

تعیین ایجاد مدل کالیبراسیون طیف‌سنج مادون قرمز نزدیک انعکاسی (NIRS)

جهت برآورد کیفیت علوفه گونه‌های بوته‌ای

- ❖ حسین ارزانی؛ استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
- ❖ وحیده عبداللهی*؛ عضو هیئت علمی مجتمع آموزش عالی سراوان، سیستان و بلوچستان.
- ❖ جواد معتمدی؛ دانشیار پژوهشی، بخش تحقیقات مرتع، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.
- ❖ مجید آخشی؛ کارشناس ارشد آبخیزداری و کارشناس آزمایشگاه، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

چکیده

امروزه بیشتر توجهات، جهت اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی گونه‌های مرتعی، بر روش‌های فیزیکی و کم هزینه از جمله طیف‌سنج اشعه مادون قرمز نزدیک (NIRS) متمرکز شده است. از این‌رو هدف از پژوهش حاضر، ارائه مدل‌های کالیبراسیونی برای طیف‌سنج مادون قرمز نزدیک انعکاسی (NIRS) به منظور برآورد مقادیر شاخص‌های کیفیت علوفه گونه‌های بوته‌ای می‌باشد تا از این طریق، ضمن صرفه‌جویی در وقت و هزینه، با دقتی مناسب، کیفیت این گیاهان را برآورد کرد. برای این منظور در مجموع، ۶۵۴ نمونه از مراحل رشد رویشی، گل‌دهی و بذردهی به منظور برآورد مقادیر ازت (N)، پروتئین خام (CP)، لیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF)، ماده خشک قابل هضم (DMD) و انرژی متابولیسمی (ME) از طریق NIRS، توسط دستگاه DA7200 Perten، پرتوتابی شد. سپس داده‌های حاصل از پرتوتابی به منظور آنالیز چند متغیره، به نرم‌افزار Unscrambler منتقل گردید. قبل از برازش مدل، برای یکنواخت و نرمال‌سازی پراکنش داده‌ها از روش S.Golay و SNV استفاده شد. ایجاد مدل کالیبراسیون با روش PLS1 و اعتبارسنجی مدل به روش Cross Validation انجام شد. سپس قابلیت پیش‌بینی مدل‌های ایجاد شده، با در نظر گرفتن آماره‌های کالیبراسیون ارزیابی و در مجموع ۱۸ برنامه کالیبراسیون تهیه شد. با در نظر گرفتن آماره‌های کالیبراسیون می‌توان گفت در تمام فاکتورهای مورد مطالعه، ضریب تشخیص بالای ۰/۸۰ بوده است. همچنین در همه مراحل رشد، ضریب همبستگی بین داده‌های مرجع و برآورد شده توسط NIR بالای ۰/۹۰ درصد بوده است. بنابراین می‌توان بیان کرد کالیبراسیون‌های NIR حاصل از این مطالعه می‌تواند در برنامه‌های کنونی و آینده برای ارزیابی کیفیت علوفه گیاهان بوته‌ای مورد تغذیه دام مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژگان: کالیبراسیون، کیفیت علوفه، گیاهان بوته‌ای، مرحله رشد، NIRS.

۱. مقدمه

گونه‌های بوته‌ای، منبع مهم مواد غذایی برای دام‌های اهلی و حیات وحش در نواحی خشک و نیمه‌خشک می‌باشند. در این نواحی، مصرف بوته‌ای‌ها، بیش از ۵۰ درصد رژیم غذایی دام را شامل می‌شود. این امر در طول دوره‌های خشک که مقدار تولید علوفه، کاهش یافته و به دلیل نسبت پائین برگ به شاخه، ارزش غذایی آن‌ها نیز کم است، نمود بیشتری دارد [۱۴]. از این رو اطلاع از مقادیر شاخص‌های کیفیت علوفه آن‌ها، از ملزومات اساسی جهت برنامه‌ریزی خوراک‌دهی دام در مرتع در این نواحی می‌باشد.

روش‌های بسیاری برای اندازه‌گیری ارزش غذایی علوفه، توسعه یافته‌اند که به‌طور کلی شامل استفاده از دام (In- Vivo)، تلفیق آزمایشگاه- دام (In- Situ) و روش‌های آزمایشگاهی (In- Vitro) هستند. اگرچه این روش‌ها، دشوار، زمان‌بر و پرهزینه هستند ولی این معایب، زمانی اهمیت دو چندان پیدا می‌کنند که نیاز به تجزیه و تحلیل تعداد زیادی نمونه برای اطلاع از مقادیر شاخص‌های کیفیت علوفه باشد [۱۲]. نیاز به تجزیه و تحلیل تعداد زیادی از نمونه‌ها در زمان اندک، باعث تلاش جهت پیدا کردن روش‌های فیزیکی و شیمیایی جایگزین شده که هم سریع بوده و هم این که نیاز اندکی به آماده‌سازی نمونه داشته باشند. امروزه بیشترین توجه بر روش‌های فیزیکی از جمله طیف‌سنج مادون قرمز نزدیک انعکاسی (NIRS) متمرکز شده است. استفاده از تکنیک NIRS برای تعیین پارامترهای کیفیت علوفه، از اوایل دهه ۱۹۷۰ گزارش شده است [۱۲]. اساس کار NIRS شامل نوری از طول موج‌های ۱۱۰۰-۲۵۰۰ نانومتر است که از روی مواد جامد خشک بازتاب می‌شود و شامل اطلاعات ترکیبی است که می‌تواند توسط یک کامپیوتر استخراج گردد و آنالیزهای متعدد را در کمتر از یک دقیقه گزارش دهد [۲۰].

به منظور استفاده از دستگاه طیف‌سنج انعکاسی مادون قرمز نزدیک (NIR) برای برآورد کیفیت علوفه، این دستگاه باید با استفاده از یک مجموعه‌ای از نمونه‌ها که ترکیب شیمیایی آن‌ها شناخته شده است، کالیبره گردد [۸]. بنابراین شرط اساسی برای استفاده از NIRS، قابلیت دسترسی به اطلاعات شیمیایی دامنه و سعی از نمونه‌ها جهت توسعه کالیبراسیون ماده مورد نظر است. کالیبراسیون، فرایند توسعه روابط ریاضی بین طیف NIR و مقادیر کیفی است که توسط روش مرجع تعیین شده است. یک معادله کالیبراسیون رضایت‌بخش، بستگی به اطلاعات قابل اعتماد و یک مدل ریاضی مناسب برای به‌دست آوردن روابط پیش‌بینی دارد [۸]. تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که داده‌های کالیبراسیون به‌جای استفاده از داده‌های مربوط به یک نوع علوفه، باید از علوفه‌های مشابه از لحاظ طبقه (تاگسونومی)، سن، نوع رویشگاه و ... تهیه گردند تا بتوان از آن‌ها برای ایجاد معادله پیش‌بینی کلی استفاده کرد که برای انواع علوفه‌ها خوب عمل کند [۲۵].

در این راستا، با کاربرد NIR جهت تعیین کیفیت غذایی گاو، معادلات پیش‌بینی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای CP و DOM (با R^2 به ترتیب ۰/۸۰ و ۰/۹۲) ارائه گردید. در این ارتباط، میزان SEC (خطای استاندارد کالیبراسیون) و CEV (خطای استاندارد اعتبارسنجی) حدود ۱/۶۶ و ۱/۶۵ برای DOM و ۰/۸۹ و ۰/۹۲ برای CP قابل قبول بودند [۱۷]. همچنین دقت NIRS، برای اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی شبدر سفید (*Trifolium repens*)، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، کالیبراسیون‌های NIRS برای خاکستر، CP، CF، NDF، ADF و ADL استخراج گردید. در مجموع ۱۴۵ نمونه برای کالیبراسیون و اعتبارسنجی متقابل معادلات استخراج شده و یک مجموعه مستقل و جداگانه (۶۵ نمونه)، برای تست پیش‌بینی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. خطاهای استاندارد کالیبراسیون و اعتبارسنجی متقابل، به‌صورت درصد میانگین به ترتیب ۳/۵ تا ۵/۵ برای خاکستر، ۳/۰ و ۴/۲

¹ Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS)

کنترل دما و رطوبت می تواند دلیل کالیبراسیون ضعیف برای این پارامتر باشد، اما در کل، پیش بینی خوبی برای پارامترهای کیفیت حاصل گردید [۱۱]. پتانسیل NIRS برای تعیین خواص کیفی *Cytisus multiflorus* به عنوان خوراک دام، مورد ارزیابی قرار گرفت. کالیبراسیون های NIRS برای CP، NDF، ADF، سلولز، همی سلولز، خاکستر و قابلیت هضم مواد آلی خشک (OMD) ایجاد گردید. نتایج نشان داد مدل های کالیبراسیون برای پیش بینی CP با $r^2 = 0/99$ ، $SEP = 3/8 \text{ g kg}^{-1}$ ؛ برای DMD با $r^2 = 0/98$ ؛ برای NDF با $r^2 = 0/98$ ، $SEP = 15/7 \text{ g kg}^{-1}$ ؛ برای ADF با $r^2 = 0/94$ ، $SEP = 13/3$ ؛ برای سلولز با $r^2 = 0/96$ ، $SEP = 12/2 \text{ g kg}^{-1}$ و برای خاکستر با $r^2 = 0/91$ ، $SEP = 1/1 \text{ g kg}^{-1}$ دقیق بودند، اما نتیجه کالیبراسیون لیگنین با $r^2 = 0/76$ ، $SEP = 7/0 \text{ g kg}^{-1}$ و همی سلولز با $r^2 = 0/88$ ، $SEP = 13/6 \text{ g kg}^{-1}$ دقت پائین تری داشت. همچنین نتایج پژوهش، نشان داد که طیفسنج NIR می تواند برای پیش بینی سریع و دقیق ویژگی های کیفی برای گونه مورد نظر استفاده شود [۱۴]. در پژوهشی با هدف ایجاد یک مدل کالیبراسیون NIR برای CP با استفاده از مقادیر شیمیایی حاصل از روش کجلدال برای ۵۰ نمونه علوفه، رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLS) برای به دست آوردن مدل NIR-CP استفاده گردید که نتایج نشان داد؛ تکنولوژی NIR با موفقیت می تواند برای تعیین سریع و ارزان پروتئین خام استفاده شود [۱۵]. با بررسی پارامترهای کیفیت علوفه توسط دستگاه طیفسنج مادون قرمز نزدیک، گزارش شد که ضریب تبیین (R^2)، اشتباه استاندارد کالیبراسیون (SEC) و اشتباه استاندارد پیش بینی (SEP)، از سطح بالایی از دقت برخوردار بودند. در این ارتباط، مقدار SEC با $0/15 - 1/09$ ، $0/83 - 0/94$ ، $0/21 - 0/86$ و $0/13 - 0/75$ ، $0/62 - 0/34$ ، $0/31 - 0/84$ ، $0/17 - 0/61$ ، به ترتیب برای صفات پروتئین خام، قابلیت هضم، دیواره سلولی منهای همی سلولز و خاکستر کل به دست آمد. مقادیر همبستگی بین داده های آزمایشگاهی و نتایج پیشگویی

برای CP، ۴/۴ و ۵/۰ برای CF، ۳/۷ و ۴/۷ برای NDF، ۳/۳ و ۴/۲ برای ADF و ۱۴ و ۱۶ برای ADL گزارش شد. نتایج نشان داد کالیبراسیون های NIR به دست آمده، پتانسیل این را دارد که در برنامه های اصلاحی برای ارزیابی کیفیت شبدر سفید مورد استفاده قرار گیرد [۸]. طیف NIR، برای ۱۳۵ نمونه از غلات سبز، از طریق بازتاب از مواد گیاهی خشک به دست آمد که نتایج حاصل از مدل کالیبراسیون در خصوص شاخص خاکستر، SEC = ۰/۷۲ و $r^2 = 0/90$ ؛ برای CP، SEC = ۰/۶۳ و $r^2 = 0/98$ ؛ برای CF، SEC = ۱/۰۲ و $r^2 = 0/94$ ؛ برای NDF، SEC = ۱/۴۱ و $r^2 = 0/97$ ؛ برای ADF، SEC = ۱/۴۳ و $r^2 = 0/96$ بود. در این ارتباط، مشخص شد که NIR، پیش بینی قابل قبولی از ترکیب گونه های مختلف غلات و حبوبات ارائه می دهد [۹]. روش غیرمستقیم و NIRS مدفوع، جهت توسعه یک معادله پیش بینی برای مقدار تانن در رژیم غذایی گوسفند، به کار برده شد که اعتبارسنجی این معادله با یک مجموعه مستقل از نمونه ها، نتایج نسبتاً موفق را به همراه داشت ($R^2 = 0/61$) [۲۳]. برای پیش بینی ترکیب شیمیایی ذرت در ارگونه، روش NIRS مورد استفاده قرار گرفت. در این خصوص، ۴۰۰ نمونه از محدوده ۴۰۰ تا ۲۵۰۰ نانومتر اسکن شدند. معادلات پیش بینی با استفاده از رگرسیون حداقل مربعات جزئی اصلاح شده (MPLS) با اعتبارسنجی متقابل پس از تصحیح پراکندگی با کاربرد SNV، توسعه یافت. مقادیر R^2 و خطاهای استاندارد اعتبارسنجی (SECV) مدل های کالیبراسیون، به صورت ۰/۷۲ (SECV ۹/۵)، ۰/۹۶ (SECV ۷/۷)، ۰/۹۸ (SECV ۱۶/۵)، ۰/۹۶ (SECV ۳۴/۳)، ۰/۹۸ (SECV ۱۷/۸) و ۰/۹۸ (SECV ۶/۱) به ترتیب برای DM، CP، ADF، NDF و IVOMD و خاکستر، بر حسب g/kg وزن خشک محاسبه شد. بررسی ها نشان داد که برای اغلب پارامترها، آماره های کالیبراسیون خوبی حاصل شد، اما DM ضعیف ترین آماره کالیبراسیون را داشت که دلیل آن هم عدم توافق بین روش مرجع (خشک کردن در آن) و اندازه گیری NIR بوده است. ذخیره سازی نمونه بدون

گونه‌های بوته‌ای انجام شد تا ضمن صرفه‌جویی در وقت و هزینه، با دقتی مناسب بتوان درصد نیتروژن (N)، پروتئین خام (CP)، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF)، ماده خشک قابل هضم^۳ (DMD) و انرژی متابولیسمی (ME) را برآورد کرد.

۲. روش شناسی

۱،۲. اندازه‌گیری مقادیر شاخص‌های کیفیت

علوفه به روش شیمیایی

برای انجام پژوهش حاضر، در گام اول نتایج مربوط به مقادیر شاخص‌های کیفیت علوفه گونه‌های بوته‌ای که مرتبط با نتایج طرح کیفیت علوفه مناطق مختلف آب و هوایی است [۴]، از بانک اطلاعاتی موجود استخراج گردید. در جدول ۱، گونه‌های بوته‌ای مورد بررسی و گسترش آن‌ها در مکان‌های انتخابی مناطق مختلف رویشی، ارائه شده است. برای این منظور از هر گونه در هر مرحله رشد (شامل رشد رویشی، گلدهی و بذردهی)، سه نمونه و برای هر نمونه حداقل پنج پایه گیاهی به‌طور تصادفی از نقاط مختلف مرتع جمع‌آوری شده است [۴] و مقادیر شاخص‌های کیفیت علوفه آن‌ها طبق دستورالعمل AOAC^۵ [۳] در آزمایشگاه اندازه‌گیری شده است.

۲،۲. اسکن نمونه‌های گیاهی با دستگاه NIRS

ایجاد معادلات کالیبراسیون

از باقی‌مانده نمونه‌ها در آزمایشگاه حدود ده تا سی گرم جهت کالیبراسیون استفاده شد. از نمونه‌های که به روش شیمیایی آنالیز شده بودند جمعاً ۲۴۸ نمونه از مرحله رشد رویشی، ۲۴۱ نمونه از مرحله گل‌دهی و ۱۶۵ نمونه از مرحله بذردهی برای کالیبراسیون از طریق NIRS، در نظر

NIR برای تمام صفات به‌ویژه پروتئین خام، خیلی بالا بود (<۹۵٪) [۱۰].

چهار مدل NIRS، برای پیش‌بینی محتوای CP، ADF، NDF و WSC (کربوهیدرات‌های محلول در آب) در گونه *Lolium multiflorum* ایجاد شد. مدل‌های بهینه بر اساس داده آزمایشگاهی و اطلاعات طیفی با رگرسیون حداقل مربعات جزئی توسعه پیدا کرد. مدل‌ها با استفاده از یک مجموعه کاملاً مستقل از نمونه‌ها، اعتبارسنجی شدند و ضریب تعیین نسبتاً بالایی داشتند [۲۸]. همچنین تعداد ۱۷۳ نمونه از برنج قهوه‌ای و ۸۶ نمونه سبوس برنج، جهت توسعه مدل‌های کالیبراسیون برای پروتئین دانه و مقدار آمیلوز برنج قهوه‌ای و ترکیبات پروتئین، روغن خام، رطوبت، خاک‌ستر و مقدار فیبر در سبوس برنج، به کار برده شد. مدل‌های مختلف PLS اصلاح شده با بهترین تیمار ریاضی برای همه ترکیبات شناسایی شد. مجموعه دیگری شامل ۲۶ نمونه برای برنامه اعتبارسنجی مدل‌های کالیبراسیون، مورد استفاده قرار گرفت. دقت بالای همه این مدل‌های کالیبراسیون و مدل‌های پیش‌بینی از طریق t -تست جفتی و آنالیز رگرسیون همبستگی بین مقادیر مرجع و مقادیر پیش‌بینی، تضمین شد [۶]. پژوهشی جهت ایجاد معادله کالیبراسیون برای طیف‌سنج NIR به‌منظور برآورد کیفیت علوفه گیاهان فورب، انجام شد. در این ارتباط، گزارش شد که معادلات ارائه شده برای شاخص‌های نیتروژن و پروتئین خام، در مقایسه با دیگر شاخص‌های کیفیت علوفه، بهتر بوده است [۵].

با توجه به لزوم جایگزینی روش‌های سریع و به‌صرفه برای تعیین ارزش غذایی گیاهان در زمینه استفاده از تکنیک NIRS و به‌خصوص کالیبراسیون این دستگاه، مطالعات اندکی در داخل کشور صورت گرفته است. بر همین اساس، پژوهش حاضر با هدف ارائه مدل‌های کالیبراسیونی برای طیف سنج مادون قرمز نزدیک انعکاسی (NIRS) به‌منظور برآورد مقادیر شاخص‌های کیفیت علوفه

⁴ Metabolizable Energy

⁵ Association of Official Analytical Chemists (AOAC)

¹ Crude Protein

² Acid Detergent Fiber

³ Dry Matter Digestibility

گرفته شدند. نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنج NIR در محدوده‌ای از طول موج‌ها اسکن شدند.

جدول ۱. گونه‌های بوته‌ای مورد بررسی و گسترش آن‌ها در مکان‌های انتخابی مناطق مختلف رویشی کشور [۴]

نام گونه	نام مکان
<i>Artemisia fragrans, Kochia prostrate</i>	ارشق استان اردبیل
<i>Acantholimon festucaceum, Andrachne fruticulosa, Artemisia sieberi</i>	آبخوان سه استان اصفهان
<i>Astragalus talimansurensis, Ferulago macrocarpa, Hammada salicornica, Pteropyrum noeanum, Salsola lachnantha</i>	صالح آباد و چنگوله استان ایلام
<i>Arenaria dianthoides, Astragalus aureus, Thymus kotschyanus</i>	سهند استان آذربایجان شرقی
<i>Atriplex verrucifera, Halocnemum strobilaceum</i>	تیزخراب استان آذربایجان غربی
<i>Thymus kotschyanus</i>	قره باغ استان آذربایجان غربی
<i>Artemisia scoparia, Atriplex leuococlada, Sporobolus arabicus</i>	کبکان استان بوشهر
<i>Dendrostellera lessertii, Salsola laricina</i>	خشکه رود استان تهران
<i>Acantholimon erinaceum, Acanthophyllum sordidum, Onobrychis cornuta, Oryzopsis holciformis, Thymus fedtschenkoi</i>	فیروزکوه استان تهران
<i>Thymus daenensis</i>	کرسنگ استان چهارمحال و بختیاری
<i>Astragalus squarrosus, Halothamnus glaucus, Reaumuria fruticosa, Salsola arbuscula, Salsola richteri, Seidlitzia rosmarinus</i>	پشته عباس استان خراسان
<i>Artemisia turanica, Salsola orientalis, Aellenia subaphylla, Artemisia diffusa</i>	سرخس استان خراسان
<i>Thymus kotschyanus, Astragalus vereciferom</i>	بادامستان استان زنجان
<i>Acantholimon erinaceum, Acanthophyllum sordidum, Artemisia aucheri, Astragalus flovoccus, Astragalus glaucacanthus, Astragalus podolobus, Crucianella gilanica, Onobrychis cornuta</i>	جاشلوبار استان سمنان
<i>Sphaerocoma aucheri, Atriplex leuococlada</i>	سایت بریس استان سیستان و بلوچستان
<i>Acantholimon festucaceum, Acanthophyllum sordidum, Astragalus cephalanthus, Astragalus susianus, Acanthophyllum bracteatum</i>	چشمه انجیر استان فارس
<i>Astragalus adscendans</i>	سپیدان استان فارس
<i>Acantholimon flexuosum, Astragalus micricephalus</i>	الموت استان قزوین
<i>Buffonia macrocarpa</i>	یکه باغ استان قم
<i>Dianthus orientalis, Thymus kotschyanus</i>	سارال استان کردستان
<i>Acantholimon olivieri, Astragalus felxilipes</i>	گون بان کرمانشاه
<i>Acantholimon festucaceum, Eurotia ceratoides, Zygophyllum atriplicoides</i>	تیل آباد استان گلستان
<i>Astragalus podolobus, Salsola arbusculiformis, Salsola dendroides, Salsola tomentosa, Zygophyllum atriplicoides, Artemisia turcomanica, Artemisia khorassanica</i>	پاشایلیق مراوه تپه گلستان
<i>Halocnemum strobilaceum</i>	اینچه برون گلستان
<i>Thymus transcaspicus</i>	سر علی آباد استان گلستان
<i>Atriplex leuococlada, Desmostachya bipinata, Halocnemum strobilaceum</i>	زمین سنگ استان هرمزگان
<i>Chrysopogon aucheri, Gaillonia aucheri, Gaillonia crucianelloides, Helianthemum lippii, Gymnocarpus decander</i>	جونگان استان هرمزگان
<i>Sphaerocoma aucheri</i>	سیریک استان هرمزگان
<i>Artemisia aucheri, Astragalus myriacanthus, Astragalus strictifolius</i>	شیرکوه استان یزد
<i>Astragalus arbusculinus, Cornulaca monacantha, Cymbopogon olivieri, Fortuynia bungei, Gymnocarpus decander, Halothamnus subaphyllus, Haloxylon ammodendron, Hammada salicornica, Pycnocycla nodiflora,</i>	طبس استان یزد

Salsola imbricate, Salsola tomentosa, Sedlitzia rosmarinus, Artemisia sieberi, Salaola yazidona, Callygonum bungei, Artemisia sieberi, Eurotia ceratoides

ندوشن استان یزد

توسعه یافته از ۳ مقدار دیگر صورت می گرفت). برای ایجاد معادله بهینه، نمونه‌هایی با باقی مانده (Residual) بزرگ حذف شده و اعتبارسنجی متقابل مجدداً انجام می شد تا در نهایت با در نظر گرفتن آماره‌های کالیبراسیون و تعداد حذف مجاز (حداکثر ۲۰ درصد داده‌ها)، معادله بهینه حاصل شد. بنابراین مقایسات آماری بین مقدار واقعی و مقادیر پیش‌بینی شده انجام شد و معادلات پیش‌بینی به دست آمد و بر اساس آن‌ها دستگاه کالیبره گردید (شکل ۱).

۳.۲. پارامترهای آماری مورد استفاده در کالیبراسیون

برای توسعه معادلات کالیبراسیون برای هر ویژگی کیفی، اطلاعات مربوط به آنالیز شیمیایی در مقابل داده‌های برآوردی NIR مورد آزمون رگرسیون قرار گرفته و ضرایب همبستگی آن‌ها تعیین شد. مدل‌های کالیبراسیون ایجاد شده سپس با استفاده از آماره‌های از قبیل خطای استاندارد کالیبراسیون^۳ (SEC)، خطای استاندارد پیش‌بینی^۴ (SEP)، ضریب تشخیص^۳ (R^2)، شیب خط (Slope)، میزان اریبی (Bias) و^۴ RPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقادیر SEC، SEP و R^2 به عنوان راهنما در انتخاب بهترین معادلات پیش‌بینی برای هر یک از ترکیبات کیفی استفاده شد. به گونه‌ای که بهترین روابط (معادله‌ها) از طریق ترکیب بهینه آماره‌ها به دست آمد، که بر اساس خطای استاندارد پیش‌گویی (SEP) و خطای استاندارد کالیبراسیون (SEC) کمتر، ضریب تشخیص^۳ (R^2) بیشتر، شیب خط رگرسیون نزدیک به یک و کمترین اریبی (انحرافات) بین نتایج NIR و آزمایشگاه، معادلات کالیبراسیون حاصل و دستگاه کالیبره گردید. سپس نتایج حاصله بر روی نمودارهای رگرسیونی که در

تکنولوژی NIR بر اساس جذب و انعکاس اشعه مادون قرمز نزدیک استوار است. از هر گونه برای هر مرحله رویشی به طور مجزا مقداری داخل محفظه دستگاه (پیاله دایره‌ای کوچک) ریخته شد تا به وسیله تاباندن پرتوهای مختلف اشعه مادون قرمز نزدیک و انرژی‌های جذب و یا منعکس شده صفات کیفی را برآورد کند. به ازای هر نمونه دو ظرف و هر یک دو بار (در مجموع هر نمونه چهار بار) پرتوتابی و طیف بازتاب شده از نمونه‌ها و داده‌های مربوط به طیف‌ها (در مجموع ۱۴۱ طیف با اختلاف ۵ نانومتر از ۹۵۰ تا ۱۶۵۰ نانومتر) ثبت گردید.

داده‌های حاصل از پرتوتابی به منظور آنالیز رگرسیون، به نرم‌افزار Unscrambler (CAMOAS، نسخه ۹/۵، نروژ) منتقل شد. قبل از برازش مدل، برای یکنواخت و نرمال‌سازی پراکنش داده‌ها از روش S. Golay [۲۴] استفاده شد. در طول کالیبراسیون NIR برای پیش‌بینی هر پارامتر، تعداد اندکی داده به عنوان داده پرت یا Outlier شناسایی شدند که شامل نمونه‌هایی بود که از بقیه جامعه نمونه متفاوت بود. این نمونه‌ها در توسعه معادله به کار نرفتند. برای ایجاد مدل کالیبراسیون از روش PLS1 [۱۸] استفاده و اعتبارسنجی مدل به روش Cross Validation انجام شد. اعتبارسنجی معادله برای ارزیابی توانایی پیش‌بینی معادله کالیبراسیون انتخاب شده، انجام می شود. اعتبارسنجی مستلزم پیش‌بینی با یک مجموعه مستقل از نمونه‌ها، یعنی از یک جامعه متفاوت نسبت به مجموعه کالیبراسیون با مقادیر مرجع شناخته شده است، و یا حذف تعداد معینی از نمونه‌ها از مجموعه کالیبراسیون و عدم استفاده آن‌ها در فرآیند کالیبراسیون می باشد (در این روش اعتبارسنجی متقابل از طریق تقسیم داده‌ها در مجموعه‌های ۴ تایی و پیش‌بینی کالیبراسیون‌های

³ Standard error prediction

⁴ ratio performance deviation

¹ Partial least squares type 1

² Standard error calibration

معیار (استاندارد) کالیبراسیون (SEC)، اشتباه از معیار تفاوت بین داده‌های مرجع و داده‌های پیش‌گویی NIR در سری کالیبراسیون است. اشتباه از معیار پیش‌بینی (SEP)، اشتباه از معیار تفاوت بین داده‌های آزمایشگاهی مرجع و داده‌های پیش‌گویی NIR در سری اعتبار‌سنجی است.

آن‌ها داده‌های آزمایشگاه به‌عنوان متغیر مستقل و داده‌های حاصل از NIR به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شده‌اند، نمایش داده شد. در این معادله‌ها ضریب همبستگی چندمتغیره (R) اندازه‌ای از همبستگی بین مقادیر جذب و داده‌های مرجع (ضریب همبستگی بین آزمایشگاه و NIR) است. اشتباه از



شکل ۱. مراحل مختلف انجام کالیبراسیون با دستگاه NIR و ایجاد مدل‌های کالیبراسیونی

پیش‌بینی برای هر یک از ترکیبات کیفی استفاده شد. در این مطالعه به ازای هر یک از شاخص‌های مورد بررسی در هر مرحله مدل کالیبراسیون ایجاد گردید. در نهایت یک معادله برای هر صفت در هر مرحله رشد برای اندازه‌گیری نهایی مشخص گردید. در مجموع در هر مرحله روشی یک برنامه کالیبراسیونی برای هر یک از صفات N، CP، ADF، DMD و ME تهیه گردید. بنابراین جمعاً ۱۸ برنامه کالیبراسیون تهیه شد. نتایج حاصل از کالیبراسیون و ایجاد مدل‌ها برای هر فاکتور به شرح ذیل است:

۳. نتایج

هدف از توسعه معادله این است که بهترین معادله پیش‌بینی با استفاده از حداقل نمونه‌های روش مرجع برای هر یک از فاکتورهای کیفیت علوفه انتخاب گردد. برای توسعه معادلات کالیبراسیون برای هر ویژگی کیفی، اطلاعات مربوط به آنالیز شیمیایی در مقابل داده‌های برآوردی NIR مورد رگرسیون قرار گرفته و ضرایب رگرسیون آن‌ها تعیین شد. خطای استاندارد کالیبراسیون (SEC) و خطای استاندارد پیش‌بینی (SEP) و ضریب تشخیص (R^2) به‌عنوان راهنما در انتخاب بهترین معادلات

۱.۳. مرحله رشد رویشی

خلاصه نتایج تجزیه شیمیایی نمونه‌ها در آزمایشگاه در این مرحله از رشد از قبیل تعداد نمونه اندازه‌گیری

شده به روش آزمایشگاهی، مقادیر حداکثر و حداقل، دامنه میانگین و انحراف معیار نمونه‌ها مربوط به هر فاکتور در جدول (۲) ارائه شده است.

جدول ۲. خلاصه پارامترهای آماری هر یک از صفات کیفی مربوط به تجزیه شیمیایی نمونه‌ها در مرحله رشد رویشی

متغیر	تعداد نمونه	میانگین	حداقل	حداکثر	اشتباه معیار	انحراف معیار (SD)
N	۲۶۷	۲/۱۳	۰/۶۵	۴/۷۷	۰/۰۴	۰/۸۰
CP	۲۶۷	۱۳/۳۵	۴/۰۴	۲۹/۸۲	۰/۳۰	۵/۰۳
ADF	۲۶۷	۳۲/۴۱	۹/۱۰	۶۴/۵۰	۰/۷۱	۱۱/۷۵
DMD	۲۶۷	۶۲/۷۷	۳۲/۹۱	۸۵/۷۹	۰/۶۳	۱۰/۳۶
ME	۲۶۷	۸/۶۷	۳/۵۹	۱۲/۵۸	۰/۱۰	۱/۷۶

پس از اسکن نمونه‌های مربوط به مرحله رویشی، انتقال آن‌ها به نرم‌افزار Unscrambler صورت گرفت و پس از نرمال‌سازی داده‌ها و حذف داده‌های پرت (Outlier)، نمونه‌ها برای ساختن بهترین معادله کالیبراسیون آماده شدند. پس از آن، جهت دستیابی به بهترین معادله کالیبراسیون برای هر فاکتور کیفی، نمونه‌هایی با باقی مانده (Residual) بزرگ از مجموعه نمونه‌ها حذف گردید و اعتبارسنجی متقابل با باقی‌مانده

نمونه‌ها صورت گرفت. از آنجایی که فقط مجاز به حذف ۲۰ درصد نمونه‌ها بودیم، تلاش بر این بود که با کمترین حذف ممکن به بهترین آماره‌های کالیبراسیون برسیم. پس از تعیین بهترین معادلات کالیبراسیونی، پارامترهای آماری مربوط به آن‌ها و برای ۵ صفت مورد بررسی در مرحله رویشی در جداول ۳ و ۴ به ترتیب برای کالیبراسیون و ارزیابی (اعتبارسنجی) آورده شده است.

جدول ۳. آماره‌های مدل‌های کالیبراسیون برای متغیرهای مختلف در مرحله رویشی

متغیر	N_1^*	N_2^*	SEC	R^2	Slope	Offset	RMSEC*	RPD*	معادله
N	۹۷۶	۸۱۷	۰/۲۷	۰/۸۷	۰/۸۶	۰/۲۶	۰/۲۷	۲/۹۶	$Y = 0.26 + 0.86X$
CP	۹۷۶	۸۱۸	۱/۷۴	۰/۸۷	۰/۸۷	۱/۶۶	۱/۷۴	۲/۸۹	$Y = 1.66 + 0.87X$
ADF	۹۷۶	۸۲۵	۳/۸۰	۰/۸۶	۰/۸۶	۴/۰۸	۳/۸۰	۳/۰۹	$Y = 4.08 + 0.86X$
DMD	۹۷۶	۸۰۹	۳/۰۴	۰/۸۹	۰/۸۹	۶/۸۷	۳/۰۴	۳/۴۰	$Y = 6.87 + 0.89X$
ME	۹۷۶	۸۱۵	۰/۵۳	۰/۸۸	۰/۸۸	۱/۰۱	۰/۵۳	۳/۳۲	$Y = 1.01 + 0.88X$

* N_1 تعداد اولیه داده‌ها بعد از حذف داده‌های پرت (outlier)، N_2 تعداد داده‌هایی که وارد محاسبات شده‌اند، جذر میانگین مربعات خطای کالیبراسیون (Root Mean Square error of calibration= RMSEC)، $SD/RMSEC = RPD$ ، عرض از مبدأ (Offset)

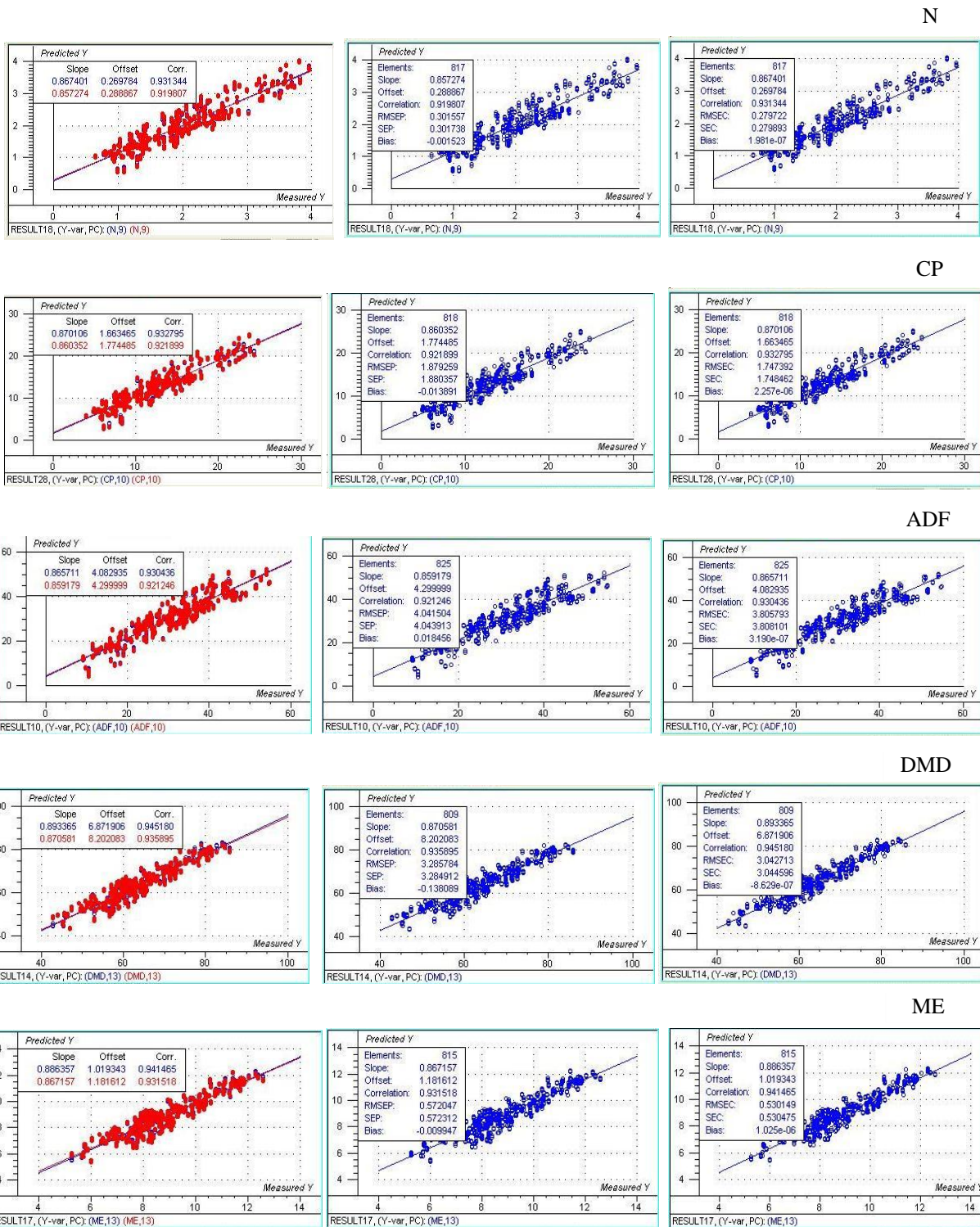
جدول ۴. آماره‌های اعتبارسنجی مدل‌های پیش‌بینی برای متغیرهای مختلف در مرحله رویشی

متغیر	N_1	N_2	SEP	R^2	Slope	Offset	RMSEP*	RPD*	معادله
N	۹۷۶	۸۱۷	۰/۳۰	۰/۸۴	۰/۸۵	۰/۲۸	۰/۳۰	۲/۶۶	$Y = 0.28 + 0.85X$
CP	۹۷۶	۸۱۸	۱/۸۸	۰/۸۵	۰/۸۶	۱/۷۷	۱/۸۷	۲/۶۸	$Y = 1.77 + 0.86X$
ADF	۹۷۶	۸۲۵	۴/۰۴	۰/۸۵	۰/۸۵	۴/۲۹	۴/۰۴	۲/۹۰	$Y = 4.29 + 0.85X$
DMD	۹۷۶	۸۰۹	۳/۲۸	۰/۸۷	۰/۸۷	۸/۲۰	۳/۲۸	۳/۱۵	$Y = 8.20 + 0.87X$
ME	۹۷۶	۸۱۵	۰/۵۷	۰/۸۷	۰/۸۶	۱/۱۸	۰/۵۷	۳/۰۸	$Y = 1.18 + 0.86X$

* جذر میانگین مربعات خطای کالیبراسیون (Root Mean Square error of prediction= RMSEP)، $SD/RMSEP = RPD$

یک از صفات کیفی علوفه در مرحله رشد رویشی به صورت نمودار رسم شده که در شکل ۲ نشان داده شده است.

رابطه رگرسیونی بین داده‌های آزمایشگاهی (محور افقی) و داده‌های برآورد شده توسط NIR (محور عمودی) برای هر



شکل ۲. رابطه رگرسیونی بین داده‌های آزمایشگاهی (محور افقی) و داده‌های برآورد شده توسط NIR (محور عمودی) به ترتیب برای N، CP، ADF، DMD و ME در مرحله رشد رویشی

کمتر، نمایانگر رابطه رگرسیونی قوی تر بین دو روش است که به شکل تجمع نزدیک تر و فشرده تر ابر نقاط در اطراف خط رگرسیون ظاهر می شود.

۲.۳. مرحله گلدھی

در این مرحله نیز خلاصه نتایج تجزیه شیمیایی نمونه ها در آزمایشگاه در جدول (۵) ارائه شده است.

در هر شاخص کیفی (اشکال سه تایی)، در شکل سمت چپ در کنار نمودارها، پارامترهایی از قبیل شیب خط (Slope)، عرض از مبدأ (Offset) و همبستگی (Correlation) معادله رگرسیون کالیبراسیون (رنگ آبی) و معادله پیش بینی (رنگ قرمز) نوشته شده است. همچنین دو شکل دیگر مشخصات معادله رگرسیون و پیش بینی را برای هر فاکتور نشان می دهد. شیب خط نزدیک به یک، ضریب همبستگی بالاتر و اشتباه معیار

جدول ۵. خلاصه پارامترهای آماری هر یک از صفات کیفی مربوط به تجزیه شیمیایی نمونه ها در مرحله گلدھی

متغیر	تعداد نمونه	میانگین	حداقل	حداکثر	اشتباه معیار	انحراف معیار (SD)
N	۲۶۸	۱/۶۲	۰/۶۹	۳/۷۳	۰/۰۳	۰/۵۸
CP	۲۶۸	۱۰/۱۴	۴/۳۲	۲۳/۳۴	۰/۲۲	۳/۶۳
ADF	۲۶۸	۳۸/۱۲	۹/۲۰	۶۹/۹۰	۰/۷۱	۱۱/۶۹
DMD	۲۶۸	۵۶/۵۴	۲۸/۳۷	۸۵/۸۱	۰/۶۲	۱۰/۲۵
ME	۲۶۸	۷/۶۱	۲/۸۲	۱۲/۵۹	۰/۱۰	۱/۷۴

و ۷ به ترتیب برای کالیبراسیون و ارزیابی (اعتبار سنجی) آورده شده است.

در مرحله گلدھی نیز همانند مرحله قبل، پس از تعیین بهترین معادلات کالیبراسیونی، پارامترهای آماری مربوط به آنها و برای ۵ صفت مورد بررسی در جداول ۶

جدول ۶. آماره های مدل های کالیبراسیون برای متغیرهای مختلف در مرحله گلدھی

معادله	RPD*	RMSEC*	Offset	Slope	R ²	SEC	N ₂ *	N ₁ *	متغیر
$Y = 0.24 + 0.84X$	۲/۷۶	۰/۲۱	۰/۲۴	۰/۸۴	۰/۸۵	۰/۲۱	۷۷۵	۹۶۱	N
$Y = 1.51 + 0.84X$	۲/۷۰	۱/۳۴	۱/۵۱	۰/۸۴	۰/۸۵	۱/۳۴	۷۷۸	۹۶۱	CP
$Y = 3.92 + 0.88X$	۳/۳۳	۳/۵۱	۳/۹۲	۰/۸۸	۰/۸۹	۳/۵۱	۷۸۰	۹۶۱	ADF
$Y = 6.18 + 0.89X$	۳/۴۳	۲/۹۸	۶/۱۸	۰/۸۹	۰/۸۹	۲/۹۸	۷۷۵	۹۶۱	DMD
$Y = 0.88 + 0.88X$	۳/۳۴	۰/۵۲	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۸۹	۰/۵۲	۷۷۸	۹۶۱	ME

*N₁ تعداد اولیه داده ها بعد از حذف داده های پرت (Outlier)، N₂ تعداد داده هایی که وارد محاسبات شده اند، جذر میانگین مربعات خطای کالیبراسیون (Root Mean Square error of calibration= RMSEC)، SD/RMSEC = RPD، عرض از مبدأ (Offset)

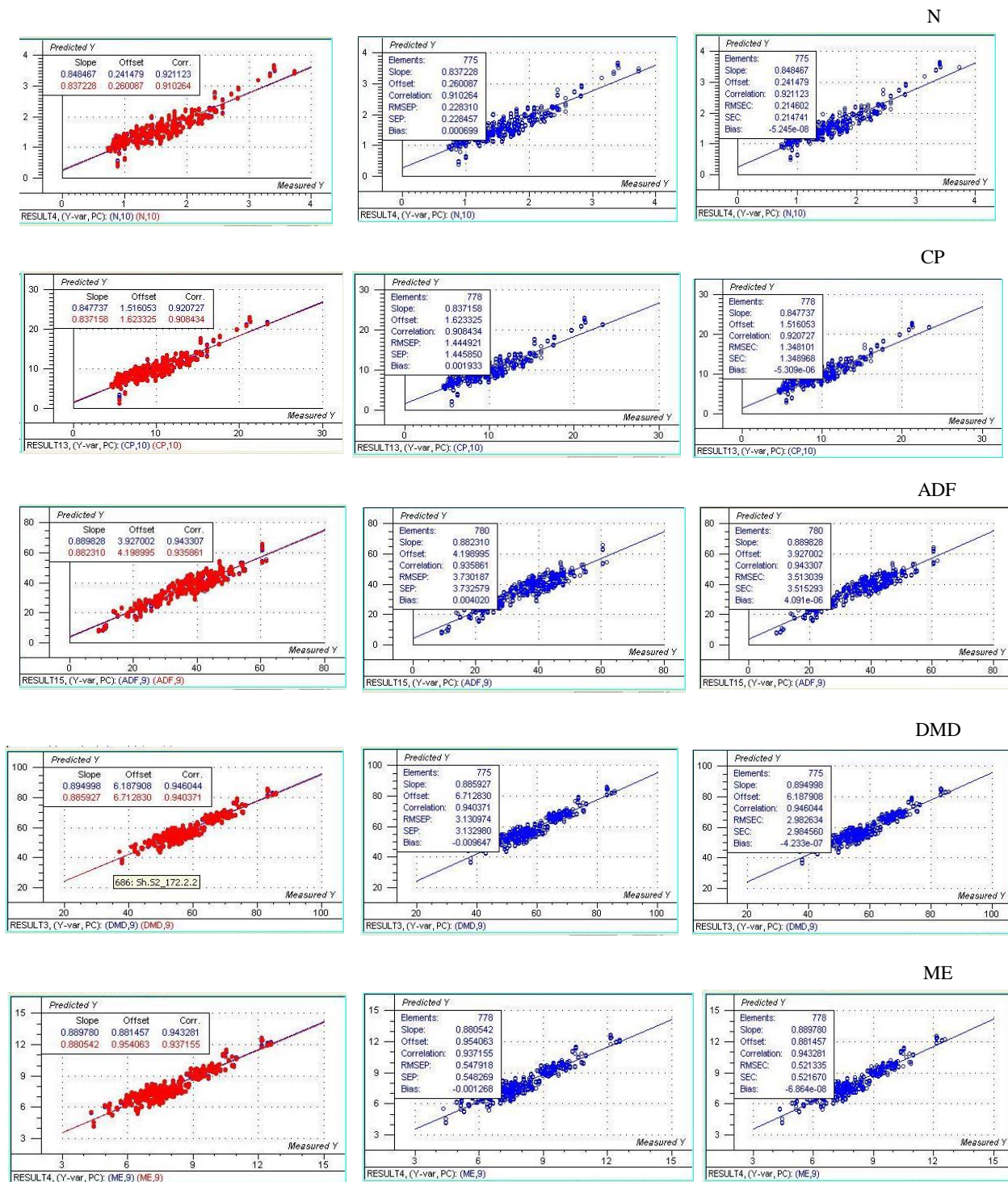
جدول ۷. آماره های اعتبارسنجی مدل های پیش بینی برای متغیرهای مختلف در مرحله گلدھی

معادله	RPD*	RMSEP*	Offset	Slope	R ²	SEP	N ₂	N ₁	متغیر
$Y = 0.26 + 0.83X$	۲/۶۳	۰/۲۲	۰/۲۶	۰/۸۳	۰/۸۳	۰/۲۲	۷۷۵	۹۶۱	N
$Y = 1.62 + 0.83X$	۲/۵۲	۱/۴۴	۱/۶۲	۰/۸۳	۰/۸۲	۱/۴۴	۷۷۸	۹۶۱	CP
$Y = 4.19 + 0.88X$	۳/۱۳	۳/۷۳	۴/۱۹	۰/۸۸	۰/۸۷	۳/۷۳	۷۸۰	۹۶۱	ADF
$Y = 6.71 + 0.88X$	۳/۲۷	۳/۱۳	۶/۷۱	۰/۸۸	۰/۸۸	۳/۱۳	۷۷۵	۹۶۱	DMD
$Y = 0.95 + 0.88X$	۳/۲۲	۰/۵۴	۰/۹۵	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۵۴	۷۷۸	۹۶۱	ME

* جذر میانگین مربعات خطای کالیبراسیون (Root Mean Square error of prediction= RMSEP)، SD/RMSEP = RPD

به صورت نمودار رسم شده که در شکل (۳) نشان داده شده است.

رابطه رگرسیونی بین داده‌های آزمایشگاهی (محور افقی) و داده‌های برآورد شده توسط NIR (محور عمودی) برای هر یک از صفات کیفی علوفه در مرحله گلدی



شکل ۳. رابطه رگرسیونی بین داده‌های آزمایشگاهی (محور افقی) و داده‌های برآورد شده توسط NIR (محور عمودی) برای N، CP، ADF، DMD، ME در مرحله گلدی

۳,۳. مرحله بذردهی

مربوط به هر یک از صفات کیفی در مرحله بذردهی در

خلاصه نتایج تجزیه شیمیایی نمونه‌ها در آزمایشگاه جدول (۸) ارائه شده است.

جدول ۸. خلاصه پارامترهای آماری هر یک از صفات کیفی مربوط به تجزیه شیمیایی نمونه‌ها در مرحله بذردهی

متغیر	تعداد نمونه	میانگین	حداقل	حداکثر	اشتباه معیار	انحراف معیار (SD)
N	۲۵۰	۱/۲۳	۰/۴۱	۲/۵۰	۰/۰۲	۰/۴۱
CP	۲۵۰	۷/۶۹	۲/۵۶	۱۵/۶۵	۰/۱۶	۲/۵۸
ADF	۲۵۰	۴۴/۳۹	۱۲/۲۰	۶۹/۰۰	۰/۷۷	۱۲/۱۹
DMD	۲۵۰	۵۰/۳۴	۲۸/۵۸	۷۸/۴۲	۰/۶۶	۱۰/۴۳
ME	۲۵۰	۶/۵۵	۲/۸۶	۱۱/۳۳	۰/۱۱	۱/۷۷

صفت مورد بررسی در جداول ۹ و ۱۰ به ترتیب برای کالیبراسیون و ارزیابی (اعتبارسنجی) آورده شده است.

در این مرحله نیز، پس از تعیین بهترین معادلات

کالیبراسیونی، پارامترهای آماری مربوط به آن‌ها و برای ۵

جدول ۹. آماره‌های مدل‌های کالیبراسیون برای متغیرهای مختلف در مرحله بذردهی

متغیر	N_1^*	N_2^*	SEC	R^2	Slope	Offset	RMSEC*	RPD*	معادله
N	۶۴۷	۵۵۸	۰/۱۳	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۱۳	۰/۱۳	۳/۱۵	$Y = 0.113 + 0.188X$
CP	۶۴۷	۵۵۴	۰/۸۴	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۸۵	۰/۸۳	۳/۱۰	$Y = 0.185 + 0.188X$
ADF	۶۴۷	۵۶۴	۳/۵۲	۰/۹۱	۰/۹۱	۳/۵۷	۳/۵۲	۳/۴۶	$Y = 3.57 + 0.91X$
DMD	۶۴۷	۵۳۶	۳/۰۲	۰/۹۱	۰/۹۰	۴/۸۷	۳/۰۲	۳/۴۵	$Y = 4.87 + 0.90X$
ME	۶۴۷	۵۳۷	۰/۵۱	۰/۹۱	۰/۹۰	۰/۶۴	۰/۵۱	۳/۴۷	$Y = 0.64 + 0.90X$

* N_1 تعداد اولیه داده‌ها بعد از حذف داده‌های پرت (Outlier)، N_2 تعداد داده‌هایی که وارد محاسبات شده‌اند، جذر میانگین مربعات خطای کالیبراسیون (Root Mean Square error of calibration= RMSEC)، $SD/RMSEC = RPD$ ، عرض از مبدأ (Offset)

جدول ۱۰. آماره‌های اعتبارسنجی مدل‌های پیش‌بینی برای متغیرهای مختلف در مرحله بذردهی

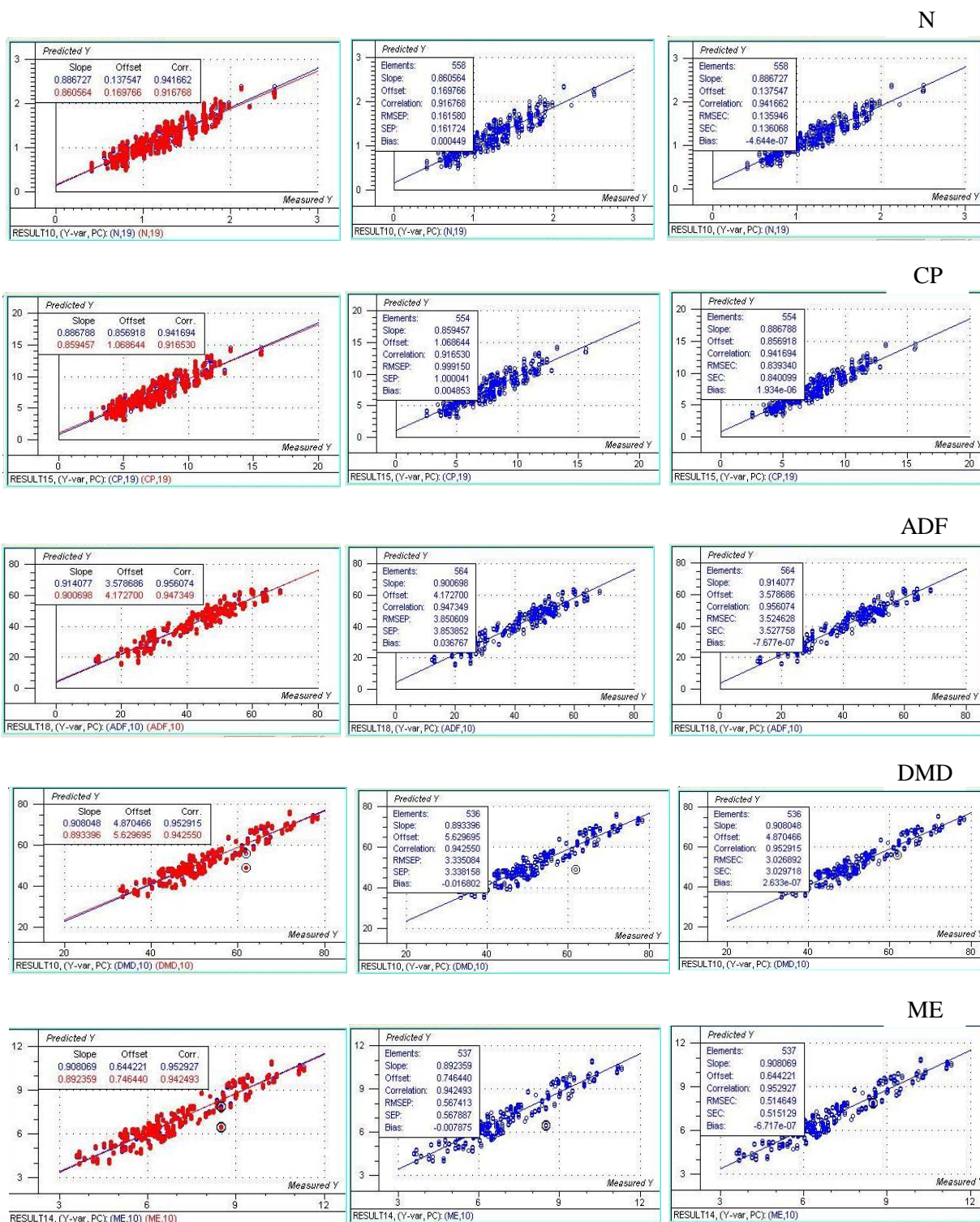
متغیر	N_1	N_2	SEP	R^2	Slope	Offset	RMSEP*	RPD*	معادله
N	۶۴۷	۵۵۸	۰/۱۶	۰/۸۴	۰/۸۶	۰/۱۷	۰/۱۶	۲/۵۶	$Y = 0.117 + 0.186X$
CP	۶۴۷	۵۵۴	۱/۰۰	۰/۸۴	۰/۸۵	۱/۰۶	۰/۹۹	۲/۶۰	$Y = 1.06 + 0.185X$
ADF	۶۴۷	۵۶۴	۳/۸۵	۰/۸۹	۰/۹۰	۴/۱۷	۳/۸۵	۳/۱۶	$Y = 4.17 + 0.90X$
DMD	۶۴۷	۵۳۶	۳/۳۳	۰/۸۹	۰/۸۹	۵/۶۲	۳/۳۳	۳/۱۳	$Y = 5.62 + 0.189X$
ME	۶۴۷	۵۳۷	۰/۵۶	۰/۸۹	۰/۸۹	۰/۷۴	۰/۵۶	۳/۱۶	$Y = 0.74 + 0.189X$

* جذر میانگین مربعات خطای کالیبراسیون (Root Mean Square error of prediction= RMSEP)، $SD/RMSEP = RPD$

یک از صفات کیفی علوفه در مرحله گلدهی به صورت نمودار رسم شده که در شکل ۴ نشان داده شده است.

رابطه رگرسیونی بین داده‌های آزمایشگاهی (محور افقی)

و داده‌های برآورد شده توسط NIR (محور عمودی) برای هر



شکل ۴. رابطه رگرسیونی بین داده‌های آزمایشگاهی (محور افقی) و داده‌های برآورد شده توسط NIR (محور عمودی) برای N, CP, ADF, DMD, ME در مرحله بذردهی

۴. بحث و نتیجه گیری

طیف‌سنج NIR به‌طور گسترده‌ای در ارزیابی انواع علوفه به‌کار رفته و کالیبراسیون‌های خوبی به‌دست آمده است [۱، ۷، ۱۴، ۱۵، ۱۲، ۹، ۲، ۲۸ و ۱۰]. با این حال دانش بیشتری مورد نیاز است تا شاید سستی بسیاری از گونه‌ها را به‌عنوان منبع پروتئین و دیگر مواد مغذی برای تغذیه حیوانات معلوم کند. تکنیک NIR می‌تواند یک ابزار مفید برای کمک به حل این مشکل باشد. از مزایای عمده NIR، سادگی آماده‌سازی نمونه، سرعت، کثرت تجزیه و تحلیل در یک عملیات، عدم مصرف نمونه و کاهش هزینه برای معرف‌های شیمیایی است [۲۲].

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه در مرحله رویشی آماره‌های کالیبراسیون ضریب تشخیص R^2 رنجی از ۰/۸۶ برای ADF تا ۰/۸۹ برای DMD و SEC نیز رنجی از ۰/۲۷ برای N تا ۳/۸۰ برای ADF دارد. در برنامه اعتبارسنجی نیز میزان ضریب تشخیص R^2 محدوده‌ای از حدود ۰/۸۴ برای N تا ۰/۸۷ برای DMD و ME و همچنین دارای میزان خطای SEP از ۰/۳۰ برای N تا ۴/۰۴ برای ADF بوده است.

در مرحله گلدهی نیز طبق نتایج، R^2 برای کالیبراسیون ۰/۸۵ برای N و CP و ۰/۸۹ برای فاکتورهای ADF، DMD و ME بود. همچنین میزان SEC رنجی از ۰/۲۱ برای N تا ۳/۵۱ برای ADF داشته است. در برنامه اعتبارسنجی نیز ضریب R^2 رنجی از ۰/۸۲ برای CP تا ۰/۸۸ برای DMD و ME داشته و SEP از ۰/۲۲ برای N تا ۳/۷۳ برای ADF بوده است.

نتایج حاصل از کالیبراسیون مرحله بذردهی نیز مقادیر R^2 به میزان ۰/۸۸ برای N و CP و ۰/۹۱ برای ADF، DMD و ME را نشان داد. مقادیر SEC نیز رنجی از ۰/۳۱ برای N تا ۳/۵۲ برای ADF داشت. در برنامه اعتبارسنجی نیز ضریب R^2 رنجی ۰/۸۴ برای N و CP و ۰/۸۹ برای ADF، DMD و ME داشته است. مقادیر SEP نیز از ۰/۱۶ برای N تا ۳/۸۵ برای ADF بوده است.

با در نظر گرفتن آماره‌های کالیبراسیون مربوط به هر

یک از فاکتورها در سه مرحله می‌توان گفت فقط در مرحله اول معادله ایجاد شده برای ADF تا حد اندکی نسبت به بقیه فاکتورها ضعیف‌تر بوده که با نتایج مطالعات دیگر [۲، ۱۰] مطابقت دارد، اما هم در این مرحله و هم دو مرحله دیگر، بقیه فاکتورهای کیفی تا حدودی از دقت مشابه‌ای نسبت به هم برخوردار هستند و در تمام فاکتورهای مورد مطالعه ضریب تشخیص بالای ۰/۸۰ بوده است. دقت کمتر کالیبراسیون ADF ممکن است در نتیجه دقت کمتر در روش آزمایشگاهی به دلیل خطای آزمایش‌کننده باشد که با نتایج دیگر پژوهش‌ها [۶] نیز هم‌خوانی دارد که دقت مدل‌های ایجاد شده را تا حد زیادی مربوط به تغییرات و دقت مقادیر مرجع دانستند.

از طرفی رابطه رگرسیونی بین داده‌های آزمایشگاهی (محور افقی) و داده‌های برآورد شده توسط NIR (اشکال ۲-۴) نشان داد که برای تمام صفات مورد بررسی در همه مراحل رشد، ضریب همبستگی بین داده‌های مرجع و برآورد شده توسط NIR بالای ۰/۹۰ در صد بوده که نشان‌دهنده دقت برنامه‌های کالیبراسیونی برای پیشگویی صفات کیفی بوته‌ای‌ها می‌باشد که با نتایج دیگر پژوهش‌ها [۱۰، ۲۱] در خصوص ضریب همبستگی بالای ۰/۹۰ برای فاکتورهای کیفی، مشابه است.

همچنین با مقایسه آماره‌های کالیبراسیونی و اعتبارسنجی فاکتورهای کیفی مرحله بذردهی در مقایسه با دو مرحله رویشی و گلدهی مشاهده می‌گردد که تمام فاکتورهای کیفی در این مرحله از میزان R^2 بالاتر و میزان SEC و SEP کمتری برخوردار بوده و البته RPD آن‌ها نیز بالاتر است که نشان‌دهنده رابطه رگرسیونی قوی‌تر برای فاکتورهای کیفی در این مرحله در مقایسه با دو مرحله قبلی است. به‌نظر می‌رسد دلیل این امر، جامعه نمونه کمتری باشد که برای کالیبراسیون این مرحله استفاده شده (۶۴۷ نمونه اسکن شده) که این جامعه نمونه کوچک منجر به همگنی بالاتر نمونه و در نتیجه ایجاد معادلات دقیق‌تر گشته است. بنابراین به‌نظر می‌رسد که طبق برخی مطالعات هر چند برای رسیدن به معادلات

از این نظر می‌تواند کمک‌کننده باشد، نسبت انحراف عملکرد یا RPD می‌باشد که در جداول مربوط به آماره‌ها، مقدار آن ارائه شده است. معادله‌ای که دارای ضریب تشخیص بالاتر از ۰/۸ و RPD آن بالاتر از ۳ باشد، توانایی پیش‌بینی لازم برای تعیین کیفیت گونه‌ها را دارند [۱۴، ۲۶، ۲۷]. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، ضریب تشخیص در تمامی فاکتورهای کیفی مورد بررسی در هر سه مرحله بالای ۰/۸۲ بوده ولی با توجه به میزان RPD، معادلات مربوط به ADF و DMD و ME در مرحله رویشی و گلدھی و معادلات حاصل شده از هر پنج فاکتور در مرحله بذردهی، از صحت کافی برخوردار هستند. با توجه به اینکه میزان RPD در N و CP در دو مرحله اول، اندکی پایین‌تر است ولی از آنجائی که میزان حداقل آن، ۲/۵ تا ۳ ذکر شده است [۱۳] و همچنین عقیده بر این هست که مقدار RPD بالاتر از ۲/۵ برای هر معادله جهت انجام تخمین قابل پذیرش مورد نیاز است [۱۹]، می‌توان بیان کرد که دو معادله ایجاد شده برای دو فاکتور N و CP در مرحله رویشی و گلدھی نیز قابل قبول هستند. بنابراین می‌توان بیان کرد که کالیبراسیون‌های NIR حاصل از این مطالعه، می‌تواند برای ارزیابی کیفیت علوفه گیاهان بوته‌ای مورد تغذیه دام، مورد استفاده قرار گیرد.

دقیق‌تر، داشتن تعداد حداقلی از نمونه برای کالیبراسیون ضروری است، برخی منابع [۱۱، ۱۶]، حداقل ۵۰ نمونه را برای ایجاد برنامه کالیبراسیون در مراحل مختلف فنولوژیکی و تعداد بیشتر از ۴۰ نمونه را برای کالیبراسیون ضروری می‌دانند، اما با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد که تعداد بیشتر از حد نمونه نیز باعث ایجاد ناهمگنی در نمونه و ایجاد اختلاف زیاد و بالا رفتن خطا و کاهش ضریب همبستگی می‌شود. در این ارتباط، دلیل SEP بالاتر، مربوط به گونه‌های *Festuca artundinacea* و *Bromus tomentellus* در مقایسه با دیگر پژوهش‌ها، تعداد بیشتر نمونه‌های اندازه‌گیری، گزارش شده است [۱۰].

به‌طور کلی همان‌گونه که قبلاً نیز بیان شد بهترین روابط (معادله‌ها) از طریق ترکیب بهینه آماره‌ها به‌دست آمد که بر اساس SEP و SEC کمتر، ضریب تشخیص (R^2) (ضریب همبستگی بین آزمایشگاه و NIR) بیشتر، شیب خط رگرسیون نزدیک به یک و کمترین اریبی (انحرافات) بین نتایج NIR و آزمایشگاه، دقت معادلات تعیین گردید. در این راستا، مدل‌هایی با ضریب تعیین بالا و خطای رگرسیون پایین، برای همه ترکیبات، مناسب‌تر گزارش شده است [۶]. همچنین از دیگر فاکتورهایی که

References

- [1] Abreau, J.M., Paco, M.T.a., Acamovic, T. & Murray, I., (1992). NIR calibration for nutritional value of a diverse set of Portuguese forage crops, In: Murray, I., Cowe, I.A. (Eds), Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy, VCH, Weinheim, pp: 309-317.
- [2] Ahmadi, A., (2004). Investigation quality forage several range species in different stage of phonological growth by two methods of lab and NIR, Ms.c. thesis of range management, Faculty of natural resources, Tehran University.
- [3] AOAC, (1995). official methods of analysis, 16th ed, association of official analytical chemists: Washington, Dc, 600 pp.
- [4] Arzani, H., (2011). Forage quality study, Report of research project on determination of economic sites and basic social units of rangeland, Faculty of natural resources, Tehran University, 78p.
- [5] Arzani, H., Allahmoradi, M., motamedi, J & Akhshi, M., (2014). The development of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibration for predicting forage quality of plants containing forb life form, J of rangeland, 9 (1):1-13.

- [6] Baran Bagchi, T., Sharma, S. & Chattopadhyay, K., (2016). Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice proximate compositions of rice bran, *Food chemistry*, 191: 21-27.
- [7] Berardo, N., (1992). Measuring Italian ryegrass quality by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS), In: Murray, I., Cowe, I.A. (Eds), *Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*, VCH, Weinheim, pp: 309-317.
- [8] Berardo, N., (1997). Prediction of the chemical composition of white clover by near-infrared reflectance spectroscopy, *Grass and Forage Science*, Vol. 52: 27-32.
- [9] Bruno-Soares, A. M., Murray, I., Paterson, R. M. & Abreu, J. M. F., (1998). Use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the prediction of the chemical composition and nutritional attributes of green crop cereals, *Animal Feed Science and Technology*, 75: 15-25.
- [10] Charehsaz, N., Jafari, A.A., Arzani, H. & Azarnivand, H. (2013). Prediction of forage quality parameters in some range species by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Watershed Management Research (Pajouhesh & Sazandegi)*, 94: 45-54.
- [11] Coleman, S.W., Barton, F.E. & Meyer, R.D., (1981). calibration of a near infrared reflectance spectrometer for prediction of forage quality, *Animal Science Research Report*, 102-111.
- [12] Cozzolino, D., Fassio, A. & Gimenez, A., (2000). The use of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants, *J. Science of Food and Agriculture*, 81: 142-146.
- [13] Edney, M.J., Morgan, J.E., Williams, P.C. & Campbell, L.D., (1994). Analysis of feed barley by near infrared reflectance spectroscopy, *J. Near Infrared Spectrosc.*, 2: 23-41.
- [14] Garcia Ciudad, A., Fernandez Santos, B., Vazquez de Aldana, B. R., Zabalgoceazcoa, I., Gutierrez, M.Y. & Garcia Criado, B., (2006). Use of near infrared reflectance spectroscopy to assess forage quality of a mediterranean shrub, published online: <http://dx.doi.org/10.1081/CSS-120030350>.
- [15] Harmanescu, M., Moisuc, A. & Gergen, I., (2011). First derivative in NIR spectroscopy calibration for protein content of forages from hill permanent grassland, *Lucrari stiintifice*, 54: 239-242.
- [16] Jafari, A., Connolly, V., Frolich, A. & Walsh, E.I., (2003). A note on estimation of quality parameters in perennial ryegrass by near infrared reflectance spectroscopy, *Irish J. Agricultural and food research*, 42: 293-299.(ISI).
- [17] Lyons, R.K. & Stuth, J.W., (1992). Fecal NIRS equations for predicting diet quality of free-ranging cattle. *J. Range Manage*, 45: 238-244.
- [18] Martens, H. & Naes, T., (1991). *Multivariate calibration*, Wiley, Chichester, UK.
- [19] Mathison, G.W., Hsu, H., Soofi-Siawash, R., Recinos-Diaz, G., Okine, E.K., Helm, J. & Juskiw, P., (1999). Prediction of composition and ruminal degradability characteristics of barley straw by near infrared reflectance spectroscopy. *Can. J. Animal Science*, 79 (519-523).
- [20] Murray, I., (1986). Near infrared reflectance spectroscopy analysis of forage., In *Recent Advances in Animal Nutrition*; Haresing, W., Cole, D. J.A., Eds; Butterworths: London, 11-20.
- [21] Nie, ZD., Han, J.G., Zhang, L.D. & IH, Li., (2007). Applications of near infrared reflectance spectroscopy technique (NIRS) to rangeland ecology research, *J. Spectroscopy and Spectral Analysis*, 27: 1308-1311.
- [22] Norris, K. H., (1989). Definition of NIRS analysis. In G.C. Marten, J. S. Shenk, & F. E. Barton II. (Eds.), *Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): Analysis of forage quality*, USDA-ARS Agriculture Handbook no. 643 (p. 6). Washington, DC: USDA.
- [23] Ossiya, S., (1999). Development of a nutritional profiling system for free-ranging livestock in major agro-ecological zones of sub-Saharan Africa. Ph.D. Dissertation, Texas A&M University, College Station, TX, USA.
- [24] Savitzky, A. & Golay, M.J.E., (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Analytical Chemistry*, 36: 1627-1639.
- [25] Stuth, J., Jama, A. & Tolleson, D., (2003). Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy, *Field Crops Research*, 83: 45-56.
- [26] Williams, P., (2004). "Near- infrared technology, getting the best out of light", A short course in the practical implementation of Near infrared spectroscopy for the user, PDK Grain, Nanaimo, British Columbia and Winnipeg, Manitoba, Canada, pp:12-13.

- [27] Williams, P.C. & Sobering, D. C., (1993). Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds, *J. Near Infrared Spectrosc*, 1:25-32.
- [28] Yang, Zh., Nie, G., Pan, L., Zhang, Y., Huang, L., Ma, X. & Zhang, X., (2017). Development and validation of near infrared spectroscopy for the prediction of forage quality parameters in *Lolium multiflorum*, *PeerJ* 5: e3867; DOI 10.7717/peerj.3867.