SID

فیلم‌های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه‌های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

سامانه ویراستاری (ویرایش متون فارسی، انگلیسی، عربی)

کارگاه‌ها و فیلم‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

روش تحقیق کمی

Archive of SID

بررسی تاثیر جایگزینی کنجاله کلزا با کنجاله سویا بر جمعیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه با استفاده از روش PCR رقابتی

محمد رضا نصیری[۱]، رضا ولی زاده[۲]، محسن دانش مسگران[۳]، علیرضا هروی موسوی[۴] و محمد هادی سخاوتی[۵*]

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۲۸

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تاثیرات جایگزینی کنجاله کلزا با کنجاله سویا بر جمعیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه گاوهای شیری هلشتاین ایران بود. بدین منظور ۶ راس گاو شیرده هلشتاین در طول مدت ۵ تا ۵۶ روز پس از زایش انتخاب شدند. جیره‌های مورد استفاده محتوی کنجاله سویا (تعدا: ۳ رأس) و کنجاله کلزا (تعدا: ۳ رأس) بودند. گاوها در جایگاه‌های بسته در طول مدت اعمال جیره نگهداری و خوراک به صورت کاملا مخلوط روزی ۲ بار به آنها داده شد. به منظور بررسی کمی جمعیت قارچ‌های بی هوازی تحت تیمارهای تغذیه‌ای از روش PCR رقابتی استفاده گردید. قطعه استاندارد در واکنش PCR رقابتی از ژنوم فاژ لامبدا سنتز گردید و تکثیر همزمان با راندمان یکسان این قطعه با قطعه کنترل استاندارد در یک واکنش PCR انجام و مورد ارزیابی قرار گرفت. از شدت نسبی باندهای قطعه الگو و کنترل استاندارد به منظور بررسی کمی جمعیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه تحت جیره‌های مختلف استفاده گردید. داده‌های حاصل با نرم افزار SAS با روش GLM در قالب یک طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد جمعیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه احتمالا تغییرات معنی داری را در اثر جایگزینی کنجاله کلزا با کنجاله سویا (به ترتیب ۸۷ /۱± ۳۵/۱۲ و ۳۴/۷۹، واحد اختیاری) نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: کنجاله کلزا، کنجاله سویا، قارچ‌های بی هوازی شکمبه، PCR رقابتی

مقدمه

اکوسیستم میکروبی شکمبه با هضم مواد کم ارزش به لحاظ تغذیه‌ای همچون مواد فیبری و تبدیل آن به منابع مورد نیاز نشخوارکنندگان از قبیل اسیدهای چرب غیر فرار نقش مهمی را در تأمین نیازمندیهای تغذیه‌ای دام ایفا می‌کنند (۱۰). امروزه قارچ‌های بی هوازی شکمبه به عنوان جزء مهمی از فلور میکروبی شکمبه شناخته شده اند (۱۸ و ۱۱). قارچ‌های بی هوازی شکمبه با تشکیل کلونی بر روی مواد فیبری موجود در شکمبه و تولید آنزیم‌های هضم کننده باعث هضم این مواد در مدت زمان ماندگاری مواد غذائی در این محیط خواهند شد (۲و۳). از زمان کشف این فلور میکروبی توسط ارپین در سال ۱۹۷۵ تحقیقات زیادی در ارتباط با تاثیر فاکتورهای خارجی همچون جیره، زمان غذا دهی و تناوب غذا دهی بر روی جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی انجام گرفته است (۶، ۷ و ۱۴). بررسی کمی جمعیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه با استفاده از روش‌های کشت سنتی به خاطر سیکل زندگی منحصر به فرد این دسته از فلور میکروبی شکمبه که شامل دو فاز جدای متحرک (زئوسپور) و فاز تشکیل کلونی بسیار مشکل و زمان بر و در بعضی موارد نیز غیر ممکن است (۱۲)، لذا روش‌هائی که بر مبنای کشت این فلور و شمارش زئوسپور و کلونی آنها باشد به لحاظ کاربردی از اهمیت چندانی برخوردار نمی باشد(۷). امروزه با معرفی روش‌های مولکولی بر پایه توالی‌های

۱، ۲، ۳ و ۴- اعضاء هیأت علمی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد
۵- دانشجوی دکتری ژنتیک گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد
* - نویسنده مسئول: Email: Hadisekhavati@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

حفاظت شده DNA همچون توالی 18S rDNA تشخیص این فلور میکروبی و تغییرات جمعیت آن‌ها در محیط شکمبه علاوه بر سادگی از دقت بالائی نیز بر خوردار می‌باشد (۱۵). یکی از روش‌های شناخته شده در زمینه بررسی کمی فلور میکروبی روش PCR رقابتی می‌باشد. این روش علاوه بر دقت بالا به دلیل استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، همچنین به لحاظ تجهیزات مورد استفاده نسبت به روش‌های دیگر مانند استفاده از شناساگر و روش Real-time PCR از هزینه‌های کمتری برخوردار است(۸). اساس این روش تکثیر همزمان دو قطعه DNA با اندازه‌های مختلف به لحاظ جفت باز و آغازگرهای یکسان، در یک واکنش PCR می‌باشد. چنانچه این دو قطعه در یک واکنش PCR به عنوان الگوی تکثیر قرار بگیرند، بر اساس غلظت‌های اولیه شان بر سر محتوی واکنش PCR رقابت کرده و می‌توان از روی نسبت شدت باندهای محصولات PCR این دو قطعه بر روی ژل آگارز، غلظت اولیه DNA هدف را به طور نسبی مورد ارزیابی قرار داد (۱۹). سخاوتی و همکاران روش PCR رقابتی را به منظور کمی سازی جمعیت قارچ‌های بی هوازی هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط مزرعه‌ای مورد بررسی قرار دادند (۱۶). در این مطالعه تعیین صحت روش PCR رقابتی با اندازه گیری کیتین موجود در دیواره قارچ‌ها و بررسی رابطه تغییرات آن با داده‌های حاصل از واکنش PCR رقابتی انجام گرفت.

در این مطالعه سعی شد تا با استفاده از روش PCR رقابتی تغییرات جمعیت قارچ‌های بی هوازی تحت جیره‌های حاوی کنجاله سویا و کنجاله کلزا مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت و خالص سازی قارچ‌های بی هوازی

به منظور کشت و خالص سازی قارچ‌های بی هوازی از روش کشت بی هوازی جوبلین در سال ۱۹۸۱ استفاده گردید (۹). بدین منظور مایع شکمبه از یک رأس گاو شیری هلشتاین موجود در گاوداری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد با وزن زنده ۵۴۵ کیلوگرم با خوراک علوفه‌ای (با نسبت ۶۰:۴۰ علوفه به کنستانتره) گرفته شد و پس از صاف کردن با یک لایه پارچه متقال به عنوان منبع قارچ بی هوازی در روش کشت بی هوازی جوبلین مورد استفاده قرار گرفت. خالص سازی قارچ‌های بی هوازی در محیط کشت محلول با تکرار ۳ بار کشت با مدت زمان ۳ روز در هر دوره کشت در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک انجام گردید و پس از خالص سازی، از محتویات محیط کشت خالص با روش ایزوتیوسیانات گوانیدین سیلیکاژل (۴) استخراج DNA به عمل آمد.

نمونه‌گیری از مایع شکمبه

این آزمایش در محل گاوداری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد با استفاده از ۶ رأس گاو شیری هلشتاین چند شکم زایش با میانگین وزن زنده(۴±۵۶۰ کیلو گرم) انجام شد. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در یک دوره زمانی ۵۰ روزه شامل ۱۴ روز عادت پذیری و یک روز نمونه گیری در پایان مدت دوره اعمال تیمار انجام شد. تیمارها شامل ۱- جیره حاوی کنجاله سویا ۲- جیره حاوی کنجاله کلزا بودند. ترکیبات جیره در جدول ۱ نشان داده شده است. پس از گذشت مدت زمان ۵۰ روز از اعمال تیمار مقادیر ۲۰۰ میلی لیتر مایع شکمبه از هر گاو در زمان ۶ ساعت پس از مصرف خوراک با استفاده از پمپ خلاء گرفته شد و به منظور استخراج DNA از هر نمونه، ۱ میلی لیتر مایع شکمبه به همراه ذرات غذائی به طور تصادفی انتخاب گردید (۱۶). نمونه‌ها سریعاً در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردیدند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. محتویات جیره‌های اعمال شده

ماده خوراکی	تیمار ۱	تیمار۲
	٪	
جو	۳۲	۳۲
ذرت	۱۷	۱۷
کنجاله سویا	۲۴	۰
کنجاله کلزا	۰	۲۷
کنجاله تخم پنبه	۸	۸
تفاله مرکبات	۶/۵	۶/۵
سبوس	۸	۵
پودر چربی	۳	۳
آهک	۰/۴	۰/۴
مکمل معدنی و ویتامینی	۰/۸	۰/۸
نمک	۰/۳	۰/۳
جمع	۱۰۰	۱۰۰

استخراج DNA و انجام واکنش PCR

از نمونه‌های مایع شکمبه وکشت‌های خالص قارچ با روش ایزوتیوسیانات گوانیدین سیلیکا ژل (۷) استخراج DNA به عمل آمد و کمیت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد (شکل ۱). ازDNA استخراج شده از محیط کشت خالص قارچ به منظور بهینه سازی واکنش PCR رقابتی و از DNA بدست آمده از مایع شکمبه به منظور کمی سازی جمعیت قارچ‌های بی هوازی تحت تیمارهای آزمایشی استفاده گردید.

برای انجام PCR از کیت لیوفلیزه شده PCR به نام Gene Pak PCR Universal محصول شرکت Iso Gene مسکو و یک جفت آغازگر اختصاصی (GAF) که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود، استفاده گردید(۷).

حجم نهائی واکنش ۲۵ میکرولیتر می‌باشد که شامل: یک میکرولیتر DNA استخراج شده با غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم، سه میکرولیتر مخلوط آغازگر با غلظت ۵ پیکامول بر میکرولیتر، ۲/۵ میکرو لیتر بافر 10X، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ میلی مول، dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرو مول، ۱ واحد بین المللی از آنزیم Taq وهشت میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده بود. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل ۲۰۰۰ شرکت Biometra استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: یک مرحله با دمای واسرشت اولیه ^{o}C ۹۵ به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ مرحله با دمای واسرشت ^{o}C ۹۴ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال ^{o}C ۵۷ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ^{o}C ۷۲ به مدت یک دقیقه بود. صحت قطعه بدست آمده از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و نشانگر وزنی ۱۰۰ M با ولتاژ ۸۰ ولت(شکل۲) به مدت ۲۰ دقیقه مورد تأئید قرار گرفت.

ساخت قطعه کنترل استاندارد

به منظور سنتز قطعه کنترل استاندارد از یک جفت آغازگر به صورت overhang که دارای توالی آغازگر GAF در دو انتهای خودش بود استفاده گردید. این آغازگرها در واکنش PCR، قطعه کنترل استاندارد را از توالی DNA فاژ لامبدا تکثیر کردند و این قطعه پس از

www.SID.ir

Archive of SID

خالص سازی از روی ژل به وسیله کیت Diatom DNA Elution محصول شرکت Iso Gene مسکو به عنوان رقابتگر در واکنش PCR رقابتی مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگر مورد استفاده برای ساخت قطعه کنترل استاندارد (LaGAF) در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

جدول ۲. آغاز گرهای مورد استفاده به منظور انجام واکنش PCR

گونه میکروبی	
قارچ بی هوازی	
GAF1:5´-GAG GAA GTA AAA GTC GTA ACA AGG TTT C-3´	
GAF2:5´-CAA ATT CAC AAA GGG TAGG ATG ATT T-3´	
فاژ لامبدا	
LaGAF1:5´- gag gaa gta aaa gtc gta aca agg ttt c GAA GTT CGC AGA ATC GTA TGT G-3´	
LaGAF2:5´- caa att cac aaa ggg tag gat gat tt .GCT GTG GAC ATA GTT AAT CCG-3´	

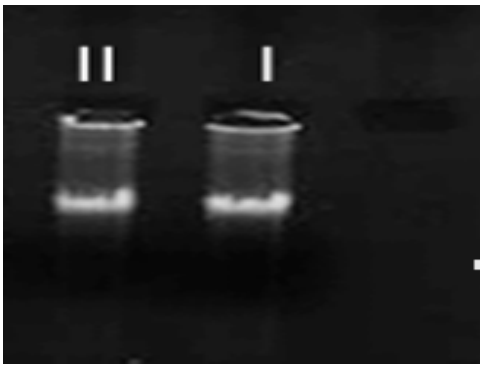
توالی رشته forward و reverse با توالی DNA فاژ لامبدا از نوکلئوتید شماره ۴۶۷۰۷-۴۶۷۷۵ و ۴۶۸۱۹-۴۶۹۱۲ با شماره بانک اطلاعاتی بیوتکنولوژی[1] (NC-1416) مکمل می‌باشد (۱۳). برای انجام PCR به منظور تکثیر قطعه کنترل استاندارد از دستگاه ترموسایکلر مدل ۲۰۰۰ شرکت Biometra استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: یک مرحله با دمای واسرشت اولیه $95\ ^{o}C$ به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ مرحله با دمای واسرشت $94\ ^{o}C$ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال $56\ ^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر $72\ ^{o}C$ به مدت یک دقیقه و در انتها یک مرحله تکثیر نهائی با دمای $72\ ^{o}C$ به مدت ۵ دقیقه بود. صحت قطعه بدست آمده از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و نشانگر وزنی ۱۰۰ M با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه مورد تأئید قرار گرفت (شکل ۲).

بررسی کمی نتایج PCR رقابتی

بررسی کمی محصولات PCR رقابتی به وسیله نرم افزار تحلیلگر تصویر Image J 1.38X انجام گرفت و داده‌های حاصل به وسیله نرم افزار SAS (۱۷) با روش GLM در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به همراه آنالیز کوواریانس انجام پذیرفت (۱۳و ۱۶).

نتایج

با استفاده از روش تیوسیانات سیلیکاژل DNA ژنومی از محیط کشت خالص و همچنین مایع شکمبه استخراج گردید (شکل ۱). با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (GAF) قطعه مورد انتظار با طول ۱۱۰ جفت باز از ژنوم قارچ‌های بی هوازی شکمبه که قبلا در مطالعه دنمن و همکاران (۷) نیز بدست آمده بود، بدست آمد (شکل ۲). قطعه کنترل استاندارد با اندازه ۱۹۱ جفت باز با استفاده از آغازگرهای LaGAF نیز بدست آمد (شکل ۲).



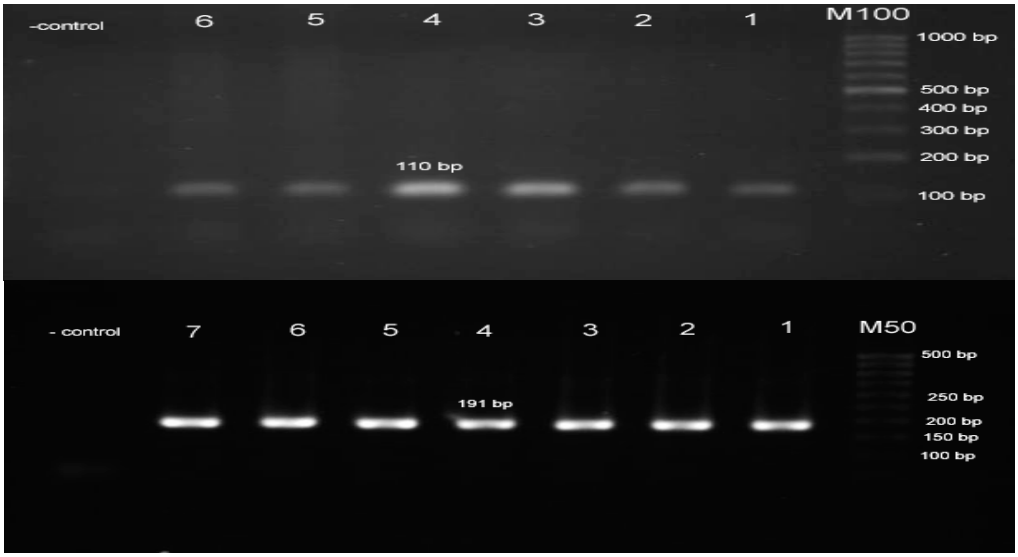
شکل ۱. DNA استخراج شده از مایع شکمبه (I) و محیط کشت اختصاصی (II)

1 - NCBI

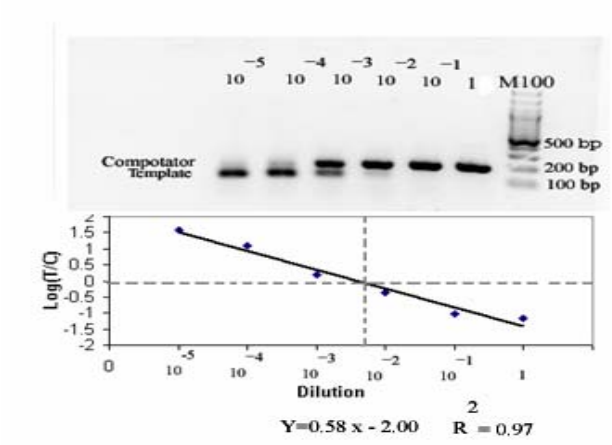
www.SID.ir

Archive of SID

برای اطمینان از یکسان بودن راندمان تکثیر دو قطعه کنترل استاندارد و قطعه الگو در واکنش PCR رقابتی، رابطه خطی داده‌های کمی حاصل از واکنش PCR رقابتی در نمونه کشت خالص مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۳). رابطه خطی در تکثیر همزمان قطعه الگو در نمونه DNA خالص قارچ بی هوازی (۵۵ نانوگرم بر میکرولیتر) با قطعه کنترل استاندارد در واکنش PCR دارای شیب خطی معادل ۰/۵۸ و ضریب تعیین(R^2) ۰/۹۷ بود که این امر نشان دهنده راندمان تکثیر یکسان در واکنش PCR رقابتی می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۲. محصولات حاصل از PCR توالی 18S rDNA قارچهای بی هوازی شکمبه (قطعه ۱۱۰ جفت بازی) و توالی فاژ لامبدا (۱۹۱ جفت بازی) .



شکل ۳. یکسانی راندمان تکثیر همزمان قطعه DNA الگو و کنترل استاندارد.

تحلیل آماری الگوهای درجه اول ،درجه دوم و درجه سوم بین رقت‌های انتخاب شده در واکنش PCR رقابتی و شدت باند قطعه الگو در نمونه‌های مربوط به مایع شکمبه معنی داری الگوی درجه اول و درجه سوم را در سطح معنی داری ۵ درصد نشان داد(جدول ۳).

www.SID.ir

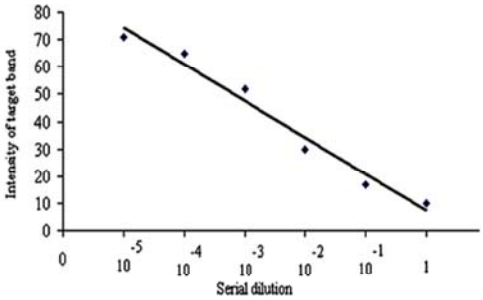
Archive of SID

جدول ۳. تحلیل آماری الگوهای درجه اول ،درجه دوم و درجه سوم بین رقت‌های انتخاب شده در واکنش PCR رقابتی و شدت باند قطعه الگو در نمونه‌های مربوط به مایع شکمبه

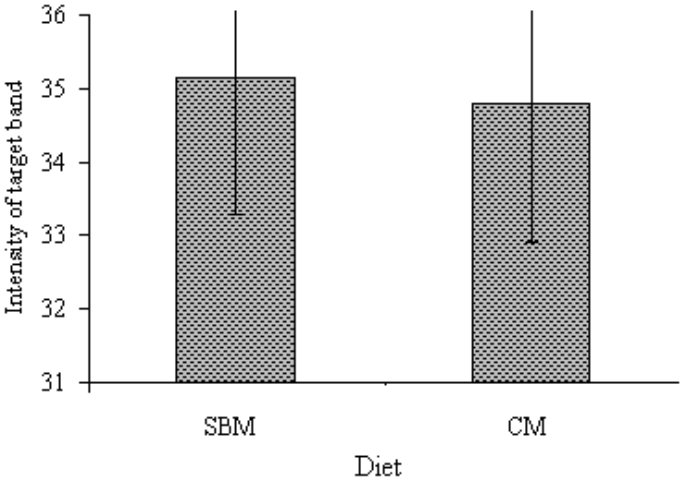
مقایسه	درجه آزادی	مجذور مربعات	میانگین مجذور مربعات	F<Pr
درجه اول	۱	۹۵۶۹۵/۳۴۲۰	۹۵۶۹۵/۳۴۲۰	۰/۰۰۰۱
درجه دوم	۱	۲۶/۷۹۰۰	۲۶/۷۹۰۰	۰/۷۷۶۲
درجه سوم	۱	۳۱۱۱/۴۴۶۴	۳۱۱۱/۴۴۶۴	۰/۰۱۰۴

معنی دار بودن الگوی درجه اول حاکی از آن بود که روش PCR رقابتی همچنان که در نمونه مربوط به کشت خالص در تکثیر دو قطعه DNA الگو و کنترل استاندارد راندمان یکسانی داشته است، در نمونه‌های مربوط به مایع شکمبه نیز همانند بودن راندمان تکثیر برای دو قطعه مذکور حفظ شده است. در ارتباط با معنی دار شدن الگوی درجه سوم می‌توان چنین نتیجه گرفت که دو رقت ۱ و $۱۰^{-۵}$ اطلاعات مفیدی در ارتباط با چگونگی تغییرات قارچ‌های بی هوازی در نمونه‌ها را با توجه به شدت باندهای بدست آمده از دو قطعه مورد نظر در واکنش نداده و بنابراین می‌توان در واکنش PCR رقابتی این دو رقت را حذف کرده و واکنش را با ۴ رقت انجام داد (شکل ۴).

پس از اطمینان از راندمان یکسان تکثیر قطعه کنترل استاندارد و قطعه الگو و در واقع آزمون صحت روش PCR رقابتی (شکل۳ و۴)، در مرحله بعد به آنالیز داده‌های مربوط به نمونه‌های مایع شکمبه پرداخته شد. نتایج آنالیز این داده‌ها تفاوت معنی داری را بین تیمار حاوی کنجاله سویا و تیمار حاوی کنجاله کلزا نشان ندادند(شکل ۵).



شکل ۴. رابطه خطی بین رقت‌های مختلف از کنترل استاندارد و میانگین شدت باند مربوط به DNA الگو نمونه‌های مایع شکمبه. هر نقطه نشانگر میانگین مربوط به ۱۸ واکنش PCR رقابتی می‌باشد.



شکل ۵. مقایسه جمعیت قارچ‌های بی هوازی تغذیه شده با دو جیره حاوی کنجاله سویا (SBN) و جیره حاوی کنجاله کلزا (CM)

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری

در ارتباط با نحوه تغییرات قارچ‌های بی هوازی شکمبه تحت جیره‌های آزمایشی در این مطالعه تفاوت معنی داری در جمعیت قارچ‌های بی هوازی مشاهده نشد، این در حالی بود که داده‌های حاصل از واکنش PCR رقابتی یک کاهش جزئی در رشد قارچ‌های بی هوازی تحت تیمار کلزا نشان دادند(شکل ۵). این کاهش احتمالا در اثر وجود مواد ضد تغذیه‌ای از جمله گلوکوزینولات که در کنجاله کلزا به وفور یافت می‌شود می‌باشد. این در حالی است که مطالعات قبلی تاثیر این فاکتور ضد تغذیه‌ای را بر رشد فلور میکروبی و حتی اثر سمی این ماده را بر حیوانات مزرعه‌ای نشان میدهند(۵ و ۱).

با توجه به قیمت بالاتر کنجاله سویا به عنوان یک مکمل پروتئینی نسبت به کنجاله کلزا در بازارهای کشور، و از طرفی اهمیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه در تامین نیازهای تغذیه‌ای دام نتایج این مطالعه در زمینه بررسی چگونگی تغییرات جمعیت قارچ‌های بی هوازی در جایگزینی کنجاله کلزا با کنجاله سویا نشان داد جایگزینی کنجاله کلزا به عنوان یک منبع پروتئینی ارزان قیمت نسبت به کنجاله سویا اثر معنی داری بر روی جمعیت قارچ‌های بی هوازی شکمبه نداشت. بنابراین استفاده از این کنجاله در ارتباط با فعالیت و جمعیت قارچ‌ها در محیط شکمبه در این مطالعه محدود کننده نبود.

تشکر و قدر دانی

از قطب علمی کاربرد بهینه مصرف فرآورده‌های جانبی، کشاورزی در تغذیه دام، منطقه خراسان که کلیه هزینه‌های مربوط به این طرح تحقیقاتی را تقبل فرمودند کمال تشکر و قدردانی را خواستاریم.

منابع

1. Acamovic, T., C. S. Stewart, and T. W. Pennycott, (editors). 2004. Poisonous Plants and Related Toxins. Wallingford, Oxon.
2. Akin, D. E, and W. S. Borneman. 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. Journal of Dairy Science. 73: 3023-3032.
3. Bauchop, T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. Mycological Research. 38: 148-58.
4. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jasen, P. M, Wertheim-Van Dillen, and J. Van Der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology.
5. Cheeke, P. R. 1998. Natural Toxicants in Feeds Forages and Poisonous Plants. Danville IL: Interstate Publishers.
6. Dehority, B. A., and P. A. Tirabasso. 2001. Effect of feeding frequency on bacterial and fungal concentrations, PH, and other parameters in the rumen. J. Anim. Sci. 79: 2908-2912.
7. Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. FEMS Microbiol Ecol 58: 572-582.
8. Franz, W., Hlfriende, H., and L. Thomas. 2001. Quantification of mRNA expression by competitive PCR using non-homologous competitors containing a shifted restriction site. Nucleic Acids Research. Vol. 29, No. 11 e52.
9. Joblin, K. N. 1981. Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Applied and environmental microbiology. P. 1119-1122.
10. Mackie, R. I. 1997. Gut environment and evolution of mutualistic fermentative digestion. Gastrointestinal Microbiology, Vol. 1(Mackie RI & White BA, eds), pp. 13-35. Chapman & Hall, New York.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Orpin, C. G. and K. N. Joblin. 1997. The rumen anaerobic fungi. In The Rumen Microbial Ecosystem (P. N. Hobson & C. S. Stewart, eds): 140-195. 2nd end. Chapman & Hall, New York.
12. Orpin, C. G. 1994. Anaerobic fungi: taxonomy, biology, and distribution in nature. Anaerobic Fungi: Biology, Ecology and Function, Vol. 12. Mycology Series Orpin CG & Mountfort DO, eds), pp. 1-45. Marcle Dekker, New York.
13. Piatak, M., K. C. Luk, B. Williams, and J. D. Lifson. 1993. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantification of HIV DNA and RNA species. BioTechniqes. 14:70-80.
14. Rezaiean, M., W. Gordon, W. Beakes, and A. S. Chaudhry. 2005. Relative fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi on untreated and sodium hydroxide treated barley straw in *in vitro* culture. Anaerobe. 11: 163-175.
15. Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield, and L. Montgomery. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl Environ Microbiol 54: 1079-1084.
16. Sekhavati, M. H., M. Danesh Mesgaran, M. R. Nassiri, T. Mohammadabadi, F. Rezaie, and A. Fani Maleki. 2009. Development and use of quantitative competitive PCR assays for relative quantifying rumen anaerobic fungal populations in both *in vitro* and *in vivo* systems. Mycological Research. Article in press.
17. SAS. 2001. SAS User Guide (Relese 7.0) SAS Ins. Ins. Cary, NC.
18. Trinci, A. P. J., D. R. Davies, K. Gull, M. I. Lawrence, B. B. Nielsen, A. Rickers, and M. K. Theodorou. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. Mycological Research. 98: 129-152.
19. Vu, H. L., S. Troubetzkoy, H. H. Nguyen, M. W. Russell, and J. Mestecky. 2000. A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by (RT)-PCR and a new mathematical model for data analysis. Nucleic Acids Research. 28. e18.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of diets containing soybean meal or canola meal on anaerobic fungal population in rumen using quantitative competitive PCR.

M. R. Nassiri, R. Valizadeh, M. Danesh Mesgaran, A. R. Heravi Moussavi and M. H. Sekhavati[*1]

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of substitution of soybean meal with canola meal and measure its effects on rumen anaerobic fungal population in lactation Iranian of Holstein cows. From d 5 to 56 postpartum, cows were fed diets that were isoenergetic containing soybean meal (SBM; n = 3) or canola meal (CM; n = 3). Cows were housed in tie stalls and fed TMR two times a day. Competitive PCR technique was used to evaluate quantitative difference of anaerobic fungal population within the rumen under the dietary groups. Universal primers were used to amplify a specific region of the rRNA locus from anaerobic rumen fungi. Standard control DNA was constructed for use in the competitive PCR and was shown to amplify under the same reaction condition and with the same amplification efficiency as the target DNA. The relative intensities of PCR products were used to compare variety of fungal population under fed treatments. The signal intensity was quantified by ImageJ 1.29x and expressed in arbitrary units. The data was analyzed using the GLM procedure of SAS for a completely randomized design. The rumen fungal population was not impacted by diet but numerically was decreased in the CM compare with the SBM diet (34.79 and 35.12 ± 1.87 arbitrary units, respectively). The results of this study demonstrated that substituting soybean meal with canola meal in the early lactation cows had no apparent effect on the fungal population.

Key words: Canola meal, Soybean meal, Rumen anaerobic fungi, QC-PCR

1 - A Contribution from Ferdowsi University of Mashhad
* - Corresponding author Email: Hadisekhavati@gmail.com

www.SID.ir

SID

فیلم‌های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه‌های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

سامانه ویراستاری (ویرایش متون فارسی، انگلیسی، عربی)

کارگاه‌ها و فیلم‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

روش تحقیق کمی