نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۵ شماره ۳/ سال۱۳۹۴

اثرات گل بومادران و برگ اکالیپتوس بر قابلیت هضم یونجه به روش برون تنی

فردین هژبری[1*]، علی شمشادی[2] و فرخ کفیل زاده[1]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/٤/۱۸

[1] بترتیب دانشیار و استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

[2] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

[*] مسئول مکاتبه: Email: hozhabri@razi.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: گل بومادران و برگ اکالیپتوس دارای ترکیبات فنولی هستند که می‌توانند الگوی تخمیر شکمبه را تحت تاثیر قرار دهند. **هدف**: این مطالعه به‌منظور تعیین میزان ترکیبات فنولی گل بومادران و برگ اکالیپتوس و بررسی اثر این دو گیاه روی قابلیت هضم ماده آلی، پروتئین‌خام و دیواره سلولی یونجه انجام شد. **روش کار**: مایع شکمبه از دو رأس قوچ سنجابی فیستولا شده، جمع‌آوری و به روش برون تنی قابلیت هضم مواد مغذی اندازه گیری شد. تیمارها شامل یونجه (کنترل) و یونجه به‌همراه سطوح ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰درصد ماده خشک گل بومادران یا برگ اکالیپتوس بود. **نتایج**: کل ترکیبات فنولی یونجه، گل بومادران و برگ اکالیپتوس به ترتیب ۵/۹، ۲۳/۳ و ۸۹/۳ گرم در کیلوگرم ماده خشک بود در حالی که کل تانن به ترتیب ۰/٤، ۱۵/۳ و ۷۲/۲ و ساپونین ۱۰/٤، ٦۷/۵ و ۱۷٤/۱ گرم در کیلوگرم ماده خشک بود. افزودن سطوح مختلف گل بومادران به محیط کشت محتوی یونجه تغییر معنی‌داری بر قابلیت هضم مواد مغذی در هیچکدام از ساعات انکوباسیون نداشت. در ساعات اولیه انکوباسیون (۱۸ ساعت ≤) قابلت هضم ماده آلی تحت تاثیر سطوح مختلف برگ اکالیپتوس قرار نگرفت ولی در ساعات پایانی با افزودن سطوح بالاتر از ۱۰ درصد، قابلیت هضم فراسنجه‌های مورد اندازه گیری، روند کاهشی داشت ($p<0/05$). قابلیت هضم پروتئین‌خام یونجه تحت تاثیر سطوح مختلف برگ اکالیپتوس قرار گرفت و بیشترین کاهش در حضور ۲۰ درصد این گیاه بود. قابلیت هضم دیواره سلولی یونجه نیز در حضور سطوح مختلف برگ اکالیپتوس کاهش یافت و بیشترین کاهش در سطح ۲۰ درصد مشاهده شد. **نتیجه گیری نهایی**: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که دو گیاه مذکور اثرات متفاوتی روی قابلیت هضم مواد مغذی یونجه گذاشتند، به نحوی که برگ اکالیپتوس ضرایب هضم را کاهش داد در صورتی که گل بومادران تاثیر معنی-داری بر آن نداشت.

واژگان کلیدی: دیواره سلولی، ضرایب هضم، فراسنجه تخمیر، ترکیبات فنولی

مقدمه

محصولات تخمیری در شکمبه به‌طور عمده اسیدهای چرب فرار و پروتیین میکروبی است که قابل جذب در شکمبه و روده کوچک می‌باشند. اسیدهای چرب فرار در شکمبه می‌توانند منبع انرژی مهمی برای حیوان باشند (در حدود ۸۰ درصد؛ فرانس و سیدونز ۱۹۹۳). در حالی‌که پروتیین میکروبی که شکمبه را ترک می کند (به طور نمونه ۸۵-٦۰ درصد؛ ارسکف ۱۹۸۲) بخش

زیادی از پروتیین ورودی به روده کوچک دام را تأمین می‌کند. با توجه به اهمیت شکمبه در تغذیه حیوان میزبان، تا کنون علاقه‌مندی و تلاش‌های بسیاری برای بررسی روش‌هایی برای دستکاری این اکوسیستم پیچیده انجام پذیرفته یا در حال انجام است. اخیراً قوانینی در اتحادیه اروپا برای ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک به‌عنوان محرک رشد در خوراک‌های دامی وضع شده است. مبنای علمی برای این ممنوعیت براساس نگرانی‌هایی است که استفاده از این آنتی-بیوتیک‌ها در دام می‌تواند موجب انتقال بقایای آنها شود که ممکن است استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را در درمان انسان‌ها به مخاطره اندازد (کاسول و همکاران ۲۰۰۳). با این حال، حذف آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد، علاقه‌مندی به جایگزین‌هایی مناسب برای دستکاری تخمیر شکمبه ایجاد کرد. متابولیت‌های ثانویه در گیاهان به عنوان عامل محافظت گیاه در برابر میکروب‌ها و حمله حشرات تولید می‌شوند (آیسون ۲۰۰۵). اکثر این ترکیبات در میان تانن‌ها، ساپونین‌ها و آلکالوئیدها طبقه‌بندی می-شوند. فعالیت ضدمیکروبی این ترکیبات زیاد است، بنابراین ممکن است از آن برای دستکاری تخمیر شکمبه با ممانعت از یک گروه میکروبی خاص در اکوسیستم شکمبه استفاده نمود. بخش‌های مختلف گیاهان مانند دانه و برگ توسط آب، متانول یا اتانول عصاره‌گیری می‌شوند و برای ارزیابی فعالیت‌های ضد پروتوزوآیی و ضد تولید متان از طریق آزمایش تولید گاز (برون-تنی) مورد استفاده قرار می‌گیرند (کامرا و همکاران ۲۰۰۶). بسیاری از این ترکیبات برای دستکاری عملکرد گوارش در حیوانات نشخوارکننده و غیرنشخوارکننده استفاده می‌شوند (گریتید ۲۰۰۳). بنابراین، در تحقیق حاضر سعی شده است اثرات اضافه نمودن گیاه گل بومادران و برگ اکالیپتوس محتوی متابولیت‌های ثانویه روی قابلیت هضم به‌روش برون‌تنی درساعت‌های مختلف انکوباسیون مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد مطالعه و ترکیبات شیمیایی

گل بومادران (*Achillea millefolium*) و برگ اکالیپتوس (*Eucalyptus globolus*) از مزرعه دانشکده کشاورزی بخش گیاهان دارویی، برداشت و در شرایط محیط آزمایشگاه خشک گردید. تجزیه تقریبی مواد آزمایشی شامل ماده خشک، ماده آلی، رطوبت، خاکستر، پروتیین خام و عصاره اتری بر اساس روش (۱۹۹۰) AOAC و الیاف نامحلول در شوینده خنثی بر اساس روش ونسوست و همکاران (۱۹۹۱) انجام شد. نمونه‌های گیاهی خشک شده آسیاب و از غربال یک میلی‌متری عبور داده شدند.

اندازه گیری ترکیبات فنلی و تانن

نمونه‌های گیاهی پس از خشک شدن در سایه وسپس آسیاب نمودن و عبور از غربال یک میلی‌متری مورد استفاده قرار گرفتند.

عصاره گیری نمونه

مقدار ۲۰۰ میلی گرم نمونه خشک شده (چهار تکرار) در لوله‌های سانتریفیوژ وزن کرده و با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محلول استن ۷۰ درصد در ظرف محتوی یخ و به کمک اولتراسوند به مدت ۱۰ دقیقه عصاره گیری شد. سپس نمونه حاصل، به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و در پایان عصاره شفاف بالائی محلول سانتریفیوژ شده به‌وسیله سمپلر جدا شد و به عنوان "عصاره اصلی" برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و تانن مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین کل ترکیبات فنولی

محتوی کل ترکیبات فنولی قابل استخراج طبق روش جالکونن- تیتو (۱۹۸۵) و با استفاده از اسید تانیک به عنوان استاندارد، اندازه‌گیری شد. به این طریق که ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره شفاف، ۰/۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر فولین فنول شیکالتو یک مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد، در لوله‌های سانتریفیوژ با هم مخلوط شدند. بعد از اضافه کردن هر

محلول، عمل مخلوط کردن و تکان دادن به خوبی صورت گرفت. در این مرحله ۳ تکرار برای هر نمونه در نظر گرفته شد. محلول تهیه شده به مدت ۳۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. عصاره شفاف بالائی برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی برداشته شد و میزان جذب در ۷۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر[1] قرائت شد.

تعیین کل تانن قابل استخراج

دو میلی‌لیتر از عصاره اصلی هر تکرار به لوله‌های آزمایش حاوی پلی وینیل پلی پیرولیدون اضافه شد. سپس مدت ۵ دقیقه محلول کاملاً مخلوط شد. محلول حاصل مدت زمان ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و از عصاره شفاف بالائی برای اندازه‌گیری تانن استفاده شد. بدین طریق که ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره شفاف پلی وینیل پلی پیرولیدون، ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی لیتر فولین فنول شیکالتو (۱ مولار) و ۲/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد در لوله آزمایش با هم مخلوط و مدت زمان ۱۰ دقیقه در حمام یخ نگهداری شدند و هر چند وقت یکبار تکان داده و مخلوط شدند. سپس مدت زمان ۳۰ دقیقه در ٤۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از عصاره بالائی برای اندازه‌گیری کل تانن (تانن متراکم و قابل هیدرولیز) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. کل تانن‌های قابل استخراج از طریق تفاوت بین محتوی ترکیبات فنولی بعد و قبل از اضافه کردن پلی وینیل پلی پیرولیدون تخمین زده شد که شامل تانن‌های قابل استخراج متراکم و قابل هیدرولیز بود.

اندازه گیری ساپونین

پنجاه میلی‌گرم عصاره گیاهی (عصاره آبی گیاه) در لوله‌های سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و ۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی ۵۰ درصد به آن اضافه شد. محتوای داخل لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه به‌خوبی مخلوط و تکان داده شد و در دور ۳۵۰۰ مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس از مایع شفاف بالای لوله سانتریفیوژ برای تخمین ساپونین استفاده شد. ساپونین‌ها (استروئیدی) در عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش کالریمتری باکو و همکاران (۱۹۷۷) اندازه گیری شد. ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره ساپونین به لوله آزمایش حاوی ۱/۷۵ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه شد. سپس یک میلی لیتر محلول A (۹۹/۵ میلی‌لیتر اِتیل استات[2] + ۰/۵ میلی‌لیتر آنیز آلدهید[3]) و یک میلی‌لیتر محلول B (۵۰ میلی‌لیتر اِتیل استات + ۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ) به لوله اضافه شد و به‌طور کامل مخلوط و مدت زمان ۲۰ دقیقه در دمای ٦۰ درجه سانتی-گراد در حمام بخار نگهداری شد. بعد از سرد شدن در دمای اتاق، جذب در طول موج ٤۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

اندازه گیری قابلیت هضم ماده آلی، پروتیین خام و دیواره سلولی سطوح استفاده شده گیاهان در آزمایش مورد نظر شامل یونجه کامل به عنوان کنترل (صفر) و یونجه به همراه سطوح ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد از گل بومادران یا اکالیپتوس بود. برای بررسی اثر گیاهان روی قابلیت هضم در ساعت‌های مختلف انکوباسیون از مرحله اول (مرحله هضم بی‌هوازی یا هضم شکمبه‌ای) روش تیلی و تری (۱۹٦۳) استفاده شد. مایع شکمبه از دو رأس گوسفند نر بالغ نژاد سنجابی (۲-۳ ساله) با فیستولای شکمبه‌ای تهیه شد که روی یک جیره بر پایه علوفه همراه با کنسانتره تغذیه شدند. دی اکسید کربن به مدت ۲ دقیقه بدرون مایع شکمبه تزریق و سپس از پارچه پنیر چهار لایه عبور داده شد. محلول مورد نیاز انکوباسیون با بافر به نسبت ۱:٤ مخلوط شد. به محلول جدید دی اکسید کربن تزریق و در حمام بخار کاملاً

1. SP-200 Spectrophotometer (Pye Unicam, Cambridge, UK).

2. Ethyl acetate

3. Anisaldehyde

مخلوط شد. حدود ۵۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها (۵۰۰ میلی-گرم یونجه به‌عنوان کنترل، ٤٧٥ میلی‌گرم یونجه باضافه ۲۵ میلی‌گرم گل بومادران یا اکالیپتوس، به‌همین ترتیب برای سایر تیمارها) توزین و درون بطری‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. به این بطری‌ها ۵۰ میلی‌لیتر از محلول انکوباسیون اضافه شد. دریچه‌های بونسن روی هر کدام از بطری‌ها قرار گرفت و سپس بطری‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد برای زمان‌های ۱۲، ۱۸، ٢٤ و ٤٨ ساعت قرار داده شدند. برای هر تیمار ٤ تکرار در نظر گرفته شد. دو سری بطری در انکوباسیون قرار داده شد: یک سری برای محاسبه قابلیت هضم ماده آلی و پروتیین خام و سری دوم برای اندازه گیری قابلت هضم دیواره سلولی. بطری‌های بلانک شامل محتویات صاف شده شکمبه همراه بافر و بدون نمونه بود. پس از هر زمان انکوباسیون، محتویات بطری‌های سری اول به‌درون لوله‌های جداگانه ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (۱۱۰۰g) شدند. مایع بالای لوله‌ها جمع‌آوری شد. بطری‌ها با ٤٠ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم (۲۰ گرم در لیتر) شستشو داده و به لوله‌های محتوی باقیمانده سانتریفیوژ قبلی اضافه شد و مجدداً در دمای ٤ درجه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۱۰۰g) شد. مایع بالای لوله‌ها دور ریخته شد و باقیمانده در دمای ٥٥ درجه به مدت ٤٨ ساعت خشک شد تا ماده خشک باقیمانده بدست آید. باقیمانده خشک شده آسیاب و جهت اندازه گیری پروتیین خام و ماده آلی بر اساس روش (۱۹۹۰) AOAC مورد استفاده قرار گرفت. قابلیت هضم ماده آلی و پروتیین‌خام به-ترتیب بر اساس ماده آلی و پروتیین خام ناپدید شده از مقدار ماده خشک اولیه که در بطری‌ها ریخته شد، محاسبه گردید. محتویات بطری‌های سری دوم به درون فلاسک ٦٠٠ میلی‌لیتری ریخته شد و دوبار با ۲۵ میلی-لیتر محلول شوینده خنثی شسته شد (بلومل و بکر ۱۹۹۷) و محتویات برای تعیین دیواره سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

روش محاسبات

قابلیت هضم ماده آلی، پروتیین خام و دیواره سلولی یونجه پس از افزودن سطوح مختلف گل بومادران یا برگ اکالیپتوس بر اساس روش تفاوت چرچ و پوند (۱۹۸۸) محاسبه و ارایه شد.

روش آماری

چهار تکرار برای هر آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM) در نرم افزار SAS ویرایش ۸/۱ آنالیز شدند. مدل آماری مورد استفاده به‌صورت زیر بود:

$$Yij=\mu+Di+eij$$

در این مدل Yij مشاهده، μ میانگین هر فراسنجه، Di اثر سطح گیاه و eij خطای آزمایش می‌باشد. میانگین‌ها بر اساس روش دانکن مقایسه شدند.

نتایج

ترکیب شیمیایی و متابولیت‌های ثانویه

داده‌های حاصل از ترکیب شیمیایی و همچنین متابولیت‌های ثانویه یونجه، گل بومادران و برگ اکالیپتوس در جدول شماره ۱ ارایه شده است. یونجه محتوی مقادیر زیاد دیواره سلولی و مقدار متوسط پروتیین خام بود. دیواره سلولی گل بومادران بیشتر از برگ اکالیپتوس ولی چربی‌خام آن کمتر بود. مقادیر پروتیین‌خام هر دو گیاه نزدیک به هم بود. یونجه محتوی مقادیر کم کل تانن و ساپونین بود. برگ اکالیپتوس دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنولی بود و مقادیر کل تانن و ساپونین آن بیشتر از مقادیر مشابه در گل بومادران بود.

جدول۱- میانگین ترکیبات شیمیایی و میانگین ترکیب برخی متابولیت های ثانویه (گرم در کیلوگرم ماده خشک) یونجه، گل بومادران و برگ اکالیپتوس

	یونجه	گل بومادران	برگ اکالیپتوس
ماده آلی	۹۰۶/۱	۹۲۰	۹٤۳
پروتئین خام	۱۳۷	۱۰۲/۳	۹۹/۲
عصاره اتری	۱۲/۲	۷۱/۷	۱۵۹/۲
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (دیواره سلولی)	۵۹٦/۲	۵۰۳/٦	۳۸۰
کل ترکیبات فنولی	۵/۹	۲۳/۳	۸۹/۳
ترکیبات فنولی غیر تانن	۵/۵	۸/۰	۱۷/۱
کل تانن	۰/٤	۱۵/۳	۷۲/۲
ساپونین استروئیدی	۱۰/٤	٦۷/۵	۱۷٤/۱

اثرات گیاهان دارویی بر قابلیت هضم

افزودن گل‌بومادران در سطوح مختلف تاثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده‌آلی، پروتیین‌خام و دیواره‌سلولی یونجه نداشت (جدول ۲).

به عبارتی می‌توان اذعان نمود که مقادیر تانن و ساپونین موجود در گل‌بومادران به اندازه‌ای بالا نبود که بتواند در مقادیر اضافه شده تاثیری بر فعالیت میکروارگانیسم‌های محیط کشت داشته باشد و قابلیت هضم مواد مغذی را تحت تاثیر قرار دهد. در ساعات اولیه انکوباسیون (۱۸ ساعت اولیه) قابلیت هضم ماده - آلی تحت تاثیر برگ اکالیپتوس قرار نگرفت (جدول ۳). ولی در ساعات پایانی سطوح ۱۰ درصد و بالاتر از آن سبب کاهش قابلیت هضم ماده آلی شد به نحوی که بیشترین کاهش (۹ درصد) در سطح ۲۰ درصد برگ اکالیپتوس مشاهده شد. روند تاثیرگذاری برگ اکالیپتوس بر قابلیت هضم پروتیین‌خام و دیواره سلولی کاملاً متفاوت از اثرات گل بومادران بود. به‌نحوی که در ساعات اولیه انکوباسیون، حضور برگ اکالیپتوس سبب کاهش معنی‌دار قابلیت هضم پروتیین خام یونجه شد. افزایش سطوح برگ اکالیپتوس کاهش قابل ملاحضه‌ای در قابلیت هضم این فراسنجه داشت به نحوی که بیشترین اثر به جهت جایگزینی ۲۰ درصدی یونجه با اکالیپتوس مشاهده شد. روند تغییرات قابلیت هضم دیواره سلولی یونجه در حضور اکالیپتوس مشابه قابلیت هضم پروتیین بود و در کلیه ساعات انکوباسیون سبب کاهش قابلیت هضم شد. اثر سطح جایگزینی نیز معنی‌دار بود و بیشترین کاهش به سبب ۲۰ درصد برگ اکالیپتوس ثبت شد.

بحث

برخی مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه ساپونین‌ها عمدتاً با افزایش جمعیت باکتریایی در اکوسیستم شکمبه از طریق ممانعت شکارشدن توسط پروتوزوآ (چیک ۱۹۹۹؛ وینا و همکاران ۲۰۰۵) باعث افزایش نرخ تخمیر و به دنبال آن، هضم ماده خشک می‌شوند (تالیب و همکاران ۱۹۹٦). به عنوان نمونه در حضور عصاره آبی بومادران (به میزان ۰/۱۲۵ و ۰/٦۲۵ میلی‌گرم در میلی-لیتر مایع انکوباسیون) قابلیت هضم ظاهری ماده خشک افزایش یافت (آلکساندر و همکاران ۲۰۰۷). در حالی که در مطالعه حاضر اثر معنی‌داری بر فراسنجه‌های هضم مواد مغذی مشاهده نشد. احتمالاً مقادیر گل بومادران اضافه شده و محتوای متابولیت‌های ثانویه به اندازه کافی نبوده است که بتواند اثر قابل ملاحظه‌ای بر این

فراسنجه‌ها داشته باشد. اثرات کاهشی برگ اکالیپتوس بر فراسنجه‌های هضم به خصوص قابلیت هضم پروتیین‌خام و دیواره‌سلولی (جدول ۳) نشان داد که علی‌رغم اینکه سطوح اضافه شده به جیره پایه، مشابه گل بومادران بود، ولی روند تغییر کاملاً متفاوت بود.

جدول۲- اثر سطوح مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد ماده خشک) گل بومادران بر قابلیت هضم مواد مغذی (درصد ماده خشک) یونجه در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی؛(میانگین± انحراف معیار)

	ساعات انکوباسیون				
	٦	١٢	١٨	٢٤	٤٨
ماده آلی					
یونجه	٢١/٧١±١/٥٦	٢٧/٧٠±٠/٦٨	٣٢/٠٦±٠/٢٦	٣٧/٥٩±٠/٨١[ab]	٤٥/٣٦±١/٩٢
یونجه به همراه سطوح مختلف گل بومادران*					
٥ درصد	٢١/٨٧±٠/٢٥	٢٨/١٥±٠/٤٦	٣٣/٦٣±١/٧٦	٣٦/٩٢±٠/٧٥[b]	٤٤/٣١±١/٦٦
١٠ درصد	٢١/٧٦±٠/٠٨	٢٨/٩٧±٠/٠٧	٣٥/١٧±٢/٠٧	٣٧/٧٤±٠/٣٠[ab]	٤٣/٦١±٢/٨١
١٥ درصد	٢٠/٨٤±٢/٠٩	٢٨/٢٢±١/١١	٣٥/٣٦±٢/٤١	٣٧/٠٤±٠/٩٨[b]	٤٤/٠٤±١/٧٨
٢٠ درصد	٢١/٠٧±٠/٧٥	٢٩/١٧±٠/٤٦	٣٥/١٩±٠/٠٥	٤٠/٦٣±٠/٤٨[a]	٤٤/٦٣±١/٠٠
P-value	٠/٩١٣٢	٠/٤٨٢٤	٠/٤٠١٤	٠/١٠٨٨	٠/٤٩٠٣
SEM	٠/٤٢	٠/٢٨	٠/٦٩	٠/٥١	٠/٦٧
پروتئین خام					
یونجه	٣٧/٤٤±١/٣٣	٤٣/٦٢±١/٤٢[a]	٤٨/٧٥±٠/٣١	٥٣/٠٦±٠/٢٨	٥٧/٢٣±٢/٠٤
یونجه به همراه سطوح مختلف گل بومادران*					
٥ درصد	٣٧/٢١±١/٩٠	٤٣/٢٥±١/٣٦[ab]	٤٨/١١±٠/٦١	٥١/٧٠±٠/٧٢	٥٧/٥٤±٠/٨٧
١٠ درصد	٣٧/١٦±١/٦٧	٤٢/٦٢±١/٩٥[ab]	٤٧/٧٨±٢/٢٣	٥١/٥٨±٢/٠٥	٥٦/٩٥±١/٦١
١٥ درصد	٣٧/٣٠±٢/٣٠	٤٢/٦٧±٢/٩٧[ab]	٤٨/١٩±٢/٣٩	٥١/٩٦±٢/٣٤	٥٧/٢٣±١/٨٧
٢٠ درصد	٣٦/١٢±٠/٩٣	٤٠/٨٨±٢/٣٣[b]	٤٧/٢١±١/١٤	٥١/٧٨±٠/٤٣	٥٥/٦٢±٠/٧٨
P-value	٠/٤٩٥٠	٠/٢٠٠٧	٠/٨٩٤٦	٠/٨٠٥٣	٠/٣١٢١
SEM	٠/٥٨	٠/٧٦	٠/٥٥	٠/٥١	٠/٥٥
دیواره سلولی (NDF)					
یونجه	١٢/٨٠±١/٥٦[b]	١٧/٥٢±١/٣٨	٢١/٠٥±٠/٧٩	٢٢/٩٩±٠/٤١	٣٠/٧٣±٠/٢٦
یونجه به همراه سطوح مختلف گل بومادران*					
٥ درصد	١٣/٢٨±١/٤٧[a]	١٧/٩٢±١/١١	٢١/٢٣±٠/٩١	٢٣/٠٩±٠/٦٢	٣٠/٤٥±٠/٣٩
١٠ درصد	١٢/٨٨±١/٣٩[ab]	١٧/٦٧±١/١٦	٢١/٠٩±١/٣٩	٢٣/٤٢±١/٢٧	٢٩/٩٤±٠/٣٩
١٥ درصد	١٢/٨٩±١/٢٨[ab]	١٧/٩٤±٠/٧٢	٢٠/٠٧±١/٦٧	٢٢/٠٥±١/٦٢	٢٩/٦٧±٠/٧٣
٢٠ درصد	١٢/٩٣±١/٣٢[ab]	١٧/٤١±٢/٤٨	١٩/٩٤±١/٥٧	٢٢/٨٠±٠/٦٥	٢٩/٤٦±٠/٨٣
P-value	٠/١٦	٠/٨١	٠/٢٠	٠/٥٠	٠/١٥
SEM	٠/٤٧٣١	٠/٤٣٠٤	٠/٤٧٥٩	٠/٣٧٣١	٠/٢٢٨٣

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<٠/٠٥).

*داده‌ها پس از تصحیح انجام شده بنابر توصیه چرچ و پوند (۱۹۸۸) ارایه شده است.

جدول۳- اثر سطوح مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد ماده خشک) برگ اکالیپتوس بر قابلیت هضم مواد مغذی (درصد ماده خشک) یونجه در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی؛(میانگین± انحراف معیار)

	ساعات انکوباسیون				
	٦	١٢	١٨	٢٤	٤٨
ماده آلی					
یونجه	٢٢/٢٨±٢/٠٢	٣٠/٥٤±١/٢٤	٣٧/٩٦±٠/٥٢	٤٠/٤١±٠/٧٨^{a}	٤٤/٨٥±٠/٣٦^{a}
یونجه به همراه سطوح مختلف برگ اکالیپتوس*					
٥ درصد	٢٤/١٠±١/٠٥	٣١/٦٣±٠/٦١	٣٨/٥٦±٠/٠٤	٤١/٢٨±٠/٤٧^{a}	٤٥/٤٩±٠/٥٥^{a}
١٠ درصد	٢٢/٦٧±٠/٣١	٢٩/٨٣±٠/٩٤	٣٦/٢٦±٢/٥١	٣٨/٧٢±٠/٠٩^{ab}	٤٣/١١±٠/٠٣^{b}
١٥ درصد	٢٠/٩٠±٠/٣٠	٢٨/٢٧±٠/٤٩	٣٥/٥٣±١/٤٨	٣٦/٥٧±٠/٧٥^{bc}	٤٢/١٣±٠/٠٧^{bc}
٢٠ درصد	١٩/٨٣±٠/٩١	٢٨/٠١±١/٩٣	٣٤/٨١±١/٣٤	٣٥/٤٨±٠/٦٣^{c}	٤٠/٨٨±٠/٣٢^{c}
P-value	٠/٢٦٣٣	٠/٢٧٨٠	٠/٣١١٦	٠/٠١٣٧	٠/٠٠٣١
SEM	٠/٦١	٠/٥٩	٠/٦٧	٠/٧٦	٠/٥٧
پروتئین خام					
یونجه	٣٩/٤٩±٠/٨٨^{a}	٤٦/٠٩±٠/١٢^{a}	٥١/٠٦±٠/٥٣^{a}	٥٦/١٦±٠/٦٠^{a}	٦٥/٩١±٠/٧٨^{a}
یونجه به همراه سطوح مختلف برگ اکالیپتوس*					
٥ درصد	٣٩/٢٧±١/٥٢^{a}	٤٥/٤٣±٠/٨٥^{a}	٤٩/٧١±٠/٦٢^{ab}	٥٤/٠٤±١/٦٢^{b}	٦٣/٣٨±١/٥٣^{b}
١٠ درصد	٣٨/٤٢±١/١٥^{a}	٤٤/١٨±٠/٥٨^{a}	٤٨/٠٥±٠/٤١^{b}	٥٢/٠٦±١/٤٥^{c}	٦١/٥٨±١/٩٢^{c}
١٥ درصد	٣٥/٩٠±٠/٨١^{b}	٤١/٣٨±٠/٤٤^{b}	٤٤/٧٨±٠/٤٥^{c}	٤٨/٣٨±١/٣٤^{d}	٥٦/٧٩±١/٠٤^{d}
٢٠ درصد	٣٤/٧٠±١/١٥^{c}	٣٩/٦١±٠/٦٧^{b}	٤٤/٢٤±٠/٦٨^{c}	٤٧/٦٤±١/٥٦^{d}	٥٦/٣٣±١/٤٥^{d}
P-value	٠/٠٠٠٨	٠/٠٠٥٤	٠/٠٠٢١	٠/٠٠٠٥	٠/٠٠٠٤
SEM	٠/٧٤	٠/٨٤	٠/٩١	١/١٧	١/٣٢
دیواره سلولی (NDF)					
یونجه	١٠/٧٧±٠/٣٨^{a}	١٦/٦٨±٠/٦٧^{a}	٢٠/٣٥±١/١٤^{a}	٢٣/٧٦±١/٧٥^{a}	٣٠/٨٩±٠/٧٣^{a}
یونجه به همراه سطوح مختلف برگ اکالیپتوس*					
٥ درصد	١٠/٤٤±٠/٥٧^{ab}	١٦/٦١±٠/٤١^{a}	١٩/٩١±٠/٧١^{a}	٢٣/١٦±١/٢٦^{a}	٣١/٢٧±٠/٦٨^{a}
١٠ درصد	٩/٩٨±٠/١٧^{bc}	١٤/٥٨±٠/٣٢^{ab}	١٨/٤٣±٠/٨٧^{b}	٢٠/٦٦±٠/٥٣^{b}	٢٨/٨١±٠/٦٥^{b}
١٥ درصد	٩/٨٠±٠/٣٣^{c}	١٤/٤٠±٠/٧٥^{ab}	١٨/١٦±٠/٧٢^{bc}	٢٠/٤٨±٠/٧٢^{b}	٢٧/٥١±٠/٣٤^{c}
٢٠ درصد	٩/١٥±٠/٣٥^{d}	١٤/٠٠±٠/٢٥^{b}	١٧/٤٦±١/٠٥^{c}	١٩/٧٦±١/٠١^{b}	٢٧/٠١±١/١٢^{c}
P-value	٠/٠٠٧٧	٠/٠٧٥٥	٠/٠٠١٧	٠/٠١٣٤	٠/٠٠١٢
SEM	٠/٢٢	٠/٤٢	٠/٤٧	٠/٦٥	٠/٦٢

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p<0/05$).

*داده‌ها پس از تصحیح انجام شده بنابر توصیه چرچ و پوند (۱۹۸۸) ارایه شده است.

بالاتر بودن میزان متابولیت‌های ثانویه این گیاه (جدول ۱) در مقایسه با گل بومادران می‌تواند دلیلی بر تفاوت در روند تغییر باشد، هر چند نوع و نسبت ترکیبات متابولیت‌های ثانویه نیز عامل مهمی در اثرگذاری

گیاهان دارویی بر قابلیت هضم محسوب می‌شود. از طرفی، ساپونین‌ها و تانن‌های موجود در گیاهان دارویی به عنوان ترکیباتی هستند که در دزهای پایین اثرات مطلوبی روی فعالیت شکمبه دارند؛ هرچند، سطوح بالای آن ممکن است اثرات معکوسی بر الگوی تخمیر شکمبه داشته باشد (هس و همکاران ۲۰۰۳). با توجه به این نکته که برگ اکالیپتوس دارای مقادیر قابل ملاحظه‌ای تانن و ساپونین می‌باشد می‌توان چنین استنباط کرد که ساپونین‌ها در محیط شکمبه یا در انکوباسیون مایع شکمبه با تجزیه کلسترول غشایی پروتوزوآ و در نهایت مرگ پروتوزوآ (چیک ۱۹۹۹) سبب کاهش تجزیه-پذیری پروتیین خوراک وابسته به پروتوزوآ می‌شوند. علاوه بر این، گزارش شده است که ساپونین‌ها با دیواره سلول پروتوزوآ کمپلکس تشکیل می‌دهند که باعث از هم گسستگی دیواره سلولی و از بین رفتن پروتوزوآ می‌شوند (فرانسیس و همکاران ۲۰۰۲). تانن-ها و ترکیبات فنلی موجود در گیاه نیز در محیط شکمبه (یا مایع انکوباسیون) با ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین بخش تانن و پروتیین با ایجاد یک کمپلکس غیرقابل هضم برگشت پذیر تحت تاثیر pH، باعث کاهش قابلیت انحلال پروتیین و تجزیه‌پذیری آن توسط باکتری‌های شکمبه می‌شوند (نیگوا و همکاران ۲۰۰۲) و پروتیین را از آنزیم‌های میکروبی محافظت می‌کنند. هم چنین تانن‌ها به علت مهار آنزیم‌های پروتئولیتیک در شکمبه باعث کاهش تجزیه پذیری پروتیین می‌شوند (بلومل و همکاران ۱۹۹۷). با توجه به اینکه بخش عمده‌ای از دیواره سلولی مواد خوراکی در شکمبه توسط میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌های میکروبی مورد هضم قرار می‌گیرد، تغییر در جمعیت میکروبی شکمبه اثرات مستقیمی بر هضم این بخش از خوراک دارد به‌طوری که در آزمایشی گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه از طریق تغییر در فلور میکروبی شکمبه و تحریک رشد میکروارگانیسم‌های مرتبط با هضم فیبر، پتانسیل هضم دیواره سلولی موادخوراکی افزایش یافت و افزودن عصاره بخش هوایی بومادران به جیره، تجزیه پذیری دیواره سلولی جیره را به میزان ۱۳ درصد افزایش ($p<۰/۰۵$) داد (برودیسکو و همکاران ۲۰۰۲). همچنین با افزودن ساپونین‌های سسبانیا، افزایشی در جمعیت *فیبروباکتر سوکسینوژنز* (۴۵-۲۱ درصد) و *رومینوکوکوس فلاوفاسینز* (۴۰-۲۳ درصد) مشاهده گردید (گل و همکاران ۲۰۰۸a). برخی مطالعات نشان می‌دهد که ساپونین نقش مهمی در افزایش باکتری‌های تجزیه‌کننده فیبر (گل و همکاران ۲۰۰۸b ؛ پاترا و همکاران ۲۰۰۸) و همچنین قارچ‌های بی‌هوازی دارد (گل و همکاران ۲۰۰۸b). در مطالعه کنونی روند تغییرات کاملاً متفاوت از نتایج این محققین بود و افزودن گل بومادران تغییری بر قابلیت هضم پروتیین‌خام و دیواره سلولی نداشت ولی برگ اکالیپتوس به میزان قابل ملاحظه‌ای هر دو فراسنجه را کاهش داد. مطالعات متعددی به منظور بررسی اثرات گیاهان دارویی بر قابلیت هضم انجام شده و نتایج متفاوتی گزارش شده است. ناصری و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تخم شنبلیله تاثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده آلی نداشت هرچند سبب افزایش قابلیت هضم پروتیین خام و کاهش قابلیت هضم دیواره سلولی شد. از طرفی ریشه مارچوبه در سطوح پایین (حداکثر ۱۰ درصد ماده خشک) سبب بهبود هضم ماده آلی شد ولی سطوح بالاتر آن سبب کاهش معنی‌دار قابلیت هضم این فراسنجه شد. روند تاثیر ریشه مارچوبه بر قابلیت هضم پروتیین خام و دیواره سلولی شبیه اثرات برگ اکالیپتوس بود و کاهش این دو فراسنجه را در ساعات مختلف انکوباسیون به همراه داشت. این در حالی است که ترکیب درصد و میزان ترکیبات فنولی این گیاهان کاملاً با هم متفاوت است. علاوه بر آن، ال-حسن (۱۹۹۴) بیان نمود که اثرات سمی گونه های واجد تانن روی پروتوزوآ تنها به سبب خود تانن‌ها نیست بلکه حضور سایر متابولیت‌ها نظیر ساپونین‌ها است. آزمایشاتی مبنی بر توان عادت‌پذیری میکروب‌های

شکمبه به ترکیباتی نظیر ساپونین وجود دارد. به عنوان مثال مکار و بکر (۱۹۹۷) اظهار نمودند که تا ٦ ساعت انکوباسیون با مایع شکمبه، تغییری در ساپونین کوالاجا مشاهده نشد ولی با طولانی‌تر شدن زمان انکوباسیون، تجزیه ساپونین افزایش یافت به نحوی که در ٢٤ ساعت به ۱۰۰ درصد رسید؛ این درحالی بود که در حضور مایع شکمبه اتوکلاو شده حتی تا ٢٤ ساعت انکوباسیون تاثیری روی ساپونین نداشت. این محققین دریافتند که میکروب‌های شکمبه دارای آنزیم‌هایی هستند که قادر به تجزیه ساپونین می‌باشند. همچنین، ماتیسون و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که در عدم حضور باکتری‌های فعال، ٧٤ درصد ساپونین‌های یونجه بعد از ۸ ساعت انکوباسیون، در مایع شکمبه ظاهر شدند و تا ٢٤ ساعت تغییری در آنها مشاهده نشد. اما در حضور باکتری‌های فعال پس از ٤ ساعت انکوباسیون، غلظت ساپونین در مایع شکمبه کاهش یافت. این محققین علت کاهش را تجزیه ساپونین توسط میکروب‌ها دانستند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش، سطوح به کار رفته گل بومادران و برگ اکالیپتوس در این آزمایش نشان داد که روند تاثیرگذاری این دو گیاه دارویی بر هضم پذیری یونجه کاملاً متفاوت بود. احتمالاً یکی از دلایل اصلی این تفاوت، وجود مقادیر، نوع و نسبت‌های متفاوت متابولیت‌های ثانویه‌ای نظیر ساپونین و تانن باشد.

منابع مورد استفاده

Alexander G, Singh B, Sahoo A and Bhat TK, 2007. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. Anim Feed Sci Technol 145: 229-242.

AOAC, 1990. Official Analytical Methods (15th ed). Association of Official Analytical Methods Inc, Arlington, VA, USA (index No. 942.04 976. 05).

Baccou JC, Lambert F and Sauvaire Y, 1977. Spectrophotometric method for determination of total steroidal sapogenin. Analyst 102: 458-465.

Blümmel M, and Becker K, 1997. The degradability characteristics of 54 roughages and roughage neutral detergent fiber as described by in-vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. Brit J Nut 77: 757–786.

Blümmel M, Makkar HPS and Becker K, 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. J Anim Physiol Anim Nut 77: 24-34.

Broudiscou LP, Papon Y and Broudiscou AF, 2002. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial mass in a dual flow fermenter. Anim Feed Sci Technol 101: 183-189.

Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P and Phillips I, 2003. The European ban on growth promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. J Antimicrob Chem 159: 80-93.

Cheeke PR, 1999. Actual and potential application of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition, In: Proceedings of the American Society of Animal Science, USA, pp.1-9.

Church DC, Pond WG, 1988. Basic Animal Nutrition and Feeding, (3rd ed). John Wiley and Sons, New York, Pp. 472.

El-Hassen SM, 1994. Yeast Culture and Multipurpose Fodder Trees as Feed Supplements for Ruminants. PhD Thesis. University of Aberdeen, Aberdeen, UK.

France J and Siddons RC, 1993. Volatile fatty acid production. In: JM Forbes and J France (eds), Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, pp. 107-121, CAB International, Cambridge, UK.

Francis G, Kerem Z, Makkar HPS and Becker K, 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. Brit J Nut 88: 587–605.

Goel G, Makkar HPS and Becker K, 2008a. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. Anim Feed Sci Technol 147: 72-89.

Goel, G, Makkar HPS and Becker K, 2008b. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. Appl Microbiol 105: 770–777.

Greathead H, 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proceedings of the Nutrition Society, Cambridge University Press 62: 279-290.

Hess HD, Kreuzer M, Diaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva CR and Machmüller A, 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. Anim Feed Sci Technol 109: 79–94.

Iason G, 2005. The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivore: Ecological perspectives. Proceeding of the Nutrition Society, Cambridge University Press, 64: 123–131.

Kamra DN, Singh B, Chaudhary LC, Agarwal N and Pathak N, 2006. Soapnut as natural defaunating agent: its effect on rumen fermentation and in sacco degradability of jowar hay in buffaloes. Buffalo J 1: 99-204.

Julkunen-Titto R, 1985. Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Method for the analysis of certain phenolics. J Agric Food Chem 33: 213-217.

Makkar HPS and Becker K, 1997: Degradation of Quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. Lett Appl Microbiol 25: 243–245.

Mathison GW, Siawash R, Klita PT, Okine EK and Sedgwick G, 1999. Degradability of alfalfa saponins in the digestive tract of sheep and their rate of accumulation in rumen fluid. Can J Anim Sci 79: 315–319.

Naseri V, Hozhabri F and Kafilzadeh F, 2013. Assessment of *in vitro* digestibility and fermentation parameters of alfalfa hay-based diet following direct incorporation of fenugreek seed (*Trigonella foenum*) and asparagus root (*Asparagus officinalis*). J Anim Physiol Anim Nut 97: 773–784.

Nigwa A, Nsahlai IV and Iji P, 2002. Effect of supplementing veld hay with a dry meal or silage from pods of *Acacia sieberiana* with or without wheat bran on voluntary intake, digestibility, excretion of purine derivatives, nitrogen utilization and weight gain in South African merino sheep. Livest Prod Sci 77: 253-264.

Patra AK, Kamra DN, Agarwal N and Chatterjee PN, 2008. Effect of *Terminalia chebula* and *Allium sativum* on rumen fermentation, enzyme activities and microbial counts in buffalo. Indian J Anim Nut 24: 251–255.

Ørskov ER, 1982. Protein Nutrition in Ruminants. London and New York: Academic Press.

SAS Institute Inc. 2006. Base SAS® 9.1.3 Procedures Guide, Second Edition, Volumes 1, 2, 3, and 4. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Thalib A, Widiawatii Y, Hamid H, Suherman D and Sabrani M, 1996. The effects of saponin from *Sapindus rarak* on ruminal flora and fermentation characteristics in vitro. J Ilmu Ternak dan Veteriner 2: 17-20.

Tilly JMA and Terry RA, 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J Brit Grassl Soc 18: 104 -111.

Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 74: 3583–3591.

Wina E, Muetzel S and Becker K, 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production, (a review). J Agr Food Chem 53: 8093–8105.

Effect of Yarrow flower (*Achillea millefolium*) and Eucalyptus leaf (*Eucalyptus globolus*) on *in vitro* digestibility of alfalfa hay

F Hozhabri[1*], A Shemshadi[2] and F Kafilzadeh[1]

Received: February 27, 2015 Accepted: July 09, 2015
[1]Associate Professor and Professor, respectively, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
[2]Former MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
[*]Corresponding Author: Email: hozhabri@razi.ac.ir

Abstract
BACKGROUND: Achillea flower and Eucalyptus including phenolic components which may affect rumen fermentation pattern. **OBJECTIVES:** This study carried out to evaluate effect of *Achillea millefolium* flower (AM) and *Eucalyptus globolus* leaf (EG) on alfalfa OM, CP and NDF digestibility (*in vitro*) at different incubation times (6, 12, 18, 24 and 48h). **METHODS:** Rumen liquor collected from two Sanjabi sheep fitted with permanent fistula and in vitro nutrients digestibility were measured using Tilly and Terry procedure. Treatments were alfalfa (control) and alfalfa plus different levels (5, 10, 15 and 20% of DM) of AM or EG. **RESULTS:** Total phenolic components of alfalfa, AM and EG were 5.9, 23.3 and 89.3 g/Kg DM, whereas total tannins were 0.4, 15.3 and 72.2 g/ Kg DM. Saponins were at the rate of 10.4, 67.5 and 174.1 g/ Kg DM, respectively. Incorporation of different levels of AM to the media containing alfalfa resulted in no significant alteration in OM, CP and NDF digestibility. Replacement of alfalfa by EG at initial stage of incubation (≤ 18 h) had no significant effect on digestibility but following prolongation of incubation it decreased ($P<0.05$) nutrients digestibility. Crude protein digestibility start to decline due to partial replacement of alfalfa hay by EG and highest effect was observed at 20 percent. NDF digestibility of alfalfa also decreased ($P<0.05$) by incorporation of EG to the media. **CONCLUSION:** It can be concluded that, both herbal plants were influenced nutrients digestibility of alfalfa in different manner. Although, EG decreased nutrients digestibility of alfalfa at different percentage level but AM did not influence its digestibility.

Keywords: Cell wall, Digestibility coefficients, Fermentation parameter, Phenolic compounds