

Primary and secondary metabolites of six species of trees, shrubs and herbaceous legumes

Metabolitos primarios y secundario de seis especies de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas

D. M. Verdecia^{1*}, R. del Carmen. Herrera Herrera², E. Torres³, A. R. Sánchez³, L.G. Hernández Montiel⁴, R. S. Herrera⁵, J. L. Ramírez¹, R. Bodas⁶, F. J. Giráldez⁷, J. Guillaume⁸, H. Uvidia⁹ and S. López⁷

D.M. Verdecia*: <https://orcid.org/0000-0002-4505-4438>

R. del Carmen. Herrera-Herrera: <https://orcid.org/0000-0002-4136-4746>

E. Torres: <https://orcid.org/0000-0002-9212-5593>

A.R. Sánchez: <https://orcid.org/0000-0001-5428-4473>

L.G. Hernández-Montiel: <https://orcid.org/0000-0002-8236-1074>

R.S. Herrera: <https://orcid.org/0000-0003-1424-6311>

J.L. Ramírez: <https://orcid.org/0000-0002-0956-0245>

R. Bodas: <https://orcid.org/0000-0001-9736-7041>

F.J. Giráldez: <https://orcid.org/0000-0002-0680-1541>

J. Guillaume: <https://orcid.org/0000-0001-5527-412X>

H. Uvidia: <https://orcid.org/0000-0002-2961-6963>

S. López: <https://orcid.org/0000-0001-6267-683X>

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Apartado Postal 21, Bayamo, C.P. 85 100, Granma, Cuba.

²Universidad Nacional de Loja, La Argelia 110150. Loja, Ecuador.

³Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Los Ríos, Ecuador

⁴Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. CP 23096. La Paz, Baja California Sur, México

⁵Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

⁶Instituto Tecnológico Agrario ITACYL, Junta de Castilla y León, Finca Zamadueñas, Ctra. Burgos km. 119, E-47071 Valladolid, España

⁷Instituto de Ganadería de Montaña (IGM), CSIC Universidad de León, Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León, España

⁸Innovative University of Grand Anse Haiti (INUGA), 11, Rue Albert Saindoux, Moron, Haití

⁹Universidad Estatal Amazónica, Pastaza, Ecuador

Email*: dverdeciaa@udg.co.cu

Six simultaneous experiments were carried out to determine the content of primary and secondary metabolites of six species of trees, shrubs and forage herbaceous legumes under the edaphoclimatic conditions of Valle del Cauto, Cuba. A randomized block design with six replications was used and the treatments were the regrowth ages of 60, 120 and 180 days for trees and shrubs (*Leucaena leucocephala*, *Tithonia diversifolia*, *Gliricidia sepium* and *Eritrina variegata*) and 30, 45, 60, 75 and 90 days for creeping legumes (*Neonotonia wightii* and *Teramnus labialis*), in the rainy and dry seasons. There were determined N, glucose, fructose and sucrose (primary); total phenols, total tannins, total condensed tannins, total bound condensed tannins, free condensed tannins, alkaloids, flavonoids, saponins, triterpenes, total steroids, stachyose, verbascose and raffinose. Cluster analyzes to group species with similar characteristics were performed. During the rainy season seven groups were found and in the dry season eight; with the best results, comprehensively, for *Gliricidia sepium* and *Tithonia diversifolia* in both seasonal periods. The age had a marked effect on the content of primary and secondary metabolites by decreasing the former and increasing the latter as maturity advanced. This

Se realizaron seis experimentos simultáneos para determinar el contenido de metabolitos primarios y secundarios de seis especies de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas forrajeras en las condiciones edafoclimáticas del Valle del Cauto, Cuba. Se empleó un diseño en bloques al azar con seis réplicas y los tratamientos fueron las edades de rebrote de 60, 120 y 180 días para los árboles y arbustos (*Leucaena leucocephala*, *Tithonia diversifolia*, *Gliricidia sepium* y *Eritrina variegata*) y de 30, 45, 60, 75 y 90 días para las leguminosas rastreras (*Neonotonia wightii* y *Teramnus labialis*), en los periodos lluvioso y poco lluvioso. Se determinaron N, glucosa, fructosa y sacarosa (primarios); fenoles totales, taninos totales, taninos condensados totales, taninos condensados ligados totales, taninos condensados libres, alcaloides, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides totales, estaquiosa, verbascosa y rafinosa. Se realizaron análisis de conglomerados para agrupar las especies con características similares. Durante el periodo lluvioso se encontraron siete grupos y en el poco lluvioso ocho; con los mejores resultados, de forma integral, para la *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* en ambos periodos estacionales. La edad presentó marcado efecto en el contenido de metabolitos primarios y secundarios al disminuir los primeros e incrementar los segundos en la medida que la madurez

performance was evidenced by verifying, through cluster analysis, that the groups where the highest contents of secondary compounds were found were composed of the most advanced ages of the *Neonotonia wightii*, *Teramnus labialis*, *Erythrina variegata* and *Leucaena leucocephala* species, in both seasonal periods. Aspects of vital importance for future studies where the associative effects of species with lower content of these compounds (*Tithonia diversifolia* and *Gliricidia sepium*) were analyzed, both in the ecosystem and in the animal response.

Key words: *cluster, dendrogram, nitrogen, oligosaccharides, polyphenols*

The plants contain numerous organic compounds called "primary metabolites", among which are the first, sugars or carbohydrates, which are produced by the photosynthesis. On the other hand, different chemical compounds called, in general, "secondary metabolites" are synthesized in variable concentrations, since they do not directly intervene in their metabolism, or at least, their function in the plant is not well known and it is assumed that they are used as a defense mechanism. They belong to different groups such as: essential oils, alkaloids, coumarins, steroids, phenols, flavonoids, glycosides, gums, iridoids, lignans, mucilages, pectins, quinones, saponins, tannins and terpenes, among others (Paumier *et al.* 2018 and Pinard *et al.* 2019).

These substances are synthesized as a response of plants to the attack by fungi, bacteria, pests, allelopathic effect, pollution, adverse effects of climatic factors and herbivorous animals. These chemical defenses are found in variable concentrations in nature and depend on the metabolite type, the characteristics of the plant and the conditions to which they are subjected. The defense based on these compounds causes toxicity to its predators and influences on the forage palatability, causing rejection when intake it (Reyes-Silva *et al.* 2020 and Verdecia *et al.* 2020a).

In the last ten years, the use of trees, shrubs and legumes or other species has become very important, as a supplement to the diet of ruminant animals, to improve the quality and quantity of the diet. These plants contain secondary metabolites, which can modify the degradation rate and passage of nutrients through the gastrointestinal tract as a result of a direct effect on ruminal ecology. By considering these effects, it is necessary to study their levels in plants that can be used for animal food (Huang *et al.* 2020). In accordance with the above, the objective of this research was to determine the content of primary and secondary metabolites of six species of trees, shrubs and herbaceous legumes, as well as to establish the groups with similar values of their content.

Materials and Methods

Research area, climate and soil. Six experiments were carried out, one for each species, simultaneously in the same agricultural area (soil and climate) from the Departamento Docente Productivo de la Universidad de

avanzaba. Este comportamiento se evidenció al constatar, mediante el análisis de conglomerados, que los grupos donde se encontró los mayores contenidos de los compuestos secundarios estaban integrados por las edades más avanzadas de las especies *Neonotonia wightii*, *Teramnus labialis*, *Erythrina variegata* y *Leucaena leucocephala*, en ambos periodos estacionales. Aspectos de vital importancia para trabajos futuros donde se analicen los efectos asociativos de especies con menor contenido de estos compuestos (*Tithonia diversifolia* y *Gliricidia sepium*) tanto en el ecosistema como en la respuesta animal.

Palabras clave: *conglomerado, dendrograma, nitrógeno, oligosacáridos, polifenoles*

Las plantas contienen numerosos compuestos orgánicos denominados "metabolitos primarios", entre los que se encuentran en primer término, los azúcares o carbohidratos, que se producen como resultado de la fotosíntesis. Por otra parte, se sintetizan en concentraciones variables diferentes compuestos químicos denominados, en general, "metabolitos secundarios", ya que no intervienen directamente en su metabolismo, o al menos, no se conoce con profundidad su función en la planta y se asume que se emplean como mecanismo de defensa. Ellos pertenecen a diferentes grupos como son: aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, gomas, iridoides, lignanos, mucílagos, pectinas, quinonas, saponinas, taninos y terpenos, entre otros (Paumier *et al.* 2018 y Pinard *et al.* 2019).

Estas sustancias se sintetizan como respuesta de las plantas al ataque de hongos, bacterias, plagas, efecto alelopático, contaminación, efectos adversos de los factores climáticos y los animales herbívoros. Estas defensas químicas se encuentran en concentraciones variables en la naturaleza y depende del tipo metabolito, las características de la planta y las condiciones a las cuales son sometidas. La defensa basada en estos compuestos provoca toxicidad a sus depredadores e influye en la palatabilidad del forraje, provocando rechazo al consumirlo (Reyes-Silva *et al.* 2020 y Verdecia *et al.* 2020a).

En los últimos diez años ha cobrado gran importancia el uso de árboles, arbustos y leguminosas u otras especies, como suplemento para la dieta de los animales rumiantes, para mejorar la calidad y cantidad de la dieta. Estas plantas contienen metabolitos secundarios, los que pueden modificar la velocidad de degradación y pasaje de los nutrientes a través del tracto gastrointestinal como resultado de un efecto directo en la ecología ruminal. Al tener en cuenta estos efectos, se precisa estudiar los niveles de ellos en las plantas que pueden ser usadas para alimento animal (Huang *et al.* 2020). De acuerdo con lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar el contenido de metabolitos primarios y secundarios de seis especies de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas, así como establecer los grupos con valores similares de su contenido.

Materiales y Métodos

Área de la Investigación, clima y suelo. Se realizaron seis experimentos, uno para cada especie, simultáneos en la misma área agrícola (suelo y clima) del Departamento Docente Productivo de la Universidad de Granma.

Granma. This facility is located in the southeast of the country, in Granma province, Cuba.

The experiments were developed during two years, dividing the study into two seasons: the rainy (May-October) and the dry (November-April) for each of the years. During the rainy season the precipitations were 893.67 mm; the average, minimum and maximum temperature registered values of 26.73, 22.31 and 33.92 °C, respectively, and the average, minimum and maximum relative humidity was 80.78, 51.02 and 96.22 %, respectively.

In the dry season the precipitations reached values of 364 mm; the temperature was in the order of 24.05, 18.29 and 31.58 °C for the average, minimum, maximum, respectively, and the minimum, average, and maximum relative humidity reached averages of 76.21, 44.16 and 97.03 %, respectively. These values are within the range of historical values for the region.

The soil of the experimental area was Brown with carbonate (Hernández *et al.* 2015), with a pH of 6.2. The content of P₂O₅, K₂O and total N was 2.4, 33.42 and 3 mg/100g of soil, respectively and 3.6 % of organic matter.

Treatments and experimental design. A randomized block design was used in each experiment, with six agronomic replications for each of the treatments. These consisted of regrowth ages of 60, 120 and 180 days for *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Erythrina variegata* and *Tithonia diversifolia*; and 30, 45, 60, 75 and 90 days for *Teramnus labialis* and *Neonotonia wightii*.

Procedures. At the beginning of each seasonal period, a uniformity cut was made at 1m in height in the plots (0.5 ha) of *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* and *Erythrina variegata* and at 15 cm above the soil for *Tithonia diversifolia*. At each of the regrowth ages (60, 120 and 180 days), 10 plants/plot were randomly harvested and leaves, petioles and stems with diameter less than 2 cm were manually separated for laboratory analysis.

For the case of *Teramnus labialis* and *Neonotonia wightii*, in each season, at the beginning of the evaluation, the uniformity cut was made at 5 cm from the soil. Plots of 25 m² were delimited, corresponding to the regrowth ages (30, 45, 60, 75 and 90 days), which were manually cut, after eliminating 50 cm of border effect and 200 g were taken for the laboratory analysis. The area was not irrigated or fertilized during the experimental stage.

Determination of primary and secondary metabolites. The samples were dried at room temperature in a dark and ventilated room for 12 days, then they were milled to a 1 mm particle size and stored in amber bottles at room temperature until their analysis in the laboratory.

The N was determined according to AOAC (2016) and for glucose (Glu), fructose (Frut), sucrose (Suc),

Esta instalación se encuentra al sureste del país, en la provincia de Granma, Cuba.

Los experimentos se desarrollaron durante dos años, dividiendo el estudio en dos periodos: el lluvioso (mayo-octubre) y poco lluvioso (noviembre-abril) para cada uno de los años. Durante el periodo lluvioso las precipitaciones fueron 893.67 mm; la temperatura media, mínima y máxima registró valores de 26.73, 22.31 y 33.92 °C, respectivamente y la humedad relativa media, mínima y máxima fue de 80.78, 51.02 y 96.22 %, respectivamente.

En el poco lluvioso las precipitaciones alcanzaron valores de 364 mm; la temperatura estuvo en el orden de 24.05, 18.29 y 31.58 °C para la media, mínima y máxima, respectivamente y la humedad relativa mínima, media y máxima alcanzó promedios de 76.21, 44.16 y 97.03 %, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango de valores históricos de la región.

El suelo del área experimental fue Pardo con carbonato (Hernández *et al.* 2015), con pH de 6.2. El contenido de P₂O₅, K₂O y N total fue de 2.4, 33.42 y 3 mg/100g de suelo, respectivamente y 3.6 % de materia orgánica.

Tratamientos y diseño experimental. En cada experimento se empleó un diseño de bloques al azar, con seis réplicas agronómicas para cada uno de los tratamientos. Éstos, consistieron en las edades de rebrote de 60, 120 y 180 días para *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Erythrina variegata* y *Tithonia diversifolia*; y de 30, 45, 60, 75 y 90 días para *Teramnus labialis* y *Neonotonia wightii*.

Procedimientos. Al inicio de cada periodo estacional se realizó un corte de uniformidad a 1m de altura en las parcelas (0.5 ha) de *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* y *Erythrina variegata* y a 15 cm de altura del suelo para la *Tithonia diversifolia*. En cada una de las edades de rebrote (60, 120 y 180 días), se cosecharon al azar 10 plantas/parcela y se separaron manualmente las hojas, los pecíolos y los tallos con diámetro inferior a 2 cm para los análisis de laboratorio.

Para el caso de *Teramnus labialis* y *Neonotonia wightii*, en cada periodo, al inicio de la evaluación, se realizó el corte de uniformidad a 5 cm del suelo. Se delimitaron parcelas de 25 m², correspondientes a las edades de rebrote (30, 45, 60, 75 y 90 días), las que se cortaron de forma manual, previa eliminación de 50 cm de efecto de borde y se tomaron 200 g para los análisis de laboratorio. El área no se regó ni fertilizó durante la etapa experimental.

Determinación de metabolitos primarios y secundarios. Las muestras se secaron a temperatura ambiente en un local oscuro y ventilado durante 12 días, con posterioridad se molinaron hasta tamaño de partícula de 1 mm y se almacenaron en frascos de color ámbar a temperatura ambiente hasta su análisis en el laboratorio.

El N se determinó de acuerdo con AOAC (2016) y para glucosa (Glu), fructosa (Frut), sacarosa (Sac),

raffinose (Raf), verbascose (Verb) and stachyose (Stac), 1 g of the dry and milled sample was taken, 9 mL of 70 % methanol were added and it was heated for 20 minutes at 100 °C, then it was cooled to room temperature and filtered by Watman 42, later 0.2 mL of Carrez I [$K_4Fe(CN)_6$] solution at 15 % in distilled water and Carrez II [$Zn(CH_3COO)_2$] at 30% in distilled water were added and it was made up to 10 mL with the 70 % methanol solution. It was centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes. A total of 5 mL of the supernatant were taken and 5 mL of dichloromethane were added, stirring vigorously in Vortex. The two phases were subsequently allowed to define and the upper phase was taken with a pipette. Two more extractions were made with dichloromethane equal to previous described. The sample was filtered with a 0.45 μm pore filter. For detection, a 2410 HPLC (WATERS) was used, a refractive index detector using the software (Empower Pro 2002), the chromatographic method used was the isocratic (constant flow) of 1 mL/min with water mobile phase + 0.01 N sulfuric acid, 50 °C column temperature, the column used was ion exclusion BioRad Amino HPX-87M 300 mm x 7.8 mm. Standards of renowned analytical quality were used.

The analysis of total phenols (TF) and total tannins (TT) was performed by the Folin-Ciocalteu method, before and after the treatment of the extracts with polyvinylpyrrolidone (PVPP) according to Makkar (2003), while the total condensed tannins (TCT), free condensed tannins (FCT) and total bound condensed tannins (TBCT) were determined by the nbutanol/HCl/Fe³⁺ method (Porter *et al.* 1986). The flavonoids (Flv) according to Bohm and Kocipai-Abyazan (1994). Saponins (Sap) by the method described by Obdoni and Ochuko (2001). Triterpenes (Trit) according to Jie-Ping and Chao-Hong (2006). Steroids (ST) by Galindo *et al.* (1989) and the alkaloids (Alk) by the method described by Muzquiz *et al.* (1994). The analyzes were carried out in the departamento de Producción Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de León, Spain. All the analyses were performed in duplicate in the six replications of each age for all species and seasonal period.

Statistical analysis. The results of the two years were grouped by seasonal period (rainy season and dry season) and a cluster analysis was performed in each of them (Visauta 1998) to establish groups with similarity in their content of primary and secondary metabolites. The sequence used by Vargas *et al.* (2013) was followed, which includes two phases: in the first, the Ward's hierarchical grouping method was used, in order to determine a preliminary number of groups (clusters) to form. Progressive grouping levels were explored and the optimal level was defined as the best distribution of the cases under study, according to the formed groups. In the second phase of the analysis, the definitive grouping of the cases was obtained; the non-hierarchical K-means

rafinosa (Raf), verbascosa (Verb) y estaquirosa (Estq) se tomó 1 g de la muestra seca y molida, se le añadieron 9 mL de metanol al 70 % y se calentó durante 20 minutos a 100 °C, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se filtró por Watman 42, luego se añadieron 0.2 mL de solución Carrez I [$K_4Fe(CN)_6$] al 15 % en agua destilada y Carrez II [$Zn(CH_3COO)_2$] al 30 % en agua destilada y se completó a 10 mL con la solución de metanol al 70 %. Se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Se tomaron 5 mL del sobrenadante y se le añadieron 5 mL de diclorometano, agitando vigorosamente en Vortex. Con posterioridad se dejó que las dos fases se definieran y se tomó la fase superior con una pipeta. Se hicieron dos extracciones más con diclorometano igual a la descrita anteriormente. La muestra se filtró con un filtro de 0.45 μm de poro. Para la detección se utilizó un HPLC (WATERS) de 2410, detector de índice de refracción utilizando el software (Empower Pro 2002), el método cromatográfico empleado fue el isocrático (flujo constante) de 1 mL/min con fase móvil de agua + ácido sulfúrico 0,01 N, 50 °C de temperatura de columna, la columna empleada fue de exclusión iónica BioRad Amino HPX-87M de 300 mm x 7.8 mm. Se emplearon patrones de renombrada calidad analítica.

El análisis de los fenoles totales (FT) y los taninos totales (TT) se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, antes y después del tratamiento de los extractos con polivinilpirrolidona (PVPP) según Makkar (2003), mientras que los taninos condensados totales (TCT), taninos condensados libres (TCL) y taninos condensados ligados totales (TCLT) se determinaron por el método nbutanol/HCl/Fe³⁺ (Porter *et al.* 1986). Los flavonoides (Flv) según Bohm y Kocipai-Abyazan (1994). Las saponinas (Sap) mediante el método descrito por Obdoni y Ochuko (2001). Los triterpenos (Trit) según Jie-Ping y Chao-Hong (2006). Los esteroides (ET) mediante Galindo *et al.* (1989) y los alcaloides (Alc) por el método descrito por Muzquiz *et al.* (1994). Los análisis se realizaron en el departamento de Producción Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de León, España. Todos los análisis se hicieron por duplicado en las seis réplicas de cada edad para todas las especie y período estacional.

Análisis estadístico. Los resultados de los dos años se agruparon por período estacional (período lluvioso y poco lluvioso) y se realizó en cada uno de ellos análisis de conglomerados (Visauta 1998) para establecer los grupos con similitud en su contenido de metabolitos primarios y secundarios. Se siguió la secuencia utilizada por Vargas *et al.* (2013), que incluye dos fases: en la primera se utilizó el método de agrupación jerárquico de Ward, con el fin de determinar un número preliminar de grupos (conglomerados) a formar. Se exploraron niveles de agrupación progresivos y el nivel óptimo se definió la mejor distribución de los casos en estudio, según los grupos formados. En la segunda fase del análisis, se procedió a obtener la agrupación definitiva de los

method was used, specifying as a starting point the number of clusters identified as optimal in the previous step and the experience of the researcher.

Results and Discussion

In the rainy season, seven groups (figure 1) were formed. *N. wightii* (30, 45, 60, 75 and 90 days), *T. labialis* (30 and 45 days), *E. variegata* (60 and 120 days) and *G. sepium* (60 days) were located in the first group characterized by low levels of Verb and ST. The *G. sepium* (120 and 180 days) in the second group showed the lowest FCT value and the highest Sap value. The *E. variegata* (180 days) with the highest amounts of Verb, Alc and Trit, and the lowest amounts of Stac formed the third group. *T. diversifolia* (60, 120 and 180 days) formed the fourth group with the lowest values of TCT, TBCT, Glu and Trit, and the highest of Stac. *L. leucocephala* (120 and 180 days) in the fifth group showed the highest concentrations of TT, TF, TCT, TBCT, Stac, Glu, Frut, Suc and Flv. In the sixth, *T. labialis* (60, 75 and 90 days) was located with the lowest values of TF, Raf, Frut, Suc, Flv, Alc and Sap. In the seventh *L. leucocephala* (60 days) had the lowest results in TT and the highest in Raf (table 1).

The low Verb contents in group one (figure 1 and table 1) coincide with the results reported by Velásquez-Holguín *et al.* (2019) in *Erythrina* and also found the Verb in lower concentration than Raf and Stac.

While Verdecia *et al.* (2020a) showed that in *E. variegata* the secondary metabolite concentrations increase with age and lower values at 60 days of regrowth. Ávila-Hernández *et al.* (2017) and Reyes-Silva

casos; se utilizó el método no jerárquico K- medias, especificando como punto de partida el número de conglomerados identificado como óptimo en el paso anterior y la experiencia del investigador.

Resultados y Discusión

En el período lluvioso se formaron siete grupos (figura 1) *N. wightii* (30, 45, 60, 75 y 90 días), *T. labialis* (30 y 45 días), *E. variegata* (60 y 120 días) y *G. sepium* (60 días) se situaron en el primer grupo caracterizado por bajos tenores de Verb y ET. La *G. sepium* (120 y 180 días) en el segundo grupo mostró el menor valor de TCL y el mayor de Sap. La *E. variegata* (180 días) con las mayores cantidades de Verb, Alc y Trit, y las menores de Estq formó el tercer grupo. La *T. diversifolia* (60, 120 y 180 días) conformó el cuarto grupo con los valores más bajos de TCT, TCLT, Glu y Trit, y los más altos de Estq. La *L. leucocephala* (120 y 180 días) en el quinto grupo mostró las mayores concentraciones de TT, FT, TCT, TCLT, Estq, Glu, Frut, Sac y Flv. En el sexto se ubicó *T. labialis* (60, 75 y 90 días) con los menores valores de FT, Raf, Frut, Sac, Flv, Alc y Sap. En el séptimo *L. leucocephala* (60 días) tuvo los resultados más bajos en TT y los mayores de Raf (tabla 1).

Los bajos contenidos de Verb en el grupo uno (figura 1 y tabla 1) coinciden con los resultados reportados por Velásquez-Holguín *et al.* (2019) en *Erythrina* y también encontraron a la Verb en menor concentración que la Raf y la Estq.

Mientras que, Verdecia *et al.* (2020a) señalaron que en *E. variegata* se incrementan las concentraciones de metabolitos secundarios con la edad y menores valores a los 60 días de rebrote. Ávila-Hernández *et al.* (2017) y

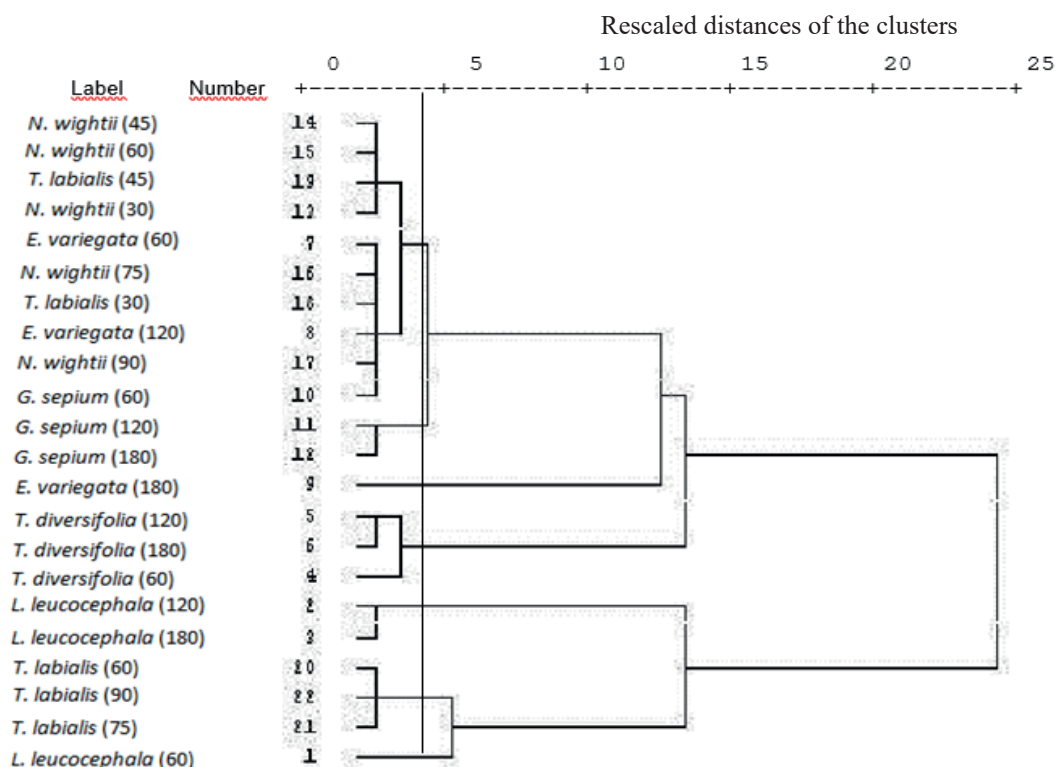


Figure 1. Dendrogram of the content of primary and secondary metabolites of trees, shrubs and herbaceous legumes during the rainy season

Table 1. Concentration of primary and secondary metabolites according to the groups obtained by cluster analysis in the rainy season

Primary and secondary metabolites, g/kg	Groups									
	1- <i>N. wightii</i> (30, 45, 60, 75, 90 d)	<i>T. labialis</i> (30, 45 d)	<i>E. variegata</i> (60, 120 d)	<i>G. sepium</i> (60 d)	2- <i>G. sepium</i> (120, 180 d)	3- <i>E. variegata</i> (180 d)	4- <i>T. diversifolia</i> (60, 120, 180 d)	5- <i>L. leucocephala</i> (120, 180 d)	6- <i>T. labialis</i> (60, 75, 90 d)	7- <i>L. leucocephala</i> (60 d)
N	117.4±5.01	134.7±1.00	107.8	133.2±6.81	171.1±2.55	90.88±1.77	197.9			
TT	4.09 ±1.94	13.57 ±1.02	11.17	3.05 ±2.41	21.49 ±0.75	3.08 ±1.02	2.33			
TF	11.44 ±4.35	33.25 ±2.10	21.05	8.75 ±3.23	43.59 ±0.06	6.64 ±0.65	17.7			
TCT	61.56 ±4.93	49.77 ±1.13	115.72	14.19 ±0.46	129.07 ±1.61	109.42 ±4.16	126.9			
TBCT	60.64 ±4.80	49.15 ±1.10	113.2	10.58 ±0.95	119.5 ±0.35	108.25 ±4.08	118.00			
FCT	0.95 ±0.34	0.62 ±0.03	2.50	3.62 ±0.62	9.59 ±1.26	1.17 ±0.18	8.88			
Verb	0.0007 ±0.0001	0.0014 ±0.001	0.007	0.001 ±0.0001	0.004 ±0.01	0.0008 ±0.001	0.002			
Stac	0.0008 ±0.002	0.0011 ±0.002	0.0003	0.0004 ±0.0002	0.0045 ±0.01	0.0005 ±0.0003	0.0018			
Raf	0.0011 ±0.0003	0.0013 ±0.000	0.0009	0.0014 ±0.0003	0.0019 ±0.001	0.0003 ±0.0001	0.0022			
Glu	0.004 ±0.0001	0.0057 ±0.01	0.0009	0.0008 ±0.0001	0.024 ±0.01	0.0012 ±0.0002	0.013			
Frut	0.0005 ±0.001	0.0005 ±0.000	0.0007	0.0008 ±0.01	0.003 ±0.001	0.00012 ±0.002	0.0019			
Suc	0.004 ±0.0004	0.0062 ±0.01	0.0015	0.0016 ±0.004	0.0027 ±0.01	0.0013 ±0.001	0.014			
Flv	2.58 ±1.09	11.67 ±3.96	7.35	24.77 ±13.60	68.44 ±12.88	2.21 ±0.59	30.30			
Alk	1.09 ±1.11	0.34 ±0.07	5.09	0.92 ±0.14	2.97 ±0.11	0.30 ±0.001	2.73			
Sap	1.13 ±1.39	11.63 ±2.96	1.30	1.61 ±0.55	9.73 ±1.38	0.43 ±0.10	5.48			
Trit	8.01 ±0.66	8.41 ±0.38	11.13	7.43 ±1.08	9.18 ±1.53	7.75 ±0.41	8.83			
ST	0.52 ±0.17	0.80 ±0.13	1.39	10.71 ±3.16	7.07 ±1.75	0.57 ±0.12	5.26			

et al. (2020) reported values lower than 0.62 g/ kg of ST in *S. humboldtiana*, *S. alba* and *P. alba*, which are agree with those reported in this study, so it is unlikely that the proportion of ST (0.52 g/kg) found in the species from the first group is of importance for its use in animal diets, although the literature shows that the toxic effects

Reyes-Silva *et al.* (2020) informaron valores inferiores a 0,62 g/kg de ET en *S. humboldtiana*, *S. alba* y *P. alba*, los que concuerdan con los reportados en el presente estudio, por lo que es poco probable que la proporción de ET (0.52 g/kg) encontradas en las especies del primer grupo sea de importancia para su empleo en dietas de animales,

of this metabolite are limited (Paumier *et al.* 2020 and Verdecia *et al.* 2020b). However, in *T. diversifolia* studies should be carried out on the biological response and animal behavior, since its value is higher than the rest of the evaluated species. Nevertheless, Holopainen *et al.* (2018) when evaluating the effects of climate change on secondary compounds (polyphenols, alkaloids and terpenes) of trees, found that CO₂ levels of 4-6.7 favor polyphenol values in foliage and decrease terpenoids, while with the normal values (1.5-3) of CO₂ are obtained high contents of terpenes with decrease of the polyphenols.

On the other hand, Holopainen *et al.* (2018) and Estrada-Jiménez *et al.* (2019) pointed out that the presence of secondary compounds is related to the age of the material, the defense mechanisms of the plant, the content of primary nutrients and the influence of the soil and climate. In the complexity of the ecosystem where the plants develop, essentially the climate and the soil exert a great influence with regard to the active principles and secondary compounds. The humidity, the salts content, soil nutrients, light, temperature and rainfalls, mainly, have a marked effect on their presence in plants, since their deficiencies and excesses cause stress situations that cause the synthesis of these substances; for example, wind speed, a factor little studied experimentally, is decisive in many cases since it is known that its action increases the evaporation of essential oils and in the case of the tropane alkaloids, the increase in transpiration in the plants increases the content of liquid that rises from the roots.

In the second group, *G. sepium* (120 and 180 days, in the rainy season) showed the lowest concentrations of FCT and the highest of Sap. Cabrera-Núñez *et al.* (2019) showed values of 2.71 g/kg of FCT, Sandoval-Pelcastre *et al.* (2020) reported 13.8 g/kg of Sap, so that *G. sepium* could be considered, according to Rodríguez *et al.* (2014) and Ramos-Trejo *et al.* (2016), as the tropical legume with the lowest content of condensed tannins, compared to *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*, *Acacia mangium* and *Callyandra sp.* (Pinard *et al.* 2019 and Huang *et al.* 2020).

The Sap contents, although they were the highest in the rainy season (table 1), are lower than those reported by Sirohi *et al.* (2009) in *Acacia concinna* (34 g/kg). For their part, García *et al.* (2006) in several species from the genera *Albizia*, *Cassia* and *Pithecellobium*, found between 12.8 and 38.5 g/kg of Sap with the highest values for the *Pithecellobium* genus. Therefore, the Sap content (11.63 g/kg) found in this study can be classified as light.

E. variegata at 180 days was part of the third group with the highest values in Verb, Alk and Trit, and the lowest in Stac. Similar performance to those obtained by Verdecia *et al.* (2020a) who reported Verb, Alk, Trit and Stac values of 0.007, 5.09, 11.13 and 0.0029 g/kg,

aunque la literatura señala que los efectos tóxicos de este metabolito son limitados (Paumier *et al.* 2020 y Verdecia *et al.* 2020b). No obstante, en *T. diversifolia* se deben realizar estudios sobre la respuesta biológica y comportamiento animal, ya que su valor es superior al resto de las especies evaluadas. No obstante, Holopainen *et al.* (2018) al evaluar los efectos del cambio climático en los compuestos secundarios (polifenoles, alcaloides y terpenos) de árboles, encontraron que los niveles de CO₂ de 4-6.7 favorecen los valores de polifenoles en el follaje y decrecen los terpenoides, mientras que con los valores normales (1.5-3) de CO₂ se obtiene altos contenidos de terpenos con disminución de los polifenoles.

Por otra parte, Holopainen *et al.* (2018) y Estrada-Jiménez *et al.* (2019) señalaron que la presencia de los compuestos secundarios está relacionada con la edad del material, los mecanismos de defensa de la planta, el contenido de nutrientes primarios y la influencia del suelo y clima. En la complejidad del ecosistema donde se desarrollan las plantas, esencialmente el clima y el suelo ejercen gran influencia en lo que respecta a los principios activos y compuestos secundarios. La humedad, el contenido de sales, nutrimentos de suelo, la luz, temperatura y precipitaciones, fundamentalmente, tienen marcado efecto en su presencia en las plantas, ya que sus carencias y excesos provocan situaciones de estrés que provocan la síntesis de estas sustancias; por ejemplo, la velocidad del viento, factor poco estudiado experimentalmente, es determinante en muchos casos ya que se conoce que por su acción se incrementa la evaporación de aceites esenciales y en el caso de los alcaloides tropánicos el aumento de la transpiración en las plantas hace que sea mayor el contenido de líquido que asciende desde las raíces.

En el segundo grupo *G. sepium* (120 y 180 días, en el período lluvioso) mostró las menores concentraciones de TCL y los mayores de Sap. Cabrera-Núñez *et al.* (2019) indicaron valores de 2.71 g/kg de TCL, Sandoval-Pelcastre *et al.* (2020) notificaron 13.8 g/kg de Sap, por lo que la *G. sepium* se pudiera considerar, según Rodríguez *et al.* (2014) y Ramos-Trejo *et al.* (2016), como la leguminosa tropical con menor contenido de taninos condensados, en comparación con *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*, *Acacia mangium* y *Callyandra sp.* (Pinard *et al.* 2019 y Huang *et al.* 2020).

Los contenidos de Sap, aunque fueron los mayores en el período lluvioso (tabla 1) son inferiores a los reportados por Sirohi *et al.* (2009) en *Acacia concinna* (34 g/kg). Por su parte, García *et al.* (2006) en varias especies de los géneros *Albizia*, *Cassia* y *Pithecellobium*, encontraron entre 12.8 y 38.5 g/kg de Sap con los mayores valores para el género *Pithecellobium*. Por lo anterior, el contenido de Sap (11.63 g/kg) hallado en el presente estudio se puede clasificar de ligero.

E. variegata a los 180 días formó parte del tercer grupo con los mayores tenores en Verb, Alc y Trit, y los menores de Estq. Comportamiento similar a los obtenidos por Verdecia *et al.* (2020a) los que notificaron

respectively in the foliage of *Erythrina variegata*, and stated that the contents of Verb, Stac and Trit in the different parts of plants are variable depending on the characteristics of each species and the phenological phase of the plant, since these compounds show mobility between the different organs.

On the other hand, Noudou *et al.* (2018) and Herlina *et al.* (2019) identified alkaloids, hypaphorin, erisodin, sterols, stigmaterol and isoflavonoids in *Erythrina poeppigiana* seed, while Patti *et al.* (2019) in *E. suberosa* reported that the seeds contain a large amount of organic acids, steroids and alkaloids, and they also isolated erythraline, erisodin, erisothrin and hypaphorin, for which they concluded that, due to the pharmacological properties of these compounds in different extracts, they may have anticancer activity. Therefore, it would be appropriate to carry out future researches on this topic in *Erythrina variegata* seeds.

With the best results, comprehensively during the rainy season, *T. diversifolia* appeared in the fourth group, with the lowest concentrations of TCT, TBCT, Glu, Trit and higher concentrations of ST. Santacoloma-Varón and Granados (2012) found in this plant between 0.43 and 2.6 g/kg of TF and from 3.1 to 4.9 g/kg of CT while, Medina *et al.* (2009) and Verdecia *et al.* (2018) reported from 6.4 to 8.7 g/kg of TF, although the Trit and ST were higher with 10.2 to 13.9 and from 25.4 to 29.2 g/kg, respectively. Aspects, which denote that the content of metabolites is controlled by genetic aspects of each species, mainly, and secondly by the environment. Although it is important to highlight that, the contents in this species are lower than those reported in *L. leucocephala*, *G. sepium* and *N. wightii*.

The fifth group composed of *L. leucocephala*, from the point of view of the concentration of secondary metabolites, was the one with the worst comprehensive results with the highest amounts of TT, TF, TCT, TBCT, FCT, Stac and Flv, although it showed the highest values of Glu, Frut and Suc. These results coincide with those reported by Verdecia *et al.* (2020b) in *L. leucocephala*, who when evaluating the effect of secondary metabolites on digestibility found relations higher than $R^2 = 0.80$ for TT, TCT and Sap. However, although the concentration of TT (21.49 g/kg) found in this group could be a positive element when evaluating, entirely, the antinutritional characteristics of the polyphenolic fraction of this species, since they are in the range where, possibly, the ruminal ecosystem is not affected and the probability of bypass protein formation increases and it would facilitate post-ruminal nitrogen digestibility (Albores-Moreno *et al.* 2019).

The soluble carbohydrate content is linked to the morpho-structural development of plants. The reserves of these compounds, in smaller quantities, in the growth points (buds) favor the foliar concentrations of saccharides after the regrowth emission. However,

valores de Verb, Alc, Trit y Estq de 0.007, 5.09, 11.13 y 0.0029 g/kg, respectivamente en el follaje de *Erythrina variegata*, y plantearon que los contenidos de Verb, Est y Trit en las diferentes partes de las plantas son variables dependiendo de las características de cada especie y de la fase fenológica de la planta, ya que estos compuestos presentan movilidad entre los diferentes órganos.

Por otra parte, Noudou *et al.* (2018) y Herlina *et al.* (2019) identificaron en semilla de *Erythrina poeppigiana* alcaloides, hipaforina, erisodina, esteroides, estigmaterol e isoflavonoides, mientras que Patti *et al.* (2019) en *E. suberosa* notificaron que las semillas contienen gran cantidad de ácidos orgánicos, esteroides y alcaloides, y también aislaron eritralina, erisodina, erisotrina e hipaforina por lo que concluyeron que, por las propiedades farmacológicas de estos compuestos presentes en diferentes extractos, pueden tener actividad anticancerígena. Por ello, sería apropiado realizar investigaciones futuras sobre este tema en las semillas de *Erythrina variegata*.

Con los mejores resultados, de forma integral durante el período lluvioso, se presentó la *T. diversifolia* en el cuarto grupo, con las menores concentraciones de TCT, TCLT, Glu, Trit y mayores de ET. Santacoloma-Varón y Granados (2012) encontraron en esta planta entre 0.43 y 2.6 g/kg de FT y desde 3,1 hasta 4,9 g/kg de TC mientras que, Medina *et al.* (2009) y Verdecia *et al.* (2018) informaron de 6.4 a 8.7 g/kg de FT, aunque los Trit y ET fueron superiores con 10.2 a 13.9 y de 25.4 a 29.2 g/kg, respectivamente. Aspectos que denotan que el contenido de metabolitos está controlado por aspectos genéticos de cada especie, fundamentalmente, y en segundo lugar por el ambiente. Aunque es de destacar que los contenidos en esta especie son inferiores a los reportados en *L. leucocephala*, *G. sepium* y *N. wightii*.

El quinto grupo compuesto por la *L. leucocephala*, desde el punto de vista de la concentración de metabolitos secundarios, fue la de los peores resultados integrales con las mayores cantidades de TT, FT, TCT, TCLT, TCL, Estq y Flv, aunque mostró los mayores valores de Glu, Frut y Sac. Estos resultados coinciden con los reportados por Verdecia *et al.* (2020b) en *L. leucocephala*, los que al evaluar el efecto de los metabolitos secundarios en la digestibilidad encontraron relaciones superiores a $R^2 = 0.80$ para los TT, TCT y Sap. No obstante, aunque la concentración de TT (21.49 g/kg) encontrada en este grupo pudiera ser un elemento positivo al evaluar, íntegramente, las características antinutricionales de la fracción polifenólica de esta especie, ya que se encuentran en el rango donde, posiblemente, no se afecta el ecosistema ruminal y aumenta la probabilidad de formación de proteína sobrepasante y facilitaría la digestibilidad pos-ruminal del nitrógeno (Albores-Moreno *et al.* 2019).

El contenido de carbohidratos solubles está ligado al desarrollo morfo-estructural de las plantas. Las reservas de estos compuestos, en menor cantidad, en los puntos de crecimiento (yemas) favorecen las concentraciones foliares de sacáridos después de la emisión del rebrote.

although these aspects are generally described from the physiological point of view, the performance of energy metabolites as a function of morpho-structural variations depends on the species, nutritional status and edaphoclimatic conditions in which it is grown (Cao *et al.* 2011).

T. labialis at 60, 75 and 90 days in the sixth group (table 1) showed the lowest concentrations of TF, Raf, Frut, Suc, Flv, Alk and Sap. Similar results were obtained by Scull and Savón (2003) when reporting 3.32-6.9 g/kg of TF in *Vigna unguiculata* and Pinto *et al.* (2002) found TF values of 3-6 g/kg in *Ipomoea triloba*, *Stizolobium deeringianum* and *Stizolobium pruri*, so it could be considered that the varieties of these legumes have low total content of polyphenols and condensed tannins, and in general, of secondary metabolites if they are compared with the other species of legumes reported in this research. However, the previous requires future researches that include a higher number of legumes.

Scull *et al.* (2012) found in *Lablab purpureus* that Suc and Frut concentrations (0.041 and 0.083 mg, respectively) were low when compared with those reported in *T. labialis* in the sixth group during the rainy period, while Paumier *et al.* (2018) showed similar results to those of this research in *G. sepium*. The content of monosaccharides in legumes is usually low, because these sugars are used in the biosynthesis of disaccharides and oligosaccharides during plant development for the formation of tissues, flowers and seeds (Verdecia *et al.* 2020b).

In the seventh group, *L. leucocephala* at 60 days had low TT content and high Raf content. Rodríguez *et al.* (2014) and Morales-Velasco *et al.* (2015) also found low levels of TT (3.01 g/kg) in *Albizia lebbekoides* and *Acacia cornigera*. This performance at early ages of the trees describes that the species with the highest proportion of fiber have a high concentration of hydroxylated metabolites, aspects that coincide with that stated by numerous authors about the negative effect of the cell wall compounds and tannins on the nutrition animal (Barragán-Hernández *et al.* 2019).

In the dry season, eight groups were obtained according to the similarity of the primary and secondary metabolites (figure 2). *T. labialis* (30, 45, 60, 75 and 90 days) and *N. wightii* (90 days) formed the first group and were characterized by low values of Raf, Frut and ST. In the second *E. variegata* (180 days) showed the highest values of TT, Alk and Trit. *N. wightii* (30, 45, 60 and 75 days) in the third group showed the lowest amounts of Verb, Flv, Alk, Sap and Trit. In the fourth was *E. variegata* (60 and 120 days) with the lowest results for Stac and the highest for Frut. *G. sepium* (60, 120 and 180 days) with the lowest concentration of FCT occupied the fifth group. The *T. diversifolia* (60, 120 and 180 days) in the sixth group had the lowest values of TT, TF, TCT, TBCT,

No obstante, aunque de forma general estos aspectos están descritos desde el punto de vista fisiológico, el comportamiento de los metabolitos energéticos en función de las variaciones morfo-estructurales depende de la especie, estado nutricional y condiciones edafoclimáticas en la cual se cultiva (Cao *et al.* 2011).

T. labialis a los 60, 75 y 90 días en el sexto grupo (tabla 1) presentó las menores concentraciones de FT, Raf, Frut, Sac, Flv, Alc y Sap. Resultados similares obtuvieron Scull y Savón (2003) al reportar de 3.32-6.9 g/kg de FT en *Vigna unguiculata* y Pinto *et al.* (2002) encontraron valores de FT de 3-6 g/kg en *Ipomoea triloba*, *Stizolobium deeringianum* y *Stizolobium pruri*, por lo que se pudiera considerar que las variedades de estas leguminosas tienen bajo contenido total de polifenoles y de taninos condensados, y en general, de metabolitos secundarios si se comparan con las otras especies de leguminosas informadas en la presente investigación. Sin embargo, lo anterior precisa de futuras investigaciones que contemplen mayor número de leguminosas.

Scull *et al.* (2012) encontraron en *Lablab purpureus* que las concentraciones de Sac y Frut (0.041 y 0.083 mg, respectivamente) fueron bajas si se comparan con las reportadas en *T. labialis* en el sexto grupo durante el período lluvioso, mientras que Paumier *et al.* (2018) mostraron resultados similares a los de la presente investigación en *G. sepium*. El contenido de monosacáridos en las leguminosas suele ser bajo, porque estos azúcares se utilizan en la biosíntesis de disacáridos y oligosacáridos durante el desarrollo de las plantas para la formación de tejidos, flores y semillas (Verdecia *et al.* 2020b).

En el séptimo grupo la *L. leucocephala* a los 60 días tuvo bajos contenidos en TT y altos de Raf. Rodríguez *et al.* (2014) y Morales-Velasco *et al.* (2015) también encontraron en *Albizia lebbekoides* y *Acacia cornigera* bajos tenores de TT (3.01 g/kg). Este comportamiento a edades tempranas de las arbóreas describe que las especies con mayor proporción de fibra presentan elevada concentración de metabolitos hidroxilados, aspectos que coinciden con lo planteado por numerosos autores sobre el efecto negativo de los compuestos de la pared celular y los taninos en la nutrición animal (Barragán-Hernández *et al.* 2019).

En el período poco lluvioso se obtuvieron ocho grupos según la similitud de los metabolitos primarios y secundarios (figura 2). *T. labialis* (30, 45, 60, 75 y 90 días) y *N. wightii* (90 días) formaron el primer grupo y se caracterizaron por bajos tenores de Raf, Frut y ET. En el segundo *E. variegata* (180 días) mostró los mayores valores de TT, Alc y Trit. La *N. wightii* (30, 45, 60 y 75 días) en el tercer grupo presentó las menores cantidades de Verb, Flv, Alc, Sap y Trit. En el cuarto estuvo *E. variegata* (60 y 120 días) con los resultados más bajos de Estq y los mayores de Frut. La *G. sepium* (60, 120 y 180 días) con la menor concentración de TCL ocupó el quinto grupo. La *T. diversifolia* (60, 120 y 180 días) en el sexto grupo tuvo los tenores más bajos de TT,

Glu and Suc, and the highest of ST. In the seventh group, *L. leucocephala* (60 and 120 days) revealed the highest amounts of Verb, Stac, Raf, Glu and Suc. *L. leucocephala* at 180 days occupied the eighth group and showed the highest concentrations of TF, TCT, TBCT, FCT, Flv and Sap (table 2).

FT, TCT, TCLT, Glu y Sac, y los mayores de ET. En el séptimo grupo la *L. leucocephala* (60 y 120 días) reveló las cantidades más elevadas de Verb, Estq, Raf, Glu y Sac. La *L. leucocephala* a los 180 días ocupó el octavo grupo y presentó las mayores concentraciones de FT, TCT, TCLT, TCL, Flv y Sap (tabla 2).

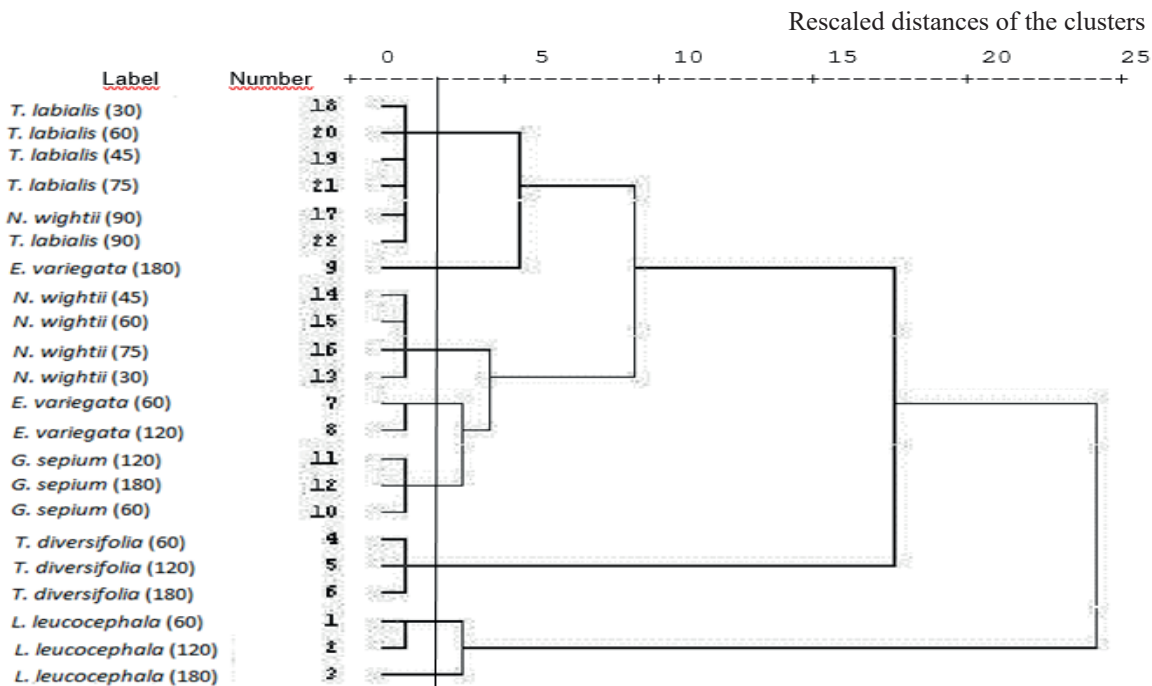


Figure 2. Dendrogram of the content of primary and secondary metabolites of trees, shrubs and legumes during the dry season

T. labialis (30, 45, 60, 75 and 90 days) and *N. wightii* (90 days) in the first group (table 2) were characterized by low contents of Raf, Frut and ST. These results could be related to what was stated by Salas *et al.* (2015) and Méndez *et al.* (2018) who in *Phaseolus vulgaris* and *Moringa oleifera* found that carbohydrate values were closely correlated with the succession of phenological events, from early growth to flower formation and flowering. From the latter, the general decrease in carbohydrates began, while oligosaccharides showed a highly variable performance during the study, where Stac and Verb were the majority.

In the second group, in the rainy season, only *E. variegata* was present at 180 days with the highest values of TT, Alc and Trit. The TT content obtained in this research are comparable with those reported by Herlina and Supratman (2016) and Herlina *et al.* (2018) in *Erythrina poeppigiana* who found 4.6-35.9 g/kg of TT, and this last value was higher than those of the rest of the studied trees, although it did not exceed the concentration from which ruminal fermentation begins to be affected (Makkar 2003). It is important to highlight that these authors also identified isoflavonoids, flavonoids, and cuersentin.

The Alc in *Erythrina* are distributed throughout the plant, largely in the seeds, stem bark and flowers,

T. labialis (30, 45, 60, 75 y 90 días) y *N. wightii* (90 días) en el primer grupo (tabla 2) se caracterizaron por bajos contenidos de Raf, Frut y ET. Estos resultados pudieran estar relacionados con lo planteado por Salas *et al.* (2015) y Méndez *et al.* (2018) quienes en *Phaseolus vulgaris* y *Moringa oleifera* encontraron que los valores de carbohidratos estaban estrechamente correlacionados con la sucesión de los eventos fenológicos, desde el crecimiento temprano hasta la formación de las flores y floración. A partir de este último comenzó el decrecimiento general de los carbohidratos, mientras que los oligosacáridos presentaron un comportamiento muy variable durante el estudio, donde fueron mayoritarios la Estq y la Verb.

En el segundo grupo en el período lluvioso solo estuvo la *E. variegata* a los 180 días con los mayores valores de TT, Alc y Trit. El contenido de TT obtenido en la presente investigación son comparables con los informados por Herlina y Supratman (2016) y Herlina *et al.* (2018) en *Erythrina poeppigiana* quienes encontraron 4.6-35.9 g/kg de TT, y este último valor fue superior al del resto de las arbóreas estudiadas, aunque no sobrepasó la concentración a partir de la cual se comienza a afectar la fermentación ruminal (Makkar 2003). Es de destacar que estos autores también identificaron isoflavonoides, flavonoides y cuersentina.

Los Alc en *Erythrina* se encuentran distribuidos en toda

Table 2. Concentration of primary and secondary metabolites according to the groups obtained by cluster analysis in the dry season

Primary and secondary metabolites, g/kg	Groups									
	1- <i>T. labialis</i> (30, 45, 60, 75, 90 d) N. wightii (90 d)	2- <i>E. variegata</i> (180 d)	3- <i>N. wightii</i> (30, 45, 60, 75 d)	4- <i>E. variegata</i> (60, 120 d)	5- <i>G. sepium</i> (60, 120, 180 d)	6- <i>T. diversifolia</i> (60, 120, 180 d)	7- <i>L. leucocephala</i> (60, 120 d)	8- <i>L. leucocephala</i> (180 d)		
N	82.19±3.59	121.1	98.30±0.47	154.4±4.30	148.1±5.80	151.3±6.09	198.97±3.51	161.9		
TT	4.40 ± 1.23	35.29	2.24 ± 0.45	27.30 ± 3.58	13.28 ± 2.85	2.22 ± 0.88	26.89 ± 5.18	34.10		
TF	8.85 ± 0.9	48.09	7.24 ± 0.48	43.79 ± 5.18	31.88 ± 3.94	5.87 ± 0.56	46.15 ± 2.91	50.53		
TCT	103.19 ± 8.56	97.52	68.08 ± 7.49	65.07 ± 0.2	38.88 ± 4.49	11.56 ± 1.40	133.42 ± 8.59	142.04		
TBCT	101.79 ± 8.7	94.73	67.24 ± 7.30	63.28 ± 0.01	38.19 ± 4.50	9.42 ± 0.68	123.77 ± 9.61	130.48		
FCT	1.39 ± 0.43	2.79	0.85 ± 0.21	1.79 ± 0.21	0.69 ± 0.1	2.13 ± 0.76	9.65 ± 1.01	11.56		
Verb	0.0006 ± 0.0002	0.0007	0.0004 ± 0.0001	0.0006 ± 0.0001	0.0008 ± 0.0002	0.0005 ± 0.0002	0.0025 ± 0.0002	0.0012		
Stac	0.0006 ± 0.0002	0.0002	0.0007 ± 0.0001	0.0002 ± 0.000	0.0007 ± 0.0001	0.0002 ± 0.000	0.0032 ± 0.0006	0.0002		
Raf	0.0004 ± 0.0005	0.0009	0.001 ± 0.0003	0.001 ± 0.0001	0.0007 ± 0.0003	0.0014 ± 0.0002	0.0018 ± 0.0005	0.0012		
Glu	0.0017 ± 0.0007	0.0009	0.0031 ± 0.0005	0.0021 ± 0.0013	0.0039 ± 0.0007	0.0006 ± 0.0001	0.02 ± 0.0049	0.010		
Frut	0.0001 ± 0.0001	0.0009	0.0003 ± 0.0001	0.0011 ± 0.0001	0.0004 ± 0.0003	0.0005 ± 0.0002	0.0005 ± 0.0003	0.0004		
Suc	0.0018 ± 0.0007	0.0017	0.0034 ± 0.0005	0.0032 ± 0.0012	0.0043 ± 0.0009	0.0011 ± 0.0002	0.02 ± 0.0042	0.010		
Flv	2.30 ± 1.11	10.05	1.99 ± 0.67	5.38 ± 2.66	11.25 ± 4.83	29.75 ± 14.61	54.13 ± 10.37	86.95		
Alk	0.28 ± 0.07	5.22	0.25 ± 0.06	4.65 ± 0.42	0.33 ± 0.06	0.99 ± 0.2	2.87 ± 0.15	3.25		
Sap	0.42 ± 0.15	1.38	0.35 ± 0.11	0.79 ± 0.14	10.30 ± 3.13	1.97 ± 0.37	9.82 ± 3.68	15.17		
Trit	7.79 ± 0.57	10.11	7.68 ± 0.30	9.29 ± 0.07	8.05 ± 0.11	7.69 ± 1.34	7.76 ± 0.96	8.43		
ST	0.50 ± 0.12	1.43	0.54 ± 0.08	1.01 ± 0.31	0.77 ± 0.23	11.59 ± 3.39	5.00 ± 1.18	8.65		

although there are also reports of their presence, in lower proportions, in roots and leaves (Herlina *et al.* (2018). The results of this research are within the range reported by Verdecia *et al.* (2019, 2020a) in *E. variegata* and *J. curcas* from 3.4 to 10.4 g/kg.

N. wightii at 30, 45, 60 and 75 days, in the dry season, in the third group showed the lowest values of Verb, Flv, Alk, Sap and Trit. The Verb values are low as they are influenced by the plant age and different authors (Salas *et al.* 2015 and Espejo and Morales 2019) showed that the individual content of each α -galactoside depends not only on the type of legume and on the genotypes, but also on the growing conditions.

The concentrations of Flv found (1.5 g/kg) coincide with that reported by Vázquez *et al.* (2017), but they are lower than those obtained by Mori *et al.* (2015) in the stems (7.5-17.2 g/kg) and leaves (15–17.6 g/kg) of *Leucaena leucocephala* and *Mucuna gigantea*. The higher concentration in the leaves is due to its function in vegetables, because of its importance for the development and good functioning of plants by protecting them against external agents, such as UV radiation, microorganisms, herbivorous animals and the environment. They can also act as chemical markers, showing to insects the appropriate plant for their feeding.

The fluctuations in non-structural carbohydrates of *E. variegata* at the ages of 60 and 120 days in the fourth group during the dry season could be due to genetic factors, weather conditions, the land where they grow and cultivation techniques used. The plant maturity is important when evaluating the carbohydrates content, taking into account that the Frut is synthesized during the first stages of growth and the highest amounts of α -galactosides, as is the case of the Estq, are found during flowering and fruiting (Sánchez-Mendoza *et al.* 2016, Kannan *et al.* 2018 and Shibata *et al.* 2018).

With the best results in the fifth group, *G. sepium* at the ages of 60, 120 and 180 days in the dry season, showed the lowest FCT values and this agrees with that reported by La O *et al.* (2018) and Canul-Solis *et al.* (2020), who recommend this species for use as excellent quality forage.

Santacoloma-Varón and Granados (2012) found a low amount of tannins in this species, which could be related to the sampling, which were carried out during the dry season, where environmental conditions can affect the photosynthetic rate and in consequently the synthesis of secondary metabolites. In addition, it must taken into account that these substances are synthesized in the plant and fulfill functions such as defense against fungi, bacteria and virus, protection against ultraviolet radiation, and serve as a mechanism to avoid dehydration of tissues, an aspect that could affect their concentration (Silva *et al.* 2017).

T. diversifolia (60, 120 and 180 days) showed, like *G. sepium*, the best comprehensive results.

la planta, en mayor cuantía en las semillas, corteza del tallo y flores, aunque también existen reportes de su presencia, en menores proporciones, en las raíces y las hojas (Herlina *et al.* (2018). Los resultados de la presente investigación están dentro del rango informado por Verdecia *et al.* (2019, 2020a) en *E. variegata* y *J. curcas* de 3.4 a 10.4 g/kg.

N. wightii a los 30, 45, 60 y 75 días, en el período poco lluvioso, en el tercer grupo mostró los menores valores de Verb, Flv, Alc, Sap y Trit. Los tenores de Verb son bajos al estar influenciados por la edad de planta y diferentes autores (Salas *et al.* 2015 y Espejo y Morales 2019) señalaron que el contenido individual de cada α -galactósido depende no sólo del tipo de leguminosa y de los genotipos, sino también de las condiciones de cultivo.

Las concentraciones de Flv encontrados (1.5 g/kg) coinciden con lo informado por Vázquez *et al.* (2017), pero son inferiores a los obtenidos por Mori *et al.* (2015) en los tallos (7.5-17.2 g/kg) y las hojas (15–17.6 g/kg) de *Leucaena leucocephala* y *Mucuna gigantea*. La mayor concentración en las hojas se debe a su función en los vegetales, por su importancia para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas al protegerlas contra agentes externos, como la radiación UV, microorganismos, animales herbívoros y del medio ambiente. Pueden actuar también como señalizadores químicos, indicando a los insectos la planta apropiada para su alimentación.

Las fluctuaciones de los carbohidratos no estructurales de la *E. variegata* a las edades de 60 y 120 días en el cuarto grupo durante el período poco lluvioso, se pudieran deber a factores genéticos, condiciones climatológicas, el terreno donde se desarrollan y las técnicas de cultivo utilizadas. La maduración de la planta, es importante a la hora de evaluar el contenido en carbohidratos, si se tiene en cuenta que la Frut se sintetiza durante las primeras etapas del crecimiento y las mayores cantidades de los α -galactósidos, como es el caso de la Estq, se encuentran durante la floración y fructificación (Sánchez-Mendoza *et al.* 2016, Kannan *et al.* 2018 y Shibata *et al.* 2018).

Con los mejores resultados integralmente en el quinto grupo la *G. sepium* a las edades de 60, 120 y 180 días en el período poco lluvioso, presentó los menores valores de TCL y esto concuerdan con lo reportado por La O *et al.* (2018) y Canul-Solis *et al.* (2020), quienes recomiendan a esta especie para su uso como forraje de excelente calidad.

Santacoloma-Varón y Granados (2012) en esta especie encontraron baja cantidad de taninos, lo que pudo estar relacionado con la toma de las muestras, las cuales se realizaron durante el período poco lluvioso, donde las condiciones ambientales pueden afectar la tasa fotosintética y en consecuencia la síntesis de metabolitos secundarios. Además, se debe tener en cuenta que estas sustancias se sintetizan en la planta y cumplen funciones como la defensa contra hongos, bacterias y virus, protección contra la radiación ultravioleta y sirven como mecanismo para evitar la deshidratación de los tejidos, aspecto que pudieron afectar su concentración (Silva *et al.* 2017).

The lower concentrations of TT, TF, TCT, TBCT, Glu and Suc, and the higher of ST are mainly due to that during the dry season the leaves intercept a lower proportion of light and consequently lower production of primary and secondary metabolites, due to the slower speed of biochemical reactions in the plant (González-Sierra *et al.* 2019 and Rodríguez *et al.* 2019), while Santacoloma-Varón and Granados (2012) when studying the content of TF, TT and CT in this species in several thermal floors there were not significant differences. On the other hand, Lezcano *et al.* (2012) reported low contents of TF, TT, Trit and ST. This little variability found could be due to that the volume and speed of biochemical reactions can increase with temperature and most reactions in plants have a characteristic thermal optimum, which decreases both at higher and lower temperatures. This is due, in the first instance, that the enzymatic activity and the integrity of cell membranes are affected by extreme temperatures.

Estrada-Jiménez *et al.* (2019) reported 12 g/kg of ST in *T. diversifolia*, results similar to those obtained in this study, a response that may be given by the similarity in climatic and soil conditions, aspects that directly influence on the production of secondary compounds. Corroborating this statement, Herrera (2020) reported a close relation between this metabolite and maximum temperature and rainfalls.

L. leucocephala at 60 and 120 days, during the dry season, was in the seventh group and showed the highest values of oligosaccharides (Verb, Stac and Raf) and of Glu and Suc. Although, it should be noted that Glu and Suc concentrations in vegetables are higher than those of oligosaccharides. This performance was pointed out by Almeida (2003) and Vilhena *et al.* (2003) who reported higher concentrations of these ones during the vegetative growth stage, which could be determined by the speed of photosynthetic activity and the phenological state of plants where carbohydrates are widely used in plant growth and development.

Aimard *et al.* (2003) when evaluating the effect of water stress on meadow grasses, they found that Raf, Stac and Verb increased, while Glu and Suc remained stable and Frut decreased more than 50%. It is probably that this response also occurs in legumes, although it would be necessary to design specific researches to validate this hypothesis.

In the eighth group, only *L. leucocephala* was at 180 days, in the dry season, and it was characterized by showing the highest concentrations of TF TCT, TBCT, FCT and Flv. These results are similar to those reported by Verdecia *et al.* (2020b) who found values of 43, 130, 119, 10 and 77 g/kg for TF, TCT, TBCT, FCT and Flv in this species in Valle del Cauto, respectively. In *Jatropha curcas* Verdecia *et al.* (2019) reported CT values in the range of 65-98 g/kg, of these 90 %

T. diversifolia (60, 120 y 180 días) presentó al igual que *G. sepium* los mejores resultados integrales. Las menores concentraciones de TT, FT, TCT, TCLT, Glu y Sac, y la mayor de ET se deben, fundamentalmente, a que durante el período poco lluvioso las hojas interceptan menor proporción de luz y en consecuencia menor producción de metabolitos primarios y secundarios, debido a la menor velocidad de las reacciones bioquímicas en la planta (González-Sierra *et al.* 2019 y Rodríguez *et al.* 2019), mientras que Santacoloma-Varón y Granados (2012) al estudiar el contenido de FT, TT y TC en esta especie en varios pisos térmicos no encontraron diferencias significativas. Por otra parte, Lezcano *et al.* (2012) reportaron bajos contenidos de FT, TT, Trit y ET. Esta poca variabilidad encontrada se pudiera deber a que el volumen y velocidad de las reacciones bioquímicas puede aumentar con la temperatura y la mayoría de reacciones en las plantas tienen un óptimo térmico característico, que disminuye tanto a temperaturas superiores como inferiores. Esto se debe, en primera instancia, a que la actividad enzimática y la integridad de las membranas celulares se afectan por las temperaturas extremas.

Estrada-Jiménez *et al.* (2019) en *T. diversifolia* notificaron 12 g/kg de ET, resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, respuesta que puede estar dada por la similitud en las condiciones climáticas y de suelo, aspectos que influyen directamente en la producción de compuestos secundarios. Por su parte, corroborando esta afirmación Herrera (2020) reportó relación estrecha entre este metabolito y la temperatura máxima y las lluvias.

La *L. leucocephala* a los 60 y 120 días, durante el período poco lluvioso se situó en el séptimo grupo y presentó los mayores valores de oligosacáridos (Verb, Estq y Raf) y de Glu y Sac. Aunque, es de señalar que las concentraciones de Glu y Sac en los vegetales son superiores a la de los oligosacáridos. Este comportamiento fue señalado por Almeida (2003) y Vilhena *et al.* (2003) quienes reportaron mayores concentraciones de estos durante la etapa de crecimiento vegetativo, lo que pudo estar determinado por la velocidad de la actividad fotosintética y el estado fenológico de las plantas donde los carbohidratos son muy utilizados en el crecimiento y desarrollo de la planta.

Aimard *et al.* (2003) al evaluar el efecto del estrés hídrico en gramíneas pratenses encontraron que la Raf, Estq y Verb se incrementaron, mientras que la Glu y Sac se mantenían estables y la Frut disminuía en más de 50%. Es probable que esta respuesta también ocurra en las leguminosas, aunque sería necesario diseñar investigaciones específicas para validar esta hipótesis.

En el octavo grupo estuvo solo la *L. leucocephala* a los 180 días, en el período poco lluvioso, y se caracterizó por presentar las mayores concentraciones de FT, TCT, TCLT, TCL y Flv. Estos resultados son similares a los reportados por Verdecia *et al.* (2020b) los que encontraron en esta especie en el Valle del Cauto valores de 43, 130, 119, 10 y 77 g/kg para FT, TCT, TCLT, TCL y Flv, respectivamente. En *Jatropha curcas* Verdecia *et al.* (2019) informaron

are TBCT and about 70 % are protein-bound, mainly because as higher TCT concentration, higher will be the amount of these coupled to proteins by the affinity they have for this nutrient.

Dago-Dueñas *et al.* (2020) obtained values from 22.2 to 33.6 and from 105 to 238 g/kg of TF and TBCT, respectively and related it to the high proportions of tannins bound to the reduction of the cell wall digestibility. Aspects highlighted by Herrera *et al.* (2017) when reporting correlations higher than $R^2 = -0.71$ between polyphenols and DMD, IVDMD and NDFD.

Conclusions

The age had a marked effect on the content of primary and secondary metabolites, as the former decreased and the latter increased as maturity advanced. This performance was evidenced by verifying, through cluster analysis, which the groups where the highest contents of secondary compounds were found were made up of the most advanced ages of the *Neonotonia wightii*, *Teramnus labialis*, *Erythrina variegata* and *Leucaena leucocephala* species, in both seasonal periods. Aspects of vital importance for future studies where the associative effects of species with lower content of these compounds (*Tithonia diversifolia* and *Gliricidia sepium*) were analyzed both in the ecosystem and in the animal response.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

Author's contribution

D.M. Verdecia: Design the experiment, data analysis, manuscript writing

R. del Carmen Herrera-Herrera: Design the experiment, data analysis, manuscript writing

R.S. Herrera: Design the experiment, data analysis, manuscript writing

J.L. Ramírez: Design the experiment, data analysis, manuscript writing

S. López: Design the experiment, data analysis, manuscript writing

L.G. Hernández-Montiel: Design the experiment, data analysis, manuscript writing

E. Torres, A.R. Sánchez: data analysis, manuscript writing

R. Bodas: data analysis, manuscript writing

F.J. Giráldez: data analysis, manuscript writing

J. Guillaume: data analysis, manuscript writing

H. Uvidia: data analysis, manuscript writing

tenores de TC en el rango de 65-98 g/kg, de estos el 90 % son TCLT y cerca del 70 % están ligados a la proteína, fundamentalmente porque a mayor concentración de TCT, mayor será la cantidad de estos acoplados a las proteínas por la afinidad que tienen por este nutriente.

Dago-Dueñas *et al.* (2020) obtuvieron valores de 22.2 a 33.6 y de 105 hasta 238 g/kg de FT y TCLT, respectivamente y lo relacionaron con las altas proporciones de taninos ligados con la reducción de la digestibilidad de la pared celular. Aspectos destacados por Herrera *et al.* (2017) al reportar correlaciones superiores a $R^2 = -0.71$ entre los polifenoles y la DMO, DIVMS y DFND.

Conclusiones

La edad presentó marcado efecto en el contenido de metabolitos primarios y secundarios al disminuir los primeros e incrementarse los segundos en la medida que la madurez avanzaba. Este comportamiento se evidenció al constatar, mediante el análisis de conglomerados, que los grupos donde se encontraron los mayores contenidos de los compuestos secundarios estaban integrados por las edades más avanzadas de las especies *Neonotonia wightii*, *Teramnus labialis*, *Erythrina variegata* y *Leucaena leucocephala*, en ambos periodos estacionales. Aspectos de vital importancia para trabajos futuros donde se analice los efectos asociativos de especies con menor contenido de estos compuestos (*Tithonia diversifolia* y *Gliricidia sepium*) tanto en el ecosistema como en la respuesta animal.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

Contribucion de los autores

D.M. Verdecia: Idea original, diseño de la investigación, análisis, escritura del artículo

R. del Carmen Herrera-Herrera: Idea original, diseño de la investigación, análisis, escritura del artículo

R.S. Herrera: Idea original, diseño de la investigación, análisis, escritura del artículo

J.L. Ramírez: Idea original, diseño de la investigación, análisis, escritura del artículo

S. López: Idea original, diseño de la investigación, análisis, escritura del artículo

L.G. Hernández-Montiel: Idea original, diseño de la investigación, análisis, escritura del artículo

A.R. Sánchez: análisis de la información, escritura del artículo

R. Bodas: análisis de la información, escritura del artículo

F.J. Giráldez: análisis de la información, escritura del artículo

J. Guillaume: análisis de la información, escritura del artículo

H. Uvidia: análisis de la información, escritura del artículo

References

- Aimard, V., Morvan, A., Billard, J., Huault, C., Keller, F. & Prud, M. 2003. "Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass". *Plant Physiology*, 132(4): 2218-2229, ISSN:1532-2548, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.103.022335>.
- Albores-Moreno, S., Alayón-Gamboa, J.A., Miranda-Romero, L.A., Alarcón-Zúñiga, B., Jiménez-Ferrer, G., Ku-Vera, J.C. & Piñero-Vázquez, A.T. 2019. "Effect of tree foliage supplementation of tropical grass diet on in vitro digestibility and fermentation, microbial biomass synthesis and enteric methane production in ruminants". *Tropical Animal Health and Production*, 51(2019): 893-904, ISSN: 1573-7438, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1772-7>.
- Almeida, A.F. 2003. Acumulación y movilización de carbohidratos durante el cuajado del fruto en el naranjo dulce Salustiana (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). PhD Thesis. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España, p. 169.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th Ed. George W. Latimer Jr (ed). Ed. AOAC International, Rockville MD, USA, ISBN: 978-0935-584-875.
- Ávila-Hernández, C.A., Molina-Torres, J. & Ramírez-Chávez, E. 2017. "¿Es HPTLC una alternativa para la cuantificación de metabolitos secundarios?: cuantificación de ácido salicílico en árboles silvestres de la familia Salicaceae ubicados en el estado de Guanajuato". *Revista Jóvenes en la Ciencia*, 3(2): 294-299, ISSN: 2395-9797.
- Barragán-Hernández, W.A., Mestra-Varga, L.I. & Cajas-Girón, Y.S. 2019. "Nutritional characterization of forages in multistrata silvopastoral systems during the rainy season in Colombia". *Livestock Research for Rural Development*, 31(2), Article #18, ISSN: 0121-3784, Available: <http://www.lrrd.org/lrrd31/2/wbarr31018.html>.
- Bohm, B.A. & Koupai-Abyazani, M.R. 1994. "Flavonoids and condensed tannins from leaves of Hawaiian *Vaccinium vaticulatum* and *V. calycynium*". *Pacific Science*, 48(4): 458-463, ISSN: 1534-6188.
- Cabrera-Núñez, A., Lammoglia-Villagomez, M., Alarcón-Pulido, S., Martínez-Sánchez, C., Rojas-Ronquillo, R. & Velázquez-Jiménez, S. 2019. "Árboles y arbustos forrajeros utilizados para la alimentación de ganado bovino en el norte de Veracruz, México". *Abanico Veterinario*, 9: 1-12, ISSN: 2448-6132, DOI: <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.913>.
- Canul-Solis, J., Campos-Navarrete, M., Piñero-Vázquez, A., Casanova-Lugo, F., Barros-Rodríguez, M., Chay-Canul, A., Cárdenas-Medina, J. & Castillo-Sánchez, L. 2020. "Mitigation of Rumen Methane Emissions with Foliage and Pods of Tropical Trees". *Animals*, 10(843): 1-14, ISSN: 2076-2615, DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10050843>.
- Cao, H., Hwang, J. & Chen, X. 2011. "Carbohydrate-containing natural products in medicinal chemistry. Opportunity, challenge and scope of natural products in Medicinal Chemistry". *ChemInform*, 44(23): 411-431, ISSN: 1522-2667, DOI: <https://doi.org/10.1002/CHIN.201323203>.
- Dago-Deñas, Y., Millan-Domínguez, J.C., Calzadilla-Reyes, K., Redonet-Miranda, M.A., López-Quintana, Y. & Hernández-Guanche, L. 2020. "Uso potencial de *Leucaena leucocephala* Lam. (leucaena) presente en sistemas agroforestales de Pinar del Río". *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8(1): 154-162, ISSN: 1996-2452.
- Espejo, N. & Morales, N. 2019. "Variación de la diversidad taxonómica y funcional de la avifauna en un bosque seco tropical (bs-T) en diferentes estados de sucesión en el sur del Valle del Magdalena, Huila, Colombia". *Ecología Caldasia*, 41(1): 108-123, ISSN: 2357-3759, DOI: <https://dx.doi.org/10.15446/caldas.v41n1.71272>.
- Estrada-Jiménez, P.M., Ramírez, J.L. & Verdecia, D.M. 2019. "Aplicación de la minería de datos en la estimación de componentes fotoquímicos". *ROCA Revista Científico- Educaciones de la provincia de Granma*, 15(2): 177-186, ISSN: 2074-0735.
- Galindo, W., Rosales, M., Murgueitio, E. & Larrahondo, J. 1989. "Sustancias antinutricionales en las hojas de árboles forrajeros". *Livestock Research for Rural Development*, 1(1): 36-47, ISSN: 0121-3784, Available: <http://www.lrrd.org/lrrd1/1/mauricio.htm>.
- García, D.E., Medina, M.G., Domínguez, C. & Soca, M. 2006. "Composición química, factores antinutricionales potenciales y valor nutritivo de dos especies del género *Pithecellobium*". *Pastos y Forrajes*, 29(2): 1-17, ISSN: 0864-0394.
- González-Sierra, L., Díaz-Solares, M., Castro-Cabrera, I., Fonte-Carballo, L., Lugo-Morales, Y. & Altunaga-Pérez, N. 2019. "Caracterización fitoquímica y actividad antioxidante total de diferentes extractos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray". *Pastos y Forrajes*, 42(3): 243-248, ISSN: 0864-0394.
- Herlina, T., Gaffar, S. & Widowati, W. 2018. "Cytotoxic activity of erypogein d from *Erythrina poeppigiana* (leguminosae) against cervical cancer (HeLa), breast cancer (MCF-7) and ovarian cancer (SKOV-3) cells". *IOP Science. Journal of Physics: Conference Series*, 1013(2018): 012198, ISSN: 1742-6596, DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1013/1/012198>.
- Herlina, T., Haraswati, N., Apriani, R., Nishinarizki, V., Gaffar, S. & Supratman, U. 2019. "Cytotoxic Activity of Alpinumisoflavone from *Erythrina poeppigiana* (Leguminosae) Against Colon Cancer (WiDr), Cervical Cancer (Hela), and Hepatoma Cancer (HepG2) Cells". *HAYATI Journal of Biosciences*, 26(2): 96-100, ISSN: 2086-4094, DOI: <https://doi.org/10.4308/hjb.26.2.%25x>.
- Herlina, T & Supratman, D.U. 2016. "Kuersetin dari Daun *Erythrina poeppigiana* (leguminosae) ". *Journal Natur Indonesia*, 17(1): 1-4, ISSN: 2503-0345, DOI: <http://dx.doi.org/10.31258/jnat.17.1.1-4>.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D., Rivero, L. & Camacho, I. 2015. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Ed. AGROINFOR. Instituto de Suelos, La Habana, Cuba, p. 64, ISBN: 959-246-022-1.
- Herrera, R.S. 2020. "Relación entre los elementos climáticos y el comportamiento de los pastos y forrajes en Cuba". *Avances en Investigación Agropecuaria*, 24(2): 23-38, ISSN: 0188-7890.
- Herrera, R.S., Verdecia, D.M., Ramírez, J.L., García, M. & Cruz, A.M. 2017. "Relation between some climatic factors and the chemical composition of *Tithonia diversifolia*". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2): 271-279, ISSN: 2079-3480.
- Holopainen, J.K., Virjamo, V., Ghimire, R.P., Blande, J.D., Julkunen-Titto, R. & Kivimäenpää, M. 2018. "Climate change effects on secondary compounds of forest trees in the Northern Hemisphere". *Frontiers in Plant Science*, 9:1445, ISSN:

- 1664-462X, DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01445>.
- Huang, J., Kautz, M., Trowbridge, A.M., Hammerbacher, A., Raffa, K.F., Adams, H.D., Goodsmann, D.W., Xu, C., Meddens, A.J.H., Kandasamy, D., Gershenzon, J., Seidl, R. & Hartmann, R. 2020. "Tree defence and bark beetles in a drying world: carbon partitioning, functioning and modelling". *New Phytologist*, 225(1): 26-36, ISSN: 0028-646X, DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16173>.
- Jie-Ping, F. & Chao-Hong, H. 2006. "Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3): 950-956, ISSN: 0731-7085, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.044>.
- Kannan, U., Sharma, R., Gangola, M.P. & Chibbar, R.N. 2018. "Improving grain quality in pulses: strategies to reduce raffinose family oligosaccharides in seeds". *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*, 4(1): 70-88, ISSN: 2459-069X.
- La O, O., Vásquez, M.C., Hernández, J., Estrada, A. & Ledea, J.L. 2018. "Nutritional characterization of *Gliricidia sepium* in a saline and high drought ecosystem of the Cauto river basin, Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(3): 347-356, ISSN: 2079-3480.
- Lezcano, Y., Soca, M., Sánchez, L., Ojeda, F., Olivera, Y, Fontes, D. Montejo, I.L. & Santana, H. 2012. "Caracterización cualitativa del contenido de metabolitos secundarios en la fracción comestible de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray". *Pastos y Forrajes*, 35(3): 283-292, ISSN: 0864-0394.
- 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 Research*, 49(3): 241-256, ISSN: 0921-4488, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00142-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00142-1).
- Medina, M.G., García D.E., González, M.E., Cova, L.J. & Moratinos, P. 2009. "Variables morfo-estructurales y de la calidad de la biomasa de *Tithonia diversifolia* en la etapa inicial de crecimiento". *Zootecnia Tropical*, 27(2): 121-134, ISSN: 2542-3436.
- Méndez, Y., Suárez, F.O., Verdecia, D.M., Herrera, R.S., Labrada, J.A., Murillo, B. & J.L. Ramírez. 2018. "Bromatological characterization of *Moringa oleifera* foliage in different development stages". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(3): 1-10, ISSN: 2079-3480.
- Morales-Velasco, S., Vivas-Quila, N.J. & Gómez-Medina, V. 2015. "Variables biofísicas de doce sistemas agrosilvopastoriles en la meseta de Popayán – Cauca". *Biociencia en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2): 11-21, ISSN: 1909-9959, DOI: [https://doi.org/10.18684/BSAA\(13\)10-21](https://doi.org/10.18684/BSAA(13)10-21).
- Mori, D., Ogita, S., Fujise, K., Inoue, A. & Sasamoto, H. 2015. "Protoplast Co-culture Bioassay for Allelopathy in Leguminous Plants, *Leucaena leucocephala* and *Mucuna gigantea*, Containing Allelochemical Amino Acids, Mimosine and L-DOPA". *Journal of Plant Studies*, 4(1): 1-11, ISSN: 2412-365X, DOI: <http://dx.doi.org/10.5539/jps.v4n1p1>.
- Muzquiz, M., Cuadrado, C., Ayet, G., De la Cuadra, C., Burbano, C. y Osagie, A. 1994. "Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and location". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7): 1447-1450, ISSN: 0021-8561, DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00043a011>.
- Noudou, B.S., Nkengfack, A.E. & Djama, C.M. 2018. "Characterization of indole alkaloids from seeds of *Erythrina poeppigiana* (Fabaceae)". *International Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences*, 5(2): 33-38, ISSN: 2394-9414, DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1173960>.
- Obdoni, B.O. & Ochuko, P.O. 2001. "Phytochemical studies and comparative efficacy of the crude extract of some homostatic plants in Edo and Delta States of Nigeria". *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 8(2): 203-208, ISSN: 1118-0579, DOI: <https://doi.org/10.4314/gjpas.v8i2.16033>.
- Patti, F., Taheri, Y., Sharifi-Rad, J., Martorell, M., Cho, W.C. & Pezzani, R. 2019. "Erythrina suberosa: Ethnopharmacology, Phytochemistry and Biological Activities". *Medicines*, 6(105): 1-7, ISSN: 2305-6320, DOI: <https://doi.org/10.3390/medicines6040105>.
- Paumier, M., Méndez-Martínez, Y., Torres, E., Sánchez, A.R., Ramírez, J.L., Herrera, R.S., Santana, A. & Verdecia, D.M. 2020. "Indicators of Yield of *Tithonia diversifolia* in the Zone of Granma Province, Cuba". *Modern Concepts & Developments in Agronomy*, 6(4) MCDA. 000645, ISSN: 2637-7659, DOI: <https://doi.org/10.31031/MCDA.2020.06.000645>.
- Paumier, M., Verdecia, D.M., Ramírez, J.L., Herrera, R.S., Leonard, I., Santana, A. & Méndez, Y. 2018. "El contenido de metabolitos primarios de *Gliricidia sepium* en una zona del Valle del Cauto, Cuba". *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria*, 19(4): 1-8, ISSN: 1695-7504.
- Pinard, D., Fierro, A.C., Marchal, K., Myburg, A.A. & Mizrachi, E. 2019. "Organelar carbon metabolism is coordinated with distinct developmental phases of secondary xylem". *New Phytologist*, 222(2019): 1832-1845, ISSN: 0028-646X, DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.15739>.
- Pinto, R., Ramírez, L., Kú-Vera, J.C. & Ortega, L. 2002. "Especies arbóreas y herbáceas forrajeras del sureste de México". *Pastos y Forrajes*, 25(3): 171-180, ISSN:0864-0394.
- Porter, L., Hrstich, L. & Chan, B. 1986. "The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cianidin and delphinidin". *Phytochemistry*, 25(14): 223-230, ISSN: 0031-9422, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3).
- Ramos-Trejo, O., Canul-Solis, J.R. & Ku-Vera, J.C. 2016. "Forage yield of *Gliricidia sepium* as affected by harvest height and frequency in Yucatan, Mexico". *Revista Bio Ciencias*, 42(2): 116-123, ISSN: 2007-3380, DOI: <https://dx.doi.org/10.15741/revbio.04.02.04>.
- Reyes-Silva, J.A., Salazar-Campos, A. & Ríos-Cortés, H.H. 2020. "Metabolitos secundarios de las plantas (angiospermas) y algunos usos interesantes". *UNO Sapiens Boletín Científico de la Escuela Preparatoria No. 1*, 4(2020): 16-18, ISSN: 2683-2054.
- Rodríguez, R., Galindo, J., Ruiz, T.E., Solís, C., Scull, I. & Gómez, S. 2019. "Valor nutritivo de siete ecotipos de *Tithonia diversifolia* colectados en la zona oriental de Cuba". *Livestock Research for Rural Development* 31(8), ISSN: 0121-3784,

Available: <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd31/8/ruiz31119.html>.

- Rodríguez, R., González, N., Ramírez, A., Gómez, S., Moreira, O., Sarduy, L. & Medina, Y. 2014. "Tannins of tropical shrub-like legumes: their effect on protein protection of soybean meal". Cuban Journal of Agricultural Science, 48(3): 247-252, ISSN: 2079-3480.
- Salas, R., Ordoñez, E. & Reátegui, D. 2015. "Polifenoles totales y capacidad antioxidante (dpph y abts) en cuatro variedades de frejol (*Phaseolus vulgaris* l.) crudo seco, remojado y cocido". Investigación y Amazonía, 5(1 y 2): 55-62, ISSN: 2224-445X.
- Sánchez-Mendoza, N.A., Jiménez-Martínez, C., Cardador-Martínez, A., Del Campo-Barba, S.M. & Dávila-Ortiz, G. 2016. "Caracterización física, nutricional y no nutricional de las semillas de Inga paterno". Revista Chilena de Nutrición, 43(4): 400-407, ISSN: 0717-7518, DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000400010>.
- Sandoval-Pelcastre, A.A., Ramírez-Mella, M., Rodríguez-Ávila, N.L. & Candelaria-Martínez, B. 2020. "Tropical trees and shrubs with potential to reduce the production of methane in ruminants". Tropical and Subtropical Agroecosystems, 23(2): 1-16, ISSN: 1870-0462.
- Santacoloma-Varón, L.E. & Granados, J.E. 2012. "Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades fisicoquímicas del suelo". Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 3(1): 53-62, ISSN: 2145-6097, DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.934>.
- Scull, I. & Savón, L. 2003. "Determination of total polyphenols and condensed tannins in forage meal of four *Vigna unguiculate* varieties". Cuban Journal of Agricultural Science, 37(4): 403-407, ISSN: 2079-3480.
- Scull, I., Savón, L. & Homaza, M.V. 2012. "Composición fotoquímica de follaje de Dolico (*Lablab purpureus*)". Revista Computarizada Porcina, 19(1): 33-36, ISSN: 1026-9053.
- Shibata, M., Hirotsuka, M., Mizutani, Y., Takahashi, H., Kawada, T., Matsumiya, K., Hayashi, Y. & Matsumura, Y. 2018. "Diversity of γ - glutamyl peptides and oligosaccharides, the "kokumi" taste enhancers, in seeds from soybean mini core collections". Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 82(3): 507-514, ISSN: 1347-6947, DOI: <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1436960>.
- Silva, S.F., Carneiro, M.S., Edvan, R.L., Pereira, E.S., De Moraes-Neto, L.B., Pinto, A.P. & Camilo, D. 2017. "Agronomic characteristics and chemical composition of *Gliricidia sepium* grown under different residual heights in different seasons". International Journal of Agriculture and Natural Resources, 44(1): 35-42, ISSN: 2452-5731, DOI: <http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i1.1579>.
- Sirohi, S.K., Pandey, N., Goel, N., Singh, B., Mohini, M., Pandey, P. & Chaudhry, P.P. 2009. "Microbial activity and ruminal methanogenesis as affected by plant secondary metabolites in different plant extracts". International Journal of Environmental Science and Engineering, 1(1): 52-58, ISSN: 2311-8741.
- Vázquez, M.A., Castro, A. & Ramos, N. 2017. "Composición química, polifenoles y actividad antioxidante del extracto etanólico de *Gentianella dianthoides* (kunth) fabris". Científica, 14(2): 19-27, ISSN: 1665-0654.
- Velásquez-Holguín, L.F., Montoya-Yepes, D.F., Jiménez-Rodríguez, A.A., Murillo-Arango, W. & Méndez-Arteaga, J.J. 2019. Género *Erythrina*: actualidad en la investigación y perspectivas de desarrollo científico. 1st Ed. Ed. Universidad de Tolima, Tolima, Colombia, p. 156, ISBN: 978-958-5569-03-4.
- Verdecia, D.M., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Bodas, R., Leonard, I., Giráldez, F.J., Santana, A. Méndez-Martínez, Y. & López, S. 2018. "Yield components, chemical characterization and polyphenolic profile of *Tithonia diversifolia* in Valle del Cauto, Cuba". Cuban Journal of Agricultural Science, 52(4): 457-471, ISSN: 2079-3480.
- Verdecia, D.M., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Leonard, I., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., Valdés, C., Arceo, Y., Paumier, M., Santana, A., Álvarez, Y., Méndez-Martínez, Y. & López, S. 2020b. "Effect of age of regrowth, chemical composition and secondary metabolites on the digestibility of *Leucaena leucocephala* in the Cauto Valley, Cuba". Agroforestry Systems, 94(4): 1247-1253, ISSN: 1572-9680, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0339-y>.
- Verdecia, D.M., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Paumier, M., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., Valdés, C., Arceo, Y., Álvarez, Y., Méndez-Martínez, Y. & López, S. 2020a. "*Erythrina variegata* quality in the Cauto Valley, Cuba". Agroforestry Systems, 94(4): 1209-1218, ISSN: 1572-9680, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00353-z>.
- Verdecia, D.M., Torres, E., Sánchez, A.R., Álvarez-Perdomo, G.R., Herrera, R.S., Ramírez, J.L., Paumier, M., Bodas, R., Giráldez, F.J., Grizelj, J. & López, S. 2019. "Effect of the Regrowth Age on the Chemical Composition, Digestibility and Polyphenol Content of *Jatropha curcas*". Current Investigations in Agriculture and Current Research, 8(1): 1-5, ISSN: 2637-4676, DOI: <https://doi.org/10.32474/CIACR.2019.08.000276>.
- Vilhena, M.C., Câmara, L.A., Piza, M.T & Lima, P.P. 2003. "Contenido de fructanos en raíces tuberosas de yacón (*Polymnia sonchifolia*)". Ciencia y Tecnología Alimentaria, 4(001): 35-40, ISSN: 1696-2443.
- Visauta, V.B. 1998. Análisis estadístico con SPSS para Windows: estadística multivariante. Ed. McGraw-Hill. Madrid, España, p. 358, ISBN: 978-84-481-2074-0.
- Vargas, B., Solis, O., Sáenz, F. & León, H. 2013. "Caracterización y clasificación de hatos lecheros en Costa Rica mediante análisis multivariado". Agronomía Mesoamericana, 24(2):257-275, ISSN: 1021-7444.

Received: September 5, 2010

Accepted: December 23, 2020