

برآورد ترکیبات شیمیایی، تجزیه پذیری و تولید گاز شبدر ایرانی در مراحل مختلف برداشت

سید محمد مهدی طباطبائی^۱، بهروز نجف‌نژاد^{۲*}، پویا زمانی^۲،
اکبر تقی‌زاده^۳، احمد احمدی^۴ و حسن علی‌عربی^۵
۱، ۲، ۳، ۵، ۶، عضو هیأت علمی، دانشجوی دکتری و اعضای هیأت علمی دانشگاه
بوعلی سینا همدان، ۴، عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز
(تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱۴ - تاریخ تصویب: ۹۰/۷/۶)

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی ترکیب شیمیایی، خصوصیات تجزیه‌پذیری و تولید گاز شبدر ایرانی در مراحل ابتدای غنچه‌دهی تا گلدهی کامل شامل: آغاز غنچه‌دهی (I)، غنچه‌دهی کامل (II)، آغاز گلدهی (III) و گلدهی کامل (IV) انجام شد. جهت برآورد مؤلفه‌های تجزیه‌پذیری از چهار رأس گوسفند نر مهربان فیستوله‌دار استفاده شد. نتایج مربوط به ترکیبات شیمیایی نشان داد که، افزایش در رشد گیاه با افزایش در میزان ماده آلی و N.D.F علوفه همراه بود، درحالی که درصد پروتئین خام و N.F.C و چربی خام نمونه‌ها با پیشرفت مرحله رشد کاهش یافت ($p < 0.05$). نتایج تجزیه‌پذیری ماده خشک نشان‌دهنده این مطلب بود که، با افزایش سن گیاه از مقادیر ناپدید شدن و تجزیه‌پذیری مؤثر ماده خشک و پروتئین خام علوفه کاسته شد. همچنین با افزایش سن گیاه روند مشابهی نیز در میزان گاز تولیدی مشاهده شد و همزمان با آن محتوی ماده آلی قابل هضم و انرژی متابولیسم آن نیز کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). تمامی این یافته‌ها مؤید این مطلب می‌باشند که افزایش مرحله رشد و در نتیجه افزایش سهم اجزاء دیواره سلولی موجب کاهش معنی‌داری در ارزش غذایی شد. از نتایج این پژوهش چنین برمی‌آید که علوفه شبدر ایرانی در مرحله آغاز گلدهی نسبت به مراحل بعدی از قابلیت‌های کمی و ارزش غذایی مطلوب‌تری برخوردار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: شبدر ایرانی، ناپدیدی، تجزیه‌پذیری و تولید گاز.

مقدمه

علوفه‌ای خوشخوراک و دارای بیش از ۱۶ درصد پروتئین و ۸۵-۶۰ درصد کربوهیدرات و ویتامین‌های K, E, D, A می‌باشد (Abasi, 2005). شبدر ایرانی دارای خصوصیات استروژنیک نبوده، پس باعث نابرووری و بی‌نظمی‌های تولیدمثلی در میش‌ها نخواهد شد (Lacy et al., 2003). Stockdale (1993) و McLaren & Doyle (1988) گزارش نمودند که پروتئین خام شبدر ایرانی با پیشرفت مرحله رشد کاهش و آن. دی. اف آن افزایش می‌یابد.

شبدر ایرانی یکی از گیاهان یکساله خانواده بقولات است که از انواع علوفه مرغوب با انعطاف‌پذیری بالا در میزان آب مورد نیاز می‌باشد. این گیاه در خاک‌های مرطوب، سنگین و با قلیائیت کم تا اسیدی متوسط رشد مناسبی دارد (Lacy et al., 2003). شبدر پس از یونجه با سطح زیر کشت حدود یکصد هزار هکتار در کشور مهمترین جنس در گیاهان علوفه‌ای است. شبدر ایرانی

رشد انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های شبدر مورد آزمایش از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا واقع در شهرستان همدان برداشت شد، برای این منظور یک مزرعه یک هکتاری به روش آبی کشت شده بود انتخاب و از بین قطعات شبدر کشت شده، قطعه‌ای که از نظر رشد از یکنواختی بیشتری برخوردار بود مورد استفاده قرار گرفت. قطعه شبدر انتخابی به چهار قسمت مساوی تقسیم شد و هر قسمت به چهار زیر بخش دیگر تقسیم گردید، به نحوی که شانزده کرت به دست آمد. سپس هر یک از این زیر بخش‌ها به قید قرعه به یک مرحله رشد شامل: (۱) آغاز غنچه‌دهی، (۲) غنچه‌دهی کامل، (۳) شروع گلدهی و (۴) گلدهی کامل (INRA, 1987)، اختصاص داده شده و در مراحل مذکور از آنها نمونه‌برداری شد.

تعیین تجزیه‌پذیری: جهت تعیین میزان تجزیه‌پذیری مواد خوراکی مورد آزمایش، سه رأس گوسفند نر مهربان فیستولدار به وزن $45 \pm 3/5$ کیلوگرم انتخاب و ۲ بار طی روز در سطح نگهداری با جیره‌ای محتوی ۱۰٪ شبدر خشک تغذیه شدند. دسترسی به آب آزادانه و دوره عادت‌پذیری به جیره دو هفته بود. نمونه ماده خوراکی با آسیاب مخصوص دارای غربال ۲ میلی‌متری آسیاب شدند. مقدار پنج گرم از هر خوراک داخل کیسه‌های نایلونی از جنس الیاف پلی‌استر به ابعاد 12×6 سانتی‌متر و قطر منافذ ۵۰ میکرومتر ریخته شد. زمان‌های انکوباسیون شامل صفر، ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بود. برای هر تیمار در هر ساعت ۶ تکرار (دو عدد کیسه به ازای هر گوسفند در هر ساعت) تهیه شد. در پایان هر زمان انکوباسیون، کیسه‌ها را خارج و در معرض جریان آب سرد شستشو شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۶۵ درجه سانتی‌گراد جهت تبخیر و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند.

پارامترهای تجزیه‌پذیری (بخش محلول، بخش غیرمحلول و نرخ ثابت تغذیه) توسط نرم‌افزار NEWAY محاسبه و تطبیق داده‌های تجزیه‌پذیری با استفاده از

Goblentz (2000) بیان نمود که نرخ تجزیه‌پذیری و ارزش غذایی گیاه در سنین پائین بالا، ولی با ورود به مراحل گلدهی و دانه بستن کاهش می‌یابد.

برای استفاده بهتر و مؤثرتر از این ماده خوراکی در تغذیه دام باید مطالعات وسیع‌تری جهت ارزیابی تغذیه‌ای آن صورت گیرد. روش کیسه‌های نایلونی امروزه پایه و اساس توصیف نیازمندی‌های نیتروژن نشخوار کنندگان در سیستم‌های تغذیه کشورهای مختلف را تشکیل می‌دهد. مزیت این روش در مقایسه با روش‌های آزمایشگاهی این است که مراحل هضمی آن در داخل شکمبه دام زنده انجام می‌شود (Stern et al., 1997). اما باید توجه داشت که استفاده از این تکنیک برای تخمین تجزیه‌پذیری به دلیل مشکلاتی نظیر نیاز به جراحی حیوان، مراقبت از حیوان و به طور کلی وقت‌گیر، پرهزینه بودن انجام آزمایش، در تمامی شرایط قابل اجرا نمی‌باشد (Noziere & Michalet- Doreau, 2000; Ørskov, 2000). به همین دلیل استفاده از روش دیگری جهت تخمین توان فلور میکروبی شکمبه در تجزیه مواد مغذی ماده خوراکی که ضمن سادگی و کم‌هزینه بودن، از تکرار پذیری و دقت بالایی برخوردار بوده و بتوان آن را در شرایط آزمایشگاهی اجرا نمود، حائز اهمیت می‌باشد. تکنیک تولید گاز توسط Menke et al. (1979) جهت پیش‌بینی قابلیت هضم به روش حیوان زنده (برون‌تنی) معرفی گردید. روش منکی تکنیکی مناسب جهت برآورد قابلیت هضم و تجزیه‌پذیری است، چرا که در مورد دینامیک تخمیرات بخش‌های مختلف محلول و غیرمحلول علوفه اطلاعات منحصر به فردی را فراهم می‌آورد. همبستگی بالایی بین گاز تولیدی و ناپدید شدن دیواره سلولی ($r^2 = 0/99$) و ماده خشک ($r^2 = 0/95$) گزارش شده است (Prasad, 1994).

با توجه به تغییرات ترکیبات شیمیایی و ارزش غذایی شبدر در مراحل مختلف رشد، آگاهی از چگونگی این تغییرات و دستیابی به زمانی که طی آن گیاه از کیفیت و کمیت بالاتری برخوردار باشد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به این منظور این تحقیق در شرایط اقلیمی همدان برای مشخص نمودن تغییرات تجزیه‌پذیری و تولید گاز شبدر ایرانی در مراحل مختلف

معادله زیر انجام گردید:

$$P=a+b(1-e^{-ct})$$

که در این معادله P = درصد تجزیه‌پذیری در زمان t ، a = عرض از مبدأ در زمان صفر و نشان‌دهنده مواد محلول، b = مواد نامحلول قابل تجزیه، c = نرخ سرعت تجزیه‌پذیری بخش b در زمان t و t = زمان انکوباسیون می‌باشد. اطلاعات حاصل از این آزمایش به ترتیب برای ماده خشک، به دلیل قرار داشتن دو کیسه در هر تکرار (شکمبه دام فیستولادار) و پروتئین خام در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چند نمونه و بلوک‌های کامل تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مدل‌های زیر برای تجزیه و تحلیل نتایج حاصله به همان ترتیب ذکر شده به کار برده شدند.

$$Y_{ijk}=\mu+T_i+R_j+e_{ijk}+\varepsilon_{ijk}$$

در این مدل Y_{ijk} = مقدار هر مشاهده، μ = میانگین مشاهدات، T_i = اثر مرحله رشد، R_j = اثر حیوان زام، و e_{ijk} = خطای آزمایشی و ε_{ijk} اشتباه نمونه‌برداری می‌باشد.

$$Y_{ijkl}=\mu+T_i+R_j+e_{ijk}$$

که Y_{ijk} = مقدار هر مشاهده، μ = میانگین مشاهدات، T_i = اثر مرحله رشد، R_j = اثر حیوان زام، e_{ijk} = خطای آزمایشی می‌باشد.

اندازه‌گیری تولید گاز در شرایط آزمایشگاه: به منظور اندازه‌گیری تولید گاز از روش Fedorak & Hurdy (1983) استفاده شد. در روش مذکور میزان جابجائی مایع داخل لوله آزمایشی مدرج، معرف میزان گاز تولیدی در نظر گرفته می‌شود. ۳۰ میلی گرم از هر نمونه خوراک آسیاب شده با استفاده از الک ۲ میلی‌متری در داخل شیشه‌های ۵۰ میلی‌لیتری استریل ریخته و برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد. شیره شکمبه را حدود ۲ ساعت بعد از وعده خوراک صبحگاهی از گوسفندان فیستولاگذاری شده که با جیره‌های متشکل از شبدر ایرانی به مدت یک ماه تغذیه شده بودند، جمع‌آوری، صاف، و در فلاسک محتوی گازکربنیک سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. مایع شکمبه و بافر تهیه شده طبق روش مکدونال به نسبت ۱ به ۲ (یک قسمت از مایع شکمبه و دو قسمت بافر)

مخلوط و به داخل لوله‌های آزمایشی ریخته شد. در مرحله بعدی به هر شیشه حاوی نمونه خوراک مورد آزمایش، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر افزوده و پس از تزریق گازکربنیک و بی‌هوای نمودن محیط داخل شیشه درب آنها با استفاده از درپوش پلاستیکی و پرس فلزی، بسته شد. برای تصحیح گاز تولیدی با منشاء مایع شکمبه ۳ تکرار شاهد در نظر گرفته شدند. کل شیشه‌ها جهت اندازه‌گیری گاز تولیدی به داخل دستگاه انکوباتور شیکر در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰ دور بر دقیقه منتقل شدند و سپس میزان گاز تولیدی به روش فدوراک (جابجایی مایع) در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۵، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت قرائت و ثبت گردید. حجم گاز تولیدی در هر زمان بر اساس وزن نمونه ماده خوراکی توسط رابطه $V=(V_t-V_b) \times 100/W$ تصحیح گردید. در این رابطه V حجم گاز تصحیح شده بر حسب میلی‌لیتر به ازای هر گرم ماده خشک، V_t حجم گاز تولیدی در شیشه‌های حاوی نمونه ماده خوراکی بر حسب میلی‌لیتر، V_b حجم گاز تولید شده در شیشه‌های فاقد نمونه بر حسب میلی‌لیتر و W وزن نمونه بر حسب میلی‌گرم ماده خشک است.

داده‌های تولید گاز با استفاده از مدل $y=b(1-e^{-ct})$ برازش گردیدند (Ørskov and McDonald., 1979). در معادله مذکور b گاز تولید شده از بخش غیر قابل حل در آب (ml/g OM)، a پتانسیل تولید گاز کل (ml/g OM) و c سرعت تخمیر (h^{-1}) است. انرژی قابل متابولیسم (ME) و درصد قابلیت هضم ماده آلی (OMD) خوراکی‌ها با استفاده از معادلات ارائه شده توسط Menke et al. (1979) محاسبه شد. میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$SCFA \text{ (mmol)} = 0.0222 GP - 0.0425$$

$$ME \text{ (MJ/kg DM)} = 2/2 + 0.135YG + 0.005YCP + 0.0002859CP^2$$

$$OMD \text{ (g/100 g DM)} = 14/88 + 0.889GP$$

$$+ 0.45CP + 0.651XA$$

در این معادلات Gp تولید گاز مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه خوراک پس از ۲۴ ساعت، CP مقدار پروتئین خام

(g/100 g DM) و XA مقدار خاکستر (g/100 g DM)

بود ($P < 0.05$).

می‌باشد.

اطلاعات حاصله در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در تمامی موارد مقایسه میانگین‌ها با روش دانکن و فرض خطای کمتر از ۰/۰۵، با روش GLM و با استفاده از نرم‌افزار SAS ویرایش ۹ سال ۲۰۰۴، انجام گردید. مدل تجزیه واریانس به کار رفته به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در این مدل Y_{ij} = مشاهدات مربوط به فراسنجه‌های تولید گاز، μ = میانگین به دست آمده برای مشاهدات، T_i = اثر تیمار (مرحله رشد)، e_{ij} = خطای آزمایشی می‌باشد.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی: ترکیب شیمیایی نمونه‌های برداشت شده در مراحل مختلف رشد در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. چنانکه نتایج نشان می‌دهد، با افزایش مرحله رشد فقط افزایش معنی‌داری در درصد ماده خشک ساقه مشاهده شد. با این حال درصد ماده خشک بوته در مرحله گلدهی کامل بیشترین و در مرحله اول کمترین مقدار را به لحاظ عددی دارا می‌باشد، که با گزارش Rezaye (2005) در مورد اسپرس در یونجه مطابقت دارد.

بیشترین مقدار پروتئین خام و کمترین درصد NDF بوته مربوط به مرحله رشد اول، اما کمترین مقدار پروتئین و بیشترین مقدار NDF مربوط به گلدهی کامل است، که در هر دو مورد تفاوت موجود بین سه مرحله رشد ابتدائی با گلدهی کامل به لحاظ آماری معنی‌دار

روند مشابهی نیز در مورد محتوی CP و NDF ساقه و برگ مشاهده می‌گردد. در مورد محتوی چربی خام و N.F.C نیز به ترتیب بیشترین مقدار مربوط به مرحله اول رشد و کمترین آن مربوط به گلدهی کامل می‌باشد ($P < 0.05$). تفاوت درصد ماده آلی بوته بین دو مرحله اول و آخر معنی‌دار بود ($P < 0.05$). بنابراین کاهش در محتوی مواد مغذی و ارزش غذایی علوفه مورد بررسی در مرحله گلدهی کامل حائز اهمیت است.

تجزیه‌پذیری به روش کیسه‌های نایلونی: نتایج مربوط به ناپدید شدن ماده خشک نمونه‌ها در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جدول ۳ ارائه گردیده است. بیشترین مقدار ناپدید شدن ماده خشک در ساعت صفر مربوط به مرحله آغاز غنچه‌دهی (۱۲/۳۵ درصد) و کمترین آن مربوط به مرحله گلدهی کامل (۶/۹۴ درصد) بود. روند کاهش تجزیه‌پذیری از آغاز غنچه‌دهی تا گلدهی کامل در تمامی ساعات دیگر انکوباسیون نیز مشاهده شد. حداکثر میزان ناپدید شدن ماده خشک ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون و برابر با ۶۶/۹۸، ۶۵/۶۳، ۵۹/۴۸ و ۵۴/۱۲ درصد به ترتیب برای مراحل چهارگانه نمونه‌برداری بود ($P < 0.05$). دلیل این امر را می‌توان به کاهش غلظت کربوهیدرات‌های قابل تخمیر و دیگر ترکیبات محلول و افزایش نسبت دیواره سلولی بویژه افزایش سهم لیگنین در آن نسبت داد (Ørskov, 2000).

در جدول ۴ مشخصه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک ارائه شده است. بیشترین مقدار a، بخش قابل تخمیر b و c در تیمار اول کمترین مقدار این فراسنجه‌ها در مرحله گلدهی کامل مشاهده گردید. Stockdale (1993b) مواد

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی بوته شبدر در مراحل مختلف برداشت (بر اساس صد در صد ماده خشک)

مرحله رشد	DM	OM	CP	NDF	EE	NFC	Ash
آغاز غنچه‌دهی	۱۱/۱۳ ^a	۸۶/۶۱ ^b	۲۳/۵۴ ^a	۲۹/۶۴ ^b	۳/۳۸ ^a	۳۰/۰۴ ^a	۱۳/۳۸ ^a
غنچه‌دهی کامل	۱۱/۸۳ ^a	۸۷/۵۱ ^{ab}	۲۳/۳۳ ^a	۳۰/۵۹ ^b	۳/۲۲ ^{ab}	۳۰/۳۷ ^a	۱۲/۴۸ ^{ab}
شروع گلدهی	۱۲/۷۶ ^a	۸۶/۷۷ ^{ab}	۲۳/۱۴ ^a	۳۱/۴۸ ^b	۳/۰۵ ^b	۲۸/۱۴ ^b	۱۳/۲۲ ^{ab}
گلدهی کامل	۱۲/۳۷ ^a	۸۷/۶۹ ^a	۲۱/۳۷ ^b	۳۴/۱۶ ^a	۲/۹۸ ^b	۲۷/۸۶ ^b	۱۲/۳۰ ^b
SEM	۰/۳۳۲۰	۰/۱۹۶۵	۰/۱۲۰۶	۰/۱۷۷۱	۰/۰۵۴۷	۰/۲۹۲۸	۰/۱۹۱۴

DM- ماده خشک (درصد)، OM- ماده آلی (درصد)، CP- پروتئین خام (درصد)، NDF- فیبر نامحلول در شوینده خنثی (درصد)، EE- چربی خام (درصد)، NFC- کربوهیدرات غیر فیبری (درصد)، ASH- خاکستر خام (درصد)، SEM- خطای استاندارد میانگین‌ها. حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی ساقه و برگ شبدر در مراحل مختلف برداشت (بر اساس صد در صد ماده خشک)

برگ					ساقه					مرحله رشد
OM	ASH	NDF	CP	DM	OM	ASH	NDF	CP	DM	
۹۰/۳۵ ^a	۹/۶۵ ^a	۲۱/۶۴ ^b	۳۲/۹۲ ^a	۹/۱۵ ^a	۸۵/۲۷ ^a	۱۴/۷۲ ^a	۳۶/۰۱ ^c	۱۵/۲۴ ^a	۹/۲۷ ^c	آغاز گنجه‌دهی
۸۹/۶۱ ^a	۱۰/۳۹ ^a	۲۳/۲۱ ^b	۳۲/۷۷ ^a	۹/۴۳ ^a	۸۵/۵۷ ^a	۱۴/۴۲ ^a	۳۷/۰۳ ^b	۱۴/۳۱ ^a	۱۰/۴۸ ^b	گنجه‌دهی کامل
۸۹/۱۴ ^a	۱۰/۸۶ ^a	۲۵/۲۷ ^a	۳۲/۶۸ ^a	۹/۶۳ ^a	۸۵/۷۸ ^a	۱۴/۲۲ ^a	۳۷/۹۵ ^b	۱۳/۷۲ ^{ab}	۱۰/۶۹ ^{ab}	آغاز گلدهی
۸۸/۳۵ ^a	۱۱/۶۵ ^a	۲۶/۹۷ ^a	۳۰/۸۱ ^b	۱۰/۶۳ ^a	۸۵/۵۳ ^a	۱۴/۴۶ ^a	۳۹/۷۲ ^a	۱۲/۴۰ ^b	۱۲/۳ ^a	گلدهی کامل
۰/۴۹۰۵	۰/۴۹۰۵	۰/۳۸۵۶	۰/۲۰۷۸	۰/۵۸۴۴	۰/۲۲۴۳	۰/۲۲۴۴	۰/۳۸۵۶	۰/۲۷۷۳	۰/۲۴۵۲	SEM

DM- ماده خشک (درصد)، OM- ماده آلی (درصد)، CP- پروتئین خام (درصد)، NDF- فیبر نامحلول در شوینده خنثی، EE- چربی خام (درصد)، NFC- کربوهیدرات غیر فیبری (درصد)، ASH- خاکستر خام (درصد)، SEM- خطای استاندارد میانگین‌ها. حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۳- میانگین تجزیه‌پذیری ماده خشک در زمان‌های انکوباسیون در شکمبه (درصد).

زمان انکوباسیون (ساعت)										تیمارها
۹۶	۷۲	۴۸	۳۶	۲۴	۱۶	۸	۴	۲	صفر	
۶۶/۹۸ ^a	۶۵/۳۰ ^a	۶۳/۸۹ ^a	۵۷/۰۳ ^a	۴۹/۰۱ ^a	۴۲/۶۸ ^a	۳۶/۶۹ ^a	۲۳/۵۵ ^a	۱۹/۱۲ ^a	۱۲/۳۵ ^a	آغاز گنجه‌دهی
۶۵/۶۳ ^a	۶۳/۵۹ ^b	۵۶/۷۳ ^b	۵۵/۶۶ ^a	۴۷/۲۹ ^a	۳۶/۴۰ ^b	۲۵/۰۹ ^{ab}	۲۲/۵۳ ^a	۱۶/۳۸ ^b	۱۱/۲۲ ^b	گنجه‌دهی کامل
۵۹/۴۸ ^b	۵۸/۴۶ ^c	۵۵/۷۴ ^{bc}	۴۸/۷۶ ^b	۴۲/۴۱ ^b	۳۴/۸۲ ^b	۲۱/۱۹ ^b	۱۵/۱۸ ^b	۱۳/۰۱ ^c	۹/۲۶ ^c	آغاز گلدهی
۵۴/۱۲ ^c	۵۳/۷۹ ^d	۵۱/۰۹ ^c	۴۵/۴۸ ^b	۳۷/۷۱ ^c	۲۸/۴۳ ^c	۱۳/۶۸ ^c	۱۱/۷۷ ^c	۱۰/۹۲ ^c	۶/۹۴ ^d	گلدهی کامل
۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۶۳	۰/۰۰۸۵	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۶۲	۰/۰۱۵۱	۰/۰۰۲۱	SEM

حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۴- میانگین تجزیه‌پذیری مؤثر ماده خشک (درصد)

RSD ^a	ED ^b	c ^c	b ^c	a ¹	مرحله رشد
۲/۱۲	۵۱/۲	۰/۰۴۴۷	۵۵/۴۵	۱۲/۸۴	آغاز گنجه‌دهی
۱/۷۸	۴۸/۵	۰/۰۴۰۵	۵۴/۵۷	۱۱/۹۴	گنجه‌دهی کامل
۱/۳۱	۴۴/۱	۰/۰۴۲۰	۵۳/۱۰	۸/۰۹	آغاز گلدهی
۲/۵۷	۳۹/۴	۰/۰۳۸۴	۵۲/۱۴	۵/۰۸	گلدهی کامل

۱- a = مواد محلول در زمان صفر. ۲- b = مواد غیر محلول قابل تخمیر. ۳- c = ضریب تجزیه‌پذیری بخش b در زمان t (h⁻¹). ۴- ED = تجزیه‌پذیری مؤثر (میزان عبور در ساعت ۲). ۵- t = انحراف معیار باقیمانده خطا در حیواناتی که در سطح نگهداری تغذیه شده‌اند، با t = ۰/۰۲.

بلوغ گیاه مقادیر تجزیه‌پذیری مؤثر کاهش خواهد یافت، زیرا با افزایش غلظت N.D.F، و قابلیت هضم آن و محتویات سلولی کاهش می‌یابد و نیز غلظت بالای دیواره سلولی مانع از شکسته شدن آن و در نتیجه سبب کاهش نفوذ میکروبی می‌گردد.

با توجه به نتایج بدست آمده (جدول ۵)، روند ناپدید شدن پروتئین خام در تمامی ساعات انکوباسیون در آغاز گنجه‌دهی بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد و کمترین آنها در مرحله پایانی رشد مشاهده گردید (P < ۰/۰۵).

در جدول ۶ فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری و تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام گزارش شده است. افزایش سن گیاه و نزدیک شدن به بلوغ کامل سبب

محلول در مراحل مختلف رشد شبدر را بیشتر از یافته‌های آزمایش حاضر گزارش نمود، ولی مقادیر مواد قابل تخمیر و ضریب ثابت تجزیه‌پذیری در تحقیق مذکور با تحقیق حاضر تطابق دارد. تفاوت‌های موجود می‌تواند به علت تفاوت آب و هوا، مرحله رشد، فصل، نسبت برگ به ساقه، دمای محیط و سطوح قابل دسترس میکروب‌های شکمبه باشد که مورد آخر بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

Goblentz & Coffey (2000) بیان نمودند که نرخ تجزیه‌پذیری و ارزش غذایی گیاه در سنین پائین، بالاتر می‌باشد، اما با ورود به مرحله گلدهی و دانه بستن، کیفیت علوفه و تجزیه‌پذیری آن کاهش می‌یابد. Southworth et al. (1996) گزارش کردند که با افزایش

محدودیت دسترسی باکتری‌ها به محتویات درون سلول شده که موجب کاهش در میزان تجزیه‌پذیری پروتئین خام گیاه می‌گردد. کاهش مقادیر c یا ضریب ثابت تجزیه‌پذیری بخش b نیز، با وجود تغییرات اندک پروتئین قابل تخمیر، می‌تواند موجب کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین در مراحل رشد پایانی نسبت به

جدول ۵- میانگین درصد تجزیه‌پذیری پروتئین خام در زمان‌های انکوباسیون در شکمبه

تیمارها	زمان انکوباسیون (ساعت)									
	صفر	۲	۴	۸	۱۶	۲۴	۳۶	۴۸	۷۲	۹۶
آغاز گنجه‌دهی	۱۱/۸۹ ^a	۱۵/۰۴ ^a	۱۸/۳۷ ^a	۳۰/۰۳ ^a	۴۱/۵۹ ^a	۶۱/۶۳ ^a	۷۰/۸۶ ^a	۷۳/۷۹ ^a	۷۸/۲۳ ^a	۸۲/۲۳ ^a
گنجه‌دهی کامل	۱۰/۲۳ ^{ab}	۱۲/۸۰ ^{ab}	۱۶/۰۸ ^{ab}	۲۰/۵۸ ^b	۴۰/۰۷ ^a	۵۰/۸۳ ^{ab}	۶۸/۱۱ ^a	۷۲/۹۱ ^a	۷۷/۷۳ ^a	۷۸/۶۸ ^a
آغاز گلدهی	۹/۳۲ ^{bc}	۱۰/۵۹ ^b	۱۵/۰۷ ^{ab}	۱۶/۸۲ ^b	۲۴/۰۷ ^b	۴۳/۸۰ ^{ab}	۵۵/۹۶ ^{ab}	۶۴/۵۴ ^{ab}	۶۹/۰۶ ^b	۷۰/۴۲ ^b
گلدهی کامل	۸/۱۸ ^c	۱۰/۵۱ ^b	۱۴/۱۱ ^b	۱۵/۸۵ ^b	۲۱/۵۴ ^b	۳۳/۵۲ ^b	۴۴/۰۵ ^b	۵۴/۹۲ ^b	۶۲/۳۶ ^b	۶۳/۸۸ ^c
SEM	۰/۰۱۵۱	۰/۰۱۹۵	۰/۰۹۶۸	۰/۰۰۱۷	۰/۰۱۲۵	۰/۰۶۵۳	۰/۰۲۱۷	۰/۰۵۴۶	۰/۰۰۴۷	۰/۰۰۱۱

حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۶- میانگین فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری و مؤثر پروتئین خام

مرحله رشد	a ^۱	b ^۲	c ^۳	ED ^۴	RSD ^۵
آغاز گنجه‌دهی	۸/۹۱	۷۴/۳۸	۰/۰۴۳۸	۶۰/۰	۳/۱۵
گنجه‌دهی کامل	۶/۴۴	۷۶/۹۴	۰/۰۳۷۳	۵۶/۵	۳/۵۱
آغاز گلدهی	۵/۸۷	۷۲/۲۴	۰/۰۲۸۸	۴۸/۵	۴/۵۹
گلدهی کامل	۶/۸۰	۶۸/۷۷	۰/۰۲۱۲	۴۲/۲	۲/۹۹

۱- بخش محلول در زمان صفر. ۲- بخش غیرمحلول قابل تخمیر. ۳- تجزیه‌پذیری بخش b در زمان t (h⁻¹). ۴- تجزیه‌پذیری مؤثر (میزان عبور در ساعت %۲، t = %۲). ۵- انحراف معیار باقیمانده خطا.

همزمان با افزایش مرحله رشد کاهش معنی‌داری در کلیه فراسنجه‌های مورد بررسی مشاهده شد و برعکس نرخ ثابت تولید گاز (C) در مراحل فوق‌الذکر به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار را دارا بود، که تنها تفاوت موجود بین مراحل رشد ابتدایی با گلدهی کامل معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

در تحقیق حاضر با افزایش سن گیاه و نزدیک شدن آن به بلوغ از مقادیر گاز تولیدی کاسته شده است (P<۰/۰۵) Mansury (2003) نیز در مورد گاز تولیدی یونجه نتایج مشابهی را گزارش نموده‌اند. کاهش در میزان گاز تولیدی با افزایش مرحله رشد را می‌توان مربوط به افزایش در سهم کربوهیدرات‌های ساختمانی و

مراحل آغازین رشد شود (Ørskov, 2000).
تولید گاز: مقادیر گاز تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون در جدول ۷ ارائه شده است. همانطور که در نتایج ارائه شده در این جدول مشاهده می‌شود، تفاوت بین تیمارهای مختلف به لحاظ مقدار گاز تولیدی در اغلب ساعات انکوباسیون به لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در مجموع میزان گاز تولیدی در مرحله آغاز گنجه‌دهی از همه زمان‌های انکوباسیون بیشترین و در گلدهی کامل کمترین مقدار را دارا بود. در جدول ۸ نیز مقادیر پتانسیل تولید گاز (b)، قابلیت هضم ماده آلی (OMD)، ماده آلی قابل هضم در ماده خشک (DOMD) و انرژی قابل متابولیسم (ME) ارائه گردیده است.

جدول ۷- مقادیر گاز تولیدی مراحل مختلف رشد شبدر ایرانی (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک)

مرحله رشد	زمان انکوباسیون (ساعت)									
	۲	۴	۸	۱۲	۱۶	۲۴	۳۶	۴۸	۷۲	۹۶
آغاز گنجه‌دهی	۱۶/۱۵ ^a	۸۲/۲۴ ^a	۱۳۴/۳۹ ^a	۱۶۸/۴۸ ^a	۱۹۲/۹۹ ^a	۲۲۸/۷۶ ^a	۲۴۸/۰۷ ^a	۲۵۶/۸۶ ^a	۲۶۵/۲۵ ^a	۲۷۸/۸۴ ^a
گنجه‌دهی کامل	۱۵/۸۲ ^a	۷۴/۲۵ ^a	۱۲۲/۷۳ ^{ab}	۱۵۸/۵۰ ^a	۱۸۱/۶۷ ^a	۲۱۰/۷۷ ^{ab}	۲۳۱/۰۹ ^{ab}	۲۴۰/۵۴ ^{ab}	۲۵۳/۹۳ ^{ab}	۲۶۷/۸۵ ^{ab}
آغاز گلدهی	۱۵/۴۱ ^a	۶۳/۲۶	۱۱۷/۰۷ ^{ab}	۱۴۳/۱۸ ^{ab}	۱۵۷/۳۶ ^{ab}	۱۷۷/۱۴ ^b	۱۹۴/۴۶ ^b	۲۰۲/۹۱ ^b	۲۱۱/۶۴ ^b	۲۲۲/۸۹ ^b
گلدهی کامل	۱۳/۱۵ ^a	۶۲/۹۳ ^a	۹۹/۴۲ ^b	۱۰۹/۵۳ ^b	۱۱۶/۰۵ ^b	۱۲۱/۳۳ ^c	۱۳۶/۴۸ ^c	۱۴۳/۹۴ ^c	۱۴۸/۶۶ ^c	۱۶۱/۲۵ ^c
SEM	۰/۳۹۹۲	۰/۲۳۷۸	۲/۸۷۹۹	۴/۱۸۳۵	۴/۵۷۷۳	۳/۵۹۲۳	۳/۵۴۲۱	۴/۲۲۷۷	۳/۹۲۱۶	۴/۰۶۲۵

حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

آزمایش دوم ماده خشک با قابلیت بالقوه تولید گاز (b) هیچ گونه تصحیحی برای اثر قندهای محلول در تولید گاز صورت نگرفته است، اما با این حال به دلیل افزایش قابل ملاحظه در محتوای N.D.F موجود در ساختار گیاه می‌توان وجود تفاوت معنی‌دار در میزان گاز تولیدی بین مراحل مختلف رشد را مشاهده نمود. همانطور که در جدول مربوطه مشاهده می‌شود با افزایش سن گیاه از آغاز گلدهی به گلدهی کامل کاهش معنی‌داری نیز در پارامترهای تولید گاز از جمله مقدار پتانسیل تولید گاز (b) و همچنین قابلیت هضم ماده آلی و محتوای انرژی قابل متابولیسم مراحل مختلف رشد رخ می‌دهد (Blummel & Orskov, 1993; Mitchell et al., 1997).

در جدول ۹ معادلات تابعیت و ضرایب تبیین بین دو روش مورد استفاده در تحقیق حاضر جهت برآورد همبستگی بین دو متد به تفکیک ماده خشک و پروتئین خام ارائه گردیده است. وجود ضریب تبیین بالا بین تولید گاز و تجزیه‌پذیری ماده خشک با نتایج Khazaal et al. (1993) و Blummel & Orskov (1993) مطابقت دارد. همچنین نمودار تابعیت ناپدیدگی ماده خشک و گاز تولیدی در زیر ارائه شده است (شکل‌های ۱ تا ۴).

محتوی N.D.F که بخش عمده آن مربوط به افزایش در سهم محتوی لیگنین موجود در گیاه، که در لگوم‌ها عمدتاً از نوع لیگنین هسته‌ای^۱ است، و کاهش در محتوی N.F.C آن دانست (Van Soest, 1994; Mertens, 1994). همچنین مقدار ماده آلی قابل هضم و انرژی قابل متابولیسم محاسبه شده از روی مقادیر گاز تولیدی نیز در جدول مذکور ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود مقدار ماده آلی قابل هضم و انرژی قابل متابولیسم نیز از الگوی حاکم بر گاز تولیدی تبعیت می‌کنند که تائیدی بر نکات فوق‌الذکر می‌باشد (NRC, 2001).

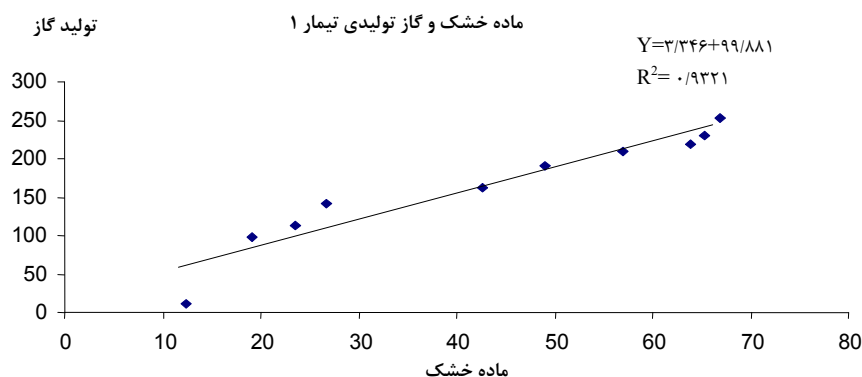
در مقایسه نتایج حاصل از دو روش کیسه‌های نایلونی و تولید گاز مشاهده می‌شود که، در روش اول مقدار ناپدیدگی و تجزیه‌پذیری مرحله رشد اول به طور معنی‌داری بیش از مرحله دوم رشد می‌باشد که دلیل این امر تصحیح نتایج حاصل برای محتوی مواد محلول (a) در زمان صفر می‌باشد، که در نتیجه روند حاکم بر تجزیه اجزای دیواره سلولی (b) بدون تأثیر قندهای محلول محاسبه شده است. اما در مورد نتایج حاصل از

1. Core lignin

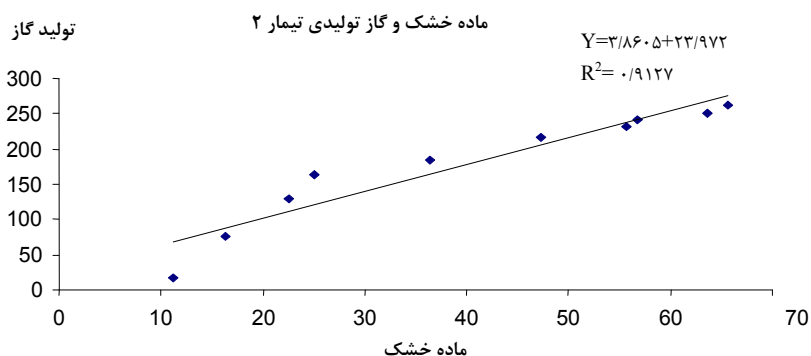
جدول ۸- پارامترهای تولید گاز در مراحل مختلف رشد شبدر ایرانی

پارامترهای تولید گاز							مرحله رشد
SCFA ^y	ME ^f	DOMD ^d	OMD ^f	L ^r	C ^r	b ¹	
۵/۰۷۴ ^a	۳۳/۳۴۰ ^a	۱۸۷۹۵ ^a	۲۱۹/۹۷ ^a	۰/۶۰۰۱ ^a	۰/۰۸۵۷ ^b	۲۶۴/۸۰ ^a	آغاز غنچه‌دهی
۴/۶۷۴ ^{ab}	۳۰/۸۹۱ ^{ab}	۱۷۵۰۸ ^{ab}	۲۰۳/۸۹ ^{ab}	۰/۶۳۵۵ ^a	۰/۸۹۶۰ ^b	۲۵۲/۲۵ ^{ab}	غنچه‌دهی کامل
۳/۹۲۸ ^b	۲۶/۳۲۵ ^b	۱۴۸۸۷ ^b	۱۷۳/۹۹ ^b	۰/۷۰۱۲ ^a	۰/۱۰۲۴ ^b	۲۰۸/۲۵ ^b	آغاز گلدهی
۲/۶۸۹ ^c	۱۸/۷۳۹ ^c	۱۰۶۷۳ ^c	۱۲۴/۲۵ ^c	۰/۶۱۵۰ ^a	۰/۱۴۷۹ ^a	۱۴۲/۶۵ ^c	گلدهی کامل
۰/۰۷۹۷	۰/۴۸۷۸	۲۵۹/۶۷	۳/۲۰۴	۰/۰۲۱۰	۰/۰۲۳۴	۴۵/۰۴۸	SEM

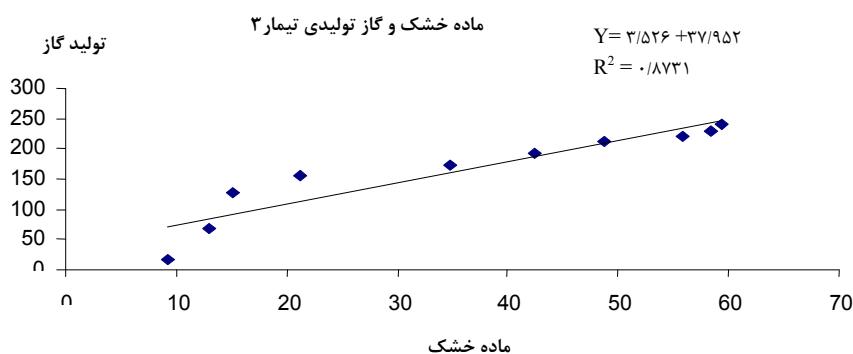
۱- پتانسیل تولید گاز (b)، ۲- سرعت تولید گاز (c) ۳- فاز تاخیر (h) ۴- قابلیت هضم ماده آلی (گرم در کیلوگرم DM) ۵- ماده آلی قابل هضم در ماده خشک (گرم در کیلوگرم DM) ۶- انرژی قابل متابولیسم (MJ/kg DM) ۷- اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول).
حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.



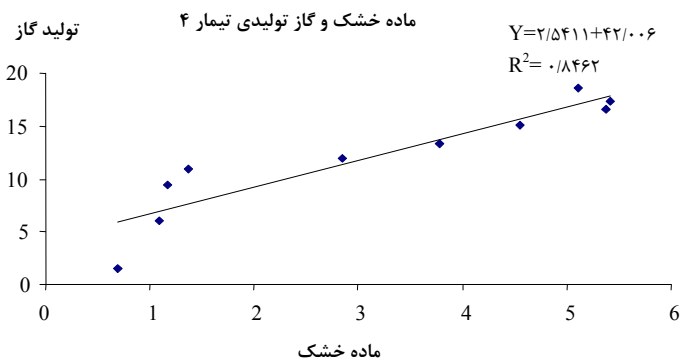
شکل ۱- رابطه گاز تولیدی و ناپدیدگی ماده خشک شبدر در مرحله آغاز غنچه‌دهی



شکل ۲- رابطه گاز تولیدی و ناپدیدی ماده خشک شبدر در مرحله غنچه‌دهی کامل



شکل ۳- رابطه گاز تولیدی و ناپدیدی ماده خشک شبدر در مرحله آغاز گلدهی



شکل ۴- رابطه گاز تولیدی + ناپدیدی ماده خشک شبدر در مرحله گلدهی کامل

جدول ۹- معادلات تابعیت و ضرایب تبیین بین دو روش کیسه‌های نایلونی و تولید گاز برای ماده خشک و پروتئین خام

مرحله رشد	ماده خشک		پروتئین خام	
	معادله رگرسیون	ضریب تبیین	معادله رگرسیون	ضریب تبیین
آغاز غنچه‌دهی	$Y = 3/346X + 99/881$	$R^2 = 0.9321$	$Y = 2/60.9X + 34/208$	$R^2 = 0.8796$
غنچه‌دهی کامل	$Y = 3/860.5X + 23/972$	$R^2 = 0.9127$	$Y = 2/180.1X + 56/458$	$R^2 = 0.8601$
آغاز گلدهی	$Y = 3/526X + 37/952$	$R^2 = 0.8731$	$Y = 2/527X + 67/084$	$R^2 = 0.7699$
گلدهی کامل	$Y = 2/5411X + 42/0.6$	$R^2 = 0.8462$	$Y = 2/20.33X + 48/926$	$R^2 = 0.8016$

Y = متغیر وابسته، X = متغیر مستقل.

نتیجه‌گیری کلی

می‌باشد که، فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری و تولید گاز و همچنین ارزش انرژی‌زایی شبدر با پیشرفت مرحله رشد کاهش یافت، ولی اختلاف بین مراحل رشد به صورتی بود که مرحله رشد آغاز گلدهی نتایج مطلوب‌تری را از نظر فراسنجه‌های فوق‌الذکر نشان داد.

با توجه به تغییر در ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی شبدر در مراحل مختلف رشد آگاهی از چگونگی این تغییرات و دستیابی به زمانی که این گیاه دارای بهترین کیفیت باشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، که نتایج تحقیق حاضر گویای این مطلب

REFERENCES

1. Abasi, M. R. & Zamanian, M. (2005). Investigation yield potential and main adjective in performance and partition genetic source of several offset Persian clover. *First congress herbage plants*, Agriculture Cartilage and natural resources, Tehran University.
2. AOAC. (1990). *Official method of analysis*. (15th ed.). Association of Official Analytical Chemist. Arlington, VA.
3. Blummel, M. & Orskov, E. (1993). *Composition of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting food in take in cattle*. *Animal Feed Science and Technology*, 40, 109-119.
4. Fedorak, P. M. & Hurdy, D. E. (1983). A Simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ Technol Leu*, 4, 425-432.
5. Goblentz, W. K. & Coffey, K. P. (2000). Effect of maturity on degradation kinetics of sod-seeded cereal grain forage grown in northern Arkansas. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2499-2511.
6. INRA. (1987). *Alimentation des ruminants ed*. INRA Publications (Route de saint-cyr). 78000 Versquille.
7. Khazaal, K., Markantonatos, X., Nastis, A. & ØRSKOV, E. R. (1993). Changes with maturity in fi ber composition and levels of extractable polyphenols in Greek browse: effects on in vitro gas production and in sacco dry matter degradation. *Journal of Science of Food Agriculture*, 63, 237-244.
8. Lacy, J., Dear, B. & Sandrl, G. (2003). *Persian Clover*. New South Wales Governments Portal. Pp: 1-9.
9. Mahdavi, A. & Nikkha, A. (2005). Using methods of gas production and regression equation in predication nutrient value of feed in feeding animal. *First congress herbage plants*, 2005, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran. (In Farsi).
10. Mansouri, H., Nikkha, A., Rezaeian, M., Moradi, M. & Mirhadi, S. A. (2003). Determination of forage degradation and gas production technique using nylon bags. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 34(2), 495-507. (In Farsi).
11. McLaren, D. J. & Doyle, P. T. (1988). Utilization of clover diets by sheep. 1. Intake and digestion of organic matter and cell Wall constituents. *Australian Journal of Agricultural Research*, 39, 871-880.
12. Menke, K. H., Rabb, L., Saleweski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schinder, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science*, 93, 217-222.
13. Mertens, D. R. (1994). Regulation of forage intake. In: *Forage Quality, Evaluation and Utilization*. G.C. Fahey Jr., ed. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. pp 450-493.
14. Mitchell, R. B., Redfearn, D. D. & Moser, L. E. (1997) Relationship between in situ protein degradability and grass developmental morphology. *Journal of Dairy Science*, 80, 1143-1149.
15. Noziere, P. & Michalet-Doreau, B. (2000). In sacco methods. In: J. P. F. D'Mello (Ed.), *Farm animal metabolism and nutrition*. CAB International, Wallingford, pp. 233-254.
16. NRC. (2001). *Nutrient requirments of sheep*. (6th ed.). Natl. Acad. Sci., Washington DC.
17. Ørskov, E. R. I. & McDonald, I. M. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from in rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, (Cambridge). 92, 499-503.
18. Ørskov, E. R. I. (2000). The in situ technique for the estimation of forage degradability. In: Givens, D. I., et al. (Eds), *Forage evaluation in ruminant nutrition*. (Pp. 175-188). CABI Publishing, Wallingford, UK.
19. Prasad, C. S., Wood, C. D. & Sampath, K. T. (1994). Use of in vitro gas production to evaluate rumen fermentation of untreated and treated finger millet strow (Eleusine coracana) supplemented with diffrent levels of concentrate. *J Sci Food Agric*, 65, 457-464.
20. Rezaei, A. (2005). *Investigation effect of different growth stages and offsets on characters cultivations, chemical component and nutrition value of Onebrychis vicifolia*. M. Sc. thesis, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan. (In Farsi).
21. Southworth, J. E., Gilman, K. M., Raeside, A. J., Wilkinson, R. G., Sinclair, L. A., Sileshi, Z., Owen, E., Dhanoa, M. S. & Theodorou, M. K. (1996). Prediction of in situ rumen dry matter disappearance of

- Ethiopian forages from an in vitro gas production technique using a pressure transducer, chemical analyser and in vitro digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 61, 73-87.
22. Stern, M. D., Bach, A. & Calsamiglia, S. (1997). Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *Journal of Animal Science*, 75, 2256-2276.
 23. Stockdale, C. R. (1993_a). The nutritive value of Persian clover (*Trifolium resupinatum*) herbage grown under irrigation in northern victoria. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44, 1557-1576.
 24. Stockdale, C. R. (1993_b). The influence of herbage water consumption on the nutritive value of Persian clover for dairy cows and sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44, 1577-1589.
 25. Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. (2nd ed.). Cornell University Press, Ithaca, NY.