نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد دوم، شماره چهارم، ۱۳۹۳
http://ejrr.gau.ac.ir

اثر نسبت‌های مختلف پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه بر بازده نیتروژن و بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) در بره‌های بلوچی در حال رشد

الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی[۱]، *عبدالمنصور طهماسبی[۲]، محسن دانش‌مسگران[۲]، عباسعلی ناصریان[۲] و سیدعلیرضا وکیلی[۳]

[۱]دانشجوی دکتری تغذیه نشخوارکنندگان، [۲]استاد و [۳]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۳/۰٤/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۲

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه بر کنترل نیتروژن اوره‌ای بازگردانده شده به شکمبه و تنظیم بیان ژن ناقل اوره، از سه راس بره نر بلوچی یکساله (۲±۳۰ کیلوگرم) مجهز به فیستولای شکمبه‌ای در قالب طرح چرخشی در زمان، استفاده شد. تیمارها دارای سطح پروتئین خام یکسان و به ترتیب دارای سطوح مختلف پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه ۸۰ به ۲۰ (جیره یک)، ۷۵ به ۲۵ (جیره دو) و ۷۰ به ۳۰ (جیره سه) بودند. نتایج نشان می‌دهد که با کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، جزء محلول (P<۰/۰۵)، جزء قابل تجزیه (P<۰/۰۵)، نرخ تجزیه‌پذیری (P<۰/۰۵) و تجزیه‌پذیری مؤثر (P<۰/۰۵) به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. با کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، قابلیت هضم ماده خشک (P<۰/۰۵) و پروتئین خام (P<۰/۰۵) کاهش و قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی (P<۰/۰۵) افزایش یافت. غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه (P<۰/۰۵) و نیتروژن اوره‌ای خون (P<۰/۰۵) در بره‌های مصرف کننده جیره یک به طور معنی‌داری نسبت به سایر جیره‌ها بالاتر بود. مقدار نیتروژن دفع شده به‌صورت گرم در روز (P<۰/۰۵) از طریق مدفوع در بره‌های مصرف کننده

*نویسنده مسئول: a.tahmasbi@lycos.com

جیره سه و مقدار نیتروژن آمونیاکی دفع شده به‌صورت گرم در روز (P<۰/۰۵) از طریق ادرار در بره‌های مصرف کننده جیره یک به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر جیره‌ها بالاتر بود. نتایج این آزمایش نشان داد تغییر در نسبت پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه، باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین جیره‌ها به لحاظ بیان ژن ناقل اوره می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: بره بلوچی، تجزیه‌پذیری، ژن ناقل اوره، نیتروژن

مقدمه

مهم‌ترین محصول تجزیه پروتئین در نشخوارکنندگان، اوره است. اوره در کبد تولید می‌شود و از طریق ادرار و مدفوع به محیط دفع می‌شود. با این حال نشخوارکنندگان دارای ساز و کاری هستند که می‌توانند ٤٠ تا ٨٠ درصد از اوره تولید شده در کبد را به مسیر هضمی باز گردانند (لاپیه‌ره و لابلی، ۲۰۰۱). عوامل مختلفی همچون سطح پروتئین خام خوراک، مقدار مصرف ماده خشک و قابلیت هضم مواد مغذی بر بازگرداندن اوره به مسیر هضمی و استفاده از آن برای اهداف آنابولیک تأثیرگذار هستند (مارینی و ون آمبورگ، ۲۰۰۳؛ هانتینگتون، ۱۹۸۹؛ ساراسه‌سا و همکاران، ۱۹۹۸).

اعتقاد بر این است که عبور تسهیل شده اوره از عرض غشای پلاسمایی سلول‌های مسیر هضمی از طریق ناقل‌هایی صورت می‌گیرد که وابسته به شیب غلظت هستند (استیوارت و اسمیت، ۲۰۰۵؛ اسمیت و روزلت، ۲۰۰۱). منشاء پروتئین‌های ناقل اوره دو ژن مجزا[1] می‌باشند. این پروتئین‌ها در مسیر هضمی گونه‌های بسیاری از جمله گاو (مارینی و ون آمبورگ، ۲۰۰۳؛ استیوارت و همکاران، ۲۰۰۵) و گوسفند (ریتژاپت و همکاران، ۱۹۹۸؛ مارینی و همکاران، ۲۰۰٤؛ لادن و همکاران، ۲۰۰۸) شناسایی شده‌اند و نقش مهمی در تعادل نیتروژن ایفا می‌کنند.

امکان کنترل بازگشت اوره به مسیر هضمی از طریق اعمال تغییر در عوامل خوراکی مانند سطوح پروتئین قابل تجزیه و پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه و تأثیر آن بر بیان ژن ناقل اوره و متعاقب آن تولید پروتئین‌های ناقل اوره وجود دارد (کیران و موستانگوا، ۲۰۰۷). با این وجود نحوه تغییر در بیان ژن ناقل اوره در بافت شکمبه در پاسخ به تغییرات خوراک، تاکنون به وضوح مشخص نشده است

1- SLC14A1 (Urea Transporter-B) و SLC14A2 (Urea Transporter-A)

(استیوارت، ۲۰۱۱). بنابراین فرض ما بر این است که تغییر در نسبت پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه می‌تواند به سبب وجود رابطه منفی که بین غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه و نرخ انتقال اوره به شکمبه وجود دارد باعث تغییر در مقدار بازگرداندن اوره به شکمبه از طریق تأثیر بر بیان ژن ناقل اوره گردد. از این‌رو این آزمایش طراحی شد تا نشان دهد که چگونه تغییر در قابلیت تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه به‌منظور بهبود بازده نیتروژن خوراک در بره‌های نر بلوچی می‌تواند بر نیتروژن اوره‌ای بازگردانده شده به شکمبه و تنظیم بیان ژن ناقل اوره، تأثیرگذار باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات، تیمارها و طرح آزمایشی: به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه بر کنترل نیتروژن اوره‌ای بازگردانده شده به شکمبه و تنظیم بیان ژن ناقل اوره، از سه راس بره نر بلوچی یکساله (۲±۳۰ کیلوگرم) مجهز به فیستولای شکمبه‌ای در قالب طرح چرخشی در زمان استفاده شد. آزمایش در ۳ دوره ۲۸ روزه، در دامداری شرکت سهامی، زراعی نیل‌آباد شهرستان تربت‌جام انجام شد. هر دوره آزمایش شامل ۲۱ روز عادت‌پذیری و ۷ روز نمونه‌گیری و رکوردبرداری بود. تیمارها دارای سطح پروتئین خام یکسان و به ترتیب دارای نسبت های مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام) ۸۰ به ۲۰ (تیمار ۱)، ۷۵ به ۲۵ (تیمار ۲) و ۷۰ به ۳۰ (تیمار ۳) بوده و بر اساس تامین نیازهای متابولیکی بره‌های در حال رشد با استفاده از نرم‌افزار اس آر ان اس[1] نسخه ویرایش شده ۱,۹,٤٤٦۸ دانشگاه کرنل تهیه گردید. خوراک در ۲ وعده (ساعت ۹ صبح و ٤ بعدازظهر) در اختیار حیوان قرار گرفت. دام‌ها در تمام مدت شبانه روز آزادانه به آب دسترسی داشتند. اجزای خوراکی و مواد مغذی موجود در جیره‌های آزمایشی به‌ترتیب در جدول ۱ آورده شده است. ترکیب شیمیایی جیره‌ها طبق روش پیشنهادی انجمن شیمیدانان رسمی کشاورزی[2] (۱۹۹۰) تعیین گردید. پروتئین خام با دستگاه کلدال (اوتوکجلتک آنالایزر، مدل ۱۰۳۰، سوئد) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی طبق روش ون سوست و همکاران (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد.

1- Small ruminant nutrition system
2- AOAC

نمونه‌برداری و ثبت نتایج: در خلال ۷ روز نمونه‌برداری، مقدار مصرف خوراک هر دام پس از کسر مقدار خوراک باقی‌مانده از مقدار مقدار خوراک داده شده، به‌صورت روزانه ثبت شد. نمونه‌برداری از غذای باقی‌مانده به‌صورت روزانه انجام شد. پس از ریختن در کیسه نایلونی و بستن درب آن به فریزر با درجه برودت ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شد. در پایان هر دوره، نمونه‌های جمع‌آوری شده به نسبت مقدار روزانه مربوط به هر دام مخلوط و یک نمونه جهت تجزیه شیمیایی آماده گردید. به‌منظور تعیین فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین خام، از ۲ راس بره نر بلوچی استفاده شد. ابتدا با استفاده از توری‌های پلی‌استری با اندازه ۵۰ میکرومتر، کیسه‌هایی به ابعاد ۱۶×۱۰ سانتی‌متر دوخته شده و یک انتهای آن باز گذاشته شد. سپس کیسه‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و بعد از رسیدن به وزن ثابت توزین و شماره‌گذاری گردید. پس از آن ۵ گرم نمونه آسیاب شده داخل هر کیسه ریخته شده (۳ کیسه به ازای هر نمونه در هر دام) و سر کیسه‌ها با نخ بسته شد. کیسه‌ها به‌مدت صفر، ۲، ٤، ۸، ۱٦، ۲٤، ۳٦، ٤۸ و ۷۲ ساعت، شکمبه‌گذاری شدند. شکمبه‌گذاری کیسه‌ها دو ساعت بعد از وعده خوراک صبح انجام شد. کیسه‌های مربوط به زمان صفر در شکمبه قرار داده نشده و تنها با آب سرد شسته شدند، به‌طوری که آب زلال از آن‌ها خارج گردید. تمام کیسه‌ها بعد از خروج از شکمبه با آب سرد شستشو داده شدند، تا آب زلال از آن‌ها خارج شد. سپس تمام کیسه‌ها در آون (٤۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس) خشک شدند و مقدار ناپدید شدن پروتئین خام نمونه‌ها در ساعات مختلف شکمبه‌گذاری با توجه به اختلاف پروتئین خام نمونه‌ها قبل و بعد از شکمبه گذاری محاسبه گردید (ارسکوف و مکدونالد، ۱۹۷۹).

برای تعیین فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین خام از معادله پیشنهادی ارسکوف و مک دونالد (۱۹۷۹) استفاده و برازش داده‌ها با مدل $P= a + b\,(1-e^{-ct})$ و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ویرایش شده ۹/۱ با رویه رگرسیون غیرخطی[1] انجام شد. که در این مدل P مقدار ناپدید شدن در زمان t، a بخش سریع تجزیه، b بخش کند تجزیه، c ثابت نرخ تجزیه و t زمان کیسه‌گذاری می‌باشد. تجزیه‌پذیری مؤثر نمونه‌ها با استفاده از معادله $ED= a + [(b\times c)/(c+k)]$ و با در نظر گرفتن ثابت نرخ عبور برابر با ۰/۰۵ در ساعت محاسبه شد اجزای این معادله عبارتند از: ED تجزیه‌پذیری مؤثر، a بخش سریع تجزیه، b بخش کند تجزیه، c ثابت نرخ تجزیه و k ثابت نرخ عبور.

1- NLIN

جدول ۱- ترکیب مواد مغذی و اجزای خوراکی موجود در جیره‌های آزمایشی.

اجزای جیره‌های آزمایشی	تیمار ۱[1]	تیمار ۲	تیمار ۳
یونجه (درصد ماده خشک)	۲۵	۲۵	۲۵
جو (درصد ماده خشک)	۲۵	۲۵	۲۵
کنجاله کلزا (درصد ماده خشک)	۱۹/۷	۸/۵	۲
سبوس گندم (درصد ماده خشک)	۲۹	۳۵/۲	۳۸/۷
آهک (درصد ماده خشک)	۰/۵	۰/۵	۰/۵
مکمل مواد معدنی و ویتامین (درصد ماده خشک)	۰/۵	۰/۵	۰/۵
نمک (درصد ماده خشک)	۰/۳	۰/۳	۰/۳
پودر ماهی (درصد ماده خشک)	-	۳	٦
گلوتن ذرت (درصد ماده خشک)	-	۲	۲
ترکیب شیمیایی مواد مغذی موجود در جیره‌های آزمایشی			
درصد ماده خشک	۹۳/۸٤	۹۳/٥٦	۹۳/٥٦
انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری بر کیلوگرم)	۲/۷۷	۲/۷۹	۲/۸۰
پروتئین خام (درصدی از ماده خشک)	۱۷/٤٤	۱۷/٦٤	۱۷/٥٤
پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (درصدی از پروتئین خام)	۸۰/۰۰	۷٥/۰۰	۷۰/۰۰
پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه (درصدی از پروتئین خام)	۲۰/۰۰	۲٥/۰۰	۳۰/۰۰
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصدی از ماده خشک)	۲۹/٤۰	۲۹/۷۰	۳۱/۰۱
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصدی از ماده خشک)	۱۸/۳۰	۱۷/٥۰	۱٤/٦۰
کربوهیدرات غیر الیافی (درصدی از ماده خشک)	٤۰/٦۰	٤۰/٥۰	٤۰/۱۰
چربی (درصدی از ماده خشک)	۰۳/٤۰	۰۳/٤۰	۰۳/٥۰
ماده آلی (درصدی از ماده خشک)	۹۰/٦۰	۸۹/۲۰	۹۳/۰۰

[1] نسبت‌های مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام): ۸۰ به ۲۰ (تیمار ۱)، ۷٥ به ۲٥ (تیمار ۲) و ۷۰ به ۳۰ (تیمار ۳)

به‌منظور تعیین قابلیت هضم مواد مغذی، ۱۰ درصد از کل مدفوع، به‌صورت روزانه برداشت شد و در آون با دمای ٦۰ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۸ ساعت خشک شد (مور، ۲۰۰۰). بعد از انتقال بره‌ها به قفس متابولیکی و اتصال کیسه‌های پلاستیکی به حیوان به منظور عدم اختلاط مدفوع با ادرار، مقدار ادار دفع شده در ۲٤ ساعت در ظروف پلاستیکی جمع‌آوری گردید و به آن اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال

اضافه گردید تا pH ادرار کمتر از ۳ شود و از اتلاف نیتروژن جلوگیری گردد. در خلال نمونه‌برداری، ظرف نمونه‌برداری تکان داده شد تا از تشکیل رسوب جلوگیری شود (مور، ۲۰۰۰). به‌منظور تعیین مقدار نیتروژن ادرار، حجم کل ادرار دفع شده به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد و یک نمونه (۲۰ درصد) در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. نمونه‌برداری از شیرابه شکمبه در ساعت‌های ۰، ۲، ٤، ٦ و ۸ بعد از وعده خوراک صبح‌گاهی انجام شد و pH آن بلافاصله تعیین گردید. در مرحله بعد شیرابه توسط پارچه توری ظریف چهار لایه صاف و ۱۰ میلی‌لیتر از آن گرفته شده و ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال به آن افزوده و جهت تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. هم‌چنین به ۱۰ میلی‌لیتر از مایع شکمبه گرفته شده، ۲ میلی‌لیتر اسیدمتافسفریک افزوده شد و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (ماکار، ۲۰۰۳). همزمان با نمونه‌گیری از مایع شکمبه، با سرنگ از ورید وداج حیوان نمونه خون گرفته شد. برای تهیه سرم، بعد از خون‌گیری، خون به‌مدت نیم‌ساعت در درجه حرارت اتاق بدون تکان باقی‌ماند. سرم هر نمونه به‌وسیله سرنگ به میکروتیوب انتقال داده شد و در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در آخرین روز هر دوره آزمایشی، از بافت اپیتلیومی شکمبه دو ساعت بعد مصرف خوراک صبح‌گاهی، نمونه‌برداری شد. بعد از انجام عمل بی‌حسی موضعی، از طریق انجام عمل جراحی و بیوپسی از بافت مخاطی شکمبه (کیسه ونترال) به‌همراه پاپیلی‌های آن نمونه‌ای در حدود ۱ سانتی‌متر تهیه شد. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس به‌منظور انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد. نمونه‌ها در مرحله بعد به‌وسیله محلول نمکی شستشو داده شده و در داخل تیوپ‌های فاقد نوکلئاز در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در مرحله بعد با استخراج ریبونوکلئیک اسید از هر نمونه و تهیه دئوکسی ریبونوکلئیک مکمل[1] و با استفاده از روش Real Time-PCR (دستگاه بیوسیستم، مدل ۷۳۰۰) بیان ژن ناقل اوره بین جیره‌ها مقایسه شد. به‌منظور استخراج ریبونوکلئیک‌اسید از نمونه‌های بیولوژیک، از کیت استخراج (کیت جداسازی ریبونوکلئیک‌اسید با خلوص بالا، آلمان) استفاده شد. روش کار طبق پروتکل شرکت مربوطه با کمی تغییرات به‌صورت زیر انجام شد. به میکروتیوب‌های فاقد دئوکسی ریبونوکیداز و ریبونوکیداز به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر، ۰/۱ گرم نمونه همگن مورد تحقیق را اضافه شد. سپس یک میلی‌لیتر ماده تریزول[2] به آن افزوده و محتویات

1- cDNA
2- Trizol

داخل میکروتیوب را هم زده شد تا یک امولسیون همگن به‌دست آمد. میکروتیوب‌های حاوی مواد را در درجه حرارت ٤ درجه سلسیوس و به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. به میکروتیوب‌ها ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفورم: ایزوآمیل الکل (با نسبت ٤۹:۱) اضافه شد و به‌شدت محتویات داخل میکروتیوب‌ها تکان داده شد. میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس انکوبه شدند. میکروتیوب‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g برای به‌دست آوردن چندین لایه سانتریفوژ شدند. بخش بالایی شفاف حاوی ریبونوکلئیک اسید را با احتیاط به میکروتیوب تمیز ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. به تمام میکروتیوب‌ها به‌طور یکسان ایزوپروپانل به‌میزان ٦۰۰ میکرولیتر افزوده شد. محتویات داخل میکروتیوب‌ها به‌شدت هم زده و در داخل فریزر تحت دمای ۲۰- درجه سلسیوس و به‌مدت ۲ ساعت قرار داده شد. میکروتیوب‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه و در ۲۷۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفیوژ به کمک پمپ هوا بخش بالایی مایع حذف شد تا از آسیب رسوب ریبونوکلئیک اسیدها ممانعت شود. سپس به آن‌ها ۱ میلی‌لیتر الکل اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه شد و محتویات داخل میکروتیوب‌ها هم زده شد و به‌مدت ۵ دقیقه در ۱٤۰۰۰g سانتریفوژ شد و با احتیاط میکروتیوب‌ها برای جداسازی سوپرناتانت وارونه شد. رسوب باقی‌مانده در دمای ٦۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه خشک شد. به میکروتیوب‌ها ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر ماده اکسترا ژن ای[1] اضافه شد.

محتویات داخل میکروتیوب‌ها را با ورتکس به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به‌صورت سوسپانسیون، تحت درجه حرارت محیط اتاق به‌مدت ۲۰-۱۵ دقیقه قرار داده شد یا این‌که تحت دمای ٦۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. ریبونوکلئیک اسید استخراج شده از بافت شکمبه بلافاصله برای انجام مرحله نسخه‌برداری معکوس و سنتز دئوکسی ریبونوکلئیک مکمل توسط کیت (سنتز دئوکسی ریبونوکلئیک مکمل، ترمو ساینتیفیک، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که در سنتز دئوکسی ریبونوکلئیک مکمل از آغازگر اختصاصی رورس[2] و پرایمر تصادفی هگزانوکلئوتیدی استفاده شد. همچنین برای ژن ناقل اوره از پرایمرهای (Forward-ggacctgcctgtcttcactc؛ Reverse-gatcaaggtgcttgggaaaa) و برای گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز از پرایمرهای (Forward-gattgtcagcaatgcctcct؛ Reverse-ggtcataagtccctccacga) برای تولید آمپلیکون با سایز ۹۷bp و ۹٤bp استفاده شد (استیوارت، ۲۰۰۵؛ لادن، ۲۰۰۹). ابتدا ژنوتیپ‌ها و توالی‌های مربوط

1- Extra Gene E
2- Revers

به ژن‌های گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز و ژن ناقل اوره به‌طور جداگانه از بانک اطلاعات ژنی[1] جمع‌آوری شدند. با استفاده از نرم‌افزار پرایمر- پرایمر-[2]۵ نسبت به طراحی آغازگرهای اختصاصی اقدام شد. برنامه حرارتی زیر برای هر دو ژن به‌طور یکسان استفاده شد (جدول ۲). در انجام Real Time-PCR مقایسه‌ای از رنگ سایبرگرین استفاده شد و سطوح بیان ریبونوکلئیک‌اسید ناقل اوره نسبت به گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز گزارش شد.

جدول ۲- برنامه‌های حرارتی دستگاه.

مدت زمان اجرا	دمای هدف	بخش	چرخه‌ها
	قبل از انکوباسیون		
۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد		۱
	آمپلیفیکاسیون		
۱۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	دناتوره شدن	
۳۰ ثانیه	٦۰ درجه سانتی‌گراد	اتصال	
۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	طویل‌سازی	٤۵
	منحنی ذوب		
۱۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	دناتوره شدن	
۱ دقیقه	٦۰ درجه سانتی‌گراد	اتصال	۱
۱۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	دناتوره شدن	
۱۵ ثانیه	٦۰ درجه سانتی‌گراد	ذوب	

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های آزمایش در قالب طرح چرخشی در زمان، آنالیز واریانس شدند. در این طرح، سه تیمار در قالب سه جیره غذایی در سه دوره مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمایش با رویه مخلوط شده برنامه آماری SAS ویرایش ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵ درصد استفاده شد. مدل آماری طرح به شکل زیر بود:

$$Y_{ijkl}= \mu + T_i + \beta_k + SUB\ (\beta)_{Jk} + t_l + \varepsilon_{ijkl}$$

1- NCBI
2- Primer premier-5

Y_{ijkl}= مشاهده مربوط به j امین حیوان، با i امین تیمار، درون k امین ترتیب تیماری در l امین دوره، μ= میانگین کل، T_i= اثر تابت i امین تیمار، β_k= اثر k امین ترتیب اعمال تیمارها، $SUB\ (\beta)_{Jk}$= اثر تصادفی j امین حیوان آزمایشی درون k امین ترتیب تیماری، t_l = اثر l امین دوره، ε_{ijkl}= اثر باقی‌مانده.

جدول ۳- تعیین کینتیک تجزیه پروتئین خام به روش کیسه‌گذاری.

اجزای جیره‌های آزمایشی	تیمار ۱[1]	تیمار ۲	تیمار ۳	خطای استاندارد میانگین‌ها
بخش محلول، (درصد)	٤٩/٨[a]	٤٦/٥[b]	٤٤/٧[c]	۰/٦٥
بخش قابل تجزیه، (درصد)	٤٧/١[a]	٤٥/٢[b]	٤٣/٤[c]	۰/٥٧
نرخ تجزیه‌پذیری، (درصد در ساعت)	۰٧/٩[a]	۰٧/١[b]	۰٦/٧[c]	۰/۰٥
تجزیه‌پذیری مؤثر[2]، (درصد)	٧٨/٦[a]	٧٣/١[b]	٦٩/٥[c]	۰/٤۰

[1] نسبت‌های مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام): ۸۰ به ۲۰ (تیمار ۱)، ۷۵ به ۲۵ (تیمار ۲) و ۷۰ به ۳۰ (تیمار ۳)

[2] محاسبه شده بر اساس سرعت عبوری ۵ درصد در ساعت

در هر ردیف بین اعداد میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰٥).

نتایج و بحث

خصوصیات خوراک: ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است. جیره‌های آزمایشی طوری طراحی شده بودند که دارای ۱۸ درصد (بر اساس درصدی از ماده خشک) پروتئین خام باشند (جدول ۱). درصد پروتئین قابل تجزیه در شکمبه طراحی شده (درصدی از پروتئین خام) برای جیره ۱، جیره ۲ و جیره ۳ به‌ترتیب ۸۰، ۷۵ و ۷۰ بود. نتایج نشان می‌دهد که با کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه از جیره ۱ به جیره ۳، جزء محلول (P<۰/۰٥)، جزء قابل تجزیه (P<۰/۰٥)، نرخ تجزیه‌پذیری (P<۰/۰٥) و تجزیه‌پذیری مؤثر (P<۰/۰٥) به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۳).

مقدار مصرف و قابلیت هضم مواد مغذی در کل مسیر هضمی: مقدار مصرف و قابلیت هضم مواد مغذی در کل مسیر هضمی در جدول ٤ نشان داده شده است. جیره‌ها تأثیر معنی‌داری بر مقدار مصرف ماده خشک، پروتئین خام، ماده آلی، الیاف نامحلول در شوینده خنثی[1] و الیاف نامحلول در شوینده

1- Neutral detergent fiber (NDF)

اسیدی[1] نداشتند (P>۰/۰۵) (جدول ٤). با کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، قابلیت هضم ماده خشک (P<۰/۰۵) و پروتئین خام (P<۰/۰۵) به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. از سوی دیگر کاهش در سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه باعث افزایش معنی‌دار در قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی شد (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در قابلیت هضم ماده آلی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ٤).

سانتوز و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که جایگزینی کنجاله سویا به‌وسیله کنجاله سویای فرآوری شده و کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه تأثیر معنی‌داری بر مقدار مصرف ماده خشک نداشت. در آزمایش دیگری، کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه از ۱۳/۲ به ۱۰/٦ درصد تأثیر معنی‌داری بر مقدار مصرف ماده خشک نداشت (رینال و برودریک، ۲۰۰۵). به‌طور مشابه جبار و همکاران (۲۰۱۳) با افزایش سطح پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه از ۵/۲٦ به ۱۰/۳۹ تأثیر معنی‌داری بر مقدار مصرف ماده خشک مشاهده نکردند. در آزمایشی مشابه افزایش سطح پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه از ۲۵ به ۳٦ درصد تأثیر معنی‌داری بر مقدار مصرف ماده خشک مشاهده نشد. (خرم‌آبادی و همکاران، ۲۰۰۱). این نتایج مؤید یافته‌های آزمایش حاضر می‌باشد. کالشر و همکاران (۲۰۰٦) و سانتوز و همکاران (۱۹۹۸) نیز عنوان کردند که مقدار مصرف ماده خشک تحت تأثیر سطح پروتئین خام جیره و تجزیه‌پذیری پروتئین خام در شکمبه قرار نمی‌گیرد.

در آزمایش حاضر، با کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه، قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی افزایش یافت. رینال و برودریک (۲۰۰۵)، پتانایک و همکاران (۲۰۰۳) و فلیکس و واتیاکس (۲۰۰۵) گزارش کردند که با کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه در جیره قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی افزایش می‌یابد که مؤید یافته‌های آزمایش حاضر می‌باشد. به‌نظر می‌رسد افزایش در قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی در جیره ۲ و ۳، می‌تواند به‌علت فراهم شدن شرایط مطلوب تخمیر و ایجاد یک محیط پایدار در شکمبه (آتکینسون و همکاران، ۲۰۱۰) به‌دلیل بهینه شدن انرژی، نسبت مناسب پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه و رشد مناسب باکتری‌های شکمبه باشد که ممکن است سبب افزایش قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی گردد (واگنر و همکاران، ۲۰۱۰). از سوی دیگر افزایش پروتئین غیرقابل تجزیه می‌تواند با بهبود بازده مصرف انرژی در سطح سلولی و افزایش زیست فراهمی اسیدهای آمینه در سطح جذبی که نهایتا منجر به رشد مناسب باکتری‌های شکمبه می‌شود، قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی را افزایش دهد

1- Acid detergent fiber (ADF)

(هاراستاد و پرستلاکن، ۲۰۰۰). داویس و همکاران (۲۰۱۲) در آزمایشی از دو سطح کربوهیدارت قابل تجزیه در شکمبه (۲۸ و ٦۹ درصد) و دو سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (٤۸ و ۵۵ درصد) استفاده کردند و عنوان کردند که با کاهش غلظت پروتئین قابل تجزیه در شکمبه در سطح ٦۹ درصد کربوهیدارت قابل تجزیه در شکمبه، قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی افزایش می‌یابد اما علت آن به درستی مشخص نیست.

جدول ٤- اثر جیره‌های آزمایشی بر مقدار مصرف مواد مغذی و قابلیت هضم در کل مسیر هضمی.

مورد	تیمار ۱[1]	تیمار ۲	تیمار ۳	خطای استاندارد میانگین‌ها
مصرف مواد مغذی (گرم در روز)				
ماده خشک	۱۲۸۹	۱۲۵۱	۱۲٦۲	۱۲/٤
پروتئین خام	۲۲٤	۲۲۰	۲۱۸	۰۲/۵
ماده آلی	۱۱٦۸	۱۱۵۰	۱۱٤۰	۱۰/۳
الیاف نامحلول در شوینده خنثی	۳۷۹	۳۷۱	۳۸۱	۰۳/۷
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	۱۳۹	۱۵۷	۱٦۰	۰۱/۵
قابلیت هضم مواد مغذی (درصد)				
ماده خشک	۷۸/۱۸[a]	۷۷/۹۱[a]	۷٦/٤۷[b]	۰/۳۹۹
پروتئین خام	۸۰/٦۵[a]	۸۰/٤۲[a]	۷۸/۳٦[b]	۰/۳۷۳
ماده آلی	۸۱/۷٤	۸۰/٤۳	۸۰/٤۹	۱/۱۲۵
الیاف نامحلول در شوینده خنثی	۵۳/٤۷[b]	۵۷/٤٤[a]	۵۷/۸۹[a]	۰/۸۲۹
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	۵۵/٤٤	۵٤/۳۲	۵۳/۲۰	۰/۸۷۷

[1] نسبت‌های مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام): ۸۰ به ۲۰ (تیمار ۱)، ۷۵ به ۲۵ (تیمار ۲) و ۷۰ به ۳۰ (تیمار ۳).

در هر ردیف بین اعداد میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵).

تخمیر شکمبه‌ای و متابولیت‌های خونی: pH مایع شکمبه، غلظت نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار، نسبت استات به پروپیونات و غلظت نیتروژن اوره‌ای خون در جدول ۵ نشان داده شده است. pH مایع شکمبه تحت تأثیر جیره‌ها قرار نگرفت (جدول ۵). کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه اثر معنی‌داری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه (P<۰/۰۵) و نیتروژن اوره‌ای خون (P<۰/۰۵) داشت. غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه و نیتروژن اوره‌ای خون در بره‌های مصرف کننده جیره ۱، در مقایسه با سایر جیره‌ها بیش‌تر بود (P<۰/۰۵) (جدول ۵). کاهش سطح پروتئین قابل

تجزیه در شکمبه تأثیر معنی‌داری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار، استات، پروپیونات، بوتیرات و نسبت استات به پروپیونات نداشت (P>۰/۰۵) (جدول ۵).

جدول ۵- اثر جیره‌های آزمایشی بر pH مایع شکمبه، غلظت نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار، نسبت استات به پروپیونات و غلظت نیتروژن اوره‌ای خون.

مورد	[1] تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	خطای استاندارد میانگین‌ها
[2] pH	٦/٣١	٦/٣٣	٦/٣٧	۰/۰٣٦
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) [3]	۲۱/۹۳[a]	۱۹/٦۲[b]	۱۹/٦۳[b]	۰/۰۷٦
اسیدهای چرب فرار (مول در ۱۰۰ مول)				
کل اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول در لیتر)	۱۱٦/٦۰	۱۱۳/۸۱	۱۱۳/۸۹	۰/٤۹٤
استات	٦۳/٤۰	٦۳/۷٤	٦۳/۲٦	۰/۲۹۸
پروپیونات	۲۱/۳۳	۲۱/۰۱	۲۱/۱۱	۰/۱۱۹
بوتیرات	۱۱/۹٤	۱۱/۸۷	۱۱/۷۷	۰/۰۳۹
نسبت استات به پروپیونات	۲/۹۷	۳/۰۳	۲/۹۹	۰/۰۱٤
نیتروژن اوره‌ای خون (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۲۵/۷۰[a]	۲٤/۰۰[b]	۲۳/۰۰[b]	۰/۱۱۷

[1] **نسبت‌های** مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام): ۸۰ به ۲۰ (جیره ۱)، ۷۵ به ۲۵ (جیره ۲) و ۷۰ به ۳۰ (جیره ۳)

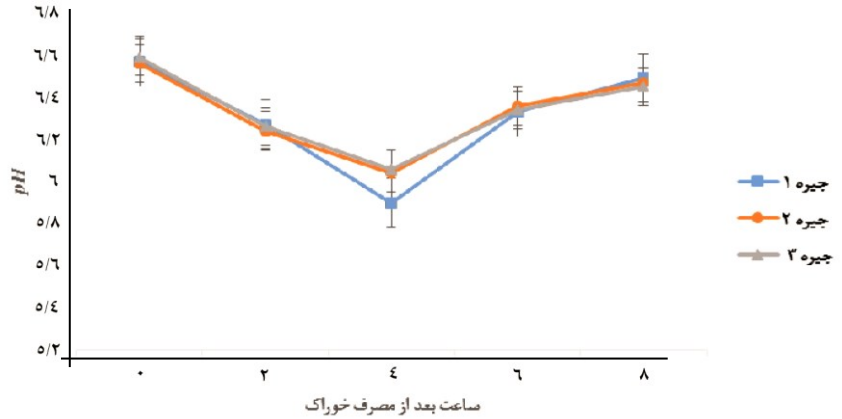
[2]میانگین‌های ذکر شده در رابطه با pH، مربوط به زمان‌های نمونه‌گیری از مایع شکمبه، بعد از مصرف خوراک می‌باشد.

[3]میانگین‌های ذکر شده در رابطه با غلظت نیتروژن آمونیاکی، مربوط به زمان‌های نمونه‌گیری از مایع شکمبه، بعد از مصرف خوراک می‌باشد.

در هر ردیف بین اعداد میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵).

pH مایع شکمبه در ساعات بعد از مصرف خوراک بین جیره‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱). در تمامی جیره‌ها pH مایع شکمبه در قبل از ساعت ۹ صبح افزایش یافت (شکل ۱). این افزایش در pH می‌تواند به‌علت انجام عمل نشخوار در طول شب و بازگشت نیتروژن به شکمبه باشد. انجام عمل نشخوار تولید بزاق را تحریک می‌کند. از این رو افزایش در pH می‌تواند به سبب اثر بافری بزاق در محیط شکمبه باشد (ماکاوا و همکاران، ۲۰۰۲). در تمامی جیره‌ها pH مایع شکمبه در ٤ ساعت بعد از مصرف خوراک کاهش یافت (شکل ۱). فراهمی انرژی سهل‌التخمیر ناشی از تجزیه نشاسته و متعاقب آن کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه به‌علت استفاده میکروارگانیسم‌ها از نیتروژن

آمونیاکی به‌منظور رشد و تولید پروتئین میکروبی می‌تواند دلیل کاهش pH مایع شکمبه در ٤ ساعت بعد از مصرف خوراک در تمامی جیره‌ها باشد (چاپاوال و همکاران، ۲۰۰۸؛ ریبریو و همکاران، ۲۰۱۱). pH مایع شکمبه ٤ الی ۸ ساعت بعد از مصرف خوراک در تمامی جیره‌ها به تدریج افزایش یافت (شکل ۱). این افزایش در pH می‌تواند به‌علت تولید بزاق در حین مصرف وعده خوراک بعد از ظهر در ساعت ٤ بعد از ظهر باشد (چاپاوال و همکاران، ۲۰۰۸؛ ریبریو و همکاران، ۲۰۱۱).

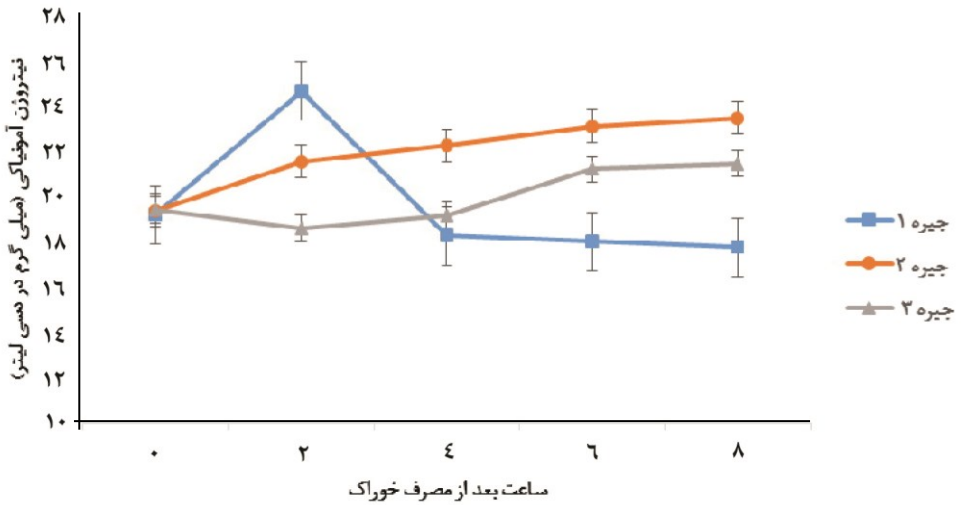


شکل ۱- اثر جیره‌های آزمایشی بر pH مایع شکمبه در ساعات بعد از مصرف خوراک، نسبت‌های مختلف پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه: ۸۰ به ۲۰ (جیره ۱)، ۷۵ به ۲۵ (جیره ۲) و ۷۰ به ۳۰ (جیره ۳).

جیره‌ها تأثیر معنی‌داری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه در ساعات بعد از مصرف خوراک داشتند (شکل ۲). غلظت نیتروژن آمونیاکی در برهه‌های مصرف کننده جیره ۱، دو ساعت بعد از مصرف وعده خوراک صبح‌گاهی در ساعت ۹ در مقایسه با سایر جیره‌ها بیش‌تر بود ($P<۰/۰۵$) (شکل ۲). دیویس و استال‌کاپ (۱۹٦۷) عنوان کردند که غلظت نیتروژن آمونیاکی ۲ تا ۳ ساعت بعد از مصرف خوراک به حداکثر می‌رسد. به‌طور مشابه بوناکیت و همکاران (۲۰۱۱) و جوسته (۲۰۱۲) مشاهده کردند که غلظت نیتروژن آمونیاکی ۲ ساعت بعد از مصرف خوراک به حداکثر رسیده است. در این میان جیره‌ای که دارای سهم بیش‌تری از پروتئین قابل هضم در شکمبه (جوسته، ۲۰۱۲) یا نسبت کم‌تری از پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه (بوناکیت و همکاران، ۲۰۱۱) داشته است، نسبت به سایر جیره‌ها غلظت نیتروژن آمونیاکی بالاتری دارد. غلظت نیتروژن آمونیاکی در برهه‌های مصرف کننده جیره ۱، ٤ الی ۸ ساعت بعد از مصرف وعده خوراک صبح‌گاهی به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت

(P<۰/۰۵) (شکل ۲). به‌طور مشابه بوناکیت و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده کردند که غلظت نیتروژن آمونیاکی ٦ ساعت بعد از مصرف خوراک کاهش یافت. لذا کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی ٤ الی ٨ ساعت بعد از مصرف خوراک، به سبب تجزیه‌پذیر بودن جیره ۱ نسبت به دو جیره دیگر است.

غلظت نیتروژن اوره‌ای خون به‌شدت وابسته غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه می‌باشد (تورنتون، ۱۹۷۰؛ هاموند، ۱۹۸۳؛ هنسی و نولان، ۱۹۸۸). از این‌رو کاهش در مقدار پروتئین قابل تجزیه در شکمبه می‌تواند منجر به کاهش در سطح نیتروژن اوره‌ای خون گردد.



شکل ۲- اثر جیره‌های آزمایشی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی در ساعات بعد از مصرف خوراک، نسبت‌های مختلف پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه: ۸۰ به ۲۰ (جیره ۱)، ۷۵ به ۲۵ (جیره ۲) و ۷۰ به ۳۰ (جیره ۳).

توازن ظاهری نیتروژن: مقدار دریافت نیتروژن، مقدار نیتروژن دفع شده و مقدار توازن ظاهری نیتروژن در جدول ٦ نشان داده شده است. مقدار دریافت نیتروژن تحت تأثیر جیره‌ها قرار نگرفت (P>۰/۰۵) (جدول ٦). عدم تفاوت بین جیره‌ها به لحاظ دریافت نیتروژن، می‌تواند به‌علت یکسان بودن سطح پروتئین خام تمامی جیره‌ها و عرضه خوراک به‌صورت کامل مخلوط و عدم توانایی بره‌ها در انتخاب خوراک باشد. مقدار نیتروژن دفع شده به‌صورت گرم در روز (P<۰/۰۵) و درصدی از نیتروژن دریافتی (P<۰/۰۵) از طریق مدفوع در بره‌های مصرف کننده جیره ۳، در مقایسه با سایر جیره‌ها بیش‌تر بود (جدول ٦). به‌طور مشابه لاینس و ویس (۱۹۹٦) مشاهده کردند که با افزایش سطح

پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه، مقدار نیتروژن دفع شده از طریق مدفوع افزایش می‌یابد. مقدار نیتروژن دفع شده (گرم در روز) از طریق ادرار در بره‌های مصرف کننده جیره ۱، در مقایسه با سایر جیره‌ها بیش‌تر بود (P<۰/۰۵) (جدول ٦). نوع پروتئین در جیره به‌خصوص پروتئین قابل تجزیه یا حلالیت پروتئین از اهمیت خاصی برخوردار است و تعیین می‌کند که چه مقدار از پروتئین جیره به نیتروژن آمونیاکی تبدیل شود (لاپیه‌ره و لابلی، ۲۰۰۱). از این‌رو با افزایش سهم پروتئین قابل تجزیه در جیره مقدار بیش‌تری از پروتئین خوراک به‌دلیل فعالیت دآمیناسیونی باکتری‌های پروتئولیتیک شکمبه تبدیل به نیتروژن آمونیاکی می‌شوند (لاپیه ره و لابلی، ۲۰۰۱). حال اگر مقدار نیتروژن آمونیاکی تولید شده در شکمبه بیش از احتیاجات میکروبی باشد، مقدار مازاد آن در کبد تبدیل به اوره می‌گردد. به دلیل این‌که مهم‌ترین مسیر دفع نیتروژن مازاد، ادرار می‌باشد و اوره مهم‌ترین شکل نیتروژن دفعی در ادرار است، پس این نتایج نشان‌دهنده این واقعیت است که با کاهش سطح پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، مقدار نیتروژن دفع شده از طریق ادرار کاهش می‌یابد (برودریک، ۲۰۰۳). در آزمایشی کاستیلو و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از کنجاله سویا و کنجاله سویای فرآوری شده با فرم آلدهید اثر افزودن دو سطح پروتئین خام با سه سطح تجزیه‌پذیری را بر مقدار استفاده از نیتروژن و تولید شیر در گاوهای شیری تغذیه شده با سیلوی علوفه بررسی کردند. مشابه یافته‌های آزمایش حاضر، کاستیلو و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که با افزایش مقدار پروتئین خام و افزایش تجزیه‌پذیری پروتئین خام در شکمبه، مقدار نیتروژن دفع شده از طریق ادرار افزایش می‌یابد. مقدار توازن ظاهری نیتروژن تحت تأثیر جیره‌ها قرار نگرفت و تمامی بره‌ها در حالت توازن مثبت نیتروژن بودند (جدول ۵). با این وجود مقدار توازن ظاهری نیتروژن در بره‌های مصرف کننده جیره ۲، در مقایسه با سایر جیره‌ها به لحاظ عددی بیش‌تر بود (جدول ۵). پانگکوم و همکاران (۲۰۰٤) عنوان کردند که با افزایش مقدار پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه، مقدار توازن ظاهری نیتروژن افزایش می‌یابد. به‌طور مشابه پتنایک و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که حیوانات مصرف کننده خوراک با مقدار کم پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، در مقایسه با حیوانات مصرف‌کننده خوراک با مقدار زیاد پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، نیتروژن بیشتری در بدن ذخیره می‌کنند.

جدول ٦- اثر جیره‌های آزمایشی بر مقدار دریافت نیتروژن، مقدار نیتروژن دفع شده و مقدار توازن ظاهری نیتروژن.

مورد	تیمار ۱[1]	تیمار ۲	تیمار ۳	خطای استاندارد میانگین‌ها
نیتروژن دریافت شده				
گرم در روز	۳۵/۹٤	۳٤/۹۰	۳٤/۹۰	۰/۵۵۷
نیتروژن دفع شده از طریق مدفوع				
گرم در روز	۷/۹۰^{b}	۷/۸٤^{b}	۸/۸۸^{a}	۰/۱٤٦
به‌عنوان درصدی از نیتروژن دریافتی	۲۱/۹٦^{b}	۲۲/۵۰^{b}	۲۵/٤۰^{a}	۰/٤۹٤
نیتروژن دفع شده از طریق ادرار				
گرم در روز	۱۷/۵۱^{a}	۱٦/٤۲^{b}	۱٦/٤۷^{b}	۰/۱۱۸
به‌عنوان درصدی از نیتروژن دریافتی	٤۸/۷۰^{a}	٤۷/۱۲^{b}	٤۷/۱٦^{b}	۰/٦۸۱
توازن ظاهری نیتروژن				
گرم در روز	۱۰/۵٤	۱۰/٦۲	۰۹/۵۸	۰/۵۲۹
به‌عنوان درصدی از نیتروژن دریافتی	۲۹/۲٦	۳۰/۲۲	۲۷/٤۰	۱/۰۸۸

[1] نسبت‌های مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام): ۸۰ به ۲۰ (تیمار ۱)، ۷۵ به ۲۵ (تیمار ۲) و ۷۰ به ۳۰ (تیمار ۳).

در هر ردیف بین اعداد میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P<۰/۰۵$).

بیان ژن ناقل اوره: بیان ژن ناقل اوره در بافت اپیتلیوم شکمبه در بره‌های مصرف‌کننده جیره تیمار ۲ (جدول ۷)، در مقایسه با سایر جیره‌ها به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر بود ($P<۰/۰۵$). مطالعات گذشته (ریتژاپت و همکاران، ۱۹۹۷؛ مارینی و ون آمبورگ، ۲۰۰۳؛ استیوارت و همکاران، ۲۰۰۵) نشان می‌دهد که با افزایش مقدار نیتروژن خوراک بیان ژن ناقل اوره، کاهش می‌یابد. رموند و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که افزایش مقدار پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه و تغییر مکان تجزیه پروتئین از شکمبه به روده کوچک سبب افزایش نرخ انتقال نیتروژن از خون به سمت شکمبه به مقدار ۲۰ درصد می‌گردد. از این‌رو می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که تغییر مکان تجزیه پروتئین از شکمبه به روده کوچک از طریق افزایش نرخ انتقال اوره به مسیر هضمی باعث افزایش بازده نیتروژن اوره‌ای خون می‌شود. این نتایج موید یافته‌های آزمایش حاضر است و توضیح می‌دهد که چرا بیان ژن ناقل اوره در جیره ۱ نسبت به سایر جیره‌ها کم‌تر بوده است. افزایش بیان ژن ناقل اوره در جیره ۲ در مقایسه با جیره ۳ می‌تواند به‌دلیل فراهمی بهتر نیتروژن برای باکتری‌های شکمبه و هم‌زمانی مناسب تر نیتروژن با

کربوهیدرات محلول در جیره ۲ باشد. استفاده بیش‌تر باکتری‌های شکمبه از نیتروژن آمونیاکی به‌منظور سنتز پروتئین میکروبی و متعاقب آن کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی باعث افزایش انتقال اوره از خون به سمت شکمبه می‌شود (کندی و میلیگان، ۱۹۸۰).

جدول ۷- اثر جیره‌های آزمایشی بر بیان ژن ناقل اوره در بافت اپیتلیوم شکمبه.

مورد	[1] تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	خطای استاندارد میانگین‌ها
چند برابر شدن میزان افزایش بیان ژن[2]	٦/۰۹^{b}	۱۸/۵۱^{a}	۷/۱٦^{b}	۱/۲۰۱

[1] نسبت‌های مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام): ۸۰ به ۲۰ (تیمار ۱)، ۷۵ به ۲۵ (تیمار ۲) و ۷۰ به ۳۰ (تیمار ۳)

[2] تعداد تکرار در هر تیمار = ۳

در هر ردیف بین اعداد میانگین‌های با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P<۰/۰۵$).

این نتایج نشان می‌دهد که تغییر در سطوح مختلف پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه، باعث تغییر معنی‌دار در بیان ژن ناقل اوره و در نهایت مقدار نیتروژن اوره‌ای بازگردانده شده به شکمبه می‌شود. لذا تنظیم ناقل‌های اوره در دیواره شکمبه از طریق تغییر در سطوح مختلف پروتئین قابل تجزیه به پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه می‌تواند نقش مهمی در کنترل نیتروژن اوره‌ای وارد شده به مسیر هضمی و افزایش بازده نیتروژن خوراک در بره‌های بلوچی در حال رشد ایفا کند.

منابع

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

Atkinson, R.L., Toone, C.D. and Ludden, P.A. 2010. Effects of ruminal protein degradability and frequency of supplementation on site and extent of digestion and ruminal fermentation characteristics in lambs fed low-quality forage. J. Anim. Sci. 88: 718–726.

Bunnakit, K. and Khampa, S. 2011. Effect of rumen undegradable levels on performance of Thai Native × Brahman beef cattle. Pakistan. J. Nut. 10: 1163-1167.

Broderick, G.A. 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 86: 1370-1381.

Castillo, A.R., Kebreab, E., Beever, D.E., Barbi, J.H., Sutton, J.D., Kirby, H.C. and France, J. 2001. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. J. Anim. Sci. 79: 247–253.

Chapaval, L., Melotti, L., Junior, P.R., Olivindo, C.S. and Rego, J.P.A. 2008. Roughage/concentrate ratio on ruminal ammonia concentration, pH and volatile fatty acids in crossbred dairy cows (Eng abstr.). Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 9: 18-28.

Davies, K.L., McKinnon, J.J. and Mutsvangwa, T. 2012. Effects of dietary ruminally degradable starch and ruminally degradable protein levels on urea recycling, microbial protein production, nitrogen balance, and duodenal nutrient flow in beef heifers fed low crude protein diets. Can. J. Anim. Sci. 93: 123-136.

Davis, G.V. and Stallcup, O.T. 1967. Effect of soybean meals, raw soybeans corn gluten feed and urea on the concentration of rumen fluid components at intervals after feeding. J. Dairy. Sci. 50: 1638-1645.

Flis, S.A. and Wattiaux, M.A. 2005. Effects of parity and supply of rumen degraded and undegraded protein on production and nitrogen balance in Holsteins. J. Dairy. Sci. 88: 2096-2106.

Hammond, A.C. 1983. Effect of dietary protein level, ruminal protein solubility and time after feeding on plasma urea nitrogen and the relationship of plasma urea nitrogen to other ruminal and plasma parameters J. Anim. Sci. 57: 435.

Harstad, O.M. and Prestlokken, E. 2000. Effective rumen degradability and intestinal indigestibility of individual amino acids in solvent-extracted soybean meal (SBM) and xylose-treated SBM (SoyPass) determined in situ. Anim. Feed Sci. Technol. 83: 31-47.

Hennessi, D.W. and Nolan, I.V. 1988. Nitrogen kinetics in cattle fed a mature subtropical grass hay with and without protein meal supplementation. Aust. J. Agric. Res. 39: 1135-1150.

Huntington, G.B. 1989. Hepatic urea synthesis and site and rate of urea removal from blood of beef steers fed alfalfa hay or a high concentrate diet. Can. J. Anim. Sci. 69: 215–223.

Ibrahimi Khoram Abadi, E., Tahmasbi, A.M., Danesh Mesgaran, M. and Valizadeh, R. 2011. Influence of protein sources with different degradability on performance, ruminal fermentation, blood metabolites and protozoal population in lactating dairy cows. J. Anim. Vet. Adv. 1: 43-49.

Jabbar, M.A., Marghazani, I.B., Pasha, T.N., Khalique, A. and Abdullah, M. 2013. Effect of protein supplements of varying ruminal degradability on nutrient intakes, digestibility, nitrogen balance and body condition score in early lactating Nili-Ravi Buffaloes. J. Anim. Plant. Sci. 23: 108-112.

Jooste, A.M. 2012. Effect of diets differing in rumen soluble nitrogen on poor quality roughage utilization by sheep. M.Sc. thesis. University of Pretorioa, South Africa.

Kennedy, P.M. and Milligan, L.P. 1980. The degradation and utilization of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants: A review. Can. J. Anim. Sci. 60: 205-221.

Kiran, D. and Mutsvangwa, T. 2007. Effects of barley grain processing and dietary ruminally degradable protein on urea nitrogen recycling and nitrogen metabolism in growing lambs. J. Anim. Sci. 85: 3391-3399.

Lapierre, H. and Lobley, G.E. 2001. Nitrogen recycling in the ruminant: A review. J. Dairy Sci. 84: 223–236.

Leng, R.A. 1990. Factors affecting the utilization of poor quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. Nutr. Res. Rev. 3: 277-303.

Lines, L.W. and Weiss, P.W. 1996. Use of nitrogen from ammoniated alfalfa hay, urea, soybean meal and animal protein meal by lactating cows. J. Dairy Sci. 79: 1992–1999.

Ludden, P.A., Stohrer, R.M., Austin, K.J., Atkinson, R.L., Belden, E. and Harlow, H.J. 2008. Effect of protein supplementation on expression and distribution of urea transporter B in lambs fed low-quality forage. J. Anim. Sci. 87: 1354–1365.

Makkar, H.P.S. 2003. Effect and fate of tannins in rumminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small. Rum. Res. 49: 421-256.

Maekawa, M., Beauchemin, K.A. and Christensen, D.A. 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production and ruminal pH of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85: 1165-1175.

Marini, J.C. and Van Amburgh, M.E. 2003. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. J. Anim. Sci. 81: 545–552.

Marini, J.C., Klein, J.D., Sands, J.M. and Van Amburgh, M.E. 2004. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. J. Anim. Sci. 82: 1157–1164.

Moore, K.P. 2000. Laboratory procedures for the plant tissue and feed analysis laboratory. Agricultural services laboratory, Clemson University. Clemson. S.C.

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. National Academy Press. Washington, DC.

Ørskov, E.R. and McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. 92: 499-503.

Paengkoum, P., Liang, J.B., Jelan, Z.A. and Masery, M. 2004. Effects of ruminally undegradable protein levels on nitrogen and phosphorus balance and their

excretion in Saanen goats fed oil palm fronds. Songkianakarin J. Sci. Tehnol. 26: 15-122.

Pattanaik, A.K., Sastry, V.R.B., Katiyar R.C. and Murari, L. 2003. Effects of grain processing and dietary protein degradability on N metabolism, energy balance and methane production inyoung calves. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 1443-1450.

Prestlokken, E. and Rise, O. 2003. Protein and amino acid digestibility in dairy cows measured with mobile nylon bags recovered inileum or in faeces. Acta Agric. Scand. 53: 11–20.

Rémond, D., Bernard, L., Savary-Auzeloux, I. and Noziere, P. 2009. Partitioning of nutrient net fluxes across the portal-drained viscera in sheep fed twice daily: effect of dietary protein degradability. Br. J. Nutr. 102: 370-381.

Reynal, S.M. and Broderick, G.A. 2005. Effect of Dietary Level of Rumen-Degraded Protein on Production and Nitrogen Metabolism in Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 88: 4045–4064.

Ribeiro, S.S., Vasconcelos, J.T., Morais, M.G., Itavo, C.B.C.F. and Franco, G.L. 2011. Effects of ruminal infusion of a slow-release polymer-coated urea or conventional urea on apparent nutrient digestibility, in situ degradability, and rumen parameters in cattle fed low quality hay. Anim. Feed Sci. Tech. 164: 53–61.

Ritzhaupt, A., Wood, I.S., Jackson, A.A., Moran, B.J. and Shirazi-Beechey, S.P. 1998. Isolation of a RT-PCR fragment from human colon and sheep rumen RNA with nucleotide sequence similarity to human and rat urea transporter isoforms. Biochem. Soc. Trans. 26: 40-51.

Santos, F.A., Santos, J.E., Theurer, C.B. and Huber, J.T. 1998. Effects of rumen undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. J. Dairy Sci. 81: 3182-213.

Sarraseca, A., Milne, E., Metcalf, M.J. and Lobley, G.E. 1998. Urea recycling in sheep: effects of intake. Br. J. Nutr. 79: 79-88.

Smith, C.P. and Rousselet, G. 2001. Facilitative Urea transporters. J. Memb. Bio. 183: 1–14.

Stewart, G.S. 2011. The emerging physiological roles of the SLC14 A family of urea transporters. Br. J. Pharm. 164: 1780–1792.

Stewart, G.S. and Smith, C.P. 2005. Urea nitrogen salvage mechanisms and their relevance to ruminants, non-ruminants and man. Nut. Res. Rev. 18: 49-62.

Thornton, R.F. 1970. Factors affecting the urinary excretion of urea nitrogen in cattle. II. The plasma urea nitrogen concentration. Aust. J. Agri. Rer. 21: 145-152.

Van Soest, P.V., Robertson, J. and Lewis, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy. Sci. 74: 3583-3597.

Wagner, J.J., Engle, T.E. and Bryant, T.C. 2010. The effect of rumen degradable and rumen undegradable intake protein on feedlot performance and c arcass merit in heavy yearling steers. J. Anim. Sci. 88: 1073 -1081.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 2(4), 2015
http://ejrr.gau.ac.ir

Effect of Different Dietary Rumen Degradable to Rumen Undegradable Protein Ratio on Nitrogen Efficiency and Urea Transporter-B Expression in Growing Baluchi Male Lambs

E. Ibrahimi Khoram Abadi[1], *A.M. Tahmasebi[2], M. Danesh Mesgaran[2], A.A. Naserian[2] and S.A. Vakili[3]

[1]Ph.D. Student of Ruminant Nutrition, [2]Professor, and [3]Associate Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Received: 06/22/2014; Accepted: 01/12/2015

Abstract

An experiment was carried out to evaluate how dietary rumen degradable and rumen undegradable protein level may alter nitrogen efficiency and urea transporter-B expression in growing Baluchi male lambs. Three Baluchi male lambs (30±2 kg BW) were used in a change over design and given 1 of 3 isonitrogenous supplements: 1) high ruminally degradable protein (RDP/RUP 80:20), 2) medium ruminally degradable protein (RDP/RUP 75:25) and 3) low ruminally degradable protein (RDP/RUP 70:30). Treatments had significant effect on Soluble Fraction ($P<0.05$), Degradable Fraction ($P<0.05$), Degradation Rate ($P<0.05$) and Effective Degradability ($P<0.05$). A significant difference was observed for DM ($P<0.05$), CP ($P<0.05$) and NDF ($P<0.05$) digestibility. The maximum value of NH_3-N ($P<0.05$) and BUN ($P<0.05$) concentration was measured in HRDP diet followed by MRDP and LRDP diets. Fecal N excretion of LRDP (g/d) ($P<0.05$) diet was significantly higher than diets MRDP and HRDP. Urinary N excretion of HRDP diet (g/d) ($P<0.05$) was significantly higher than other diets. A significant difference was observed for ruminal urea transporter-B mRNA expression ($P<0.05$). In conclusion, this study show that dietary changes in rumen degradable and rumen undegradable protein produce significant changes in urea transporter-B expression within the ovine rumen. Our findings suggest that the dietary regulation of urea transporters plays a major role in altering urea entry into the gastrointestinal tract.

Keywords: Baluchi lamb, Degradability, Nitrogen, Urea transporter

*Corresponding author: a.tahmasbi@lycos.com