

CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN FABÁCEAS FORRAJERAS TROPICALES EN EDAD DIFERENTE DEL REBROTE

CONCENTRATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN TROPICAL FORAGE FABACEAE AT DIFFERENT REGROWTH TIME

Lidia García-Ferrer¹, E. Daniel Bolaños-Aguilar^{2*}, L. Carmen Lagunes-Espinoza¹, Jesús Ramos-Juárez¹, M. Manuel Osorio-Arce¹

¹Áreas de Ciencia Vegetal y Ciencia Animal. Colegio de Posgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n 86500 H. Cárdenas, Tabasco.² Programa de Forrajes. Campo Experimental Huimanguillo. INIFAP-Tabasco. 86600 Huimanguillo, Tabasco (bolanos.eduardo@inifap.gob.mx).

RESUMEN

Las fabáceas son una opción para incrementar la disponibilidad de proteína en las praderas pero especies de la familia Fabaceae contienen compuestos fenólicos que, según su cantidad y tipo, benefician o perjudican la producción pecuaria. El objetivo del estudio fue determinar la concentración de compuestos fenólicos del rebrote de diferentes edades de *Arachis pintoi*, *Stylosanthes guianensis*, *Clitoria ternatea* y *Pueraria phaseoloides*. El estudio se realizó en un campo experimental del INIFAP-Tabasco, México, de marzo a agosto del año 2013, abarcando las épocas seca y lluviosa, y en cuatro edades del rebrote después del corte de uniformidad: 21, 42, 63 y 84 d. Las variables evaluadas fueron las concentraciones de cinco tipos de compuestos fenólicos: polifenoles totales (PFT), no taninos (FNT), taninos condensados (TC) hidrolizables (TH) y totales (TT). Dieciséis tratamientos se evaluaron en un diseño de parcelas divididas completamente al azar con tres repeticiones, la especie como parcela mayor, y la edad del rebrote como parcela menor. Las comparaciones entre medias se realizaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La interacción especie x edad del rebrote se observó en los cinco tipos de compuestos. Las concentraciones mayores de compuestos fenólicos (CF) se obtuvieron en todas las especies a los 42 d del rebrote. *Clitoria ternatea* presentó las concentraciones mayores en los meses sin lluvias (155.4, 40.1, 16.9, 98.4 y 115.3 g kg⁻¹ MS de PFT, FNT, TC y TH) y en los lluviosos (121.7, 39.6, 20.1, 61.9 y 82.0 g kg⁻¹ MS de PFT, FNT, TC y TH). En contraste, *S. guianensis* presentó las concentraciones menores de CF. La concentración de TC varió entre especies, en los meses sin lluvias de 4.62 (Stylo) a 20.21 (Kudzú) g kg⁻¹ MS y en meses lluviosos de 3.66 (Stylo)

ABSTRACT

Fabaceae are an option to increase the availability of protein in the prairies, but species of the Fabaceae family contain phenolic compounds, which depending on their number and type, benefit or harm livestock production. The aim of the study was to determine the concentration of phenolic regrowth compounds of different ages of *Arachis pintoi*, *Stylosanthes guianensis*, *Clitoria ternatea* and *Pueraria phaseoloides*. The study was carried out in an experimental field, INIFAP-Tabasco, Mexico, from March to August 2013, covering the dry and rainy seasons, and in four ages of regrowth after uniformity cutting: 21, 42, 63 and 84 d. The variables evaluated were the concentrations of five types of phenolic compounds: total polyphenols (PFT), no tannins (FNT), condensed tannins (TC) hydrolysable (TH) and total tannins (TT). Sixteen treatments were evaluated in a design of completely randomly divided plots with three replications, the species as main plot, and regrowth age as a minor plot. Comparisons between means were performed using the Tukey test ($p \leq 0.05$). We observed the interaction species x age of regrowth in the five types of compounds. The highest concentrations of phenolic compounds (CF) were obtained in all species at 42 d of regrowth. *Clitoria ternatea* presents the highest concentrations in the months without rain (155.4, 40.1, 16.9, 98.4 and 115.3 g kg⁻¹ MS of PFT, FNT, TC and TH) and rainy (121.7, 39.6, 20.1, 61.9 and 82.0 g kg⁻¹ MS of PFT, FNT, TC and TH). In contrast, *S. guianensis* presented lower concentrations of CF. The TC concentration varied between species, in the months without rain from 4.62 (Stylo) to 20.21 (Kudzú) g kg⁻¹ MS and in rainy months from 3.66 (Stylo) to 20.10 (Clitoria) g kg⁻¹ MS. No species reached the toxic level of 60 g kg⁻¹ MS of TC. Results showed that the concentration of CT varied among species and age of regrowth. Among species, the highest concentrations were observed in *C. ternatea* and the

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2015. Aprobado: noviembre, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 429-440. 2016.

a 20.10 (Clitoria) g kg⁻¹ MS. Ninguna especie alcanzó el nivel tóxico de 60 g kg⁻¹ MS de TC. Los resultados mostraron que la concentración de CT varió entre las especies y con la edad de rebrote. Entre especies, las concentraciones mayores se observaron en *C. ternatea* y las menores en *S. guianensis*. La interacción especie por edad del rebrote determina la concentración de compuestos fenólicos.

Palabras clave: *Arachis pintoi*, *Stylosanthes guianensis*, *Pueraria phaseoloides*, *Clitoria ternatea*, fabáceas, taninos condensados.

INTRODUCCIÓN

El uso de fabáceas forrajeras en asociación con gramíneas es relevante en la nutrición y sustentabilidad del sistema de producción pecuario (Martens *et al.*, 2012). En gramíneas forrajeras tropicales, el contenido de proteína varía de 6 a 14 % y en algunos casos es menor a 6 %, según la época del año, edad de rebrote, y especie (Juárez-Hernández *et al.*, 2004). En las fabáceas forrajeras la proteína puede alcanzar hasta 25 % (Heinritz *et al.*, 2012); además, éstas fijan N al suelo, lo que puede beneficiar a las gramíneas asociadas (Onyeonagu y Eze, 2013). Las fabáceas contienen metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos, que benefician o afectan negativamente al animal que las consume (Jezierny *et al.*, 2010). Los compuestos fenólicos están relacionados con el sabor, olor y color del alimento, y pueden modificar la fermentación ruminal y reducir la emisión de gas metano (Evans y Martin, 2000; Rochfort *et al.*, 2008). Entre los compuestos fenólicos están los taninos, que en concentraciones altas en las plantas las hacen menos aceptadas por el animal, y su efecto depende de la cantidad ingerida y del tipo de tanino (Mole *et al.*, 1993; Patra *et al.*, 2006).

Entre los taninos están los de tipo condensado o proantocianidinas y los hidrolizables (Hagerman y Butler, 1991). Los taninos condensados intervienen en la protección de la planta contra hongos y bacterias (Scalbert, 1991), actúan contra parásitos gastrointestinales (Aerts *et al.*, 1999), son antioxidantes y pueden mejorar la resistencia al estrés por calor (Liu *et al.*, 2011). En contraste, concentraciones altas deprimen el consumo de alimento por el animal (Miller y Ehlke, 1994). Concentraciones bajas a moderadas, entre 5 y 55 g kg⁻¹ MS, contribuyen a la protección de las proteínas en el rumen, permitiendo su paso hasta el intestino delgado, donde son degradadas y

lowest in *S. guianensis*. The interaction species-regrowth age determined the concentration of phenolic compounds.

Keywords: *Arachis pintoi*, *Stylosanthes guianensis*, *Pueraria phaseoloides*, *Clitoria ternatea*, fabaceae, condensed tannins.

INTRODUCTION

The use of forage fabaceae in association with grasses is important in the nutrition and sustainability of livestock production system (Martens *et al.*, 2012). In tropical grasses the protein content varies from 6 to 14 % and in some cases is less than 6 %, depending on the time of year, age of regrowth, and species (Juárez-Hernández *et al.*, 2004). In forage fabaceae protein content can reach up to 25 % (Heinritz *et al.*, 2012); besides, these species fix N to the soil, which can benefit associated grasses (Onyeonagu and Eze, 2013). Fabaceae family contain secondary metabolites such as phenolic compounds, which benefit or adversely affect the animals that consume them (Jezierny *et al.*, 2010). Phenolic compounds are related to the taste, smell and color of the food, and can modify the ruminal fermentation and reduce the emission of methane gas (Evans and Martin, 2000; Rochfort *et al.*, 2008). Tannins are among the phenolic compounds, and their high concentration in plants make them less accepted by animals, and their effect depends on the amount ingested and the type of tannin (Mole *et al.*, 1993; Patra *et al.*, 2006).

There are condensed tannins or proanthocyanidins, and the hydrolysable type (Hagerman and Butler, 1991). The condensed tannins participate in plant protection against fungi and bacteria (Scalbert, 1991), act against gastrointestinal parasites (Aerts *et al.*, 1999), are antioxidants and can improve resistance to heat stress (Liu *et al.*, 2011). In contrast, high concentrations depress feed intake by the animal (Miller and Ehlke, 1994). Low to moderate concentrations, between 5 and 55 g kg⁻¹ DM, contribute to the protection of proteins in the rumen, allowing their passage to the small intestine, where they are degraded and absorbed (Gebrehiwot *et al.*, 2002; Berard *et al.*, 2011; Patra, and Saxena, 2011).

Most studies of forage fabaceae carried out in the tropical region of Mexico are based on their nutritional value without including studies of phenolic

absorbidas (Gebrehiwot *et al.*, 2002; Berard *et al.*, 2011; Patra y Saxena, 2011).

En la región tropical de México, la mayoría de los estudios realizados con fabáceas forrajeras, se basan en su valor nutritivo sin incluir estudios de compuestos fenólicos, los que podrían afectar positiva o negativamente el valor nutritivo de la pradera, cuando está asociada, o se proporciona en banco de proteína o como forraje de corte. Además, la concentración de compuestos fenólicos, particularmente taninos, puede variar en función de la temperatura a la cual la fabácea crece, la fertilidad del suelo, del estado de madurez de la planta y de la especie (Berard *et al.*, 2011). Por lo tanto, la determinación de la concentración de taninos en fabáceas forrajeras durante el desarrollo de las plantas ayudará a desarrollar estrategias de manejo y utilización en alimentación animal, sin producir efectos adversos. El objetivo del presente estudio fue determinar la concentración de compuestos fenólicos en cuatro fabáceas forrajeras tropicales con diferentes edades del rebrote.

MATERIALES Y MÉTODOS

La fase de campo se realizó en el Jardín de Recursos Genéticos Forrajeros del Campo Experimental Huimanguillo (17° 50' N, 93° 23' O) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Tabasco, México, de febrero a agosto de 2013. Este periodo abarcó los meses secos del año (de marzo a mayo) y los meses de lluvia (de junio a agosto) (Figura 1). La textura del suelo fue franca, con 41.1 % de arena, 24.5 % de arcilla y 34.4 % de limo, pH 7.0 y 21.5 meq 100 g⁻¹ de CIC. No se aplicó fertilización y no se irrigó en el período seco del año.

En el estudio se evaluaron 16 tratamientos en un diseño de parcelas divididas completamente al azar, con tres repeticiones. La parcela mayor fue la especie de fabácea: Cacahuatillo (*Arachis pintoi* Krapovickas & Gregory), Stylo (*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.), Clitoria, Conchita o Tehuana (*Clitoria ternatea* L.) y Kudzú (*Pueraria phaseoloides* Roxburgh Benth). La parcela menor fue la edad del rebrote: 21, 42, 63 y 84 d. La unidad experimental fue una parcela de 2 X 1 m.

La siembra se realizó el 8 de agosto de 2012 en parcelas de 2x4 m, densidad de 5 kg de semilla ha⁻¹ en hileras a 50 cm de separación, excepto Cacahuatillo, que fue establecido por material vegetativo (tallos con raíces), espaciado a 25 cm dentro de cada hilera.

Para determinar la edad del rebrote, en cada unidad experimental se asignó, en forma aleatoria, una de las cuatro edades del

compounds, which could positively or negatively affect the nutritional value of the prairie, when associated, or provided as protein supply or cutting fodder. Furthermore, the concentration of phenolic compounds, particularly tannins, may vary depending on the temperature at which the fabaceae grows, soil fertility, state of maturity of the plant and species (Berard *et al.*, 2011). Therefore, the determination of the concentration of tannins in forage fabaceae during plant development will help develop management strategies and use in animal feed, without causing adverse effects. The aim of this study was to determine the concentration of phenolic compounds in four tropical forage fabaceae with different ages of regrowth.

MATERIALS AND METHODS

The field phase took place in the Garden of Fodder Genetic Resources of the Huimanguillo Experimental Field (17° 50' N, 93° 23' W) of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP) in Tabasco, Mexico, from February to August 2013. This period covers the dry months of the year (March to May) and the rainy season (June to August) (Figure 1). The soil texture was loamy, with 41.1 % sand, 24.5 % clay, and 34.4 % silt, pH 7.0 and 21.5 meq 100 g⁻¹ CIC. No fertilizer was applied, neither irrigation during the dry period of the year.

We evaluated 16 treatments in a design of completely randomly divided plots with three replications. The largest plot was the fabaceae species: Cacahuatillo (*Arachis pintoi* Krapovickas & Gregory), Stylo (*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.), Clitoria, Conchita or Tehuana (*Clitoria ternatea* L.) and Kudzú (*Pueraria phaseoloides* Roxburgh Benth). The smallest plot was that of regrowth: 21, 42, 63 and 84 d. The experimental unit was a plot of 2 X 1 m.

Planting took place on August 8, 2012 in plots of 2x4 m, density of 5 kg seed ha⁻¹ in rows 50 cm apart, except Cacahuatillo, which was established by vegetative material (stems with roots), 25 cm spacing within each row.

To determine the age of regrowth, each experimental unit was randomly assigned one of the four ages of regrowth: 21, 42, 63 and 84 days. The days of regrowth ages were counted from uniformity cut. The uniformity cut was applied to all plots on February 26 for the dry months, and May 20 for rainy months of 2013.

Aboveground biomass samples collected by species and age of regrowth were dried at 50 °C, crushed, passed through a 1 mm mesh in a Wiley mill, and stored in dark at 4 °C until analysis.

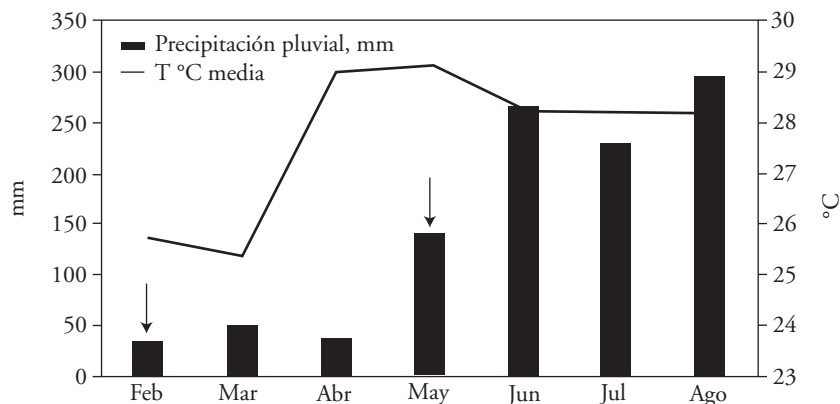


Figura 1. Precipitación pluvial acumulada y temperatura promedio por mes durante el estudio en 2013. Huimanguillo, Tabasco, México. Las flechas indican el mes en el que se realizó el corte de uniformidad, previo a los meses sin y con lluvias.

Figure 1. Cumulative rainfall and average temperature per month during the study in 2013. Huimanguillo, Tabasco, Mexico. Arrows indicate the month in which the uniformity cut was made, prior to the months with and without rain.

rebrote: 21, 42, 63 y 84 d. Los días de las edades del rebrote se contaron a partir del corte de uniformidad. El corte de uniformidad se aplicó a todas las parcelas el 26 de febrero para los meses secos, y el 20 de mayo para los meses con lluvias de 2013.

Las muestras de biomasa aérea recolectadas por especie y edad de rebrote se secaron a 50 °C, se trituraron, pasaron a través de una malla de 1 mm, en molino Wiley, y se conservaron en oscuridad a 4 °C hasta el análisis.

Las variables evaluadas fueron las concentraciones de polifenoles totales, fenoles no taninos, taninos condensados, hidrolizable y totales.

Polifenoles totales (PFT)

Las muestras se desengrasaron con éter de petróleo (Muzquiz *et al.*, 1993). Los polifenoles se determinaron con el método de Folin-Ciocalteu, y ácido gálico como estándar en muestras libres de grasa. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrómetro (ThermoElectron, Genesys 10 UV) (Makkar *et al.*, 1993).

Fenoles no taninos

A muestras libres de grasa se adicionó polivinilpirrolidona para separar fenoles taninos de los fenoles no taninos, después de agitarlas en vortex se incubaron por 15 min en oscuridad a 4 °C y se centrifugaron (10 000 rpm) a 25 °C por 10 min (Makkar *et al.*, 1993). En el sobrenadante se cuantificó la concentración de fenoles no taninos con el reactivo de Folin-Ciocalteu a 725 nm. Los estándares se prepararon a partir de una solución estándar de 0.5 mg mL⁻¹ de ácido gálico.

The evaluated variables were the concentrations of total polyphenols, no tannin phenols, condensed, hydrolyzable and total tannins.

Total polyphenols (PFT)

The samples were degreased with petroleum ether (Muzquiz *et al.*, 1993). Polyphenols were determined using the Folin-Ciocalteu method, and gallic acid as standard. Absorbance was measured at 765 nm in a spectrometer (ThermoElectron, Genesys 10 UV) (Makkar *et al.*, 1993).

Non tannin phenols

Free fat samples were added polyvinylpyrrolidone to separate tannin phenols from non tannin phenols; after shaking them in vortex they were incubated for 15 min in dark at 4 °C and centrifuged (10 000 rpm) at 25 °C for 10 min (Makkar *et al.*, 1993). In the supernatant we estimated the concentration of non tannin phenols with the Folin-Ciocalteu reagent at 725 nm. Standards were prepared from a standard solution of 0.5 mg mL⁻¹ of gallic acid.

Condensed tannins (proanthocyanidins)

To quantify the condensed tannins, fat-free samples were extracted with 80 % methanol; to 250 µL of this extract 1500 µL of butanol were added: HCl (95: 5, v/v) and 50 µL of ferric reagent (ferric ammonium sulphate at 2 % in 2N HCl) were covered and maintained in boiling waterbath for 60 min and left to cool to room temperature.

Taninos condensados (proantocianidinas)

Para cuantificar los taninos condensados, muestras libres de grasa se extrajeron con metanol al 80 %; a 250 μL de ese extracto se le agregaron 1500 μL de butanol:HCl (95:5, v/v) y 50 μL de reactivo férrico (sulfato de amonio férrico al 2 % en HCl 2 N), se cubrieron y mantuvieron en baño María a ebullición por 60 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Un blanco preparado con butanol:HCl y sin calentar se incluyó (Porter *et al.*, 1986). La absorbancia se midió a 550 nm. La concentración de taninos condensados se calculó como equivalente leucocianidina con la fórmula: $\text{TC (g kg}^{-1}\text{MS)} = (A_{550\text{nm}} \times 78.26 \times \text{Factor de dilución}) / \text{RMSP (g kg}^{-1}\text{MS)}$, donde 78.26 es un factor de corrección. El coeficiente de extinción molar (E 1 %, 1 cm, 550nm) de leucocianidinas es 460.

Taninos totales e hidrolizables

Los taninos totales (TT) se calcularon con la diferencia de fenoles no taninos de polifenoles totales. Los taninos hidrolizables (TH) fueron estimados como la diferencia de taninos totales y taninos condensados (Singh *et al.*, 2005; Rana *et al.*, 2006).

Análisis estadístico

Con los datos de concentración de cada compuesto fenólico por tratamiento se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias por el método de Tukey ($p \leq 0.05$). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los análisis se hicieron con SAS, versión 9.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones Ambientales

Las temperaturas medias mensuales y las precipitaciones acumuladas por mes fueron mayores y menores en los meses secos en comparación con los de lluvias (Figura 1). Entre los meses secos, marzo tuvo la temperatura menor, 3.7 °C menos con respecto al promedio de abril y mayo. La diferencia en precipitación pluvial acumulada entre los meses secos y de lluvias promedió 190 mm más de lluvia en estos últimos. Mayo tuvo 98 mm más de lluvia que el promedio en marzo y abril.

La precipitación baja o alta y duración del periodo son condiciones ambientales a las cuales las fabáceas forrajeras tropicales están expuestas durante su crecimiento. Esto puede limitar la acumulación de

We included a blank prepared with butanol:HCl and unheated (Porter *et al.*, 1986); and measured absorbance at 550 nm. The concentration of condensed tannins was calculated as a leucocyanidin equivalent with the formula: $\text{TC (g kg}^{-1}\text{DM)} = (A_{550\text{nm}} \times 78.26 \times \text{Dilution factor}) / \text{RMSP (g kg}^{-1}\text{DM)}$, where 78.26 is a correction factor. The molar extinction coefficient (E 1 %, 1 cm, 550nm) of leucocyanidins is 460.

Total and hydrolysable tannins

We calculated total tannins (TT) with the difference of non tannin phenols from total polyphenols. Hydrolysable tannins (TH) were estimated as the difference of total tannins and condensed tannins (Singh *et al.*, 2005; Rana *et al.*, 2006).

Statistical analysis

With the concentration data of each phenolic compound per treatment we performed analysis of variance and mean comparison tests by the Tukey test ($p \leq 0.05$). All determinations were performed in triplicate. The analyses were performed with SAS, version 9.3.

RESULTS AND DISCUSSION

Environmental Conditions

Monthly average temperatures and monthly accumulated rainfall were higher and lower in the dry months compared to the rainy season (Figure 1). Among the dry months March had the lowest temperature, 3.7 °C lower than the average of April and May. The difference in accumulated rainfall between dry and rainy months averaged 190 mm more rain in the latter. May had 98 mm more rain than the average in March and April.

Low or high rainfall and duration of the period are environmental conditions to which the tropical forage fabaceae are exposed to during their growth, which may limit the accumulation of biomass and modify the concentration of secondary metabolites (García *et al.*, 2005; Jayanegara *et al.*, 2011).

Total polyphenols

In the dry months fabaceae species, regrowth age and their interaction had a significant effect ($p \leq 0.05$) on the concentration of total polyphenols (PFT) (Table 1). The four species of fabaceae showed

biomasa y modificar la concentración de metabolitos secundarios (García *et al.*, 2005; Jayanegara *et al.*, 2011).

Polifenoles totales

En los meses secos las fabáceas, edad del rebrote y su interacción tuvieron efecto significativo ($p \leq 0.05$) en la concentración de polifenoles totales (PFT) (Cuadro 1). Las cuatro especies de fabáceas mostraron incremento inicial entre los 21 y 42 d de rebrote; pero esta tendencia de incremento no se mantuvo (Cuadro 2). Cacahuatillo, Stylo, Clitoria y Kudzú incrementaron su concentración en 27.02, 31.01, 74.62 y 46.38 g kg⁻¹ MS en ese periodo. A los 42 d, Clitoria acumuló la cantidad mayor de PFT de las especies evaluadas (155.5 g kg⁻¹ MS) y Cacahuatillo, Stylo y Kudzú no presentaron diferencias significativas (promedio 79 g kg⁻¹ MS).

Clitoria y Kudzú mantuvieron la concentración de PFT sin cambio entre 42 y 84 d del rebrote, y Cacahuatillo y Stylo disminuyeron su concentración (Cuadro 2). En los meses con lluvias PFT aumentó a los 21 d con respecto a los meses secos, y la concentración con la edad del rebrote, excepto en Kudzú (Cuadro 3). La interacción especie x edad del rebrote afectó a Kudzú, ya que aumentó su concentración de PFT con la edad del rebrote, y cambió de una concentración baja, a los 21 d junto con Stylo, a la concentración mayor a los 84 d de edad. Simultáneamente Stylo mantuvo concentración baja durante su crecimiento. Cacahuatillo y Clitoria disminuyeron el contenido de PFT entre 21 a 84 d del rebrote.

Durante el crecimiento, Clitoria y Stylo mostraron las concentraciones mayor y menor de PFT, excepto Clitoria a los 84 d en los meses de lluvias.

Variaciones del contenido de PFT durante el crecimiento de especies forrajeras tropicales se han documentado (Rana *et al.*, 2006; Jayanegara *et al.*, 2011). El efecto significativo de la época de lluvias en la concentración de PFT en *Morus alba* (García *et al.*, 2005) se debe probablemente al aumento del área foliar (Frutos *et al.*, 2004). Al respecto, en nuestro estudio el incremento de área foliar pudo haber aumentado los PFT en los meses con lluvias.

El contenido de PFT de Clitoria durante el crecimiento fue significativo, por lo que esta planta podría contribuir a disminuir las emisiones de gas metano por los rumiantes, ya que la concentración de PFT en

initial increase between 21 and 42 d of regrowth; but this increase trend did not last (Table 2). Cacahuatillo, Stylo, Clitoria and Kudzú increased their concentration by 27.02, 31.01, 74.62 and 46.38 g kg⁻¹ DM in that period. At 42 days, Clitoria accumulated the largest amount of PFT of the species tested (155.5 g kg⁻¹ DM) and Cacahuatillo, Stylo and Kudzú showed no significant differences (average 79 g kg⁻¹ DM).

Clitoria and Kudzú maintained unchanged PFT concentration between 42 and 84 d of regrowth, and Cacahuatillo and Stylo decreased their concentration (Table 2). In the rainy months PFT increased after 21 d with respect to the dry months, and decreased concentration with age of regrowth, except in Kudzú (Table 3). The interaction species x age of regrowth affected Kudzú since its PFT concentration increased with regrowth age, and changed from a low concentration, at 21 d together with Stylo, to a greater concentration at 84 old.

Simultaneously Stylo concentration remained low throughout its growth. Cacahuatillo and Clitoria decreased the content of PFT, going from 21 to 84 d of regrowth.

During growth, Clitoria and Stylo showed the highest and lowest concentrations of PFT, except Clitoria at 84 d in the rainy months.

The PFT content changes during growth of tropical forage species have been documented (Rana *et al.*, 2006; Jayanegara *et al.*, 2011). The significant effect of the rainy season on the concentration of PFT in *Morus alba* (García *et al.*, 2005) was probably due to the increase of the leaf area (Frutos *et al.*, 2004). In this regard, the expanded leaf area may have increased PFT during the rainy months, in our study.

The content of Clitoria PFT during growth was significant, so that this plant could help reduce methane emissions by ruminants, since the concentration of PFT in plants shows negative correlation with the production of methane (Jayanegara *et al.*, 2009; Jayanegara *et al.*, 2011).

Non tannin phenols (FNT)

Simple non tannin phenols showed a similar pattern to the PFT in regrowth age, and a significant species x age of regrowth interaction (Table 1). Stylo had the lowest concentration of FNT between the species evaluated (Table 2 and 3). The FNT varied

Cuadro 1. Efecto de especie de fabácea, edad del rebrote y su interacción en la concentración de compuestos fenólicos en los meses secos y de lluvia del 2013, en Huimanguillo, Tabasco, México.

Table 1. Table 1. Effect of fabaceae species, regrowth age and their interaction in the concentration of phenolic compounds in the dry and rainy months of 2013, in Huimanguillo, Tabasco, Mexico.

Compuestos fenólicos g Kg ⁻¹ MS	Media	Especie (S)	Edad (E)	S x E
Meses sin lluvias (marzo a mayo)				
Polifenoles totales	78.33 ± 22.9	***	***	***
Fenoles no taninos	23.62 ± 5.7	***	***	***
Taninos condensados	10.27 ± 5.4	*	***	***
Taninos totales	54.76 ± 20.4	***	***	***
Taninos hidrolizables	44.84 ± 19.2	***	***	***
Meses con lluvias (junio a agosto)				
Polifenoles totales	72.18 ± 20.3	***	NS	***
Fenoles no taninos	25.31 ± 6.6	***	***	***
Taninos condensados	9.80 ± 3.1	***	***	***
Taninos totales	46.86 ± 18.2	***	NS	***
Taninos hidrolizables	37.20 ± 18.3	***	*	***
GL		3	3	9

*, ** y *** Significancia p ≤ 0.05, 0.01 y 0.001. NS: no significativo. GL: grados de libertad ♦ *, ** and *** Significance p ≤ 0.05, 0.01 and 0.001. NS: not significant. GL: degrees of freedom.

Cuadro 2. Fenoles y sus fracciones (g kg⁻¹ de MS) en rebrotes de fabáceas forrajeras tropicales entre marzo y mayo (meses secos) del 2013. Huimanguillo, Tabasco, México.

Table 2. Table 2. Phenol fractions (g kg⁻¹ DM) in regrowths of tropical forage fabaceae between March and May (dry months) 2013. Huimanguillo, Tabasco, Mexico.

Especie	Edad del rebrote	Polifenoles totales	Fenoles no taninos	Taninos condensados	Taninos hidrolizables	Taninos totales
Cacahuatillo	21	53.49 bB	23.84 bA	06.96 aA	22.68 cB	29.64 cB
	42	80.51 aC	21.59 bC	06.43 aC	52.48 aB	58.91 aB
	63	71.04 aB	24.24 bA	10.61 aC	36.18 bB	46.80 bC
	84	35.06 cC	33.65 aA	07.99 aB	00.00 dC	02.17 dD
Stylosanthes	21	31.75 bC	11.20 cB	04.62 cA	15.92 bB	20.54 bB
	42	62.76 aC	18.59 aC	06.07 bcC	38.09 aB	44.17 aB
	63	37.90 bC	14.98 bB	15.38 aB	07.54 bC	22.92 bD
	84	39.07 bC	15.78 abC	10.50 abB	12.78 bC	23.28 bC
Clitoria	21	80.78 bA	23.30 cA	08.64 bA	48.82 bA	57.47 bA
	42	155.4 aA	40.10 aA	16.91 aA	98.46 aA	115.37 aA
	63	138.7 aA	30.47 bcA	07.65 bC	101.78 aA	108.30 aA
	84	146.9 aA	32.03 abA	08.60 bB	106.35 aA	114.96 aA
Kudzú	21	47.45 bBC	13.45 bB	05.35 cA	29.59 cAB	33.9 bAB
	42	93.83 aB	27.51 aB	11.63 bB	58.00 aB	66.32 aB
	63	84.53 aB	24.01 aA	19.14 aA	41.37 bcB	60.52 aB
	84	93.95 aB	23.14 aB	20.21 aA	48.64 abB	70.80 aB

Medias con letras minúsculas distintas en una columna y dentro de cada especie son significativamente diferentes (Tukey, p ≤ 0.05). Medias con letras mayúsculas distintas en una columna indican diferencia significativa (Tukey, p ≤ 0.05) entre especies para una misma edad del rebrote ♦ Means with different lowercase letters in a column and within each species are significantly different (Tukey, p ≤ 0.05). Means with different capital letters in a column indicate significant difference (Tukey, p ≤ 0.05) between species of the same age of regrowth.

plantas tiene correlación negativa con la producción de metano (Jayanegara *et al.*, 2009; Jayanegara *et al.*, 2011).

Fenoles no taninos (FNT)

Los fenoles simples no taninos mostraron un patrón similar al de los PFT con la edad del rebrote, y una interacción significativa especie x edad del rebrote (Cuadro 1). Stylo presentó la concentración menor de FNT entre las especies evaluadas (Cuadro 2 y 3). Los FNT variaron en los meses de lluvias y en los no lluviosos. A los 42 d Stylo, Clitoria y Kudzú incrementaron los FNT, excepto Cacahuatillo en los meses secos. Concentraciones superiores, de 14 a 56 g kg⁻¹ MS de FNT, se observaron en hojas de fabáceas arbustivas (Jayanegara *et al.*, 2011). Estos compuestos son de interés porque algunos de ellos tienen propiedades antioxidantes (Makkar *et al.*, 2007) y podrían tener una acción inhibitoria directa sobre la actividad de metanógenos (Jayanegara *et al.*, 2011).

both in the rainy and non-rainy months. At 42 d Stylo, Clitoria and Kudzú increased the FNT, except Cacahuatillo in the dry months. Higher concentrations of 14-56 g kg⁻¹ MS FNT were observed in leaves of shrubby fabaceae (Jayanegara *et al.*, 2011). These compounds are of interest because some of them exhibit antioxidant properties (Makkar *et al.*, 2007) and could have a direct inhibitory action on the activity of methanogens (Jayanegara *et al.*, 2011).

Total tannins (TT)

Total tannins concentration increased in the four species of fabaceae in the dry months, and only in Kudzú in the rainy months (Table 2 and 3). The species x regrowth age interaction was significant only in the dry months (Table 1). The TT ranged from 2.17 (Cacahuatillo) to 115.37 (Clitoria) g kg⁻¹ MS in the dry months and 9.97 (Stylo) to 92.63 (Clitoria) g kg⁻¹ MS in the rainy season. Other studies show that tannins can act favorably on ruminal

Cuadro 3. Fenoles y sus fracciones (g kg⁻¹ de MS) en especies de fabáceas forrajeras tropicales en edades diferentes del rebrote durante junio a agosto (meses con lluvias) del 2013. Huimanguillo, Tabasco, México.

Table 3. Phenols and their fractions (g kg⁻¹ DM) in tropical forage fabaceae species in different ages of regrowth during June to August (rainy months) 2013. Huimanguillo, Tabasco, Mexico.

Especie	Edad del rebrote	Polifenoles totales	Fenoles no taninos	Taninos condensados	Taninos hidrolizables	Taninos totales
Cacahuatillo	21	76.90 aB	22.90 aB	07.85 aB	46.14 aAB	53.9 aAB
	42	57.8 abB	29.43 aA	08.43 aB	20.00bcBC	28.4bcBC
	63	45.98 bB	29.50 aA	08.51 aBC	07.96 cB	16.47 cB
	84	66.61abB	31.78 aA	07.99 a	26.82 b	34.82 bC
Stylosanthes	21	36.80 aC	11.46 cB	03.66bC	21.67 aC	25.33 aC
	42	31.94 aC	21.96 aB	10.69aB	01.56 bC	09.97 bC
	63	38.74 aB	15.82 bB	06.00abC	16.91 aB	22.92 aB
	84	34.74 aC	14.12bcB	06.36ab	14.24 a	20.61abC
Clitoria	21	132.3 aA	39.74 aA	14.59 bA	78.03 aA	92.63 aA
	42	121.7abA	39.63 aA	20.10aA	61.98 aA	82.09 aA
	63	91.93bcA	27.91 bA	14.99 bA	49.02 aA	64.02 aA
	84	81.77 cB	24.21 bAB	13.82 b	43.73 a	57.56 aB
Kudzú	21	50.94 cBC	16.31 cB	04.57 dC	30.05 cBC	34.6 cBC
	42	81.43 bB	26.8abAB	12.55 aB	42.07bcAB	54.63bcAB
	63	95.85abA	23.02 bA	09.70 bB	63.12abA	72.82abA
	84	109.27aA	30.38 aA	06.97 c	71.91 a	78.88 aA

Medias con letras minúsculas distintas en una columna y dentro de cada especie son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Medias con letras mayúsculas distintas en una columna indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$) entre especies para una misma edad del rebrote ♦ Means with different lowercase letters in a column and within each species are significantly different (Tukey, $p \leq 0.05$). Means with different capital letters in a column indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$) between species of the same age of regrowth.

Taninos totales (TT)

La concentración de TT aumentó en las cuatro especies de fabáceas en los meses secos, y solo en Kudzú en los de lluvias (Cuadro 2 y 3). La interacción especie x edad del rebrote fue significativa solo en los meses secos (Cuadro 1). Los TT variaron de 2.17 (Cacahuatillo) a 115.37 (Clitoria) g kg^{-1} MS en los meses secos y de 9.97 (Stylo) a 92.63 (Clitoria) g kg^{-1} MS en los de lluvias. Otros estudios mostraron que los taninos pueden actuar favorablemente en la fermentación ruminal, ya que forman complejos tanino-proteína que evitan la degradación de ésta en el rumen, inhiben la metanogénesis y mejoran la eficiencia reproductiva, aunque los efectos benéficos no son los mismos en todos los casos (Patra y Saxena, 2011). El efecto benéfico en la eficiencia reproductiva del ganado depende de la estructura química de los taninos presentes, su concentración y tipo de dieta (Makkar *et al.*, 2007). El efecto en la reducción de la metanogénesis con los TT no se observa en todos los casos (Jayanegara *et al.*, 2011). Solo Stylo y Cacahuatillo mostraron valores promedio inferiores a 60 g kg^{-1} MS de TT en todas las edades del rebrote (Cuadro 2 y 3). Clitoria y Stylo mostraron la concentración mayor y menor durante su crecimiento en el año. Algo similar se observó en Clitoria y Kudzú en los últimos 21 d en la época con lluvia y en Stylo y Cacahuatillo en los meses secos a los 84 d de rebrote.

Taninos condensados (TC)

Información de la variación en taninos condensados es abundante en especies de fabáceas forrajeras y su efecto benéfico en producción pecuaria cuando las concentraciones no exceden 60 g kg^{-1} MS (Makkar *et al.*, 2003; Rochfort *et al.*, 2008). Los TC de las especies en estudio variaron, en promedio, en cantidades similares en los meses secos y de lluvias (Cuadro 2 y 3). Solo en Clitoria aumentó TC en los meses con lluvia en todas las edades del rebrote (Cuadro 3). Kudzú, Stylo y Cacahuatillo mostraron concentraciones mayores desde 63 d del rebrote y en Clitoria desde los 42 d en los meses secos (Cuadro 2). Clitoria disminuyó su concentración casi 10 veces a los 63 d con respecto a los 42 d, y en los meses con lluvias, esta especie también aumentó la concentración de TC con la edad del rebrote (Cuadro 3). Berard *et al.* (2011) reportaron el contenido de TC en hojas de

fermentation, as they form tannin-protein complexes that prevent the latter's degradation in the rumen, inhibit methanogenesis and improve reproductive efficiency, although the beneficial effects are not the same in all cases (Patra and Saxena, 2011). The beneficial effect on livestock reproductive efficiency depends on the chemical structure of tannins, their concentration and type of diet (Makkar *et al.*, 2007). The effect of reducing methanogenesis with TT is not observed in all cases (Jayanegara *et al.*, 2011). Only Stylo and Cacahuatillo showed average values below 60 g kg^{-1} DM of TT in all ages of regrowth (Tables 2 and 3). Clitoria and Stylo showed the highest and lowest concentrations along their growth during the year. Something similar was observed in Clitoria and Kudzú in the last 21 d during the rainy period, and in Stylo and Cacahuatillo in the dry months at 84 d of regrowth.

Condensed tannins (TC)

There is abundant information on the variation of condensed tannins in forage fabaceae species and their beneficial effect on livestock production when concentrations do not exceed 60 g kg^{-1} MS (Makkar *et al.*, 2003; Rochfort *et al.*, 2008). The TC of the species under study ranged, on average; in similar amounts in dry and wet months (Tables 2 and 3). Only in Clitoria we observed a TC increase in the rainy months at all ages of regrowth (Table 3). Kudzú, Stylo and Cacahuatillo showed higher concentrations from 63 d of regrowth and in Clitoria from 42 d in the dry months (Table 2).

Clitoria concentration decreased almost 10 times at 63 d compared to 42 d, and in the rainy months this species also increased the concentration of TC with regrowth age (Table 3). Berard *et al.* (2011) reported the content of TC in leaves of tropical fabaceae, *Acacia angustissima* and *Calliandra calothyrsus* (33 and 196 g kg^{-1} DM), as well as herbaceous fabaceae, *Medicago sativa* and *Astragalus cicer* (0.0 g kg^{-1} DM) and *Dalea purpurea* (68.7 g kg^{-1} DM). The authors also observed an increase in TC with the maturity of the plant. The species had levels that could be beneficial for feeding ruminants (Patra and Saxena, 2011), although their biological activity depends on their chemical structure and molecular weight. The binding of tannins with proteins depends on the number of phenolic groups in the molecule and

fabáceas tropicales, *Acacia angustissima* y *Calliandra calothyrsus* (33 y 196 g kg⁻¹ MS), y en fabáceas herbáceas, *Medicago sativa* y *Astragalus cicer* (0.0 g kg⁻¹ MS) y *Dalea purpurea* (68.7 g kg⁻¹ MS). Ellos también observaron aumento en TC con la madurez de la planta. Las especies presentaron concentraciones que podrían ser benéficas en alimentación de rumiantes (Patra y Saxena, 2011), aunque su actividad biológica depende de su estructura química y peso molecular. La unión de los taninos con proteínas depende del número de grupos fenólicos en la molécula y los de peso molecular alto no se absorben (Frutos *et al.*, 2004).

Las concentraciones bajas de TC en las especies de nuestro estudio, comparando con otras fabáceas forrajeras, puede ser efecto de la especie y tejido vegetal analizado. Al respecto, Häring *et al.* (2007) indicaron que la distribución de taninos en los tejidos de las plantas es heterogénea, y concentraciones mayores se detectan en hojas y menores en tallos. Debido a esto se observa un efecto de dilución en la concentración de TC cuando la muestra incluye la biomasa aérea total.

Taninos hidrolizables (TH)

Todas las especies alcanzaron concentración mayor de TH a los 42 d de edad del rebrote. Desde esa edad, Clitoria mantuvo la concentración de 102.2 g kg⁻¹ MS. En las otras especies la concentración fluctuó. Al contrario, en los meses de lluvias las especies no mostraron tendencias similares. Clitoria mantuvo una concentración promedio de 58.19 g kg⁻¹ MS durante el crecimiento. Kudzú incrementó continuamente su concentración con la edad del rebrote. Clitoria y Kudzú tuvieron concentración mayor entre 42 y 84 d. Stylo mostró las concentraciones menores, junto con Kudzú a los 21 d y con Cacahuatillo a los 63 y 84 d de edad del rebrote (Cuadro 3).

Concentraciones de TH superiores a 200 g kg⁻¹ MS pueden producir toxicidad al ganado (Mole *et al.*, 1993; Rana *et al.*, 2006). Las especies evaluadas no superaron los niveles tóxicos en los meses sin o con lluvias. La toxicidad causada por TH puede deberse a la degradación de los TH, con lo que su peso molecular disminuye y la absorción de los productos en el rumen puede producir una carga metabólica mayor con fenoles, los que pueden exceder la capacidad de desintoxicación del hígado (Jayanegara *et al.*, 2011).

those of high molecular weight (Frutos *et al.*, 2004) are not absorbed.

Low concentrations of TC in the species under study compared to other forage fabaceae can be the result of the species and plant tissue analyzed. In this regard, Häring *et al.* (2007) indicated that the distribution of tannin in the tissues of plants is heterogeneous, and concentration are higher in leaves and lower in stems. On this account a dilution effect is observed on the concentration of TC when the sample included total aboveground biomass.

Hydrolyzable tannins (TH)

All species reached a higher concentration of TH at 42 d of regrowth age. From this age, Clitoria maintained the concentration of 102.2 g kg⁻¹ DM. In the other species concentration fluctuated. On the contrary, in the rainy months, the species showed no similar trends. Clitoria maintained an average concentration of 58.19 g kg⁻¹ DM during growth. Kudzú continuously increased its concentration with regrowth age. Clitoria and Kudzú had a higher concentration between 42 and 84 d. Stylo showed lower concentrations, along with Kudzú at 21 d and Cacahuatillo at 63 and 84 d of regrowth age (Table 3).

The TH concentrations above 200 g kg⁻¹ DM may cause toxicity to livestock (Mole *et al.*, 1993; Rana *et al.*, 2006). The species tested did not exceed the toxic levels in months with or without rain. Toxicity induced by TH may be due to TH degradation, so its molecular weight decreases and the absorption of products in the rumen can cause an increased metabolic burden with phenols, which may exceed the capacity of liver detoxification (Jayanegara *et al.*, 2011).

The results of our study showed the effect of plant age on the concentration of phenolic compounds during their growth. But the interaction species x regrowth age was significant for the groups of compounds evaluated. Plants had the highest concentrations of phenolic compounds at 42 d of regrowth age. The highest concentrations of phenolic compounds were observed in Clitoria and the lowest in Stylo; these concentrations were lower than those identified as toxic by some authors. The highest levels of condensed tannins (16.91 and 20.1 g kg⁻¹ DM) in Clitoria, at the age of 42 d in months with and

Los resultados de nuestro estudio mostraron el efecto de edad de la planta en la concentración de compuestos fenólicos durante su crecimiento. Pero, la interacción especie x edad del rebrote fue significativa para los grupos de compuestos evaluados. Las plantas tuvieron las concentraciones mayores de compuestos fenólicos a los 42 d de edad del rebrote. Las concentraciones mayores de compuestos fenólicos se observaron en *Clitoria* y las menores en *Stylo*; esas concentraciones fueron menores a las identificadas como tóxicas por algunos autores. Los niveles mayores de taninos condensados (16.91 y 20.1 g kg⁻¹ MS) en *Clitoria*, a la edad de 42 d en los meses sin y con lluvias, son menores que la considerada (60 g kg⁻¹ MS) mínima para que la fermentación en rumen sea afectada (Makkar, 2003).

CONCLUSIONES

La especie de fabácea y la edad de rebrote son fuente de variación en la concentración de polifenoles totales durante el crecimiento; la edad de rebrote (madurez de la planta) es el factor que afecta más esas concentraciones. Las concentraciones máximas de compuestos fenólicos se observaron a los 42 d, y no alcanzaron los niveles tóxicos para los animales. *Clitoria* y *Stylo* presentaron la concentración de compuestos fenólicos mayor y menor entre las especies.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero para la realización de estudios de postgrado en el Campus Tabasco del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.

LITERATURA CITADA

- Aerts, R. J., T. N. Barry, and W. C. McNabb. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agr. Ecosyst. Environ.* 75: 1-12.
- Berard, N. C., Y. Wang, K. M. Wittenberg, D. O. Krause, B. E. Coulman, T. A. McAllister, and K. H. Ominski. 2011. Condensed tannin concentrations found in vegetative and mature forage legumes grown in western Canada. *Can. J. Plant Sci.* 91: 669-675.
- Evans, J. D., and S. A. Martin. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.* 41: 336-340.
- Frutos, P., G. Hervás, F. J. Giráldez, and A. R. Mantecón. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish J. Agric. Res.* 2: 191-202.

without rains, are lower than that considered (60 g kg⁻¹ DM) minimum for the rumen fermentation be affected (Makkar, 2003).

CONCLUSIONS

The fabaceae species and age of regrowth are a source of variation in the concentration of total polyphenols during growth; regrowth age (maturity of the plant) is the factor that most affects these concentrations. The maximum concentrations of phenolic compounds were observed at 42 d, and did not reach toxic levels for animals. *Clitoria* and *Stylo* presented the highest and lowest concentration of phenolics between species.

—End of the English version—



- García D. E., M. G. Medina, y F. Ojeda. 2005. Efecto de la fertilización orgánica, la variedad y la época en el perfil polifenólico de *Morus alba* (L.). *Rev. AIA* 9: 53-68.
- Gebrehiwot, L., P. R. Beuselinck, and A. R. Craig. 2002. Seasonal variations in condensed tannin concentration of three *Lotus* species. *Agron. J.* 94: 1059-1065.
- Hagerman, A. E., and L. G. Butler. 1991. Tannins and lignins. *In: Rosenthal G. A. and M. R. Berenbaum (eds). Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites. Vol. I. Academic Press, San Diego, CA. pp. 355-388.*
- Häring, D. A., D. Suter, N. Amrhein, and A. Lüscher. 2007. Biomass allocation is an important determinant of the tannin concentration in growing plants. *Ann. Bot. (Oxford)* 99: 111-120.
- Heinritz, S. N., D. Martens S., P. Avila, and S. Hoedtke. 2012. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174: 201-210.
- Jayanegara, A., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2009. Methane reduction effect of simple phenolic acids evaluated by in vitro Hohenheim gas production method. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 18: 98.
- Jayanegara, A., E. Wina, C. R. Soliva, S. Marquardt, M. Kreuzer, and F. Leiber. 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 163: 231-243.
- Jezierny, D., R. Mosenthin, and E. Bauer. 2010. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157: 111-128.
- Juárez-Hernández, J., E. D. Bolaños-Aguilar, y M. Reinoso. 2004. Contenido de proteína por unidad de materia seca acumulada en pastos tropicales. Época de Nortes. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 38: 423-430.

- Liu, H. W., X. F. Dong, J. M. Tong, and Q. Zhang. 2011. A comparative study of growth performance and antioxidant status of rabbits when fed with or without chestnut tannins under high ambient temperature. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164: 89-95.
- Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Res.* 49: 241-256.
- Makkar, H. P. S., M. Blummel, N. K. Borowy, and K. Becker. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.* 61: 161-165.
- Makkar, H. P. S., G. Francis, and K. Becker. 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal* 1: 1371-1391.
- Martens, S. D., T. T. Tiemann, J. Bindelle, M. Peters, and C. E. Lascano. 2012. Alternative plant protein sources for pigs and chickens in the tropics – nutritional value and constraints: a review. *J. Agric. Rural Dev. Tropics and Subtropics* 113: 101-123.
- Miller, P. R., and N. J. Ehlke. 1994. Condensed tannins relationships with in vitro forage quality analysis for birdsfoot trefoil. *Crop Sci.* 34: 1074-1079.
- Mole, S., J. C. Roglers, and L. G. Butler. 1993. Growth reduction by dietary tannins: different effects due to different tannins. *Biochem. Syst. Ecol.* 21: 667-677.
- Muzquiz, M., C. Burbano., Cuadrado C., and C. De la Cuadra. 1993. Determination of thermo resistant antinutritional factors in legumes. I. Alkaloids. *Invest. Agrar. Prod. Prot. Veg.* 8: 351-361.
- Onyeonagu, C. C., and S. M. Eze. 2013. Proximate compositions of some forage grasses and legumes as influenced by season of harvest. *African J. Agric. Res.* 8: 4033-4037.
- Patra, A. K., D. N. Kamra, and N. Agarwal. 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128: 276-291.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 91: 24-37.
- Porter, L. H., L. N. Hrstich, and B. C. Chan. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry* 25: 223-230.
- Rana, K. K., M. Wadhwa, and M. P. S. Bakshi. 2006. Seasonal variations in tannin profile of tree leaves. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19: 1134-1138.
- Rochfort, S., A. J. Parker, and F. R. Dunshea. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69: 299-322.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Singh, B., A. Sahoo, R. Sharma, and T. K. Bhat. 2005. Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 351-364.