

CONTENIDO DE TANINOS CONDENSADOS EN GERMOPLASMA DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Lotus* EN DIFERENTES AMBIENTES

Condensed tannin concentrations of three *Lotus* species germplasm grown in different environments

Hernán Acuña^{1*}, Alex Concha² y Marcos Figueroa²

RESUMEN

Los taninos condensados (TC) presentes en *Lotus* spp., dependiendo de su concentración en la planta, pueden evitar el meteorismo y favorecer la absorción de proteína en rumiantes. Con el objetivo de conocer la variabilidad de esta característica se determinó por el método del butanol-HCl la concentración (% base materia seca) de TC en el follaje de 13 cultivares de *Lotus corniculatus* L. (Lc) introducidos de Norteamérica, Sudamérica y Oceanía, 11 accesiones de *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. ex Willd. (Lt) y 22 accesiones de *Lotus uliginosus* Schkuhr. (Lu), colectadas en Chile entre los 32° y 38° lat. S, y 36° y 46° lat. S, respectivamente. Los experimentos, en un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones, fueron establecidos en otoño de 1998 en cinco diferentes ambientes en la zona centro sur de Chile (suelo arcilloso, suelo arenoso y tres suelos volcánicos con diferentes niveles de humedad disponible) y el muestreo para análisis se hizo en primavera-verano de 1999-2000, cuando las plantas estaban en plena floración. Los resultados mostraron diferencias significativas entre cultivares o accesiones, dentro de cada localidad, en concentración de TC totales y/o en sus fracciones extractables o ligados a la proteína o a la fibra. Se encontró alta variabilidad entre genotipos de Lc (rango 4,7-8,7% de TC totales, media 6,1%) y de Lu (rango 6,3-11,0% de TC totales, media 8,2%). En Lt la variabilidad entre accesiones fue muy baja y la media fue 4,8% de TC totales, considerablemente más alta que lo informado por la literatura.

Palabras clave: *Lotus corniculatus*, *L. tenuis*, *L. uliginosus*, taninos condensados.

ABSTRACT

The condensed tannins (TC) present in *Lotus* spp., according their concentrations in plant, can avoid bloat and improve the protein absorption in ruminants. With the objective to know the variability of this characteristic, the TC concentration (% dry matter basis) determined by the butanol-HCl procedure in 13 cultivars of *Lotus corniculatus* L. (Lc) introduced from North and South-America and Oceania, 11 accessions of *Lotus tenuis* Waldst. & Kit. ex Willd. (Lt) and 22 accessions of *Lotus uliginosus* Schkuhr. (Lu) collected in Chile, from 32° to 38° lat. S and 36° to 46° lat. S, respectively. The field experiments, with two randomized complete blocks, were established in autumn 1998 on five different environments in the central-south zone of Chile (clay soil, sandy soil, and three volcanic soils with different levels of water availability). The herbage sampling was conducted in spring-summer 1999-2000, when the plants were in full flowering. Significant differences between cultivars or accessions were found within each site, in total and/or in extractable, protein bound or fiber bound fractions of TC concentrations. The Lc and Lu genotypes showed high variability with a range of 4.7 to 8.7% and 6.3 to 11.0% and means of 6.1 and 8.2%, respectively, of total TC. The Lt general mean was 4.8%, considerably higher than the figures reported in literature, and had low variability.

Key words: *Lotus corniculatus*, *L. tenuis*, *L. uliginosus*, condensed tannins.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Casilla 426, Chillán, Chile. E mail: hacuna@inia.cl*

*Autor para correspondencia.

² Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Casilla 537, Chillán, Chile.

Resultados parciales de este trabajo han sido presentados en: XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal, Talca, 2003; XX International Grassland Congress, Ireland and United Kingdom, Dublin, 2005; y *Lotus* Newsletter 35(1):11-12, 2005.

Recibido: 29 de noviembre de 2006.

Aceptado: 1 de febrero de 2007.

INTRODUCCIÓN

Las especies forrajeras del género *Lotus*, en especial *L. corniculatus* (Lc) y *L. uliginosus* (Lu) y en menor medida *L. tenuis* (Lt), contienen taninos condensados (TC) en sus tejidos. En los años sesenta se observó que estos compuestos evitaban el meteorismo en los rumiantes, y una década más tarde se confirmó su presencia en *Lotus* spp. y otras leguminosas forrajeras.

Los TC son productos secundarios de las plantas que se encuentran en las paredes celulares o almacenados en vacuolas, tallos, corteza, hojas, flores o semillas, principalmente en las dicotiledóneas. Desde el punto de vista químico son compuestos orgánicos complejos derivados del flavonol, solubles en agua, con peso molecular entre 500 y 3000, y capaces de precipitar proteínas. McMahon *et al.* (2000) presentan una revisión detallada sobre la química de estos compuestos, sus funciones y ubicación en la planta.

El meteorismo en rumiantes que consumen leguminosas forrajeras ocurre cuando los gases producidos durante la fermentación de los alimentos son atrapados dentro del rumen en la forma de una espuma estable. Esta espuma impide la expulsión normal del gas y con ello aumenta el volumen y la presión intrarruminal (Tanner *et al.*, 1995). Las especies forrajeras del género *Lotus*, que contienen una apreciable cantidad de TC, no producen este grave desorden digestivo y pueden reducir la incidencia del meteorismo en animales que están consumiendo plantas de alto riesgo, como alfalfa (*Medicago sativa* L.), trébol blanco (*Trifolium repens* L.) o trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), posiblemente ligándose a las proteínas en el fluido ruminal y reduciendo su capacidad para dar estabilidad a la espuma (McMahon *et al.*, 1999). Niveles bajos de TC en el alimento mejoran la utilización de la proteína por los rumiantes sin afectar el consumo ni la digestibilidad de los carbohidratos (Wang *et al.*, 1996), al aumentar el flujo y absorción de compuestos nitrogenados no amoniacales (proteína dietaria, endógena y microbial, péptidos y aminoácidos) hacia el intestino delgado, lo cual es de alto valor económico ya que la proteína es generalmente el componente más caro de la ración.

La medición de los TC en la planta es compleja debido a su reactividad con otros compuestos. A pH neutro los TC forman complejos estables con proteínas y carbohidratos disminuyendo su extractabilidad (Terrill *et al.*, 1990). Para la determinación de TC totales en la planta, Terrill *et al.* (1992) propusieron un procedimiento que permite determinar separadamente los TC extractables, los TC ligados a la proteína y los TC ligados a la fibra. Gran parte de la información que existe en la literatura ha sido obtenida por métodos que sólo determinan los TC extractables, como la entregada por Kelman (2006). Sin embargo, según Terrill *et al.* (1992) existe una buena correlación entre TC extractables y totales. En promedio, para 11 leguminosas forrajeras estudiadas, los TC extractables corresponden al 68% de los TC totales. Estos autores obtuvieron que el 33% de los TC totales fueron extractables para el caso específico de Lc y Lt.

La concentración de TC en las plantas es controlada primariamente por factores genéticos y en segundo término por variables ambientales (Miller y Ehlke, 1996; McMahon *et al.*, 2000). En general, su concentración aumenta con la madurez y está asociada con el aumento de la lignina en los tejidos, lo cual puede causar la disminución de la digestibilidad del forraje cuando se alcanzan niveles demasiado altos. Entre los factores ambientales, la temperatura del aire y la fertilidad del suelo son los más importantes. Lees *et al.* (1994) informaron que *Lotus pedunculatus* Cav. (syn. *L. uliginosus*) alcanzó mayores niveles de TC cuando creció a 30°C comparado con 20°C, y otros autores han observado incrementos significativos en plantas que crecen en suelos ácidos y de baja fertilidad con respecto a las cultivadas en suelos de alta fertilidad. Sin embargo, la aplicación de cal al suelo (que elevó el pH de 4,3 a 5,2) no disminuyó significativamente la concentración de TC en hojas de Lc, Lu, y Lt, manteniéndose las claras diferencias entre especies (Kelman y Tanner, 1990).

Lo anterior refuerza la conclusión de Carter *et al.* (1999), en el sentido que la relación entre fertilidad del suelo y concentración de TC en la planta puede ser confundida con el efecto de factores climáticos, como estrés hídrico, temperatura, y concentración de dióxido de carbono. Anuraga *et al.* (1993) informaron que el nivel de TC en Lu aumentó cuando las tasas de crecimiento se redujeron por estrés hídrico y altas temperaturas, mientras que en Lc

estos factores no afectaron el nivel de TC. La disponibilidad de azufre en el suelo también es importante. Kelman (2006) encontró que en Lc los niveles de TC se mantuvieron bajos al aumentar los niveles de fósforo y azufre en el medio de cultivo y en Lu éstos aumentaron al incrementar el fósforo y azufre disponibles.

De acuerdo al trabajo de Kelman y Tanner (1990), las concentraciones de TC en Lc varían entre 0,15 y 7,28%, base peso seco, con una media de 2,09; Terrill *et al.* (1992) informaron 2,1% de TC totales para esta especie; Anuraga *et al.* (1993) informan valores de entre 0,5 y 6% con un máximo en verano; Douglas *et al.* (1999) obtuvieron concentraciones de TC totales de 5,0% de los cuales 2,2% estaban ligados a la proteína y 0,4% a la fibra; y Kelman (2006) midió 0,4% en plantas jóvenes (68 días). En general, Lc presenta concentraciones de TC inferiores a Lu, con promedios cercanos al rango de 2 a 3%, sugerido como óptimo por Waghorn *et al.* (1990) para mejorar la eficiencia del uso de la proteína sin disminuir el consumo y la digestibilidad. La información de la literatura sobre concentraciones de TC en Lu entrega mediciones en el rango de 2,5 a 10,7% de taninos extractables (Kelman y Tanner, 1990); 10% para el cv. Sharna y 2 a 5% para el cv. Maku (Anuraga *et al.*, 1993). De las tres especies, Lt es la de menor contenido de TC: 0,07 y 0,16% de TC extractables, con suelo sin encalar y encalado, respectivamente, según Kelman y Tanner (1990), y 0,6% de TC totales según Terrill *et al.* (1992).

El objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad de la concentración de TC en germoplasma de tres especies de *Lotus*, introducido (*L. corniculatus*) o colectado en Chile (*L. tenuis* y *L. uliginosus*), cultivadas en cinco ambientes en las regiones del Bío-Bío y de La Araucanía. Esta información complementará la caracterización agronómica (Acuña *et al.*, 2002a; 2002b) y sobre fijación biológica de nitrógeno (Acuña *et al.*, 2004) del germoplasma estudiado, para identificar qué accesiones pueden ser usadas en programas de mejoramiento genético para Chile Central y Sur.

MATERIALES Y MÉTODOS

El germoplasma estudiado incluyó 12 cultivares de *Lotus corniculatus* (Lc) introducidos de Norteamérica, Sudamérica y Oceanía, más uno nacional; 11 accesiones de *Lotus tenuis* (Lt) y 21 accesiones de *Lotus uliginosus* (Lu) provenientes de colecciones de germoplasma naturalizado realizadas en Chile, más el cultivar neozelandés Maku. La procedencia de cada uno de los cultivares de Lc introducidos se detalla en Acuña *et al.* (2002b) y la identificación original de las accesiones y la ubicación y características del suelo de los sitios de colección de Lt y Lu se encuentran en Acuña *et al.* (2002a).

Para la determinación de TC se utilizaron dos repeticiones de los experimentos de caracterización agronómica de los materiales ya mencionados, llevados a cabo por especie entre los años 1998 y 2000, en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, en cinco localidades, incluyendo en cada una de ellas a las especies mejor adaptadas a los respectivos ambientes. En Chillán (36°36' lat. S; 72°02' long. O) y Cabrero (36°58' lat. S; 72°23' long. O) se estudió Lc, Lg y Lu; en Cato (36°32' lat. S; 71°54' long. O) Lc y Lg; en Vilcún (38°41' lat. S; 72°25' long. O) Lc y Lu, y Lc en San Ignacio (36°49' lat. S; 71°55' long. O). La forma y fecha de establecimiento de los experimentos, tamaño de parcelas, aplicación de fertilizantes, riego en algunas localidades y manejo de cortes se describen en Acuña *et al.* (2002a) para Lc, y en Acuña *et al.* (2002b) para Lt y Lu. En el **Cuadro 1** se presentan las características del suelo y clima de cada localidad.

Se realizó análisis de varianza de acuerdo al diseño utilizado para los resultados por variable y por experimento. En los cuadros de resultados se presenta el error estándar de la media (EE) como expresión de la variabilidad del germoplasma estudiado. La prueba de la DMS (Diferencia Mínima Significativa) indica el nivel de significancia entre pares de medias.

Cuadro 1. Características físicas y químicas del suelo y variables climáticas en cada localidad.

Table 1. Soil physical and chemical characteristics and climatic variables per locality.

Ítem	Cato	Cabrero	Chillán	San Ignacio	Vilcún
pH	6,00	6,80	6,50	5,90	5,70
MO, %	10,00	8,10	2,50	15,00	15,00
N, mg kg ⁻¹	21,00	11,00	9,00	16,00	35,00
P, mg kg ⁻¹	6,00	10,00	3,00	7,00	18,00
K, cmol kg ⁻¹	0,23	0,16	0,09	0,11	0,70
Ca, cmol kg ⁻¹	4,60	8,86	1,32	4,77	5,60
Mg, cmol kg ⁻¹	0,56	5,39	1,10	0,48	0,73
Na, cmol kg ⁻¹	0,17	0,46	0,13	0,21	0,91
Zn, cmol kg ⁻¹	0,11	0,56	0,32	0,22	n.o.
Fe, cmol kg ⁻¹	30,89	67,87	41,27	25,77	n.o.
Cu, cmol kg ⁻¹	0,91	3,31	1,15	0,72	n.o.
Mn, cmol kg ⁻¹	2,54	33,31	3,36	1,70	n.o.
S, cmol kg ⁻¹	12,00	5,00	3,00	6,00	n.o.
Profundidad total, cm	140	70	+ 100	+ 100	65
Profundidad horizonte A, cm	25	17	23	15	23
Textura horizonte A	F Arc fina	F Are fina	Arc	F limosa	F
Porosidad horizonte A, %	58	47	52	68	n.o.
Drenaje	Moderado	Imperfecto	Pobre	Bueno	Bueno
Da horizonte A, g cm ⁻³	1,12	1,40	1,26	0,85	0,79
Topografía	Plana	Plana ondulada	Plana	Lomaje suave	Plana
Serie	Arrayán	Arenales	Quella	Sta. Bárbara	Vilcún
Gran grupo (USDA, 1994)	Melanoxerands	Xeropsamments	Durixererts	Haploxerands	Melanudands
Pp media anual, mm	1200	1100	1000	1400	1400
Meses sin lluvia	4	5	5	3	2

Fuente: Laboratorio de Suelos y Red de Estaciones Meteorológicas, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigaciones Quilamapu, Chillán.

Muestreo para análisis químicos 0-30 cm de profundidad.

MO: materia orgánica; Da: densidad aparente; F: franco; Arc: arcillosa; Are: arenosa; Pp: precipitación; n.o.: no observado.

Muestreo y determinación de taninos condensados

Las muestras utilizadas para los análisis se obtuvieron del segundo corte de la temporada de crecimiento 1999-2000 (noviembre-diciembre en Lc y diciembre-enero en Lt y Lu, dependiendo de la localidad), el cual se realizó cuando las plantas estaban en plena floración. Los días de rezago en Lc, contados a partir del corte anterior, fueron 38, 46, 53, 53 y 51, para las localidades de Chillán, Cato, Cabrero, San Ignacio y Vilcún, respectivamente. En Lt los días de rezago fueron 39, 40 y 43, para las localidades de Chillán, Cato y Cabrero, respectivamente. Los días de rezago en Lu fueron 40, 42 y 41, para las localidades de Chillán, Cabrero y Vilcún, respectivamente. Las plantas se cosecharon dejando un residuo de 5 cm.

Se tomaron muestras de 40 g de materia verde de plantas completas. Las muestras se pusieron en bolsas de polietileno y se colocaron en un termo con nitrógeno líquido para detener los procesos biológicos de la planta. Luego se almacenaron en un congelador a -20°C. Posteriormente se secaron en una liofilizadora de 6 L (FreeZone 77530, Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, USA). Una vez secas las muestras se molieron (tamiz 1 mm) para determinar TC por el método del butanol-HCl descrito por Terrill *et al.* (1992).

Se utilizaron estándares de taninos purificados para cuya extracción y purificación se siguió el procedimiento descrito por Terrill *et al.* (1992). La longitud de onda que produjo mayor absorbancia fue de 409 nm, y se eligió midiendo en un espectrofotómetro la absorbancia de una solución concentrada de 600 mg L⁻¹ de taninos purificados. Para la obtención de la curva estándar se prepararon nueve soluciones de distintas concentraciones de taninos, entre 600 y 200 mg L⁻¹, a partir de una solución concentrada. Estas soluciones se leyeron a la longitud de onda elegida, 409 nm, y con los datos obtenidos se estableció la ecuación de regresión $y = 0,0036x - 0,0305$ ($R^2 = 0,994$), donde y = absorbancia, x = concentración de taninos. Los resultados se expresan como porcentaje de TC base materia seca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

L. corniculatus

En el **Cuadro 2** se presenta la concentración de TC de los cultivares de Lc en las cinco localidades. Además, se indica la procedencia de cada cultivar, que no necesariamente corresponde al obtentor.

En la localidad de Chillán, el cv. Ges-5 presentó una concentración de TC extractables inferior ($P < 0,05$) a 'Georgia-1'; el resto de los cultivares no difirieron entre sí. 'AU Dewey' presentó una concentración de TC ligados a la proteína significativamente ($P < 0,05$) más alta que todos los cultivares excepto 'Quimey'. No se encontraron diferencias ($P > 0,05$) en la concentración de TC ligados a la fibra, y la concentración total de TC en 'AU Dewey' fue superior ($P < 0,05$) a 'Dawn', 'Ganador', 'Ges-5', 'Norcen', 'San Gabriel' y 'Viking', y estadísticamente similar al resto de los cultivares.

En la localidad de Cato no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre cultivares en TC extractables, pero sí las hubo ($P < 0,001$) en los TC ligados a la proteína, destacando los altos valores de 'Steadfast', 'Ganador' y 'Upstart' versus el bajo nivel de 'San Gabriel'. La concentración de TC ligados a la fibra en los cvs. Dawn y San Gabriel fue significativamente mayor que en el cv. Steadfast. No hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre cultivares en los TC totales. En Cabrero, 'Quimey' presentó un nivel de TC extractables significativamente superior ($P > 0,05$) a 'Upstart' y 'Norcen'. La concentración de TC ligados a la proteína en el cv. Ganador fue significativamente superior ($P < 0,01$) a todos los cultivares, excepto 'San Gabriel', 'Georgia-1' y 'AU Dewey'. No hubo diferencias ($P > 0,05$) entre cultivares en concentración de TC ligados a la fibra y totales. En San Ignacio el nivel de TC extractables del cv. Dawn fue estadísticamente superior ($P < 0,05$) al de los cvs. AU Dewey, Georgia-1, Ges-5, Quimey y Upstart, y no difirió del resto de los cultivares. No hubo diferencias significativas entre cultivares en concentración de TC ligados a la proteína.

La concentración de TC ligados a la fibra de 'Norcen' fue superior ($P < 0,05$) a 'Dawn', 'Ganador', 'Granger' y 'Quimey'. El nivel de TC totales del cv. Dawn fue superior ($P < 0,05$) al de los cvs. AU Dewey y Georgia-1. Finalmente, en la localidad de Vilcún, la concentración de TC extractables de 'AU Dewey' fue significativamente inferior ($P < 0,05$) a 'Quimey', y la concentración de TC ligados a la proteína de 'Ganador' fue más alta ($P < 0,05$) que la de 'Norcen'. No hubo diferencias significativas entre cultivares en concentración de TC ligados a la fibra. La concentración de TC totales de 'Quimey' fue superior ($P < 0,05$) a 'AU Dewey'.

Los resultados muestran una alta variabilidad en el germoplasma de Lc, sin embargo, ésta es menor que la observada por otros autores. Trabajando con 22 accesiones en suelo con y sin enclado, lo que permitió variaciones de pH en un rango similar al de las localidades estudiadas pero aproximadamente un punto inferior (4,3-5,2 vs. 5,7-6,8) que no afectaron significativamente el contenido de TC, Kelman y Tanner (1990) obtuvieron un rango de concentraciones de TC extractables de 0,15-7,28%, en tanto que en estos experimentos fue de 1,9-5,6%, aunque la media fue mayor (2,88 vs. 2,09%).

En el caso específico del cv. Quimey estos autores obtuvieron una media inferior (2,47 vs. 3,42%) pero con 'AU Dewey' la situación se invirtió (3,37 vs. 2,58%). Esto se explicaría por las diferencias analíticas y a que en el caso de Kelman y Tanner (1990) sólo se usaron hojas y en este experimento hojas y tallos en un estado de madurez probablemente más avanzado. Los valores de TC extractables y totales obtenidos en este experimento son altos comparados con los que midieron para esta especie Terrill *et al.* (1992), debido a que estos últimos (0,7 y 2,1, respectivamente) corresponden a hojas y tallos tiernos muestreados en primavera. Los resultados, en general, también son consistentes con los de Anuraga *et al.* (1993) y Douglas *et al.* (1999). Estos últimos autores informan que el porcentaje de TC extractables respecto del porcentaje total fue de 52%. En estos experimentos este porcentaje alcanzó un valor muy cercano, 53% en promedio para los 13 cultivares. En ambos casos se superó el 33% encontrado por Terrill *et al.* (1992) para esta especie en particular, probablemente debido al estado fenológico más temprano del follaje analizado, asumiendo que a menor contenido de TC mayor proporción está ligada a la proteína o fibra. Las concentraciones encontradas, en general, exceden levemente el rango de 2 a 3% propuesto por Waghorn *et al.* (1990) o el límite de 4% de TC totales mencionado por otros autores, bajo el cual no se afecta negativamente la digestibilidad y el consumo de forraje.

Cuadro 2. Concentración (% BMS) de taninos condensados en cultivares de *Lotus corniculatus* en cinco localidades: extractables (Ext), ligados a la proteína (Prot), ligados a la fibra (Fib) y totales (Tot).

Table 2. Concentration (% of DM basis) of condensed tannins in *Lotus corniculatus* cultivars at five localities: extractables (Ext), protein bound (Prot), fiber bound (Fib) and totals (Tot).

Cultivar	Procedencia	Chillán				Cato				Cabrero				San Ignacio				Vilcún				
		Ext	Prot	Fib	Tot	Ext	Prot	Fib	Tot	Ext	Prot	Fib	Tot	Ext	Prot	Fib	Tot	Ext	Prot	Fib	Tot	
Quimey	INIA-Chile	3,2	1,5	2,0	6,6	2,9	1,5	1,6	6,0	5,6	1,5	1,6	8,7	1,9	2,3	1,2	5,5	3,5	2,5	1,9	7,9	
Upstart	FAO	2,9	1,2	1,8	5,8	2,1	2,3	1,4	5,8	2,6	1,6	1,2	5,4	2,3	1,6	1,4	5,3	3,1	1,4	1,6	6,2	
Norcen	U. of Missouri	2,9	0,9	1,2	5,0	2,2	2,1	1,4	5,7	2,4	1,6	1,5	5,5	2,8	1,7	1,8	6,3	2,2	1,3	1,6	5,2	
Dawn	U. of Missouri	2,6	1,1	1,4	5,1	2,7	1,6	2,1	6,3	3,4	1,7	1,4	6,5	3,5	2,2	0,9	6,6	3,2	1,6	1,5	6,3	
AU Dewey	U. of Missouri	3,0	2,6	1,6	7,2	3,1	1,9	1,2	6,2	2,8	1,8	1,9	6,6	2,1	1,3	1,3	4,7	1,9	2,1	1,2	5,2	
Steadfast	U. of Missouri	3,1	0,9	1,5	5,4	2,1	2,4	1,1	5,6	2,9	1,9	1,6	6,3	2,9	1,5	1,4	5,9	3,3	1,8	1,4	6,6	
Georgia-1	U. of Missouri	3,6	1,1	1,5	6,2	2,4	1,9	1,9	6,2	2,8	2,2	1,8	6,8	2,5	1,2	1,3	5,0	3,1	1,5	1,2	5,8	
Ganador	INIA-Uruguay	2,7	0,9	1,6	5,2	2,8	2,4	1,6	6,8	3,1	3,1	1,9	8,1	3,0	1,4	1,1	5,5	3,3	2,8	1,7	7,8	
San Gabriel	INIA-Uruguay	3,0	0,8	1,5	5,3	2,6	1,2	2,1	5,9	4,2	2,1	2,1	8,4	3,4	1,6	1,5	6,5	2,9	1,7	0,9	5,6	
Ges-5	CSIRO-Australia	2,4	1,1	1,7	5,1	2,8	1,8	1,5	6,1	3,6	0,9	2,0	6,6	2,5	2,3	1,3	6,1	2,6	1,5	1,3	5,4	
Granger	CSIRO-Australia	3,3	1,1	1,7	6,1	3,2	1,9	1,2	6,4	3,4	1,0	1,9	6,4	2,9	1,9	0,9	5,9	2,6	1,7	1,5	5,8	
Viking	Montana, EUA	2,8	0,9	1,6	5,3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2,6	2,2	1,1	5,9
Empire	Montana, EUA	2,7	1,0	2,1	5,9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	3,0	2,5	1,6	7,2
EE		0,33	0,45	0,34	0,63	0,61	0,18	0,30	0,93	0,95	0,44	0,51	1,17	0,27	0,33	0,19	0,51	0,44	0,47	0,38	0,86	
Significancia, DMS		*	*	NS	*	NS	***	*	NS	*	**	NS	NS	**	NS	*	*	*	*	NS	*	
Media		2,9	1,2	1,6	5,7	2,6	1,9	1,6	6,1	3,3	1,8	1,7	6,8	2,7	1,7	1,3	5,8	2,9	1,9	1,4	6,2	

BMS: base materia seca; EE = error estándar; DMS: diferencia mínima significativa; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; NS = no significativa

INIA-Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chile; INIA-Uruguay: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay; CSIRO: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization

El número de días de rezago, contados desde el corte anterior a la fecha de muestreo para análisis, aproximadamente 5 semanas para Chillán, 6 semanas para Cato y 7 semanas para Cabrero, San Ignacio y Vilcún, y las fechas de muestreo 17 noviembre, 26 noviembre, 06 diciembre, 27 noviembre, y 25 noviembre, respectivamente, muestran una estrecha concordancia con las medias del contenido total de TC de esta especie por localidad: 5,7; 6,1; 6,8; 5,8 y 6,2, respectivamente. Así, de Chillán a Cato, dos localidades cercanas y por lo tanto con mínima diferencia en temperatura y humedad, se ve un aumento debido a la suma de los efectos de pasar de 5 a 6 semanas de rezago y de retrasar en 9 días el corte. Luego hay nuevamente un alza en Cabrero al pasar a 7 semanas de rezago y retrasar el corte 16 días más. Finalmente, la pequeña caída de los TC en San Ignacio y Vilcún se debe al corte más temprano, y a que estas localidades por su ubicación geográfica, mayor altitud en San Ignacio y mayor latitud en el caso de Vilcún (**Cuadro 1**), tienen un clima más frío y húmedo en primavera que determina que las plantas estuvieran menos sobremaduras que en Cabrero, donde el suelo, por su textura arenosa, pierde humedad temprano en la primavera, lo que unido al predominio de temperaturas más altas determina un aceleramiento del proceso de madurez (Anuraga *et al.*, 1993). Pese a lo anterior, posiblemente en todos los casos el material estaba sobremaduro desde el punto de vista del manejo recomendado para utilización en pastoreo o corte, el cual busca maximizar la calidad del forraje.

Acuña y Cuevas (1999) informan que una frecuencia de 6 semanas maximiza la producción de forraje, pero no significa que se maximice su calidad desde el punto de vista de contenido de TC. Abarca (1997) encontró que la velocidad de desaparición de la materia seca, lignina y fibra detergente ácido en el rumen, fue menor en el material cosechado con una frecuencia de corte de 7 semanas a una altura de 10 cm respecto de la cosecha con frecuencia de 5 semanas y altura de 2,5 cm, debido, supuestamente, a una menor concentración de TC en el material menos lignificado.

Al comparar las medias de cada localidad en relación con el pH y la disponibilidad de fósforo del suelo (**Cuadro 1**), estos resultados no confirman lo informado por Barry y Forss (1983) en el sentido que la acidez del suelo y la baja fertilidad aumentan el contenido de TC en las plantas, más bien confirman lo observado por Kelman y Tanner (1990) y Kelman (2006) respecto de la respuesta de Lc a estos factores. Considerando que en general el pH fluctuó en un rango de valores levemente ácidos y los contenidos de P fueron bajos a medios, exceptuando la localidad de Vilcún, las variaciones responderían a estrés hídrico y temperatura más que a condiciones de suelo, acorde con lo planteado por Anuraga *et al.* (1993). Las claras diferencias en el comportamiento relativo de los cultivares estudiados dentro de cada localidad confirman que hay variabilidad genética, y que ésta, de acuerdo con Miller y Ehlke (1996) y McMahon *et al.* (2000), controla primariamente la concentración de TC en las plantas. Marshall *et al.* (2005) y Marley *et al.* (2006) estudiando separadamente 7 y 13 cultivares de Lc, respectivamente, concluyeron que existe variabilidad entre cultivares y dentro de cultivares.

L. tenuis

La concentración de TC en 11 accesiones de Lt en las tres localidades en que se estudio esta especie se presentan en el **Cuadro 3**. En la localidad de Chillán la concentración de TC extractables de la accesión Lt4 fue más alta ($P < 0,05$) que la de Lt11 y Lt12; el resto de las accesiones no difirieron entre sí. Los niveles de TC ligados a la proteína de Lt3 y Lt7 fueron significativamente más altos que Lt1, Lt4, Lt12 y Lt14. La concentración de TC ligados a la fibra de la accesión Lt4 fue menor ($P < 0,05$) que la de Lt14. En Cato, la concentración de TC extractables de la accesión Lt4 fue mayor ($P < 0,05$) que la del resto de las accesiones, excepto Lt6, Lt8, y Lt 15. Los TC ligados a la proteína de la accesión Lt15 presentaron un nivel estadísticamente más alto que el de las accesiones Lt7, Lt8, Lt11 y Lt14. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre accesiones en concentración de TC ligados a la fibra ni totales. En Cabrero no hubo diferencias ($P > 0,05$) entre accesiones en la concentración de TC en ninguna de las tres fracciones ni en el total.

Cuadro 3. Concentración (% BMS) de taninos condensados en accesiones de *Lotus tenuis* en tres localidades: extractables (Ext), ligados a la proteína (Prot), ligados a la fibra (Fib) y totales (Tot).

Table 3. Concentration (% of DM basis) of condensed tannins in *Lotus tenuis* accessions at three localities: extractables (Ext), protein bound (Prot), fiber bound (Fib) and totals (Tot).

Accesión	Procedencia	Chillán				Cato				Cabrero			
		Ext	Prot	Fib	Tot	Ext	Prot	Fib	Tot	Ext	Prot	Fib	Tot
Lt1	Cabrero	2,3	0,7	1,2	4,2	2,4	1,6	1,1	5,1	3,1	0,9	1,4	5,4
Lt3	Yumbel	2,5	1,1	1,3	4,9	2,9	1,7	1,2	5,7	2,8	1,1	1,3	5,2
Lt4	San Javier	27	0,6	0,7	4,1	4,6	0,9	0,9	6,6	2,7	0,9	1,9	5,5
Lt5	Parral	2,3	0,9	1,3	4,5	2,1	1,5	1,1	4,7	2,2	0,8	1,0	4,0
Lt6	Parral	2,4	0,9	1,2	4,5	3,2	1,5	0,8	5,5	2,4	1,2	1,6	5,2
Lt7	Cato	2,5	1,1	1,5	5,1	2,4	1,4	0,7	4,4	2,5	0,9	1,1	4,6
Lt8	Coihueco	2,4	0,9	1,4	4,7	3,3	1,4	0,9	5,7	2,1	0,9	0,9	3,9
Lt11	Itahue	2,1	0,8	1,1	3,9	2,8	1,3	0,8	4,9	2,4	0,8	0,8	4,0
Lt12	Villa Alegre	2,1	0,7	1,0	3,9	2,0	1,7	1,1	4,8	2,6	0,9	1,4	4,9
Lt14	Melipilla	2,4	0,7	1,6	4,7	2,8	1,2	0,9	4,9	2,2	0,9	1,3	4,5
Lt15	Las Cabras	2,5	0,8	0,8	4,1	3,0	2,1	1,2	6,3	2,2	0,8	0,9	4,0
EE		0,18	0,12	0,27	0,50	0,54	0,22	0,26	0,73	0,3	0,19	0,37	0,81
Significancia, DMS		*	*	*	NS	**	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Media		2,4	0,8	1,2	4,4	2,9	1,5	0,9	5,3	2,5	0,9	1,2	4,7

BMS: base materia seca; EE = error estándar; DMS: diferencia mínima significativa * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; NS = no significativa

La concentraciones de TC de Lt fueron inferiores a Lc, como señalan los antecedentes de la literatura, pero muy superiores a las informadas por Kelman y Tanner (1990), Terrill *et al.* (1992) y Douglas *et al.* (1999), debido en gran medida a que estos autores utilizaron tejidos menos lignificados. El material usado en este experimento estaba en plena floración, desde la fecha del corte anterior al muestreo habían pasado 39, 40 y 43 días en las localidades de Chillán, Cato y Cabrero, respectivamente, y el muestreo se hizo en verano con tiempo seco, alta temperatura y alta luminosidad (29 diciembre 1999, 05 enero 2000, y 15 enero 2000, respectivamente). Este último factor puede ser de gran importancia, ya que según Arcioni *et al.* (2005) afecta positivamente la síntesis de TC a través de la acción de la enzima dihidro flavonol reductasa (DFR) regulada por la luz. Todo lo anterior podría ser la razón de las altas concentraciones de TC encontradas en esta especie. Las referencias de la literatura al respecto, además de las ya citadas, son muy escasas.

Estrella y Ugalde (1993) no detectaron TC en hojas de Lt y afirman que la concentración en tallos y raíces sería muy baja para ser detectada por los procedimientos fotoquímicos usualmente empleados para ello, pero que la especie es capaz de sintetizarlos.

Strittmatter *et al.* (1994) analizaron raíces, tallos y hojas frescas y detectaron ausencia de TC en hojas, presencia en tallos y abundancia en raíces. En este experimento, el rango de variación considerando las tres localidades fue 3,9-6,6 para TC totales y 2,0-4,6 para TC extractables. La variabilidad encontrada sería muy baja, ya que no hubo diferencias significativas entre accesiones en TC totales en ninguna localidad, aun cuando la accesión Lt4 presentó una concentración de TC extractables significativamente más alta que las demás accesiones en Cato y Chillán.

En el área donde se colectaron estas accesiones (32° y 38° lat. S) las diferencias edáficas son los cambios ambientales más notorios, suelos arcillosos con mal drenaje, arenosos con nivel freático alto y franco-limosos derivados de cenizas volcánicas (Acuña *et al.*, 2002b), las que probablemente no han contribuido a modificar los genotipos de las poblaciones naturalizadas de los diferentes sitios en términos de la concentración de TC en el follaje. La experiencia de los investigadores y agricultores de esta zona indica que esta especie, al igual que Lc y Lu, no produce meteorismo en los animales, lo cual no tendría explicación si las concentraciones de TC en el forraje fueran tan bajas como las informadas en la literatura. Dichos niveles no serían claramente superiores a los encontrados para trébol blanco cv. Huia, 0,25% (Burggraaf *et al.*, 2005), una planta de alto riesgo desde este punto de vista, ni tampoco exceden el umbral de 0,5% requerido según Li *et al.* (1996) para evitar el meteorismo.

L. uliginosus

Las concentraciones de TC en accesiones de Lu para las tres localidades donde se estudió la especie se presentan en el **Cuadro 4**. Las concentraciones de TC extractables en la localidad de Chillán muestran que Lu23 difiere significativamente ($P < 0,05$) de las accesiones Lu9, Lu12, LuP32, LuP48 y LuP58. Las concentraciones de TC ligados a la proteína no difirieron significativamente ($P > 0,05$) entre accesiones, excepto entre LuP4 (1,3%) y LuP48 (1,9%). La concentración de TC ligados a la fibra no difirió ($P > 0,05$) entre accesiones, y la concentración de TC totales fue mayor ($P < 0,05$) en la accesión Lu10 que en las accesiones Lu9, Lu12 y LuP32. En Cabrero la concentración de TC extractables de la accesión LuP58 fue superior ($P < 0,05$) a la de las accesiones Lu1, Lu4, Lu8, Lu9, Lu11 y LuP23. No se encontraron diferencias significativas entre accesiones en concentración de TC ligados a la proteína, en tanto que en los TC ligados a la fibra la concentración de la accesión LuP48 fue estadísticamente igual ($P > 0,05$) a las accesiones Lu2, Lu3, Lu9, LuP4, LuP11, y LuP54 y superior ($P < 0,05$) al resto de las accesiones. La concentración de TC totales de la accesión Lu2 fue mayor ($P < 0,05$) a las concentraciones de las accesiones Lu1, Lu4, Lu10, Lu11, LuP23, LuP52 y LuP63. En Vilcún no hubo diferencias ($P > 0,05$) entre accesiones en concentración de TC extractables y el nivel de TC ligados a la proteína de la accesión Lu5 fue superior ($P < 0,05$) al de todas las demás accesiones estudiadas. El nivel de TC ligados a la fibra de la accesión Lu2 fue estadísticamente superior al de las accesiones Lu12, LuP23, LuP36, LuP52, LuP58, LuP63 y Maku. La concentración de TC totales de la accesión Lu5 fue más alto ($P < 0,05$) que el de las accesiones LuP48 y LuP52.

Cuadro 4. Concentración (% BMS) de taninos condensados en accesiones de *Lotus uliginosus* en tres localidades: extractables (Ext), ligados a la proteína (Prot), ligados a la fibra (Fib) y totales (Tot).

Table 4. Concentration (% of DM basis) of condensed tannins in *Lotus uliginosus* accessions at three localities: extractables (Ext), protein bound (Prot), fiber bound (Fib) and totals (Tot).

Accesion	Procedencia	Chillán				Cabrero				Vilcún			
		Ext	Prot	Fib	Tot	Ext	Prot	Fib	Tot	Ext	Prot	Fib	Tot
Maku ¹	Nueva Zelanda	4,5	1,7	1,8	7,9	6,1	2,4	1,4	9,9	3,8	2,0	0,9	6,8
Lu1	Piedra Azul	3,9	1,6	2,5	8,0	4,2	1,9	1,3	7,4	4,9	2,2	1,5	8,6
Lu2	C. Puelche	4,6	1,6	2,3	8,5	6,3	2,8	1,9	11,0	3,5	2,3	2,5	8,3
Lu3	Contao	4,5	1,5	2,2	8,2	4,9	1,9	1,9	8,7	5,6	1,7	1,7	9,0
Lu4	Hornopiren	5,1	1,6	2,0	8,7	3,7	2,1	1,7	7,5	4,6	2,1	1,4	8,1
Lu5	Chaitén	3,8	1,8	2,4	7,9	4,8	2,4	1,5	8,7	4,5	3,9	1,6	9,9
Lu7	Chaitén	4,9	1,8	1,9	8,6	4,8	2,2	1,4	8,3	4,2	1,8	2,4	8,4
Lu8	Chaitén	4,2	1,7	2,4	8,4	4,1	2,5	1,5	8,1	3,9	2,3	2,4	8,6
Lu9	La Junta	3,5	1,6	1,6	6,7	4,1	2,2	1,8	8,2	3,4	2,2	1,4	6,9
Lu10	Lago Verde	5,2	1,9	2,2	9,3	4,8	2,1	1,1	7,9	5,3	1,7	1,9	8,9
Lu11	La Junta	4,1	1,6	2,4	8,1	4,3	2,1	1,3	7,8	5,7	1,9	1,6	9,2
Lu12	Coyhaique	3,5	1,4	2,1	7,0	4,9	2,2	1,9	9,0	3,8	1,7	1,1	6,7
LuP4	Villarrica	4,4	1,3	1,9	7,5	3,9	2,4	2,6	8,8	4,6	1,5	2,2	8,3
LuP11	Puerto Saavedra	4,7	1,5	2,0	8,2	4,9	2,5	2,3	9,8	5,0	1,8	2,1	8,9
LuP23	Vilcún	5,3	1,5	1,9	8,7	4,1	2,1	1,5	7,7	4,1	2,1	0,9	7,2
LuP32	Liucura	3,7	1,3	1,8	6,8	5,2	1,9	1,1	8,4	5,1	2,2	2,0	9,3
LuP36	Pitrufrquén	4,0	1,4	1,8	7,2	4,8	2,8	1,7	9,3	3,9	2,3	1,2	7,5
LuP48	Quellón	3,7	1,9	1,6	7,2	4,7	2,1	2,9	9,8	2,6	1,8	1,8	6,3
LuP52	Castro	5,1	1,4	1,6	8,1	4,8	1,7	1,1	7,5	3,2	1,9	1,2	6,4
LuP54	Castro	4,2	1,6	2,0	7,8	5,3	2,3	1,9	9,6	3,3	1,9	1,9	7,2
LuP58	Puerto Varas	3,7	1,6	2,3	7,6	6,5	2,7	1,1	10,3	5,0	2,1	1,0	8,2
LuP63	Riñihue	3,9	1,4	2,3	7,6	4,9	1,9	1,2	8,0	4,1	2,5	1,1	7,7
EE		0,51	0,20	0,34	0,74	0,63	0,39	0,38	0,97	1,04	0,39	0,37	1,12
Significancia, DMS		*	*	NS	*	**	NS	**	*	NS	***	*	*
Media		4,3	1,6	2,0	7,9	4,8	2,2	1,6	8,7	4,3	2,1	1,6	8,0

BMS: base materia seca; EE = error estándar; DMS: diferencia mínima significativa; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS = no significativa

¹Cultivar control

Los resultados de Lu muestran niveles de TC más altos que los encontrados en Lc. Los rangos de variación para los TC extractables y totales dentro de las tres localidades fueron 2,6-6,5 y 6,3-11,0, respectivamente. Kelman y Tanner (1990), quienes trabajaron con 11 genotipos de esta especie con y sin encalado de suelo, obtuvieron una media de TC extractables inferior a la de estos experimentos (5,99%) y un rango más amplio (2,52-10,72 %), lo cual evidenciaría una menor variabilidad en el germoplasma en estudio. Para el caso del cv. Maku estos autores encontraron un valor medio mayor que el de este experimento (4,8 vs. 5,2), y para las accesiones chilenas probadas obtuvieron una media levemente menor que la de las tres localidades estudiadas (4,5 vs. 4,2). Anuraga *et al.* (1993) encontraron concentraciones de 2,0 y 5,5% para 'Maku' y entre 2,0 y 10,0% para el cv. Sharnee, con variaciones directamente relacionadas con la temperatura, de modo que los valores más altos se dieron en verano, factor que probablemente también afectó los resultados de este experimento. Pese a que se observó variabilidad en la concentración de TC totales entre las accesiones en las tres localidades, los valores más bajos superaron los límites aceptables desde el punto de vista de la calidad nutricional del forraje (Barry, 1989; Waghorn *et al.*, 1990). Lo anterior no disminuye la utilidad de esta especie, ya que el consumo conjunto con leguminosas que producen meteorismo puede contribuir a corregir este problema (McMahon *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

La variabilidad de la concentración de TC observada entre los cultivares de Lc estudiados es alta en todos los ambientes en que se evaluó el germoplasma, lo que permite identificar genotipos para programas de mejoramiento genético, o hacer recomendaciones de cultivares para las zonas representadas por cada una de las localidades consideradas en el estudio.

El germoplasma de Lt presentó baja variabilidad en su concentración de TC en el follaje. No hubo diferencias significativas entre accesiones en concentración de TC totales en ninguno de los ambientes estudiados. Los valores obtenidos fueron más bajos que los de Lc y Lu, pero considerablemente más altos que los informados por la literatura, lo que se atribuye al avanzado estado de madurez de los tejidos analizados debido a condiciones ambientales favorables para la síntesis de estos compuestos.

La concentración de TC en Lu presentó diferencias significativas entre accesiones en todas las localidades, lo que refleja un grado importante de variabilidad en el material estudiado que permitiría identificar genotipos útiles para programas de mejoramiento. Estas concentraciones fueron mayores que las medidas en Lc.

RECONOCIMIENTOS

Este estudio es parte del proyecto FONDECYT 1980003. Los autores agradecen el apoyo de INIA, la Universidad de Concepción y FONDECYT. También agradecen el apoyo del Dr. Carlos Lascano, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia, en la implementación de la metodología analítica.

LITERATURA CITADA

Abarca, C.E. 1997. Degradación ruminal *in situ* de lotera (*Lotus corniculatus*) cv. Quimey con diferentes tratamientos de altura y frecuencia de corte. 26 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán, Chile.

Acuña, H., y G. Cuevas. 1999. Efecto de la altura y frecuencia de la defoliación, bajo corte y pastoreo, en el crecimiento y productividad de tres especies del género *Lotus* en suelos arcillosos. *Agric. Téc. (Chile)* 59:296-308

Acuña, H., M. Figueroa, A. de la Fuente, F. Ortega, y C. Fuentes. 2002a. Comportamiento de cultivares de *Lotus corniculatus* L. en diferentes ambientes de la VIII y IX Regiones de Chile. *Agro-Ciencia* 18:75-84.

Acuña, H., M. Figueroa, A. de la Fuente, F. Ortega, I. Seguel, y R. Mundaca. 2002b. Caracterización agronómica de accesiones de *Lotus glaber* Mill. y *Lotus uliginosus* Schkur. naturalizadas en Chile. *Agro-Ciencia* 18:63-74.

Acuña, H., P. Hellman, L. Barrientos, M. Figueroa, y A. de la Fuente. 2004. Estimación de la fijación de nitrógeno en tres especies del género *Lotus* por el método de la dilución isotópica. *Agro-Ciencia* 20:5-15.

Anuraga, M., P. Duarsa, M.J. Hill, and J.V. Lovett. 1993. Soil moisture and temperature affect condensed tannin concentrations and growth in *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus*. *Aust. J. Agric. Res.* 44:1667-1681.

Arcioni, S., T. Bovone, F. Damiani, and F. Paolocci. 2005. Light intensity is positively correlated with the synthesis of condensed tannins in *Lotus corniculatus*. p. 244. In O'Mara, F.P., R.J. Wilkins, L. Manneje, D.K. Lovett, P.A.M. Rogers, T.M. Boland (eds.). XX International Grassland Congress: Offered papers. Dublin, Ireland. 26 June-1 July. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2005.

Barry, T. N. 1989. Condensed tannins: their role in ruminant protein and carbohydrate digestion and possible effects upon the rumen ecosystem. p. 153-169. In J.V. Nolan, R. A. Leng and D. I. Demeyer (eds). The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Perambur Books, Armidale, Australia.

Barry, T. N., and D. A. Forss. 1983. The condensed tannins content of vegetative *Lotus pedunculatus*, its regulation by fertilizer application, and effect upon protein solubility. *J. Sci. Food Agric.* 34:1047-1056.

Burggraaf, V.T., S.L. Woodward, D.R. Woodfield, E.R. Thom, G.C. Waghorn, and P.D. Kemp. 2005. Condensed tannin concentration and herbage accumulation of white clover bred for increased floral condensed tannin. p. 243. In O'Mara, F.P., R.J. Wilkins, L. Manneje, D.K. Lovett, P.A.M. Rogers, T.M. Boland (eds.). XX International Grassland Congress: Offered papers. Dublin, Ireland. 26 June-1 July. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2005.

Carter, E.B., M.K. Theodorou, and P. Morris. 1999. Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change. 2. Effect of elevated CO₂, temperature and drought on tissue digestion in relation to condensed tannin and carbohydrate accumulation. *J. Sci. Food Agric.* 79:1431-1440.

Douglas, G.B., M. Stienezen, G.C. Waghorn, and A.G. Foote. 1999. Effect of condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on body weight, carcass fat depth, and wool growth of lamb in New Zealand. *N.Z. J. Agric. Res.* 42:55-64.

Estrella, J.M., y R.A. Ugalde. 1993. Análisis de los flavolanos en especies del género *Lotus* y su efecto sobre el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium loti*. p. 326-327. Actas XX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Chascomus. 25-27 octubre. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús (IIB-INTECH), Buenos Aires, Argentina.

Kelman, W.M. 2006. The interactive effects of phosphorus, sulfur and cultivar on the early growth and condensed tannin content of greater lotus (*Lotus uliginosus*) and birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). *Aust. J. Exp. Agric.* 46:53-58.

Kelman, W.M., and G.J. Tanner. 1990. Foliar condensed tannin levels in lotus species growing on limed and unlimed soils in South- Eastern Australia. *Proc. N.Z. Grassl. Assoc.* 52:51-54.

Lees, G.L., C.F. Hinks, and N.H. Suttill. 1994. Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosus* Schkur). *J. Sci. Food Agric.* 65:415-421.

Li, Y-G., G. Tanner, and P. Larkin. 1996. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *J. Sci. Food Agric.* 70:89-101.

- Marley, C.L., R. Fychan, and R. Jones. 2006. Yield, persistency and chemical composition of *Lotus* species and varieties (birdsfoot trefoil and greater birdsfoot trefoil) when harvested for silage in the UK. *Grass For. Sci.* 61:134-145.
- Marshall, A.H., F. Ribaimont, R.P. Collins, D. Bryant, and M.T. Abberton. 2005. Variation in tannin content and morphological traits in *Lotus corniculatus* L. (birdsfoot trefoil). p. 245. *In* O'Mara, F.P., R.J. Wilkins, L. Mannetje, D.K. Lovett, P.A.M. Rogers, T.M. Boland (eds.). XX International Grassland Congress: Offered papers. Dublin, Ireland. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- McMahon, L.R., W. Majak, T.A. McAllister, J.W. Hall, G.A. Jones, J.D. Popp, and K.J. Cheng. 1999. Effect of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Can. J. Anim. Sci.* 79:203-212.
- McMahon, L.R., T.A. McAllister, B.P. Berg, W. Majak, S.N. Acharya, J.D. Popp, *et al.* 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant Sci.* 80:469-485
- Miller, P.R., and N.J. Ehlke. 1996. Condensed tannins in birdsfoot trefoil: genetic relationships with forage yield and quality in NC-83 germplasm. *Euphytica* 92:383-391.
- Strittmatter, C.D., R.A. Ricco, M. Kade, M. Wagner, and A.A. Gurni. 1994. Condensed tannins in *Lotus tenuis* Waldst. *et* Kit. *Lotus Newsl.* 25:41-44.
- Tanner, G.J., P.J. Moate, L.H. Davis, R.H. Laby, I.G. Li, and P.J. Larkin. 1995. Proanthocyanidins (condensed tannins) destabilize plant protein foams in a dose dependant manner. *Aust. J. Agric. Res.* 46:1101-1109.
- Terrill, T.H., A.M. Rowan, G.B. Douglas, and T.N. Barry. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannins concentration in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58:321-329.
- Terrill, T.H., W.R. Windham, and J.J. Evans, and C.S. Hoveland. 1990. Condensed tannins concentration in *Sericea lespedeza* as influenced by preservation method. *Crop Sci.* 30:219-224.
- USDA. 1994. Reference to soil taxonomy. United States Department of Agriculture (USDA), Washington, D.C.
- Waghorn, G.C., W.T. Jones, I.D. Shelton, and W.C. McNabb. 1990. Condensed tannins and the nutritive value of herbage. *Proc. N.Z. Grassl. Assoc.* 51:171-176.
- Wang, Y., G.C. Waghorn, W.C. McNabb, T.N. Barry, M.J. Hedley, and I.D. Shelton. 1996. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *J. Agric. Sci.* 127:413-421.