

Diss. ETH No. 17237

**Determinants of tannin concentrations in forage plants.
Agronomic potential of tanniferous forage plants.**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by
DIETER ADRIAN HÄRING
Dipl. Bio I (University of Basel)
born 15th of September 1976
citizen of Arisdorf, BL

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. N. Amrhein, examiner
PD Dr. A. Lüscher, co-examiner
Prof. Dr. P. J. Edwards, co-examiner

2007

Zusammenfassung

Kondensierte Tannine (KT) spielen eine Hauptrolle bei der pflanzlichen Verteidigung gegen Herbivore und Pathogene. Sie haben ein hohes Anwendungspotenzial in Nahrungsmitteln, in der Tierernährung sowie in der Human- und Tiermedizin. Kondensierte Tannine sind nicht besonders giftig, sondern sie beeinträchtigen ihre Konsumenten in einer passiven, konzentrationsabhängigen Weise indem sie die Schmackhaftigkeit und Verdaulichkeit des Pflanzenmaterials reduzieren. Diese Doktorarbeit stellt das pflanzenwissenschaftliche Modul des interdisziplinären *Tannin-Projektes* dar, welches die Erarbeitung der Grundlagen zur Nutzung von tanninhaltigen Pflanzen zur Bekämpfung von Magen-Darm-Nematoden bei Wiederkäuern zum Ziel hat. Das *Tannin-Projekt* umfasst zwei weitere Dissertationen, eine zur Wiederkäuerernährung und eine zur Parasitologie. Ziele der Doktorarbeit waren die folgenden:

1. Die Gewinnung von grundlegenden Einsichten zu wichtigen Bestimmungsgrößen der Tanninkonzentration tanninhaltiger, krautiger Pflanzen (Nährstoffverfügbarkeit, Induktion durch Elizitoren, Wachstumsgeschwindigkeit, Konkurrenz, etc.) und das Testen von bereits bestehenden Pflanzenverteidigungs-Hypothesen zur Vorhersage der Tanninkonzentration in Pflanzen.
2. Die Erforschung der agronomischen Eignung verschiedener tanninhaltiger Futterpflanzen für den Anbau und die Verwendung gegen Magen-Darm-Parasiten bei Wiederkäuern.

Das Eröffnungskapitel gibt eine kurze Einführung in die Thematik der kondensierten Tannine. Es enthält Informationen zur Biosynthese und zum Vorkommen von kondensierten Tanninen und einen Abriss über die anhaltenden Schwierigkeiten einer zuverlässigen Vorhersage der Tanninkonzentration in (wachsendem) Pflanzenmaterial. Das zweite Kapitel geht die Frage an, ob die Tanninkonzentration von *Onobrychis viciifolia* (dt. Saat-Esparsette) durch simulierte Angriffe von natürlichen 'Pflanzenfeinden' erhöht werden kann und, falls dem so ist, ob das Ausmass dieser Erhöhung vom

Nährstoff-Status der Pflanze abhängt: Die Tanninkonzentration von *Onobrychis viciifolia* nahm unabhängig vom Nährstoffangebot durch mittels Elitizoren simulierte Angriffe von Pilzen (16 %), Bakterien (20 %) oder pflanzenfressenden Insekten (29 %) in der unmittelbaren Umgebung der Verwundung zu. Trotz einer Abnahme der Tanninkonzentration mit zunehmendem Nährstoffangebot fanden sich keine Hinweise auf einen Trade-off zwischen pflanzlichem Wachstum und chemischer Verteidigung. Das dritte Kapitel behandelt die Tanninkonzentrationen verschiedener Pflanzenorgane und die Wichtigkeit der Verschiebung der Biomasseallokation in diese Organe für die Bestimmung der Tanninkonzentration auf dem Niveau der erntbaren, oberirdischen Biomasse tanninhaltiger Futterpflanzen: Sowohl in *Onobrychis viciifolia* als auch *Lotus corniculatus* (dt. Hornklee) kamen kondensierte Tannine in höherer Konzentration in Blättern (74.8, 42.6 mg KT g⁻¹ TS) als in Stängeln (23.8 and 12.4 mg KT g⁻¹ DM) vor. Mit fortschreitender Ontogenese (vom Säen im Mai bis zur Blattseneszenz im Oktober) stieg die Tanninkonzentration der Blätter an – gleichzeitig nahm aber der relative Anteil der (tanninreichen) Blätter an der Ernte ab (in *Onobrychis* von 100 zu 79 % DM, in *Lotus* von 61 auf 32 % DM). Anhand eines Modells wird gezeigt, wie Wissen über die Verteilung von kondensiertem Tannin in der Pflanze und Verschiebungen der Biomasseallokation während der pflanzlichen Entwicklung für die Vorhersage der Tanninkonzentration verwendet werden kann.

Das vierte Kapitel verbindet die Arbeiten aller drei Module des *Tannin-Projektes*. Es umfasst: (i) Eine Untersuchung der agronomischen Güte von 12 Zuchtsorten vierer tanninhaltiger Futterpflanzenarten, die entweder in Reinsaat oder in Mischung mit *Festuca pratensis* (dt. Wiesenschwingel) angebaut worden waren. (ii) Eine Abschätzung der Schmackhaftigkeit von tanninhaltigen Futterpflanzen. (iii) Ein Experiment betreffend deren Wirksamkeit gegen Magen-Darm-Würmer in Schafen. Die Tanninkonzentration und die Eignung zur Kultivierung war vor allem bei *Onobrychis viciifolia* und *Lotus corniculatus* vielversprechend, während sich *Lotus pedunculatus* (dt. Sumpfschotenklee) unter 'normalen' Anbaubedingungen als schwacher Konkurrent zeigte und *Cichorium intybus* (dt. Wegwarte) nur sehr tiefe Tanninkonzentrationen aufwies (< 10 g KT kg⁻¹ TS). Die Tanninkonzentration der Ernte war unter Feldbedingungen ausgeprägten Schwankungen unterworfen, die stark vom Anteil der tanninhaltigen Pflanzen am totalen Trockenmassenertrag der Parzelle abhängig waren. Mischungen von *O. viciifolia* oder *L. corniculatus* mit *F. pratensis* waren den Reinsaaten der tanninhaltigen Pflanzen bezüglich Ertrag (Mischungen: 16.4 – 18.4 t TS ha⁻¹ y⁻¹ gegenüber Reinsaaten: 9.9 – 13 t TS ha⁻¹ y⁻¹) und Unkrautunterdrückung überlegen. Allerdings reduzierte das Vorkommen des (nicht tanninhaltigen) Grases die Tanninkonzentration der Ernte

beträchtlich. Die Schmackhaftigkeit von getrocknetem oder siliertem *Onobrychis* oder *Lotus* war in allen Fällen zumindest vergleichbar mit einer gleichartig konservierten Gras / Klee-Mischung und, im Falle der *Onobrychis*-Silage, der entsprechenden Kontrolle sogar überlegen. Das Fressen von *Onobrychis* Heu oder Silage war mit einer Abnahme der Ei-Ausscheidung von *Haemonchus contortus*, einem der weltweit wichtigsten Schafparasiten, verbunden.

Kapitel fünf und sechs sind das Resultat einer Zusammenarbeit des pflanzenwissenschaftlichen und des parasitologischen Moduls des *Tannin-Projektes*. Sie untersuchen die parasitologische Wirkung von frischem resp. konserviertem tanninhaltigen Futter gegen Magen-Darm-Würmer in Schafen. Das Verfüttern von *Onobrychis* oder *Lotus* im Vergleich zu einem nicht-tanninhaltigen Kontrollfutter senkte den täglichen Parasiten-Ei-Ausstoss der Schafe in beiden Fällen nachhaltig um 63 % und die Anzahl der adulten Würmer um 49 resp. 35 %. Die antiparasitäre Wirkung von tanninhaltigem Futter blieb auch in konserviertem Futter erhalten.

Ich schliesse aus den präsentierten Ergebnissen, dass die Tanninkonzentration der Ernte tanninhaltiger Pflanzen mit hinreichender Genauigkeit aus der Kenntnis (i) der Pflanzenart und -sorte, (ii) dem relativen Anteil der tanninhaltigen Pflanzen an der Trockenmasse der Ernte und, im Falle von (nahezu) reinen Beständen, (iii) aus dem relativen Anteil von Blättern und Stängeln in der Ernte abgeschätzt werden kann. Bezuglich Ertrag, Schmackhaftigkeit und antiparasitärer Wirkung scheinen vor allem *Onobrychis viciifolia* und *Lotus corniculatus* aussichtsreiche Kandidaten zu sein. Eine erhöhte Konkurrenzkraft der Zuchtsorten und ein verbessertes Verständnis der Wirkungsweise der entwurmenden Aktivität von kondensiertem Tannin wäre dringend wünschenswert und bietet Forschungsbedarf für zukünftige Experimente.

Summary

Condensed tannins (CT) play a major role as plant defensive compounds in plant-herbivore and plant-pathogen interactions. Condensed tannins also have high potential for applications relevant to humans in food and animal nutrition as well as in human and veterinary medicine. Rather than being acutely toxic, condensed tannins affect their consumers in a passive, concentration-dependent manner by reducing the palatability and digestibility of the plant. This thesis represents the plant scientific module of the interdisciplinary *Tannin-Project* which is aimed at establishing basic knowledge for the use of tanniferous forages against gastrointestinal nematodes in parasitised ruminants. The *Tannin-Project* includes two other PhD-theses; one on ruminant nutrition and one on parasitology. The goals of the here presented thesis were the following:

1. To gain fundamental insight on important determinants of CT-concentrations in tanniferous, herbaceous plant species (nutrient availability, induction by elicitors, growth rate, competition, etc.) and to test already existing plant defence hypothesis for the prediction of tannin concentrations in plants.
2. To evaluate the agronomic suitability of various tanniferous forage plants for cultivation and the use against gastrointestinal nematodes in ruminants.

The opening chapter contains a brief introduction to condensed tannins. It provides information on biosynthesis and occurrence of condensed tannins and an outline concerning the continued difficulty to reliably predict the concentrations of condensed tannins in (growing) plant material. The second chapter addresses the question whether or not the tannin concentrations of *Onobrychis viciifolia* (sainfoin) can be enhanced by elicitor-simulated attacks of natural plant ‘enemies’ and if so, whether this induction depends on the nutrient status of the plant: in *Onobrychis viciifolia* the condensed tannin concentration in close proximity to the wound increased in response to the elicitor-simulated presence of fungi (16 %), bacteria (20 %) and herbivorous insects (29 %), independent of the nutrient status of the plant. Despite a decreasing tannin concentration with increasing nutrient availability, there was no evidence for a trade-off between

growth and defense. The third chapter deals with tannin concentrations in various plant organs and the importance of shifts in biomass allocation to these organs for the determination of tannin concentrations on the level of the harvestable aboveground biomass of tanniferous forage plants: in both *Onobrychis viciifolia* and *Lotus corniculatus* (birds-foot trefoil), condensed tannins occurred in higher concentrations in leaves (74.8, 42.6 mg CT g⁻¹ DM, respectively) than in stems (23.8 and 12.4 mg CT g⁻¹ DM, respectively). With progressing ontogenesis (from sowing in May to leaf senescence in October), the tannin concentrations in leaves increased – however, at the same time the relative contribution of (tannin-rich) leaves to dry matter yield decreased (*Onobrychis*: from 100 to 79 % DM, *Lotus*: from 61 to 32 % DM). In a model, it is shown how knowledge of the distribution of condensed tannins within plants and of shifts in biomass allocation during ontogenesis can be used to predict tannin concentrations.

The fourth chapter integrates work of all three modules within the *Tannin-Project*. It includes: (i) An investigation of the agronomic performance of 12 cultivars of 4 tanniferous forage species, sown either as pure stands or in mixture with *Festuca pratensis*. (ii) An assessment of the palatability of tanniferous forages. (iii) An experiment addressing the efficacy of tanniferous forage plants against gastrointestinal parasites in sheep. The tannin concentrations and the suitability for cultivation were particularly promising in *Onobrychis viciifolia* and *Lotus corniculatus* while *Lotus pedunculatus* (big trefoil) proved to be a weak competitor under ‘normal’ agronomic conditions and *Cichorium intybus* had very low tannin concentrations (< 10 g CT kg⁻¹ DM). Tannin concentrations of the harvestable biomass under field conditions showed pronounced dynamics according to the relative contribution of tanniferous plants to the total dry matter yield of the entire plot. Mixtures of *Onobrychis viciifolia* and *Lotus corniculatus* with *Festuca pratensis* were superior to purely sown stands of these tanniferous species with regard to yield (mixtures: 16.4 – 18.4 t DM ha⁻¹ y⁻¹ versus purely sown stands: 9.9 – 13 t DM ha⁻¹ y⁻¹) and resistance to weed invasion. However, the presence of the (non-tanniferous) grass reduced the tannin concentrations of the harvest considerably. The palatability of dried or ensiled *Onobrychis* and *Lotus* was at least comparable to an equally conserved grass / legume mixture and, in the case of ensiled *Onobrychis*, even superior to the control. The feeding of *Onobrychis* hay or silage was associated with a reduction of the faecal egg count of *Haemonchus contortus*, one of the most important sheep parasites world-wide.

Chapters five and six are the result of a cooperation between the plant scientific and the parasitological module of the *Tannin-Project* and address the anthelmintic effect of

fresh and conserved tanniferous forages, respectively, against two important gastrointestinal nematodes in sheep. The feeding of *Onobrychis viciifolia* and *Lotus corniculatus* sustainably reduced the daily faecal egg output by 63 % (both species) relative to the respective controls and tended to lower the number of adult parasite worms by 49 and 35 %, respectively. The antiparasitic effect of tanniferous forages was largely preserved in conserved forage.

Based on the results presented herein, I conclude that tannin concentrations of harvestable biomass are reasonably well predictable from (i) the identity of the tanniferous forage plant, (ii) the relative contribution of tanniferous forages to the total dry matter yield and, in case of (almost) pure stands, (iii) from knowledge of the proportion of leaves and stems in the harvest. With regard to yield, palatability and efficacy against gastrointestinal parasites, *Onobrychis viciifolia* and *Lotus corniculatus* are particularly promising candidate plants for the control of gastrointestinal parasites, though an enhanced competitive ability of the tanniferous plants is desirable and an improved mechanistic understanding of the antiparasitic effects of condensed tannins an important area for future research.