

사초 품질 평가 및 친환경적 초지이용

Lowell Bush

Department of Agronomy University of Kentucky Lexington, KY 40546-0091 USA

사초와 초지는 21세기를 접어들면서 탄소를 이용하고 환경을 보존하며, 수질향상 및 식량공급 등을 제공해 줄 수 있는 가능성으로 인해 더욱 관심을 받고 있다. 사초와 초지의 이러한 친환경적 측면에 대해서 구체적으로 논의하기 전에 먼저 미국의 켄터키주와 한국의 지리적, 환경적 유사성에 대해서 간단히 살펴보고자 한다. 한국과 켄터키주는 위도상 비슷한 위치에 놓여져 있고, 연평균 온도도 큰 차이를 보이지 않아 서로의 연구를 상호 이용할 수 있다는 장점이 있다(표 1). 연평균 강수량도 1,100 mm으로 거의 비슷한 수준이나, 켄터키주가 연중 고르게 내리는 반면, 한국은 6, 7 및 8월에 집중적으로 내리는 것이 다르다. 위도는 한국이 켄터키주에 비해서 높고, 경작지와 숲이 많은 것에 비해 켄터키주는 초지가 많다. 미국전체 특히 켄터키주에선 너무 많은 초지로 인해 사람들이 환경에 대해서 우려하고 있는 실정이다. 본 글은 켄터키주립대학에서 수행된 초지 관련연구들중, 목초 endophyte, 목초품질평가를 위한 새로운 기술 및 초지의 환경보전적 이용 등을 토대로 21세기에 초지가 나아가야 될 길에 대해서 간단히 서술하고자 한다.

Table 1. Geographical and agricultural comparison of Kentucky and the Republic of Korea

	Kentucky	Republic of Korea
Population - millions	4	47.9
Total area - km ²	103,600	98,480
Percent of total land as		
Arable land	19	21
Permanent pasture	19	1
Forests and woodlands	51	65
Other	11	13
Cattle - million	2.3	3.0
Mean January temperature °C	1	-2
July	25	24
Precipitation - mm	1130	900-1500
Elevation range - m	80-1200	0-1,950

친환경적 초지이용

초지가 증가한다는 것은 자연환경 자원이 함께 증가 할 수 있다는 점을 명심해야 한다. 야생동물이나 가축들도 인공 초지나 자연 초지 등으로 부터 큰 혜택을 누린다. 하지만 경작지나 초지로부터 발생될 수 있는 계산하기 힘든 환경오염, 특히 수질오염 등이 환경문제로 크게 대두될 수 있다. 수질오염의 문제는 토양유실, 가축의 분으로부터 연유되는 영양물질 및 이러한 분에 기생하는 미생물 등으로부터 발생된다. 초지로부터 발생되는 토양유실의 정도는 대부분의 주에서 경작지보다 훨씬 적다 (표 2).

Table 2. Annual sheet and rill erosion in selected States

State	Erosion loss t ha ⁻¹	
	Cropland	Pasture
Kentucky	7.6	4.5
Alabama	13.4	1.1
Florida	2.7	0.2
Tennessee	12.5	1.8
Texas	5.8	1.1

미국에서는 목축업이나 경작업에 종사하는 사람들은 연방정부가 제정한 수질오염 방지 프로그램에 참여해야 한다. 이러한 프로그램은 호수나 강을 따라 완충지대나 오염원을 거르는 시설을 설치해야 한다. 이러한 설치들은 오염원들이 호수로 유입되는 것을 방지할 수 있다. 이러한 완충지대의 넓이는 초지의 경사정도에 의해서 달라질 수 있으며, 이 지대에선 어떠한 경작이나 방목이 금지되며, 목초의 초고도 최소한 20 cm 이상으로 유지해야 한다. 이러한 지대에는 야생동물과 토양보존에 좋은 토착초종들이 생육되어지는 것이 바람직 하다.

초지연구자들은 초지생산의 변화와 탄소 이용성의 변화로 부터 연유되는 대기중의 이산화탄소 함량 증가와 지구온난화에 대해 특별히 목소리를 높여야 한다. 이산화탄소의 농도변화와 온도차이에 따른 초지의 생산성 변화에 대한 많은 논문들이 발표되고 있다. 이런 입장에서 대부분의 미국의 주에서 이러한 연구결과를 토대로 일관된 탄소관리 정책을 유지하고자 한다. 미국에서 이러한 완충 보존지대는 2020

년까지 최소한 3.2 Mha 에 이를 것이다 (Lal et al 1999). 이러한 지대에는 탄소가 일년에 약 50 g C m^{-2} 씩 축적되어 진다. 열대지역에서 수목벌채에 의한 이산화탄소의 생성은 화석연료의 의한 발산에 약 15~20%에 해당된다 (see Schroeder and Winjum, 1995). Tarre 등 (2001)은 토양의 탄소지대가 열대지역의 초지에서 땅속 50 cm 까지 걸쳐있음을 발견했다. 21세기에 들어서면서 온대 및 열대지역 토양에 식물 상태로 탄소를 저장하는 것이 중요한 과제로 떠오른다. 수확된 식물들을 혐기적 상태로 땅속깊이 석탄자원으로 저장하는 것과 경운을 최소화 하여 탄소자원을 보존하는 것이 미래의 환경자원 보호를 위해서 강력히 제기된다.

친환경적 초지-가축 생산체계의 미래는 어떠한가? 미국과 한국을 포함한 많은 나라에서 시장이 이에 관련된 연구에 우선순위를 둘 것인가를 결정한다. 식량은 이제 웬만큼 해결된 상태이기 때문에 이러한 생산에 대한 연구는 앞으로 많이 있지는 않을 것이다. 하지만 초지는 여전히 세계적 식량공급에 중요한 역할을 할 것이고, 특히 환경 친화적이고 환경 보존의 역할을 담당하기 때문에 계속적으로 그 중요성이 강조 될 것이다. 목초와 초지의 생산체제는 분자 유전학적 기법을 통하여 개발된 새로운 동 식물품종들에 의해서 유지될 것이다. 모든 자연과학적인 노력은 생물학적, 물리학적 및 사회과학적인 학문과 서로 연계되어 이루어 져야 한다. 이러한 연구는 켄터키주를 포함한 세계 여러나라에서 소자본 투자에 의한 생산의 극대화나 소규모 농장에 알맞은 생산 기술들을 개발하기 위하여 계속적으로 일어나야 한다. 켄터키주는 소규모의 자본을 가지고 운영하는 수천 개의 소규모 목장들이 산재해 있다. 이러한 농장은 대개 소를 중심으로 사육하는데 목초를 재배하고 수확하여 저장하는데 지출되는 비용을 최소화하기 위하여 큰 노력을 들인다.

미래에 가축생산이 어떻게 변화할 것인가를 예측하기란 쉽지 않다. 하지만 세계 인구가 증가함에 따라서 값싸고 안전한 식량공급이 지속적으로 요구될 것이라는 것은 분명하다. 이러한 식량공급의 요구는 현재 대부분의 농장에서 사육되는 소, 양, 염소와 같은 가축을 위한 사료와 목초 뿐만 아니라 버펄로, 낙타, 사슴, 라마 및 야크 등과 같은 반추동물의 사료 등도 이에 해당한다. 미국에서 이러한 가축의 증가를 막는 가장 큰 원인은 환경오염인데 그 중에서도 수질오염이 가장 크다. 우리는 앞으로 가축의 증가로 식량자원을 공급하고 환경오염을 줄이는 다각적인 형태의 가축사육방법을 모색해야 한다.

초지를 이용하여 가축을 사육하면 그렇지 않을 경우보다 약간의 비용이 더 들겠지만 안전하고 양질의 축산물을 생산 할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 이러한 가

축사육 방법은 방목되고 있는 가축에게 그 가축의 영양소 요구량에 맞게 사료를 공급해 주기가 힘들고, 가축의 초기 질병 발생을 파악하는데 어려움이 있다. 사실 환경오염이나 국민들의 삶의 여건을 고려한다면 초지의 집약적 이용은 피하는 것이 좋다. 왜냐하면 초지를 집약적으로 이용할 경우 여러가지 환경적, 경제적 및 사회적 문제에 대한 우려가 있는 반면 초지를 비 집약적으로 관리 이용할 경우 오히려 환경보존에 좋은 영향을 끼칠수 있다는 것이다. 생태적 입장에서 볼 때 초지의 집약적관리로 인한 자원의 고갈은 초지를 비집약적으로 관리함으로써 다시 재생시킬 수 있다.

초지를 기초로 한 유우산업에서 아직도 많은 관심을 기울이는 분야는 높은 에너지 요구량에 맞는 유우종을 선발하는 것이다. Kolver 등 (2000)은 북반구 Holstein Friesian 종이 new Zealand Holstein Friesian 종 비교해서 우유생산량에 큰 차이를 보이지 않고 오히려 증체가 감소하는 경향을 보였다. Webster (2000)은 에너지의 불균형으로 인한 대사 스트레스로 인하여 유전적 능력이 좋고 초지를 기반으로 사육되는 유우의 수명이 오래 가지 못할 것이라고 우려하고 있다. 이러한 대사 스트레스를 줄이기 위해선 올바른 육종과 관리가 선행되어야 할 것이다.

사초품질 평가방법의 다양성

지난 10년간 목초의 품질에 대한 평가방법에 대해서 많은 연구가 이루어져 왔는데, 이는 새로운 품질평가기술을 개발하기 보다는 품질을 예상할 수 있는 방법에 대해서 초점이 모아져 왔다. 즉, 사초의 품질, 이용 및 가축의 생산성을 예측하는데 대한 많은 다양한 방법들이 개발되어 왔다. 요즘 미국에서는 초지가 친환경적으로 유지되어 야생동물의 보존과 긴밀한 관계를 유지하는데 많은 연구가 활발히 시행되고 있다. 이러한 상황에서 사초의 품질에 대한 정의가 변화하고 있다. 우리가 사초의 품질을 논의 할 때는 사초가 지니고 있는 그 자체의 성분에 대해서만 언급해서는 안된다. 그 사초가 얼마 만큼 야생동물 보존에 도움이 되느냐에 따라 그 품질이 달라질 수 있다. 이것이 새로운 개념의 사초품질인 것이다. 과거 사초품질이 가축의 생산성에 관심있는 생산자를 위한 것이었다면, 요즘 사초의 화학적 품질은 사료회사의 사료제조관련 업무에 종사하는 사람들에게나 관심이 있다. 야생동물 보호론자들은 요즘 사초의 품질이 야생동물 보호에 어떠한 관련이 있느냐를 알기를 원한다. 예를들어 언제 목초를 수확하는 것이 야생조류의 생장에 도움을 주는가 하는 등이다. 이러한 것들은 더 이상 가축의 생산성에 관련된 초지의 이용성과는 거리가 멀

다. 이제 우리는 목초의 품질을 평가하기 위해선 가축자체의 생산성 만도 환경보존 자체만도 아닌 이러한 두 가지 문제를 모두 고려할 수 있는 다양한 평가 시스템이 구축되어야 한다.

목초의 품질은 통상적으로 조섬유와 단백질 분석을 통해서 측정되어진다. 목초의 세포내용 물질들은 쉽게 분해된다. 하지만, 조섬유, 다시말해 세포벽 물질들은 식물체가 성숙되어 가면서 증가되고, 이는 가축의 섭취량을 예상할 수 있는 좋은 지표가 될 수 있다. 미국에서는 van Soest 분석방법이 가장 널리 이용되는데, 이는 조섬유를 NDF, ADF 및 리그닌 (Van Soest et al 1991)으로 나눈 시스템이다. NDF는 쉽게 용해되지 않는 식물체의 조섬유를 총칭하는 것으로 사료 섭취량과 아주 밀접한 관계를 가지고 있다. 반추위의 포만감이 조사료위주 사양에 있어 섭취량을 조절한다. 섬유소 분석의 변화는 더욱 효과적이고 보다 정확하고 빠르게 분석할 수 있는 방법을 제시해 주고 있다. 새로운 방법들은 같은 개념의 화학적 분석법을 채택하고 있으나, 보다 이용하기 간편하다. 지금까지 가장 많이 이용되고 있는 섬유소 분석기는 미세구멍이 30μ 이하의 필터 봉지를 사용하므로써 걸러지는 부분과 용해되어 빠져나가는 부분으로 나뉘어 분석한다. 이러한 간편한 분석기구는 기존에 사용하던 뜨거운 용기를 사용하지 않아도 되며, 같은시간에 시료를 가열하고 휘저을수 있어 분석에 필요한 노력과 시간을 최소화 할 수 있다. 필터봉지는 원래 ash가 없는 재료이므로 ash가 없는 NDF나 ADF를 쉽게 구할 수 있을 뿐더러, 시료상에 들어 있는 유기물도 계산해 낼 수 있다. *In situ* 소화시험과 단백질 분해도 또한 이와 같은 미세구멍이 50μ 인 질소가 함유되어 있지않은 필터백을 이용하면 기존에 사용해온 켈달방법의 불편함을 크게 개선할 수 있다. 이러한 새로운 방법들은 기존의 방법들과 결과면에서 큰 차이가 없고, 오히려 더 정확하고 안전한 방법으로 평가받고 있다.

최근에 미국에서 새로이 개발된 분석방법은 기존 분석방법의 개념을 달리한 목초의 품질을 유기물 기준으로 평가하는 방법인데, 유기물 소화평가 방법은 목초의 품질을 평가하는데 건물소화평가 방법보다 더 정확한 측정방법이 될 수 있다. 왜냐하면 이 새로운 방법은 Ash의 함량이나 타액 그리고 목초의 토양오염 등에 의해 영향을 받지 않기 때문이다.

목초품질은 지금까지 목초가 지니고 있는 성분들이 가축에 얼마만큼 이용될 수 있는가에 의하여 평가되어 왔다. 초지에 방목되는 가축에 사료급여시 채취되는 Grab 샘플은 종종 목초의 품질을 평가할 수 있는데, 이는 종종 목초의 품질을 과대평가하는 결과를 초래 하곤 했다. Dubbs (2001) and Dubbs et al. (2002)는 목초의 품

질을 평가하기 위하여 손으로 예취된 샘플과 저작된 샘플과 비교 분석 하였다. 저작된 샘플은 케놀라가 부착된 소의 반추위에서 채취되었고, 채취된 반추위는 방목되기 30분전에 인위적으로 비워지고 세척되어 졌다. 그후 방목이 끝난뒤 섭취된 샘플이 채취되었다. 손으로 예취된 샘플과 섭취된 샘플과의 품질 비교는 표 3에 나타나 있다. 유기물 함량에서 5% unit의 차이는 타액의 회분성분에 기인된 것으로 여겨진다. 섭취된 샘플의 높은 조단백질 함량과 분해된 단백질 수준 및 낮은 NDF와 ADF의 함량은 방목시 가축의 선택채식의 결과라 보여진다.

Table 3. Effect of forage collection on forage quality components of tall fescue based pastures. Values are averaged over a six month grazing season. Adapted from Dubbs et al 2002

Component	Clipped sample	Masticate sample
Organic matter - % DM	92.7	87.4
Crude protein - % OM	13.0	17.5
NDF - %OM	70.0	64.7
ADF - %OM	36.0	32.9
<i>Streptomyces griseus</i> degradable protein - % CP	60.3	71.0

표식인자를 이용한 시험방법이 방목가축의 섭취량 및 소화량 조사를 위해서 널리 사용되어 왔는데, 이는 간단하지만 몇 가지의 조건들을 맞추어야 한다. 모든 식물의 큐틴질 왁스에서 발견되어지는 n-alkanes를 표식인자로 이용함으로써 이러한 조건들이 다소 필요없게 됐으며, 필요에 따라 다양하게 사용되고 있다. 이러한 기술은 전적으로 짝수 사슬과 자연적으로 존재하는 홀수 사슬의 alkane이 얼마나 발견되어지는가에 달려있다. 알려진 조건의 하나는 소화력을 측정하기 위하여 C36-alkane의 회수율을 아는 것이다. 표 4는 양과 소에서 실제 사료 섭취량과 alkane를 이용한 기술에 의한 섭취량과의 차이를 보여주고 있다. Dove and Mayes (1996)의 10번에 걸친 시험에서 알려진 섭취량과 측정된 섭취량과의 차이는 2.6%에 불과했다. 반추위내에서 천천히 분해되는 캡슐의 이용은 이러한 분야의 연구를 좀더 활성화 하는데 기여해 왔다 (Mayes and Dove 2000). Alkane 표식인자를 이용한 기술의 개발 전에 사료의 성분을 측정하는 것은 주로 식도에 케놀라를 부착한 가축에 의존해 왔다. 이러한 기술은 외과적 수술과 수술한 가축의 관리 등 여러가지 어려움이 상존해 있다. 다양한 종류의 식물들이 다양한 타입의 alkane를 함유하고 있다는 사실을 발견한 것은 또다른 분석방법의 획기적 발전을 가져왔다. 이는 방목되고 있는 가축들의 분

서 alkane의 성분을 측정함으로써 가축들이 어떠한 종류의 목초를 채식하는가를 하는데 크게 공헌해 왔다.

Table 4. Dry matter intake estimates using dosed and herbage alkanes compared with actual intakes in sheep and cattle. Adapted from Dove and Mayes, 1996

Animal & diets	Mean true DM intake	Mean bias of estimate
Sheep	g d ⁻¹	g d ⁻¹
Fresh perennial ryegrass	579	0
Freeze-stored perennial ryegrass	914	0.2
Fresh herbage	778	20
Cattle	kg d ⁻¹	kg d ⁻¹
Fresh grass	4.0	0.07
Fresh perennial ryegrass	14.2	0.09
Silage	4.8	0.10
Pasture	12.0	0.31

사료성분을 측정하는 이유는 단지 사료의 영양적 가치를 추론하고자 하는 것일 뿐 아니라, 초지에서 식생의 변화를 이해함으로써 장기적으로 가축의 영양적 상태가 어떻게 변할 것인가를 추정하는데 더 큰 의의가 있다(Milne 1991). 이것은 초지의 환경친화적 관리를 위해 더욱 중요한 것이다. 이러한 지식은 환경친화적 초지를 만들기 위해서 어떠한 초종과 식생구조가 올바른가를 결정하는데 크게 기여한다. 앞으로 이렇게 생태학적이고 환경친화적인 초지의 발달을 염두에 둔 목초품질평가방법만이 그 의의를 지닐 것이다.

가스를 이용한 분석방법이 1963년 Tilley와 Terry가 만든 재래적 *in vitro* 기술을 대체할 수 있는 방법이다. 식물의 불용성 부분의 용해를 통해서 측정 (Tilley and Terry, 1963) 하는 것 대신 가스의 발생을 측정하는 것이다. 이 방법은 두 가지 큰 장점이 있는데 그 하나는 전기적 압력센서를 이용하여 측정치가 컴퓨터에 의해서 기록되어지고, 둘째는 Sacco 방법에서 불용성 부분의 소화정도를 알 수 있는 것처럼 사료의 수용성 부분의 소화정도가 자세하게 기록된다는 것이다. 비록 이 방법이 아주 최근 방법은 아니지만, 몇 년 전만 해도 흔히 이용된 방법이다(Schofield 2000).

이 방법의 간결성과 영양모델에 적응성은 이 방법이 발효성상을 결정하는데 아주 유용하게 이용될 것으로 예상된다.

*In situ*와 *in vitro* 방법을 통하여 분석된 사료의 화학적 구성성분은 직접적으로 사료품질의 평가하는데 이용되는 것이 아니라, 여러가지 구성성분을 지표로 사료분석 통계 프로그램을 이용하여 최종 사료품질을 평가할 수 있다. 그 이유는 반추위에서 사료가 소화되기 위해선 여러가지 복잡한 대사경로를 통과해야 하기 때문에 하나의 분석 지표를 가지고 사료 전체의 품질을 평가하기란 불가능 하기 때문이다. 지난 10여년간 보다 정확한 사료분석을 위해서 새로운 분석방법을 개발하기 보다는 분석 방법의 자동화 및 전산화와 같은 방법에 보다 많은 연구가 진행되어 왔다. 앞으로 목초의 품질을 평가하는데는 수용성 섬유소 및 전분 분석과 *by-pass* 단백질과 같은 화학적 구성성분이 계속적으로 중요한 몫을 차지하겠지만, 분석기술의 자동화 및 최적화는 분석의 속도, 정확성 및 연결성 등을 개선시키고 특히 분석에 따른 비용절감에 크게 관심이 있다. 요즘 NIR (near infrared reflectance spectroscopy)는 목초의 품질을 목초의 품질을 평가하는 중요한 수단으로 인정받고 있다. 그러나 아직도 많은 자료들이 부족하고 그의 정확성에 대해서 의문이 있기 때문에 아직까지 전세계적으로 널리 사용되고 있지는 않다. 이러한 이유중에 하나는 장비가 고가라는 것이다. 만약 장비의 가격이 낮추어 진다면, 정확성의 문제에도 불구하고 세계 널리 이용될 것이라고 생각된다.

앞으로 목초의 품질을 평가하는데 값비싼 장비의 이용은 더욱 증가할 것이라 생각된다. 특히 Toxicosis와 같은 연구처럼 좀더 복잡한 물질의 분석일때 더욱 그 필요성이 증시된다. 이러한 분석방법은 주로 액체크로마토 그래피와 스펙트럼을 이용한 방법이다 (lc/ms/ms; liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometers as detectors). 이러한 방법을 이용한 대표적 예는 tall fescue/endophyte의 연관성을 밝히는데 사용된다. Tall fescue/endophyte의 ergovaline의 구조와 특징적인 223 m/z 단편 및 ergolene 고리가 그림 2에 보여지고 있다. 이에 관련된 이온들의 스펙트럼이 그림 1A와 1B에서 나타나있고, 이에 대한 요약은 표 5에 정리되어 있다. 이러한 기술에서 밝혀진 바에 따르면 이온의 단편이 223 m/z보다 적을때인 208, 197, 180, 70 및 44 m/z일 경우 ergot alkaloid의 감지가 용이하다. 만약 223 m/z보다 크면 이러한 ergot alkaloid의 peptide 고리 시스템을 분석하는데 도움을 준다 (Lehner et al. 2002).

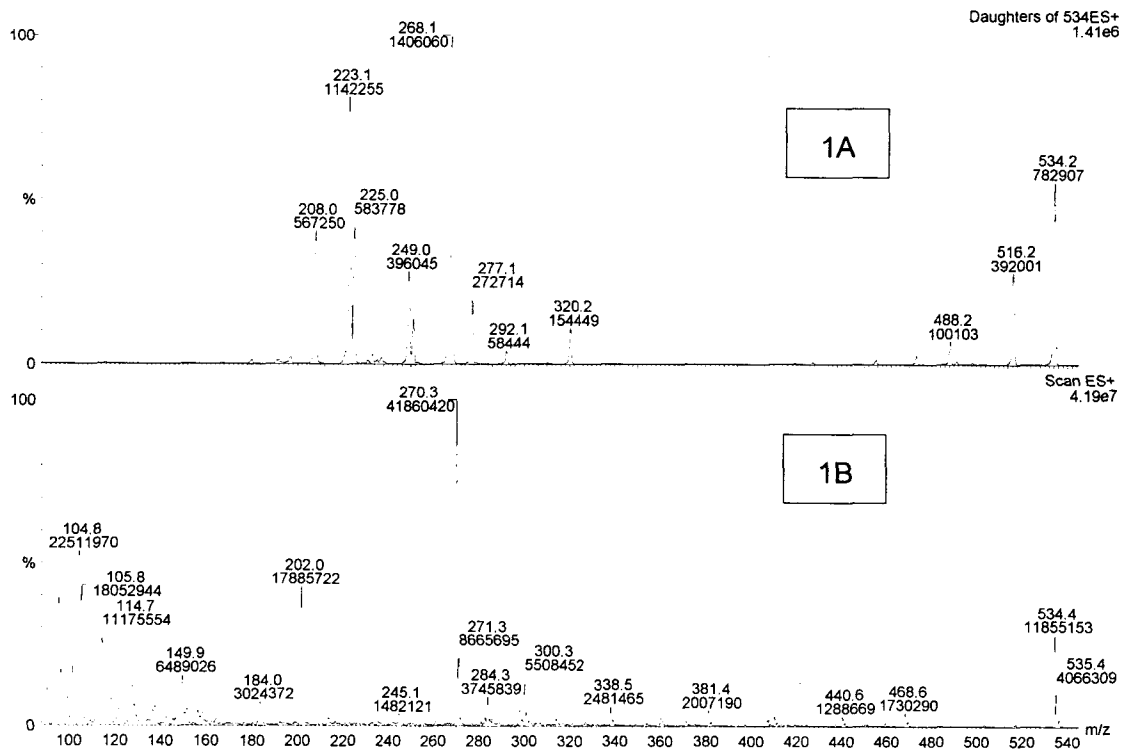


Figure 1. Ergovaline mass spectrometry. 1B, ESI(+), MS of ergovaline standard. 1A, daughter ion spectrum of the m/z 534.5 fragment seen in the lower part of the figure.

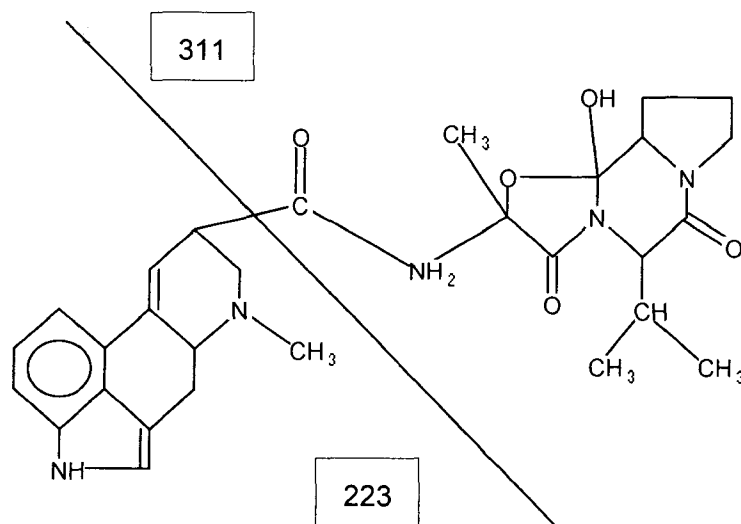


Figure 2. Ergovaline structure protonated on the amide linkage and indicating collisionally-induced dissociation with the corresponding origin of the m/z fragment.

Table 5. Ergovaline daughter ion peak assignments.

Peak, m/z	assignment
534	M + H
516	loss of water (-18) from peptide ring system
488	m/z 516 minus N=CH ₂
320	cleavage of peptide ring system (in amide and at ether) with transfer of a proton
292	m/z 516 minus lysergic ring system
277	m/z 292 minus CH ₃
268	[lysergic ring system-C=O-NH ₂] + H
249	m/z 516 minus [lysergic ring system-C=O-NH ₂]
225	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₄ =peptide ring system released by cleavage of M+H central amide group, minus alkyl or aralkyl side groups
223	[M+H] minus [peptide side chain-NH ₂ -HC=O]
208	m/z 223 minus CH ₃
197	m/z 223 minus CH=CH
180	223 minus CH ₂ =NCH ₃
70	pyrrole ring+H
44	O=C=NH ₂

목초 Endophyte의 성격과 영향

목초 endophyte는 목초에만 국한되는 것이 아니라 전 세계적으로 많은 식물들에서 나타난다. 많은 목초에서 endophyte의 존재에 대해서 많이 조사되어 있지 않지만, 계속적으로 많은 식물들이 endophyte에 의해 감염되고 있는 실정이다. 자연적 생태 환경에서 목초 endophyte의 존재에 대한 영향은 많이 연구되어 있지 않지만, 앞으로 이러한 분야에 대한 많은 연구가 이루어 질 것이라 예상된다.

최근 endophyte 곰팡이에 감염된 목초의 특징들이 보고되고 있다(Bacon and White 1994). 이들의 특징은 mammalian 독소를 함유하고 목초의 생산량은 증가 시킨다는 것이다. 생산량 증가는 endophyte가 감염된 목초를 가축들이 섭취를 기피하기 때문이고 또한 병, 저항성, 가뭄 저항성 및 성장의 촉진 등에 기인된다. 다년생 목초의 농업적 이용가치는 이들 목초들이 지속력이 있다는 것이다. 우리가 endophyte와 목초와의 상호작용을 잘 이해하면 어떻게 이들의 유전적 형질을 생산된 목초의 품질과 생산량을 높이기 위하여 조절할 것인가에 대한 아이디어를 구할 수 있다. 현재 이러한 연구는 대부분 내생 endophyte에 감염되어 있는 목초의 형질을 바꾸는데 초점이 맞추어지고 있다.

그 한 예로 Tall fescue에 있는 pyrrolizidine 및 ergot alkaloid를 변화시키는 것이다 (표 6). Endophyte를 변화시키면 pyrrolizidine alkaloid가 양적으로 또는 질적으로 변화되어 noracetylloine성분이 발견되어 지지만, 야생종에선 N-acetylloine 및 N-formylloline 성분이 발견되어 진다. Ergovaline가 주요한 ergot alkaloid 형태이면, ergot alkaloid는 질적인 변화보다는 주로 양적인 변화를 한다. 이러한 변형된 형태가 농업적 생산성에 얼마큼 기여하는지는 많이 알려지지 않고 있지만, Bouton 등 (2002)은 그 중요성을 보고해 왔다(표 7). 포유동물에 해를 끼칠 수 있는 독소는 ergot alkaloid 성분이 감소하면서 영향력이 줄어들고, 변형된 형태가 야생종에 비해 월등히 가축의 생산성에 기여해 왔다.

Table 6. Alkaloid content of tall fescue with different endophytes(Data from Lee Jung Kyong)

Alkaloid	Endophyte		
	Wildtype	Mutant	Low
	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$
Ergovaline	1.5	0.02	ND
Peramine	0.08	0.09	ND
Noracetylloine	187	563	2
N-formylloline	640	ND	7
N-acetylloine	349	ND	5

Table 7. Dry matter yield, ergot alkaloid content and lamb performance during a 10 week grazing trial of Jesup tall fescue with different *N. coenophialum* endophyte strains. (Adapted from Bouton et al., 2002)

Endophyte	Dry matter	Ergot alkaloids	Lamb ADG
	kg ha ⁻¹	μg kg ⁻¹	g d ⁻¹
E-	2149	31	123.0
Wildtype	2251	1184	78.5
AR502	2457	39	114.9
AR542	2284	29	130.3

남방형 다년생 토착화본과 목초의 가능성

자연환경과 사초품질을 모두 고려할 때, 21세기는 남방형 다년생 토착 화본과 목초가 환경친화적 목초로 유력한 초종이다. 이러한 초종은 켄터키주에서 토양 보존, 야생동물 보호 및 사초로서의 역할이 매우 크다. 또한 이러한 초종은 북방형목초의 생장이 둔화되는 여름철에 생육이 왕성하다. 켄터키주에서 생육하는 남방형 목초로는 big bluestem(*Andropogon gerardii*), eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides*), indiangrass (*Sorghastrum nutans*) and switchgrass (*Panicum virgatum*) 등이 있다. 이들은 켄터키주에서 첫 정착민들이 들어왔을 때 이곳에 있던 들소를 비롯한 사슴 등의 야생동물의 먹이와 쉼터로서의 역할을 해왔다. Switchgrasses와 eastern gamma grass는 6월에 최고의 생산량을 보이고, big bluestem은 7월, indiangrass은 8월에 각각 최고의 생산량을 보인다. 따라서 이러한 토착초종들은 켄터키주에서 북방형 목초의 생산량이 떨어지는 여름철에 충분한 먹이를 제공해 주고 있다. 과방목, 경작 및 다른 초종의 도입 등은 이러한 초종의 생육을 점점 어렵게 하고 있다. 하지만 최근들어, 가축들과 야생동물의 여름먹이로 또한 토양보전 효과 등으로 이러한 초종들이 다시 각광을 받기 시작하고 있다. 이러한 초종들은 파종과 정착이 쉽지 않기 때문에 윤환방목을 통하여 그루터기를 최소한 15cm~20cm는 반듯이 남겨놔야 한다. 다른 목초들과 마찬가지로 이러한 목초의 품질은 생육시기에 의해서 결정되며, 가장 좋은 방목시기는 수잉기 바로전으로 초고가 35cm~50cm 일 때이다. 또한 이듬해 초지의 생산성과 좋은 식생상태를 유지하기 위해선 초가울에 마지막 방목이 이루어져야 한다. 윤환방목은 방목기간이 30~45일 간격으로 이루어져야 한다. 최소한 2년에 한 번씩 화입을 해야되며, 이는 초지의 관목들의 성장을 억제하고, 좋은 식생상태를 유지

하며, 남방형 목초가 살기에 좋은 토양의 영양상태를 유지할 수 있다. 이러한 초종과 톨 페스큐의 품질 비교는 표 8에 나타나 있다.

Table 8. Production and quality measurements of some Kentucky native warm season grasses

Grass	protein	NDF	DM yield
	%	%	t ha ⁻¹
Eastern gamma grass	10	70	7.9
Switch grass	8	69	5.9
Big bluestem	10	69	6.0
Tall fescue	13	56	7.4

북방형 목초는 광합성 대사의 C₃ 체계를 따르고 있는 반면, 남방형 목초는 C₄ 체계를 따르고 있다. 이는 잎조직 체계의 구조적 차이와 밀접한 관계가 있다. 일반적으로 C₄ 식물은 엽육세포보다 관상세포 부분이 많다. 이렇게 관상세포 부분이 많은 경우 소화속도가 늦어 목초의 품질이 떨어진다 (Akin and Chesson 1989). 엽육세포는 세포벽이 얇아 소화가 빨리 일어나는 반면, 관상세포는 세포벽이 두꺼워서 소화가 느리게 일어난다. C₄ 식물은 높은 온도에서도 생육이 왕성하며 수분 부족으로 인한 스트레스도 크다. 하지만 수분 부족 스트레스로 인한 건물 생산량의 저하는 C₄ 식물 뿌리의 왕성한 발달로 인하여 극복될 수 있다.

Table 9. Percentage of cross-sectional area of different tissue types in leaf blades of C₃ and C₄ grasses

Leaf blade tissue	C ₃ grasses	C ₄ grasses
	% area	
Total vascular	15	22
Lignified vascular	7	4
Parenchyma bundle sheath	6	15
Epidermis	23	35
Mesophyll	57	38

C₃ 식물체의 잎사귀에는 총 비구조 탄수화물 (TNC) 함량이 C₃ 식물체에서 보다 많이 존재한다. 특히 5~10℃와 같은 낮은 온도 조건에서는 더욱 그렇다. 15~25℃ 같은 높은 온도 조건 하에서도 C₃ 식물체는 C₄ 식물체보다 TNC 함량이 약간 많다. 이렇게 품질면에서 북방형목초가 월등히 우수함에도 불구하고, 남방형 목초가 증가 추세에 있다. 이는 여름철 방목되는 가축의 영양소 요구량에 맞추기 위해서는 북방형 목초보다 남방형 목초가 수월하기 때문이다. 또한 농가에게 이러한 남방형 목초를 사용하므로써 기대되는 점은 그들의 땅에 다양한 종류의 야생동물들이 서식할 수 있고, 토양의 보존 효과를 크게 기대할 수 있기 때문이다.

초지 농업의 미래

미래를 추측하는 것은 결코 어려운 일이 아니다. 하지만 미래에 어떤 일이 일어날지 정확히 예상하기란 결코 쉬운 일이 아니다. 왜냐하면 우리는 미래의 초지이용에 어떤 외부적 요인이 영향을 줄지 알 수 없기 때문이다. 하지만, 분명한 것은 그동안 개발된 많은 기술들이 21세기 초지관리와 연구분야에 적용되고 이끌어 나갈 것 이라고 믿고 있다. 이러한 분야에는 다음과 같은 세 가지 분야로 크게 나눌 수 있다. 첫째, 전지구 위치 파악 시스템 (GPS), 둘째, 목초의 유전형질 파악, 셋째, 유전형질의 적용 등이다. 첫째와 둘째는 매우 밀접한 관계를 지니고 있다.

GPS (Global positioning system)는 일종의 지구 궤도를 도는 인공위성 무리이다. 이 체계는 지구 표면의 어떠한 특정한 위치를 파악하는데 사용되어 왔다. GPS는 궤도를 도는 인공위성으로부터 삼각상의 위치감지 시스템을 기본으로 하고 있다. GIS (Geographic information systems)는 우주에서 참고 자료를 받아 분석에 이용한다. 농업분야 GPS와 GIS 기술은 곡물의 생산량을 측정하기 위하여 사용되어 왔고, 초지에서도 상당한 이용가치가 있다는 것이 여러가지 연구자료를 통해서 알 수 있다. 이 기술은 초지의 경계선을 정확히 정할 수 있으며 각 초지의 면적을 정확히 계산해 낼 수 있다.

화본과 목초들은 부모로부터 유사한 염색체를 집단적으로 물려받아 대립유전자를 같이 공유하는 비교적 간단한 유전적 체계를 하고 있다. 이는 다시 말해서 같은 목초종간에 큰 변이를 보이지 않는다는 것이다. 이러한 유전적 체계는 유전자의 자연적 변이를 통하여 발생하는 진화적 차이를 쉽게 이해 할 수 있게 한다. 이러한 유전자의 배열은 자연적 변이를 통하여 쉽게 발생하기 어렵고 유전자 조작을 통하여야만 완전히 새로운 목초의 탄생을 기대할 수 있다.

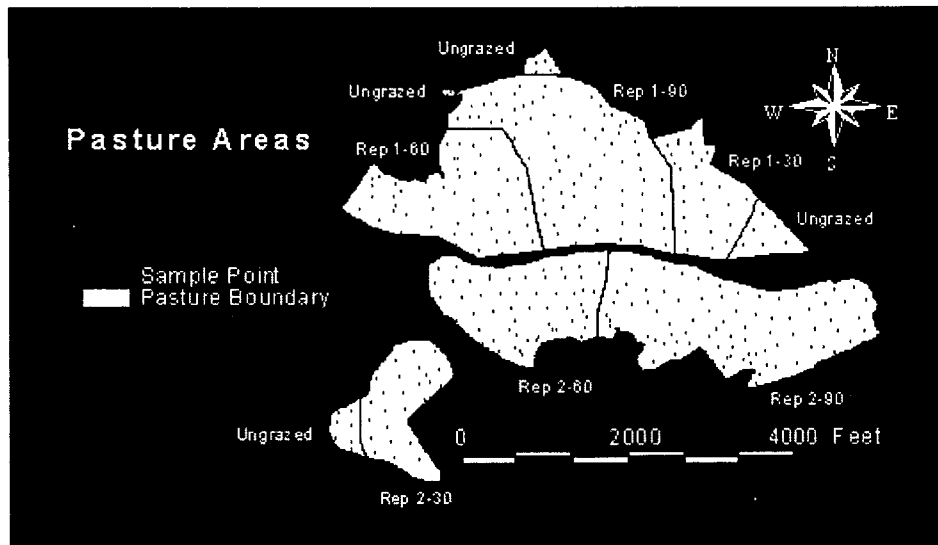


Figure 3. Sampling grid and pasture boundaries for 6 pastures plus ungrazed control areas on disturbed land in the mountainous region of eastern Kentucky.

목초생산에 분자 유전학적 접근은 기존 목초의 특징을 바꾸어 목초생산 및 품질에도 큰 변화를 가져왔다. 최근 유전자가 변형된 목초가 탄생되어 재배되고 있다 (Austin and Bingham 1997; Kalla et al. 2000; White et al. 2000). 유전적, 생리적 및 생화학적 대사작용이 복잡하여 우리가 원하는 유전자 변형의 목초를 쉽게 만들기관 쉽지 않지만, 이러한 유전자 조작 기술은 앞으로 새로운 목초품종의 탄생을 위한 중요한 도구이다. 이러한 기술을 통하여 우리가 개선해야 할 목표는 목초의 품질을 높이는 동시에 병과 해충의 저항성을 높여서 목초의 성장력을 향상시키는데 있다.

미생물로부터 추출된 유전자를 목초에 삽입할 경우 Fructan의 양이 증가하는데, 이는 목초의 목질화를 방지할 수 있어 목초의 성장에 따라 나타나는 목초의 소화의 저하를 방지할 수 있다. 또한 사료 섭취량이 증가되어 가축의 생산성을 높일 수 있다. 증가된 Fructan는 습지나 추위로 인한 피해를 줄일 수 있을 뿐 아니라 단백질의 by pass량도 높여주어 단백질의 이용성을 증가시킨다. 이러한 by pass 단백질은 황 함유 단백질에서 높은 비율을 차지하는데, 이러한 종류의 단백질은 알부민 형태의 단백질로 해바라기씨 알부민이나 완두 알부민에서 많이 나타난다. 목초에서 이러한 형태의 단백질이 발견되어지지만 극히 낮은 양에 불과하다 (see review by Spangenberg 2001; Hancock and Ulyatt 2001). 농축된 tannin, 수정력, 개화, 결실 등의 다양한 목초의 특성들이 목초의 기존 유전자에 삽입된 외래유전자에 의해서 다양하

게 변화되어 질 수 있다. 앞으로 이러한 생각은 수 년내에 목초에 관련한 여러가지 분야에서 다양하게 전개될 것이다.

하지만 모든 분자유전학의 가능성은 이에 관련된 기존에 개발된 기술과 연계되어 성취될 수 있다. Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. = *Lolium arundinaceum*)는 미국에서 가장 널리 재배되는 북방형 목초로서 분자 유전학 연구에 가장 많이 이용되고 있다. 켄터키 주립대학의 Buckner 교수는 이 목초의 품질을 개선하기 위해서 다른 목초 또는 다른 품종들 (*Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *Festuca gigantea* and *F. pratensis*.) 과의 교잡을 통해서 Tall fescue의 품질을 개선시켜 왔다. 이러한 고전적 육종방법은 현대적 분자 유전학적 기법을 도입함으로써 더욱 발전되어 왔다. 이러한 목초의 모계나 잡종의 염색체 수준은 2 X에서 8 X이다 (표 10). Tall fescue에 비해서 잡종들이 수분 및 단백질 함량이 높고 섬유소 함량이 낮아 소화가 잘 일어난다. 기호성과 소화성도 수분 함량이 증가됨에 따라 높아지고, 이렇게 증가된 수분 함량은 많은 광물질을 포함하고 있다 (Buckner et al, 1981). Alkaloid perloline 은 몇몇 식물체에서 발견되는 유전자에 의해서 감지될 수 없을 정도의 양인 약 3000 $\mu\text{g g}^{-1}$ 로 줄어들 수 있다 (Buckner et al. 1973). 또한 Perloline는 섬유소와 단백질의 소화에 영향을 줄 수 있다 (Bush et al 1976; Boling et al 1975; Bush 2001). 이러한 결과는 목초종간의 상호 DNA 교환 연구에 의해서 발전될 수 있는 좋은 예인 것이다.

Table 10. Perloline content of ryegrass and fescue species and ryegrass-fescue hybrids grown in space plants

Species and hybrids	Ploidy	Perloline content
		$\mu\text{g g}^{-1}$
Annual ryegrass (a)	2x	17
Perennial ryegrass (p)	2x	209
Meadow fescue (m)	2x	3,545
Giant fescue	6x	209
Tall fescue	6x	716
F ₁ (at)	4x	138
F ₁ (pt)	4x	368
Amphiploid (AT)	8x	1,387
(at)t	6x	633
(pt)t	6x	53

결 론

21세기에서도 사초와 초지는 여전히 식량생산과 환경보전차원에서 지속적인 중요성을 지닌다. 사초생산은 가축의 생산성 향상에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 자연자원, 야생동식물, 토양 및 수질 향상에도 큰 역할을 한다. 이러한 생산과 환경보전은 전 세계의 많은 연구자들의 다양한 연구의 결과로 더욱 발전될 수 있었고, 앞으로도 더욱 발전될 것이다. 요즘들어 분자생물학을 이용한 새로운 목초생산도 자연생태계의 지속적 유지를 위해 중요한 학문으로 대두되고 있다. Fungal endophyte는 목초에서 계속적으로 발견되어지고, 그 감염 수도 증가하고 있어 목초생산에 큰 영향을 끼칠 수 있다. 목초나 endophyte를 유전적으로 변형시켜서 목초생산에 영향을 주지않을 뿐아니라 자연생태계에 더욱 적합한 관계를 유지할 수 있다. 이와 같은 연구방법은 앞으로 전세계적으로 자연환경 보전을 위한 중요한 연구분야로 인정받고 발전되어 갈 것이다. 즉 친 환경적농업 생산체계에 있어 생물학, 물리학, 경제학 및 사회학 등의 여러가지 학문분야가 균형을 유지하는 것이 이러한 생산체계를 유지하는데 중요하게 대두될 것이다. 개발된 새로운 기술은 자연 생태계를 유지하면서 대부분의 생산자들에게 경제적인 수익으로 다가 와야 된다. 이러한 의미에서 초지는 전세계 수백만명의 농촌사람들에게 지속적인 필요를 충족시켜 줄 것이다.

Forage evaluation and sustainable agriculture

Lowell Bush

Department of Agronomy University of Kentucky Lexington, KY 40546-0091 USA

Forage and grasslands are receiving added attention as we move into the 21st century mainly because of their potential for carbon sequestration, protection and improvement of water quality and food production. There many aspects to each of these broad benefits of forage and grasslands but before a discussion of some of these topics a comparison of Kentucky and the Republic of Korea is appropriate. A brief introduction to show the similarities between Kentucky and the Republic of Korea will place in context some of the research going on at the University of Kentucky and its potential relevance to South Korea. The two entities are about the same distance north of the equator. Land area of the two regions is very similar as are the January and July average temperatures (Table 1). Precipitation is also about the same, 1100 mm, but rainfall in Kentucky is evenly distributed throughout the year, whereas in South Korea most falls in the June to August period. Elevation range in the Republic of Korea is greater than that in Kentucky. The Republic of Korea has slightly more arable land, much more forests and woodlands but Kentucky has much more permanent pasture. In the United States and in Kentucky, perhaps because of the large amount of pasture and grasslands the urban and rural people are becoming more concerned about the environment.

Table 1. Geographical and agricultural comparison of Kentucky and the Republic of Korea

	Kentucky	Republic of Korea
Population - millions	4	47.9
Total area - km ²	103,600	98,480
Percent of total land as		
Arable land	19	21
Permanent pasture	19	1
Forests and woodlands	51	65
Other	11	13
Cattle - million	2.3	3.0
Mean January temperature °C	1	-2
July	25	24
Precipitation - mm	1130	900-1500
Elevation range - m	80-1200	0-1,950

This presentation will briefly discuss the environmental and conservation issues of grassland use, forage quality evaluation with some applications of newer techniques, significance of grass endophytes, use of native grasses and some research done at the University of Kentucky and then some ideas for 21st century forages.

Environment

Increasingly grasslands are being recognized as important to maintain or improve our natural resources and environment. Wildlife and well as domestic livestock benefit from forage and range land. However, nonpoint source pollution from grasslands and croplands has become recognized as an environmental problem, especially with respect to water quality. Water quality problems may be caused by soil erosion, nutrient runoff including nutrients from animal fecal material and contamination with microbes in the fecal material. Amount of soil erosion from pastures is much less than from cropland in most states (Table 2).

Table 2. Annual sheet and rill erosion in selected States

State	Erosion loss t ha ⁻¹	
	Cropland	Pasture
Kentucky	7.6	4.5
Alabama	13.4	1.1
Florida	2.7	0.2
Tennessee	12.5	1.8
Texas	5.8	1.1

In the United States each producer is to have a water quality plan to participate in any Federal programs. These plans include filter or buffer strips along bands of streams and lakes. These filter strips are to trap nutrients and sediments before they enter the surface waters. If a producer joins the Federal Riparian Program they are required to have a filter strip, width is defined by the slope of the land, and a producer cannot graze or utilize this forage, but must clip the sward to maintain approximately 20 cm

height sward. Producers are encouraged to use native grasses on these filter strips to enhance wildlife and soil conservation.

Forage researchers must address the issue of increased CO₂ in the atmosphere and atmospheric warming from both the change in forage production and carbon sequestration. Much information is available on productivity of C₃ and C₄ forage grasses at different atmospheric CO₂ levels and temperature. In this venue and in much of the United States the issue is not so much to prevent clearing of the land but to provide the knowledge to develop coherent carbon policy. Much has been written about development of carbon trading rights to maintain the economic viability of individual landholders controlling vegetation as dry matter, while addressing broader environmental concerns. It has been calculated that in the United States conservation filter strips will occupy at least 3.2 Mha by 2020 (Lal et al. 1999). This area would accumulate carbon at approximately 50 g C m⁻² yr⁻¹. In tropical areas CO₂ release by deforestation may be only 15~20% of emissions from fossil fuel (see Schroeder and Winjum, 1995). However, below ground changes of carbon could be zero or actually increased in some instances (Hughes et al. 2000; Post and Kwon 2000; Tarre et al. 2001). Tarre et al (2001) found increased soil carbon to depths of 50 cm under tropical grasslands. Carbon sequestration in vegetation or in temperate and tropical soils will be significant in the 21st century. Ways to store harvested vegetation in deep coal mines, under anaerobic conditions, with minimum tillage to keep carbon on the land but yet diffuse are and must be considered.

What is the future for sustainability of forage/livestock research and production systems? In many countries, including the United States and the Republic of Korea, market forces are determining priorities for research and development programs. Food is sufficient and support for production research probably will not increase in the near future. However, grasslands will continue to be important to global food production and environmental sustainability and improvement. Forage and grassland systems will be developed to utilize the newly developed plant and animal resources from molecular biology and changing environmental constraints. All scientific endeavors must participate in the research effort biological, physical and social. There is continuing need to develop or adapt technology which is particularly appropriate for the low input and small scale systems which characterize many parts of the world including Kentucky. Kentucky has thousands of small size farms with little capital available that are

primarily cow/calf operations that require low input harvest, storage and preservation systems for their forage. These are the sectors of forage and grassland research-environment, molecular biology, forage utilization and the social impact of grasslands on rural and urban areas - in which there is still substantial opportunity for significant improvement and contribution to a better quality of life for us.

While it is difficult to predict future changes in livestock production, the need to produce cheap and safe animal products as the world's population increases is likely to result in greater intensification of livestock production. This pressure for intensification of production will extend beyond the main farm animal species that presently supply food and fiber for humans such as cattle, sheep and goats, to other ruminants such as buffalo, camel, deer, llama, reindeer and yak. In the United States the main constraints on increased numbers of animals in confinement is waste removal, point source air pollution and ground water pollution. The advantages of production in confinement are in marketing and a dependable supply of food. We must develop best management practices that allow for adequate food production while protecting our valued resources on which the production depends.

More extensive forage/livestock systems may have few of the constraints of confinement production and may produce a healthier product but at a higher cost. One disadvantage of extensive forage/livestock systems is to meet acceptable dietary requirements of the animals and to provide good disease control. Less intensive use of grasslands, and more generally of the livestock systems they support, has been triggered by a growing sensitivity of citizens to environmental quality (degradation by high density animal production systems) and quality of animal products, and by the warnings addressed to political authorities by scientists about the environmental consequences of economic imbalances (decreasing biodiversity, drop in soil fertility, greenhouse effect), and in particular of food overproduction in some parts of the world. As a consequence forage/livestock production most likely will be maintained and should grow in the near future as societies stress a perceived better treatment of animals and concern for environmental degradation. From an ecological standpoint, grassland de-intensification must be promoted whenever techniques used disrupt resource sustainability.

An increasing concern in pasture-based dairy production is the use of genotypes

selected on high energy diets. Kolver et al. (2000) reported that Northern Hemisphere Holstein Friesian genotype produced the same yield of milk solids in an all-pasture system as the New Zealand Holstein Friesian genotype but the former genotype failed to maintain body weight in this production system. Webster (2000) has also argued that longevity and welfare are risk in these high genetic merit dairy cows particularly on pasture when metabolic stress is likely to arise with the imbalance between energy input and output. Breeding and management strategies are required to avoid stress due to high metabolic load in such situations.

Forage quality evaluation

Much of the research in the last decade has related to improving predictive measurements not in developing new measurements. Different degrees of progress have been made in the development and use of measurements to further our understanding of forage quality, utilization and animal response. In the United States there is movement towards more extensive use of grasslands to meet sustainability, wildlife conservation and viewscape objectives. In these circumstances the definition of forage quality changes, certainly to meet wildlife conservation and viewscape objectives, and this requires new approaches to measure forage quality. In the past forage quality has focused on animal performance for the individual producer, but now chemical forage quality is of great importance to commercial companies that mix feeds. Also, wildlife conservationists now want to know the quality of the forage for wildlife herbivores and the quality of the hay, for example, in designing systems in which hay is cut at particular times in the season to meet the requirements of nesting birds. It is no longer sufficient to consider forage quality purely in terms of efficiency of forage utilization and domestic animal performance. The requirements for measuring forage quality have increased as the diversity of grassland systems utilization has increased.

Fiber and protein analyses are the two components of forages most frequently measured. Forage cell content is assumed to be readily digestible. Fiber, the cell wall portion of the cell, increases with plant maturity and fractions of the cell wall are good predictors of forage intake. The Van Soest system of fiber analysis is most often used in the United States and partitions the fiber into NDF (neutral detergent fiber) ADF

(acid detergent fiber) and lignin (Van Soest et al. 1991). NDF is best related to feed intake as it represents the total insoluble fiber and a measure of digestibility. Ruminant fill or capacity regulates intake on many forage diets. The significant change in fiber analyses has been the use of more efficient, more precise and safer methodologies than the original. The new methodologies utilize the same chemistry but in containers that are easier and safer to use. Commercial fiber analyzers are available and use filter bag technology with known pore size of $< 30 \mu$ that allows a sample to be solubilized and filtered simultaneously. The handling system and chemical container eliminates the handling of hot chemicals and all samples are heated and agitated the same amount of time. The filter bags are essentially ash free, thus ash-free NDF and ADF are easily determined and organic matter calculated. *In situ* digestion and protein degradation is also done in nitrogen free bags with approximately 50μ pore size to increase precision and accuracy of measurement. Also, most total nitrogen or crude protein measurements are done with nitrogen analyzers and not by Kjeldahl wet chemistry. These techniques have not changed the basic analysis or the significance of the data but have allowed for greater accuracy and safer measurements.

One parameter that has changed over recent years in the United States is that most of the forage quality data are now being reported on an organic matter basis. Organic matter digestibility is a better estimate of nutritive value than dry matter digestibility as it is not affected by ash content or salivary and soil contamination of the forage.

Forage quality has often been measured on the material available to the animal. Grab samples from the field or feeding trough frequently represented the forage. This often over estimates the forage quality as the animals are very selective. Dubbs (2001) and Dubbs et al. (2002) took hand clipped samples to represent the forage and these were compared to masticate samples. Masticate samples were obtained from rumens of cannulated steers which were manually emptied and rinsed prior to a 30 minute grazing period. After the grazing period a wet masticate sample was taken. Clipped forage samples and masticate samples were compared for quality (Table 3). The 5 percentage units difference in organic matter is attributed to salivary ash contamination. The higher crude protein and degradable intake protein values and the lower NDF and ADF for the masticate samples is the result of selective grazing.

Table 3. Effect of forage collection on forage quality components of tall fescue based pastures. Values are averaged over a six month grazing season. Adapted from Dubbs et al 2002

Component	Clipped sample	Masticate sample
Organic matter - % DM	92.7	87.4
Crude protein - % OM	13.0	17.5
NDF - %OM	70.0	64.7
ADF - %OM	36.0	32.9
<i>Streptomyces griseus</i> degradable protein - % CP	60.3	71.0

Markers added to the diet have been the most widely used method of estimating daily intake and digestibility of forage by grazing animals on swards containing few forage species because of their simplicity, despite the need to make several key assumptions. The advent of the use of n-alkanes, found in the cuticular wax of all plants, as markers (Mayes et al. 1986), has reduced the assumptions and the technique has become recognized as the method of choice. The technique relies on the recovery rates of adjacent dosed even-chain and naturally occurring odd-chain alkanes for measuring forage intake and a known assumed recovery rate of C36-alkane to estimate digestibility. Table 4 shows the good agreement between estimates of intake, estimated using the alkane technique, and actual intakes of forages by sheep and cattle. In ten validation studies reported by Dove and Mayes (1996) the largest discrepancy between known and estimated intake amounted to 2.6%. The use of slow-release capsules in the rumen increases the application of the technique to more extensive grassland situations (Mayes and Dove 2000). Before the development of the alkane marker technique, the measurement of the diet composition relied upon the use of esophageal-fistulated animals. This technique had a number of difficulties including the use and maintenance of surgically prepared animals. Exploitation of the fact that different plant species have different patterns of alkanes has allowed the estimation of the diet of herbivores grazing a small number of species from the composition of alkanes in the feces.

The significance of estimating diet composition is not only because of the prediction of the nutritive value of the diet but also because it can lead to the prediction of the long-term consequences for the nutrition of herbivores through an understanding of the

vegetation dynamics of the pasture (Milne 1991). This is important in assessing the sustainability of extensively managed grasslands. Such knowledge is also important in managing grasslands to achieve specific flora and fauna conservation objectives. This aspect of forage quality will become a priority for the future in order that ecological sustainability and sustainable developments can be achieved.

Table 4. Dry matter intake estimates using dosed and herbage alkanes compared with actual intakes in sheep and cattle. Adapted from Dove and Mayes, 1996

Animal & diets	Mean true DM intake	Mean bias of estimate
Sheep	g d ⁻¹	g d ⁻¹
Fresh perennial ryegrass	579	0
Freeze-stored perennial ryegrass	914	0.2
Fresh herbage	778	20
Cattle	kg d ⁻¹	kg d ⁻¹
Fresh grass	4.0	0.07
Fresh perennial ryegrass	14.2	0.09
Silage	4.8	0.10
Pasture	12.0	0.31

The gas production system is an alternative analytical technique to the conventional *in vitro* technique pioneered by Tilley and Terry (1963). Instead of measuring the dissolution of insoluble plant components, as in the method of Tilley and Terry (1963), gas production is measured. This has two main advantages, namely that, using electronic pressure sensors, measurements can be recorded by computer and the details of the digestion of soluble feed components can be studied in the same manner as that of insoluble components in the *in sacco* method. Although it is not a new technique, it has begun to be used frequently in the past few years (Schofield 2000). The simplicity of the method and the major gap that still exists in the ability to predict degradability of constituents of forages as inputs to nutritional models makes the use of the technique to determine fermentation kinetics attractive.

Chemical characterization, *in situ* and *in vitro* methods cannot give a direct estimate of forage quality but rely on statistical associations. Because of the complexity of ruminant digestion, single measurements of chemical characterization have a relatively low ability to predict forage quality. In the last decade most progress has been made in the automation of techniques and minor adjustments to them rather than in the development of techniques for the measurement of new chemical entities. In the future the use of modeling to predict forage quality will increase and these models are likely to continue to rely upon chemical characterization, particularly on soluble fiber, starch analyses and by-pass protein. Automation and refinement of techniques will increase speed, reliability and, as a consequence, reduce the cost of analyses. Moreover, arguments for maintaining animals for routine determinations of forage quality will become increasingly difficult to make. Near infrared reflectance (NIR) spectroscopy has always had great potential for measuring components of forage quality, but the reference methods have been lacking and NIR spectroscopy has not become universally adopted. There is still some question whether NIR can meet the requirements for acceptable forage quality measurements. One limitation to the wider use of NIR spectroscopy will be the cost of the equipment. Only if there is a significant reduction in cost will the technique have world-wide applicability, regardless of the accuracy of the measurements.

A reasonably expensive technique that is becoming more common place in forage evaluation, especially for toxicosis research is the use of lc/ms/ms (liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometers as detectors). This technique provides for the positive identification of substances in a complex mixture without extensive chemical cleanup. Some resolution of components in the mixture are resolved in the liquid chromatograph but the most powerful tool is the ability to analyze daughter ions in the second mass spectrometer of the fragments from the first mass spectrometer. An example of application of this technique is shown with ergovaline, the principal ergot alkaloid in many tall fescue/endophyte associations. The structure of ergovaline and the characteristic 223 m/z fragment, the ergolene ring, of the tall fescue/endophyte ergot alkaloids is shown in Fig 2. The daughter ions Fig 1A of the m/z 534 ion, molecular ion in this instance, of Fig 1B are summarized in Table 5. In this technique when the daughter ions show the 223 fragment and the smaller 208, 197, 180, 70 and 44 m/z fragments it is very indicative of ergot alkaloids. The larger than 223 molecular weight fragments are helpful to describe the peptide ring system of these ergot alkaloids (Lehner et al. 2002).

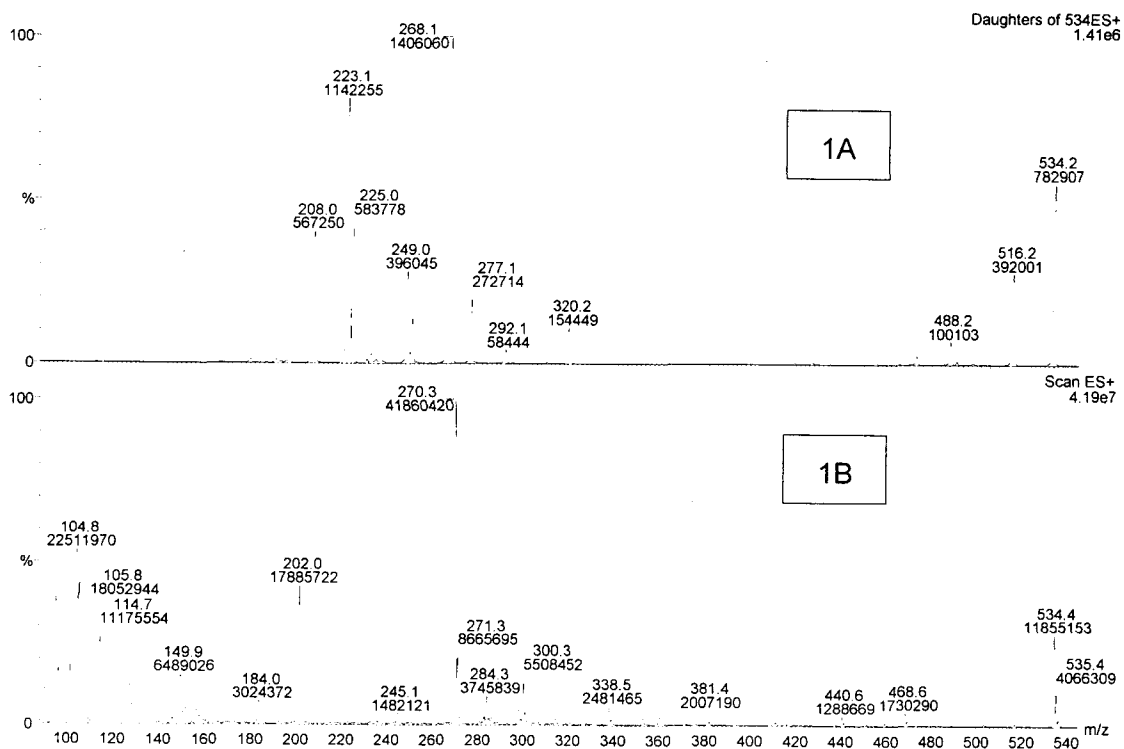


Figure 1. Ergovaline mass spectrometry. 1B, ESI(+), MS of ergovaline standard. 1A, daughter ion spectrum of the m/z 534.5 fragment seen in the lower part of the figure.

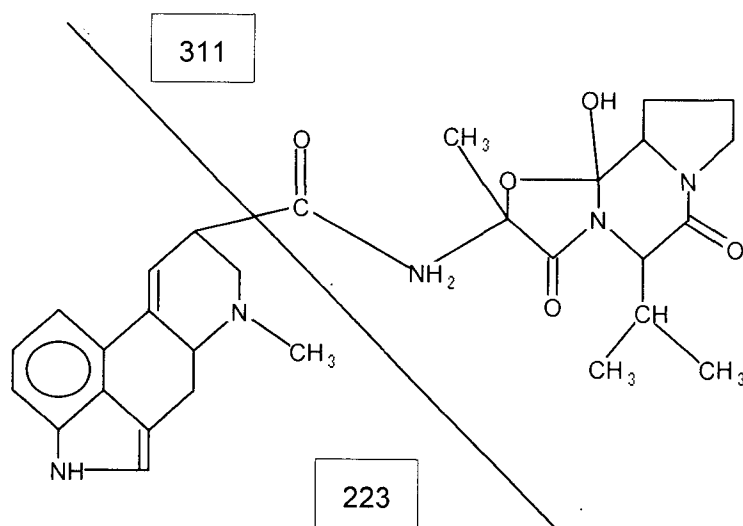


Figure 2. Ergovaline structure protonated on the amide linkage and indicating collisionally-induced dissociation with the corresponding origin of the m/z fragment.

Table 5. Ergovaline daughter ion peak assignments

Peak, m/z	assignment
534	M + H
516	loss of water (-18) from peptide ring system
488	m/z 516 minus N=CH ₂
320	cleavage of peptide ring system (in amide and at ether) with transfer of a proton
292	m/z 516 minus lysergic ring system
277	m/z 516 minus CH ₃
268	[lysergic ring system-C=O-NH ₂] + H
249	m/z 516 minus [lysergic ring system-C=O-NH ₂]
225	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₄ =peptide ring system released by cleavage of M+H central amide group, minus alkyl or aralkyl side groups
223	[M+H] minus [peptide side chain-NH ₂ -HC=O]
208	m/z 223 minus CH ₃
197	m/z 223 minus CH=CH
180	223 minus CH ₂ =NCH ₃
70	pyrrole ring+H
44	O=C=NH ₂

Grass Endophytes

Grass endophytes are not confined to forage grasses but are found in several genera with worldwide distribution. Many grass species have not been examined for the presence of fungal endophytes and as more are examined new hosts continue to be found. The significance of grass fungal endophytes in natural ecosystems has not been studied extensively but is just now being reported in the literature.

Beneficial and detrimental characteristics of grasses infected with endophytic fungi have recently been the objectives of many reviews (Bacon and White 1994). These characteristics include mammalian toxicity and production of plant biomass. Biomass production is the summation of antiherbivore activity, disease resistance, drought resistance and improved growth (Siegel and Bush, 1994; West, 1994). Agricultural usefulness of perennial grasses is based on their persistence. As we better understand the endophyte/grass interaction we are beginning to change the genotypes of both the endophyte and the grass to manipulate the quantity and quality of the forage produced. Presently this is most done by manipulating grasses with endogenous endophytes. The cost to the host appears to be less than the benefit and as more useful endophytes are developed they most likely will be inserted into host species for the benefit of the host and humans. Modified associations or new associations would not have livestock toxicosis but would have improved forage production based on characters such as stand establishment, growth rate, drought resistance, disease resistance, nutritive value, insecticidal and nematicidal activity. Ky 31 tall fescue infected with *Neotyphodium coenophialum* had 8 to 25% greater yield than noninfected swards (Wilkinson 1993). In tall fescue these benefits are most often measured in hot dry growth conditions. The greatest potential benefit of endophyte/grass associations are the improved agronomic performance. The impetus for much of the research on grass endophytes was mammalian toxicity but the long term benefit will probably be application for greater production of higher quality forage. This may be exemplified by the increased photosynthetic rate and water use efficiency of endophyte infected plants (Bush et al 1993)

An example of what changes can occur is the change in the pyrrolizidine and ergot alkaloids in tall fescue (Table 6). The endophyte change is both quantitative and qualitative for the pyrrolizidine alkaloids as mainly noracetylloine is found in the modified association, whereas the wild type has mainly N-acetylloine and N-formylloine. The ergot alkaloids appear to be mainly a quantitative change as ergovaline is the principle ergot alkaloid present, when detected. Agronomic performance of most modified associations have not been evaluated but Bouton et al. (2002) have reported significant but inconsistent differences among associations and locations (Table 7). Mammalian toxicity decreased with decreased ergot alkaloids and animal performance increased compared to the wildtype endophyte/grass association.

Table 6. Alkaloid content of tall fescue with different endophytes(Data from Lee Joung Kyong)

Alkaloid	Endophyte		
	Wildtype	Mutant	Low
	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$
Ergovaline	1.5	0.02	ND
Peramine	0.08	0.09	ND
Noracetylloline	187	563	2
N-formylloline	640	ND	7
N-acetylloline	349	ND	5

Table 7. Dry matter yield, ergot alkaloid content and lamb performance during a 10 week grazing trial of Jesup tall fescue with different *N. coenophialum* endophyte strains. (Adapted from Bouton et al, 2002).

Endophyte	Dry matter	Ergot alkaloids	Lamb ADG
	kg ha^{-1}	$\mu\text{g kg}^{-1}$	g d^{-1}
E-	2149	31	123.0
Wildtype	2251	1184	78.5
AR502	2457	39	114.9
AR542	2284	29	130.3

Warm season perennial native grasses

In the discussion on environment and forage quality analysis warm season native grasses were a significant part of 21st century forage systems for sustainability. Warm season perennial grasses can be grown in Kentucky for soil conservation, wildlife and forage. These grasses are productive in summer when cool season grasses are semi-dormant. Native warm season grasses for Kentucky include big bluestem (*Andropogon gerardii*), eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides*), indiagrass (*Sorghastrum nutans*) and switchgrass (*Panicum virgatum*). They were an important part of

the native forage species of Kentucky, supplying food and shelter for bison, deer and other wildlife when settlers first moved into the area. Switchgrass and eastern gamma grass have maximum dry matter accumulation in June, big bluestem has greatest forage production in July and Indiangrass has greatest forage production in August. Thus, these native warm season grasses provide a good source of forage during the summer months to complement the cool season grasses in Kentucky. Overgrazing, plowing and introduction of other forage species led to near extinction of these grasses. In recent years there has been great interest in re-establishing them for soil conservation, wildlife and summer forage for domestic livestock. These grasses are difficult to seed and establish and must be managed by rotational grazing, leaving at least 15 to 20 cm stubble. As in other grasses, the quality is dependent upon stage of growth but it is most important to graze when the forage height is 35 to 50 cm, before the boot stage and to stop grazing during early fall in Kentucky to insure good stands and productivity the following year. In the rotational system there must be 30 to 45 days growth between grazing periods. Prescribed use of fire, at least every two years, should be part of native warm season grass management to assure high nutrient levels, good stand vigor and to control woody vegetation. Production and quality measurements of these grasses compared to tall fescue are summarized in Table 8.

Table 8. Production and quality measurements of some Kentucky native warm season grasses

Grass	protein	NDF	DM yield
	%	%	t ha ⁻¹
Eastern gamma grass	10	70	7.9
Switch grass	8	69	5.9
Big bluestem	10	69	6.0
Tall fescue	13	56	7.4

The native warm season grasses have carbon dioxide fixation pathway of photosynthesis known as C₄. Cool season grasses have carbon dioxide fixation pathway known as C₃. Leaf anatomy is also different between C₃ and C₄ plants. In general there is a higher proportion of vascular bundle tissue in C₄ plants and less mesophyll tissue (Table 9). The greater vascular tissue and less mesophyll tissue generally provides a less

rapidly digested forage and a lower quality forage (Akin and Chesson 1989). Mesophyll tissue has thin cell walls and digests rapidly and nearly completely in the rumen, whereas the vascular bundle tissue degrade much slower. C₄ plants will maintain growth at higher temperatures and greater water stress. Dry matter accumulation of C₄ plants under water stress may be due to deeper rooting than C₃ grasses.

Table 9. Percentage of cross-sectional area of different tissue types in leaf blades of C₃ and C₄ grasses

Leaf blade tissue	C ₃ grasses	C ₄ grasses
	% area	
Total vascular	15	22
Lignified vascular	7	4
Parenchyma bundle sheath	6	15
Epidermis	23	35
Mesophyll	57	38

C₄ plants also have much greater total nonstructural carbohydrate (TNC) in leaves than C₃ plants, especially at lower temperatures (5-10°C). Even at higher temperatures (15~25°C) C₃ plants usually have slightly greater TNC than C₄ plants. Even with the apparent advantages of cool season grasses compared to the warm season grasses, the warm season grasses are increasingly being used to meet dietary requirements of grazing livestock during the summer months. Important to many producers are the added benefits of improved soil conservation and increased numbers and diversity of wildlife on their land.

The Future ?

It is easy to speculate about the future but it is very difficult to accurately predict what will actually occur in the future. We are collectively hampered by the past and by not knowing what outside events may influence forage and grassland utilization in the future. However, I believe that many techniques that are now being perfected will be

applied to and guide 21st century forage grassland management and research. Three general areas that are in this category and are (1) global positioning, (2) the conclusion that grasses are a single genetic system and (3) application of molecular genetics to the non-cereal grasses. The single genetic system for grasses and application of molecular genetics to non-cereal grasses are closely related.

The global positioning system (GPS) is a constellation of orbiting satellites. This system is used to determine precise locations on the earth's surface. The basis of GPS is triangulation from the orbiting satellites. Geographic information systems (GIS) is a means of referencing data in space. GPS and GIS technologies are being used in grain crop production and have great potential for grasslands. The technology can be used to establish pasture boundaries and document accurately the area of each pasture. Sampling grids for pastures may be established with this technology and spatially referenced data from these grids will permit mapping of pasture attributes allowing for visualization and documentation of intrapasture variability. Teutsch (2000) has applied these technologies to a grazing study in our mountainous region of eastern Kentucky. The pasture boundaries for two each of 12, 24 and 36 acre (4.7, 9.7 and 14.6 ha) pastures and the 334 points of the sampling grid are illustrated in Fig 3. At the sampling points the slope averaged 13 degrees, but ranged from 0 to 57 degrees. The aspect from north averaged 176 degrees but ranged from 1 to 359 degrees. Grazing activity was negatively correlated with slope. Cattle grazed where there was available forage and available forage was positively influenced of symbiotic N₂ fixation by legumes in the sward. Also, soil pH was positively associated with grazing activity as vigorously growing swards are on higher soil fertility and less acid locations. GPS and GIS technologies will be very useful to determine grazing behavior and to predict grazing behavior in production pastures, especially on steep lands with great soil and plant variability.

The conclusions that grasses are a single genetic system means that grasses share alleles of an ancestral grass genome rearranged in blocks that are of sufficient base pairs to reconstruct useful syntenic (large homologous chromosomal segments) relationships (Freeling 2001). That is to say that many of these genes move in blocks and if the same blocks are in different grasses they are probably not responsible for the observed variation between or among the grasses. The single genetic system concepts

provides a way to study and understand the natural variation of gene sequences that caused profound evolutionary changes. These sequences would not be these syntenic regions found in the grasses. Perfect synteny occurs as long as the ancestral gene order can be reconstructed, and accepts chromosomal breakpoints, polyploidy and partial duplications.

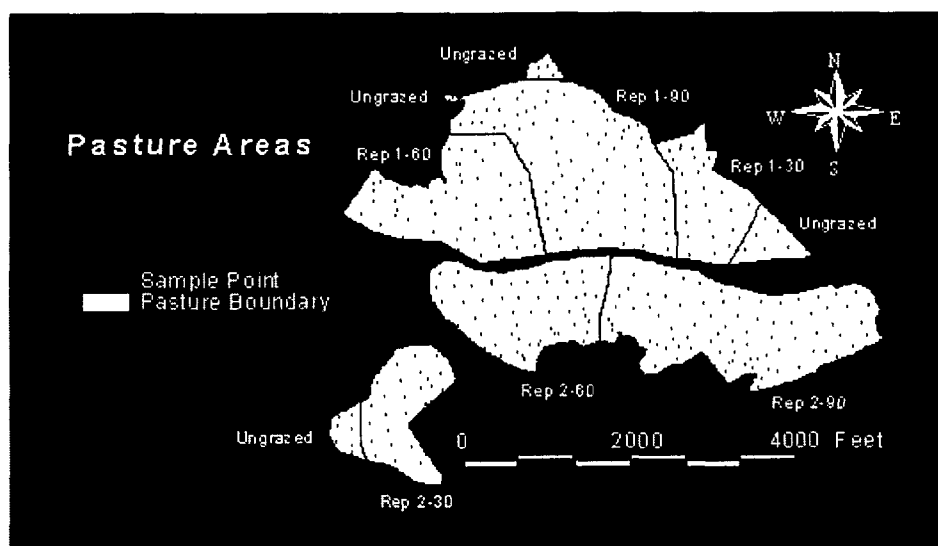


Figure 3. Sampling grid and pasture boundaries for 6 pastures plus ungrazed control areas on disturbed land in the mountainous region of eastern Kentucky.

Application of molecular genetics to the non-cereal grasses will result in the production of transgenic plants and offer the opportunity to generate unique genetic variation, when the required variation is either absent or has very low heritability. In recent years, the first transgenic pasture plants with simple 'engineered' traits have reached the stage of field-evaluation (Austin and Bingham 1997; Kalla et al. 2000; White et al. 2000). While gaps in our understanding of the underlying genetics, physiology and biochemistry of many complex plant processes are likely to delay progress in many applications of transgenesis in forage plant improvement, gene technology is a powerful tool for the generation of the required molecular genetic knowledge. Consequently, applications of transgenesis to forage plant improvement are focused on the development of transformation events with unique genetic variation and in studies on the molecular genetic dissection of plant biosynthetic pathways and

developmental processes of high relevance for forage production. Primary target traits for the application of transgenesis to forage plant improvement are forage quality, disease and pest resistance, tolerance to abiotic stresses, and the manipulation of growth and development.

While the basic effect of transgenically manipulating the expression of some enzymes in the monolignol pathway may be similar to that of native genes coding for decreased enzyme activity in brown mid rib (*bmr*) mutants (Casler and Kaeppler, 2000), transgenic approaches offer the potential for transgenic plants with highly novel lignins, higher frequencies of novel lignin phenotypes compared to natural variation, effective simultaneous down-regulation of multiple enzymes, and highly targeted down-regulation of enzymes through the choice of cell type-specific and developmentally-regulated promoters. Transgenic approaches to genetic manipulation of monolignol biosynthesis and other aspects of forages to enhance herbage quality are currently being explored in forage legumes (e.g. *Stylosanthes humilis*, *Medicago sativa*) and forage grasses (e.g. *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*) (Eckhardt 2002; Guo et al 2001; Lee et al 2000; Spangenberg et al 2000, 2001; Zubiata et al 2002).

Fructan increase in forage plants by insertion of genes from bacteria compensate for lignification and decreased digestibility with increased plant maturity. Also herbage intake should increase as well as protein utilization in the rumen and animal performance. Increased fructans would also improve tolerance to water and cold stress based on results from conventional plants. Another potential plant alteration is to have the plant synthesize protein that would not be degraded in the rumen but with improved nutritional qualities. Such by-pass protein would be high in sulfur amino acids and probably be an albumin type protein, i.e. sunflower seed albumin or pea albumin. Expression of these protein have occurred in forage plants but at very low levels (see review by Spangenberg 2001; Hancock and Ulyatt 2001). Condensed tannins, estrogenic activity, flowering, leafiness, leaf senescence and most any facet of forage quality eventually may be addressed by changing the plants original DNA by insertion of alien DNA, over expression or multiple copies of native DNA or antisense of native DNA to achieve the desired results. Application of many of these ideas is several years in the future.

However, with all the potential of molecular genetics much can be and has been accomplished doing manipulation of genetic material with classical techniques. Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. = *Lolium arundinaceum*) is the most widely grown cool season in the United States and will be used as an example of some of the things that have been done. There some limitations to the forage quality of this species and R.C. Buckner at the University of Kentucky and United States Department of Agriculture improved the quality of this grass by making intergeneric and interspecific hybrids with *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *Festuca gigantea* and *F. pratensis*. These classical breeding efforts accomplished many of the objectives espoused by the potential of molecular genetics. Ploidy levels of the parents and hybrids ranged from 2× to 8× (Table 10). Moisture, protein content and *in vitro* digestibility was increased and fiber content decreased in some hybrids compared to tall fescue (Buckner et al., 1967). Palatability and digestibility increased with increased succulence (Buckner et al., 1979) and the increased succulence was a heritable trait in these hybrids as was many mineral constituents (Buckner et al., 1981). The alkaloid perloine was also controlled by a few plant genes (Buckner et al., 1973) with accumulation levels ranging from below detectable limits to over 3000 g g⁻¹ Table 10 (Buckner et al., 1973). Perloine has been shown to affect *in vitro* and *in vivo* cellulose and protein digestibility (Bush et al., 1976; Boling et al., 1975; Bush 2001). These results are an example of progress that may be made by exchange of DNA between forage species.

Table 10. Perloine content of ryegrass and fescue species and ryegrass-fescue hybrids grown in space plants

Species and hybrids	Ploidy	Perloine content
		μg g ⁻¹
Annual ryegrass (a)	2x	17
Perennial ryegrass (p)	2x	209
Meadow fescue (m)	2x	3,545
Giant fescue	6x	209
Tall fescue	6x	716
F ₁ (at)	4x	138
F ₁ (pt)	4x	368
Amphiploid (AT)	8x	1,387
(at)t	6x	633
(pt)t	6x	53

Conclusions

Forage and grasslands will continue to have great significance in food production and environmental stability well into the 21st century. Emphasis on forage production will go beyond yield and digestibility by domestic animals to include sustainability of the natural resources, wildlife, the soils and fresh water. Production and conservation strategies will be couple to molecular genetics to improve the quality of the forage for all the applications mentioned in the preceding sentence. Molecular genetics will be applied to the forage to meet specific requirements of production or sustainability of the ecosystem. Fungal endophytes are being found in ever increasing number of grasses and they have tremendous positive impact on agronomic performance. However, often times they do have a negative impact on the herbivore. Genetic modification of both the host and the endophyte will occur for the betterment of the ecosystem. These type of forage improvements will be overlaid on a greater understanding of the land and vegetative resource by application of global positioning system and geographical information systems. It will be important in the future to maintain an appropriate balance between the biological, physical, economic and social aspects of the agricultural production system. New technologies developed must be economically available to most of the producers in an ecosystem. It is in this context that grasslands will continue to meet the needs of millions of rural people around the world.

Literature Cited

- Akin, D. E. and A. Chesson. 1989. Lignification as the major factor limiting forage feeding value especially in warm conditions. pp 1753-1760. In: D. Descroches (ed). Proc. 16th Intl. Grassl. Congr. Nice, France.
- Austin, S. and E. T. Bingham. 1997. The potential use of transgenic alfalfa as a bioreactor for the production of industrial enzymes. pp. 409-424. In: McKersie B.D. and Brown, D. C. W. (eds.) Biotechnology and the improvement of forage legumes. Biotechnology in Agriculture Series, No. 17. CAB International, New York.
- Bacon, C. W. and J. F. White, Jr. 1994. Biotechnology of endophytic fungi of grasses. CRC Press.

- Boling, J. A., L. P. Bush, R. C. Buckner, L. C. Pendlum, P. B. Burrus, S. G. Yates, S. P. Rogovin and H. L. Tookey. 1975. Nutrient digestibility and metabolism in lambs fed added perloline. *J. Anim Sci.* 40:972-976.
- Bouton, J. H., G. C. M. Latch, N. S. Hill, C. S. Hoveland, M. A. McCann, R. H. Watson, J. A. Parish, L. L. Hawkins and F. N. Thompson. 2002. Reinfection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agron J.* 94:567-574.
- Buckner, R. C., P. B. Burrus, II, P. L. Cornelius and L. P. Bush. 1981. Genetic variability and heritability of certain forage quality and mineral constituents in *Lolium-Festuca* hybrid derivatives. *Crop Sci.* 21:419-423.
- Buckner, R. C., L. P. Bush and P. B. Burrus, II. 1979. Succulence as a selection criterion for improved forage quality in *Lolium-Festuca* hybrids. *Crop Sci.* 19:93-96.
- Buckner, R. C., L. P. Bush and P. B. Burrus, II. 1973. Variability and heritability of perloline in *Festuca* sp., *Lolium* sp., and *Lolium-Festuca* hybrids. *Crop Sci.* 13:666-669.
- Buckner, R. C., J. R. Todd, P. B. Burrus, II, and R. F. Barnes. 1967. Chemical composition, palatability, and digestibility of ryegrass-tall fescue hybrids, 'Kenwell' and 'Kentucky 31' tall fescue varieties. *Agron J.* 59:345-349.
- Bush, L. P. 2001. Perloline, the forgotten plant alkaloid. *Proceed XIX Intl Grassl Congr.* pp. 461-462.
- Bush, L. P., H. Burton and J. A. Boling. 1976. Activity of tall fescue alkaloids and analysis in *in vitro* rumen fermentation. *J. Agric Food Chem.* 24:864-872.
- Bush, L. S. Gay and W. Burhan. 1993. Accumulation of pyrrolizidine alkaloids during growth of tall fescue. *Proceed XVII Intl Grassl Congr.* Palmerston North, New Zealand. pp. 1378-1379.
- Casler, M. D. and H. F. Kaeppler. 2000. Molecular breeding for herbage quality in forage crops. Chapter 10. In: Spangenberg G. (ed.). *Molecular breeding of forage crops.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Dove, H. and R. W. Mayes. 1996. Plant wax components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *J. Nutrition.* 126:13-26.
- Dubbs, T. M. 2001. Characterization of seasonal changes in forage quantity and quality in fescue-based pastures. MS Thesis. University of Kentucky Library.
- Dubbs, T. M., E. S. Vanzant, S. E. Kitts, R. F. Bapst, B. G. Fieser and C. M. Howlett. 2003. Characterization of season and sampling method effects on measurement of forage quality in fescue-based pastures. *J. Anim Sci.* (in press)

- Eckardt, N. A. 2002. Probing the Mysteries of Lignin Biosynthesis: The crystal structure of caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase provides new insights. *Plant Cell*. 14:1185-1189.
- Freeling, M. 2001. Grasses as a single genetic system. Reassessment. 2001. *Plant Physiology*. 125:1191-1197.
- Guo, D., F. Chen, K. Inoue, J. Blount and R. A. Dixon. 2001. Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell*. 13:73-88.
- Hancock, K. R. and M. J. Ulyatt. 2001. Opportunities in molecular biology: Enhancement of the nutritional value of forages. Proceed XIX Intl Grassl Congr. Sao Pedro, Brazil.
- Hughes, R. F., J. B. Kauffman and V. J. Jaramillo. 2000. Ecosystem-scale impacts of deforestation and land use in a humid tropical region of Mexico. *Ecological Applications*. 10:515-527.
- Kalla, R., P. Chu and G. Spangenberg. 2000. Molecular breeding of forage legumes for virus resistance. Chapter 13. In: Spangenberg G. (ed.) *Molecular breeding of forage crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lal, R., R. F. Follet, J. Kimble and C. V. Cole. 1999. Managing U.S. cropland to sequester carbon in soil. *J Soil Water Conservation*. 54:374-381.
- Kolver, E. S., A. R. Napper and L. D. Muller. 2000. A comparison of Holstein Friesian cows from the Northern Hemisphere and New Zealand grazing pasture or fed a total mixed ration. *Anim Sci* 78: Suppl. 1, 73.
- Lehner, A. F., J. Meek, J. True, K. Harkin, W. Karpiesiuk, C. Hughes, L. Dirikolu, E. Woods, J. Bosken, J. Boyles, A. Troppmann, N. Fannin, L. Bush, M. Craig and T. Tobin. 2002. Analysis of ergot alkaloids by electrospray tandem quadrupole mass spectrometry.
- Lee, H. B-H. Lee and J. Jo. 2000. Development of transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Korean Grassl Sci*. 20:103-108.
- Mayes, R. W. and H. Dove. 2000. Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores. *Nutrition Research Reviews*. 13:107-138.
- Mayes, R. M., C. S. Lamb and P. M. Colgrove. 1986. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J. Agric Sci*. 107:161-170.

- Milne, J. A. 1991. Diet selection by grazing ruminants. *Proceed Nutrition Society*. 50: 77-85.
- Post, W. M. and K. C. Kwon. 2000. Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. *Global Change Biology*. 6:317-327.
- Schofield, P. 2000. Gas production methods. pp. 209-232. In: D'Mello, J.P.D. (ed.) *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. Wallingford: CAB International.
- Schroeder, P. E. and J. K. Winjum. 1995. Assessing Brazil's carbon budget 1. Biotic carbon pools. *Forest Ecology and Management*. 75:77-86.
- Siegel, M. R. and L. P. Bush. 1994. Importance of endophytes in forage grasses, a statement of problems and selection of endophytes. pp. 135-150. In C. W. Bacon and J. F. White, Jr. (ed). *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. CRC Press.
- Spangenberg, G., K. Baera, A. Bartkowski, H. Huxley, A. Lidgett, D. Lynch, R. McInnes and J. Nagel J. 2000. The manipulation of lignin biosynthesis in pasture grasses. Abstracts 2nd Intl Symp Molecular Breeding of Forage Crops, Lorne and Hamilton, Victoria. p 41.
- Spangenberg, G., R. Kalla, A. Lidgett, T. Sawbridge, E. K. Ong and U. John. 2001. Transgenesis and genomics in molecular breeding of forage plants. *Proceed XIX Intl Grassl Congr. Sao Pedro, Brazil*.
- Tarr, R. M., R. Macedo, R. B. Cantarutti, C. de P. Rezende, J. M. Pereira and E. Ferreira. 2001. Carbon accumulation in soils under *Brachiaria* pastures in the Atlantic forest region of the south of Bahia, Brazil. *Proceed XIX Intl Grassl Congr*
- Teutsch, C. D. 2000. Soil, plant and animal interactions on reclaimed mine-land pastures in southeastern Kentucky. Ph. D. Dissertation, University of Kentucky Library.
- Tilley, J. M. A. and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage. crops. *J British Grassl Soc*. 18:104-111.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson and R. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*. 74:3583-3597.
- Webster, A. J. F. 2000. Sustaining fitness and welfare in the dairy cow. *Proceed NZ Soc Anim Production*. 60:207-213.
- West, C. 1994. Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses. pp 87-99. In CW. Bacon and J. F. White, Jr. (eds). *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. CRC Press.
- Wilkinson, S. R. 1993. Influence of endophytic infection of KY 31 tall fescue on yield

- response to irrigation, cutting management and competition with Tifton 44 bermuda grass. pp189-192. In: D. E. Hume, G. C. M. Latch, and H. S. Eastons (eds). Proc. 2nd Intl. Symp. *Acremonium*/grass Interactions. AgResearch, Grasslands Research Centre, Palmerston North, New Zealand
- White, D. W. R., D. R. Woodfield, B. Dudas, R. L. S. Forster and D. L. Beck, 2000. White clover molecular genetics. *Plant Breed Rev* 17:191-223.
- Zubieta, C., P. Kota, J- L. Ferrer, R. A. Dixon and J. P. Noel. 2002. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. *Plant Cell* 14:1265-1277.