevó a cabo con NaOH 200 mM durante 15 minutos. Las condiciones del IHPLC fueron: velocidad de flujo de fase móvil de 10 cm³ min⁻¹, con una presión de seguridad: 4.000 psi (28 MPa), con una presión de 2800 psi y con una inyección de un volumen de 1 cm³ de muestra. Finalmente, después de un tiempo de exploración de 25 minutos se obtuvo un cromatograma como se muestra en la **Figura 10**.

3.3 Espectros fecales

Las muestras de heces se secaron mediante la liofilización. Cada muestra se trituró con un molino, controlando el tamaño de partícula para que tuvieran una distribución de tamaño uniforme (Dryden, 2003; Shenk y Westerhaus, 1993a, b), ya que esto puede afectar a los espectros NIR (Casler y Shenk, 1985; Windham, 1987). Se hicieron dos repeticiones para cada muestra, en un orden aleatorio (Casale et al., 2012). Se obtuvieron los espectros usando un espectrómetro de reflectancia en el infrarrojo cercano con una transformada de Fourier FT-NIR Antaris (MDS) equipado con una esfera integradora con una eficiencia mayor al 95% y un detector de InGaAs para trabajar en la región comprendida entre 12000-3800 cm⁻¹ (833-2631,58 nm). Las muestras fueron escaneadas en el rango de longitudes de onda desde 4.000 hasta 10.000 cm⁻¹ (1000-2500 nm) Después de cada medición, el vidrio del muestreador donde se colocó la muestra fue limpiado con agua destilada y se secado cuidadosamente. El número de exploración se optimizó a 160 escaneos, para obtener una adecuada relación señal-ruido, y se unieron todas las exploraciones en un solo espectro.

3.4 Análisis quimiométrico

Previamente al análisis quimiométrico se verificó la normalidad y homocedasticidad de los datos de referencia del rumen, utilizando el programa SPSS Statistics 17.0. Los datos espectrales y los análisis quimiométricos para la calibración PLS, fueron procesados mediante TQ Analyst 6.1.1 y software de Thermo Nicolet Corp. El ajuste PLS encontró las relaciones fundamentales entre la matriz variable Y (el índice de interés) y la matriz de la variable X (el espectro) (Di Wu et al., 2010). Realizamos diferentes calibraciones, con diferentes regiones espectrales entre 4.000-10.000 cm⁻¹ (1000- 2500 nm) y distintos pretratamientos matemáticos del espectro, como primera y segunda derivada. Aunque se obtuvieron ecuaciones para las muestras de ciervos y gamos por separado, para el gamo, se tuvo un número bajo de muestras según la cantidad aconsejada para las

calibraciones (Dryden, 2003). Con el fin de utilizar un conjunto de datos mayor a 150 muestras, y para comprobar la posibilidad de obtener una ecuación global para predecir la dieta de ambas especies al mismo tiempo, también se crearon ecuaciones utilizando los datos de ambas especies conjuntamente.

Hemos intentado encontrar el modelo que tuviese los mejores ajustes, es decir, con los valores más altos de coeficiente de correlación (r) y con la raíz media del error estándar de calibración más bajo (RMSEC). La capacidad predictiva del modelo de calibración, así como su precisión, se evaluó mediante el cálculo de la raíz media del error estándar de la validación cruzada (RMSECV), y de la raíz media del error estándar de predicción (RMSEP). Estos indicadores son estadísticos adimensionales, lo que significa que se pueden comparar entre los diferentes modelos (AACC, 1999; Feam, 2002). El RMSECV representa la variabilidad en la diferencia entre los valores predichos y los de referencia, cuando la ecuación se aplica secuencialmente a subconjuntos de datos del conjunto de datos general de la calibración (Naes et al., 2002). Todos estos indicadores fueron considerados en relación con el rango de valores para los que se creó la calibración NIRS. A continuación, se utilizó el valor de error residual (RER) que es el rango dividido por el RMSEP. Las calibraciones se consideraron como aceptables para la selección de muestras y para la evaluación con valores de $RER \geq 4$ (Millmier et al., 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Análisis de química húmeda

La **Tabla 14** muestra el contenido de celulosa, hemicelulosa y azúcar de muestras ruminales de ciervos y gamos, determinados por análisis químico y que fueron usados para las calibraciones quimiométricas ($n = 217$). Teniendo en cuenta las muestras de ambas especies de cérvidos, la media del contenido global de celulosa fue de $16,30 \pm 5,24$, mientras que el contenido medio de hemicelulosa estuvo entorno a $16,68 \pm 6,10$, y el de azúcar a $19,80 \pm 9,87$.

Los diferentes monosacáridos secundarios que se encontraron en el rumen por el procedimiento IHPLC fueron arabinosa, xilosa, manosa y fructosa (véase la **Figura 10**). El monosacárido principal fue la glucosa, coincidiendo con el encontrado por Hou (2011), con altas concentraciones, y por esta razón, se eligió este hidrato de carbono para establecer las muestras patrón para la determinación de azúcar por el método DNS.

Tabla 14: Celulosa, hemicelulosa (% w w⁻¹) y azúcares (g dm⁻³) de ciervo (*Cervus elaphus*) y gamo (*Dama dama*). Medidas en muestras de rumen para el análisis de química usado como referencia para las calibraciones PLS.

	Celulosa				Hemicelulosa			Azúcar			
	N	min-máx.	media± SD	rango	min-máx.	media± SD	rango	N	min-máx.	media± SD	rango
Usado en calibración quimiométrica y validación cruzada interna											
Ciervo	127	6.68-32.78	16.76±5.09	26.10	1.28-29.24	16.17±5.82	27.96	55	7.07-51.66	19.70±9.70	44.59
Gamo	90	6.71-29.39	15.68±5.43	22.68	2.51-32.32	18.35±6.30	29.81	55	9.17-50.15	19.94±10.14	40.98
Usado en validación externa adicional											
Ciervo	22	9.73-24.47	17.42±4.17	14.74	2.04-25.40	14.54±5.50	23.36	10	12.02-26.39	17.6±4.6	14.37
Gamo	21	9.05-29.88	18.32±5.99	20.83	1.79-27.37	15.26±6.50	25.58	10	8.95-43.41	17.57±9.61	34.46
Total	260	6.68-32.78	16.30±5.24	26.10	1.28-32.32	16.68±6.10	31.04	130	7.07-51.66	19.80±9.87	44.59

4.2 Espectros Fecal-FT-NIRS y calibración

4.2.1 Modelo de calibración de la celulosa y ecuaciones predictivas

La **Tabla 15** muestra los estadísticos de las calibraciones PLS, y la validez de las seis ecuaciones para predecir concentraciones de celulosa. La mayoría de los valores resultantes de las calibraciones seleccionadas son similares a los de referencia, tanto para las muestras de ciervo como para las de gamo, mostrándose junto a la línea de regresión lineal múltiple (**Figura 19**). Los ejes de coordenadas son los valores calculados por la ecuación resultante de la calibración, y la abscisa el valor de referencia obtenido por los métodos analíticos. Las ecuaciones seleccionadas tenían coeficientes de correlación (r) que oscilaron entre 0,87 y 0,99. Estas ecuaciones tuvieron una precisión fiable, teniendo en cuenta los errores de predicción (RMSEP), de calibración (RMSEC) y de validación cruzada (RMSECV), en relación con el rango de valores para los que se establecieron las calibraciones NIRS. El índice RER varió de 4,14 a 5,12 (**Tabla 15, Figura 19**).

Tabla 15. Estadísticos de calibración PLS de las ecuaciones predictivas para Celulosa de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y las dos especies conjuntas, utilizando segunda derivadas y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Corr. coeff	Región espectral (nm)
1.Cervus	4.25	0.60	6.14	5.25	0.99	1419.12-2416.34
2.Cervus	4.14	1.48	6.31	6.72	0.96	1927.68-2342.12
3.Dama	5.12	0.93	4.43	5.34	0.99	2083.33-2500
4.Dama	5.49	1.10	4.13	6.19	0.98	1927.68-2342.12
5.Conjunta	4.88	2.04	5.35	6.90	0.94	1419.12-2416.34
6.Conjunta	5.10	2.53	5.12	6.32	0.87	1927.68-2342.12

¹ Valor del error residual

² Raíz media del error estándar de calibración

³ Raíz media del error estándar de predicción

⁴ Raíz media del error estándar de validación cruzada

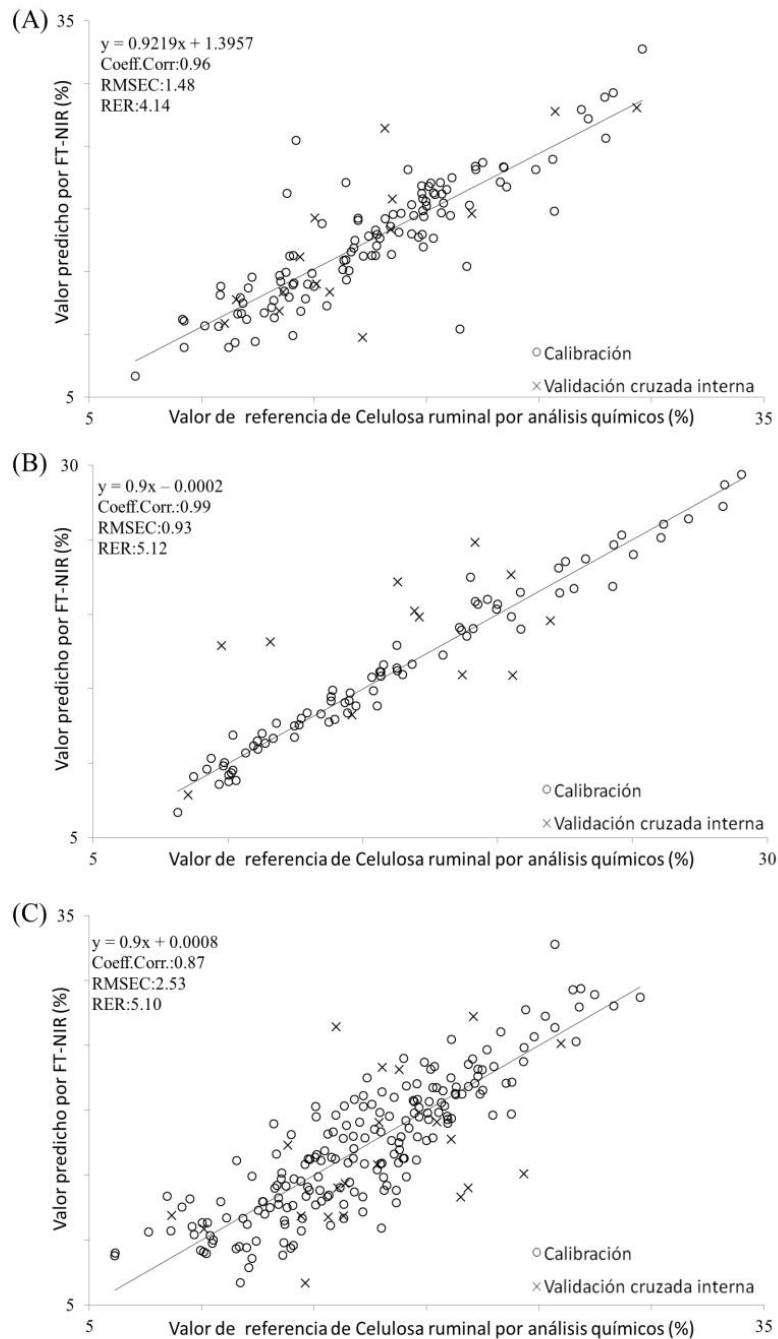


Figura 19: Relación de regresión lineal entre los valores pronosticados fecal-FT-NIR y los valores medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) modelo de calibración de Celulosa para ciervo (ecuación 2.Cervus). B) modelo de calibración de Celulosa para gamo (ecuación 3.Dama). C) modelo de calibración de Celulosa para ambos cérvidos (ecuación 6.Conjunta).

4.2.2 Modelo de calibración de la hemicelulosa y ecuaciones predictivas

Los estadísticos de las seis ecuaciones de predicción para la determinación de la hemicelulosa se muestran en la **Tabla 16**. Las ecuaciones seleccionadas tenían una alta linealidad, con coeficientes de correlación (r) que oscila entre 0,91 y 0,99. También tenían una precisión fiable, con errores de predicción (RMSEP), calibración (RMSEC) y validación cruzada (RMSECV) cercanos a las desviaciones estándar de los datos de referencia, para los que se estableció la calibración NIRS. El índice RER varió desde 3,01 hasta 4,80 (**Tabla 16**, **Figura 20**). La **Figura 20** representa gráficamente las regresiones de las mejores calibraciones para hemicelulosa.

Tabla 16. Estadísticos de calibración PLS de las ecuaciones predictivas para Hemicelulosa de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y las dos especies conjuntas, utilizando segunda derivadas y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Coef. Corr.	Región espectral (nm)
7.Cervus	4.71	2.52	5.94	7.71	0.91	2222.22-2500
8.Cervus	6.97	0.75	4.01	6.41	0.99	1419.12-2321.16
9.Dama	3.01	2.44	9.91	11.60	0.93	2222.22-2500
10.Dama	3.90	0.57	7.65	7.37	0.99	1419.12-2321.16
11.Conjunta	4.80	1.19	6.46	6.69	0.98	1000-2500
12.Conjunta	4.58	1.68	6.77	6.62	0.96	1419.12-2321.16

¹ Valor del error residual

² Raíz media del error estándar de calibración

³ Raíz media del error estándar de predicción

⁴ Raíz media del error estándar de validación cruzada

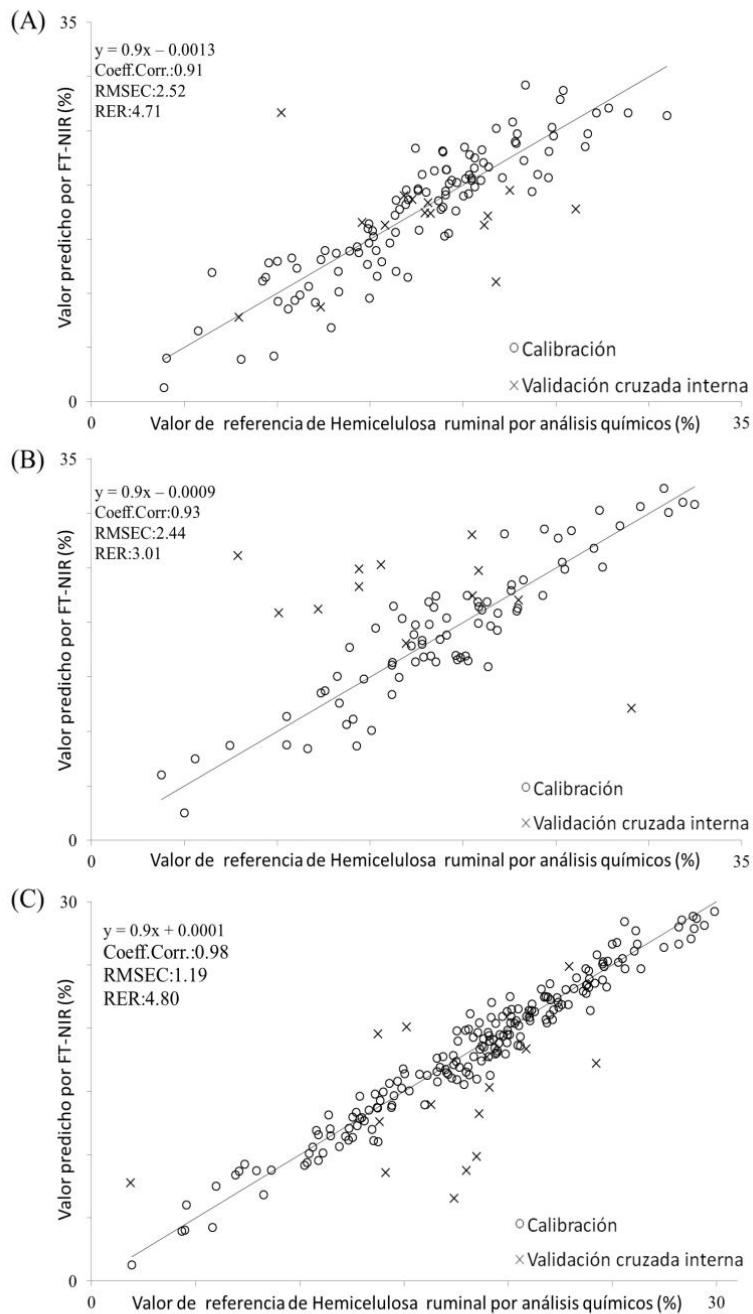


Figura 20: Relación de regresión lineal entre los valores pronosticados fecal-FT-NIR y los valores medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) modelo de calibración de Hemicelulosa para ciervo (ecuación 7.Cervus). B) modelo de calibración de Hemicelulosa para gamo (ecuación 9.Dama). C) modelo de calibración de Hemicelulosa para ambos cérvidos (ecuación 11.Conjunta).

4.2.3 Modelo de calibración de azúcares y ecuaciones predictivas

Siguiendo los indicadores estadísticos se seleccionaron seis ecuaciones de predicción para determinar el azúcar. Todos los modelos dieron valores de coeficientes de correlación superiores a 0,96, y un aceptable RMSEC. Las mejores ecuaciones fueron enumeradas: 13 para el ciervo, el 16 de gamos y 18 para la combinación de ambas especies. Se obtuvieron valores de RMSEP y RMSECV que oscilan entre, 8,96 a 11,8 y 11,23 a 11,70, respectivamente (Tabla 17, Figura 21).

Tabla 17. Estadísticos de calibración PLS de las ecuaciones predictivas para azúcares de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y las dos especies conjuntas, utilizando segunda derivadas y 10 factores PLS.

Ecuación	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Corr. coeff	Región espectral (nm)
13.Cervus	4.98	1.80	8.96	11.70	0.98	1659.88-2225.52
14.Cervus	4.85	1.63	9.20	10.86	0.99	1333.33-2500
15.Dama	2.58	0.48	15.90	14.83	0.99	1000-2500
16.Dama	3.47	0.27	11.80	11.23	0.99	1333.33-2500
17.Conjunta	3.38	2.85	13.20	12.51	0.96	1659.88-2225.52
18.Conjunta	4.89	2.68	9.11	11.47	0.96	1333.33-2500

¹ Valor del error residual

² Raíz media del error estándar de calibración

³ Raíz media del error estándar de predicción

⁴ Raíz media del error estándar de validación cruzada

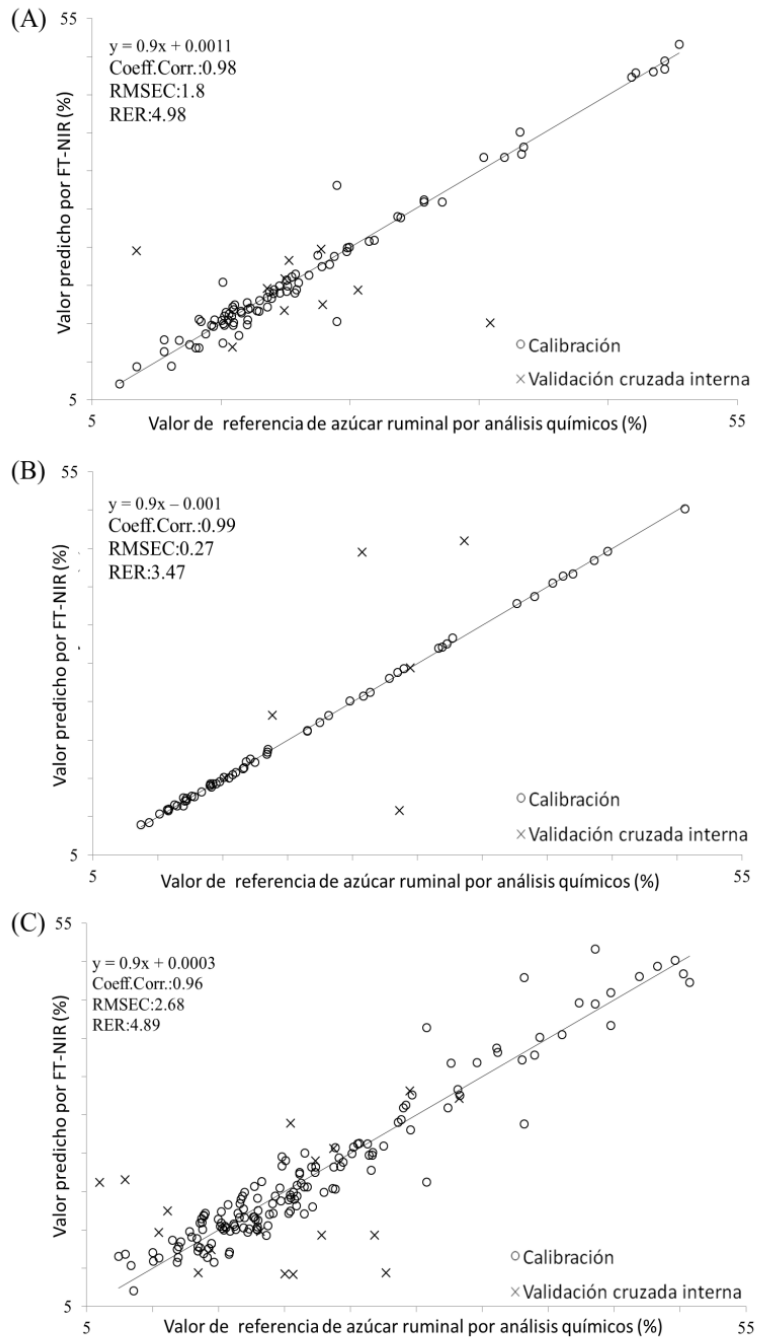


Figura 21: Relación de regresión lineal entre los valores pronosticados fecal-FT-NIR y los valores medidos utilizando técnicas estándar de química húmeda. A) modelo de calibración de Azúcares para ciervo (ecuación 13.Cervus). B) modelo de calibración de Azúcares para gamo (ecuación 16.Dama). C) modelo de calibración de Azúcares para ambos cérvidos (ecuación 18.Conjunta).

4.2.4 Validación adicional de las ecuaciones predictivas seleccionadas

Hemos querido evaluar los mejores modelos de predicción de la celulosa, hemicelulosa y de los azúcares, para lo cual hemos utilizado muestras no incluidos en el proceso de calibración. La **Tabla 18** muestra los resultados estadísticos de las comparaciones entre los valores de referencia y predichos, utilizando las ecuaciones de calibración Cervus, Dama y conjunta. Obtuvimos que las ecuaciones conjuntas (6, 11 y 18.Conjunta), tanto de la celulosa como de la hemicelulosa y azúcares eran fiables para predecir las concentraciones de estos parámetros, tanto en las muestras de ciervo como en las muestras de gamo. Más específicamente, para la celulosa todas las ecuaciones de calibración fueron útiles para predecir tanto las muestras de ciervo como de gamo indistintamente del tipo de ecuación que se utilizara, ya que al comparar los datos de referencia de celulosa de las muestras externas con los datos de predicción obtenidos de cualquier ecuación de celulosa, no hubo diferencias estadísticamente significativas. Para la predicción del contenido de hemicelulosa tanto para las muestras de ciervos como de gamos fue fiable el uso de la ecuación conjunta (11.Conjunta) y la de ciervo (7.Cervus), como anteriormente hemos mencionado. En la determinación de azúcares la ecuación conjunta (18.Conjunta) mostró el mejor y más preciso resultado para las muestras de ciervo y gamo, a parte para la concentración de azúcar en las muestras de gamo no solo fue fiable el uso de su propia ecuación (16.Dama) y de la conjunta (18.Conjunta), sino que también se podía utilizar la ecuación de ciervo (13.Cervus).

Table 18. Valores predichos de contenido de celulosa, hemicelulosa y azucar de muestras de rumen de ciervo (*Cervus elaphus*) y gamo (*Dama dama*) por las ecuaciones NIRS seleccionados. (2, 7 y 13.Cervus = ecuación de calibración quimiométrico de muestras de ciervo; 3, 9 and 16.Dama= ecuación de calibración quimiométrico de muestras de gamo; 6, 11 and 18.Conjunta= ecuación de calibración quimiométrico de muestras de ambas especies).

	Celulosa					Hemicelulosa				Azúcar			
	n	Ec	min-máx	media± SD	P-valor	Ec	min-máx	media± SD	P-valor	Ec	min-máx	media± SD	P-valor
Ciervo	22	2	5.68-25.6	18.69±5.16	0.13(t=-1.53)	7	4.81-27.12	16.23±5.8	0.43(t=-0.80)	13	10.84-33.02	20.16±7.06	0.08(W=175)
		3	12.32-24.48	18.41±3.32	0.26(t=-1.13)	9	2.2-27.89	14.87±6.58	0.73(t=-0.35)	16	7.93-30.24	16.1±6.19	0.92(t=-0.10)
		6	7.68-22.23	16.32±3.47	0.55(t=0.59)	11	11.53-26.25	17.74±3.95	0.15(t=-1.45)	18	13.05-24.47	18.26±3.46	0.27(t=-1.11)
Gamo	21	2	10.28-26.5	17.75±5.01	0.95(t=-0.06)	7	9.77-28.76	17.12±4.59	0.8(t=-0.26)	13	14.90-34.10	21.85±6.19	0.27(t=-1.13)
		3	12.49-25.17	17.80±3.99	0.94(t=0.08)	9	9.77-28.76	17.12±4.59	0.8(t=-0.26)	16	7.53-36.19	16.3±8.54	0.88(t=0.15)
		6	14.21-22.68	17.74±2.58	0.78(t=0.28)	11	14.12-29.65	20.36±3.62	0.07(W=293)	18	11.16-28.58	19.27±5.20	0.92(t=-0.10)

SD- desviación estandar; Ec- Ecuación; P-valor < 0.05 indica diferencias entre los valores de referencia y los predichos. (t indica el uso de T-test Student, W indica el uso del test no paramétrico de Wilcoxon porque el test de Levene's con p-valor <0.05 indica una diferencia en las varianzas entre los valores comparados.

5 DISCUSIÓN

Hemos desarrollado y validado una metodología de espectroscopía de reflectancia difusa en el infrarrojo cercano, con transformada de Fourier (fecal-FT-NIRS), junto con un ajuste de mínimos cuadrados parciales (PLS), en las heces, para evaluar la calidad de la dieta de dos especies de cérvidos silvestres españoles. La exactitud de las ecuaciones predictivas, para NIRS fecal, en comparación con los valores de química húmeda fue buena. Esto se debió al hecho de que obtuvimos ecuaciones para la determinación de celulosa con bajos errores de calibraciones, que oscilaron entre 0,6 y 2,53, menores a los publicados en especies leñosas (Petisco et al., 2005; Poke y Raymond, 2006), y con unos coeficientes de correlación de 0,87 a 0,99, que fue considerado como excelente (Workman, 2001; Williams, 2001). Los valores de RMSEP y RMSECV, fueron ligeramente superiores a estudios similares, aunque estuvieron dentro de los límites aceptables (Dryden, 2003). También usamos el RER y el RMSECV, que nos ofrecieron la exactitud media que se esperaba para la predicción de las muestras no incluidas en la calibración. Por lo tanto, al obtener un valor de RER superior a 4, en las ecuaciones seleccionadas (**Tabla 15-17**), implicó que las ecuaciones de calibración fueran aceptable para la selección de muestras (Millmier et al., 2000).

Al predecir razonablemente bien nuestras ecuaciones NIRS, podemos aceptar nuestra hipótesis inicial de que la dieta ingerida fue constante a través de varios días, corroborándose también una buena correlación en la concentración ruminal-rectal. En un principio creímos que sólo tendrían eficiencia las ecuaciones de predicción individuales, ya que la dieta del ciervo tenía una mayor proporción de especies arbustivas que los gamos, los cuales consumieron más bellotas en el área de estudio (Azorit et al., 2012), y debido a las diferencias entre la composición de sus dieta, se consideró como un potencial de incompatibilidad para los modelos de predicción entre especies (Aufrère et al., 1996). Pero finalmente, las ecuaciones conjuntas de la combinación de las muestras de ambos cérvidos fueron útiles para la celulosa, la hemicelulosa y la determinación de azúcar en ciervos y gamos simultáneamente.

Como comentan Dixon y Coates (2009), las heces contienen una amplia variedad de información sobre la dieta, la fisiología y la ecología de los animales de pastoreo. Así, los índices fecales indicadores de la calidad de la dieta, pueden ser herramientas útiles para la investigación sobre la ecología, el comportamiento y la gestión de la vida silvestre. Una ventaja de conseguir la información de las heces, es que las muestras a menudo se pueden encontrar fácilmente y se pueden tomar muestras en circunstancias en que los animales no pueden ser muestreados o

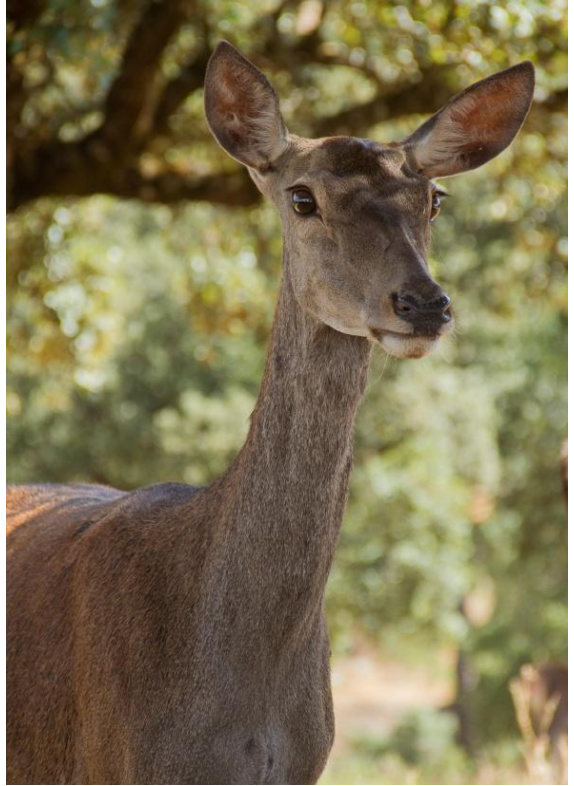
incluso observados con regularidad. Sin embargo, las diferencias fecales probablemente reflejan diferencias de las capacidades digestivas de los distintos herbívoros, en lugar de algún aspecto de la ingesta alimentaria, debido a las diferencias fisiológicas entre los animales como constitución del tracto digestivo, la naturaleza de la flora microbiana y la velocidad de paso por el intestino (Van Soest, 1994). Por lo tanto, no deben hacerse comparaciones directas de atributos fecales de especies con distintas capacidades digestivas, ya que estos no ofrecen una visión útil de los componentes de la dieta (Leslie et al., 2008).

El enfoque multifactorial que se obtuvo en este estudio, mejoró el control de las variaciones intraespecíficas en la dieta, siendo una buena herramienta que nos permitió estudiar la calidad de la dieta simultáneamente de dos especies de cérvidos mediante las heces. En realidad, pensamos que las ecuaciones de predicción generadas por fecal-NIRS mediante la regresión de los valores obtenidos por los análisis químicos de referencia realizados en material ruminal (dieta ingerida), y los espectros obtenidos de las heces, evita estas variaciones inter o intra-específicas en la composición fecal. La integración de las dietas ruminales de forma independiente de ambas especies con sus correspondientes capacidades digestivas nos permite realizar comparaciones directas de la dieta de las dos especies de cérvidos.

La composición química del contenido del rumen o de las heces es diferente de la dieta original debido a la influencia de la saliva, la actividad microbiológica en el rumen, la absorción de la materia digerida y la actividad de las enzimas endógenas. En esta línea, los resultados obtenidos dan una estimación de nutrientes en lugar de una determinación exacta. Pero mediante el uso del contenido del rumen, se hizo un ensayo integrador de rumen-heces permitiéndonos monitorear indirectamente la dieta seleccionada de dos especies de cérvidos silvestres.

La calibración de las muestras fecales con un espectrómetro de reflectancia infrarroja requiere tiempo, experiencia, y un gran número de muestras, con valores de referencia conocida con precisión y fiabilidad, para cada parámetro analizado. Sin embargo, excepto por el costo inicial de la adquisición del equipo NIRS, el análisis de muestras no es caro. Ya que emplea métodos de preparación sencilla de la muestra (secado y molienda), y una vez validado evita los problemas de eliminación de residuos químicos orgánicos y otros, no utilizando reactivos tóxicos o corrosivos (MarK et al., 2002). El método proporciona una evaluación fiable de la dieta, más bien, una determinación exacta de los parámetros. Sin embargo, una vez validado el FT-NIRS por espectros fecal es un método rápido que nos permite monitorear los índices de calidad de la dieta de los

animales huidizos, como los ciervos, así como para obtener la cantidad adecuada de muestras necesarias para la investigación ecológica de la fauna.



4.4 Composición botánica de la dieta: Art 4 Variaciones estacionales y de dieta en poblaciones simpátricas de ciervo y gamo del sur de España: una primera aproximación al comportamiento alimentario

Azorit C., Tellado S., Oya A. and Moro J. (2012). Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain: A preliminary approach of feeding behaviour. *Animal Production Science*. 51(4): 78-82.

1 RESUMEN

Se estudió la composición de la dieta y el solapamiento entre dos especies simpátricas, el ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y el gamo (*Dama dama*) a lo largo de todo un año, para determinar la variación entre las distintas épocas del año, las especies, el sexo y la edad, utilizando muestras de contenido ruminal de 81 ciervos y 69 gamos cazados mensualmente durante la temporada de 2008-09 en el parque natural de Sierra de Andújar, al sur de España. Encontramos diferentes estrategias alimentarias en ambas especies y sexos, durante los períodos con recursos limitados. En ambas especies la dieta a lo largo del año está dominada por las herbáceas, con un máximo de consumo en primavera. Los arbustos fueron un importante recurso alimenticio al final del invierno y del verano, y los frutos en otoño e invierno. El ciervo consumió una mayor proporción de arbustos que el gamo, el cual ingirió más bellotas y mostró una mayor capacidad para compensar los períodos de restricciones nutricionales. En general la baja similitud de la dieta en verano y al final del invierno, nos llevó a suponer que la competencia de explotación entre ciervos y gamos e incluso entre sexos era probable. Las hembras de ciervo mostraron una baja similitud de la dieta con los machos, mientras que hubo un mayor solapamiento de las dietas entre machos ciervos y hembras de gamo al final del verano. Las diferencias detectadas entre ambas especies y sexos no siempre apoyan las predicciones que provienen del tamaño corporal específico y de las características morfofisiológicas, pero probablemente puede explicarse como una consecuencia de diferentes demandas metabólicas. La relación entre los atributos nutricionales de las plantas y la selección de alimento de acuerdo con el estado reproductivo o fisiológico y con la época, para ambos sexos y especies, debería ser investigado con el fin de realizar una mejor evaluación de los comportamientos alimentarios de los ciervos.

2 INTRODUCCIÓN

Un gran número de áreas protegidas coexisten con una de las principales actividades económicas, basada en las monterías de ungulados en Sierra Morena de Jaén, en el sur de España. Las tasas de capturas son más altas que en otras áreas europeas, con un incremento en las dos últimas décadas. Las cacerías de ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) son las más abundantes e importantes, aunque la densidad de gamo (*Dama dama*) se ha incrementado considerablemente desde los años 50, cuando ellos fueron introducidos en algunos cotos de caza como Lugar Nuevo (LN) y Selladores Contadero (SC), cotos oficiales del estado en el Parque Natural de Sierra de Andújar. Se ha registrado la sobreabundancia y los consecuentes daños en la vegetación así como

la resultante reducción en la condición corporal de los cérvidos, debido al exceso de ramoneo, sobre todo en los años de sequía, por lo que el control de la población es necesario. Los programas de manejo para la reducción de la población de cérvidos, han sido sistemáticamente organizados, pero estos han sido sólo efectivos en el ciervo, ya que en la densidad de gamo no se ha reducido significativamente (Nugent et al., 2011).

La detección de la competencia inter-específica, la cual juega un importante papel en la dinámica de poblaciones y en el conocimiento de la plasticidad fisiológica en las diferentes especies, para compensar los períodos de restricción, son claves en las decisiones de la gestión. El análisis de estas cuestiones a través de estrategias de alimentación y el uso de los recursos, se han citado como un requisito importante, para una comprensión más completa de los mecanismos de competencia en especies simpátricas (Latham, 1999). También son muy importantes para entender las diferencias en la explotación del hábitat, la interacción sociales y de comportamiento, el reparto de los recursos y el impacto de los animales en la vegetación. Además, el reconocimiento del extraordinario grado de variación intra-específica, que puede ser grabado dentro de las especies, teniendo consecuencias importantes para la gestión de los cérvidos y la conservación de especies amenazadas (Putman y Flueck, 2011).

Sin embargo, los datos sobre la variación estacional, en la composición y la similitud de la dieta de las poblaciones simpátricas de ciervos son todavía escasos (Storms et al., 2008). La mayoría de los estudios no cubren el período de un año entero o la variación intra-específica entre sexos, ni los datos sobre la composición de la dieta y el solapamiento de los ciervos y gamos cuando son poblaciones simpátricas, siendo aún más escasos para el sur de España (Martínez, 2002). Entre los estudios de dieta del ciervo ibérico son pocos los llevados a cabo en Sierra Morena (Rodríguez-Berrocal, 1978; Rodríguez-Berrocal et al., 1987).

Nosotros estudiamos la composición de la dieta y el solapamiento en las poblaciones simpátricas de ciervo y gamo durante todo un año para determinar la variación estacional, entre especies, sexos y edad por el análisis de muestras del contenido del rumen. Se evaluó la similitud de la dieta y la posible competencia inter- e intra-específica, obteniendo información sobre los hábitos alimenticios y las diferentes estrategias de alimentación de ambas especies y sexos. Discutiremos varias consideraciones teóricas de las interacciones inter- e intra-específica y el comportamiento con respecto a un ambiente mediterráneo.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

Cubriendo todo un año llevamos a cabo la investigación entre los años 2008-09 en las fincas de Lugar Nuevo (LN) y Selladores Contadero (SC), fincas cerradas de unos 10 km² cada una, situado en el Parque Natural de la Sierra de Andújar en Sierra Morena de Jaén, en el sudeste de España. En estas fincas un promedio de 375 ciervos y 450 gamos son cazados anualmente en cada una de ellas desde 2002 a 2009 a través de cazas selectivas reguladas por la dirección, las cuales pretende reducir la densidad de población de estas especies. El nivel de eliminación selectivo aplicado redujo la densidad de ciervo en un 26%, pero la densidad de gamo no disminuyó de manera significativa. Las densidades últimas en la zona son de 23.3 ciervos y 4.0 gamos por km². A estas poblaciones no se le administra ninguna alimentación suplementaria.

Esta área es caracterizada por un macroclima de tipo mediterráneo con una distribución irregular de precipitaciones, teniendo las tasas más altas en primavera y otoño, y una escasez casi total de lluvias, junto con unas altas temperaturas durante el verano. La precipitación total anual en el área de estudio fue de 852,6 mm, con más del 40% de la lluvia caída durante la primavera (210.4 mm de Abril) y un 30% durante el otoño (187.0 mm en septiembre y de octubre). El año en el que se llevó a cabo el muestreo fue un año húmedo en esta zona, donde el promedio anual de precipitaciones varían entre 200 y 900 mm. La climatología determina en gran medida la productividad vegetal y fenología de las plantas. El pasto verde está disponible de mayo a Junio, convirtiéndose en forraje y pasto seco en verano como es habitual en esta área. La producción de nueva planta verde y hierba está de nuevo disponible en el invierno, después de las lluvias durante el otoño.

Las comunidades típicas de plantas del suelo silíceo de los ecosistemas mediterráneos y las dehesas son una parte dominante del sistema agroforestal, como la encina (*Quercus rotundifolia*), el quejigo (*Quercus faginea*) y el alcornoque (*Quercus suber*). La cobertura arbustiva dominante es la jara pringosa (*Cistus ladanifer*) y otros como el lentisco (*Pistacea sp.*), labiérnago (*Phillyrea sp.*), Acebuche (*Olea europaea var. Sylvestris*) y romero (*Rosmarinus officinalis*). Además, más del 50% de las fincas está cubierto por la reforestación de coníferas (principalmente *Pinus sp.*, con unos niveles de densidad forestal que van desde 200 a más de 1000 árboles / ha). La producción de bellota de los *Quercus* es de octubre a finales de febrero, extendiéndose desde septiembre del quejigo e incluso hasta marzo para el alcornoque (Rodríguez-Estévez et al., 2007).

3.2 Muestras de rumen y análisis de dieta

Se analizó una colección de muestras de contenido ruminal de 81 ciervos y 69 gamos. La **Tabla 19** muestra el número de cervidos, el sexo y la edad. Las edades se determinaron mediante el estudio de una combinación de erupción dental, de los patrones de reemplazo (Brown y Chapman, 1990; Azorit et al., 2002a), y marcas de crecimiento observados en el cemento del primer molar descalcificado y sin descalcificar siguiendo un método estandarizado de recuento (Azorit et al., 2004). Por último, las mandíbulas fueron agrupadas en cinco clases de edad, siendo excluidos los animales jóvenes de 1 año.

Las muestras del rumen se analizaron volumétricamente por características macroscópicas de las plantas. En primer lugar el contenido del rumen fue mezclado y una muestra de 250 g fue congelada y almacenada hasta su análisis. Posteriormente estas muestras se descongelaron y lavaron a través de tamices con una luz de malla que oscilaba de 1.0 a 0.5 cm, siendo clasificado macroscópicamente el material retenido.

Todo el material retenido por los tamices se identificó y clasificó en tres grupos:

1. Arbustos (madera, hojas de árboles y partes de los arbustos, incluyendo hierbas, hojas verdes anchas, tallos y brotes).
2. Herbáceas (gramíneas, monocotiledóneas, plantas acuáticas, y también hongos y setas).
3. Frutos (bellotas, aceitunas y semillas).

De manera similar al método descrito por Nugent (1983) y McCullough (1985) el material ordenado fue secado en una estufa a 80 °C hasta peso constante y se pesó con una precisión de miligramo. El porcentaje de la composición de materia seca de cada uno de los tres grupos de forraje con respecto al peso total de la muestra, se utilizó para describir la cantidad de cada clase de forraje que comieron, comparándolo posteriormente entre las dos especies, el sexo, la edad y la estacionalidad (cada 2 meses). En términos matemáticos, el porcentaje de peso seco del forraje comido por las especies de ciervo j (p_{ij}) se puede expresar como:

$$p_{ij} = \left(\sum b_i / \sum b_{ti} \right) \times 100$$

Donde b_i es el peso de la muestra de tipo de forraje y b_{ti} el total del peso de la muestra de rumen.

3.3 Índices de solapamiento de la dieta

Utilizamos la ecuación de Pianka (1973) para calcular el índice de solapamiento de la dieta

O_{jk} .

$$O_{jk} = O_{kj} = \frac{\sum_i^n p_{ij}p_{ik}}{\sqrt{\sum_i^n p_{ij}^2 \sum_i^n p_{ik}^2}}$$

Donde p_{ij} y p_{ik} representa la proporción de los i_{th} grupos de plantas usados como recurso alimentario por las especies j y k , en nuestro caso ciervo y gamo, respectivamente. También se evaluó el solapamiento de dieta entre sexos, teniendo en cuenta los machos y las hembras de cada especie. Este índice tiene valores límite de 0 (sin solapamiento) a 1 (solapamiento total de los nichos de la dieta). Este coeficiente de solapamiento de nicho simétrico ha sido ampliamente utilizado para evaluar la similitud en la composición de la dieta. (Storms et al., 2008).

Tabla 19: Número de ciervos y gamo separados por sexo y edad.

Clases de edad	Ciervo		Gamo		Total
	machos	hembras	machos	hembras	
1-2	11	6	14	9	40
2-5	16	14	12	14	56
5-7	0	11	2	3	16
7-9	4	8	1	8	21
> 9	2	9	2	4	17
	33	48	31	38	
Total	81		69		150

3.4 Análisis estadístico

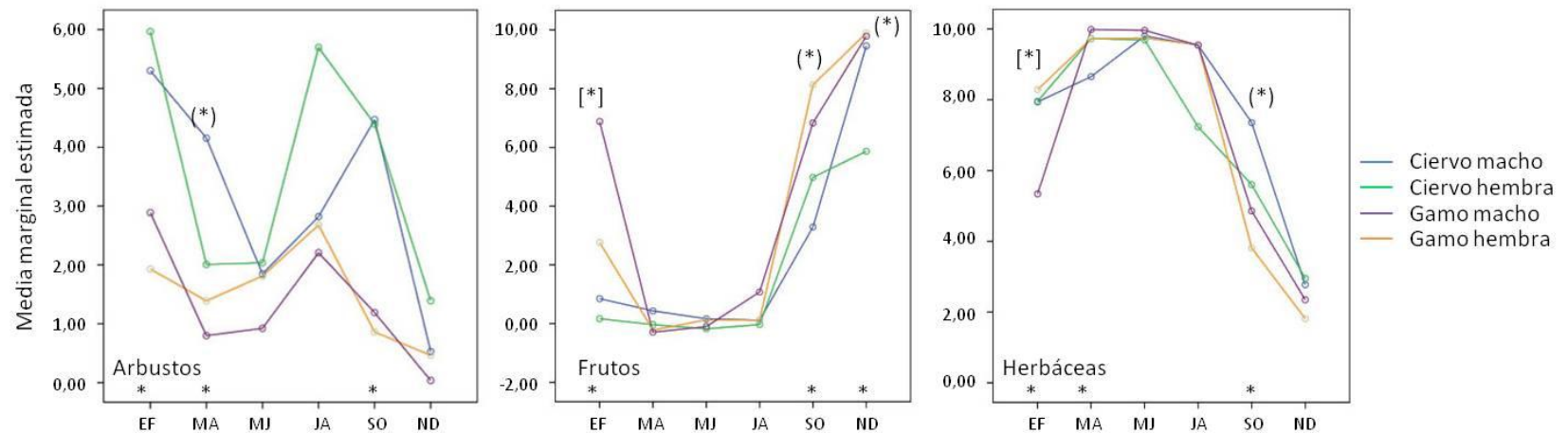
El análisis estadístico se realizó con el software SPSS Statistics 17.0. Se consideraron tres variables dependientes: arbustos, hierbas y frutos, y por la aplicación del método estadístico de ANOVA multifactorial que evaluó las diferencias en la composición de la dieta de acuerdo con los factores: sexo, especie, edad, temporada (dos meses) y sus interacciones. Los datos se transformaron mediante una raíz, que se realizó con el fin de satisfacer los supuestos de normalidad y homocedasticidad del ANOVA. Una vez que los factores estadísticamente significativos había sido detectados se realizó un análisis de comparación, usando el método de

mínimas diferencia significativa (L.S.D.) para determinar diferencias inter- e intra-específica significativa a lo largo de todo el año en el uso de cada clase de forraje.

4 RESULTADOS

La **Tabla 20** muestra el porcentaje medio de la composición de la dieta, separado en los distintos grupos de forraje, durante todo el año (cada dos meses) para los ciervos y gamos, en ambos sexos. En la **Figura 22** se ve la variación estacional de la dieta lo que indica diferencias significativas entre los ciervos y gamos (p -valor <0.001), así como entre los sexos de ambas especies (p -valor <0.05). La **Tabla 21** presenta el grado de solapamiento de la dieta de cada grupo de plantas consumidas por las ambas especies (ciervo y gamo), también teniendo en cuenta machos y hembras a lo largo de todo el año.

Figura 22: Variación estacional de la dieta (Enero-Febrero (EF); Marzo-Abril (MA); Mayo-Junio (MJ); Julio-Agosto (JA); Septiembre-Octubre (SO); Noviembre-Diciembre (ND)).



* Indica diferencias significativas entre los ciervos y gamos (p-valor <0.001).

(*) Indica diferencias significativas entre macho y hembras de ciervo (p-valor<0.05)

[*] Indica diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras de gamo (p-valor <0.05).

Tabla 22: Porcentaje medio de composición de la dieta, separado por la clase de forraje durante todo el año (cada dos meses) para los ciervos y gamos, en ambos sexos (Machos (M); Hembras (H)) en el sur de España.

Sex	n	Ciervo			n	Gamo		
		Herbáceas	Frutos	Arbustivos		Herbáceas	Frutos	Arbustivos
Enero-Febrero								
M	8	58.95±11.32	2.10±1.69	38.95±11.68	6	74.66±14.15	19.74±14.71	5.61±3.27
H	5	63.89±4.56	0.26±0.26	35.85±4.46	7	37.87±7.99	44.39±11.69	17.74±8.66
Marzo-Abril								
M	6	75.33±9.15	3.09±3.09	21.58±8.87	7	91.21±8.14	0.00±0.00	8.79±8.14
H	7	93.43±2.20	0.00±0.00	6.56±2.20	6	98.15±0.97	0.00±0.00	1.85±0.97
Mayo-Junio								
M	5	95.33±1.39	0.38±0.38	4.29±1.31	3	94.38±3.06	0.00±0.00	5.62±3.06
H	4	91.15±6.57	0.00±0.00	8.85±6.57	6	98.52±0.37	0.00±0.00	1.48±0.37
Julio-Agosto								
M	2	91.67±4.52	0.00±0.00	8.33±4.52	4	91.10±3.53	0.00±0.00	8.91±3.53
H	7	75.72±12.36	0.00±0.00	27.28±12.36	6	92.66±2.69	1.31±0.73	5.52±2.81
Septiembre-October								
M	7	58.15±12.73	17.44±8.18	24.42±8.61	7	15.92±12.03	83.29±12.09	0.79±0.27
H	14	32.82±6.15	44.84±9.96	21.97±6.34	9	44.01±15.11	53.51±15.31	2.47±0.96
Noviembre-Diciembre								
M	5	9.24±2.09	87.64±4.00	0.99±0.64	4	5.22±2.33	94.22±2.51	0.55±0.37
H	11	22.15±8.89	69.01±12.14	7.55±3.89	4	6.32±1.57	93.68±1.57	0.00±0.00
Total								
M	33	61.72±6.09	18.11±5.62	19.85±4.30	31	60.20±7.78	34.79±8.14	5.01±1.99
H	48	53.79±5.15	28.06±5.69	17.76±3.12	38	63.75±6.54	30.92±6.9	5.25±1.87
total	81	57.06±13.17	23.96±5.82	18.62±7.67	69	61.25±10.72	33.44±6.35	5.26±12.68

Tabla 21: Grado del solapamiento de la dieta de cada grupo de plantas (H: Herbáceas, F: Frutos, A: Arbustivos) consumidas por la especie de ciervo (C) y gamo (G) considerando tanto machos (CM. GM) y hembras (CH. GH) de ambas especies respectivamente. Variaciones a lo largo del año en Lugar Nuevo, al sur de España número de ciervos entre paréntesis (media± D.E.)

	<i>Enero-Febrero</i>			<i>Marzo-Abril</i>			<i>Mayo-Junio</i>			<i>Julio-Agosto</i>			<i>Septiembre-October</i>			<i>Noviembre-Diciembre</i>			total
	H	F	A	H	F	A	H	F	A	H	F	A	H	F	A	H	F	A	
C-G	0.75	0.56	0.58	0.97	-	0.15	1.00	-	0.57	0.93	-	0.15	0.75	0.85	0.07	0.76	1.00	0.00	150
	26 (0.63±0.10)			26 (0.56±0.52)			18 (0.79±0.50)			19 (0.54±0.50)			37 (0.56±0.42)			24 (0.59±0.52)			(0.61±0.10)
CM-CH	0.52	0.00	0.45	0.90	-	0.17	0.88	-	0.45	0.37	-	0.06	0.79	0.10	0.81	0.82	0.99	0.98	81
	13 (0.32±0.28)			13 (0.54±0.48)			9 (0.67±0.44)			9 (0.22±0.19)			21 (0.57±0.40)			16 (0.93±0.10)			(0.54±0.25)
GM-GH	0.59	0.22	0.30	0.90	-	0.17	0.71	-	0.69	0.88	-	0.29	0.27	0.66	0.17	0.74	1.00	1.00	69
	13 (0.37±0.20)			13 (0.54±0.48)			9 (0.70±0.40)			10 (0.59±0.45)			16 (0.37±0.26)			8 (0.91±0.15)			(0.58±0.21)
CM-GM	0.59	0.95	0.65	0.85	-	0.13	0.77	-	0.87	0.66	-	0.11	0.55	0.68	0.55	0.76	1.00	0.01	64
	14 (0.73±0.19)			13 (0.49±0.46)			8 (0.82±0.48)			6 (0.39±0.35)			14 (0.59±0.08)			9 (0.59±0.52)			(0.60±0.16)
CH-GH	0.67	0.25	0.49	0.92	-	0.19	0.81	-	0.56	0.73	-	0.08	0.75	0.85	0.07	0.76	1.00	0.00	86
	13 (0.47±0.21)			13 (0.56±0.49)			10 (0.69±0.42)			13 (0.41±0.40)			23 (0.56±0.42)			15 (0.59±0.52)			(0.55±0.10)
CM-GH	0.67	0.22	0.30	0.97	-	0.26	0.91	-	0.79	0.61	-	0.98	0.68	0.53	0.23	1.00	1.00	0.00	71
	15 (0.40±0.24)			12 (0.62±0.50)			11 (0.85±0.49)			8 (0.80±0.50)			16 (0.48±0.23)			9 (0.67±0.58)			(0.64±0.18)
CH-GM	0.79	0.28	0.59	0.97	-	0.36	0.84	-	0.39	0.73	-	0.05	0.21	0.41	0.08	0.77	1.00	0.01	79
	11 (0.55±0.26)			14 (0.67±0.49)			7 (0.62±0.42)			11 (0.39±0.41)			21 (0.23±0.17)			15 (0.59±0.52)			(0.51±0.17)

4.1 Variación estacional de la dieta

Como era de esperar, las diferencias significativas entre estaciones en la dieta de los ciervos se encontraron para arbustos ($F = 9.095$, P -valor < 0.001), herbáceas ($F = 38.443$, P -valor < 0.001) y frutos ($F = 50.169$, P -valor < 0.001). Una dieta anual dominada por gramíneas se registró en ambas especies. Las herbáceas son el principal recurso en la primavera, consumida en cuanto están disponibles incluso como pasto seco, y siendo menos significativo su consumo en invierno (ver **Tabla 20** y **Figura 22**). Los arbustos fueron un importante recurso alimenticio en dos períodos: al final del invierno y al final del verano y los frutos fueron los recursos más elegidos en otoño e invierno. Entre los frutos, destacaron las bellotas como el principal tipo de fruto consumido y el mayor contribuyente al peso de rumen seco en este período. Las plantas acuáticas como *Ranunculus aquatilis*, *Lemna minor*, y *Myriophyllum alterniflorum* fueron consumidos ocasionalmente en verano. En ninguna de las dos especies de cérvidos se encontró que ingirieran ningún elemento de las coníferas.

No se encontró diferencias significativas en la composición de la dieta debido a la edad (Arbustos $F = 0.570$, P -value = 0.685; Herbáceas $F = 0.920$ P -valor = 0.456; Frutos $F = 0.671$, P -valor = 0.614), probablemente debido a la exclusión de los cervatillos. Sin embargo, la composición de la dieta con respecto a leñosas dependió también de sexo y especie ($F = 10.879$, P -valor < 0.001), y para el consumo de frutos las variaciones fueron estadísticamente significativas, debidas también a la interacción entre el sexo, las especies y las estaciones ($F = 2.351$, P -valor < 0.05). Se comprobó que la dieta varió, mostrándose diferentes estrategias de alimentación entre las especies y sexos.

4.2 Dieta específica y comportamientos alimentarios

En general, los ciervos fueron más ramoneadores que los gamos, y aunque los cérvidos seleccionan una alta proporción de frutos, se detectaron diferencias entre las especies y sexos, siendo los gamos los más frugívoros (ver **Tabla 20** y **Figura 22**).

Los gamos ingirieron un mayor porcentaje de frutos y durante un periodo de tiempo más largo (desde antes de septiembre hasta febrero). Al final del verano, las hembras fueron las primeras en comenzar a comer frutos, a pesar de que las bellotas maduras aun eran escasas. Los machos utilizaron más recursos arbustivos que en otros períodos de dos meses y fueron los mayores consumidores de frutos en septiembre-octubre, mientras que las hembras fueron las más frugívoras al final de la temporada de bellota. En este período los machos de ciervo y las hembras

fueron en su mayoría ramoneadores, pero los machos comieron un gran porcentaje de hierbas secas, mientras que las ciervas utilizaron más frutos, al igual que las hembras de gamo. En noviembre-diciembre todos consumieron un alto porcentaje de frutos, las ciervas en menor medida que los ciervos. Teniendo en cuenta todo el período de producción de bellota, las hembras de ciervo comieron menos frutos que los demás. Las diferencias sexuales se encontraron para los gamos en enero y febrero, cuando las hembras comían más frutos mientras que los machos consumieron más pasto con un porcentaje similar al del ciervo. Las diferencias entre sexos también se encontraron para los ciervos en dos períodos: en marzo-abril, cuando los machos ingerieron una mayor proporción de ramoneo y menos pastos, mientras que las hembras consumieron más pastos, comportándose de manera similar a los gamos, y en julio y agosto con las hembras comieron más extracto arbustivo y menos pastos que los machos, siendo similar al comportamiento de los gamos de ambos sexos. Encontrándose que para ambas especies y sexos durante Mayo-Junio más del 90% de la dieta se compuso de gramíneas.

4.3 Similitud de la dieta

Las variaciones en el índice de solapamiento de la dieta resultaron ser inter-específica e intra-específica durante todo el año. Hubo un gran solapamiento general entre la dieta de ciervos y gamos. La similitud global de las dietas inter-específica fue un promedio de 0.61, siendo menor en julio y agosto, aumentando en enero-febrero y alcanzando el mayor grado de solapamiento general en mayo-junio con un índice de 0,73, en el momento en que todos los cérvidos comparten los recursos de pastos verdes (ver **Tabla 21**).

Las máximas similitudes intra-específicas se encontraron en noviembre y diciembre con niveles de alrededor de 0.93 en ciervo y 0.91 en gamo. Sin embargo, con frecuencia los machos y las hembras de la misma especie mostraron bajo índice de solapamiento en la dieta, y hubo más similitudes inter-específicas, cuando utilizaban los mismos recursos alimentarios los cérvidos de diferentes especies, al mismo tiempo. En enero-febrero, el más bajo índice de solapamiento se dio intra-específicamente, con 0,32 para los ciervos y 0.37 para el gamo. En este momento el más alto índice de solapamiento se registró entre los machos de ambas especies (0.73) y entre los machos de gamo y hembras de ciervo (0.55). En marzo-abril el solapamiento de dieta intra-específicas fue siempre alrededor del 50%, pero los mayores solapamientos se encontraron también inter-específicamente entre ciervo macho y hembra de gamo (0.62) y la hembra de ciervo y macho de gamo (0.67). De mayo a agosto los ciervos machos fueron más similares a los gamos que a las

hembras de su propia especie. En mayo y junio el grado de solapamiento máximo fue entre ciervos machos y gamos de ambos sexos (0.81 y 0.85 respectivamente). Por otra parte, en julio-agosto el solapamiento de dieta más bajos se encontró para las hembras y los machos de ciervo (0.22). El solapamiento de las dietas más importantes en este periodo se dio para los machos de ciervo y las hembras de gamo (0.80). En julio-agosto las hembras de ciervo se comportaron significativamente diferentes a los otros cérvidos. En septiembre y octubre los niveles más altos de superposición de la dieta se hallaron entre los machos (0.59) y hembras (0.56) de ambas especies, así como el nivel más bajo entre las hembras de gamo y los machos de ciervo y gamo, con un 0.37 y un 0.23 de índices de solapamiento respectivamente (ver **Tabla 21**).

5 DISCUSIÓN

5.1 Variaciones estacionales y especificidad de la dieta a lo largo del año

La variación de la dieta en cérvidos ha sido asociado con factores ambientales como hábitat, época del año (Gebert y Verheyden-Tixier, 2001), y la variación sustancial en las clases de forraje consumido entre años, debido a las diferencias en la disponibilidad de estos forrajes (McCullough, 1985). A lo largo de todo un año de estudio se encontró una dieta anual dominada por gramíneas en ambas especies, mientras que otras áreas europeas han registrado una dieta anual dominada por arbustos (Clutton-Brock y Albon, 1989). Los cervidos en nuestra área fueron arbustivos o ramoneadores en dos períodos: al final del invierno y del verano, pero en otros estudios tanto ciervos como gamo eran principalmente ramoneadores desde la primavera hasta el otoño y en invierno herbáceos (Putman, 1986; Verheyden-Tixier et al., 2008). Estos resultados sobre la elección de los pastos o arbustos en las diferentes estaciones son similares a los publicados para ciervo en el norte de Australia (Dryden y Finch, 2002), probablemente debido a las condiciones climáticas similares.

A medida que va cambiando la vegetación, el comportamiento alimentario de los ciervos también va cambiando considerablemente, pasando de herbívoros a través de alimentarios intermedios a los ramoneadores (Putman y Flueck, 2011). La disponibilidad de cada tipo de alimento parece ser una importante fuente de la variación, pero el cambio de un ramoneador a una dieta de herbáceas también ha sido relacionada con la disponibilidad de los nutrientes (Verheyden-Tixier et al., 2008). Aquí los factores importantes son las necesidades de los animales

en cada estación, su situación fisiológica y su capacidad específica para compensar los períodos de recursos limitantes.

En el ecosistema mediterráneo del sur de España, debido a la falta de lluvias y las altas temperaturas, la temporada limitante es el verano (sobre todo al final del verano) en lugar del invierno, como es el caso en el ecosistema del norte. Sin embargo, un segundo período de restricción podría ocurrir a finales de invierno, si la escasez de frutos coincide con la falta de lluvias. Nuestra investigación se llevó a cabo en un año húmedo, con precipitaciones en primavera y otoño que proporcionó abundante material disponible de planta verde en el pasto a partir de mayo y junio, convirtiéndose en pasto seco en verano, y la garantía de un nuevo crecimiento de las plantas verdes y hierba en invierno, junto con una buena producción de bellota a partir de finales de septiembre hasta finales de febrero.

Coincidiendo con Bugalho y Milne (2003) se observó que cuando los pastos eran ampliamente disponibles, los cérvidos son predominantemente herbáceos, mientras que cambiaron a una estrategia de ramoneo cuando se redujo la disponibilidad de pasto. Sin embargo, los pastos lo utilizaron menos en invierno, a pesar de estar aún disponible después de las lluvias durante el otoño, ya que los frutos fue el recurso más seleccionado en noviembre-diciembre. Las bellotas de *sp. Quercus* se convirtió en una interesante fuente de energía, y de reserva para los períodos de restricciones nutricionales. Todos los cérvidos prefieren elegir la bellota, en un gran porcentaje, probablemente porque las bellotas eran más eficaces en el suministro de sus necesidades en ese momento. Las bellotas, que tienen un nivel muy alto de glúcidos y lípidos (más del 85% de MS), con un contenido de ácido oleico hasta un 60% (Rodríguez-Estévez et al., 2008), permitió al cérvido acumular reservas de grasa, compensar la posible inanición, la escasez del verano y durante el periodo de celo cuando principalmente los machos pierde peso y condición corporal. Probablemente las principales adaptaciones para superar la escasez de alimentos de verano son, unos pastos de calidad suficiente en la primavera previa y una cantidad suficiente de bellota en otoño y el invierno a fin de recuperar peso y acumular reservas de grasa. Esto puede reflejar una buena plasticidad de los ciervos Mediterráneos y la capacidad para compensar la escasez estacional de alimentos. En los períodos de restricción puede ocurrir un mayor daño a la vegetación, por el ramoneo provocados principalmente por los ciervos, ya que estos son generalmente más ramoneadores que los gamos, especialmente cuando el pasto y frutos son escasos.

De esta manera, se encontró entre las diferencias inter-específicas, que el gamo comenzó a consumir antes bellota e inició la compensación para la inanición del verano, al menos varias semanas antes que los ciervos, mostrando una mayor capacidad para sobrevivir al verano por consumir más frutos y hierbas que el ciervo. Estos hechos pueden explicar la mejor condición corporal observada en octubre y febrero, durante la temporada de caza (C. Azorit y Moro J., obs. pers.) y un mayor éxito reproductivo en el gamo teniendo una mejor condición corporal en el comienzo del verano (Azorit et al., 2002b).

Los ciervos y los gamos se comportaron como alimentadores intermediarios o mixtos, pero con diferencias significativas entre ellos. Los ciervos eran más ramoneadores comiendo plantas leñosas, mientras que los gamos fueron más frugívoros, comportándose como selectores de frutos y como ramoneadores en menor grado que los ciervos. Los cérvidos son generalmente clasificados entre los ramoneadores o selectores de concentrados, que seleccionan partes de plantas altamente nutritivas (hojas de los árboles, los frutos y las semillas), o alimentadores intermedios, que se adaptan a los cambios estacionales en la cantidad y calidad de los alimentos disponibles alternando entre el pasto y los arbustos (Hofmann, 1989). Pero el follaje de arbustos, madera o tallos no siempre puede ser considerado "concentrados" debido a la lignina, taninos y otros compuestos secundarios indigeribles, por lo que las clasificaciones se han propuesto teniendo en cuenta los componentes de la dieta de frutos y planta verde por separado (Bodmer, 1990). La afirmación general de que en arbustos hay unos niveles mayores de contenido de azúcares solubles y en gramíneas de proteínas (Gordon, 2003) se contradujo en algunos trabajos recientes como el desarrollado por Verheyden-Tixier y colaboradores (2008). La investigación sobre la relación entre los atributos de la planta y la selección de alimentos nutritivos, según la especie de cérvido, sería interesante para un próximo estudio.

5.2 Diferencias sexuales, competencia potencial inter- e intra-específica.

La información sobre los solapamientos en el uso de recursos es fundamental para la comprensión de la competencia inter-específica y el reparto de recursos. Por otra parte, la disponibilidad de recursos está determinada no sólo por factores como la estacionalidad, sino también por las interacciones inter e intra-específica. La importancia de la competencia como un factor primario en la determinación de la organización estructural de las comunidades de origen animal ha sido objeto de intenso debate durante las últimas dos décadas (Schoener, 1974). El solapamiento en sí mismo no implica competencia, de hecho, puede haber a menudo una relación

inversa entre el solapamiento y la competencia. Si los recursos no son escasos, dos organismos pueden compartirlo sin perjudicarse entre ellos, por lo que un amplio solapamiento del nicho en realidad puede resultar con una reducción del nicho, como se especifica en la "hipótesis de solapamiento de nicho" de Pianka (1974). Por lo general, varias condiciones deben cumplirse para que exista una competencia de explotación inter-específica o intra-específica, como por ejemplo debe haber coincidencia en el uso del hábitat y en la dieta consumida, y el recurso compartido debe ser limitado (Boer y Prins, 1990).

Un alto grado de solapamiento puede ser un buen indicador de una ausencia de competencia, debido a un reparto de los recursos comunes, siempre y cuando los recursos sean abundantes y ya que si son escasos, existirá una competencia, aunque el solapamiento disminuya en la temporada de escasez (Gordon y Illius, 1989). La mayoría de los estudios han encontrado una disminución en el solapamiento de nicho, cuando los recursos son limitados, lo que se ha atribuido a los efectos de la competencia moderada (Schoener, 1982).

En nuestra área de estudio, hubo un alto solapamiento total de la dieta para ciervos y gamos. El valor alto de solapamiento puede depender de la escala a la que se midan los recursos, de modo que si las plantas ingeridas se calculan a nivel de especies, es probable que se dé un valor alto de solapamiento (Latham, 1999).

Sin embargo, se registraron variaciones significativas e interesantes a nivel de especie, el sexo y la estación. El mayor índice de coincidencia se produjo en los momentos de abundancia de recursos como es en primavera y otoño, cuando todas las especies compartían pastos y bellotas, respectivamente. Este alto grado de solapamiento, puede indicar una ausencia de competencia que permita un reparto de los recursos comunes. Por otro lado, la más baja similitud de dieta que hemos encontrado fue en los períodos de escasez de recursos, al final de invierno y verano, lo que sugiere que puede darse competencia. También en estos periodos de escasez, se observó un alto grado de variación intra-específica, debido al sexo, dándose también un bajo solapamiento de las dietas entre sexos de la misma especie. Como se puede ver en la **Tabla 21** el índice de solapamiento entre ciervo macho y hembra en julio y agosto y entre machos y hembras de ambas especies en enero-febrero. Esto puede ser explicado como que los cérvidos evitan usar el mismo recurso utilizado por los miembros de su propia especie. La coexistencia de cérvidos debe modificar su comportamiento y las necesidades ecológicas, por lo menos cierta cantidad mínima, para evitar la exclusión competitiva.

La separación espacial o segregación sexual de las especies de cérvidos fuera de la época de celo y las diferencias ecológicas en los hábitos alimentarios, debido a que se alimentan en zonas diferentes, puede reducir la competencia intra-específica. Sin embargo, en temporada de celo, encontramos un índice alto de grado solapamiento entre machos y hembras de ambas especies, debido a que comparten el mismo espacio, encontrando también diferencias intra-específicas en la dieta, destacando sobre todo la baja similitud de la dieta entre los machos y las hembras de gamo.

Se han explicado diferentes estrategias de alimentación por adaptaciones morfo-fisiológicas (Hofmann, 1989), y como consecuencia del tamaño corporal (Geist, 1974, Illius y Gordon, 1992), ya que los cérvidos más grandes tenderían a consumir más forraje rico en fibra, tales como hierbas de digestión lenta, que los más pequeños. Además los cérvidos pequeños serían menos capaces de aprovechar los forrajes de baja calidad, que los más grandes, debido a la incompatibilidad de los requerimientos metabólicos necesarios (mayor capacidad intestinal) con una disminución del tamaño corporal (Demment y Van Soest, 1985).

Sin embargo, el ciervo con un peso medio de 66.37 kg (con un máximo de 103 kg) tenía una dieta en mayo-junio con una similitud de más del 80% con ambos sexos del gamo, pesando los machos unos 37.67 kg (máximo de 51,8 kg) y las hembras 24,67 kg (con un máximo registrado de 37,2 kg) y con la cierva en julio-agosto.

Las diferencias detectadas entre los dos sexos en los ciervos y gamos no apoyan las predicciones derivadas de tamaño corporal específico y las características morfo-fisiológicas, pero probablemente puede ser explicado como una consecuencia de las diferentes demandas metabólicas (Baboza y Bowyer, 2000).

En la diferencia sexual de la calidad de la dieta durante el invierno, se ha registrado que las ciervas comen una dieta de mejor calidad que los ciervos, dándose como explicación la segregación sexual (Clutton-Brock et al., 1982). A lo mejor es obligatorio para las ciervas cambiar a una estrategia de ramoneador y la búsqueda de forraje más concentrado, debido a las demandas fisiológicas tales como la lactancia o incluso el final de la gestación en algunas hembras. Pero se han registrado que el ramoneo contiene niveles más bajos de azúcares solubles y proteínas que los pastos (Verheyden-Tixier et al., 2008), por lo que la relación entre los atributos nutricionales de la planta y la selección de alimentos de los ciervos de acuerdo con el estado reproductivo o

fisiológico y los requerimientos estacionales para ambos sexos y especies, deben ser investigados para facilitar una mejor evaluación de los hábitos alimentarios de los ciervos.

6 IMPLICACIONES

Es trascendental conocer los requerimientos alimentarios que necesitan y seleccionan las poblaciones animales de cérvidos para una buena gestión, así como, es imprescindible los estudios de la capacidad de carga y la plasticidad fisiológica de las especies, ya que una sobre abundancia o un déficit en los requerimientos de estos animales pueden causar graves daños en la vegetación y una reducción en la condición corporal, siendo de especial importancia en los periodos de sequía ya que en estas temporadas los problemas anteriormente mencionados se agravan. Dándole un mayor énfasis a la competencia intra- e inter-específica y al solapamiento de recursos en poblaciones simpátricas como las que nos ocupan. Jugando un papel esencial en la dinámica poblacional y así determinar si se hace imprescindible en algunos periodos el uso de tratamientos compensatorios de los recursos, mediante el suministro de alimentación suplementaria.

CAPITULO 5:
DISCUSIÓN GENERAL

El control de la calidad nutricional, el bienestar y la selección de la dieta de los ciervos silvestres son una parte esencial de la gestión de caza desde hace mucho tiempo (Hodgman et al., 1996). Los estudios sobre los índices de la calidad nutricional tales como la variación de fibra en la dieta, así como la eficiencia digestiva también son necesarios para comprender adecuadamente los mecanismos de adaptación en la investigación ecológica (Robbins et al., 1995; Pérez-Barbería et al., 2004; Codron et al., 2007).

La calidad nutricional se ha venido evaluando mediante diferentes parámetros, a través de métodos que dificulta la realización de análisis masivos, debido a su lentitud (Alomar y Fuchslocher, 1998). Aunque algunos de estos métodos como el de la determinación de las fibras son relativamente simples, tienen algunas limitaciones como en el caso de la NDF, donde la fibra soluble se pierde y algunas sustancias pécticas de la pared son solubilizadas (Van Soest, 1994). O en el caso del método Klason-lignina, cuyos valores pueden estar sobre o subestimados debido a la contaminación por proteínas (Monties, 1989). Sin embargo Hatfield y colaboradores (1994) comentaron que este método puede ser el mejor para estimar el contenido de lignina. El método de ADL, siendo el método más común para la determinación de lignina, también subestima su valor debido a la solubilización de algunas ligninas en el paso anterior de ADF (Lowry et al., 1994). Por todos estos inconvenientes existe una gran controversia entre los diferentes autores sobre el método más apropiado para la cuantificación de la lignina.

Estos métodos gravimétricos necesitan tiempo, unas cantidades relativamente altas de muestra y de reactivos, además, los resultados obtenidos se ven afectados por muchas variables y algunas veces no muestran las proporciones reales de los constituyentes de interés. Por esas razones, se muestra como una herramienta de excepción para el seguimiento de la condición nutricional de ciervos y gamos en Sierra Morena, la espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), aunque sus calibraciones requieran tiempo, especialización, y un gran número de muestras con valores de referencia conocidos con precisión y fiabilidad para cada parámetro analizado.

Desde la década del setenta se perfila a nivel mundial la espectroscopia de reflectancia cercana al infrarrojo (NIRS), como una técnica alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales, con muy buen potencial para obtener estimaciones seguras y muy rápidas de la composición química nutricional de forrajes (Givens, 1993; De la Roza, 1993). Esta es una técnica no destructiva, rápida, de gran precisión y exactitud, siempre que se sigan los

procedimientos adecuados para generar las ecuaciones de predicción requeridas (Marten et al., 1989; Murray, 1993; Garrido et al, 1993) y no se utilice en especies, localidades o equipos diferentes en los que se ha realizado la calibración.

El NIRS es una técnica muy utilizada para estudiar la química de los residuos lignocelulósicos, ya que requiere poca preparación de la muestra (secado y molienda), se utilizan pequeñas cantidades de muestra para el análisis (unos pocos miligramos) (Pandey y Pitman, 2003) y el tiempo de análisis es muy corto. También evita los problemas de eliminación de residuos químicos orgánicos y otros, ya que no utiliza reactivos tóxicos o corrosivos (Mark et al., 2002), es de bajo costo (excepto por el alto costo inicial de la adquisición de equipos) y en su análisis no se destruye la muestra (Landau et al., 2004).

Una vez desarrollada y validada, la técnica NIRS resulta satisfactoria para la determinación fiable de parámetros nutricionales a partir de heces. La composición de las heces refleja las diferentes capacidades digestivas existentes (Leslie et al., 2008), debido a las diferencias fisiológicas entre los animales, tales como la estructura, la naturaleza de la flora microbiana y la velocidad de paso por el intestino (Van Soest, 1994). Las heces contienen una amplia variedad de información sobre la dieta, la fisiología y la ecología de los animales (Coleman et al., 1993; Dixon y Coates, 2009). Por esto es una interesante aplicación la utilización directa de los espectros NIR en heces, para relacionarlos con los atributos de la dieta (Dixon y Coates, 2009).

Uno de los primeros aspectos que se plantean al desarrollar una calibración, es el número de muestras que será necesario incluir para obtener resultados satisfactorios. No existe un número mínimo definido, sino que éste dependerá del parámetro a predecir y de la naturaleza del producto a evaluar. Cuando se pretende analizar entidades químicas simples, en productos más heterogéneos, se requieren más de 100 muestras (Shenk y Westerhaus, 1993c). En este sentido, Murray (1993) indica que es poco probable obtener calibraciones robustas en su uso rutinario para analizar forrajes, si se cuenta con menos de 100 muestras. Por estas razones, nuestro número muestral superaba las 100 muestras, constando un total de 260 muestras analizadas de ciervo y gamo.

El éxito de las ecuaciones de predicción va a depender de la fiabilidad del método químico tradicional utilizado, debido a que los resultados de estos análisis químicos son los que utilizamos como referencia en las calibraciones quimiométricas.

El análisis quimiométrico de los espectros obtenidos a partir de muestras de heces y los resultados del análisis químico del contenido ruminal ha permitido obtener ecuaciones predictivas fiables para la predicción de FAD, FND, lignina, C:N, digestibilidad, CWD, celulosa, hemicelulosa y azúcares tanto para ciervos como para gamos. Así lo muestran la bondad de ajuste, los indicadores de calidad de las ecuaciones y la validación externa.

En general, se encontraron buenos modelos de calibración con una precisión satisfactoria, donde los valores bajos de RMSEP en todos los casos fueron muy similares a los RMSECV, así como los valores de RMSEC fueron aceptables y los RER alcanzaron valores superiores a 12, considerándose la calibración aceptable, para el control de calidad, e incluso excelente para la cuantificación exacta (Millmier et al., 2000).

La exactitud de las ecuaciones predictivas fecal-NIRS para ADF, NDF, C:N, lignina y EDOM, en comparación con los valores de química húmeda, fueron buenos debido a que todos los modelos dieron valores de coeficientes de correlación mayores a 0,8. Las concentraciones generales de ADF y NDF fueron parecidas a las detectadas en otras especies de ciervos (Hodgman et al., 1996), no obstante, estas concentraciones de fibras, junto con la de lignina, fueron menores en gamos que en ciervos, coincidiendo con los meses de primavera, cuando nuestros cévidos se alimentaban más de herbáceas (Azorit et al., 2012), ocurriendo lógicamente al contrario para la EDOM, donde la digestibilidad fue en los ciervos menor que en los gamos y mayor en estos meses de primavera (Tellado y Azorit, 2014).

El aumento de C:N, debido a la reducción de las concentraciones de N y el aumento de los carbohidratos estructurales, conduce a la disminución de la calidad foliar (Couture et al., 2012). Este aumento se observó que ocurría cuando había un consumo mayor de porción arbustiva, por lo que también está relacionado con el aumento de carbohidratos en la dieta, favorecido también por un mayor consumo de frutos en esta época que además coincide con mayores índices de azúcares (Tellado et al., en revisión). Las ecuaciones de calibración de C:N se consideraron aceptables ya que tuvieron unos valores bajos de los errores, siendo el RMSEP mayor que RMSEC en todas las ecuaciones obtenidas (Alomar y Fuchslocher, 2008). Tanto en ciervo como en gamo, cuando había un mayor consumo de frutos había una mayor concentración de azúcares y de C:N así como una mayor digestibilidad enzimática. Durante los periodos de restricción, cuando se comportaban como ramoneadores debido al dominante nivel de lignina de este tipo de dieta,

aumentaba la concentración de fibras como ADF, NDF, celulosa y hemicelulosa, habiendo una menor digestibilidad (EDOM y CWD) del contenido ruminal para ambas especies.

Obtuvimos ecuaciones para la determinación de celulosa con valores bajos para los errores de calibración, que oscilaron entre 0,6 y 2,53, menores a los publicados en especies leñosas (Petisco et al., 2005; Poke y Raymond, 2006), y con unos coeficientes de correlación de 0,87 a 0,99, que fue considerado como excelente (Workman, 2001; Williams, 2001). Los niveles más altos de celulosa y hemicelulosa coincidieron a finales de verano, siendo niveles similares a los encontrados en verano por otros estudios en el área mediterránea (Zarovali et al., 2007), mientras que los niveles más bajos de celulosa y hemicelulosa se encontraron en enero (Tellado et al., en revisión).

La calibración de la lignina nos dio unos valores bajos para los errores de calibración, menores que los encontrados en otros ciervos (*Cervus elaphus nelsoni*) del noreste de Oregón (Keating, 2005). Los valores de RMSEP y de RMSECV fueron ligeramente superiores a los de estudios similares, pero dentro de unos límites aceptables (Dryden, 2003).

Se encontró que la digestibilidad de la dieta seleccionada por los cérvidos varía entre especies y estación, y esta variación fue coherente con la disponibilidad y la dieta consumida. Para el índice de digestibilidad de la pared celular (CWD) encontramos unos valores altos cuando hubo un mayor porcentaje de celulosa, ya que es la porción de la fibra más fácilmente digerible de la pared celular de las plantas (Bach y Calsamiglia, 2006), coincidiendo también con el final de verano cuando el forraje y pasto seco supone entre un 75-92% de la dieta (Azorit et al., 2012). Aparte encontramos un índice CWD más alto en gamos que en ciervos, debido a que los ciervos consumieron una dieta significativamente más rica en fibras poco digestible que los gamos.

Las diferencias en la composición de la dieta han sido consideradas como posibles fuentes de incompatibilidad para los modelos de predicción entre especies (Aufrère et al., 1996). Por lo que creímos que sólo tendrían eficiencia las ecuaciones de predicción individuales, ya que la dieta del ciervo tenía una mayor proporción de especies arbustivas que los gamos, que consumieron más bellotas en el área de estudio, siendo mas frugívoros y menos ramoneadores (Azorit et al., 2012); sin embargo las ecuaciones conjuntas para la determinación de NDF, lignina, CWD, hemicelulosa y azúcares fueron compatibles para la predicción de muestras de ciervos y gamos

indistintamente. Y las ecuaciones específicas para cada especie están más recomendadas si se quieren valorar parámetros como ADF, EDOM, C:N y celulosa.

La ecuación de calibración que hemos conseguido con mejores estadísticos para la predicción fue la 7. conjunta del índice CWD, dándonos los valores más fiables en la predicción de las muestras no incluidas en la calibración. En comparación con este índice, las ecuaciones con los peores estadísticos pero aceptables, serían para la determinación de azúcares, posiblemente por el número inferior de muestras. Las ecuaciones obtenidas para la digestibilidad enzimática (EDOM), tampoco dieron unos resultados estadísticos tan buenos como los de CWD porque la predicción de la digestibilidad de la dieta con NIRS en heces es menos exitosa, como hemos comentado anteriormente, es más difícil de determinar, debido a las características e influencia del animal en cuestión; ya que no es sólo un componente químico de la alimentación. Por lo tanto, el error inherente asociado con la cuantificación de digestibilidad de la dieta es mayor que la asociada con la cuantificación del resto de parámetros químicos de la dieta y relativamente fáciles de medir

Acerca de la composición botánica, observamos un consumo dominante en la dieta de gramíneas en ambas especies. No obstante, tanto al final del invierno, como del verano la fracción arbustiva de la dieta era elevada, comportándose como ramoneadores en estos periodos del año de escasez de recursos (Bugalho et al., 2001). No coincide con otros estudios cuyo periodo ramoneador está comprendido desde la primavera hasta el otoño, y herbáceo en invierno (Putman, 1986; Verheyden-Tixier et al., 2008). Sin embargo estos resultados de la elección de la fracción vegetal según la época del año, coincidieron con los publicados en el norte de Australia para ciervos (Dryden y Finch, 2002), probablemente debido a las condiciones climáticas similares al tratarse también de zonas con clima mediterráneo.

Observamos que cuando elegían ser predominantemente herbáceos, coincidía con la abundancia de pasto, y cuando se reducía la cantidad de éste, cambiaban de estrategia para ser más ramoneadores, este comportamiento también fue observado por Bugalho y Milne en su trabajo de 2003. En los meses de noviembre y diciembre, habiendo aun herbáceas, el recurso más seleccionado por nuestros cérvidos fue los frutos, coincidiendo con la disponibilidad de bellotas.

Finalmente, afirmar que nuestra hipótesis inicial en este trabajo se ha cumplido siendo los datos resultantes tras el análisis de las heces en el espectroscopio de infrarrojo cercano (NIRS)

para el estudio de la alimentación de ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y gamo (*Dama dama*) en ecosistemas mediterráneos, igual de validos para determinar la calidad de la dieta, que los métodos químicos tradicionales.

Sería interesante, para un próximo estudio, la investigación sobre la relación entre los atributos de la planta y la selección de alimentos nutritivos según la especie de cérvido. También sería un interesante foco para estudios futuros acerca de la utilización eficiente de los recursos, un mejor conocimiento de las posibles diferencias de capacidades anatómicas y fisiológicas de los procesos gastrointestinales entre las especies de cérvidos. Todo ello podría implicar estudios de tipo experimental con animales vivos en condiciones controladas.

CAPITULO 6:
CONCLUSIONES GENERALES

- 1.- La calibración de un espectrofotómetro de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) es caro, requiere mucho esfuerzo, tiempo y gran número de análisis. Además, esta técnica ha de ser validada y estandarizada cada vez que se quiera utilizar en especies, localidades o equipos diferentes.
- 2.- La metodología NIRS y el análisis quimiométrico han permitido la obtención de ecuaciones predictivas fiables para la valoración de índices de calidad de dieta en cervidos silvestres. Como queda de manifiesto a partir de la bondad de ajuste, los demás indicadores estadísticos y los resultados de las validaciones externas.
- 3.- Para el estudio de la alimentación de ciervo y gamo en ecosistemas mediterráneos, los datos resultantes del análisis de las heces a través del método NIRS han resultado igual de válidos para determinar la calidad de la dieta que los métodos químicos tradicionales.
- 4.-Nuestras ecuaciones conjuntas para la determinación de NDF, lignina, CWD, hemicelulosa y azúcares fueron fiables para la predicción de muestras de ciervo y de gamo indistintamente. Mientras que para la determinación de ADF, EDOM, C:N y celulosa resulta más seguro el uso de las ecuaciones específicas en cada caso.
- 5.- En general ambas especies de cérvidos fueron arbustivos o ramoneadores en dos períodos: al final del invierno y del verano. El resto del año fueron predominantemente herbáceos, con la excepción del otoño y comienzo del invierno cuando los frutos fueron el recurso más seleccionado.
- 6.- Esto explica las variaciones a lo largo del año en los índices de calidad de dieta estudiados. Así, las épocas con la dieta más nutritiva, fueron la primavera con mayor cantidad de herbáceas ricas en nitrógeno así como finales de otoño y principios de invierno, probablemente debido al aumento del consumo de frutos, principalmente bellota.
- 7.- Por el contrario, los menores índices de CWD de final del invierno coinciden con niveles altos de ramoneo en ambas especies, lo que implica una menor digestibilidad debido a la mayor cantidad de lignina. Mientras que a finales de verano se detectan mayores índices C:N y menores concentraciones de azúcares coincidiendo con el consumo de pasto seco.

8.- También se detectaron diferencias inter-específicas en la dieta de las especies estudiadas. El ciervo consumió dietas menos digeribles que el gamo, con índices CWD y EDOM más bajos y mayor concentración de ADF, NDF y lignina. Probablemente como consecuencia de un comportamiento más ramoneador en el caso del ciervo y más frugívoro en el caso del gamo.

9.- En el gamo observamos un periodo de consumo de bellotas temporalmente más amplio y un contenido mayor de herbáceas que en el ciervo. Lo que puede darle a esta especie ventaja a la hora de adquirir mejor condición corporal y mayor capacidad para afrontar épocas de escasez.

10.- Una vez desarrollada y validada, la técnica NIRS se muestra como una herramienta de excepción para el seguimiento de la condición nutricional de ciervos y gamos en Sierra Morena. La calibración fecal-NIRS es una herramienta útil, no invasiva, para el estudio de las variaciones de la calidad de la dieta de los cervidos mediterráneos.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC. (1999). Near-infrared methods: Guidelines for model development and maintenance- AACC Method 39-00. Approved methods of the American Association of cereal chemists; AACC Press; St. Paul, MN.
- Abney C. y Festing L.C. (1882). Note on the Absorption Spectrum of Iodine in Solution in Carbon Disulphide. Proceedings of the Royal Society of London. 34(220-223): 480-482.
- Acevedo P., Ruiz-Fons F., Vicente J., Reyes-García A. R., Alzaga V. y Gortázar C. (2008). Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. Journal of Zoology. 276: 37-47.
- Alomar D. y Fuchslocher R. (1998). Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarojo cercano (NIRS) como metodo de analisis de forrajes. Agro sur. 26(1): 88-104.
- Álvarez G. y Ramos J. (1991). Estrategias alimentarias del ciervo (*Cervus elaphus L.*) en Montes de Toledo. Doñana Acta Vertebrata. 18(1): 63-99.
- Álvarez Jimenez G. (1999). Ecología y gestión de las poblaciones de cérvidos, ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus capreolus*), en los Quintos de Mora (Montes de Toledo). Tesis Doctoral de la Facultad de ciencias biológicas. Universidad Complutense de Madrid
- Alves A., Schwanninger M., Pereira H. y Rodrigues J. (2006). Analitical pirolisis as a direct method to determine the lignin content in Wood. Part 1: Comparison of pyrolysis lignin with Klason lignin. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 76: 209-213.
- Anderson A.E., Snyder W.A. y Brown G.W. (1965). Stomach content analyses related to condition in mule deer, Guadalupe Mountains, N.M. Journal of Wildlife Management. 29: 352-366.
- AOAC. (1995). Official methods of analysis, 16th edition. Association of Official Analytical Chemists; Washington, DC. 30.
- Aragonés L. (1997). Dugongs and green turtles: grazers in the tropical seagrass ecosystem. PhD thesis, James Cook University, Townsville, Australia.
- Arenzana O., García F. y Fraile J.L. (1965) Repoblaciones de caza mayor. Bol. Téc. Serie cinegética. SNPFC. Ministerio de agricultura. Madrid
- Arman P., Hopcraft D. y McDonald I. (1975). Nutritional studies on East African herbivores. 2. Losses of nitrogen in faeces. British Journal of Nutrition. 33: 265-276.
- Audesirk T., Audesirk G y Byers B.E. (2003). Biology: Life on Earth. Sixth Edition. Pearson Education Inc. ISBN 0-13-089941.
- Aufrère J., Graviou D., Demarquilly C., Pérez J.M. y Andrieu, J. (1996). Near infrared reflectance spectroscopy to predict energy value of compound feeds for swine and ruminants. Animal Feed Science and Technology. 62: 77-90.

- Azorit C. (1999). Determinación de la edad y su aplicación a la gestión de la caza del ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) en Sierra Morena Oriental. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén, España
- Azorit C., Analla M., Carrasco R., Calvo J.A. y Muñoz-Cobo J. (2002a). Teeth eruption pattern in red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) from southern Spain. *Annals of Biology* 24: 193-200.
- Azorit C., Analla M., Moro J., Gutierrez R., Carrasco R. y Muñoz-Cobo J. (2002b). Reproductive success of deer from Sierra Morena in southeastern Spain. In 'Proceedings of the 5th International Deer Biology Congress. Scientific program and abstracts'. Pp: 6-7.
- Azorit C., Analla M., Carrasco R. y Muñoz-Cobo J. (2002c). Influence of age and environment on antler traits in Spanish red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Zeitschrift fur Jagdwissenschaft*. 48: 137-144.
- Azorit C., Analla M., Hervás J., y Muñoz-Cobo J. (2004). Aging through growth marks in teeth of Spanish red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Wildlife Society Bulletin*. 32(3): 702-710.
- Azorit C. (2005). La importancia de la gestión de los ciervos en sierra morena oriental. *Anales*. 18 (1): 15-21
- Azorit C., Tellado S., Oya A. y Moro J. (2012). Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain: A preliminary approach of feeding behaviour. *Animal Production Science*. 51(4): 78-82.
- Bach A. y Calsamiglia S. (2006). La fibra en los rumiantes ¿química o física?. XXII curso de especialización Fedna. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Barboza P.S. y Bowyer R.T. (2000). Sexual segregation in dimorphic deer: a new gastrocentric hypothesis. *Journal of Mammalogy*. 81: 473-489.
- Barton II F.E. (1989). Spectra. En: Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality. (Ed) Marten G.C, Shenk J.S. y Barton F.E. II. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook (revised with supplements). 643: 30-32.
- Behrend A., Lechner-Doll M., Jürgen Streich W. y Clauss M. (2004). Seasonal faecal excretion, gut fill, liquid and particle marker retention in mouflon *Ovis ammon musimon*, and a comparison with roe deer *Capreolus capreolus*. *Acta Theriologica*. 49: 503-515.
- Benner R., Maccubbin A.E., y Hodson R.E. (1984). Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide components of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. *Applied and Environmental Microbiology*. 47(5): 998-1004.
- Blanchard P., Festa-Bianchet M., Gaillard J.M. y Jorgenson J.T. (2003). A test of long-term fecal nitrogen monitoring to evaluate nutritional status in bighorn sheep. *Journal Wildlife Management*. 67(3): 477-484.
- Blanco M.M. (1956). A contribution to the study of the area of evergreen oak (*Quercus ilex* L.) and its nutritive value to livestock in the Province of Cordoba (Spain). *Archivos de Zootecnia*. 5(18):103-97.

- Bodmer R.E. (1990). Ungulate fugivores and the browser-grazer continuum. *Oikos* 57: 319-325.
- Boisen S. y Fernández J.A. (1991). In vitro digestibility of energy and amino acids in pig feeds. En: Digestive physiology in pigs. (Ed) Verstegen M.W.A., Huisman J. y Hartog L.A. PuDoc, Wageningen, the Netherlands. Pp: 231-236
- Boval M., Coates D.B., Lecompte P., Decruyanaere V. y Archimede H. (2004). Faecal near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to assess chemical composition, in vivo digestibility and intake of tropical grass by Creole cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 114: 19-29.
- Braza F. (2002). *Dama dama* (Linnaeus, 1758). En: Atlas de los mamíferos terrestres de España. (Ed) Palomo L. J. y Gisbert J. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-SECEM-SECEMU, Madrid. Pp: 314-317
- Braza F. (2011). Gamo (*Dama dama*). En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. (Ed) Salvador, A., Cassinello, J. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Brinkmann K., Blaschke L. y Polle A. (2002). Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implication of lignoproteins. *Journal of Chemical Ecology*. 28:2483-2501.
- Brooks J., Anderson M. y Urness P.J. (1984). Infrared reflectance of forage quality for elk. *Journal of Wildlife Management*. 48: 254-258.
- Brown W.A.B. y Chapman N.G. (1990). The dentition of fallow deer (*Dama dama*): a scoring system to assess age from wear of the permanent molariform teeth. *Journal of Zoology*. 221: 659-682.
- Bruce R.J. y West C.A. (1989). Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology*. 91:889-897
- Bugalho M.N., Milne J.A. y Racey P.A. (2001). The foraging ecology of red deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean environment: is a larger body size advantageous? *Journal of Zoology*. (London). 255: 285-289.
- Bugalho M.N. y Milne J.A. (2003). The composition of the diet of red deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean environment: a case of nutritional constraint? *Forest Ecology and Management*. 181: 23-29.
- Burthey A. (1991). Étude du regime alimentaire du cerf de Barbarie par analyse des feces. Diplome d'Études. École Pratique des Hautes Études, France.
- Butkute B. y Slepeliene A. (2004). Near Infrared reflectance Spectroscopy as a fast method for simultaneous prediction of several soil quality component. *Journal Chemija*. T. 15(2): 12-20.
- Cabrera A. (1914). Fauna Ibérica. Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN). Madrid.

- Campa H., Woodyard D.K. y Haufler J.B. (1984). Reliability of captive deer and cow in vitro digestion values in predicting wild deer digestion levels. *Journal Range Management*. 37: 468-470.
- Carranza J. (2002). *Cervus elaphus* Linnaeus, 1758. Ciervo rojo. En: Atlas de los mamíferos terrestres de España. (Ed) Palomo L.J. y Gisbert J. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-SECEM-SECEMU, Madrid. Pp: 310-313
- Carranza J. (2004). Ciervo-(*Cervus elaphus*). En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. (Ed) Carrascal L.M. y Salvador A. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Carranza J. (2007). Calidad en la gestión cinegética del ciervo. En: Criterios para la certificación de la calidad cinegética en España. (Ed) Carranza J. y Vargas J.M. Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Carrier M., Loppinet-Serani A., Denux D., Lasnier J.M., Ham-Pichavant F., Cansell F. y Aymonier C. (2011). Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy*. 35: 298-307
- Casalea M., Oliveri P., Casolino C., Sinelli N., Zunin P., Armanino C., Forina M. y Lanteri S. (2012). Characterisation of PDO olive oil Chianti Classico by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical Techniques. *Analytica Chimica Acta*. 712: 56- 63
- Casler M.D. y Shenk J.S. (1985). Effect of sample grinding size on forage quality estimates of smooth brome grass clones. *Crop Science*. 25: 167-170.
- Castro A.G., Rodríguez Berrocal J., Collado J., Medina C.M. y Peinado L.E. (1978). The Mediterranean shrubby vegetation and its valoration. VII. Variation in chemical content of *Cistus ladanifer* L. *Archive Zootecnia*. 27(107):1-5.
- Cerón J.J., Hernández F., Madrid J. y Gutiérrez C. (1996). Chemical composition and nutritive value of fresh and ensiled carnation (*Dianthus caryophyllus*) by-product. *Small Ruminant Research*. 20: 109-112.
- Chamrad A.D. y Box T.W. (1964). A point-frame for sampling rumen contents. *Journal of Wildlife Management*. 28: 473-477.
- Chippendale G. (1962). Botanical composition of kangaroo and cattle stomach contents. *The Australian journal of science*. 25: 21-22.
- Cho S., De Vries J.W. y Prosky L. (1997). *Dietary Fiber Analysis and Applications*. Gaithersburg, MD: AOAC.
- Ciurczak E.W. y Drennen J.K. (2002). *Pharmaceutical and Medical Applications of NearInfrared Spectroscopy*, Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA.
- Clutton-Brock T.H., Guinness F.E. y Albon S.D. (1982). *Red deer. Behavior and ecology of two sexes*. Edinburgh University Press.

- Clutton-Brock T.H. y Albon S.D. (1989). 'Red deer in the Highlands.' (Blackwell Scientific Publications: Oxford)
- Coates D.B. (1999). Faecal spectroscopy (NIRS) for nutritional profiling of grazing cattle. En: International Rangeland Congress. Townsville Queensland Australia. pp: 466-68.
- Codron D., Lee-Thorp J.A., Sponheimer M. y Codron J. (2007). Nutritional content of savanna plant foods: implications for browser/grazer models of ungulate diversification. *European Journal of Wildlife Research*. 53: 100-111.
- Coleman S.W. y Murray I. (1993). The use of near-infrared reflectance spectroscopy to define nutrient digestion of hay by cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 44: 237-249.
- Contreras Lara D., Gutiérrez Chávez L., Valdivia Macedo I., Govea Casares R. y Ramírez Carrillo J.T. (1999). Two techniques for measuring neutral detergent (NDF) and acid detergent fibers (ADF) in forages and by products. *Archive Zootecnia*. 48: 351-354.
- Courtright A.M. (1959). Results of some detailed analyses of caribou rumen contents. Tenth Alaskan Science Conference Proceedings. Pp: 28-35.
- Couture J.J., Meehan T.D. y Lindroth R.L. (2012). Atmospheric change alters foliar quality of host trees and performance of two outbreak insect species. *Oecologia*. 168: 863-876.
- Darr R.L. (2009). Effects of habitat enrichment on white-tailed deer selective foraging and productivity in a semi-arid landscape: an ecological approach using stable isotopes (tesis de maestría). Kingsville: Texas A&M University.
- Davies A.M. y Grant A. (1987). Review: Near infra-red analysis of food. *International Journal of Food Science and Technology*. 22: 191-207.
- De Boer W.F. y Prins H.H.T. (1990). Large herbivores that strive mightily but eat and drink as friends. *Oecologia*. 82: 264-274.
- De la Roza B. (1993). Uso de la técnica NIRS en trabajos de I+D en el IEPA. En: A.Gómez Cabrera y E.J. de Pedro Sauz (Eds.), *Nuevas Fuentes de Alimentos para la Producción Animal IV*, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Pp: 271-278.
- Decruyenaere V., Lecompte Ph., Demarquilly C., Aufrere J., Dardenne P., Stilmant D. y Buldgen A. (2009). Evaluation of green forage intake and digestibility in ruminants using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): Developing a global calibration. *Animal Feed Science and Technology*. 148: 138-156.
- Demment M.W. y Van Soest P.J. (1985) A nutritional explanation for body size patterns of ruminant and non-ruminant herbivores. *American Naturalist*. 152: 641-672.
- Dixon R. y Coates D. (2009). Review: near infrared spectroscopy of faeces to evaluate the nutrition and physiology of herbivores. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 17: 1-31.

- Dixon R.M. y Coates D.B. (2010). Diet quality estimated with faecal near infrared reflectance spectroscopy and responses to N supplementation by cattle grazing buffel grass pastures. *Animal Feed Science and Technology*.158: 115-125.
- Djordjevic N., Popović Z. y Grubić G. (2006). A study of the Chemical composition of the rumen contents in roe deer as a quality indicator of their feeding. *Journal of Agricultural Sciences*. 51(2): 133-140.
- Domínguez S., Villar P., Peñuelas J.L., Herrero N. y Nicolás J.L. (1999). Técnicas para cultivar encinas en suelos agrícolas. *Quercus*. 166: 22-25.
- Douglas F.S., Terry B.R., Thomas R. S. y Perry S.B. (2004). Sexual segregation in moose Alces alces: an experimental manipulation of foraging behaviour. *Wildlife biology*. 10:1.
- Druckerab D.G., Hobsona K.A., Ouelletc J.P. y Courtoisid R. (2010). Influence of forage preferences and habit at use on 13C and 15N abundance in wild caribou (*Rangifer tarandus caribou*) and moose (*Alcesalces*) fromCanada. *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 46: 107-121.
- Dryden G.McL. y Finch N.A. (2002). Performance and condition of the wild red deer herd of southeastern Queensland, Australia. In: *Proceedings of the 5th International Deer Biology Congress*. Scientific program and abstracts. Pp: 45-46.
- Dryden G.McL. (2003). Near Infrared reflectance Spectroscopy; applications in Deer Nutrition. Tesis doctoral. School of Animal Studies, The University of Queensland, Gatton Q4343, Australia.
- Dumont B., Renaud P., Morellet N., Mallet C., Anglard F. y Verheyden-Tixier H. (2005). Seasonal variations of Red Deer selectivity on a mixed forest edge. *Animal Research*. 54: 369-381
- Dzieciolowski R. (1969). Repartition of hábitat niches within the area of red deer (*Cervus elaphus* L.) population. *Ekologia Polska*. 17: 381-389.
- Ebringerova A., Hromadkova Z. y Heinze T. (2005). Hemicellulose. In: *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use*. Springer-Verlag, Berlin. 186: 1-67.
- Everitt J.H. y Gonzalez C.L. (1981). Seasonal nutrient content in food plants of white-tailed deer on the south Texas plains. *Journal of Range Management*. 34: 506-510.
- Fanchone A., Boval M., Lecomte Ph. y Archimède H. (2007). Faecal indices based on near infrared spectroscopy to assess intake, in vivo digestibility and chemical composition of the herbage ingested by sheep (crude protein, fibres and lignin content). *Journal Near Infrared Spectroscopy*. 15: 107-113.
- Fanchone A., Archimède H. y Boval M. (2009). Comparison of fecal crude protein and fecal near-infrared reflectance spectroscopy to predict digestibility of fresh grass consumed by sheep. *Journal Animal Science* .87: 236-243.
- Feam T. (2002). Assessing calibration: SEP, RPD, RER and R2. *NIR News*. 13(6): 12-14.

- Fierro Y., Gortázar C., Landete-Castillejos T., Vicente J., García A. y Gallego L. (2002). Baseline values for cast antlers of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*. 48: 244-251.
- Foley W.J., McIlwee A., Lawler I., Aragones L., Woolnough A. y Berding N. (1998). Ecological applications of near infrared spectroscopy a tool for rapid, cost effective prediction of the composition of plant and animal tissue and aspects of animal performance. *Oecologia*. 116: 293-305
- Freschet G.T., Cornilissen J.H.C., Logtestijn R.S.P.V. y Aerts R. (2010). Evidence of the plant economics spectrum in a subarctic flora. *Journal of Ecology*. 98: 362-373.
- Gadd G.M. (2001). *Fungi in Bioremediation*. Cambridge: British Mycological Society. Pp: 1-20
- Gallagher J.F. (1990). Fecal indices of nutritional status of whitetailed deer based on near-infrared reflectance. Ph.D. Dissertation. Texas A&M University, College Station. Pp: 1-62.
- García González R. y Cuartas P. (1992). Food habits of *Capra pirenaica*, *Cervus elaphus* and *Dama dama* in Cazorla Sierra (Spain). *Mammalia*. 56 (2).
- García J., Carabaño R., De Blas C. y García A. (2006). Importancia del tipo de Fibra: Nuevos conceptos y ejemplos para su aplicación en cunicultura. XXII Curso de especialización FEDNA.
- Garin I., Aldezabal A., García-González R. y Aihartza J.R. (2001). Composición y calidad de la dieta del ciervo (*Cervus elaphus L.*) en el norte de la Península Ibérica. *Animal Biodiversity and Conservation*. 24(1): 53-63.
- Garnsworthy P. C. y Unal Y. (2004). Estimation of dry-matter intake and digestibility in group-fed dairy cows using near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Science*. 79: 327-334.
- Garrido A., Guerrero J.E. y Gomez Cabrera A. (1993). Posibilidades y limitaciones de la aplicación de la técnica NIRS en la evaluación nutricional de alimentos para el ganado. En: *Nuevas Fuentes de Alimentos para la Producción Animal IV*. (Ed) Gómez Cabrera A. y De Pedro Sauz E.J.. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Pp: 243-255.
- Gebert C. y Verheyden-Tixier H. (2001). Variations of diet composition of Red Deer (*Cervus elaphus L.*) in Europe. *Mammal Review*. 31: 189-201.
- Geist V. (1974). On the relationship of social evolution and ecology in ungulates. *American Zoologist*. 14: 205-220.
- Geist V. (1998). *Deer of the world. Their evolution, behavior, and ecology*. Stackpole Books. Mechanicsburg. USA.
- Gill R.B., Carpenter L.H., Bartmann R.M., Baker D.L. y Schoonveld G.C. (1983). Fecal analysis to estimate mule deer diets. *Journal of Wildlife Management*. 47(4): 902-915.

- Gillon D., Houssard C. y Joffre R. (1999). Using near-infrared reflectance spectroscopy to predict carbon, nitrogen and phosphorus content in heterogeneous plant material. *Oecologia*. 118: 173-182.
- Givens D. (1993). Evaluating energy y protein in grass y grass silage. *Grass Farmer*. 45: 26-27
- Glasser T.A., Landau S.Y., Ungar E.D., Perevolotsky A., Dvash L., Muklada H., Kababya D. y Walker J.W. (2008). A fecal NIRS-aided methodology to determine goat dietary composition in a Mediterranean shrubland. *Journal of Animal Science*. 86: 1345-1356.
- Goering H.K. y Van Soest P.J. (1970). Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some application). *Agricultural Handbook 379*, USDA, ARS.
- Goffin R.A. y De Crombrughe S.A. (1976). Régime alimentaire du cerf (*Cervus elaphus*) et du chevreuil (*Capreolus capreolus*) et critères de capacité stationnelle de leurs habitats. *Mammalia*. 40: 355-376
- Gordon I.J. y Illius A.W. (1989). Resource partitioning by ungulates on the Isle of Rhum. *Oecologia* 79: 383-389.
- Gordon I.J. (2003). Browsing and grazing ruminants: are they different beasts? *Forest Ecology and Management*. 181, 13–21.
- Gortazar C., Herrero J., Villafuerte R. y Marco J. (2000). Historical examination of the status of large mammals in Aragon, Spain. *Mammalia*. 64: 411-422.
- Hanley T.A. (1982). The nutrition bias for food selection by ungulates. *Journal Range Management*. 35:145-151.
- Hanley T.A. (1997). A nutritional view of understanding and complexity in the problem of diet selection by deer (*Cervidae*). *Oikos*. 79: 209-218.
- Hatfield R.D., Jung H.G., Ralph J., Buxton D.R. y Weimer P.J. (1994). A Comparison of the Insoluble Residues Produced by the Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 65(1): 51–58.
- Hatfield R. y Fukushima R.S. (2005). Can lignin be accurately measured?. *Crop Science*. 45: 832-839.
- Haufler J.B. y Servello F.A. (1996). Techniques for wildlife nutritional analyses. In: *Reserch and management techniques for wildlife and habitat*. The Wildlife Society, Betnesda, Maruland, EEUU. Pp: 302-323.
- Henneberg W. y Stohmann F. (1859). On the Maintenance Feeding of One-year Old Cattle. (Ueber das Erhaltungsfutter volljahrigen Rindviehs.) *Journal Landwirtsch*. 3: 485-551
- Henneberg W. y Stohmann F. (1867). Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer, vol. 1. Braunschweig, Germany.

- Hernández Guzman S. (2010). Importancia de la fibra en la alimentación de los bovinos. Tesis doctoral en la facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Hill R.R. (1946). Palatability ratings of Black Hills plants for white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management*. 10: 47-54.
- Hilzeimer M. (1909). Neigen inselbewohnende Säugetiere zu einer Abnahme der Körpergröße? *Arch Rass Gessell Biol*. 3: 305-321.
- Hirth D.H.(1977). Social behavior of white-tailed deer in relation to habitat. *Wildlife Monogr*. 53:1-55.
- Hoch G. (2007). Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Functional Ecology*. 21: 823-834
- Hodge G.R. y Woodbridge W.C. (2004). Use of near infrared spectroscopy to predict lignin content in tropical and sun-tropical pines. *Journal Near Infrared Spectroscopy*. 12: 381-390.
- Hodgman T.P., Davitt B.B. y Nelson J.R. (1996). Monitoring mule deer diet quality and intake with fecal indices. *Journal Range Management*. 49: 215-222.
- Hofmann R.R. (1985). Digestive physiology of the deer- their morphophysiological specialization and adaptation. In *biology of deer production*, Wellington: the Royal Society of New Zealand. Eds Fennessy, P. F., and Drew, K. R. Pp: 393-407.
- Hofmann R.R. (1989). Evolutionary stops of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*. 78:443-457.
- Holechek J.L., Vavra M. y Pieper R.D. (1982a). Methods for determining the nutritive quality of range ruminant diets: a review. *Journal of Animal Science*. 54: 363-376.
- Holechek J.L., Vavra M. y Pieper R.D. (1982b). Botanical composition determination of range herbivore diet: a review. *Journal of Range Management* 35: 309-315.
- Holisova V., Obrtel R. y Kozena I. (1986). Seasonal variation in the diet of field Roe Deer (*Capreolus capreolus*) in southern Moravia. *Folia Zoologica*. 35(2): 97-115.
- Hou S. y Laigeng L. (2011). Rapid Characterization of woody biomass digestibility and Chemical composition using Near-infrared Spectroscopy. *Journal of integrative Plant Biology*. 53(2):166-175.
- Huston J.E., Rector B.S., Ellis W.C. y Allen M.L. (1986). Dynamics of digestion in cattle, sheep, goats and deer. *J Anim Sci*. 62(1): 208-215
- Hut P. (2004). *Forest Products Chemistry. Chemistry of Cellulose Making: Module II – Basics of Wood Chemistry*. Helsinki University of Technology
- Illius A.W. y Gordon I.J. (1992). Modelling the nutritional ecology of ungulate herbivores: evolution of body size and competitive interactions. *Oecologia*. 89: 428–434.

- Illius A.W., Gordon I.J., Elston D.A. y Milne J.D. (1999). Diet selection in goats: a test of intake-rate maximization. *Ecology*. 80 (3): 1008–1018.
- Irwin L.L., Cook J.G., McWhirter D.E., Smith S.G. y Arnett E.B. (1993). Assessing winter dietary quality in bighorn sheep via fecal nitrogen. *Journal Wildlife Management*. 57: 413-421.
- Jianzhang M., Junsheng L., Zhaowen J. y Mingbo G. (1999). Nitrogen and fiber concentration in rumen contents and feces contents of Mongolian gazelles. *J Forest Research*. 10 (2): 103-106.
- Jensen P.V. (1968). Food selection of danish red deer (*Cervus elaphus* L.) as determined by examination of the rumen content. *Danish Review of Game Biology*. 5: 1–44.
- Jones D. y Hayward M. (1975). The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulose solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 26: 711-718.
- Jones D. y Theodorou M. (2000). Enzyme techniques for estimating digestibility. En: *Forage evaluation in ruminant nutrition*. (Ed) Givens D., Owen E., Axford R., y Omed H. CABI Publishing, Oxon, UK. Pp. 155-173.
- Jung H.G y Deetz D.A. (1993). Cell wall lignifications and degradability. En: *Forage cell wall structure and digestibility*. (Ed) Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield R.D. y Ralph J. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison WI. Pp 315.
- Katoh K., Kajita Y., Odashima M., Ohta M. y Sasaki Y. (1991). Passage and digestibility of Lucerne (*Medicago sativa*) hay in Japanese sika deer (*Cervus Nippon*) and sheep under restricted feeding. *Britain Journal Nutrition*. 66: 399-405.
- Kay R.N.B. y Staines B.W. (1981). The nutrition of the red deer (*Cervus elaphus*). *Nutrition Abstracts and Reviews*. 51: 601–622.
- Keating M.S., Stuth J.W. y Tolleson D.R. (2001). Prediction of diet quality parameters of rocky mountain elk via near infrared reflectance spectroscopy fecal profiling. In: *Proceedings of the Texas Chapter, Wildlife Society Meetings*, College Station, Texas, Texas A&M University. Pp: 25–27.
- Keating M.S. (2005). Prediction of the diet quality parameters of Rocky Mountain elk via near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) fecal profiling. Ph.D. Dissertation. College Station, TX: Texas A&M University. Pp:118
- Kirk T.K. y Cullen D. (1998). Chapter 9: Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi. En: Young RA, Akhtar M. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. Toronto: John Wiley y Sons. Pp: 273-307
- Körner C. (2003). Carbon limitation in trees. *Journal of Ecology*. 91: 4–17
- Korschgen L.J. (1966). Foods and nutrition of ruffed grouse in Missouri. *Journal of Wildlife Management*. 30: 86-100

- Landau S., Glasser T., Dvash L. y Perevolotsky A. (2004). Faecal NIRS to monitor the diet of Mediterranean goats. *South African Journal of Animal Science*. 34: 76-80.
- Landau S., Glasser T., Muklada H., Dvash L., Perevolotsky A., Ungar E.D. y Walker J.W. (2005). Fecal NIRS prediction of dietary protein percentage and in vitro dry matter digestibility in diets ingested by goats in Mediterranean scrubland. *Small Ruminant Research*. 59: 251-263.
- Landau S., Glasser T. y Dvash L. (2006). Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: A review. *Small Ruminant Research*. 61: 1-11.
- Landau S., Giger-Reverdin S, Rapetti L., Dvash L., Dorleans M. y Ungar E.D. (2008). Data mining old digestibility trials for nutritional monitoring in confined goats with the aid of fecal near infra-red spectrometry. *Small Ruminant Research*. 77: 146-158.
- Latham J. (1999). Interspecific interactions of ungulates in European forests: an overview. *Forest Ecology and Management* 120: 13-21.
- Leite E.R. y Stuth J.W. (1995). Fecal NIRS equations to assess diet quality of free-ranging goats. *Small Ruminant Research*. 15: 223-230.
- Leslie D.M. y Starkey E.E. (1987). Fecal indices to dietary quality a reply. *Journal of Wildlife Management*. 51: 321-325.
- Leslie D.M.Jr., Terry-Bowyer R. y Jenks J.A. (2008). Facts From Feces: Nitrogen Still Measures Up as a Nutritional Index for Mammalian Herbivores. *Journal of Wildlife Management*. 72(6): 1420-1433.
- Li H., Tolleson D., Stuth J., Baic K., Mo F. y Kronberg S. (2007). Faecal near infrared reflectance spectroscopy to predict diet quality for sheep. *Small Ruminant Research*. 68: 263-68.
- Ligi K. y Randveer T. (2012). Pre-winter Diet Composition of Estonian Red Deer (*Cervus elaphus* L.) in Estonia. *Balt For*. 18(1): 150-155.
- Lowry J.B., Conlan L.L., Schlink A.C. y McSweeney C.S. (1994). Acid Detergent Dispersible Lignin in Tropical Grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 65(1): 41-50.
- Lyons R.K. y Stuth J.W. (1992). Fecal NIRS equations for predicting diet quality of free-ranging cattle. *Journal Range Management*. 45(3): 238-244.
- Machado O. (1997). Valor nutricional de los alimentos - Elementos de Evaluación y Factores de Calidad. 1ª ed. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Maisels F.G. (1988). The feeding ecology of the Cyprus mouflon *Ovis orientalis* Gmelin 1774, in the Paphos forest, Cyprus. PhD thesis, Univ. of Edinburgh, Edinburgh.
- Maizeret C., Boutin J.M. y Sempere A. (1986). Intéret de la méthode micrographique d'analyse des fèces pour l'étude du régime alimentaire du Chevreuil (*Capreolus capreolus*). *Gibier Faune Sauvage*. 3: 159-183.

- Mann J.C.E. (1983). The Social Organisation and Ecology of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Southern England. Doctoral thesis. University of Southampton. United Kingdom.
- Mark H., Ritchie G.E., Roller R.W., Ciurszak E.W., Tso C. y MacDonald S.A. (2002). Validation of a near-infrared transmission spectroscopic procedure, part A: validation protocols. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 28: 251-260.
- Marten G.C., Shenk J.S. y Barton F.E. (1989). Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No.643 (revised with supplements). Pp: 110.
- Martin A.C. (1949). Procedures in wildlife food studies. U.S. Fish and Wildl. Service Wildlife Leaflet. 325: 10.
- Martínez A., De la Roza M.B. y Argamentería A. (1990). Valoración bromatológica de ensilados de hierba de la zona litoral de Asturias por reflectancia de infrarrojos. En: XXX Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos. Ponencias y comunicaciones. Donostia-San Sebastián. Pp: 256-263
- Martínez T. (2002). Comparison and overlap of sympatric wild ungulate diet in Cazorla, Segura y las Villas Natural Park. *Pirineos*. 157: 103–116.
- McCullough D.R. (1985). Variables influencing food habits of white-tailed deer on the George Reserve. *Journal of Mammalogy*. 66(4): 682–692.
- McLeod M.N. y Minson D.J. (1978). The accuracy of the pepsin--cellulase technique for estimating the dry matter digestibility in vivo of grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*., 3: 277--287.
- McInnis M. (1977). A comparison of four methods used in determining the diets of large herbivores. M.S. Thesis. Oregon State Univ., Corvallis. Pp:127.
- Medin D.E. (1970). Stomach content analyses: collections from wild herbivores. En: Range and wildlife habitat evaluation: A research Symposium. U.S. Department of agriculture forest service miscellaneous publication. 1147: 133-145.
- Meineri G., Peiretti P.G. y Masoero G. (2008). Appraisal of ingestion and digestibility in growing rabbits using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) of feeds and faeces. *Italian Journal Animal Science*. 8: 75-82.
- Meissner H.H., Zacharias J.P.K. y O'Reagain P.J. (1999). Forage quality (feed value). In: Tainton NM (ed) Veld management in South Africa. University of Natal Press, Pietermaritzburg, South Africa. Pp 139-168.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.
- Millmier A., Lorimor J., Hurburgh C., Fulhage C., Hattey J.Z. y Hang H. (2000). Near-infrared sensing of manure nutrients. *Trans ASAF*. 43: 903-908.

- Monties B. (1989). Lignins. En: *Methods in Plant Biochemistry*, Volume I. (Ed) Dey P.P. y Harborne J.B. London: Academic Press. Pp. 113-157
- Moore J.E., Goetsch A.L., Luo J., Owens F.N., Gallean M.L., Jonson Z.B., Saúl T. y Ferrell C.L. (2004). Prediction of fecal crude protein excretion of goats. *Small Ruminant Research*. 53: 275-292.
- Morrison I.M. (1972). A semi-micro method for the determination of lignin and its use in prediction the digestibility of forage crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 23:455-463.
- Mould E.D. y Robbins C.T. (1982). Digestive capabilities in elk compared to white-tailed deer. *The Journal of Wildlife Management*. Pp: 22-29.
- Moussie A.M., Van der Veen C.E.J., Veen G.F. y Van Diggelen R. (2005). Ecological correlates of seed survival after ingestion by Fallow Deer. *Functional Ecology*. 19: 284-290.
- Muñoz-Cobo J. (1991). Sierra Morena/ Jaén. Actas de las I jornadas Medioambientales del Parque Natural "Sierra de Andújar". Pp: 83-98
- Murray I. (1988). Aspects of the interpretation of Near Infrared Spectra. *Food Science and Technology Today*. 2: 135-140.
- Murray I. (1993). Forage Analysis by Near Infra-Red Reflectance Spectroscopy. In: *Sward Measurement Handbook*, Second Edition. (Ed) Davies A., Baker R.D., Grant S.A. y Laidlaw A.S. British Grassland Society. Pp: 285-312.
- Naes T., Isakson T., Fearn T. y Davies T. (2002). Validation. En: *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. (Ed) Naes T., Isakson T., Fearn T. y Davies T. NIR Publications Chichester, UK. Pp. 155-177.
- Norris J.J. (1943). Botanical analysis of stomach contents as a method of determining forage consumption of range sheep. *Ecology*. 24: 244-251.
- Norris K.H. (1989). NIRS Instrumentation. En: *Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*. (Ed) Marten G.C, Shenk J.S. y Barton F.E.II. U.S. Department of Agriculture, *Agriculture Handbook*. 643: 12-17.
- Nugent G. (1983). Deer diet estimation by rumen or faecal analysis: an evaluation of available techniques. *Forest Research Institute Bulletin*. 24: 1-17.
- Nugent G., McShea W.J., Parkes J., Woodley S., Waithaka J., Moro J., Gutierrez R., Azorit C., Mendez-Guerrero F., Flueck W.T. y Smith-Flueck J.M. (2011). Policies and management of overabundant deer (native or exotic) in protected areas. Summary workshop and symposia. *Animal Production Science* 51, 384-389.
- Olivas S.M., Vital G.C. y Flores M.J. (2014). Métodos para determinar la composición de la dieta en venados: Comparación de su efectividad y factibilidad. *Revista Bio Ciencias*. 2(4): 252-260.

- Osborn R.G., Jenks J.A. y Jensen W.F. (1997). Diet of north dakota elk determined from rumen and fecal analyses. *Prairie Natr.* 29 (4): 237-248.
- Otis D. (1997). Analysis of habitat studies with multiple patches within cover type. *Journal of Wildlife Management.* 61: 1016-22.
- Palacios F., Martínez T. y Garzón P. (1980). Datos sobre la ecología alimenticia del ciervo (*Cervus elaphus hispanicus* Hilzheimer, 1909) y el gamo (*Dama dama* Linneo, 1758) durante otoño e invierno en el Parque Nacional de Doñana. II Reunión Iberoamericana Cons. Zool.Vet. Pp: 444-454.
- Palacios F., Martínez T. y Garzón P. (1989). Data on the autumn diet of the red deer (*Cervus elaphus* L., 1758) in the Montes de Toledo (Central Spain). Doñana. *Acta Vertebrata.* 16: 157-163.
- Pandey K.K. y Pitman A.J. (2003). FTIR Studies of the Changes in Wood Following Decay by Brown-rot and White-rot Fungi. *International Biodeterioration y Biodegradation.* 52(3): 151-160.
- Pauly M. y keegstra K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal.* 54: 559-568
- Perez-Barbería F.J., Elston D.A., Gorden I.J. y Illius A.W. (2004). The evolution of phylogenetic differences in the efficiency of digestion in ruminants. *Proc. Royal Society London.* 271(B): 1081-1090.
- Petisco C., García-Criado B., De Aldana B.R.V., Zabalgoceazcoa I., Mediavilla S. y García-Ciudad A. (2005). Use of near-infrared reflectance spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody plant species. *Anal Bioanal Chemistry.* 382(2): 458-465
- Pianka E.R. (1973). The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 4: 53-74.
- Pianka E.R. (1974). Niche overlap and diffuse competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 71: 2141-2145.
- Pojic M., Mastilovic J., Palic D. y Pestoric M. (2010). The development of near-infrared spectroscopy (NIRS) calibration for prediction of ash content in legumes on the basis of two different reference methods. *Food chemistry.* 123: 800-805.
- Poke F.S. y Raymond C.A. (2006). Predicting extractives, lignin, and cellulose contents using near infrared spectroscopy on solid wood in *Eucalyptus globulus*. *J Wood Chemical Technolgy.* 26 (2): 187-199.
- Poli B.M., Ponzetta M.P., Zappa A. y Giorgetti A. (1991). Voluntary intake and digestibilities of four diets in fallow deer and ewe. *Atti IX Congress Nazionale ASPA, ISHEA-Agricoltura Ricerca, Rome.* Pp: 363-370.

- Poli B.M. y Ponzetta M.P. (1994). Study on voluntary intake, selective capacity and energy requirements in fallow deer of different ages. *Atti Sot. Italian Science Veterinary*. 18: 1637-1641.
- Poli B.M., Focardi S. y Tinelli A. (1996). Composition and metabolizable energy of feed used by fallow deer (*Dama dama*) in a coastal Mediterranean ecosystem. *Small Ruminant Research*. 22: 103-109.
- Prosky L., Asp N-G., Furda I., Devries J.W., Schweizer T.F. y Harland B.F. (1984). Determination of total dietary fiber in foods, food products and total diets: interlaboratory study. *Journal Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.)*. 67: 1044-1052
- Puglisi M.J., Liscinsky S.A. y Harlow R.F. (1978). An Improved Methodology of Rumen Content Analysis for White-Tailed Deer. *J Wildlife Management*. 42 (2): 397-403
- Pullanagari R.R., Yule I., King W., Dalley D. y Dynes R. (2011). The use of optical sensors to estimate pasture quality. *International Journal on Smart Sensing and Intelligent Systems*. 4(1): 125-137.
- Purnomoadi A., Kurihara M., Nishida T., Shibata M., Abe A. y Kameoka K. (1996). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict fecal composition and its use for digestibility estimation. *Animal Science and Technology (Japan)*. 67: 851-861.
- Putman R.J. (1984). Facts from faeces. *Mammal revision*. 14 (2): 79-97.
- Putman R.J. (1986). *Grazing in temperate ecosystem: large herbivores and the ecology of the New Forest*. Croom-Helm. Chapman y Hall. London
- Putman R.J. y Hemmings G.J. (1986). Can dietary quality of free-ranging ungulates be simply determined from faecal chemistry?. *Acta Theriologica*. 13(20): 257-270.
- Putman R.J. (1988). *The natural history of deer*. Christopher Helm, London (UK).
- Putman R. y Flueck W.T. (2011) Intraspecific variation in biology and ecology of deer: magnitude and causation. *Animal Production Science*. 51: 277–291.
- Ramírez Lozano R.G. (2004). *Nutrición del Venado Cola Blanca*. Publicaciones Universidad Autónoma de Nuevo León. México. Pp: 73-87.
- Robbins C.T. (1993). *Wildlife feeding and nutrition*. New York: Academic Press
- Robbins C.T., Spalinger D.E. y Van Hoven W. (1995). Adaptation of ruminants to browse and grass diets: are anatomical-based browser-grazer interpretations valid? *Oecologia* .103: 208-213.
- Rodríguez-Berrocal J. (1978). Introducción al estudio y valoración de los recursos forestales y arbustivos para el ciervo en el área ecológica de Sierra Morena: I, Estudio de la dieta del ciervo. *Archivos de Zootecnia*. 27: 73-82.

- Rodríguez-Berrocal J., Castro-Escobar M.C. y Serrano T. (1987). Aprovechamiento de recursos alimenticios naturales: valoración nutritiva de algunas especies vegetales del climax Mediterráneo en biotopos de Sierra Morena. *Archivos de Zootecnia*. 36: 65-74.
- Rodríguez-Berrocal J. (1993). Utilización de los recursos alimenticios naturales. Nutrición y alimentación de rumiantes silvestres. Córdoba: Publ. Facultad de Veterinaria de Córdoba.
- Rodríguez-Estévez V., García A., Perea J., Mata C. y Gómez A.G. (2007). Acorn production at the dehesa: influential factors. *Archivos de Zootecnia*. 56: 25-43.
- Rodríguez-Estévez V., García A., Mata C., Perea-Muñoz J.M. y Gómez A.G. (2008). Measures and nutritional characteristics of quercus acorns from the dehesa. *Archivos de Zootecnia*. 57: 1-12.
- Saha B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30(5): 279-291.
- Schädel C., Blöchl A., Richter A. y Hoch G. (2009). Short-term dynamics of nonstructural carbohydrates and hemicelluloses in young branches of temperate forest trees during bud break. *Tree physiology*. 29(7): 901-911.
- Schaefer A.L., Young B.A. y Chimwano A.M. (1978). Ration digestion and retention times of digesta in domestic cattle (*Bos taurus*), American bison (*Bison bison*), and Tibetan yak (*Bos grunniens*). *Canadian Journal of Zoology*. 56 (11): 2355-2358.
- Schoener T.W. (1974). Resource partitioning in ecological communities. *Science*. 185: 27-39.
- Schoener T.W. (1982). The controversy over interspecific competition. *American Scientist*. 70: 586-595.
- Schwarm A., Albrecht S., Ortman S., Wolf C. y Claus M. (2010). Digesta retention time in roe deer *Capreolus capreolus*, as measured with cerium-, lanthanum-, and chromium-mordanted fibre. *European Journal of Wildlife Research*. 57: 437-442.
- Segura S.F., Echeverri F.R., Patiño Ll. y Arley C. (2007). Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *Vitae*. 14(1): 72-81.
- Servello F.A., Hellgren E.C. y McWilliams S.R. (2005). Techniques for wildlife nutritional ecology. In C.E. Braun, ed. *Techniques for Wildlife Investigations and Management*. Sixth Edition. The Wildlife Society, Bethesda, Maryland. Pp. 554-590
- Shenk J.S. y Westerhaus M.O. (1993a). Near infrared reflectance analysis with single and multiproduct calibrations. *Crop Science*. 33: 582-584
- Shenk J.S. y Westerhaus M.O. (1993b). Monograph: analysis of agriculture and food products by near-infrared reflectance spectroscopy. Infracore, Port Matilda.

- Shenk J. y Westerhaus M. (1993c). Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Monograph. Dept. of Agronomy, Penn State University and Infrasoft. International, Port Matilda, PA, USA. Pp: 116.
- Showers S.E. (1997). Prediction of diet quality parameters of white-tailed deer via near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) fecal profiling (M.S. Thesis) College Station, TX: Texas A&M Univ. Pp: 102.
- Showers S.E., Tolleson D.R., Stuth J.W., Kroll J.C. y Koerth B.H. (2006). Predicting Diet Quality of White-Tailed Deer via NIRS Fecal Profiling. *Rangeland Ecology and Management*. 59: 300-307.
- Simao-Neto M., Jones R.M. y Ratcliff D. (1987). Recovery of pasture seed ingested by ruminants. 1. Seed of six tropical pasture species fed to cattle, sheep and goats. *Australian Journal of Agricultural Research*'s. 27: 239-246.
- Smith W.R., Yu I. y Hungate R.E. (1973). Factors affecting cellulolysis by *Ruminococcus albus*. *Journal of bacteriology*. 114(2): 729-737.
- Smith A.D. y Shandruk L.J. (1979). Comparison of fecal rumen and utilization methods for ascertaining pronghorn diets. *Journal of Range Management*. 32: 275-279.
- Soriguer R., Fandos P., Bernaldez E. y Delibes J. (1994). El ciervo en Andalucía. Ediciones Consejería de Agricultura y Pesca, Jerez de la Frontera.
- Staines B.W., Crisp J.M. y Parish T. (1982). Differences in the quality of food eaten by red deer stags and hinds in winter. *Journal of Applied Ecology*. 19: 65-77.
- Stewart K.M., Bowyer R.T., Kie J.G., Dick B.L. y Bend D.M. (2003). Niche partitioning among mule deer elk and Cattle do stable isotopes reflect diet. *Ecoscience*. 10: 297-302.
- Storms D., Aubry P., Hamann J.L., Said S., Fritz H., Saint-Andrieux C. y Klein F. (2008). Seasonal variation in diet composition and similarity of sympatric red deer *Cervus elaphus* and roe deer *Capreolus capreolus*. *Wildlife Biology*. 14(2): 237-250.
- Stuth J., Jama A., Tolleson D. (2003). Direct and indirect means of predicting forage quality through infrared reflectance spectroscopy. *Field Crops Research*. 84: 45- 56.
- Talbot L.M. y Talbot M.H. (1963). The wilde beast in western Maisailand, East Africa. *Wildlife Monographs* .12: 88.
- Takatsuki S. y Ikeda S. (1993). Botanical and chemical composition of rumen contents of Sika deer on Mt Goyo, northern Japan. *Ecol Res*. 8 (1): 57-64.
- Tappi Test Method T222 om-88, 1998. Acid-Insoluble Lignin in Wood and Pulp. In Tappi Test Methods: Technical Association of the Pulp and Paper Industry; Atlanta, GA.
- Tellado S. y Azorit C. (2014). An integrative assay to quantify the nutritional quality of the selected diet of two Mediterranean free-living deer by Faecal-FT-NIRS. *Animal Production Science*. 55(1): 11-16.

- Tellado S., Orpez R., Muñoz-Cobo J. y Azorit C. (2015). Fecal-FT-NIRS as a Noninvasive Tool for Assessing Diet Quality of Mediterranean Deer. *Rangeland Ecology y Management*. 68: 92–99
- Tellado S., Puentes J.G., Orpez R. y Azorit C. (en revisión). NIRS as a non-invasive tool for assessing dietary compounds in two Mediterranean deer species. *Archives of Animal Nutrition*.
- Tixier H., Duncan P., Scephovic J., Yant A., Gleizes M. y Lila M. (1997). Food selection by European roe deer (*Capreolus capreolus*): effects of plant chemistry, and consequences for the nutritional value of their diets. *Journal of Zoology*. 242: 229-245.
- Tolleson D.R., Randel R.D., Stuth J.W. y Neuendorff D.A. (2005). Determination of sex and species in red and fallow deer by near infrared reflectance spectroscopy of the faeces. *Small Ruminant Research*. 57: 141-150.
- Tomkins N.W. y McMeniman N.P. (2006). The effects of different levels of dietary crude protein on urea metabolism of rusa deer (*Cervus timorensis*). *Small Ruminant Research*. 66: 187-196.
- Tornero Gómez J. (2005). Lugar Nuevo. Edita O.A. Parques Nacionales, España. Pp: 142-302.
- Tornero Gómez J. (2008). Selladores Contadero. Edita O.A. Parques Nacionales, España. Pp: 126-342.
- Torres G., Arbaiza F., Carcelén C., y Lucas A. (2009). Comparación de las técnicas in situ, in vitro y enzimática (celulasa) para estimar la digestibilidad de forrajes en ovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 20(1): 5-9.
- Van Barneveld R.J., Nuttall J.D., Flinn P.C. y Osborne B.G. (1999). Near infrared reflectance measurement of the digestible energy content of cereals for growing pigs. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 7: 1-7.
- Van der Made J. (2001). Les ongules d'Atapuerca. *Statigraphie et biogeography. Anthropologie*. 105: 95-113.
- Van Soest P.J. (1963). Use of detergents in the analisis of fibrous feeds. II. A rapid method for determination of fiber and lignin. *Journal Association of Official Agricultural Chemists*. 46: 829-835.
- Van Soest P.J. y Wine R.H. (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal Association of Official Agricultural Chemists*. 50: 50-55.
- Van Soest P.J., Robertson J.B. (1980). Systems of Analysis for Evaluating Fibrous Feeds. En: Pigden WJ, Balch CC, Graham M. (eds.) *Standardization of Analytical Methodology in Feeds*. Ottawa: International Research Development Center. Pp. 49-60.
- Van Soest P.J. (1982). *Nutritional Ecology of ruminants*. O. y B. Books, Inc., Corvallis, Oregon. USA. Pp: 374.

- Van Soest P.J., Robertson J.B. y Lewis B.A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3597.
- Van Soest P.J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant* (second edition). Cornell University Press, Ithaca, NY. Pp: 476
- Vavra M., Rice R.W. y Hansen R.M. (1978). A comparison of esophageal fistula and fecal material to determine steer diets. *Journal of Range Management*. 31(1): 11-13.
- Vavra M. y Holechek J.L. (1980). Factors influencing microhistological analysis of herbivore diets. *Journal of Range Management*. 33: 371-374.
- Venero González J.L. (1984). Dieta de los grandes fitófagos silvestres del Parque Nacional de Doñana, España. *Doñana Acta Vertebrata*. 11(3): 1-130.
- Verheyden-Tixier H., Renaud P.C., Morellet N., Besle J.M. y Dumont B. (2008). Selection for nutrients by red deer hinds feeding on a mixed forest edge. *Oecologia*. 156:715-726.
- Waelput J.J., Biston R. y Meuret M. (1990). Study of the potential of nearinfrared reflectance spectroscopy in the analysis of the tree foliage intake of goats. *Reproduction Nutrition Development*. (Suppl. II).Pp: 166.
- Walker J.W., McCoy S.D., Launchbaugh K.L., Fraker M.J. y Powell J. (2002). Calibrating fecal NIRS equations for predicting botanical composition of diets. *Journal Range Management*. 55: 374-382.
- Westerhaus M.O. (1989). Equation Development. En: *Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*. (Ed) Marten G.C., Shenk J.S. y Barton F.E. II. U.S. Department of Agriculture, Agric. Handbook (revised with supplements). 643: 38-39.
- Williams P.C. (2001). Implementation of near-infrared technology. En: *Near infrared technology in the agricultural and food industries* (second edition). (Ed) Williams P.C. y Norris K. 8: 145-169.
- Windham W.R. (1987). Influence of grind and gravimetric technique on dry matter determination of forages intended for analysis by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*. 27: 773-776.
- Wofford H., Holechek J.L., Galyean M.L., Wallace J.D. y Cardenas M. (1985). Evaluation of fecal indices to predict cattle diet quality. *Journal Range Management*. 38:450-545.
- Woolnough A.P. y Foley W.J. (2002). Rapid evaluation of pasture quality for a critically endangered mammal, the hairy nosed wombat (*Lasiorhinus krefftii*). *Wildlife Research*. 29: 91-100.
- Workman J.J. (2001). *NIR Spectroscopy calibration basics*. In *Handbook of near infrared analysis*. 2nd edition, Marcel Dekker, New York.

- Wu D., He Y., Nie P., Cao F. y Bao Y. (2010). Hybrid variable selection in visible and near-infrared spectral analysis for non-invasive quality determination of grape juice. *Analytica Chimica Acta*. 659: 229-237.
- Yalden D.W., Staines B.W. y Crisp J.M. (1978). Observations on food quality in Scottish Red deer (*Cervus elaphus*) as determined by chemical analysis of the rumen contents. *Journal Zoology*. 185 (2): 253–259.
- Yao S., Wu G., Xing M., Zhou S. y Pu J. (2010). Determination of lignin content in *Acacia* spp. Using near-infrared reflectance spectroscopy. *BioResources*. 5(2): 556-562.
- Zarovali M.P., Yiakoulaki M.D.y Panpanastasis V.P. (2007). Effects of shrub encroachment on herbage production and nutritive value in semi-arid Mediterranean grasslands. *Grass and Forage Science*. 62:355-363.

ANEXO I:

Tamaño de partícula en las muestras de heces

nº muestra	subgrupo	tamaño (Micras)	nº muestra	subgrupo	tamaño (Micras)	nº muestra	subgrupo	tamaño (Micras)
1	1	31,99	3	1	15,39	5	1	8,18
1	1	12,72	3	1	15,57	5	1	10,28
1	1	12,17	3	1	57,5	5	1	10,75
1	1	13,13	3	1	22,1	5	1	15,03
1	1	15,03	3	1	11,32	5	1	8,2
1	2	15,94	3	2	23,4	5	2	20,75
1	2	44,41	3	2	12,83	5	2	10,63
1	2	16,61	3	2	17,69	5	2	15,09
1	2	19,24	3	2	30,07	5	2	15,81
1	2	15,08	3	2	12,33	5	2	10,41
1	3	37,45	3	3	21,76	5	3	8,84
1	3	34,78	3	3	25,78	5	3	12,5
1	3	22,43	3	3	21,55	5	3	20,69
1	3	22,61	3	3	9,95	5	3	22,4
1	3	13,7	3	3	7,32	5	3	33,61
1	4	10,06	3	4	13,3	5	4	6,88
1	4	20,97	3	4	8,94	5	4	8,15
1	4	13,92	3	4	33,44	5	4	8,2
1	4	16,5	3	4	18,76	5	4	8,5
1	4	18,95	3	4	18,88	5	4	12,66
2	1	22,81	4	1	24,76			
2	1	14,38	4	1	26,41			
2	1	20,56	4	1	30,61			
2	1	28,01	4	1	15,77			
2	1	17,06	4	1	13,19			
2	2	53,56	4	2	8,75			
2	2	12,5	4	2	14,48			
2	2	7,63	4	2	16,83			
2	2	7,51	4	2	21,25			
2	2	12,5	4	2	22,5			
2	3	13,05	4	3	21,1			
2	3	16,07	4	3	15,12			
2	3	10,63	4	3	14,38			
2	3	12,36	4	3	24,69			
2	3	11,13	4	3	12,72			
2	4	29,83	4	4	7,19			
2	4	31,28	4	4	20,85			
2	4	14,38	4	4	12,82			
2	4	15,03	4	4	11,27			
2	4	19,19	4	4	7,81			

ANEXO II:
Fecal-FT-NIRS as a Noninvasive Tool for Assessing Diet Quality of Mediterranean Deer



Contents lists available at ScienceDirect

Rangeland Ecology & Management

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/rama>

Fecal-FT-NIRS as a Noninvasive Tool for Assessing Diet Quality of Mediterranean Deer

S. Tellado^a, R. Orpez^b, J. Muñoz-Cobo^a, C. Azorit^{a,*}^a Animal, Vegetal Biology and Ecology Department, University of Jaén, 23071, Spain^b Department of Chemical, Environmental and Materials Engineering, University of Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2013

Accepted 6 August 2014

Keywords:

C:N

EDOM

fecal-FT-NIRS

fiber

lignin

Mediterranean deer diet

ABSTRACT

In order to assess the diet quality of two Mediterranean deer species we developed and validated a Fourier transform near-infrared diffuse reflectance spectroscopy methodology on feces (Fecal-FT-NIRS) for the determination of acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), lignin, C:N ratio, and enzymatic digestibility of organic matter (EDOM). We used rumen contents and fecal samples from 149 red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and 111 fallow deer (*Dama dama*) from southeast Spain ($n = 520$ observations). Spectra from the feces were related with rumen conventional chemical analysis through chemometric regression with partial least-squares (PLS). Specific predictive equations from red and fallow deer data separately were generated, as well as merged equations after pooling all deer samples. All the predictive equations had a high linearity with high correlation coefficients ($r = 0.8 - 0.99$). The selected equations had a reliable accuracy considering the root-mean-square errors of prediction (RMSEP), calibration (RMSEC), and cross-validation (RMSECV) in relation to the range of values for which the NIRS calibration was set for each parameter. Broad-based equations from combined samples were demonstrated as being useful for all nutritional parameters determination in red and fallow deer simultaneously. Equations obtained for the red deer data were also successfully applied to fallow deer and vice versa for NDF, ADF, C:N, and lignin determination, while for EDOM assessment the specific equations for each species were more accurately applied. Once validated, the Fecal-FT-NIRS technique can be considered as a suitable noninvasive tool for monitoring deer diet quality variations in Mediterranean environment. This method has the possibility to overcome interspecific barriers of direct fecal analysis by using rumen digesta as its reference method.

© 2015 Society for Range Management. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The N and C content of vegetation is one of the plant characteristics of vital importance for herbivores, involving all the metabolic processes, as well as the cellular structure. Because N is an element of the amino acids that make up proteins, it is the most common constituent used to evaluate the nutritional quality of the diet of wild (Leslie and Starkey, 1987; Irwin et al., 1993; Hodgman et al., 1996; Blanchard et al., 2003) and domestic ruminants (Arman et al., 1975; Moore et al., 2004). This is positively correlated with the digestibility of the diet as well (Irwin et al., 1993). Increased C:N ratio due to reductions in the concentrations of N and increases in structural carbohydrates lead to foliar quality decrease (Couture et al., 2012).

Other constituents such as fiber, the main component of the plant cell wall, have been widely studied since their analysis was developed

in the 1960s by Van Soest and coworkers (Van Soest, 1963; Van Soest and Wine, 1967) as indicators of forage quality. Lignin content also represents the structural investment of plants, which influences their physical properties via their involvement in architectural support and defense (Freschet et al., 2010). Because digestion in ruminants is mostly inversely correlated with the rate of lignification (Hatfield and Fukushima, 2005), studying this issue is important because it gives useful information about the quality of diet consumed. Similarly, the use of cellulases appears to be a good alternative for evaluating forage quality and a method that could offer a high correlation with in vivo results in digestibility studies (Jones and Theodorou, 2000).

However, all these analyses are unsuitable for addressing many of the nutritional ecological questions involving large amounts of samples because they are too laborious and expensive. Dietary evaluation analysis has traditionally involved laboratory-based wet chemistry techniques, which especially for lignin are difficult and require skilled personnel in order to achieve accurate and reproducible results. The cost of chemicals and time are high when using these standard approaches, and many of the analyses require large quantities of

* Correspondence: C. Azorit, Animal, Vegetal Biology and Ecology Department, University of Jaen, 23071, Spain.
E-mail address: cazorit@ujaen.es (C. Azorit).

Table 3

PLS calibration statistics of NDF predictive equations for red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and both species conjunctly. Second derivative and 10 PLS factors were used.

Equation	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Corr. Coeff.	Spectral region
7.Cervus	4.46	1.74	8.81	8.73	0.96	2083.3–2500
8.Cervus	4.92	2.47	7.98	10.52	0.92	2066.1–2377
9.Dama	4.2	1.75	12.8	9.70	0.98	2083.3–2500
10.Dama	5.67	2.28	9.48	8.99	0.96	2066.1–2377
11.Merged	5.95	3.63	9.03	8.97	0.86	2083.3–2500
12.Merged	6.24	4.3	8.6	9.22	0.80	2066.1–2377

(Equations: 1. Cervus, 3. Dama, 5. Merged = Equation from chemometric calibration of red deer, fallow deer, all deer samples, respectively). The gray lines represent the best of the 6 equations represented in the table.

¹Residual error value.

²Root-mean-square error of calibration.

³Root-mean-square of standard error of prediction.

⁴Root-mean-square error of cross-validation.

in a 72% sulfuric acid solution. The lignin content measured with this method had good correlation with the lignin content determined by direct methods such as analytical pyrolysis in woody elements (Alves et al., 2006), and this is the most widely accepted analytical method for determining the lignin content in woody constituents (Carrier et al., 2011). We chose this sulfuric acid method instead of the acid detergent fiber lignin method (ADL), most used in herbaceous and grazing ruminants, because of the high content of woody elements in the diet of deer, which are browsers during long constraint periods eating forbs and woody elements (Bugalho and Milne, 2003; Azorin et al., 2012).

Elemental Analyzer (Thermo Finnigan Flash EA1112) by Micro-Dumas Combustion was used for total N and C analysis, and then the C:N ratio was obtained. Samples from rumen for these determinations were previously freeze-drying lyophilized and ground to uniformity.

Fecal Spectral Data Collection

Fecal samples were freeze-dried lyophilized, then dried to constant mass in an oven at 60°C. Each sample was ground with a grinder (Bosch, MKM 6003), controlling the particle size (12–18 μm), because this has a great effect on the spectra NIR (Casler and Shenk, 1985; Windham, 1987), although the fineness of the particles is less important than the size distribution of uniform particles in a sample (Shenk and Westerhaus, 1993a, 1993b; Dryden, 2003). We acquired spectra using a near-infrared reflectance spectrophotometer FT-NIR Antaris (MDS) equipped with an integrated sphere efficiency above 95% and an InGaAs detector for working in the region of 833–2630 nm. Samples were scanned over the wavelength range 1000–2500 nm. After each sample measurement, the glass of the sampler where the sample was placed was cleaned with distilled water and dried carefully afterwards. The scan number was optimized to 160 scans, by adequate signal-to-noise ratio, uniting in a single spectrum.

Chemometric Analysis and Calibration Model Development

Spectral data and chemometric analysis for PLS calibration were processed using TQ Analyst 6.1.1 and software from the Thermo Nicolet Corp. PLS regression is based on spectral decomposition in which the original variables are replaced by the so-called latent variables, which are linear combinations of the original ones. For this calculation PLS uses the spectral and concentration information resulting from ruminal content chemical analyses and maximizes the covariance between them, thus achieving latent variables that are directly related to the constituents of interest. In the initial

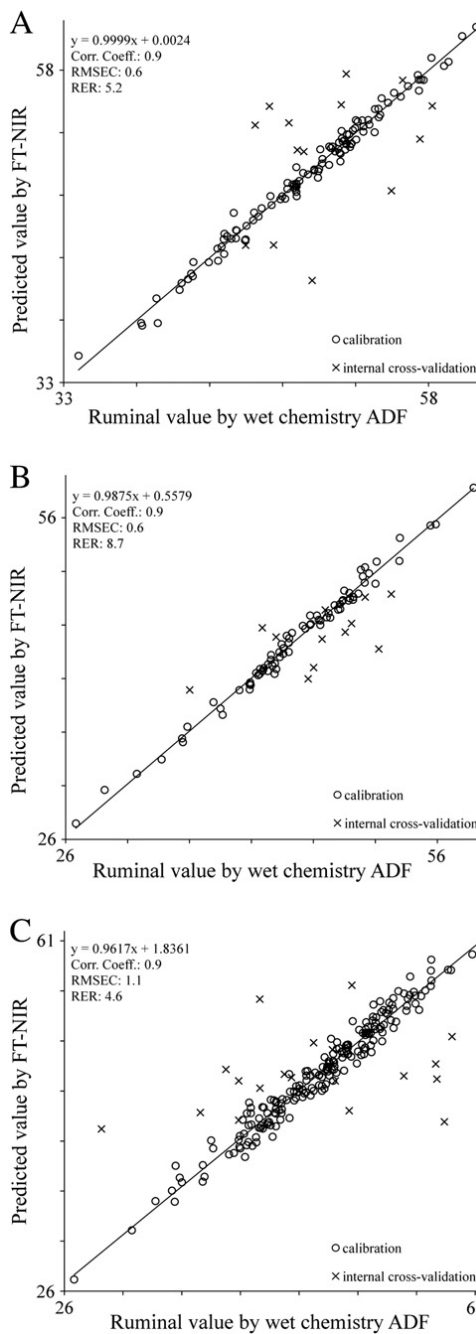


Fig. 1. Linear regression relationship between Fecal-FT-NIR predicted values and ADF values measured using standard wet chemistry techniques. **A**, ADF calibration model from red deer set (equation 1. Cervus). **B**, ADF calibration model from fallow deer set (equation 3. Dama). **C**, ADF calibration model from all deer sets (equation 5. Merged).

database only two values were eliminated before performing calibration because their being out of range may have been due to mistakes detected during the analysis with standard chemical methods. Later, no outliers were detected within a minimum standardized H distance of 6.0 from their nearest neighbors (Shenk and Westerhaus, 1993a, 1993b). Different equations are obtained by combining distinct spectral regions with different mathematical pretreatments of the spectrum, first and second derivatives. The best model was found when the correlation coefficient (*r*) was the higher value and the RMSEC was the lower. The predictive ability of the calibration model, as well as its accuracy, were assessed by calculating the root-mean-square error of cross-validation (RMSECV) of the

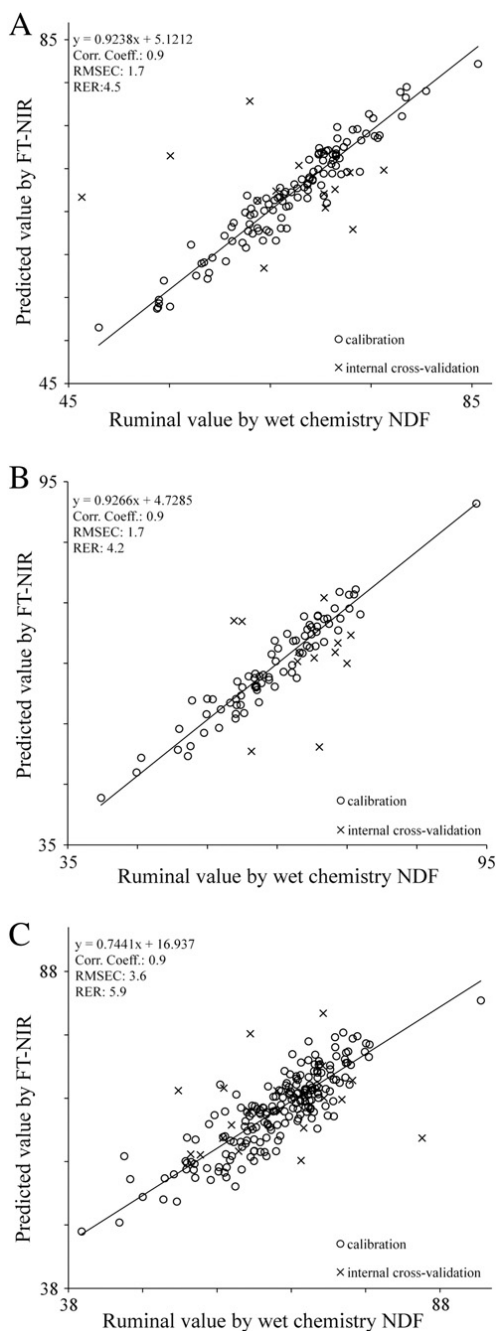


Fig. 2. Linear regression relationship between Fecal-FT-NIR predicted values and NDF values measured using standard wet chemistry techniques. **A**, NDF calibration model from red deer set (equation 7. Cervus). **B**, NDF calibration model from fallow deer set (equation 9. Dama). **C**, NDF calibration model from all deer sets (equation 11. Merged).

standard error of prediction (RMSEP). We assessed the accuracy of NFD, ADF, lignin, C:N ratio, and EDOM prediction through equations obtained with the data of red and fallow deer separately, as well as after pooling all deer samples together.

Predictive Equations: Selection and Validation

The quality of calibration was assessed from the correlation coefficient and the root-mean-square error of calibration, while the predictive ability of the calibration model and its accuracy were assessed by calculating the RMSECV and standard RMSEP. The

Table 4
PLS calibration statistics of lignin predictive equations for red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and both species conjunctly. Second derivative and 10 PLS factors were used.

Equation	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Corr. Coeff.	Spectral region
13.Cervus	5.54	0.36	4.54	5.32	0.99	2223.7-1374.7
14.Cervus	5.86	0.62	4.29	5.13	0.99	2449.2-1286.5
15.Dama	6.93	0.20	2.88	4.25	0.99	2223.7-1374.7
16.Dama	6.89	0.31	2.90	3.85	0.99	2449.2-1286.5
17.Merged	6.49	1.55	4.58	6.99	0.96	1666.6-1333.3
18.Merged	5.85	1.6	5.08	5.74	0.96	2449.2-1286.5

(Equations: 1. Cervus, 3. Dama, 5. Merged = Equation from chemometric calibration of red deer, fallow deer, all deer samples, respectively). The gray lines represent the best of the 6 equations represented in the table.

¹Residual error value.
²Root-mean-square error of calibration.
³Root-mean-square of standard error of prediction.
⁴Root-mean-square error of cross-validation.

residual error value (RER) was also used as a validation statistic. These indicators are dimensionless statistics, meaning they can be compared on the same basis between different models (AACC, 1999; Williams, 2001; Workman, 2001; Feam, 2002). The RMSEP measures the accuracy of prediction (the difference between the true and estimated values). We used RER as range/RMSEP, which together with the RMSECV provides the average uncertainty that can be expected for prediction of true samples. With values of RER ≥ 4 the calibration is acceptable for sample screening, with 8–12 the calibration is acceptable for quality control, and if RER ≥ 12 the calibration is good for quantification (Millmier et al., 2000).

Results

Wet Chemical Analysis and Fecal-FT-NIRS Spectra

Through chemical analysis we determined the ADF, NDF, lignin, C:N ratio, and EDOM contents of red and fallow deer ruminal samples and used it for both chemometric calibrations (n = 217) and external validation (n = 43) (Table 1). The overall mean ADF content was 47.1 ± 5.9, while the mean NDF content was 65.1 ± 7.4. The overall mean lignin content was 29.8 ± 5.3, the C:N ratio was 9.8 ± 2.5, and mean digestibility was 33.6 ± 7.6 considering the average for both deer species. These sets of samples, randomly selected from a natural population throughout the whole year, had a wide range of values appropriate for NIRS calibrations. We detected significant seasonal differences (P < 0.001) for all diet constituents. Validation sets had similar means and SD to the full data set, and the variability in the concentration of parameters in the samples was also considered suitable for developing an NIR calibration.

Acid Detergent Fiber Content

PLS calibration statistics and different prediction equations for ADF results for the model of the total variability were performed. The most significant results with PLS models using different spectral regions are summarized in Table 2. The second derivative and 10 PLS factors were used in all cases, and latent variables were selected on the basis of the RMSECV, which should be minimized. The lowest calibrations error (RMSEC) was used as an indicator of calibration quality, while the accuracy of prediction of the models was assessed on RMSEP, which should be as low as possible and similar to RMSECV, as well as the RER, which was considered as the better test for the quality of the model (Millmier et al., 2000). Through linear regression we related the values predicted by Fecal-FT-NIR and the reference values of the selected calibration equations derived from deer, fallow deer, and

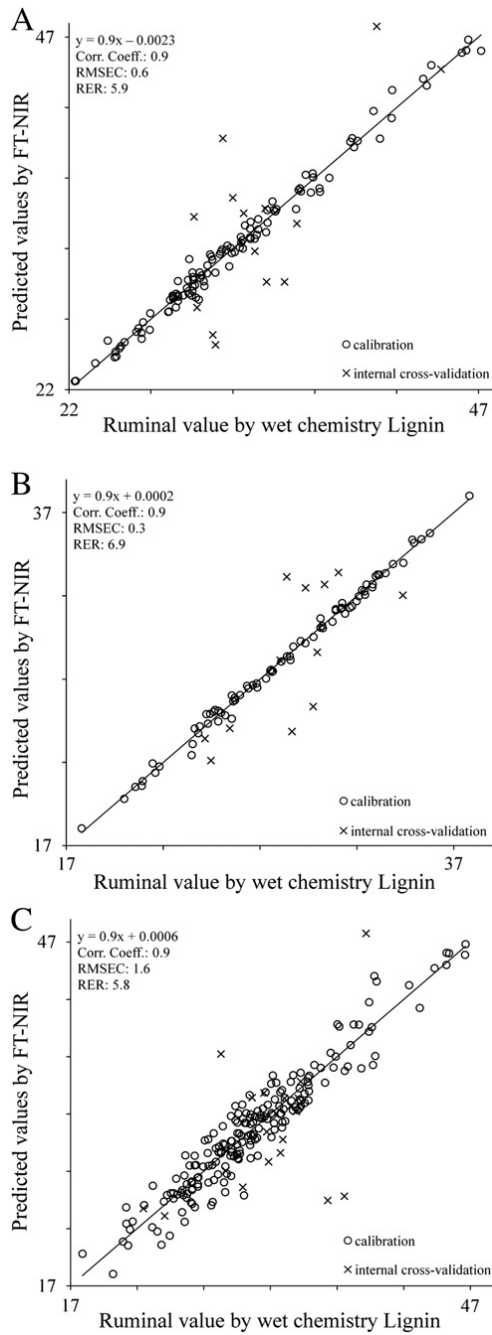


Fig. 3. Linear regression relationship between fecal-FT-NIR predicted values and lignin values measured using standard wet chemistry techniques. **A**, Lignin calibration model from red deer set (equation 14. Cervus). **B**, Lignin calibration model from fallow deer set (equation 16. Dama). **C**, Lignin calibration model from all deer sets (equation 18. Merged).

pooled samples (Fig. 1). The selected equations had a high linearity with correlation coefficients (r) around 0.99, and a reliable accuracy considering the RMSEP, RMSEC, and RMSECV in relation to the range of values for which the NIRS calibration was set for each parameter. The RER index ranged from 4.20–8.67 (Table 2, Fig. 1).

Neutral Detergent Fiber Content

The PLS calibration statistics and performance of six predictive equations for NDF determination are shown in Table 3. The selected equations for NDF determination had high linearity with correlation coefficients (r) ranging between 0.80 and 0.98 and a reliable accuracy

Table 5
PLS calibration statistics of C:N predictive equations for red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and both species conjunctly. Second derivative and 10 PLS factors were used.

Equation	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Corr.Coeff	Spectral region
19.Cervus	3.69	0.50	2.88	2.18	0.97	1686.9-2376.9
20.Cervus	3.17	0.52	3.35	2.68	0.96	1600-1800.2
21.Dama	4.87	0.97	2.65	3.56	0.94	2500-2200.22
22.Dama	4.39	0.52	2.94	3.36	0.98	1686.9-2376.9
23.Merged	4.89	1.59	2.64	3.05	0.80	2190.1-2455.8
24.Merged	4.01	0.55	3.22	3.00	0.97	1000-2500

(Equations: 1. Cervus, 3. Dama, 5. Merged = Equation from chemometric calibration of red deer, fallow deer, all deer samples, respectively). The gray lines represent the best of the 6 equations represented in the table.

- ¹Residual error value.
- ²Root-mean-square error of calibration.
- ³Root-mean-square of standard error of prediction.
- ⁴Root-mean-square error of cross-validation.

with RMSEP, RMSEC, and RMSECV near the standard deviations of the reference data of values for which the NIRS calibration was set for each parameter, as well as their range. The RER index ranged from 4.2–6.24 (Table 3, Fig. 2). Fig. 2 plots the regression of the better calibration.

Lignin Calibration Model and Predictive Equations

Several equations for the prediction of chemical components were obtained separately with the data of red and fallow deer and also after pooling all deer samples to generate a broad-based equation. The second derivative and 10 PLS factors were used in all cases. Following the statistical indicators we selected six predictive equations for determining lignin. All models for lignin determination gave correlation coefficient values > 0.96 and acceptable RMSEC. The best equations were 14.Cervus, 16.Dama, and 18.Merged with RMSEP and RMSECV values ranging from 2.88–5.08 and 3.85–6.99, respectively (Table 4, Fig. 3).

C:N Ratio Calibration Model

Table 5 shows the PLS calibration statistics and performance of the best index prediction equations for C:N. Fig. 4 shows the best calibration regressions. The quality of the calibration models and the high correlation of the NIR spectra of the samples were confirmed by a high correlation coefficient in fallow deer from 0.96 to 0.98 (Table 5, Fig. 4). In this case the equations had reliable accuracy with RMSEP, RMSEC, and RMSECV near the standard deviations of the reference data values for which NIRS calibration was set. The RER index ranged from 4.89–3.17 (Table 5, Fig. 4).

Enzymatic Digestibility of Organic Matter

The PLS calibration statistics and better performance of EDOM equations are shown in Table 6. The quality of the calibration models and the high correlation of the NIR spectra of the samples' digestibility were verified by a high correlation coefficient for red deer and fallow deer of 0.96–0.99 (Table 6, Fig. 5). In this case the red deer equations had a higher standard RMSECV and RMSEP in relation to the range of reference values, so a lower RER than in the case of the fallow deer and merged equations was obtained (Table 6).

Discussion

Samples of rumen measured by wet chemistry analysis for ADF and NDF in both species were similar to those resulting from analysis in

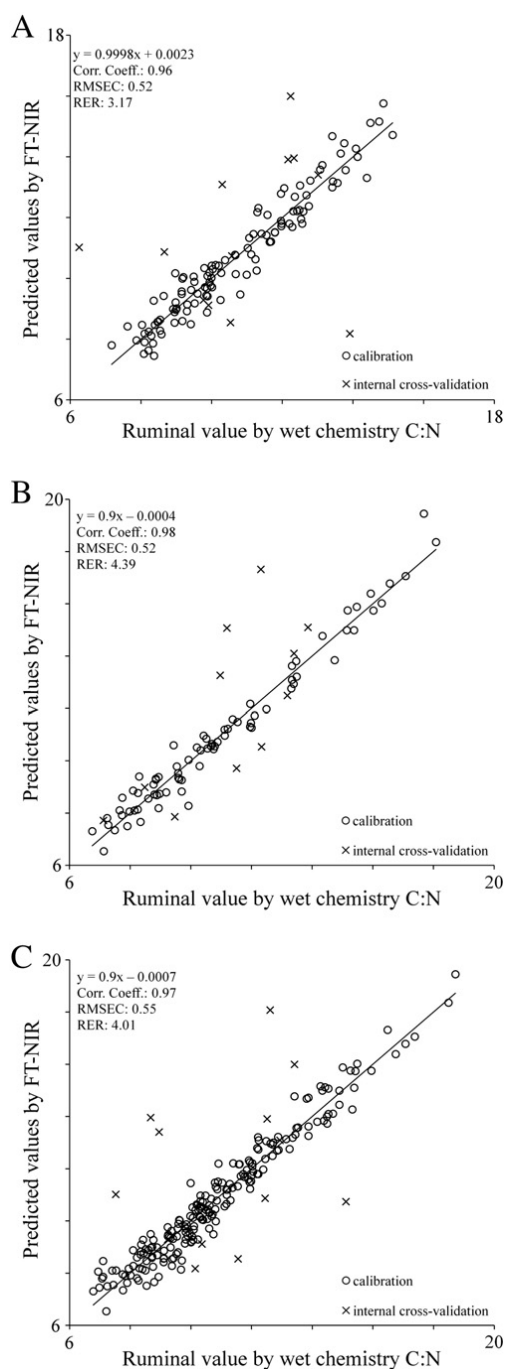


Fig. 4. Linear regression relationship between Fecal-FT-NIR predicted values and measured values using standard wet chemistry techniques. **A.** C:N calibration model from red deer set (equation 20. Cervus). **B.** C:N calibration model from fallow deer set (equation 22. Dama). **C.** C:N calibration model from all deer sets (equation 24. Merged).

goats (Cerón et al., 1996; Illius et al., 1999) and other deer species (Hodgman et al., 1996). The values of lignin in goats were lower than those found in our study, due to a difference between the feeding of farm goats and feeding of deer in our study, which were in an environment having to adapt to different food availability with seasonal variations. Although seasonal variation was not measured, overall ADF, NDF, and lignin concentrations in rumen digesta were lower from fallow deer and lower EDOM from red deer. This may be due to the fact that red deer browse more than fallow deer (Azorit et al., 2012).

Monitoring the nutritional quality, well-being, and diet selection of free-ranging deer has been an essential part of big game management for a long time (Hodgman et al., 1996). Studies on nutritional

Table 6
PLS calibration statistics of EDOM predictive equations for red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and both species conjunctly. Second derivative and 10 PLS factors were used.

Equation	RER ¹	RMSEC ²	RMSEP ³	RMSECV ⁴	Corr. Coeff.	Spectral region
25.Cervus	3.55	1.45	13	20.33	0.99	1000–2500
26.Cervus	1.86	5.25	24.8	22.59	0.96	2022.6–2416.6
27.Dama	6.36	0.69	7.39	10.89	0.99	1000–2500
28.Dama	4.86	1.94	9.67	10.26	0.97	2022.6–2416.6
29.Merged	5.82	1.22	8.01	8.06	0.98	1000–2500
30.Merged	4.55	1.55	10.3	9.22	0.98	1000–2500

(Equations: 1. Cervus, 3. Dama, 5. Merged = Equation from chemometric calibration of red deer, fallow deer, all deer samples, respectively). The gray lines represent the best of the 6 equations represented in the table.

¹Residual error value.

²Root-mean-square error of calibration.

³Root-mean-square of standard error of prediction.

⁴Root-mean-square error of cross-validation.

quality attributes such as diet fiber variation, as well as digestive efficiency, are also needed in order to properly understand adaptation mechanisms in ecological research (Robbins et al., 1995; Perez-Barbería et al., 2004; Codron et al., 2007). But many of the nutritional ecological questions involve large amounts of samples difficult to obtain in wild deer in the natural environment. Fecal-NIRS methodology using fecal spectra, without requiring fecal wet chemical analysis, is an interesting tool for noninvasive monitoring of deer diet quality in the natural environment, allowing us to obtain the suitable amount of data required in ecological research. Furthermore, by using rumen digesta samples consisting of the combination of plants eaten by deer, this study became an integrative assay, allowing us to monitor directly the diet selected by deer.

We developed and validated a Fecal-FT-NIRS coupled with PLS for diet deer quality assessment of free-ranging Spanish deer. The prediction of dietary ADF, NDF, lignin, C:N ratio, and EDOM in red and fallow deer can be accomplished via fecal NIRS. Equation performance statistics (*r*, RMSEP, RMSEC, RMSECV, RER) are similar to previous reports for both wild and domestic ruminants.

ADF, NDF, lignin, and C:N ratio content are chemical properties of the diet and relatively easily measured. Digestibility, on the contrary, is more difficult to determine, owing to the effects of the animal in question; it is not just a chemical component of the feed. Thus it follows that the prediction of diet digestibility with fecal NIRS would be less successful than that of ADF, NDF, lignin, and C:N ratio, the inherent error associated with quantifying diet digestibility being greater than that associated with diet fiber, lignin, and nitrogen. The success of an NIRS prediction equation for any diet constituent will ultimately depend on the reliability of the chemical reference method. This will of course include all aspects of the process including sampling, not just the chemical technique in and of itself.

Sampling rumen and feces obtained directly from the animal instead of collecting them from the ground improved the identification of samples and their conservation and avoided the contamination of the samples, as well as the degradation of the main constituents.

The accuracy of the predictive equations for fecal NIRS compared with wet chemistry values was good, owing to the fact that all models gave correlation coefficient values > 0.80, as obtained in goats (Glasser et al., 2008), which are considered to be excellent (Williams, 2001; Workman, 2001). In addition, the low RMSECV values, indicative of satisfactory accuracy, as well as the acceptable RMSEC and RER in relation to the range of reference values, also indicate the usefulness of Fecal-FT-NIRS for estimating red and fallow deer diet quality parameters. Lignin is a noncarbohydrate cell wall component, the structure of which is highly complex and variable according to diet. We obtained useful equations for lignin determination with low errors of calibrations ranging between 0.2 and 1.6,

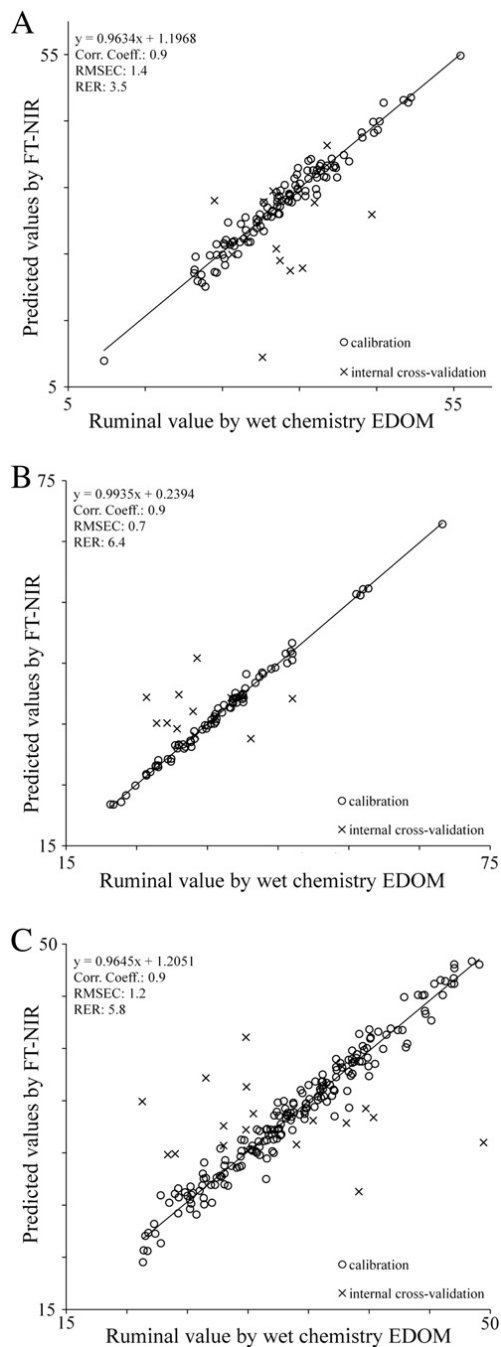


Fig. 5. Linear regression relationship between Fecal-FT-NIR predicted values and EDOM values measured using standard wet chemistry techniques. **A**, EDOM calibration model from red deer set (equation 25. Cervus). **B**, EDOM calibration model from fallow deer set (equation 27. Dama). **C**, EDOM calibration model from all deer sets (equation 29. Merged).

lower than those reported in deer (Keating, 2005), and correlation coefficients from 0.96 to 0.99, which are considered to be excellent (Williams, 2001; Workman, 2001). These are greater than those obtained in pasture (Pullanagari et al., 2011) and herbage ingested by sheep (Fanchone et al., 2007) but similar to acacia (Yao et al., 2010) and other woody lignin determinations (Hodge and Woodbridge, 2004). RMSEP and RMSECV values were slightly higher than similar studies but all within acceptable limits (Dryden, 2003).

The degree of accuracy and precision obtained with fecal NIRS for the measurement of dietary ADF, NDF, lignin, C:N ratio, and EDOM in red and fallow deer indicates that this technique could be employed

to obtain near real-time assessments of both animal nutrient status and forage resource quality.

Although incompatibility for prediction models between species has been found in previous studies (Aufrère et al., 1996), our broad-based equations from combined red and fallow deer samples were useful for ADF, NDF, lignin, C:N ratio, and EDOM determination in red and fallow deer simultaneously, producing a single model to obtain the values for both species. Moreover, equations obtained for the red deer data were also successfully applied to fallow deer and vice versa, as was corroborated by an external validation, correctly determining new samples not included in the calibration set. Regarding the statistical quality indicators, the equations can be classified as good for sample screening and quality control (Millmier et al., 2000) and good enough for accurate determinations in order to monitor variations in free-ranging Mediterranean deer diet.

Implications

The calibration of fecal samples with a spectrophotometer in infrared reflectance (NIRS) requires time, expertise, and a large number of samples with known reference values with precision and reliability for each parameter analyzed. However, except for the initial cost of the NIRS equipment acquisition, analysis of samples is not expensive. Once validated by statistical indicators and even by an external verification of the calibration equations ability in order to predict new samples from the same deer populations, Fecal-FT-NIRS appears to be an integrative, noninvasive, simultaneous tool for monitoring diet quality variations of two deer species. Allowing rapid analysis of large amounts of fecal samples, this technique should be considered of interest to be used in ecological research monitoring of Mediterranean deer. This method had the possibility to overcome interspecies barriers of direct fecal analysis by using rumen content as its reference method.

Acknowledgements

This study was approved by the Bioethical Committee of University of Jaén and supported by Ministry of Agriculture, Food and Environment (National Parks, Spain), the projects P07-RNM-03087 and CGL-2011-23919, and by the European Fund for Regional Development (FEDER). We thank López-Sánchez M. for helpful comments and field and/or laboratory assistance and especially Sánchez-Villasclaras S. and Moro Valverde J., who made this study possible. Nick Snow from the English International Academy improved the English expression.

References

- AACC, 1999. Near-infrared methods: guidelines for model development and maintenance—AACC Method 39-00. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. AACC Press, St. Paul, MN, USA.
- Alves, A., Schwanninger, M., Pereira, H., Rodrigues, J., 2006. Analytical pyrolysis as a direct method to determine the lignin content in wood. Part 1: comparison of pyrolysis lignin with Klason lignin. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 76, 209–213.
- AOAC, 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (30 p.).
- Arman, P., Hopcraft, D., McDonald, I., 1975. Nutritional studies on East African herbivores. *British Journal of Nutrition* 33, 265–276.
- Aufrère, J., Graviou, D., Demarquilly, C., Pérez, J.M., Andrieu, J., 1996. Near infrared reflectance spectroscopy to predict energy value of compound feeds for swine and ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 62, 77–90.
- Azorit, C., Tellado, S., Oya, A., Moro, J., 2012. Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain: a preliminary approach to feeding behavior. *Animal Production Science* 52, 720–727.
- Blanchard, P., Festa-Bianchet, M., Gaillard, J.M., Jorgenson, J.T., 2003. A test of long-term fecal nitrogen monitoring to evaluate nutritional status in bighorn sheep. *Journal of Wildlife Management* 67 (3), 477–484.

- Boval, M., Coates, D.B., Lecomte, P., Decruyenaere, V., Archimede, H., 2004. Faecal near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to assess chemical composition, in vivo digestibility and intake of tropical grass by Creole cattle. *Animal Feed Science and Technology* 114, 19–29.
- Bugalho, M.N., Milne, J.A., 2003. The composition of the diet of red deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean environment: a case of nutritional constraint? *Forest Ecology and Management* 181, 23–29.
- Carrier, M., Loppinet-Serani, A., Denux, D., Lasnier, J.M., Ham-Pichavant, F., Cansell, F., Aymonier, C., 2011. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy* 35, 298–307.
- Casler, M.D., Shenk, J.S., 1985. Effect of sample grinding size on forage quality estimates of smooth brome grass clones. *Crop Science* 25, 167–170.
- Cerón, J.J., Hernández, F., Madrid, J., Gutiérrez, C., 1996. Chemical composition and nutritive value of fresh and ensiled carnation (*Dianthus caryophyllus*) by-product. *Small Ruminant Research* 20, 109–112.
- Codron, D., Lee-Thorp, J.A., Sponheimer, M., Codron, J., 2007. Nutritional content of savanna plant foods: implications for browser/grazer models of ungulate diversification. *European Journal of Wildlife Research* 53, 100–111.
- Couture, J.J., Meehan, T.D., Lindroth, R.L., 2012. Atmospheric change alters foliar quality of host trees and performance of two outbreak insect species. *Oecologia* 168, 863–876.
- Dixon, R., Coates, D., 2009. Review: near infrared spectroscopy of faeces to evaluate the nutrition and physiology of herbivores. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 17, 1–31.
- Djordjevic, N., Popović, Z., Grubić, G., 2006. A study of the chemical composition of the rumen contents in roe deer as a quality indicator of their feeding. *Journal of Agricultural Sciences* 51 (2), 133–140.
- Dryden, G.McL., 2003. Near infrared reflectance spectroscopy; applications in deer nutrition. The University of Queensland, Gatton Q4343. Ph.D. School of Animal Studies, Australia.
- Fanchone, A., Boval, M., Lecomte, P., Archimede, H., 2007. Faecal indices based on near infrared spectroscopy to assess intake, in vivo digestibility and chemical composition of herbage ingested by sheep (crude protein, fibers and lignin content). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 15, 107–113.
- Fanchone, A., Archimède, H., Boval, M., 2009. Comparison of fecal crude protein and fecal near-infrared reflectance spectroscopy to predict digestibility of fresh grass consumed by sheep. *Journal of Animal Science* 87, 236–243.
- Feam, T., 2002. Assessing calibration: SEP, RPD, RER and R2. *NIR News* 13 (6), 12–14.
- Freschet, G.T., Cornilissen, J.H.C., Logtestijn, R.S.P.V., Aerts, R., 2010. Evidence of the plant economics spectrum in a subarctic flora. *Journal of Ecology* 98, 362–373.
- Glasser, T.A., Landau, S.Y., Ungar, E.D., Perevolotsky, A., Dvash, L., Muklada, H., Kababya, D., Walker, J.W., 2008. A fecal NIRS-aided methodology to determine goat dietary composition in a Mediterranean shrubland. *Journal of Animal Science* 86, 1345–1356.
- Hatfield, R., Fukushima, R.S., 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop Science* 45, 832–839.
- Hodge, G.R., Woodbridge, W.C., 2004. Use of near infrared spectroscopy to predict lignin content in tropical and sun-tropical pines. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 12, 381–390.
- Hodgman, T.P., Davitt, B.B., Nelson, J.R., 1996. Monitoring mule deer diet quality and intake with fecal indices. *Journal Range Management* 49, 215–222.
- Illius, A.W., Gordon, I.J., Elston, D.A., Milne, J.D., 1999. Diet selection in goats: a test of intake-rate maximization. *Ecology* 80 (3), 1008–1018.
- Irwin, L.L., Cook, J.G., McWhirter, D.E., Smith, S.G., Arnett, E.B., 1993. Assessing winter dietary quality in bighorn sheep via fecal nitrogen. *Journal of Wildlife Management* 57, 413–421.
- Jones, D., Theodorou, M., 2000. Enzyme techniques for estimating digestibility. In: Givens, D., Owen, E., Axford, R., Omed, H. (Eds.), *Forage evaluation in ruminant nutrition*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 155–173.
- Keating, M.S., 2005. Prediction of the diet quality parameters of Rocky Mountain elk via near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) fecal profiling. Ph.D. Dissertation. Texas A&M University, College Station, TX, p. 118.
- Landau, S., Glasser, T., Dvash, L., Perevolotsky, A., 2004. Faecal NIRS to monitor the diet of Mediterranean goats. *South African Journal of Animal Science* 34, 76–80.
- Landau, S., Glasser, T., Muklada, H., Dvash, L., Perevolotsky, A., Ungar, E.D., Walker, J.W., 2005. Fecal NIRS prediction of dietary protein percentage and in vitro dry matter digestibility in diets ingested by goats in Mediterranean scrubland. *Small Ruminant Research* 59, 251–263.
- Landau, S., Glasser, T., Dvash, L., 2006. Monitoring nutrition in small ruminant with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: a review. *Small Ruminant Research* 61, 1–11.
- Landau, S., Giger-Reverdin, S., Rapetti, L., Dvash, L., Dorleans, M., Ungar, E.D., 2008. Data mining old digestibility trials for nutritional monitoring in confined goats with the aid of fecal near infra-red spectrometry. *Small Ruminant Research* 77, 146–158.
- Leite, E.R., Stuth, J.W., 1995. Fecal NIRS equations to assess diet quality of free-ranging goats. *Small Ruminant Research* 15, 223–230.
- Leslie, D.M., Starkey, E.E., 1987. Fecal indices to dietary quality a reply. *Journal of Wildlife Management* 51, 321–325.
- Lyons, R.K., Stuth, J.W., 1992. Fecal NIRS equations for predicting diet quality of free-ranging cattle. *Journal Range Management* 45 (3), 238–244.
- Mark, H., Ritchie, G.E., Roller, R.W., Ciurszak, E.W., Tso, C., MacDonald, S.A., 2002. Validation of a near-infrared transmission spectroscopic procedure, part A: validation protocols. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28, 251–260.
- McLeod, M.N., Minson, D.J., 1982. Accuracy of predicting digestibility by the cellulase technique; the effect of pretreatment of forage samples with neutral detergent or acid pepsin. *Animal Feed Science and Technology* 7, 83–92.
- Millmier, A., Lorimor, J., Hurburgh, C., Fulhage, C., Hattey, J.Z., Hang, H., 2000. Near-infrared sensing of manure nutrients. *Trans ASAF* 43, 903–908.
- Moore, J.E., Goetsch, A.L., Luo, J., Owens, F.N., Gallean, M.L., Jonson, Z.B., Saúl, T., Ferrell, C.L., 2004. Prediction of fecal crude protein excretion of goats. *Small Ruminant Research* 53, 275–292.
- Perez-Barbería, F.J., Elston, D.A., Gordon, I.J., Illius, A.W., 2004. The evolution of phylogenetic differences in the efficiency of digestion in ruminants. *Proceeding of the Royal Society of London* 271 (b), 1081–1090.
- Pullanagari, R.R., Yule, I., King, W., Dalley, D., Dynes, R., 2011. The use of optical sensors to estimate pasture quality. *International Journal on Smart Sensing and Intelligent Systems* 4 (1), 125–137.
- Robbins, C.T., Spalinger, D.E., Van Hoven, W., 1995. Adaptation of ruminants to browse and grass diets: are anatomical-based browser-grazer interpretations valid? *Oecologia* 103, 208–213.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1993a. Near infrared reflectance analysis with single and multiproduct calibrations. *Crop Science* 33, 582–584.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1993b. Monograph: analysis of agriculture and food products by near-infrared reflectance spectroscopy. Infrasoft, Port Matilda, PA, USA.
- Tappi Test Method T222 om-88, 1998. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Tappi test methods. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta, GA, USA.
- Van Soest, P.J., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 46, 829–835.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 50, 50–55.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.
- Walker, J.W., McCoy, S.D., Launchbaugh, K.L., Fraker, M.J., Powell, J., 2002. Calibrating fecal NIRS equations for predicting botanical composition of diets. *Journal of Range Management* 55, 374–382.
- Williams, P.C., 2001. Implementation of near-infrared technology. In: Williams, P.C., Norris, K. (Eds.), 2nd ed. *Near infrared technology in the agricultural and food industries* 8, pp. 145–169.
- Windham, W.R., 1987. Influence of grind and gravimetric techniques on dry matter determination of forages intended for analysis by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science* 27, 773–776.
- Workman, J.J., 2001. NIR spectroscopy calibration basics. *Handbook of near infrared analysis*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Yao, S., Wu, G., Xing, M., Zhou, S., Pu, J., 2010. Determination of lignin content in *Acacia* spp. Using near-infrared reflectance spectroscopy. *BioResources* 5 (2), 556–562.

ANEXO III:
**An integrative assay to quantify the nutritional quality of the selected diet of two
Mediterranean free-living deer by faecal-FT-NIRS**

An integrative assay to quantify the nutritional quality of the selected diet of two Mediterranean free-living deer by faecal-FT-NIRS

S. Tellado^A and C. Azorit^{A,B}

^ADepartment of Animal Biology, Vegetal Biology and Ecology, University of Jaén, Jaén 23071, Spain.

^BCorresponding author. Email: cazorit@ujaen.es

Abstract. Integrating the interaction between cell wall components through a lignin and neutral detergent fibre ratio as a cell wall digestibility (CWD) index may provide a suitable method for diet quality and fibre digestibility estimation. Predictive faecal-Fourier-transform (FT)-near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) equations useful for CWD determination were developed as an integrative assessment of the digestibility and quality of the diet selected by red (*Cervus elaphus hispanicus*) and fallow (*Dama dama*) deer in southern Spain. A chemometric regression was used from spectra of faeces and wet chemical rumen contents analysis as reference data coupled with partial least-squares. The accuracy and feasibility of the equations obtained for red and fallow deer samples separately were evaluated, as well as after pooling all samples for both species. The predictive equations had a high linearity with correlation coefficients (r) ranging between 0.89 and 0.99, as well as a reliable accuracy considering the errors of prediction (RMSEP 0.57–0.87), calibration (RMS 0.04–0.45) and cross-calibration (RMSECV 0.80–1.12) in relation to the range of values for which the NIRS calibration was set for each parameter, giving very good RER (residual error value) indices (7.44–13.23). The ability of the calibration equations to predict new samples from the same deer populations was also assessed through an external validation. Equations obtained for the red deer data were successfully applied not only to red deer but also to fallow deer, and *vice versa*. Feasible CWD simultaneous determination in red and fallow deer was also obtained by using the broad-based equations. There was variation of the CWD index throughout the year and differences between the two deer species. A lower CWD of the forage was recorded in red deer, while a lower CWD ratio was detected at the end of winter coinciding with the highest browsing levels in both species. This technique has potential to enable closer examination of the non-grass variables and distinguish between browse and herbage feeding behaviour. The faecal-NIRS method of CWD ratio determination is a useful, non-invasive tool for monitoring variations in the diet quality of Mediterranean deer in their natural environment.

Additional keywords: CWD, digestibility, diet quality, fallow deer, faecal-NIRS, Mediterranean environments, red deer.

Received 19 February 2013, accepted 2 December 2013, published online 14 January 2014

Introduction

The assessment of nutritional composition of plants is an issue of great interest in ecology, wildlife management and evolutionary adaptation research. However, the approach is complicated when monitoring the nutritional quality of diet selected by free-ranging ruminants. Since the different components of plant cell walls determine the digestibility of forage and the diet quality, Van Soest and co-workers developed a system for characterising the fibrous portion of forages such as neutral detergent fibre (NDF), which represents cellulose, hemicelluloses and lignin fractions of the plant cell wall (Van Soest 1963; Van Soest and Wine 1967). Primarily, lignin content has been consistently correlated with the overall digestibility of fibre (Jung and Deetz 1993; Van Soest 1994), digestion in ruminants being mostly inversely correlated with the amount of lignification (Hatfield and Fukushima 2005). Plant fibre digestibility is expected to decrease with increased lignification rather than with total cell wall concentration (Van

Soest 1994; Robbins *et al.* 1995; Meissner *et al.* 1999). Assessing the interaction between cell wall components through a lignin and NDF ratio index representing the cell wall digestibility (CWD) may provide a suitable method for estimation of fibre digestibility and diet quality in ruminants (Perez-Barbería *et al.* 2004). The CWD has been used successfully as an appropriate digestibility index to be compared with other similar approaches such as dry matter digestibility (DMD) (Codron *et al.* 2007).

However, the complex analysis of lignin and NDF has traditionally involved laboratory-based, wet chemical techniques that require large quantities of hazardous chemicals such as concentrated sulfuric acid (Van Soest *et al.* 1991). These are difficult, time-consuming, costly and not suitable for ecological research, which requires large numbers of samples. By contrast, the technique of near-infrared reflectance spectrometry (NIRS) is low-cost, chemical-free, rapid and supposes non-destructive analyses (Landau *et al.* 2004). Moreover, NIRS methods have been widely

considered not only in livestock nutrition but also in ecology and management, after establishment of the feasibility of predicting dietary chemical attributes by 'faecal-NIRS', analysing NIR spectra of the faeces (Lyons and Stuth 1992). Predictive faecal-NIRS equations are obtained through multivariate regression of reference chemistry performed on diet and spectra obtained from faeces. Once validated, a predictive equation becomes a suitable, non-invasive monitoring tool in wildlife management (Tolleson *et al.* 2005). Near-infrared reflectance has also been widely applied in deer nutrition (Dryden 2003), but no information is available on the use of these techniques on faecal samples to predict diet quality for Spanish wild deer. These procedures must be validated and standardised each time they are used with new species and locations or different computers.

In this paper predictive faecal-NIRS equations useful for CWD determination were developed as an integrative assessment of the digestibility and quality of the selected diet of red (*Cervus elaphus hispanicus*) and fallow (*Dama dama*) deer in southern Spain. The accuracy and feasibility of the equations obtained for red and fallow deer samples separately were evaluated, as well as after pooling all samples for both species. The value of this technique in Mediterranean wildlife research and management is discussed, as well as the variation of CWD index throughout the year and the differences between deer species.

Material and methods

Deer sampled and study area

Rumen contents and faeces ($n = 260 \times 2$) were taken from 149 red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and 111 fallow deer (*Dama dama*) hunted during 2008–09 in Lugar Nuevo, an enclosed official estate in the Sierra de Andújar Natural Park, in the south-east of Spain (38°9'N, 4°3'W). The animals were eating when hunted. Immediately thereafter, 250 g of recently consumed rumen contents were collected as well as 5–10 g of feces directly from the rectum. As advised by Djordjevic *et al.* (2006), only samples from deer with non-macerated rumen contents were used. All samples were kept under refrigeration in field coolers and then at -20°C until further laboratory study.

Ruminal content chemical analyses and CWD determination

Neutral detergent fibre was estimated following Van Soest and Wine (1967). Briefly, 1 g of dry rumen content was weighed for each analysis, and treated with 100 mL of neutral detergent solution and 5 drops of decahydronaphthalene (decalin), which acts as an antifoaming agent. The sample was submitted to boiling for 1 h and then vacuum-filtered through a tared, fritted glass and washed several times with hot water and then with acetone, drying at 105°C until constant weight.

For lignin determination the Tappi T222 om-88 norm was used. In this method, known as 'Klason lignin', lignin is defined as the insoluble component in a 72% sulfuric acid solution. Briefly, 1 g of dry rumen contents was weighed and then treated with 15 mL of 72% sulfuric acid for 2 h as a primary hydrolysis step, followed by dilution with water to 1.88% acid for a 4-h reflux boiling secondary hydrolysis. Insoluble material (lignin) was precipitated for 1 h and passed through a filter

plate lined with a mat of glass wool. Finally, the lignin was dried in an oven at 105°C until constant weight, with the dried insoluble residue representing the lignin content. Lignin is a non-carbohydrate cell wall component whose structure is highly complex and variable, according to feedstuffs. Of the several methods available to determine the lignin in plant samples, none would be considered a standard unambiguous method for all samples (Brinkmann *et al.* 2002). It is also practically impossible to extract lignin in pure form because of its chemical nature (Hatfield and Fukushima 2005). The lignin content measured with the Klason method had good correlation with the lignin content determined by direct methods such as analytical pyrolysis in woody elements (Alves *et al.* 2006), which is the most widely accepted analytical method for determining the lignin content in woody constituents (Carrier *et al.* 2011). This sulfuric acid method was chosen instead of the acid detergent fibre lignin method, because of the high content of woody elements in the diet of our deer, which are browsers during long periods of constraint, eating forbs and woody elements (Bugalho and Milne 2003; Azorit *et al.* 2012).

The CWD index was estimated as $\text{CWD} = 100 - (\text{lignin}/\text{NDF} \times 10)$. Using Klason lignin, this equation varies slightly from the one used by Codron *et al.* (2007). In this approach, the higher the CWD index the higher the cellular wall digestibility of the forage selected by deer. Higher levels of hemicellulose and cellulose in relation to lignin content give high CWD indices, whereas higher lignin contents in relation to the hemicellulose and cellulose give lower CWD values.

Faecal spectral data collection

Faecal samples were freeze-dry lyophilised, then dried to constant mass in an oven at 60°C . Each sample was ground with a grinder, controlling the particle size because this has a great effect on the NIR spectra (Casler and Shenk 1985; Windham 1987), although the fineness of the particles is less important than the uniformity of the size distribution of particles in a sample (Shenk and Westerhaus 1993a, 1993b; Dryden 2003). Spectra were acquired using a Fourier-transform NIR spectrophotometer, FT-NIR Antaris (MDS; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), equipped with an integrating sphere efficiency $>95\%$ and an InGaAs detector for working in the region 833–2630 nm. Samples were scanned over the wavelength range 1000–2500 nm. After each sample measurement, the glass of the sampler where the sample was placed was cleaned with distilled water and dried carefully. The scan number was optimised to 160 scans, by adequate signal-to-noise ratio, uniting in a single spectrum.

Chemometric analyses

The equations were obtained for red and fallow deer samples separately, and after pooling all samples for both species. Prior to chemometric analysis, the normality and homoscedasticity of the ruminal reference data were verified using the SPSS Statistics 17.0 program (SPSS Inc., now IBM). Spectral data and chemometric analysis for partial least squares (PLS) calibration were processed using TQ Analyst 6.1.1 and software (Thermo Fisher Scientific Inc.). The PLS uses the spectral and reference ruminal wet chemical analyses,

maximising the covariance between them and so achieving latent variables that are directly related to the constituents of interest. Several calibrations were performed with different spectral regions and mathematical pre-treatments of the spectrum, such as first and second derivate, attempting to find the model with the best-fit indices with the highest correlation coefficient (r) values and the lowest root mean-square error of calibration (RMSEC). The predictive ability of the calibration model as well as its accuracy was assessed by calculating the root mean-square error of cross-validation (RMSECV), and the standard error of prediction (RMSEP). These indicators are dimensionless statistics, meaning they can be compared on the same basis between different models (Feam 2002). The RMSECV represents the variability in the difference between predicted and reference values when the equation is applied sequentially to subsets of data from the calibration dataset (Naes *et al.* 2002). All of these indicators were considered in relation to the range of values for which the NIRS calibration was set. Then, the residual error value (RER) as range/RMSEP was used. The calibration is considered as acceptable for sample screening with values of RER ≥ 4 , for quality control when RER ranges from 8 to 12, and if RER ≥ 12 the calibration is good even for exact quantification (Millmier *et al.* 2000).

Extra validation of the calibration models

Finally, the best equations were tested by predicting values of the 'independent data set' consisting of 22 red and 21 fallow deer faeces samples, which were scanned along with their related ruminal samples for which compositional data were also available. The results of CWD determined by equations were compared with those from the chemical analysis results through mean comparisons using the SPSS Statistics 17.0. In this way the usefulness of broad-based prediction equations for both red and fallow deer CWD determination as well as the specific equations were assessed. Additionally, equations obtained for the red deer

data were applied to fallow deer CWD determination and *vice versa*.

Results

Cell-wall digestibility of ruminal forage and faecal-FT-NIR spectra

Figure 1 shows the FT-NIR spectra from red and fallow deer faeces. Spectral peaks indicate absorbance at particular wavelengths. Table 1 shows the CWD of red and fallow deer ruminal samples determined by chemical analysis and used for both chemometric calibrations ($n = 217$) and extra validation ($n = 43$). Figure 2 shows the specific and monthly variation of CWD values determined from the samples of rumen content comprising the combination of plants eaten by red and fallow deer. These sets of samples, randomly selected from a natural population throughout the whole year, had a normal distribution of data and a wide range of values appropriate for NIRS calibrations. The validation sets had means and s.d. similar to the full dataset, and the variability in the concentration of parameters in the samples was also considered suitable for the extra validation.

The overall mean CWD was 95.28 ± 1.09 , but fallow deer showed higher CWD than red deer (95.58 and 95.05, respectively, $F_{1,11} = 30.26$, $P = 0.000$). There were also significant differences between months. Variation in the CWD index was found to be lower in January and February (94.12 and 94.21, respectively), reaching highest values in July and August (96.03 and 96.12, respectively) in both species ($F_{1,11} = 18.34$, $P = 0.000$).

Best equations for CWD determination

Table 2 shows the PLS calibration statistics and performance of the best CWD predictive equations. The selected equations had a high linearity, with correlation coefficients (r) between 0.89 and

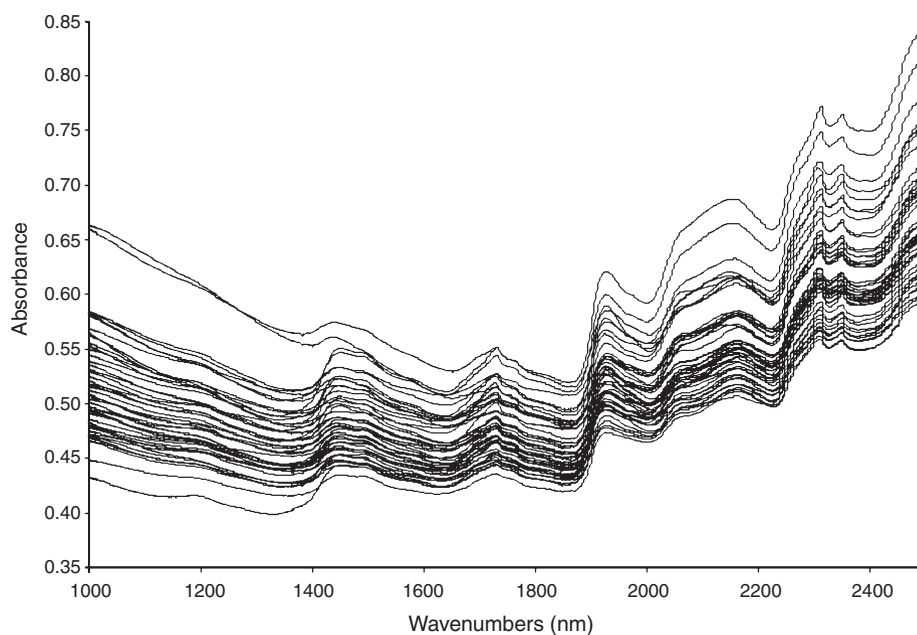


Fig. 1. Fourier-transform near-infrared spectra of faecal samples from all deer.

Table 1. Cell wall digestibility (% w/w) of red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*) rumen samples measured by wet chemical analysis used as references for partial least squares calibration and for external validation of turned equations

	N	Min.–max.	Mean ± s.d.	Range
<i>Used in chemometric calibration and internal cross-validations</i>				
<i>Cervus</i>	127	87.92–97.36	95.05 ± 1.17	9.44
<i>Dama</i>	90	92.75–97.39	95.58 ± 0.88	4.64
<i>Used in additional external validation</i>				
<i>Cervus</i>	22	93.53–96.37	95.25 ± 0.78	2.84
<i>Dama</i>	21	93.34–96.96	95.68 ± 0.77	3.62
All deer	260	87.92–97.4	95.28 ± 1.09	9.47

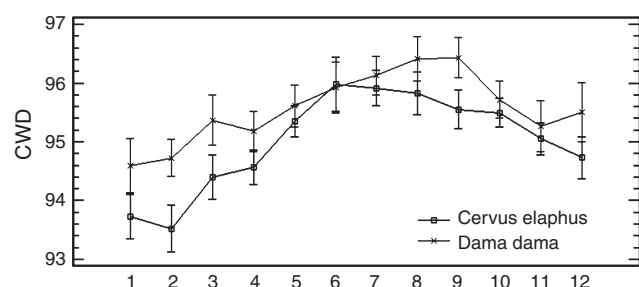


Fig. 2. The cell wall digestibility (CWD) values of rumen content consisting of the combination of plants eaten by red and fallow deer in Lugar Nuevo, a Mediterranean environment of Southern Spain.

0.99, and a reliable accuracy with errors of prediction (RMSEP), calibration (RMSEC) and cross-calibration (RMSECV) near to the standard deviations of the reference data of values for which the NIRS calibration was set for each parameter as well as their range. The RMSEP are very similar to the RMSECV, and the RER index ranged from 7.44 to 13.23 (Table 2, Fig. 3). The *Cervus* equations and eqn 5 conjunct may even be good enough for exact quantification (Table 2). As Table 3 shows, there were no statistically significant differences between the CWD determined for both species by the different predictive equations and the CWD reference values (also see Table 1). The CWD index was accurately determined using conjunct as well as specific equations. The one species CWD determination using the predictive equation built from the other species was found to be not only feasible but accurate.

Table 2. Partial least squares (PLS) calibration statistics of cell wall digestibility predictive equations for red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and both species conjunctly

Second-derivative and 10 PLS factors were used. Equations: 2. *Cervus*, from chemometric calibration of red deer samples; 4. *Dama*, from chemometric calibration of fallow deer samples; 7. Conjunct, from chemometric calibration of all deer samples)

Equation	RER	RMSEC	RMSEP	RMSECV	<i>r</i>	Region (nm)
1. <i>Cervus</i>	13.17	0.07	0.72	0.89	0.99	1000–2500
2. <i>Cervus</i>	12.26	0.12	0.77	0.96	0.99	2449.18–1286.50
3. <i>Dama</i>	8.19	0.04	0.57	0.91	0.99	1374.76–2223.70
4. <i>Dama</i>	7.44	0.07	0.62	0.80	0.99	2449.18–1286.50
5. Conjunct	13.23	0.45	0.72	1.12	0.89	2083.33–2500
6. Conjunct	10.91	0.28	0.87	1.11	0.96	1374.76–2223.70
7. Conjunct	11.29	0.30	0.84	0.99	0.95	2449.18–1286.50

Discussion

In southern Spain, the grassland that contributes as a forage resource is derived from natural Mediterranean forests after the removal of trees and shrub cover vegetation. The initial forest becomes the savanna-like landscapes of the Iberian Peninsula, known as ‘dehesas’ or ‘montados’. In this region, the relationship between nutritional attributes of plants and food selection needs to be researched to provide a better assessment of feeding behaviour, differences in habitat exploitation, social interaction, resource partitioning, and the animals’ impact on the vegetation (Azorit *et al.* 2012).

Integrating the interaction between cell wall components through a lignin and NDF ratio as a CWD index may provide a suitable method for diet quality and fibre digestibility estimation. The digestibility of deer diet measured as a CWD index varied between species and seasons, and this variation was coherent with the availability and diet consumed. In the study area, live green plant material in the herbage layer is usually available from May to June, becoming fodder and dry pasture in summer, and new green plant production and grass is usually available again in winter after the autumn rainfall. However, browse (shrubs and woody vegetation rich in structural constituents and lignin) is also an important food source for deer diet mainly in late summer and winter, red deer being browsers more than fallow deer. In this constraint period, at the end of winter, the resources are scarce and the deer behave like browsers (Azorit *et al.* 2012), so a lower digestibility in rumen content due to a high level of lignin in relation to other fibres such as cellulose and hemicelluloses may be expected. Thus, there was an explainable, higher CWD index in red deer than in fallow deer as well as a lower CWD index in January and February in both species.

By contrast, at the end of summer when the fodder and dry pasture comprise 75–92% of diet (Azorit *et al.* 2012), the highest CWD values in July and August may relate to a higher percentage of hemicelluloses, which make up the ‘digestible’ fibre portion of the cellular plant wall. Our data show the highest levels of hemicelluloses in August, in levels similar to those found in summer of other Mediterranean areas by Zarovali *et al.* (2007), whereas the lowest hemicelluloses levels were found in January (C. Azorit and S. Tellado, unpubl. data).

In summary, the CWD indices varied throughout the year and between deer species in relation to a variation in the botanical composition of the diet consumed, the end-of-winter diet being

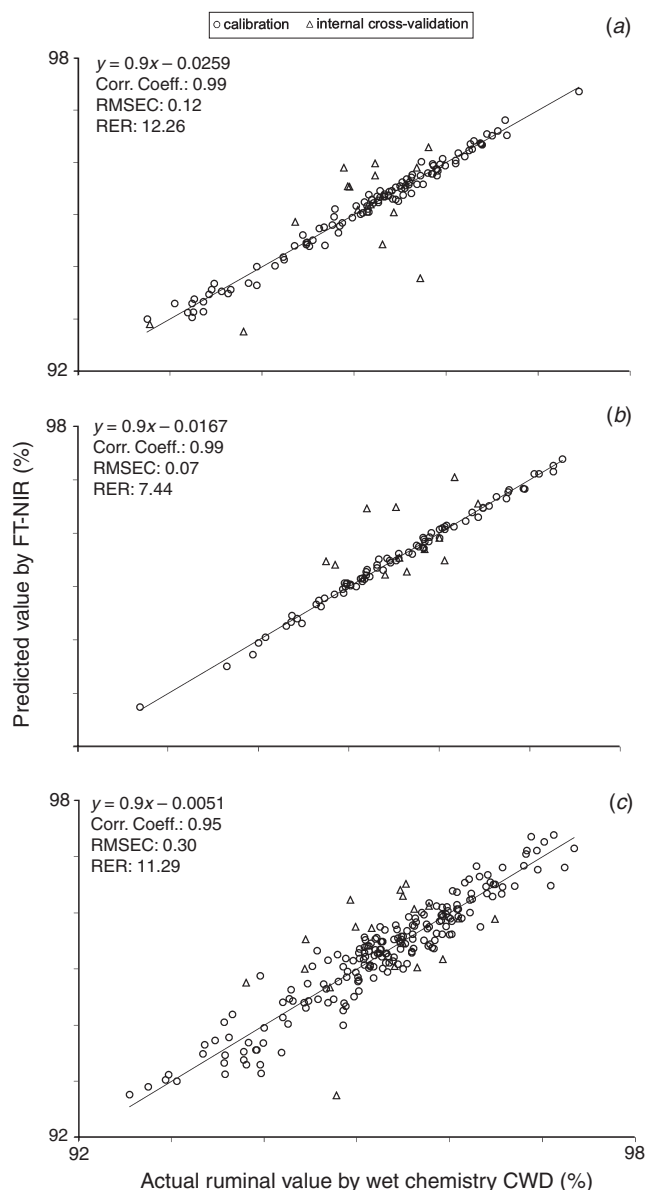


Fig. 3. Linear regression relationship between faecal-FT-NIR spectra and measured values using standard wet chemistry techniques. (a) Cell wall digestibility (CWD) calibration model from red deer set (eqn 20 *Cervus*); (b) CWD calibration model from fallow deer set (eqn 22 *Dama*); (c) CWD calibration model from all deer sets (eqn 25 conjunct).

the least digestible for both species, and red deer consumed a significantly more indigestible diet than fallow deer.

Differences in diet composition have been considered as potential sources of incompatibility for prediction models between species (Aufrère *et al.* 1996). However, good calibration models were found where the RMSEP values in all cases were very similar to the RMSECV, and the RER index reached values >12, allowing the calibration to be considered not only acceptable for quality control, but even excellent for exact quantification (Millmier *et al.* 2000).

In addition, the assay named external validation corroborated the correct determination of new faecal samples through the

Table 3. Predicted values of cell wall digestibility content of rumen samples from red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*) by the selected NIRS equations

Equations: 2. *Cervus*, from chemometric calibration of red deer samples; 4. *Dama*, from chemometric calibration of fallow deer samples; 7. Conjunct, from chemometric calibration of all deer samples. $P < 0.05$ indicates differences between reference values vs predicted

Deer	<i>n</i>	Equation	Min.–max.	Mean \pm s.d.	<i>P</i> -value
Red deer	22	2. <i>Cervus</i>	94.53–96.42	95.29 \pm 0.54	0.85 ($t = -0.19$)
		4. <i>Dama</i>	93.94–96.95	95.28 \pm 0.63	0.47 ($t = -0.73$)
		7. Conjunct	94.38–96.14	95.38 \pm 0.44	0.82 ($t = -0.23$)
Fallow deer	21	2. <i>Cervus</i>	94.39–96.47	95.46 \pm 0.58	0.70 ($t = -0.38$)
		4. <i>Dama</i>	94.43–96.53	95.76 \pm 0.50	0.49 ($t = 0.70$)
		7. Conjunct	94.71–96.54	95.54 \pm 0.50	0.29 ($t = 1.06$)

CWD predictive equations in all cases. The broad-based equations built from combined deer samples were useful for CDW determination in red and fallow deer simultaneously, and equations obtained for the red deer data were also successfully applied not only in red but also in fallow deer CDW determination.

The chemical composition of undigested residues is likely to be closely correlated with the chemical composition of diet eaten, so that faeces should contain information about the characteristics of the diet (Coleman and Murray 1993). Faecal indices of diet quality may be useful tools for research on the ecology, behaviour and management of wildlife. However, since faeces consist of residues of feed, plant tissue and components of microbial and animal origin, their chemical composition is more influenced by the digestive physiology of the ruminant than the chemical composition of the diet ingested. Faecal differences likely reflect digestive capabilities rather than differences in some aspects of dietary intake because of physiological differences among the animals such as structure, nature of the microbial flora and speed of passage through the gut (e.g. Van Soest 1994). Therefore, direct comparisons of faecal attributes from species with disparate digestive capabilities should not be carried out because these do not provide useful insights into dietary constituents (Leslie *et al.* 2008). The NIRS predictive equation avoids these inter- or intra-specific variations in faecal composition caused by different deer digestion mechanisms because faecal-NIRS methodologies are integrated by regressing reference chemistry performed on one material (diet ingested) and spectra obtained from another (faeces without requiring the determination of faecal chemical composition). By using rumen content samples consisting of the combination of plants eaten by deer, this study became an integrative assay, allowing us to monitor directly the diet selected by deer. Integrating diets independently of digestive capabilities allow us direct comparisons of the two deer species' diets.

The multifactorial approach obtained in this study improved the control of intraspecific variations in diet, diet quality and digestive efficiency and became a good tool, allowing us to study selected-diet quality simultaneously in two deer species, from faeces. The faecal-NIRS methodology of CWD ratio determination using faeces spectra, without requiring faecal wet chemical analysis, was shown to be a useful tool for

non-invasive monitoring of diet quality in Mediterranean deer in their natural environment.

Acknowledgements

This study was approved by the Bioethical Committee of University of Jaén and supported by Ministry of Agriculture, Food and Environment (National Parks, Spain), the projects P07-RNM-03087 and CGL-2011-23919 and by the European Fund for Regional Development (FEDER). We thank Sánchez-Villasclaras S., Muñoz-Cobo J., Moro Valverde J., López M. and Orpez R. for their helpful comments, field and/or laboratory assistance. Nick Snow improved the English expression.

References

- Alves A, Schwanninger M, Pereira H, Rodrigues J (2006) Analytical pyrolysis as a direct method to determine the lignin content in wood. Part 1: Comparison of pyrolysis lignin with Klason lignin. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **76**, 209–213. doi:10.1016/j.jaap.2005.11.004
- Aufrère J, Graviou D, Demarquilly C, Pérez JM, Andrieu J (1996) Near infrared reflectance spectroscopy to predict energy value of compound feeds for swine and ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **62**, 77–90. doi:10.1016/S0377-8401(96)00995-9
- Azorit C, Tellado S, Oya A, Moro J (2012) Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain: a preliminary approach to feeding behaviour. *Animal Production Science* **52**, 720–727. doi:10.1071/AN12016
- Brinkmann K, Blaschke L, Polle A (2002) Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implication of lignoproteins. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 2483–2501. doi:10.1023/A:1021484002582
- Bugalho MN, Milne JA (2003) The composition of the diet of red deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean environment: a case of nutritional constraint? *Forest Ecology and Management* **181**, 23–29. doi:10.1016/S0378-1127(03)00125-7
- Carrier M, Loppinet-Serani A, Denux D, Lasnier JM, Ham-Pichavant F, Cansell F, Aymonier C (2011) Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy* **35**, 298–307. doi:10.1016/j.biombioe.2010.08.067
- Casler MD, Shenk JS (1985) Effects of sample grinding size on forage quality estimates of smooth brome grass clones. *Crop Science* **25**, 167–170. doi:10.2135/cropsci1985.0011183X002500010040x
- Codron D, Lee-Thorp JA, Sponheimer M, Codron J (2007) Nutritional content of savanna plant foods: implications for browser/grazer models of ungulate diversification. *European Journal of Wildlife Research* **53**, 100–111. doi:10.1007/s10344-006-0071-1
- Coleman SW, Murray I (1993) The use of near-infrared reflectance spectroscopy to define nutrient digestion of hay by cattle. *Animal Feed Science and Technology* **44**, 237–249. doi:10.1016/0377-8401(93)90050-T
- Djordjevic N, Popović Z, Grubić G (2006) A study of the chemical composition of the rumen contents in roe deer as a quality indicator of their feeding. *The Journal of Agricultural Science* **51**(2), 133–140. doi:10.2298/JAS0602133D
- Dryden GMcL (2003) Near infrared reflectance spectroscopy; applications in deer nutrition. PhD thesis. School of Animal Studies, The University of Queensland, Gatton, Qld, Australia.
- Feam T (2002) Assessing calibration: SEP, RPD, RER and R². *NIR News* **13**, 12–14. doi:10.1255/nirn.689
- Hatfield R, Fukushima RS (2005) Can lignin be accurately measured? *Crop Science* **45**, 832–839. doi:10.2135/cropsci2004.0238
- Jung HG, Deetz DA (1993) Cell wall lignifications and degradability. In 'Forage cell wall structure and digestibility'. (Eds HG Jung, DR Buxton, RD Hatfield, J Ralph) p. 315. (American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America: Madison WI)
- Landau S, Glasser T, Dvash L, Perevolotsky A (2004) Faecal NIRS to monitor the diet of Mediterranean goats. *South African Journal of Animal Science* **34**, 76–80.
- Leslie DM, Bowyer RT, Jenks JA (2008) Facts from feces: Nitrogen still measures up as a nutritional index for mammalian herbivores. *The Journal of Wildlife Management* **72**(6), 1420–1433. doi:10.2193/2007-404
- Lyons RK, Stuth JW (1992) Faecal NIRS equations for predicting diet quality of free-ranging cattle. *Journal of Range Management* **45**, 238–244. doi:10.2307/4002970
- Meissner HH, Zacharias JPK, O'Reagain PJ (1999) Forage quality (feed value). In 'Veld management in South Africa'. (Ed. NM Tainton) pp. 139–168. (University of Natal Press: Pietermaritzburg, South Africa)
- Millmier A, Lorimor J, Hurburgh C, Fulhage C, Hattey JZ, Hang H (2000) Near-infrared sensing of manure nutrients. *Trans ASAF* **43**, 903–908. doi:10.13031/2013.2986
- Naes T, Isakson T, Fearn T, Davies T (2002) Validation. In 'A user-friendly guide to multivariate calibration and classification'. (Eds T Naes, T Isakson, T Fearn, T Davies) pp. 155–177. (NIR Publications: Chichester, UK)
- Perez-Barberia FJ, Elston DA, Gorden IJ, Illius AW (2004) The evolution of phylogenetic differences in the efficiency of digestion in ruminants. *Proceedings of the Royal Society of London B* **271**, 1081–1090. doi:10.1098/rspb.2004.2714
- Robbins CT, Spalinger DE, van Hoven W (1995) Adaptation of ruminants to browse and grass diets: are anatomical-based browser-grazer interpretations valid? *Oecologia* **103**, 208–213. doi:10.1007/BF00329082
- Shenk JS, Westerhaus MO (1993a) Near infrared reflectance analysis with single and multiproduct calibrations. *Crop Science* **33**, 582–584. doi:10.2135/cropsci1993.0011183X003300030032x
- Shenk JS, Westerhaus MO (1993b) 'Monograph: analysis of agriculture and food products by near-infrared reflectance spectroscopy.' (Infrasoft International: Port Matilda, PA)
- Tolleson DR, Randel RD, Stuth JW, Neuendorff DA (2005) Determination of sex and species in red and fallow deer by near infrared reflectance spectroscopy of the faeces. *Small Ruminant Research* **57**, 141–150. doi:10.1016/j.smallrumres.2004.06.020
- Van Soest PJ (1963) The use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **46**, 829–835.
- Van Soest PJ (1994) 'Nutritional ecology of the ruminant.' 2nd edn. (Comstock: Ithaca, NY)
- Van Soest PJ, Wine RH (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal of the Association of Agricultural Chemists* **50**, 50–55.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**, 3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- Windham WR (1987) Influence of grind and gravimetric technique on dry matter determination of forages intended for analysis by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science* **27**, 773–776. doi:10.2135/cropsci1987.0011183X002700040033x
- Zarovaly MP, Yiakoulaki MD, Panpanastasis VP (2007) Effects of shrub encroachment on herbage production and nutritive value in semi-arid Mediterranean grasslands. *Grass and Forage Science* **62**, 355–363. doi:10.1111/j.1365-2494.2007.00590.x

ANEXO IV:

**Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain:
a preliminary approach to feeding behavior**

Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain: a preliminary approach to feeding behaviour

C. Azorit^{A,D}, S. Tellado^A, A. Oya^B and J. Moro^C

^ADepartment of Animal and Vegetal Biology and Ecology, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, 23071, Spain.

^BDepartment of Statistics and Operations Research, University of Jaén, 23071, Spain.

^CMinistry of Agriculture, Food and Environment (National Parks), 23071, Spain.

^DCorresponding author. Email: cazorit@ujaen.es

Abstract. We studied the diet composition and diet overlap in sympatric red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and fallow deer (*Dama dama*) throughout a whole year in order to determine variation due to season, species, sex and age class by analysing rumen contents samples of 81 red and 69 fallow deer shot monthly during 2008–09 in Sierra de Andújar Natural Park, southern Spain. We assessed diet similarity and possible inter- and intra-specific foraging competition. We found different foraging strategies for both species and sexes during constraint periods, and several theoretical considerations of specific interactions and behaviour are discussed with respect to the Mediterranean environment. In both species an annual diet dominated by grasses was recorded, peaking in spring. Browsers were an important food resource at the end of winter and at the end of summer, and fruit more in autumn and winter. Red deer ingested a higher proportion of browse than fallow deer, which consumed more acorns and for a longer time showed a better ability to compensate for nutritional constraint periods. An overall decline in diet similarity in summer and at the end of winter led us to assume that exploitative competition between red and fallow deer and even between sexes was probable. Red deer females showed low diet similarity to other deer, while there was a great diet overlap between red deer males and fallow deer females at the end of summer. Differences detected between both two species and sexes do not always support predictions deriving from specific body size and morpho-physiological characteristics, but can probably be explained as a consequence of different metabolic demands. The relationship between plant nutritional attributes and food selection according to reproductive or physiological status and seasonal demands for both sexes and species should be researched in order to perform a better assessment of deer feeding behaviour.

Received 13 January 2012, accepted 12 April 2012, published online 29 May 2012

Introduction

Large protected areas and a primary economic activity based on wild ungulate hunting coexist in the Sierra Morena Mountains of Jaén in southern Spain. Harvest rates are higher than in other European areas with an increase in the last two decades. Red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) are the most abundant and important game, but fallow deer (*Dama dama*) density has increased considerably since the 1950s, when they were introduced into some game reserves such as Lugar Nuevo (LN), an official game estate in the Sierra de Andújar Natural Park. Overabundance and consequent vegetation damage as well as reductions in deer body condition have been recorded due to over-browsing mainly in drought years, making herd control necessary. Programs for reducing deer population through management harvest have been systematically organised in LN, but these have been only effective in red deer while the fallow deer density did not decline significantly (Nugent *et al.* 2011).

Detection of inter-specific competition, which plays an important role in the population dynamic, and knowledge of

specific differences in physiological plasticity and the ability to compensate constraint periods are clues in management decisions. Analysis of these questions across feeding strategies and overlaps in resource use have been cited as an important requirement for a more complete understanding of competition mechanisms in sympatric species (Latham 1999). Studies of feeding behaviour and use of food resources by sympatric herbivores are also very important for understanding differences in habitat exploitation, behavioural and social interaction, resource partitioning and the animals' impact on the vegetation. Furthermore, recognition of the extraordinary degree of intra-specific variation, which may be recorded within species has important consequences for management of cervids and conservation of threatened species (Putman and Flueck 2011).

However, data on seasonal variation in the composition and similarity of the diet of sympatric deer populations are still rare (Storms *et al.* 2008). Most studies do not cover a whole year period or intra-specific variation because of sex,

data on the diet composition and overlap of red and fallow deer when populations occur sympatrically being even more scarce for southern Spain (Martínez 2002). Among the studies of Iberian deer diet few have been performed in the Sierra Morena Mountains (Rodríguez-Berrocal 1978; Rodríguez-Berrocal *et al.* 1978).

We studied the diet composition and overlap in sympatric red and fallow deer throughout a whole year to determine variation due to season, species, sex and age by analysing rumen content samples. We assessed diet similarity and possible inter- and intra-specific competition, obtaining information about feeding behaviour and different foraging strategies of both species and sexes. Several theoretical considerations of inter- and intra-specific interactions and behaviour are discussed with respect to a Mediterranean environment.

Material and methods

Study area

Covering a whole year we conducted research in 2008–09 on LN, an enclosed official estate of 10 km² located in the Sierra de Andújar Natural Park in the Sierra Morena Mountains of Jaén, south-east Spain (38°9'N, 4°3'W). In LN an average of ~375 red and 450 fallow deer were harvested annually from 2002 to 2009 through intensive regular management culls intended to reduce population density. The culling level applied reduced red deer density by 26% but the density of fallow deer did not decline significantly. The current densities in the area are 23.3 red and 4.0 fallow deer per km². Supplementary feed was not distributed.

This area is characterised by a Mediterranean-type macroclimate with irregular distribution of rainfall, reaching the highest rates in spring and autumn, and an almost total lack of rain together with high temperatures during summer. Total annual precipitation in the study area was 852.6 mm with more than 40% of rain falling during the spring (210.4 mm in April) and ~30% during the fall (187.0 mm in September and October). It was a wet year in this area, where average annual rainfall varies between 200 and 900 mm. Climatology greatly determines vegetal productivity and plant phenology. Live green plant material in the herbage layer was available from May to June, becoming fodder and dry pasture in summer as is usual in this area, and new green plant production and grass was again available in winter after the autumn rainfall.

Plant communities typical of the siliceous soil of Mediterranean ecosystems and savannah-like landscapes of the Iberian Peninsula known as 'dehesas' are a dominant part of the agroforestry system, with holm oak (*Quercus rotundifolia*), gall oak (*Quercus faginea*), and cork oak (*Quercus suber*) the most abundant trees. The dominant shrub cover is of gum cistus (*Cistus ladanifer*) and others such as mastic (*Pistacea* sp.), mock privet (*Phillyrea* sp.), wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Moreover, more than 50% of LN is covered by conifer reforestation (mainly *Pinus* sp., forest density levels from 200 to more than 1000 tree/ha). The *Quercus* acorn production is from October to the end of February, extending from September for gall oak and even until March for the cork oak (Rodríguez-Estévez *et al.* 2007).

Deer, rumen samples and diet analyses

We analysed a collection of rumen content samples from 81 red and 69 fallow deer. Table 1 shows deer number, sex and age. The ages were determined by studying a combination of tooth eruption and replacement patterns (Brown and Chapman 1990; Azorit *et al.* 2002a), and growth marks observed in cementum from decalcified and non-decalcified first molars following a stand counting method (Azorit *et al.* 2004). Finally the mandibles were assigned to five age classes, animals younger than 1 year being excluded.

Rumen samples were analysed volumetrically based on macroscopic plant features. First the rumen contents were mixed and samples of ~250 g were frozen and stored until analysed. These were later thawed and washed through sieves with 1.0- and 0.5-cm meshes and the material retained was sorted macroscopically.

All plant material retained by the sieves was able to be identified and classified into three groups:

- (1) Browse (woody, tree foliage and shrub parts, including forbs, broad green leaves, stems and shoots);
- (2) Grasses (graminoids, monocots, aquatic plants, and also fungi and mushrooms); and
- (3) Fruit (acorns, olives and seeds).

Similarly to the method described by Nugent (1983) and McCullough (1985) the sorted material was then oven-dried at 80°C to constant weight and weighed to the nearest milligram. The percentage dry weight composition of each of the three forage groups with respect to the total weight of the sample was then compared for species, sex, age and season (each 2 months) and used to describe how much each forage class was eaten. In mathematical terms the percentage dry weight of the *i* forage eaten by the *j* deer species (p_{ij}) can be expressed as:

$$p_{ij} = \left(\frac{\sum b_i}{\sum b_{ii}} \right) \times 100$$

where b_i is the weight of this forage in the rumen sample and b_{ii} the total sample weight.

Diet overlap index

We used the equation by Pianka (1973) to calculate an index of diet overlap O_{jk}

$$O_{jk} = O_{kj} = \frac{\sum_i^n p_{ij} p_{ik}}{\sqrt{\sum_i^n p_{ij}^2 \sum_i^n p_{ik}^2}}$$

Table 1. Sex and age of red and fallow deer studied

Age class	Red deer		Fallow deer		Total
	Males	Females	Males	Females	
1–2	11	6	14	9	40
2–5	16	14	12	14	56
5–7	0	11	2	3	16
7–9	4	8	1	8	21
>9	2	9	2	4	17
Total	33	48	31	38	150
	81		69		

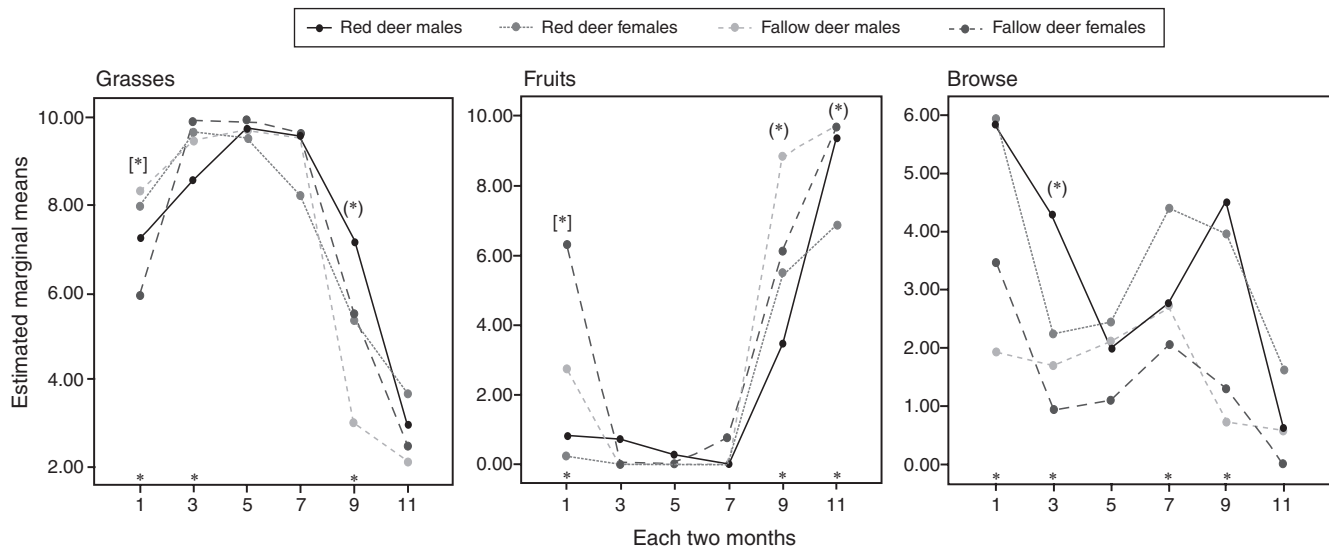


Fig. 1. Diet variation throughout the year (1: January–February; 3: March–April; 5: May–June; 7: July–August; 9: September–October; 11: November–December). Asterisks indicate significant differences between red and fallow deer ($P < 0.001$). Asterisks in parentheses (*) indicate a significant difference between male and female red deer ($P < 0.05$), and asterisks in square brackets [*] indicate statistically significant differences between male and female fallow deer ($P < 0.05$).

probably due to the exclusion of fawns. However, the diet composition with respect to browses also depended on sex and species ($F = 10.879$, P -value < 0.001), and for the fruit consumed the variations due to the interaction among sex, species and seasons were also statistically significant ($F = 2.351$, P -value < 0.05). Diet was found to vary, showing different feeding strategies between species and sexes as well.

Specific diet and feeding behaviour

In general red deer were more browsers than fallow deer, and although all deer selected a high proportion of fruit, differences were detected between species and sexes with fallow deer being the most frugivorous (see Table 2 and Fig. 1).

Fallow deer ingested a higher percentage of fruit and for a longer time period (from before September until February). At the end of summer females were the first to begin eating fruit in spite of ripe acorns still being scarce. Males used more browse resources than in other 2-month periods and were the largest fruit consumers in September–October, while the females were the most frugivorous at the end of the acorn season. In this period red deer males and females were largely browsers but males ate a great percentage of dry grasses whereas hinds used more fruit, similarly to fallow deer females. In November–December all deer consumed a high percentage of fruit with the hinds less than the other deer. Considering the whole acorn production period, red deer females ate less fruit than any other class of deer. Sexual differences were found for fallow deer in January–February, when females ate the most fruit whereas males consumed more grasses in a similar percentage to that of red deer. Differences between sexes were also found for red deer in two periods: in March–April when males ingested a higher proportion of browses and less grasses whereas females consumed more grasses, behaving similarly to fallow deer, and in July–August with females eating more browses and fewer grasses

than males which is similar to the behaviour of fallow deer of both sexes. In May–June more than 90% of the diet was composed of grasses in all animals.

Diet similarity

Variations in the diet overlap index were found to be inter-specific and intra-specific throughout the year. There was a great global dietary overlap between the red and fallow deer species. The global inter-specific similarity of the diets averaged 0.61, was lower in July–August, increased in January–February and reached the highest general overlap degree in May–June with an index of 0.73, the time when all deer shared the green grasses resource (see Table 3).

Maximal intra-specific similarities were found in November–December with levels of ~ 0.93 in red deer and 0.91 in fallow deer. However, frequently males and females of the same species showed a low diet overlap index, and there were more inter-specific similarities when the same food resources were used by deer of different species at the same time. In January–February the lowest overlap index was reported intra-specifically, with 0.32 for red deer and 0.37 for fallow deer. At this time the highest overlap index was recorded between males of both species (0.73) and between male fallow and female red deer (0.55). In March–April the intra-specific diet overlap was always around 50%, but the highest overlaps were also found to be inter-specific between male red deer and female fallow deer (0.62) and female red and male fallow deer (0.67). From May to August red deer males behaved more similarly to fallow deer than to hinds of their own species. In May–June the maximal overlap degree was reported between red males and fallow deer of both sexes (0.81 and 0.85, respectively). Furthermore, in July–August the lowest diet overlap was found for red deer females and males (0.22). The most important diet overlap at this time was found for red deer males and fallow deer females (0.80). In July–August female red

Table 3. Degree of diet overlap of each group of plants (G: grasses, F: fruit, B: browse) consumed by red deer (RD) and fallow deer (FD) considering also males (RM, FM) and females (RF, FF) of both species, respectively
 Variations throughout the year in Lugar Nuevo, southern Spain. Deer number in parentheses (mean \pm s.d.)

	January–February		March–April		May–June		July–August		September–October		November–December		All months	
	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	F	B	All food	
RD-FD	0.75 26 (0.63 \pm 0.10)	0.58 0.10	0.97 26 (0.56 \pm 0.52)	0.15 0.17	1.00 18 (0.79 \pm 0.50)	0.57 0.45	0.93 19 (0.54 \pm 0.50)	0.15 0.06	0.75 37 (0.56 \pm 0.42)	0.85 0.10	0.07 0.81	0.76 24 (0.59 \pm 0.52)	1.00 0.98	150 (0.61 \pm 0.10)
RM-RF	0.52 13 (0.32 \pm 0.28)	0.45 0.30	0.90 13 (0.54 \pm 0.48)	0.17 0.17	0.88 9 (0.67 \pm 0.44)	0.45 0.69	0.37 9 (0.22 \pm 0.19)	0.06 0.29	0.79 21 (0.57 \pm 0.40)	0.10 0.66	0.81 0.17	0.82 16 (0.93 \pm 0.10)	0.99 1.00	81 (0.54 \pm 0.25)
FM-FF	0.59 13 (0.37 \pm 0.20)	0.30 0.20	0.90 13 (0.54 \pm 0.48)	0.17 0.13	0.71 9 (0.70 \pm 0.40)	0.69 0.87	0.88 10 (0.59 \pm 0.45)	0.29 0.11	0.27 16 (0.37 \pm 0.26)	0.66 0.68	0.17 0.55	0.74 8 (0.91 \pm 0.15)	1.00 1.00	69 (0.58 \pm 0.21)
RM-FM	0.59 14 (0.73 \pm 0.19)	0.65 0.49	0.85 13 (0.49 \pm 0.46)	0.13 0.19	0.77 8 (0.82 \pm 0.48)	0.87 0.56	0.66 6 (0.39 \pm 0.35)	0.11 0.08	0.55 14 (0.59 \pm 0.08)	0.68 0.85	0.55 0.07	0.76 9 (0.59 \pm 0.52)	1.00 1.00	64 (0.60 \pm 0.16)
RF-FF	0.67 13 (0.47 \pm 0.21)	0.49 0.30	0.92 13 (0.56 \pm 0.49)	0.19 0.26	0.81 10 (0.69 \pm 0.42)	0.56 0.79	0.73 13 (0.41 \pm 0.40)	0.08 0.98	0.75 23 (0.56 \pm 0.42)	0.85 0.53	0.07 0.23	0.76 15 (0.59 \pm 0.52)	1.00 1.00	86 (0.55 \pm 0.10)
RM-FF	0.67 15 (0.40 \pm 0.24)	0.30 0.59	0.97 12 (0.62 \pm 0.50)	0.26 0.36	0.91 11 (0.85 \pm 0.49)	0.79 0.49	0.61 8 (0.80 \pm 0.50)	0.98 0.05	0.68 16 (0.48 \pm 0.23)	0.53 0.41	0.23 0.08	1.00 0.77	1.00 1.00	71 (0.64 \pm 0.18)
RF-FM	0.79 11 (0.55 \pm 0.26)	0.59 0.26	0.97 14 (0.67 \pm 0.49)	0.36 0.49)	0.84 7 (0.62 \pm 0.42)	0.39 0.42)	0.73 11 (0.39 \pm 0.41)	0.05 0.41)	0.21 21 (0.23 \pm 0.17)	0.41 0.17)	0.08 0.17)	0.77 15 (0.59 \pm 0.52)	1.00 1.00	79 (0.51 \pm 0.17)

deer behaved significantly differently to the other deer. In September–October the highest levels of diet overlap were found between males (0.59) and females (0.56) of both species, as well as the lowest level between females of fallow and red deer and fallow deer males, with 0.37 and 0.23 overlap indexes, respectively (see Table 3).

Discussion

Seasonal and specific annual diet variations

Deer diet variation has been associated with environmental factors like habitat and season Gebert and Verheyden-Tixier (2001), and substantial year-to-year variation in forage classes consumed due to differences in food availability has also been reported (McCullough 1985). Throughout a whole year's study in LN we found an annual diet dominated by grasses in both species, whereas other European areas have recorded an annual diet dominated by browse (Clutton-Brock and Albon 1989). Deer in our area were browsers in two periods: at the end of winter and at the end of summer, but in other studies red as well as fallow deer were mainly browsers from spring to autumn and grazers in winter (Putman 1986; Verheyden-Tixier *et al.* 2008). It might be as well to make explicit the fact that these results relate to red deer in non-Mediterranean regions where the availability of grass in winter is reduced (in contrast to Spain). These results about the choice of grasses or browse in different seasons are similar to those reported for red deer in northern Australia (Dryden and Finch 2002), most probably because of the similar climactic conditions.

As vegetation changes feeding behaviour in deer can change substantially, moving from pure grazers through intermediate feeding to pure browsers (Putman and Flueck 2011). The availability of each food item seems to be an important source of variation, but the switch from a browser to a grazer diet has also been related to changes in the availability of the nutrients (Verheyden-Tixier *et al.* 2008). Here important factors include the animals' requirements in each season, their physiological situation and their specific ability to compensate for periods of constraint.

In the Mediterranean ecosystem of southern Spain, because of the lack of rainfall and the high temperatures, the limiting season is the summer (especially at the end of the summer) instead of the winter, as is the case in the northern ecosystem. But a second constraint period might occur at the end of winter if the scarcity of fruit coincides with lack of rainfall. Our research was carried out in a wet year with precipitation in spring and autumn that provided abundant available live green plant material in the herbage from May–June, becoming fodder in summer, and ensuring new green plant growth and grass in winter together with good acorn production from the end of September to the end of February.

Coinciding with Bugalho and Milne (2003) we observed that when grasses were widely available deer were predominantly grazers, whereas they switched to a browser strategy when grass availability fell. However, grasses were less used in winter in spite of still being available after the autumn rainfall, fruit being the most selected resource in November–December. Acorns from *Quercus* sp. became an interesting source of energy, reserved for nutritional constraint periods. All deer preferred to choose acorns in a great percentage, likely because acorns were more effective in supplying their needs at that moment. Acorns, which have a very

high level of glucids and lipids (more than 85% of DM) with an oleic acid content up to 60% (Rodríguez-Estévez *et al.* 2008), allowed the deer to build up fat reserves and to compensate the scarcity and possible starvation from summer and during the rut period when mainly the males lose weight and condition. Probably the main adaptations for overcoming the scarcity of food at the end of the summer season are a sufficient quality grass in spring and a previous quantity of acorn in autumn and winter in order to recover liveweight and accumulate fat reserves. This may reflect a good plasticity of the Mediterranean deer and an ability to compensate for seasonal shortages of food and times of food scarcity. In constraint periods greater damage to the vegetation by browsing may be provoked by red deer, generally more browsers than fallow deer, especially when grass and fruit are scarce.

We also found inter-specific differences as fallow deer started to consume acorn earlier and initiated the compensation for summer starvation at least several weeks earlier than red deer, showing better ability to survive the summer by consuming more fruit and grasses than the red deer. These facts may explain the better body condition observed in October–February during the hunting season (C. Azorit and J. Moro, pers. obs.) and a recorded higher reproductive success in fallow deer (Azorit *et al.* 2002b). Fallow deer are probably also in better body condition at the beginning of the summer.

Red and fallow deer behaved like intermediate or mixed feeders, but with significant differences between them. Red deer were more browsers eating forbs and woody elements as well, while fallow deer were more frugivorous, behaving like fruit selectors or more like true concentrates. Cervids are usually ranked among either concentrate selectors (i.e. browsers), which select highly nutritive plant parts (tree and forb leaves, fruit and seeds), or intermediate feeders, which adapt to seasonal changes in the quantity and quality of available food by feeding alternatively on grasses or browse (Hofmann 1989). But browse shrub foliage, wood or stems cannot always be considered 'concentrated' because of lignin, tannin and other secondary compounds, so classifications have been proposed considering fruit diet components and green separately (Bodmer 1990). The general affirmation that browses contain higher levels of soluble sugars and protein compared with grasses (Gordon 2003) is also contradicted in recent work (Verheyden-Tixier *et al.* 2008). Research on the relationship between nutritional plant attributes and food selection according to species would be an interesting contribution.

Sex differences, inter- and intra-specific potential competition

Information on overlap in resource use is central to an understanding of inter-specific exploitation competition and resource partitioning. Moreover, availability of resources is determined not only by factors like seasonality, but also by inter- and intra-specific interactions. The importance of competition as a primary factor in determining the structural organisation of animal communities has been the subject of intensive debate over the last two decades (Schoener 1974). Overlap in itself need not necessitate competition. In fact, there may often be an inverse relationship between overlap and competition. If resources are not in short supply, two

organisms can share them without detriment to one another, thus extensive niche overlap may actually correlate with the reduced competition 'niche overlap hypothesis' (Pianka 1974). Usually several conditions must be fulfilled in order for inter-specific or intra-specific exploitation competition to exist. There must be overlap in habitat use and in diet consumed, and the shared resource must be limited (de Boer and Prins 1990).

A high degree of overlap may equally well indicate an absence of competition permitting a sharing of common resources. It has been argued that it is pertinent to describe resource overlap both at times of the year when resources are abundant and when they are scarce, and infer the existence of competition if and when overlap decline in the lean season (Gordon and Illius 1989). Most studies have found a decrease in niche overlap when resources are limited, which has been attributed to the effects of moderate competition (Schoener 1982).

In our study area, there was a high overall diet overlap for red and fallow deer. The higher value of overlap may be affected by the scale at which resources have been measured, so that a higher value of overlap is likely to be measured than if plants are taken at species level (Latham 1999).

However, significant and interesting variations were recorded in relation to species, sex and season. The largest overlap index occurred in spring and autumn when all species shared grasses and acorns, respectively, at a moment of abundant of resources. This high overlap degree may well indicate an absence of competition permitting a sharing of common resources. On the other hand, the lowest diet similarity found in the constraint periods, at the end of winter and summer when resources are scarce, suggesting that competition may occur. Recognition of a great degree of intra-specific variation due to sex was also recorded when a lower diet overlap was found between sexes of the same species in these scarce periods. See the overlap index between male and female red deer in July–August and between males and females of both species in January–February (Table 3).

This may be explained as deer avoiding the same resource used by members of their own species. Coexisting deer must differ in their behaviour and ecological requirements by at least some minimal amount to avoid competitive exclusion.

Spatial separation of sexes and species is evident the whole year (except in rut season) so that they forage in areas with different feeding opportunities and sexual segregation outside of rut among deer species and ecological differences in food habits between sexes may reduce intra-specific competition. However, in rut season we also found also intra-specific diet differences in spite of the sex spatial overlap. For instant, see the low diet similarity between males and females fallow deer. Also we found a high overlap index between males and females of both species in the rut period.

Different feeding strategies have been explained in terms of both physio-morphological adaptations (Hofmann 1989), and as a consequence of body size (Geist 1974; Illius and Gordon 1992), due to the fact that the bigger deer would tend to consume more forage richer in fibre such as slowly digestible grasses than smaller ones. In additional smaller deer would be less able to exploit lower quality forage than larger ones because the metabolic requirement to gut capacity ratio increases with decreasing body size (Demment and Van Soest 1985).

However, red deer weighing 66.37 kg (with a maximum of 103) in LN had a diet similarity in May–June of more than 80% with fallow deer of both sexes, which weigh 37.67 (maximum 51.8) and 24.67 kg (maximum recorded 37.2) respectively, and with female red deer in July–August.

Differences detected between the two sexes in red and fallow deer do not support predictions derived from specific body size and morpho-physiological characteristics, but can probably be explained as a consequence of different metabolic demands (Barboza and Bowyer 2000).

A sexual difference in diet quality during winter, with hinds eating a better quality diet than stags has also been recorded and given as an explanation for sexual segregation (Clutton-Brock *et al.* 1982). Maybe it is compulsory for female red deer to change to a browser strategy and to search for more concentrated foraging due to physiological demands such as lactation or even at the end of gestation in some females. But browses containing lower levels of soluble sugars and protein than grasses have been recorded (Verheyden-Tixier *et al.* 2008), so the relationship between nutritional plant attributes and food deer selection according to reproductive or physiological status and seasonal demands for both sexes and species should be researched to provide a better assessment of deer feeding behaviour.

Acknowledgements

This study was supported by the project P07-RNM-03087 from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, by the Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Spain, and by the European Fund for Regional Development (FEDER). We thank J. Muñoz-Cobo, E. and F. Cubillas, M. Castilla, V. Barato, P. Reina, L. Sánchez, R. Gutiérrez, J. Salas, F. Guerrero, P. Novoa, R. García, E. Cuenca, L. M. Muñoz and G. García for their helpful comments, collection of deer samples and field or laboratory assistance. We also thank C. Salazar and C. Fernández for their assistance in several plant determinations.

References

- Azorit C, Analla M, Carrasco R, Calvo JA, Muñoz-Cobo J (2002a) Teeth eruption pattern in red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) from southern Spain. *Annals of Biology* **24**, 193–200.
- Azorit C, Analla M, Moro J, Gutiérrez R, Carrasco R, Muñoz-Cobo J (2002b) Reproductive success of deer from Sierra Morena in southeastern Spain. In 'Proceedings of the 5th International Deer Biology Congress. Scientific program and abstracts'. pp. 6–7.
- Azorit C, Analla M, Hervás J, Muñoz-Cobo J (2004) Aging through growth marks in teeth of Spanish red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Wildlife Society Bulletin* **32**(3), 702–710. doi:10.2193/0091-7648(2004)032[0702:ATGMIT]2.0.CO;2
- Barboza PS, Bowyer RT (2000) Sexual segregation in dimorphic deer: a new gastrocentric hypothesis. *Journal of Mammalogy* **81**, 473–489. doi:10.1644/1545-1542(2000)081<0473:SSIDDA>2.0.CO;2
- Bodmer RE (1990) Ungulate fugivores and the browser-grazer continuum. *Oikos* **57**, 319–325. doi:10.2307/3565960
- Brown WAB, Chapman NG (1990) The dentition of fallow deer (*Dama dama*): a scoring system to assess age from wear of the permanent molariform teeth. *Journal of Zoology* **221**, 659–682. doi:10.1111/j.1469-7998.1990.tb04023.x
- Bugalho MN, Milne JA (2003) The composition of the diet of red deer (*Cervus elaphus*) in a Mediterranean environment: a case of summer nutritional constraint? *Forest Ecology and Management* **181**, 23–29. doi:10.1016/S0378-1127(03)00125-7
- Clutton-Brock TH, Albon SD (1989) 'Red deer in the Highlands.' (Blackwell Scientific Publications: Oxford)
- Clutton-Brock TH, Guinness FE, Albon SD (1982) Feeding behaviour and habitat use in Red Deer. In 'Red Deer – behavior and ecology of two sexes'. (Ed. GB Schaller) pp. 219–249. (University of Chicago Press: Chicago)
- de Boer WF, Prins HHT (1990) Large herbivores that strive mightily but eat and drink as friends. *Oecologia* **82**, 264–274. doi:10.1007/BF00323544
- Demment MW, Van Soest PJ (1985) A nutritional explanation for body size patterns of ruminant and non-ruminant herbivores. *American Naturalist* **152**, 641–672.
- Dryden GMcL, Finch NA (2002) Performance and condition of the wild red deer herd of southeastern Queensland, Australia. In 'Proceedings of the 5th International Deer Biology Congress. Scientific program and abstracts'. pp. 45–46.
- Gebert C, Verheyden-Tixier H (2001) Variations of diet composition of Red Deer (*Cervus elaphus* L.) in Europe. *Mammal Review* **31**, 189–201. doi:10.1046/j.1365-2907.2001.00090.x
- Geist V (1974) On the relationship of social evolution and ecology in ungulates. *American Zoologist* **14**, 205–220.
- Gordon IJ (2003) Browsing and grazing ruminants: are they different beasts? *Forest Ecology and Management* **181**, 13–21.
- Gordon IJ, Illius AW (1989) Resource partitioning by ungulates on the Isle of Rhum. *Oecologia* **79**, 383–389. doi:10.1007/BF00384318
- Hofmann RR (1989) Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* **78**, 443–457. doi:10.1007/BF00378733
- Illius AW, Gordon IJ (1992) Modelling the nutritional ecology of ungulate herbivores: evolution of body size and competitive interactions. *Oecologia* **89**, 428–434.
- Latham J (1999) Interspecific interactions of ungulates in European forests: an overview. *Forest Ecology and Management* **120**, 13–21. doi:10.1016/S0378-1127(98)00539-8
- Martínez T (2002) Comparison and overlap of sympatric wild ungulate diet in Cazorla, Segura y las Villas Natural Park. *Pirineos* **157**, 103–116. doi:10.3989/pirineos.2002.v157.65
- McCullough DR (1985) Variables influencing food habits of white-tailed deer on the George Reserve. *Journal of Mammalogy* **66**(4), 682–692. doi:10.2307/1380794
- Nugent G (1983) Deer diet estimation by rumen or faecal analysis: an evaluation of available techniques. *Forest Research Institute Bulletin* **24**, 1–17.
- Nugent G, McShea WJ, Parkes J, Woodley S, Waithaka J, Moro J, Gutiérrez R, Azorit C, Mendez-Guerrero F, Flueck WT, Smith-Flueck JM (2011) Policies and management of overabundant deer (native or exotic) in protected areas. Summary workshop and symposia. *Animal Production Science* **51**, 384–389.
- Pianka ER (1973) The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* **4**, 53–74. doi:10.1146/annurev.es.04.110173.000413
- Pianka ER (1974) Niche overlap and diffuse competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 2141–2145. doi:10.1073/pnas.71.5.2141
- Putman RJ (1986) 'Grazing in temperate ecosystem: large herbivores and the ecology of the New Forest.' (Croom-Helm/Chapman & Hall: London)
- Putman R, Flueck WT (2011) Intraspecific variation in biology and ecology of deer: magnitude and causation. *Animal Production Science* **51**, 277–291.
- Rodríguez-Berrocal J (1978) Introducción al estudio y valoración de recursos forestales y arbustivos para el ciervo, en el área ecológica de Sierra Morena: estudio de la dieta del ciervo. *Archivos de Zootecnia* **27**, 73–82.
- Rodríguez-Berrocal J, Castro-Escobar MC, Serrano T (1987) Aprovechamiento de recursos alimenticios naturales: valoración nutritiva de algunas especies vegetales del climax Mediterráneo en biotopos de Sierra Morena. *Archivos de Zootecnia* **36**, 65–74.

- Rodríguez-Estévez V, García A, Perea J, Mata C, Gómez AG (2007) Acorn production at the dehesa: influential factors (in Spanish). *Archivos de Zootécnia* **56**, 25–43.
- Rodríguez-Estévez V, García A, Mata C, Perea-Muñoz JM, Gómez AG (2008) Measures and nutritional characteristics of quercus acorns from the dehesa (in Spanish). *Archivos de Zootécnia* **57**, 1–12.
- Schoener TW (1974) Resource partitioning in ecological communities. *Science* **185**, 27–39. doi:[10.1126/science.185.4145.27](https://doi.org/10.1126/science.185.4145.27)
- Schoener TW (1982) The controversy over interspecific competition. *American Scientist* **70**, 586–595.
- Storms D, Aubry P, Hamann JL, Saïd S, Fritz H, Saint-Andrieux C, Klein F (2008) Seasonal variation in diet composition and similarity of sympatric red deer *Cervus elaphus* and roe deer *Capreolus capreolus*. *Wildlife Biology* **14**(2), 237–250. doi:[10.2981/0909-6396\(2008\)14\[237:SVIDCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2008)14[237:SVIDCA]2.0.CO;2)
- Verheyden-Tixier H, Renaud PC, Morellet N, Jamot J, Besle JM, Dumont B (2008) Selection for nutrients by red deer hinds feeding on a mixed forest edge. *Oecologia* **156**, 715–726. doi:[10.1007/s00442-008-1020-3](https://doi.org/10.1007/s00442-008-1020-3)

**ANEXO V:
Currículum Vitae**

FORMACIÓN ACADÉMICA

- Licenciatura de Biología, por la Universidad de Jaén. 2007
- Certificado de Aptitud Pedagógica (CAP) cursado por la Universidad de Jaén. 2008
- Trabajo tutelado de iniciación a la investigación en la línea de investigación “Biología de la conservación en vertebrados” titulado “**Determinación de nitrógeno y FAD como índices de calidad de dieta en ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y gamo (*Dama dama*) en ecosistemas mediterráneos: validación y uso de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS)**”.
- Matriculada en el Doctorado en Ciencias

PERFIL PROFESIONAL

- Con conocimientos aplicables a diversas áreas temáticas: Sanidad, Medio Ambiente, Producción y calidad, investigación y formación. Capacidad de análisis y resolución, responsable.

EXPERIENCIA PROFESIONAL

- **Contrato** con Tragsa, desde Octubre de 2007 hasta Abril de 2008, como responsable de la coordinación y ejecución de los trabajos de realización de necropsias, tareas de recogida y procesado de muestras y estudios de edad, en un proyecto de investigación sobre la determinación del estado fisiológico y dinámica de las poblaciones de ungulados cinegéticos, y en el proyecto de “Actuaciones en territorios Linceros en el ámbito del centro de Montes de Lugar Nuevo y Selladores-Contadero”, por encargo de Organismo Autónomo Parques Nacionales del Ministerio de Medio Ambiente.
- **Contrato** con Novastock, a través de Adecco, el 17 de Junio de 2013 y el 16 de Febrero de 2014, como ayudante en la realización de inventario en la tienda Kiabi Jaén.
- **Contrato** con B. Braun medical a través de Adecco, desde Octubre de 2013 hasta Septiembre 2014, para labores en cadena de producción

CONTRATOS DE INVESTIGACIÓN

- **Título del proyecto:** Calidad de dieta y condición corporal de cévidos en ambiente mediterráneo

Administración financiadora: Proyecto de Excelencia P07-RNM-03087, Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía

Duración: 31 meses **desde** Junio 2008 **hasta:** Enero 2012

Investigador responsable: Concepción Azorit Casas

PUBLICACIONES:

1. Tellado, M. S., Orpez, R., Muñoz-Cobo, J., y Azorit, C. (2015). Fecal-FT-NIRS as a Non-invasive Tool for Assessing Diet Quality of Mediterranean Deer. *Rangeland Ecology and Management*. 68:92-99.
2. Tellado S., Azorit C. (2014) An integrative assay to quantify the nutritional quality of the selected diet of two Mediterranean free-living deer by faecal-FT-NIRS. *Animal Production Science*. 55(1): 11-16.

3. Azorit C., Tellado S, Oya A. and Moro J. (2012) Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain: a preliminary approach to feeding behavior. *Animal Production Science*, 51(4):78-82.
4. Azorit C. , Oya A., Tellado S., Carrasco R. and Moro J. 2011. Mandibular osteomyelitis in red deer and fallow deer: occurrence and associated factors in free-living populations of Spain. *Journal Wildlife Disease*, 48(1) 77–86.
5. Azorit C., Rodrigo M.-J., Tellado S. and Sánchez-Ariza M.C. (2011) Periodontal disease in relation to different fluoride levels in two separate spanish red deer populations. *Animal Production Science*, 51(4): 60-68.
6. Galán-Ocaña A., Tellado S., Ramírez M.J., Martínez J.M., Muñoz-Cobo J. and Azorit C. (2011) Renin-angiotensin system-regulating aminopeptidases: monitoring seasonal variations in red deer and fallow deer from a mediterranean ecosystem . *Animal Production Science*, 51 (4): 92-97.
7. Paramio M.A.R., Muñoz-Cobo J., Moro J., Gutierrez R., Tellado S. and Azorit C. (2011) Assessing density of red deer antlers with parametric volume modeling in cad-3D. *Animal Production Science*, 51 (4):69-77.
8. Azorit C., Castro J., Carrasco R., Tellado S., Orpez R. and Moro J. (2011) Fecal 11-Ketoetiocholanolone measurement in Spanish red deer: Validation of methodology using HPLC-MS/MS. *Animal Production Science*, 51 (4):83-91.

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

1. **Autores:** López-Fuster, M.J., Azorit Casas, C., Rocha-Balbosa, O., Tellado-Ruiz, M.S., Moro-Valverde, J., Casinos Pardo, A.
Título: A geometric morphometric study of the mandibular ontogeny in the mouflon, *Ovis aries* (mammalia: artiodactyla)
Tipo participación: Poster
Congreso: Iberian symposium on geometric morphometrics
Lugar de celebración: Barcelona **año:** 2009
2. **Autores:** Azorit C., Tellado S, Oya A. and Moro J
Título: Seasonal and specific diet variations in sympatric red and fallow deer of southern Spain: a preliminary approach to feeding behaviour
Tipo participación: Poster
Congreso: 7th international Deer Biology Congress (IDBC)
Lugar de celebración: Chile, **año:** 2010
3. **Autores:** Azorit, C. Rodrigo, M.-J., Tellado, S. and Sánchez-Ariza, M.C.
Título: Periodontal disease in relation to different fluoride levels in two separate Spanish red deer populations
Tipo participación: Poster
Congreso: 7th international Deer Biology Congress (IDBC)
Lugar de celebración: Chile, **año:** 2010
4. **Autores:** Galán-Ocaña A., Tellado S., Ramírez M.J., Martínez J.M., Muñoz-Cobo J. and Azorit C.

- Título:** Renin-angiotensin system-regulating aminopeptidases: monitoring seasonal variations in red deer and fallow deer from a mediterranean ecosystem
Tipo participación: Poster
Congreso: 7th internacional Deer Biology Congress (IDBC)
Lugar de celebración: Chile **año:** 2010
5. **Autores:** Paramio, M.A.R., Muñoz-Cobo, J., Moro, J., Gutierrez, R., Tellado, S. and Azorit, C.
Título: Assessing density of red deer antlers with parametric volume modelling in cad-3D
Tipo participación: Poster
Congreso: 7th internacional Deer Biology Congress (IDBC)
Lugar de celebración: Chile, **año:** 2010
6. **Autores:** Azorit, C., Castro, J., Carrasco, R., Tellado, S., Orpez, R. and Moro, J.
Título: Fecal 11-Ketoetiocholanolone measurement in Spanish red deer:Validation of methodology using HPLC-MS/MS
Tipo participación: Poster
Congreso: 7th internacional Deer Biology Congress (IDBC)
Lugar de celebración: Chile, **año:** 2010
7. **Autores:** Tellado S., Orpez R., Moro J. and Azorit C
Título: Fecal near-infrared reflectance spectroscopy (F-NIRS) for predicting the ADF of the diet consumed by red deer and fallow deer in southern Spain
Tipo participación: Poster
Congreso: XXXth IUGB Congress (International Union of Game Biologists) and Perdix XIII
Lugar de celebración: Barcelona **año:** 2011
8. **Autores:** Azorit C., Muñoz-Cobo J., Tellado S., Cara-Ortega C., López-Pulido P., López-Izquierdo O. and Moro J.
Título: Assesing mineral content in teeth and bones of red (*Cervus elaphus hispanicus*) and fallow deer (*Dama dama*) using Scanning Electron Microscope analysis
Tipo participación: Poster
Congreso: XXXth IUGB Congress (International Union of Game Biologists) and Perdix XIII
Lugar de celebración: Barcelona **año:** 2011
9. **Autores:** Azorit C., Hohl L.S.L., Tellado S., López-Izquierdo O., Sánchez-Ariza M.C.and CarrascoR.
Título: The Occurrence of P1 agenesis in wild boar (*Sus Scrofa*, Linnaeus, 1758) in Sierra Morena, southern Spain
Tipo participación: Poster
Congreso: XXXth IUGB Congress (International Union of Game Biologists) and Perdix XIII
Lugar de celebración: Barcelona **año:** 2011
10. **Autores:** Hohl L.S.L., Carrasco R., Rocha-Barbosa O., Casinos A., Tellado S., López-Izquierdo O. and Azorit C.
Título: Preliminary geometric morphometric approach to the study of wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) morphology from southern Spain
Tipo participación: Poster
Congreso: XXXth IUGB Congress (International Union of Game Biologists) and Perdix XIII
Lugar de celebración: Barcelona **año:** 2011

EQUIPOS QUE SABE MANEJAR

1. Liofilizador Thermo Savant modelo Modulyo D
Septiembre 2008-MARZO 2010 Nivel Usuario
2. Analizador Elemental Thermo Finnigan Flash EA1112
Septiembre 2008- Junio 2010 Nivel Usuario
3. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) Agilent Technologies 7500 series
Abril 2010-Junio 2010 Nivel Usuario
4. Cromatógrafo iónico DX120 DIONEX; columna(ion pack AS9-HC de 4mm) con supresora (SRS 300 4mm)Marzo 2010 Nivel Usuario
5. Espectrofotómetro de infrarrojo cercano (NIRS)(ATR-FTIR)
Mayo2010-Agosto 2010 Nivel Usuario

OTROS MÉRITOS

- **Participación** en actividades de campo en los Montes de “**Lugar Nuevo y Selladores-Contadero**”. Campo de trabajo organizado por la asociación para la conservación y Gestión de la Biodiversidad (Gaia) y el Organismo Autónomo Parques Nacionales. Andujar (Jaén). Abril de 2005.
- **Alumna colaboradora** durante los curso académico 2005-2006 y 2006-2007 de Área de Zoología del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén.
- **Experiencia** en la determinación de la edad de ungulados cinegéticos mediante métodos petrográficos y métodos histológicos.
- **Prácticas profesionales en el Zoológico de Córdoba** en Julio y Agosto de 2007 participando en el manejo y cuidados de las especies de fauna salvaje en cautividad
- **Participación** en campo de trabajo de “Diseño, construcción e interpretación de jardín didáctico” organizado por la Asociación Juvenil Favencia y la Junta de Andalucía. Sierras Subbéticas. Agosto-septiembre 2007.
- **Experiencia** en otras actividades de Educación Ambiental.
- **Realizado** curso de prevención de riesgos laborales el 17 de junio de 2013.
- **Conocimientos de Inglés y Francés:** nivel básico hablado, escrito y traducido.
- **Conocimientos de Informática**

OTROS DATOS DE INTERÉS

- Disponibilidad horaria y geográfica.
- Incorporación inmediata.
- **Carnet de conducir B-1 y vehículo propio.**