Chemical composition, digestibility and *in vitro* fermentation variables of mixed silage from different levels of Paulownia leaves and forage corn

Ayoob Azizi

Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University
*Corresponding author: azizi.ay@lu.ac.ir; azizi.msc.modares@gmail.com

Introduction: The dried climate and water lack in most areas of Iran caused to serious restriction in planting fodder. Therefore, it is very important to find new fodder sources to feed ruminants in order to reduce the ration costs. One of the new sources of fodder that may have a favorable nutritional value are plants of the *Paulowniaceae* family in China, East Asia and some parts of Iran. Several types of paulownia are known in the world. These plants are known for their high growth rate and intense photosynthesis, which are specific to C_4 plants, and with wide leaves with a diameter of about 90 cm. The commercial production of Paulownia wood produces a large mass of leaves, which are usually used as natural fertilizers. At the age of about 6 to 8 years, the production leaf of each Paulownia tree reaches about 100 kg. When the leaves have a favorable nutritional value, they can be used as fodder in feeding ruminants. In Iran, there has been no study on the nutritional value of paulownia leaves for use in animal feed. Therefore, the aim of this research was to investigate the chemical composition of paulownia leaves and the chemical composition, gas production parameters, digestion and fermentation characteristics of the silages from the mixture of different levels of paulownia leaves (Tebjoo hybrid variety) and fodder corn *in vitro*.
Material and Methods: The corn forage and paulownia leaves (Tebjoo hybrid variety) were prepared. At first, the chemical composition of corn forage and Paulonia leaf samples was determined based on the conventional methods. Then, both forages were chopped into 2-4 cm sizes using a hand chopper for silage preparation. Experimental treatments included silages containing different ratios of fodder corn and Paulownia leaves (0:100, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100). The materials were compacted in the plastic containers and the silage period lasted 60 days. Determining the chemical composition of fresh fodders and the nutritional value of experimental silages including chemical composition, in vitro gas production and fermentation parameters, digestibility and enzyme activity were carried out based on a completely random design.
Results and Discussion: Results indicated that dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), ether extract (EE), lignin, non-fibrer carbohydrates (NFC) and water soluble carbohydrates content of fresh paulownia leaves were 266, 911, 173, 402, 201, 35.5, 86.4, 404 and 91.2 g/kg DM, respectively. The mentioned chemical composition in paulownia silage were 273, 902, 164, 393, 191, 38.8, 74.5, 386 and 25.4 g/kg DM, respectively. With increasing the proportion of paulownia leaf in silage, DM, CP, lignin, EE, ammonia nitrogen concentration increased linearly ($P<0.05$). However, OM, NDF and ADF decreased linearly ($P<0.05$). By increasing the ratio of paulownia leaf to corn in th silage, *in vitro* gas production (GP) in 24, 36 and 48 h, GP potential (coefficient b) and short-chain volatile fatty acids concentration decreased linearly ($P<0.05$), although it linearly increased ammonia nitrogen concentration and microbial protein synthesis ($P<0.05$). The carboxymethyl cellulase and filter paper degrading

activities decreased linearly with increasing the inclusion level of paulownia leaf in silage (P<0.05). However, ruminal alpha-amylase and protease activity showed a linear increase (P<0.05).
Conclusion: The present study showed that the paulownia leaf of Tebjoo hybrid variety has a favorable nutritional value as a new forage source in animal nutrition. Also, the preparation of silages including different ratio of paulownia leaves and corn is recommended for animal feeding in the conditions of significant shortage of protein resources in the country. Future research is warranted to investigate how paulownia leaf affect ruminant performance.
Keywords: Paulownia leaf, Chemical composition, corn forage, silage, Fermentation parametes, Digestibility.

تعیین ترکیب شیمیایی، قابلیت هضم و متغیرهای تخمیر برون‌تنی سیلاژ حاصل از مخلوط سطوح مختلف برگ پالونیا و ذرت علوفه‌ای

ایوب عزیزی*

دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

*ایمیل نویسنده مسئول: azizi.ay@lu.ac.ir;azizi.msc.modares@gmail.com

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر تعیین ارزش غذایی برگ پالونیا و سپس تعیین ترکیب شیمیایی، تولید گاز، هضم‌پذیری و فراسنجه‌های تخمیر برون‌تنی سیلاژ مخلوط سطوح مختلف برگ پالونیا و ذرت علوفه‌ای در شرایط برون‌تنی بود. تیمارهای آزمایشی شامل سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیا (۱۰۰:۰، ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۲۵:۷۵ و ۰:۱۰۰) بود. نتایج نشان داد که محتوای مادهٔ خشک، مادهٔ آلی، پروتئین خام، الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی (NDF)، الیاف نامحلول در شویندهٔ اسیدی (ADF)، عصارهٔ اتری، لیگنین، کربوهیدارت‌های غیبر فیبری (NFC) و کربوهیدرات‌های محلول برگ پالونیای تازه به ترتیب برابر ۲۶۶، ۹۱۱، ۱۷۳، ۴۰۲، ۲۰۱، ۳۵/۵، ۸۶/۴، ۳۰۱ و ۹۱/۲ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک بود. ترکیبات مذکور در سیلاژ برگ پالونیا به ترتیب برابر ۲۷۳، ۹۰۲، ۱۶۴، ۳۹۳، ۱۹۱، ۳۸/۸، ۷۴/۵، ۳۸۶ و ۲۵/۴ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک به دست آمد. با افزایش نسبت برگ پالونیا و کاهش سهم ذرت علوفه‌ای در سیلاژهای مخلوط، درصد مادهٔ خشک، پروتئین خام، لیگنین، عصارهٔ اتری، NFC و غلظت نیتروژن آمونیاکی سیلاژ به طور خطی افزایش یافت (P<۰/۰۵). اما، درصد مادهٔ آلی، NDF و ADF با افزایش برگ پالونیا کاهش خطی معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵). با افزایش سطح برگ پالونیا در مخلوط سیلویی، تولید گاز برون‌تنی در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، پتانسیل تولید گاز (ضریب b) و غلظت اسیدهای چرب فرار به طور خطی کاهش یافت

(P<۰/۰۵)، هرچند افزایش سطح برگ پالونیا سبب افزایش خطی غلظت نیتروژن آمونیاکی و سنتز پروتئین میکروبی شد (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت تجزیهٔ کاغذ صافی با افزایش سطح برگ پالونیا در سیلاژ به طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵). اما فعالیت آلفا آمیلاز و پروتئاز شکمبه افزایش خطی نشان دادند (P<۰/۰۵). در کل، نتایج تحقیق نشان داد که برگ پالونیا دارای ارزش غذایی مطلوبی جهت استفاده در تغذیهٔ دام به ویژه در شرایط کمبود منابع پروتئینی به عنوان یک منبع علوفه‌ای جدید است. به‌علاوه، سیلو کردن سطوح مختلف برگ پالونیا مخلوط با ذرت علوفه‌ای به عنوان یک روش نگهداری برای آن قابل توصیه است و سبب بهبود محتوای نیتروژن و کربوهیدرات های غیر فیبری سیلاژ نیز می‌شود.

واژه‌های کلیدی: برگ پالونیا، ترکیب شیمیایی، ذرت علوفه‌ای، سیلاژ، فراسنجه‌های تخمیر، گوارش‌پذیری

مقدمه

منابع علوفه‌ای ایران عمدتاً شامل یونجه، ذرت علوفه‌ای و کاه غلات هستند. کمبود منابع آبی از یک طرف و زیاد بودن نیاز آبی اغلب گیاهان علوفه‌ای رایج از طرف دیگر سبب شده است تا تولید علوفهٔ با کیفیت در کشور با محدودیت جدی مواجه شود. همچنین، نوع ارقام مورد استفاده، مدیریت کاشت، داشت و برداشت علوفه و مدیریت نگهداری آن نیز سبب کاهش سطح و کیفیت علوفه تولیدی شده است. بنابراین، یافتن و استفادهٔ بهینهٔ منابع علوفه‌ای جدید به منظور استفاده در تغذیهٔ نشخوارکنندگان، به ویژه اگر سبب کاهش آلودگی‌های زیست محیطی (گازهای گلخانه‌ای) نیز بشود، بسیار مورد توجه است (Huang *et al.*, 2021). یک منبع علوفه‌ای جدید ضمن دارا بودن قابلیت رشد سریع و مقاومت به شرایط گرم و خشک، باید ارزش غذایی مناسبی نیز داشته باشد (Huang *et al.*, 2021). یکی از منابع علوفه‌ای جدید که ممکن است دارای ارزش غذایی مطلوبی باشد گیاهان خانواده پالونیای (*Paulowniaceae*) چینی و آسیای شرقی هستند (Garcia-Morote *et al.*, 2014). چندین گونهٔ پالونیا در دنیا شناخته شده است که مهم‌ترین آن‌ها شامل گونه‌های آلبیفلوا (*P. albiphloea*)، آسترالیس (*P. australis*)، الونگاتا (*P. elongata*)، فارگسی (*P. fargesii*)، فوتونئی (*P. fortunei*)، کاتالبیفولیا (*P. catalpifolia*)، کاواکامی (*P. kawakamii*) و تومنتوسا (*P. tomentosa*) هستند (Yadav *et al.*, 2013; Bodnar *et al.*, 2014). این گیاهان به دلیل سرعت رشد زیاد و فتوسنتز شدیدی که مختص گیاهان C_4 است و برگ‌های پهن با قطر حدود ۹۰ سانتی‌متر شناخته می‌شوند (Icka *et al.*, 2016). از تنهٔ این درختان در صنعت چوب استفاده می‌شود، لذا تولید تجاری چوب پالونیا باعث تولید تودهٔ بسیار زیادی از برگ می‌گردد که معمولاً به عنوان کود طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حدود ۶ تا ۸ سالگی، برگ تولیدی هر درخت پالونیا به حدود ۱۰۰ کیلوگرم می‌رسد. زمانی که برگ‌ها دارای ارزش غذایی مطلوبی هستند، می‌توان از آن‌ها به عنوان علوفه در تغذیهٔ نشخوارکنندگان استفاده نمود. اخیراً در مطالعه‌ای محتوای مادهٔ خشک، مادهٔ آلی، پروتئین خام، عصارهٔ اتری، الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی (NDF)، الیاف نامحلول در شویندهٔ اسیدی (ADF)، کربوهیدرات‌های غیر فیبری (NFC) و نشاسته برگ پالونیا به ترتیب، ۲۷۵، ۸۸۶، ۱۷۵، ۲۴/۴، ۳۴۱، ۲۹۵، ۳۴۵ و ۱۹/۶ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک و محتوای انرژی خام آن ۱۴/۲ مگاژول در کیلوگرم مادهٔ خشک گزارش شد (Huang *et al.*, 2021). از طرفی، برگ‌های پالونیا دارای ترکیبات فنولی و به خصوص اسیدهای فنولی، ساپونین و فلاونوئید هستند که تغذیهٔ آن‌ها به دام ممکن است سبب تعدیل تخمیر شکمبه‌ای و بروز آثار مفیدی مانند بهبود متابولیسم نیتروژن و سنتز پروتئین میکروبی و کاهش تولید گاز متان شود (Huang *et al.*, 2021; Özelçam *et al.*, 2021). با توجه به

کمبود میزان سیلاژ ذرت تولیدی در کشور و نیز معایبی از قبیل زیاد بودن میزان رطوبت (مادهٔ خشک حدود ۲۲–۲۰ درصد) و محتوای کم پروتئین خام، به نظر می‌رسد که می‌توان با استفاده از مخلوطی از ذرت علوفه‌ای و برگ‌های تازهٔ پالونیا، سیلاژی با خصوصیات و ارزش غذایی مطلوبتر تهیه کرده، و بخشی از کمبودهای خوراک دام به خصوص در مزارع کوچک پرورش دام را مرتفع نمود. این نکته را نیز باید مد نظر داشت که زمان برداشت برگ‌های پالونیا در دو ماه اول پاییز هر سال بوده، که این خود همزمان با برداشت ذرت علوفه‌ای در مناطق سردسیر کشور است. کشت و پرورش درخت پالونیا و به خصوص واریته‌های اصلاح شده و هیبرید آن به منظور زراعت چوب در بسیاری از مناطق ایران در حال گسترش است که از منظر تغذیهٔ دام، می‌توان به برگ‌های این درخت به دید ارزش افزوده توجه نمود و آن را در جیرهٔ غذایی دام‌ها گنجاند. دربارهٔ سطح زیر کشت درخت پالونیا در کشور اطلاعات دقیقی در دست نیست، اما کشت این درخت در کشور به طور فزاینده‌ای در حال افزایش است. بر اساس اطلاعات موجود پراکنش آن بیشتر در استان‌های فارس، اصفهان، مازندران، گیلان، گلستان و خراسان شمالی می‌باشد. تاکنون عمدهٔ مطالعاتی که روی برگ پالونیا به عنوان خوراک دام صورت گرفته، تغذیهٔ برگ خشک یا سیلاژ آن بوده است. اخیراً در مطالعه‌ای افزودن ۶ درصد سیلاژ پالونیا به جای سیلاژ یونجه بر حسب مادهٔ خشک در جیرهٔ گاو شیری سبب افزایش pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی، پروپیونات، ایزو والرات، والرات و جمعیت پروتوزوای *ایزوتریش*، *داسیتریشا رومیننتیوم*، *ایزوتریشا پروستوماتا* و *ایزوتریشا اینتستینالیس* و کاهش غلظت استات شکمبه شد، هرچند گوارش‌پذیری مادهٔ خشک، مادهٔ آلی و NDF تحت تأثیر قرار نگرفت (Huang *et al.*, 2022). در مطالعهٔ مذکور کاربرد سیلاژ برگ پالونیا در جیره سبب افزایش جمعیت کل گونه‌های باکتریایی شکمبه به جز *رومینوکوکوس فلاووفاسیانس*، *رومینوکوکوس آلبوس* و گونه‌های *لاکتوباسیلوس* شد، و جمعیت کل آرکی باکتری‌ها، متانومیکروب‌ها و متانوباکتری‌ها کاهش یافت. در ایران تاکنون مطالعه‌ای روی بررسی ارزش غذایی برگ پالونیای اصلاح شده برای استفاده در تغذیهٔ دام صورت نگرفته است. لذا هدف از تحقیق حاضر، بررسی ترکیب شیمیایی برگ پالونیا و سپس بررسی ارزش غذایی، فراسنجه‌های تولید گاز، خصوصیات هضم و تخمیر سیلاژ حاصل از مخلوط سطوح مختلف برگ پالونیای اصلاح شدهٔ رقم "طب جو" با ذرت علوفه‌ای در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیا و آماده‌سازی سیلاژهای آزمایشی

ذرت علوفه‌ای از مزارع تحت کشت در اطراف شهرستان خرم‌آباد تهیه شد. برگ پالونیای اصلاح شدهٔ رقم هیبرید طب جو (شرکت طب جویان، شیراز، استان فارس) از یک مزرعهٔ پرورش پالونیای ۳–۲ ساله در اطراف شهر خرم‌آباد جمع‌آوری گردید. برگ‌ها به صورت دستی از ۱۵ درخت به طور تصادفی برداشت و مخلوط شد. در ابتدا، بر اساس روش های مرسوم اقدام به تعیین ترکیب شیمیایی نمونه‌های ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیای تازه شد (۵ تکرار به ازای هر علوفه). قبل از سیلو کردن هر دو علوفه به وسیلهٔ دستگاه چاپر دستی آشپزخانه در اندازه‌های ۴–۲ سانتی‌متری خرد شد و از هر علوفه به مقدار مورد نیاز برای تهیهٔ مخلوط سیلاژهای آزمایشی نمونه‌برداری شد. سپس عملیات سیلو کردن مخلوطی از این دو علوفه به نسبت‌های مختلف صورت گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سیلاژهای حاوی ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیا به ترتیب با نسبت‌های ۱۰۰:۰، ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۲۵:۷۵ و ۰:۱۰۰ بر اساس درصد مادهٔ خشک بود. نحوهٔ تهیهٔ سیلاژهای آزمایشی به این صورت بود که هر سیلاژ در ۸ تکرار (در کل ۴۰ ظرف پلاستیکی) در ظرف‌های

پلاستیکی با ظرفیت ۱۰ کیلوگرم قرار داده شد و پس از فشردن و خارج نمودن هوا توسط جارو برقی، از بی‌هوازی بودن آن‌ها حصول اطمینان شد. سپس، درب ظرف‌ها بسته شده و به مدت ۶۰ روز عملیات سیلو کردن نمونه‌ها انجام شد. ظرف‌های حاوی مواد سیلویی حاوی روزنه‌ای جهت خروج شیرابه بودند. حاوی پس از طی این مدت، درب ظرف‌ها باز شده و خصوصیاتی از قبیل محتوای مادۀ خشک، مادۀ آلی، پروتئین خام، عصارۀ اتری، NDF، ADF، کربوهیدات‌های محلول در آب (WSC)، NFC و غلظت نیتروژن آمونیاکی سیلاژها بر اساس روش‌های استاندارد تعیین شد. میزان pH سیلاژها نیز بلافاصله اندازه‌گیری شد. برای تعیین pH سیلاژ، ۵۰ گرم نمونۀ تازه در یک بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری توزین گردید و ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. نمونه‌ها طی یک ساعت به طور متناوب به هم زده شدند. سپس، عصارۀ حاصل به بشر کوچکتری منتقل گردید و pH با استفاده از pHمتر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) تعیین شد (Faithfull, 2000).

تجزیه شیمیایی نمونه‌ها

پیش از تجزیۀ شیمیایی، ابتدا نمونه‌های علوفه و سیلاژ حاصل از آن‌ها در دمای ۶۰ درجۀ سانتی‌گراد در آون برای رسیدن به وزن ثابت، خشک شد و سپس با استفاده از آسیاب مجهز به الک با قطر منافذ یک میلی‌متری آسیاب شدند. میزان مادۀ خشک، خاکستر خام، مادۀ آلی، پروتئین خام و عصارۀ اتری در نمونه‌های علوفۀ تازه و سیلاژ بر اساس روش‌های AOAC (۲۰۰۲) تعیین گردید. میزان ADF و لیگنین توسط روش Van Soestو همکاران (۱۹۹۱) محاسبه گردید. برای تعیین میزان NDF نمونه‌ها از روش Mertens و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. برای تعیین میزان NDF و ADF نمونه‌ها از دستگاف فایبرتک (Fibertec System M, Tecator, 1020 Hot Extraction, Flawil, Switzerland) و بدون استفاده از سدیم سولفیت و آنزیم آلفا امیلاز مقاوم به حرارت استفاده شد. محتوای WSC نمونه‌ها توسط روش آنترون تعیین شد (MAFF, 1982). در این روش، عصارۀ کربوهیدراتی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی، در مجاورت معرف آنترون (مخلوط اسید سولفوریک، تیوره و آنترون)، در حمام آب جوش حرارت داده شد تا کمپلکسی به رنگ آبی–سبز ایجاد گردد. سپس، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل ۳۴۰ (HITACHI) خوانده شد. محتوای NFC نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر تخمین زده شد (McDonald *et al.*, 2011):

$$NFC\ (\%) = 100 - [NDF\ \%) + CP\ (\%) + EE\ (\%) + Ash\ (\%)]$$

که در آن، NFC درصد کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی، NDF درصد الیاف نامحلول در شویندۀ خنثی، CP درصد پروتئین خام، EE درصد عصارۀ اتری و Ash درصد خاکستر خام است. میزان نیتروژن آمونیاکی نمونه‌ها با استفاده از معرف‌های فنول و هیپوکلریت اندازه‌گیری شد (Broderick and Kang, 1980).

آزمون تولید گاز برون‌تنی

به منظور انجام انجام آزمون تولید گاز برون‌تنی، مایع شکمبه از سه رأس گوسفند نژاد لری–بختیاری بالغ که حداقل به مدت دو هفته با جیرۀ غذایی حاوی ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره تغذیه شدند، قبل از تغذیۀ صبحگاهی از

طریق لولهٔ مری تهیه شد. جیرهٔ آزمایشی دام‌ها حاوی ۳۰ درصد کاه گندم، ۱۵ درصد سیلاژ ذرت، ۱۵ درصد یونجه خشک، ۱۸/۵ درصد بلغور ذرت، ۲۰ درصد سبوس گندم، ۰/۵ درصد اوره، ۰/۵ درصد کربنات کلسیم، ۰/۲۵ درصد مواد معدنی و ویتامینه و ۰/۲۵ درصد نمک بر حسب مادهٔ خشک بود که بر اساس جداول احتیاجات تغذیه‌ای نشخوارکنندگان کوچک متوازن شده بود (NRC, 2007). گوسفندان روزانه دو بار و در حد احتیاجات نگهداری تغذیه شدند. محتوای پروتئین خام و انرژی قابل متابولیسم جیرهٔ تغذیه شده به گوسفندان به ترتیب ۱۱/۸ درصد و ۲/۳۳ مگاکالری در کیلوگرم مادهٔ خشک بود.

محتویات شکمبهٔ هر سه رأس گوسفند در هر مرحله در یک فلاسک عایق که از قبل توسط گاز دی اکسید کربن بی‌هوازی شده بود، در دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد کاملاً مخلوط گردید و سریعاً (در کمتر از ۲۰ دقیقه) به آزمایشگاه منتقل شد. قبل از تزریق به داخل ویال‌های آزمایشی، محتویات شکمبه توسط چهار لایه پارچهٔ متقال صاف شد. دو آزمون تولید گاز به طور همزمان و در سه سری (Run) مجزا انجام شد. در آزمون اول، ابتدا میزان ۲۵۰ میلی‌گرم نمونهٔ سیلاژ کاملاً خشک آسیاب شده و با اندازه ذرات ۱ میلی‌متر به داخل هر ویال برای تعیین پارامترهای آزمون تولید گاز قرار داده شد (۵ تکرار به ازای هر تیمار در هر سری؛ ۲۵ ویال آزمایشی در هر سری به‌علاوه ۳ ویال بلانک، جمعاً ۲۸ ویال در هر سری، و در کل ۸۴ ویال در هر ۳ سری برای آزمایش تولید گاز). سپس، هر ویال که از قبل دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد رسیده بود، با ۵ میلی‌لیتر مایع شکمبهٔ صاف شده و ۲۵ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح گردید (Marten and Barnes, 1980). جهت حصول اطمینان از ایجاد شرایط بی‌هوازی، گاز دی اکسید کربن به شیرابهٔ شکمبه صاف شده و بزاق مصنوعی قبل و پس از تزریق به داخل ویال‌ها نیز تزریق گردید. میزان ۳ ویال نیز به عنوان بلانک (حاوی فقط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. سپس درب ویال‌ها بسته شده و در بن‌ماری با دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان گاز تولیدی هر ویال توسط دستگاه فشارسنج دیجیتال در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. برای تعیین پارامترهای تولید گاز از معادلهٔ $P = b(1 - e^{-ct})$ استفاده گردید (Blümmel *et al.*, 2003). در معادلهٔ مذکور b گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (میلی‌لیتر)، c سرعت تولید گاز در ساعت، t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد.

آزمون دوم تولید گاز با ۸ تکرار به ازای هر تیمار و سه سری (۸ تکرار به ازای هر تیمار در هر سری؛ ۴۰ ویال آزمایشی در هر سری به‌علاوه ۳ ویال بلانک، جمعاً ۴۳ ویال در هر سری، و در کل ۱۲۹ ویال در هر ۳ سری برای فراسنجه‌های هضم و تخمیر برون‌تنی). به منظور تعیین گوارش‌پذیری شکمبه‌ای مادهٔ خشک، قابلیت هضم مادهٔ آلی و تخمین انرژی قابل متابولیسم جیره‌های آزمایشی و نیز فراسنجه‌های تخمیر شامل pH، نیتروژن آمونیاکی، سنتز پروتئین میکروبی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و فعالیت آنزیمی شکمبه طراحی شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (Vercoe *et al.*, 2010)، ابتدا میزان گاز تولیدی هر ویال ثبت گردید، سپس pH به وسیلهٔ pHمتر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) قرائت شد. محتوای هر ویال با دور ۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بقایای هر ویال جمع‌آوری و خشک شده و میزان گوارش‌پذیری شکمبه‌ای مادهٔ خشک از اختلاف وزن سوبسترای اولیه و وزن بقایا پس از انکوباسیون محاسبه گردید. جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌های سوپرناتانت (۵ میلی‌لیتر) سریعاً با یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجهٔ

سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان گوارش‌پذیری مادهٔ آلی و انرژی قابل متابولیسم سیلاژهای آزمایشی به ترتیب بر اساس معادلات زیر تخمین زده شد (Menke and Steingass, 1988):

$$IVOMD\ (g/kg\ OM) = 148.8 + 8.89\ GAS + 4.50\ CP + 6.51\ XA$$
$$ME\ (MJ/kg\ DM) = 2.2 + 0.136GP + 0.0157CP + 0.00002859CP^2$$

که در این معادلات IVOMD میزان گوارش‌پذیری مادهٔ آلی، GAS میزان گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (Menke and Steingass, 1988)، CP میزان پروتئین خام به صورت گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک، XA خاکستر به صورت گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک و ME انرژی قابل متابولیسم می‌باشد.
تولید پروتئین میکروبی (MPS) به صورت زیر محاسبه گردید (Blümmel *et al.*, 1997):

$$MPS\ (mg/g\ DM) = mg\ ADS - (ml\ gas \times 2.2\ mg/ml)$$

که ADS سوبسترای هضم شدهٔ ظاهری پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ml gas حجم گاز تولیدی پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته و ۲/۲ عامل استوکیومتری بر حسب میلی‌گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن مورد نیاز برای سنتز اسیدهای چرب کوتاه زنجیر است.
غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادلهٔ زیر محاسبه شد (Getachew *et al.*, 2002):

$$SCFA\ (mmol/200\ mg\ DM) = 0.0222GP - 0.0042$$

که در این معادله SCFA اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر تولیدی و GP حجم گاز تولیدی در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

تعیین فعالیت آنزیم‌های هیدرولتیک میکروبی شکمبه

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیهٔ کاغذ صافی، آلفا آمیلاز و پروتئاز موجود در بخش میکروب‌های چسبیده به ذرات خوراکی (پلت‌های جمع‌آوری شده) بر اساس روش Agarwal (2000) تخمین زده شد. روش کار به این صورت بود که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ابتدا محتوای هر ویال (چهار ویال به ازای هر تیمار) به مدت ۲۰ دقیقه و با دور g×۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده و بقایا جمع‌آوری گردید. سپس بقایا با تتراکلرید کربن و آنزیم لیزوزیم فرآیند شده و مخلوط آنزیم‌های مایع شکمبه در بافر فسفات در سانتریفیوژ با دور g×۲۷۰۰۰ در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه بدست آمد. برای تخمین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر شیرابهٔ شکمبه صاف شده و ۰/۵ میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولز ۱ درصد (به عنوان سوبسترا) بوده که در دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. مخلوط واکنش برای آنزیم میکروکریستالین سلولاز که شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر شیرابهٔ شکمبه صاف شده و ۱ میلی‌لیتر میکروکریستالین سلولز ۱ درصد (به عنوان سوبسترا) بوده که در دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت. به منظور محاسبهٔ فعالیت کاغذ صافی، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر

شیرابهٔ شکمبه صاف شده و ۰/۵ گرم کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (به عنوان سوبسترا)، در دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. در همه آزمون‌های مذکور، واکنش با افزودن ۳ میلی‌لیتر محلول دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد. گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون بر اساس روش Miller (1959) تخمین زده شد. فعالیت‌های آنزیمی بر اساس این فرض که یک واحد آنزیمی توانایی تولید ۱ میکرومول گلوکز در هر ساعت در هر میلی‌لیتر را تحت شرایط مخلوط واکنش دارد محاسبه گردید. برای تعیین فعالیت پروتئازی شکمبه، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۲۵ میلی‌لیتر مایع شکمبهٔ صاف شده و ۰/۲۵ میلی‌لیتر کازئین (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود که در دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. سپس، مخلوط واکنش با افزودن تری‌کلرو استیک اسید (۲۰۰ میلی‌لیتر در لیتر) متوقف شده و پروتئین بر اساس روش مربوطه تعیین شد (Lowry *et al.*, 1951).

تجزیهٔ آماری

تجزیهٔ واریانس داده‌های مربوط به ترکیب شیمیایی ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیای تازه و سیلاژهای آزمایشی حاصل از آن‌ها با استفاده از رویهٔ GLM و توسط نرم‌افزار SAS (2005) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. مدل آماری طرح آزمایشی به صورت مدل زیر بود:

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

در این مدل Y_{ij}، μ، T_i و e_{ij} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر ثابت تیمار آزمایشی iام و اثر خطای آزمایشی است. میانگین‌های به دست آمده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری ۵ درصد با هم مقایسه شدند.

تجزیه واریانس سایر داده‌ها شامل تولید گاز، گوارش‌پذیری مواد مغذی، فراسنجه‌های تخمیر و فعالیت آنزیمی سیلاژهای آزمایشی با استفاده از رویهٔ MIXED و توسط نرم‌افزار SAS (2005) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. مدل آماری طرح آزمایشی به صورت مدل زیر بود:

$$Y_{ijk}= \mu + T_i + Run_j + e_{ijk}$$

در این مدل Y_{ijk}، μ، T_i، Run_j و e_{ijk} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر ثابت تیمار آزمایشی iام، اثر تصادفی دورهٔ jام و اثر خطای آزمایشی است. میانگین‌های صفات به دست آمده با استفاده از مقاسیات متعامد (خطی و غیر خطی) و در سطح معنی‌داری ۵ درصد با هم مقایسه شدند.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی برگ پالونیا، ذرت علوفه‌ای و سیلاژهای حاصل از آن‌ها

در جدول ۱ نتایج مربوط به به ترکیب شیمیایی ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیای تازه ارائه شده است. محتوای مادۀ خشک، پروتئین خام و لیگنین در برگ پالونیا به طور معنی‌داری بیشتر از ذرت علوفه‌ای بود (P<۰/۰۵). این در حالی است که محتوای مادۀ آلی، NDF و ADF ذرت علوفه‌ای به طور معنی‌داری بیشتر از برگ پالونیا به دست آمد (P<۰/۰۵). میزان عصارۀ اتری، NFC و WSC دو علوفه مشابه بود (P>۰/۰۵). در جدول ۲ نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی سیلاژهای مخلوط حاوی نسبت‌های مختلف برگ پالونیا و ذرت علوفه‌ای ارائه شده است. با افزایش سطح برگ پالونیا در سیلاژ، درصد مادۀ خشک، پروتئین خام، لیگنین، عصارۀ اتری، و غلظت نیتروژن آمونیاکی به طور خطی افزایش یافت (P<۰/۰۵). به هر حال، درصد مادۀ آلی، NDF و ADF با افزایش نسبت برگ پالونیا به طور خطی کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). محتوای NFC، WSC و pH سیلاژهای آزمایشی تحت تأثیر نسبت برگ پالونیا و ذرت علوفه‌ای قرار نگرفت (P>۰/۰۵). باید عنوان نمود که به جز محتوای مادۀ خشک که در سیلاژ برگ پالونیا و سیلاژ ذرت علوفه‌ای اندکی بیشتر از علوفۀ تازۀ آن‌ها بود (جداول ۱ و ۲)، میزان سایر ترکیبات شیمیایی در هر سیلاژ کمتر از میزان آن در علوفۀ تازه بود. افزایش میزان مادۀ خشک در سیلاژها احتمالاً به دلیل خروج بخشی از رطوبت آن‌ها به صورت شیرابۀ سیلویی باشد. میزان پروتئین خام در علوفه و سیلاژ برگ پالونیا به طور قابل توجهی بیشتر از ذرت علوفه‌ای بود (جداول ۱ و ۲) که این می‌تواند پتانسیل و مزیت برگ پالونیا به عنوان یک منبع علوفه‌ای جدید، به خصوص در شرایطی که پروتئین به عنوان یک عامل محدود کننده در جیرۀ نشخوارکنندگان مطرح باشد، را نشان دهد. همچنین، بر خلاف ذرت علوفه‌ای، غلظت پروتئین خام در برگ تازه و سیلو شده پالونیا (به ترتیب ۱۷۳ و ۱۶۴ گرم در کیلوگرم مادۀ خشک) بیشتر از حداقل پروتئین خام مورد نیاز (۸ درصد مادۀ خشک) برای تولید آمونیاک کافی در شکمبه به منظور دستیابی به حداکثر رشد میکروبی بود (Norton, 1998)، این می‌تواند یکی دیگر از مزیت‌های استفاده از برگ یا سیلاژ پالونیا در تغذیۀ دام باشد. با سیلو کردن غلظت پروتئین خام هر دو سیلاژ آزمایشی در مقایسه با علوفۀ تازۀ آن‌ها اندکی کاهش یافت که این احتمالاً به دلیل تجزیۀ بخشی از پروتئین خام در اثر فعالیت میکروب‌ها و تولید آمونیاک باشد (McDonald *et al.*, 2011).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیای تازه (گرم در کیلوگرم مادۀ خشک یا واحد بیان شده)

Table 1- Chemical composition of fresh forage corn and Paulownia leaf (g/kg DM or as statsed)

پارامتر Parameter	نوع علوفه Forage type		خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	احتمال معنی‌داری P-value
	ذرت Corn	برگ پالونیا Paulownia leaf		
مادۀ خشک Dry matter	234[b]	266[a]	4.82	<0.01
مادۀ آلی Organic matter	936[a]	911[b]	5.27	0.02
پروتئین خام Crude protein	81.4[b]	173[a]	7.27	<0.01
الیاف نامحلول در شویندۀ خنثی Neutral detergent fiber	502[a]	402[b]	6.74	<0.01
الیاف نامحلول در شویندۀ اسیدی Acid detergent fiber	325[a]	201[b]	7.08	<0.01
لیگنین Lignin	63.4[b]	86.4[a]	2.85	<0.01
عصاره اتری	33.5	35.5	1.64	0.41

Ether extract				
کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی Non-fiber carbohydrates	319	301	6.65	0.11
کربوهیدرات‌های محلول در آب Water soluble carbohydrates	101	91.2	3.65	0.11

– اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

- Means with different letters in a row differ (P<0.05).

مطابق با این نتایج، در مطالعه‌ای محتوای پروتئین خام برگ تازهٔ گونه پالونیا الونگاتا ۱۷۲ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک گزارش شد (Stewart *et al.*, 2018). در پژوهش دیگری محتوای پروتئین خام برگ خشک پالونیا ۱۷۴ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک بود (Al-Sagheer *et al.*, 2019). در کل محتوای پروتئین خام برگ پالونیا در دامنهٔ ۱۱۳ تا ۲۷۱ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک گزارش شده است (Descals *et al.*, 2013). وجود اختلافات در نتایج محققان ممکن است به دلیل عواملی مانند رقم گیاه، زمان کاشت و برداشت، شرایط جغرافیایی محل کشت، نوع و میزان کاربرد کودهای شیمیایی و مدیریت تهیهٔ سیلاژ باشد (Kaiser *et al.*, 2004). محتوای NDF و ADF در برگ تازه و سیلاژ پالونیا به طور قابل توجهی کمتر از ذرت علوفه‌ای بود که نشان دهندهٔ پتانسیل مطلوب پالونیا به عنوان یک منبع علوفه‌ای است، زیرا مشخص شده است که مقدار NDF گیاه با مصرف خوراک رابطهٔ معکوس دارد (McDonald *et al.*, 2011). لذا عدم اثر منفی فیبر برگ پالونیا بر مصرف خوراک در نشخوارکنندگان قابل انتظار است.

جدول ۲– ترکیب شیمیایی (گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک یا واحد ذکر شده) سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیا

Table 2- Chemical composition (g/kg DM or as stated) of silages containing different proportion of forage corn (FC) and Paulownia leaf (PL)

صفت Parameter	Proportions of corn and Paulownia in the silage (% of DM)					خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	Contrast	
	Control (only FC)	75:25	50:50	25:75	0:100 (only PL)		خطی Linear	غیر خطی Quadratic
مادهٔ خشک Dry matter	242^{c}	252^{bc}	260^{ab}	267^{a}	273^{a}	4.30	<0.01	0.65
مادهٔ آلی Organic matter	927^{a}	920^{ab}	915^{bc}	907^{bc}	902^{c}	4.97	<0.01	0.97
پروتئین خام Crude protein	80.5^{e}	102^{d}	122^{c}	144^{b}	164^{a}	3.56	<0.01	0.93
الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی Neutral detergent fiber	487^{a}	465^{b}	438^{c}	415^{d}	393^{e}	4.24	<0.01	0.78
الیاف نامحلول در شویندهٔ اسیدی Acid detergent fiber	310^{a}	278^{b}	253^{c}	223^{d}	191^{e}	3.94	<0.01	0.74
لیگنین Lignin	60.1^{c}	63.9^{bc}	66.3^{bc}	70.3^{ab}	74.5^{a}	2.38	<0.01	0.77
عصارهٔ اتری Ether extract	33.4^{b}	35.1^{ab}	35.9^{ab}	37.2^{ab}	38.8^{a}	1.57	0.03	0.91
کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی Non-fiber carbohydrates	326	318	319	311	306	7.28	0.10	0.75

کربوهیدرات‌های محلول در آب Water soluble carbohydrates	22.9	23.5	24.4	25.3	25.4	1.19	0.11	0.81
pH	3.96	3.99	4.11	4.26	4.29	0.157	0.15	0.89
نیتروژن آمونیاکی Ammonia-N (g/kg total N)	51.3^{b}	54.2^{ab}	54.8^{ab}	57.3^{ab}	59.1^{a}	1.59	0.02	0.46

– اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

- Means with different letters in a row differ (P<0.05).

محتوای NDF سیلاژ برگ پالونیا در مطالعهٔ حاضر بیشتر از مقادیر گزارش شده توسط Huang و همکاران (۲۰۲۲) بود (۳۵۹ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک)، اما مشابه با مقدار گزارش شده (۴۴۷ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک) توسط Stewart و همکاران (۲۰۱۸) بود. در پژوهش دیگری (Al-Sagheer *et al.*, 2019) میزان NDF برگ پالونیا ۴۰۵ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک گزارش شد که کمتر از نتایج ارائه شده در تحقیق حاضر است. کاهش محتوای فیبری سیلاژها در مقایسه با علوفهٔ تازه مطابق با نتایج سایر محققان است (Rezaei *et al.*, 2009) و دلیل آن را می‌توان به تجزیهٔ سلولز و همی‌سلولز در اثر فعالیت میکروب‌ها حین تخمیر و نیز هیدرولیز آنها در pH اسیدی سیلاژ نسبت داد (Rezaei *et al.*, 2009). محتوای لیگنین در برگ تازه و سیلاژ پالونیا بیشتر از ذرت علوفه‌ای بود که این ممکن است بر ارزش غذایی آن اثر منفی داشته باشد و لذا در زمان استفاده از برگ یا سیلاژ پالونیا در جیرهٔ نشخوارکنندگان باید به غلظت کل جیرهٔ کامل مخلوط توجه نمود. همچنین، با افزایش نسبت برگ پالونیا در جیره، غلظت لیگنین به تدریج افزایش معنی‌داری یافت، هرچند اختلاف خیلی زیاد نبود. تفاوت غلظت WSC در علوفهٔ تازه هر دو گیاه از نظر آماری معنی‌دار نبود (۱۰۱ و ۹۱/۲ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک). به نظر می‌رسد که غلظت WSC در هر دو علوفه برای ایجاد یک تخمیر پایدار و مطلوب حین سیلو کردن کافی بوده است، زیرا مشخص شده است که حداقل میزان WSC در علوفه که بتوان آن را سیلو نمود باید حدود ۳۰ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک باشد (Haigh and Parker, 1985). پس از سیلو کردن، میزان WSC به طور معنی‌داری کاهش یافت که این قابل انتظار بود، زیرا قندهای محلول علوفه طی فرایند تخمیر بی‌هوازی توسط میکروارگانیسم‌ها به خصوص باکتری‌های مولد اسید لاکتیک مصرف شده و تولید لاکتات جهت کاهش pH سیلاژ و پایدرای آن خواهند کرد (Nkosi and Mekuria, 2010). افزایش سهم برگ پالونیا در سیلاژهای مخلوط تأثیری بر غلظت WSC نداشت. محتوای خاکستر خام برگ تازه (۸۹ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک) و سیلاژ پالونیا (۹۸ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک) بیشتر از علوفهٔ تازه و سیلاژ ذرت بود. بالا بودن غلظت خاکستر خام برگ پالونیا در مطالعهٔ دیگری (به ترتیب ۱۱۴ و ۱۲۵ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک در برگ خشک و سیلاژ پالونیا) نیز گزارش شده است (Huang *et al.*, 2022).

افزایش محتوای مادهٔ خشک، پروتئین خام، لیگنین و عصارهٔ اتری با افزایش سهم برگ پالونیا نسبت به ذرت در سیلاژهای مخلوط، احتمالاً به دلیل غلظت بیشتر ترکیبات مذکور در برگ پالونیا بوده است. کاهش محتوای فیبری سیلاژ با افزایش نسبت برگ پالونیا احتمالاً به دلیل محتوای NDF و ADF کمتر برگ پالونیا باشد. میزان pH سیلاژهای آزمایشی در دامنهٔ مناسب ۴/۲–۳/۸ برای یک تخمیر مطلوب قرار داشت (Faithfull, 2000) و تحت تأثیر نسبت ذرت و برگ پالونیا قرار نگرفت، هرچند انتظار این بود که سیلاژهای حاوی برگ پالونیا به دلیل افزایش میزان پروتئین خام، در برابر افت pH سیلو مقاومت از خود نشان دهند. با افزایش نسبت برگ پالونیا به ذرت علوفه‌ای، غلظت

نیتروژن آمونیاکی سیلاژ افزایش یافت که این احتمالاً به خاطر محتوای پروتئین خام برگ پالونیا بوده که حین عمل تخمیر تبدیل به آمونیاک شده است.

تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر و گوارش‌پذیری برون‌تنی

همان طوری که در جدول ۳ نشان داده شده است، با افزایش نسبت برگ پالونیا به ذرت علوفه‌ای در سیلاژ، تولید گاز در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ و نیز پتانسیل تولید گاز (ضریب b) به طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵). هرچند، حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۱۶، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعته (کل گاز تولیدی) و نرخ تولید گاز (ضریب c) تحت تأثیر قرار نگرفت (P>۰/۰۵). تفاوت در میزان گاز تولیدی در زمان‌های انکوباسیون مربوطه احتمالاً به دلیل اختلاف در غلظت پروتئین خام، NDF و لیگنین سیلاژهای آزمایشی بوده است، زیرا یک رابطهٔ معکوس بین ترکیباتی مانند پروتئین خام، NDF و مخصوصاً لیگنین با تولید گاز وجود دارد (Van Soest, 1994). دلیل دیگر کاهش تولید گاز با افزایش نسبت برگ پالونیا در سیلاژ را می‌توان با کمتر بودن میزان مادهٔ آلی توجیه کرد.

نتایج مربوط فراسنجه‌های تخمیر و گوارش‌پذیری در جدول ۴ ارائه شده است. با افزایش نسبت برگ پالونیا به ذرت علوفه‌ای در سیلاژ غلظت نیتروژن آمونیاکی و سنتز پروتئین میکروبی به طور خطی افزایش نشان داد (P<۰/۰۵)، هرچند، غلظت اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر به طور خطی کاهش یافت. میزان pH، انرژی قابل متابولیسم و گوارش‌پذیری شکمبه‌ای مادهٔ خشک تحت تأثیر سیلاژهای آزمایشی قرار نگرفت. اما با افزایش سهم برگ پالونیا در سیلاژ، گوارش‌پذیری مادهٔ آلی تمایل به کاهش خطی پیدا کرد (P=۰/۰۸).

جدول ۳- فراسنجه‌های تولید گاز آزمایشگاهی (میلی‌لیتر به ازای ۲۵۰ میلی‌گرم سوبسترا یا واحد ذکر شده) سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیا

Table 3- *In vitro* gas production parameters (ml/250 mg substrate or as stated) of silages containing different proportion of forage corn (FC) and Paulownia leaf (PL)

صفت Parameter	Proportions of corn and Paulownia in the silage (% of DM)					خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	Contrast	
	Control (only FC)	75:25	50:50	25:75	100 (only PL)		خطی Linear	غیر خطی Quadratic
تولید گاز ۱۶ ساعته Gas producion at 16 h	31.2	32.3	32.6	34.2	34.5	2.05	0.21	0.95
تولید گاز ۲۴ ساعته Gas producion at 24 h	52.3^{a}	48.1^{ab}	45.8^{b}	43.4^{bc}	40.5^{c}	1.60	<0.01	0.68
تولید گاز ۳۶ ساعته Gas producion at 36 h	59.8^{a}	57.5^{ab}	56.3^{ab}	52.6^{bc}	49.5^{c}	1.98	<0.01	0.58
تولید گاز ۴۸ ساعته Gas producion at 48 h	64.2^{a}	63.1^{ab}	61.1^{ab}	58.1^{ab}	55.8^{b}	2.70	0.02	0.83
تولید گاز ۷۲ ساعته Gas producion at 72 h	64.9	63.8	61.6	60.8	58.8	2.21	0.09	0.87
تولید گاز ۹۶ ساعته Gas producion at 96 h	65.1	64.5	62.3	62.2	60.3	2.50	0.16	0.76
کل گاز تولیدی ۱۲۰ ساعته Total gas production (120 h)	66.7	65.5	63.3	61.1	60.9	2.58	0.18	0.87
پتانسیل تولید گاز (b)	72.1^{a}	68.3^{a}	67.5^{ab}	65.8^{ab}	63.5^{b}	2.11	0.02	0.87

Gas production potential		b						
نرخ تولید گاز (c) Rate of gas production (c; %/h)	0.033	0.032	0.031	0.030	0.030	0.002	0.22	0.55

– اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

- Means with different letters in a row differ (P<0.05).

دلیل کاهش تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر احتمالاً محتوای NDF کمتر و لیگنین بیشتر برگ پالونیا بوده است. یکی دیگر از دلایل این امر می‌تواند این باشد که احتمالاً تخمیر و مواد آلی بیشتر سبب تولید پروتئین میکروبی شده‌اند، زیرا برگ پالونیا دارای محتوای قابل ملاحظه‌ای ترکیبات فنولی (۶۰ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک) بوده (Huang *et al.*, 2022) که در مطالعاتی نشان داده شده است که ترکیبات مذکور با تعدیل کردن تجزیهٔ پروتئین در شکمبه سبب تولید بهینهٔ پروتئین میکروبی می‌شوند (Makkar *et al.*, 1995). دلیل اینکه گوارش‌پذیری مادهٔ خشک بر خلاف گوارش‌پذیری مادهٔ آلی که با افزایش کاربرد برگ پالونیا به جای ذرت علوفه‌ای تمایل به کاهش نشان داد، تفاوتی بین سیلاژها نداشت احتمالاً به خاطر میزان خاکستر بالاتر برگ پالونیا بوده که معمولاً گوارش‌پذیری بالایی دارد و از این طریق از افت بیش از حد گوارش‌پذیری مادهٔ خشک جلوگیری نموده است. با انکوباسیون همهٔ سیلاژهای آزمایشی، غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون بیشتر از حداقل مقدار مورد نیاز آن (۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) جهت رشد بهینهٔ میکروبی بود (Satter and Slytor, 1974). دلیل افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش نسبت برگ پالونیا به ذرت علوفه‌ای در سیلاژ احتمالاً به دلیل غلظت پروتئین خام بیشتر برگ پالونیا بوده است و در حقیقت پروتئین بیشتری در فرایند تجزیه و آمین‌زدایی وارد شده است. افزایش پروتئولیز شکمبه (جدول ۵) نیز می‌تواند توجیه کنندهٔ این نتایج باشد. ویژگیهای پروتئین دو نمونهٔ علفی و مقاومت آن‌ها در برابر پروتئولیز هم ممکن است در این زمینه اثر داشته باشد. برگ پالونیا دارای مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنولی است که ممکن است با کند کردن روند تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه، از طریق تبدیل آمونیاک به پروتئین میکروبی سبب کاهش غلظت آن در مایع شکمبه شود، اما در مطالعهٔ حاضر به دلیل زیاد بودن محتوای پروتئین خام با افزایش نسبت برگ پالونیا در سیلاژ، احتمالاً تجزیهٔ زیاد پروتئین توسط میکروارگانیسم‌های پروتئولتیک شکمبه مانع از دیده شدن اثرات مثبت ترکیبات فنولی شده است. انرژی قابل متابولیسم سیلاژهای آزمایشی تحت تأثیر سطح پالونیا قرار نگرفت. انرژی قابل متابولیسم به دست آمده در این مطالعه کمتر از نتایج به دست آمده (۱۰/۸ مگاژول در کیلوگرم مادهٔ خشک) توسط Özelçam و همکاران (۲۰۲۱) بود.

جدول ٤– فراسنجه‌های تخمیر و گوارش‌پذیری آزمایشگاهی مواد مغذی سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیا

Table 4- Fermentation parameters and *in vitro* nutrient digestibility of silages containing different proportion of forage corn (FC) and Paulownia leaf (PL)

صفت Parameter	Proportions of corn and Paulownia in the silage (% of DM)					خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	Contrast	
	Control (only FC)	75:25	50:50	25:75	100 (only PL)		خطی Linear	غیر خطی Quadratic
اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر (mmol/g DM) Short chain fatty acids	4.64^{a}	4.26^{ab}	4.05^{b}	3.83^{bc}	3.58^{c}	0.142	<0.01	0.68

گوارش‌پذیری مادهٔ خشک (٪) Dry matter digestibility	58.4	59.4	59.8	60.8	61.4	1.87	0.24	0.97
گوارش‌پذیری مادهٔ آلی (٪) Organic matter digestibility	60.4	58.9	58.4	58.2	57.4	1.14	0.08	0.70
انرژی قابل متابولیسم (MJ/kg DM) Metabolisable energy	8.52	8.30	8.21	8.32	8.31	0.171	0.41	0.56
pH	6.59	6.66	6.63	6.66	6.70	0.043	0.13	0.87
نیتروزن آمونیاکی (mg/dl) Ammonia-N	11.9^{c}	12.8^{c}	14.3^{b}	16.1^{a}	16.3^{a}	0.383	<0.01	0.55
پروتئین میکروبی (mg/g DM) Microbial protein	146^{e}	165^{d}	182^{c}	202^{b}	223^{a}	4.35	<0.01	0.71

– اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

- Means with different letters in a row differ (P<0.05).

فعالیت آنزیمی شکمبه

در جدول ۵ نتایج مربوط به فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی محیط کشت با انکوباسیون سیلاژهای آزمایشی در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون گزارش شده است. فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت تجزیهٔ کاغذ صافی با افزایش نسبت برگ پالونیا به ذرت علوفه‌ای در سیلاژ به طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵)، هرچند، فعالیت آلفا آمیلاز و پروتئازی شکمبه افزایش خطی نشان داد (P<۰/۰۵). فعالیت میکروکریستالین سلولاز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). فعالیت کمپلکس‌های آنزیمی شکمبه به طور غیر مستقیم نشان دهندهٔ جمعیت میکروب‌های دخیل در تخمیر و تجزیهٔ مواد خوراکی است (Raghuvansi *et al.*, 2007).

جدول ۵– فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه (واحد در ساعت در میلی‌لیتر یا واحد ذکر شده) سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیا

Table 5- Rumen activity of hydrolytic enzymes (U/h/ml or as stated) of silages containing different proportion of forage corn (FC) and Paulownia leaf (PL)

صفت Parameter	Proportions of corn and Paulownia in the silage (% of DM)					خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	Contrast	
	Control (only FC)	75:25	50:50	25:75	100 (only PL)		خطی Linear	غیر خطی Quadratic
کربوکسی متیل سلولاز Carboxymethyl cellulase	16.2^{a}	14.8^{ab}	14.6^{ab}	15.3^{ab}	13.8^{b}	0.586	0.03	0.72
میکروکریستالین سلواز Microcrystalline cellulase	10.9^{a}	10.4^{ab}	10.4^{ab}	10.3^{ab}	10.6^{b}	0.492	0.50	0.39
فعالیت تجزیهٔ کاغذ صافی Filter paper degrading	28.9	25.9	24.9	24.1	22.8	1.49	<0.01	0.55
آلفا امیلاز α-amylase	31.1^{b}	32.8^{b}	33.3^{b}	37.1^{ab}	42.1^{a}	2.54	0.01	0.61
پروتئاز (میکروگرم پروتئین هیدرولیز شده در ساعت) Protease	70.6^{b}	73.9^{ab}	76.6^{ab}	79.4^{ab}	84.1^{a}	3.25	0.01	0.84

– اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

- Means with different letters in a row differ (P<0.05).

با افزایش نسبت برگ پالونیا در سیلاژ محتوای NDF و ADF سیلاژها به طور خطی کاهش یافت، که این کاهش سوبسترا می‌تواند دلیلی برای کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های شاخص تجزیه کنندهٔ فیبر شامل کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت تجزیهٔ کاغذ صافی باشد. افزایش میزان لیگنین سیلاژهای حاوی پالونیا نیز ممکن است دلیل دیگری برای این منظور باشد، زیرا رابطهٔ معکوسی بین سطح لیگنین و تخمیرپذیری و هضم علوفه‌ها گزارش شده است (Van Soest, 1994). نتایج مربوط به گوارش‌پذیری شکمبه‌ای مادهٔ آلی (جدول ۴) تأیید کنندهٔ این نتایج است. افزایش فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز و پروتئاز محیط کشت با افزایش سطح برگ پالونیا در سیلاژ احتمالاً به دلیل فراهمی بیشتر سوبستراهای پروتئین خام بوده است (جدول ۲).

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که برگ پالونیا رقم اصلاح شدهٔ طب جو دارای ارزش غذایی مطلوبی به عنوان یک منبع علوفه‌ای جدید در تغذیهٔ دام است. همچنین، تهیهٔ سیلاژهای آزمایشی با مخلوط کردن سطوح مختلف برگ پالونیا و ذرت علوفه‌ای امکان‌پذیر است و سبب افزایش محتوای پروتئین خام سیلاژ شده، که در شرایط کمبود منابع خوراکی پروتئینی، کاربرد آن در تغذیهٔ دام قابل توصیه است. به هر حال با توجه به افزایش سطح زیر کشت درخت پالونیا در کشور و نیز میزان برگ سبز تولیدی قابل توجه، طراحی دستگاهی جهت سهولت در برداشت برگ‌ها، امکان تولید سیلاژ در سطح تجاری را امکان‌پذیر می‌سازد. همچنین، انجام آزمایش‌های بیشتر به خصوص در دام زنده ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم شرکت دانش بنیان اصلاح نژاد گوسفند و بز گهر درود به خاطر حمایت مالی و فراهم نمودن امکانات لازم جهت انجام طرح تحقیقاتی حاضر نهایت تشکر و قدردانی را دارم. از همکار گرامی جناب آقای دکتر سعید حیدری، عضو هیأت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه لرستان به سبب تأمین برگ پالونیا از مزرعهٔ ایشان جهت انجام طرح تحقیقاتی حاضر کمال تشکر را دارم. از معاونت محترم پژوهشی و بخش ارتباط با صنعت دانشگاه لرستان به جهت هماهنگی‌ها و کمک شایان جهت انجام پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Agarwal, N. (2000). Estimation of fiber degrading enzyme. In: L. C. Chaudhary, N. Agarwal, D. N. Kamra, D. K. Agarwal, editor. Feed microbiology. Izatnagar (India): CAS Animal Nutrition, pp. 278–291.

2. Al-Sagheer, A. A., Abd El-Hack, M. A., Alagawany, M., Naiel, M. A., Mahgoub, S. A., Badr, M. M., Hussein, E. O. S., Alowaimer, A. N., & Swelum, A. A. (2019). Paulownia leaves as a new feed resource: chemical composition and effects on growth, carcasses, digestibility,

blood biochemistry, and intestinal bacterial populations of growing rabbits. *Animals*, 9, 95. https://doi.org/10.3390/ani9030095.

3. AOAC. (2002). Official Methods of Analysis of AOAC International (17th ed., 1th rev.). Gaithersburg (MD): Association of Official Analytical Chemists.

4. Blümmel, M., Karsli, A., & Russell J. R. (2003). Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in vitro* and *in vivo*: Influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *British Journal of Nutrition,* 90, 625–634. https://doi.org/10.1079/bjn2003934.

5. Blümmel, M., Steingss, H., & Becker, K. (1997). The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and ^{15}N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition,* 77, 911–921. https://doi.org/10.1079/BJN19970089

6. Bodnar, A., Pajor, F., Steier, J., Kispal, T., & Poti, P. (2014). Nutritive value of paulownia (Paulownia spp.) hybrid tree leaves. *Hungarian Agricultural Research,* 23, 27–32. https://doi.org/10.3390/ani9030095.

7. Broderick, G., & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science,* 63, 64-75. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8.

8. Descals, P., Seradj, A., Villorbina, G., & Balcells, J. (2013). Estudiodel valor nutritio de la hoja de Paulownia como recursoforrajero. AIDA, XV Jornadas sobre Producciyn Animal, TomoI, pp. 240-242 (E).

9. Faithfull, N. T. (2000). Methods in Agricultural Chemical Analysis; A Practical Handbook. Cab Int., Wallingford, UK.

10. García-Morote, F. A., L´opez-Serrano, F. R., Martínez-García, E., Andr´es-Abell´an, M., Dadi, T., Candel, D., Rubio, E., & Lucas-Borja, M. E. (2014). Stem biomass production of Paulownia elongata × P. fortunei under low irrigation in a semi-arid environment. *Forests,* 5, 2505–2520. https://doi.org/10.3390/f5102505.

11. Getachew, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationshipbetween short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science,* 139, 341–352. https://doi.org/10.1017/S0021859602002393.

12. Haigh, P. M., & Parker, J. W. G. (1985). Effect of silage additives and wilting on silage fermentation, digestibility and intake and on live weight change of young cattle. *Grass and Forgae Science*, 40(4), 429-436. https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1985.tb01774.x.

13. Huang, H., Lechniak, D., Szumacher‐Strabel, M., Patra, A. K., Kozłowska, M., Kolodziejski, P., Gao, M., Ślusarczyk, S., Petrič, D., & Cieslak, A. (2022). The effect of ensiled paulownia leaves in a high‐forage diet on ruminal fermentation, methane production, fatty acid

composition, and milk production performance of dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13, 104. https://doi.org/10.1186/s40104-022-00745-9.

14. Huang, H., Szumacher-Strabel, M., Patra, A. K., ´Slusarczyk, S., Lechniak, D., Vazirigohar, M., Varadyova, Z., Kozłowska, M., & Cie´slak, A. (2021). Chemical and phytochemical composition, *in vitro* ruminal fermentation, methane production, and nutrient degradability of fresh and ensiled Paulownia hybrid leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 279, 115038. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115038.

15. Icka, P., Damo, R., & Icka, E. (2016). Paulownia Tomentosa, a fast growing timber. *Annals of "Valahia" University of Târgovişte. Agriculture,*10, 14‑9. https://doi.org/10.1515/agr-2016-0003.

16. Kaiser, A. G., Piltz, J. W., Burn, H. M., & Grinffiths, N. W. (2004). Successful Silage, 2nd ed. Dairy Australia and NSW Dept. of Primary Industries, New South Wales, Australia.

17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 262–275. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6.

18. MAFF. (1982). The Analysis of Agricultural Materials, 2nd ed. Ministry of Agriculture Fisheries and FOOD, London, UK.

19. Makkar, H. P. S., Blümmel, M., & Becker, K. (1995). *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 69, 481–493.https://doi.org/10.1002/jsfa.2740690413.

20. Marten, G. C., & Barnes, R. F. (1980). Prediction of energy digestibility of forages within vitro rumen fermentation and fungal enzymes systems. In: W. J. Pidgen, C .C. Balch, & M. Graham editor, Standardization of analytical methodology for feeds. International Development Research Center, Ottawa, pp. 61-71.

21. McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2011). Animal Nutrition. 5th ed. Prentice Hall, Essex, UK.

22. Menke, K. H., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development,* 28, 7–55.

23. Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds using refluxing in beakers or crucibles; collaborative study. *Journal AOAC International*, 85, 1217-1240.

24. Miller, J. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426–429. https://doi.org/10.1021/ac60147a030.

25. Nkosi, M. T., & Mekuria, F. (2010). Cloud computing for enhanced mobile health applications. Cloud Computing Technology and Science, 2010 IEEE Second International Conference on 2010. https://doi.org/10.1109/CloudCom.2010.31.

26. Norton, B. W. (1998). The nutritive value of tree legumes. In: R. C. Gutteridge & H. M. Sheton editors, Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture. Tropical grfor aland Society Aus. Inc., St Lucia. Queensland, Australia, pp. 15-48.

27. NRC. (2007). National Research Council, Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington (DC, USA): National Academy of Sciences.

28. Özelçam, H., İpçak, H. H., Özüretmen, S., & Canbolat, Ö. (2012). Feed value of dried and ensiled paulownia (Paulownia spp.) leaves and their relationship to rumen fermentation, *in vitro* digestibility, and gas production characteristics. *Revista Brasileiro de Zootecnia,* 50, e20210057. https://doi.org/10.37496/rbz5020210057.

29. Raghuvansi, S. K. S., Prasad, R., Tripathi, M. K. & Mishra, A. S. (2007). Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilization, and rumen fermentation and rumen microbial enzymes. *Animal,* 1, 221-226. https://doi.org/10.1017/S1751731107284058.

30. Rezaei., J., Rouzbehan, Y., & Fazaeli, H. (2009). Nutritive value of fresh and ensiled amaranth (Amaranthus hypochondriacus) treated with different levels of molasses. *Animal Feed Science and Technology*, 151, 153-160. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.12.001.

31. SAS Institute Inc. (2005). User's Guide: Statistics, Version 9.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

32. Satter, L. D., & Slyter, L. L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition,* 32, 199-208. https://doi.org/10.1079/BJN19740073.

33. Stewart, M., Vaidya, B., Mahapatra, A., Terrill, T., & Joshee, N. (2018). Potential use of multipurpose Paulownia elongata tree asan animal feed resource. *American Journal of Plant Sciences,* 9, 1212-1227. https://doi.org/10.4236/ajps.2018.96090.

34. Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science,* 74, 3583–3597. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

35. Van Soest, P. J. (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd ed. Cornell Universuty Press, Itacha, NY, USA, pp.476.

36. Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S., & Schlink, A. C. (2010). *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritionalattributes in ruminants: nuclear and related methodologies (2th ed.). Springer Verlag Gmbh.

37. Yadav, N. K., Vaidya, B. N., Henderson, K., Lee, J. F., Stewart, W. M., Dhekney, S. A., & Joshee, N. (2013). A review of Paulownia biotechnology: a short rotation, fast growing multipurpose bioenergy tree. *American Journal of Plant Science*, 4, 2070. https://doi.org/10.4236/ajps.2013.411259.

نسخه پیش انتشار