Iranian Journal of Animal Science
Vol 48, No 3, Autumn 2017 (363-370)
DOI: 10.22059/ijas.2017.226942.653502

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶ (ص ۳۶۳-۳۷۰)

بررسی بیان ژن تریپسین در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با آرد بلوط

فاطمه قربانی[۱] و مصطفی محقق دولت‌آبادی[۲*]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه یاسوج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳)

چکیده

هدف از این پژوهش ارزیابی بیان ژن تریپسین در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره‌های بلوط تانن‌دار بود. در این آزمایش، از سه جیره (شاهد یا کنترل، جیرهٔ حاوی ۱۵ درصد و جیرهٔ حاوی ۲۰ درصد بلوط) برای تغذیهٔ جوجه‌های گوشتی در طول دورهٔ ۴۲ روزه استفاده شد. در روزهای ۲۱ و ۴۲ روزگی، از ۳۶ جوجهٔ گوشتی (۱۸ جوجه برای هر زمان، شش جوجه برای هر تیمار) RNA کل از بافت پانکراس استخراج شد. برای بررسی بیان ژن تریپسین، از ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. برای تجزیهٔ داده‌های بیان ژن از نرم‌افزار REST, 2009, V2.0.13 و SAS استفاده شد. نتایج نشان داد، وزن نسبی پانکراس در سن ۲۱ روزگی در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت نداشت، اما در سن ۴۲ روزگی، وزن پانکراس در تیمار ۲۰ درصد نسبت به تیمارهای شاهد و ۱۵ درصد افزایش معنی‌داری داشت. بیان ژن تریپسین در سن ۲۱ روزگی در تیمار ۱۵ درصد نسبت به تیمار شاهد تغییر معنی‌داری نداشت اما در همین سن بیان ژن تریپسین در تیمار ۲۰ درصد نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در سن ۴۲ روزگی در تیمار ۱۵ و ۲۰ درصد بیان ژن تریپسین نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. بر پایهٔ نتایج این بررسی، در سن ۲۱ روزگی سطح ۲۰ درصد بلوط در جیره منجر به افزایش بیان ژن تریپسین شد، درحالی‌که در سن ۴۲ روزگی استفاده از ۱۵ و ۲۰ درصد بلوط تغییر معنی‌داری در بیان ژن تریپسین ایجاد نکرد. همچنین، همبستگی معنی‌داری بین بیان ژن تریپسین در پانکراس و وزن نسبی پانکراس در روز ۴۲ روزگی مشاهده شد (P<۰/۰۱).

واژه‌های کلیدی: بلوط، بیان ژن، تریپسین، جوجهٔ گوشتی.

Expression analysis of trypsin gene in pancreatic tissue of broiler chicken fed diets containing oak acorn

Fatemeh Ghorbani[1] and Mustafa Muhaghegh-Dolatabady[2*]
1, 2. M.Sc. Student and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
(Received: Feb. 5, 2017 - Accepted: Nov. 4, 2017)

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the expression of trypsin gene in the pancreas tissue of broiler chicken fed tannin containing oak diets. In this experiment, three diets (control, 15% and 20% oak) were fed to broilers from 1 to 42 days of age. On days 21 and 42, total RNA extracted from pancreatic tissue of 36 broiler chicken (18 for each time, 6 for each treatment). To study of gene expression, the trypsin expression was compared with β-actin gene as a reference gene. Data of gene expression analzed, using REST, V2.0.13 2009 software. No significant association was found between pancreases relative weight and different treatments on day 21, but the relative weight of pancreases on day 42 was significantly for increased in diet with 20 percent of oak acorn in comparison to other treatments. The mRNA expression level of trypsin gene was significantly higher in 20 percent of oak acorn treatment on day 21, but their differences were not significant in compared to control diet on day 42. In addition, significant correlation was found between gene expression of trypsin and relative weight of pancreases on day 42.

Keywords: Broiler, gene expression, oak, trypsin.

* Corresponding author E-mail: mmuhaghegh@yu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کاربرد روش‌های اصلاح نژادی منجر به تولید پرندگانی شده است که از نظر تولید گوشت و تخم می‌تواند بخش مهمی از غذای انسان را تأمین کند. دستیابی به بیشترین ظرفیت ژنتیکی نیازمند فراهم کردن همهٔ نیازهای طیور به‌ویژه نیازهای تغذیه‌ای آن‌ها است به‌طوری‌که خوراک نه تنها تعیین‌کنندهٔ عملکرد گله‌های پرورش طیور است، بلکه بخش عمدهٔ هزینه‌ها را نیز به خود اختصاص می‌دهد. بنابراین شناسایی مواد غذایی جدید می‌تواند بسیاری از هزینه‌ها را کاهش دهد. با توجه به خودرو بودن درخت بلوط و تولید فراوان میوهٔ بلوط در کشور و به دلیل داشتن مواد مغذی با ارزش، می‌توان از این مادهٔ خوراکی به‌عنوان یک مادهٔ خوراکی جایگزین استفاده کرد (Varmqany *et al*., 2004). تاکنون بررسی‌های چندی درزمینهٔ استفاده از بلوط در جیرهٔ جوجه‌های گوشتی انجام شده است. در کشورهای مدیترانه‌ای، بلوط به‌عنوان یک منبع انرژی ارزان در جیرهٔ حیوان‌های اهلی کاربرد فراوانی دارد (Kekos & Kaukios, 1985). افزون بر این، گزارش شده است که استفاده از ۱۵ درصد بلوط خام در جیرهٔ جوجه‌های گوشتی، در مقایسه با گروه شاهد اثرگذاری نامطلوبی ندارد (Ghaedi *et al*., 2012; Hooshmane *et al*., 2015).

استفاده از میوهٔ بلوط به‌عنوان جایگزین ذرت در جیرهٔ طیور می‌تواند منجر به کاهش وابستگی و خروج ارز از کشور شود ولی باید توجه داشت مشکل اساسی میوهٔ بلوط، وجود میزان قابل توجهی از ترکیب‌های ضد تغذیه‌ای از جمله تانن‌هاست (Santos-Bulga & Scalbert, 2000). به‌طورکلی تانن‌های گیاهی ترکیب‌های فنلی محلول در آب هستند که وزن مولکولی بین ۵۰۰ تا ۳۰۰۰ دالتون دارند (Jansman, 1993). این ترکیب‌ها با کاهش دسترسی اسیدهای آمینه برای طیور (Short, 1976) منجر به کاهش عملکرد طیور در رشد، مصرف غذا و بازدهٔ تبدیل غذایی می‌شوند (Rostagno *et al*., 1973; Armstrong *et al*., 1974). این قابلیت تانن‌ها در ترکیب با پروتئین‌های جیره موجب بازدارندگی عمل آنزیم‌هایی تجزیه‌کنندهٔ پروتئین از جمله تریپسین می‌شوند (Mahmood & Smithard, 1993). افزایش اندازهٔ پانکراس در جوجه‌های تغذیه‌شده با جیرهٔ حاوی تانن، به کاهش فعالیت آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین و آمیلاز نسبت داده شده است (Mahmood *et al*., 1997). در حقیقت، افزایش اندازهٔ پانکراس در نتیجهٔ فعالیت زیاد این اندام برای خنثی کردن تأثیر تانن از راه تولید بیشتر آنزیم‌های گوارشی مانند تریپسین، کیموتریپسین و آمیلاز رخ می‌دهد (Ahmed, 1991). همچنین حساسیت فعالیت ویژهٔ تریپسین به تانیک اسید موجود در جیرهٔ غذایی گزارش شده است (Marija *et al*., 2013). از سویی، بیان ژن تریپسین متأثر از سن و ترکیب‌های جیرهٔ غذایی است (Lemos *et al*., 1996). بنابراین انتظار می‌رود با تغییر ترکیب‌های جیرهٔ غذایی و افزایش سن بیان ژن مورد نظر نیز تغییر کند.

از این‌رو، هدف این بررسی ارزیابی بیان ژن تریپسین در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با میوهٔ بلوط در دو سطح ۱۵ و ۲۰ درصد در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از شمار ۲۶۴ قطعه جوجهٔ یک روزهٔ نر و مادهٔ سویهٔ کاب ۵۰۰ در قالب طرح کامل تصادفی با سه تیمار و چهار تکرار(هر تکرار با ۲۲ قطعه) استفاده شد. تیمار اول، با جیرهٔ بر پایهٔ ذرت- کنجالهٔ سویا (بدون استفاده از میوهٔ بلوط) به‌عنوان جیرهٔ شاهد، و تیمارهای دو و سه به ترتیب با جیره‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط تغذیه شدند. جیره‌های غذایی بر پایهٔ میزان توصیه‌شدهٔ مواد مغذی برای جوجه‌های گوشتی NRC (1994) برای دو دورهٔ آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و پایانی (۲۲ تا ۴۲ روزگی) با نرم‌افزار UFFDA تنظیم شدند.

شمار ۱۸ جوجه در سن ۲۱ روزگی و ۱۸ جوجه در سن ۴۲ روزگی (در هر سن شش جوجه از تیمار بدون بلوط، شش جوجه از تیمار ۱۵ درصد بلوط و شش جوجه از تیمار ۲۰ درصد بلوط) از سالن مرغداری دانشگاه یاسوج انتخاب شدند و میزان وزن زنده و وزن پانکراس اندازه‌گیری شد. برای استخراج RNA قطعه‌های کوچکی از بافت پانکراس هر جوجه

Archive of SID

www.SID.ir

توسط تیغ سترون (استریل)شده جدا شد و به‌سرعت درون تانک نیتروژن قرار داده شد. استخراج RNA کل از ۱۰۰میلی‌گرم بافت پانکراس و بنا بر دستورکار کیت استخراج شرکت سیناژن صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتوفوتومتر) ارزیابی شد. برای ساخت (سنتز) cDNA از مستر میکس لیوفیلیزه بایونیر شرکت تکاپوزیست استفاده شد. بدین منظور میزان ۱۰ پیکومول از آغازگر تصادفی هگزامر به همراه ۲ میکرولیتر RNA استخراج به ریزلوله (میکروتیوپ)های حاوی مسترمیکس اضافه شد و درنهایت حجم نهایی مواد افزوده‌شده به ریزلوله‌ها توسط آب RNase Free به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از تهیهٔ مخلوط کامل، ساخت cDNA در شرایط دمای ^{o} ۱۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۹۰ درجهٔ سلسیوس برای پنج دقیقه قرار گرفت. پس از ساخت، cDNA در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. همچنین کیفیت cDNA ساخت شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد.

برای بررسی بیان ژن هدف و مرجع از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد (Wen *et al*., 2012) که ویژگی‌های آن‌ها در جدول ۱ آمده است. در روش تعیین کمی بیان ژن تصحیح تغییر آزمایشی ضروری است. برای این منظور، از یک ژن کنترل داخلی، β-Actin، در دو سن ۲۱ و ۴۲ روزگی استفاده شد. برای واکنش Real time PCR از مسترمیکس Q-RT-PCR شرکت سیناژن استفاده شد.. برای هر نمونه در هر تیوپ ۴ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، ۱میکرولیتر از هر آغازگر رفت با غلظت ۵ پیکومول، ۱ میکرولیتر cDNA ساخت شده و ۳ میکرولیتر آب DNase Free اضافه شد که در کل حجم نهایی هر ریزلوله به ۱۰میکرولیتر رسید. برای هر نمونه نیز دو ریزلوله به‌منظور دو تکرار در نظر گرفته شد.

برنامهٔ گرمایی استفاده‌شده در واکنش Real Time PCR برای ژن‌های β-Actin و تریپسین شامل دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس و ۳۱ ثانیه در دمای۶۰ درجهٔ سلسیوس با ۴۰ چرخه و در مرحلهٔ جداسازی نهایی در شرایط دمایی ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه بود.

در پایان مقایسهٔ بیان ژن در دو سن ۲۱ و ۴۲ روزگی با تیمارهای ۱۵ و ۲۰ درصد بلوط با استفاده از برنامهٔ REST و بر پایهٔ میزان Ct (شمار چرخهٔ مورد نیاز برای رسیدن به یک سطح آستانه) به‌دست‌آمده توسط Real Time PCR نسبت به گروه شاهد (کنترل) انجام شد. برای بررسی ارتباط بین وزن نسبی پانکراس و تیمارها، همچنین تعیین همبستگی بین بیان ژن تریپسین و وزن نسبی پانکراس از نرم‌افزار SAS استفاده شد.

نتایج

پس از انتخاب و اندازه‌گیری وزن زندهٔ جوجه، جداسازی بافت پانکراس و تعیین وزن نسبی پانکراس، ارتباط بین تیمارها و وزن نسبی پانکراس با نرم‌افزار SAS محاسبه شد که در جدول ۲ نشان داده شده است.

وزن نسبی پانکراس در سن ۲۱ روزگی در تیمارهای ۱۵ درصد و ۲۰ درصد بلوط نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). در سن ۴۲ روزگی، وزن پانکراس تیمار ۲۰ درصد تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و تیمار ۱۵ درصد بلوط نشان داد ($P<0/05$) ، تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری با تیمار ۱۵ درصد بلوط نداشت.

جدول۱. توالی، شمارهٔ دسترسی و جایگاه آغازگرها

Table 1. The sequences, access numbers and locations of primers

Primer	GeneBankID	Sequence	Size bp	Reference
Trypsinogen	GGU15155	5´-CAGTGATGAGGATGATGACA-3´ 5´-GTGACGGATGACTTTAGATG-3´	241	Wen *et al*., 2012
β-Actin	NM 205518	5'-CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA-3' 5'-ATTTCTCTCTCGGCTGTGGTG-3'	139	Yang *et al*., 2013

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن نسبی پانکراس در سن‌های ۲۱ و روزگی ۴۲

Table 2. The mean comparison of experimental treatments on pancreatic relative weight at 21 and 42 days age

Treatment	Day 21	Day 42
Control	0.33	0.20[a]
15% oak acorn	0.34	0.20[a]
20% oak acorn	0.37	0.25[b]
P value	0.07	0.001[**]

پس از افزایش موفق قطعه‌های مورد نظر از ژن‌های تریپسین و بتا اکتین توسط آغازگرها (جدول۱)، مشاهدهٔ محصولات در ژل آگارز همراه با نشانگر درستی اندازهٔ قطعه‌ها را تأیید کرد (تصویر ۱). همان‌طور که در این تصویر مشاهده می‌شود اندازهٔ قطعه‌های افزونش‌شده برای ژن تریپسین و بتا اکتین به ترتیب ۲۴۱ و ۱۳۶ جفت باز است.

نتایج بررسی بیان ژن تریپسین در سن ۲۱ روزگی و ۴۲ روزگی پرورش در جدول ۳ آمده است. در سن ۲۱ روزگی در تیمار ۱۵ درصد بلوط بیان ژن تریپسین نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (P=۰/۷۱)، اما بیان آن در تیمار ۲۰ درصد بلوط افزایش معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد (P=۰/۰۳).

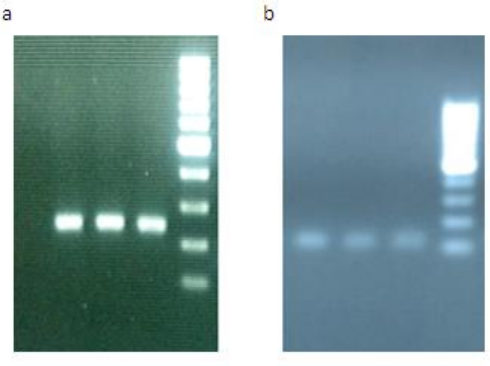
در سن ۴۲ روزگی، بیان ژن در تیمار ۱۵ درصد تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (P=۰/۷۹) و در همین سن نیز بیان ژن تریپسین در تیمار ۲۰ درصد نسبت به گروه شاهد متفاوت نبود (تصویر ۲). بررسی همبستگی بین وزن نسبی پانکراس و بیان ژن تریپسین (r=۰/۱۳) نشان داد که در سن ۲۱ روزگی هیچ‌گونه همبستگی معنی‌داری بین این دو صفت وجود ندارد درحالی‌که در سن ۴۲ روزگی این همبستگی برابر ۰/۶۰ بود که در سطح ۱ درصد معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۰۸).

جدول۳. میزان بیان ژن تریپسین در روزهای ۲۱ و ۴۲ روزگی جوجه‌های گوشتی با تیمار ۱۵ و ۲۰درصد آرد میوهٔ بلوط

Table 3. Gene expression levels of trypsin in broiler chicken on days 21 and 42 with 15 and 20% oak acorn

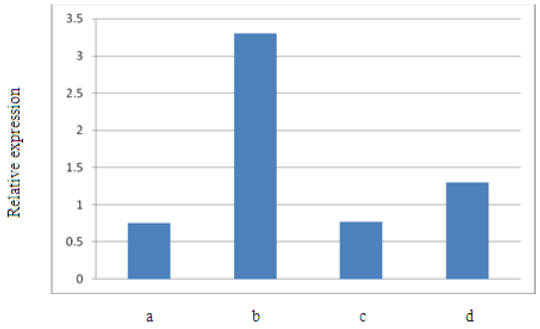
Age	Treatment	Expression rates	P value	Results
21	15% oak acorn	0.75	0.71	-
	20% oak acorn	**3.3***	0.03	UP
42	15% oak acorn	0.77	0.79	
	20% oak acorn	1.3	0.13	-

توجه: عددها در ستون سوم میزان بیان نسبی ژن تریپسین در تیمارهای ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوهٔ بلوط نسبت به گروه شاهد را نشان می‌دهد که نسبت به ژن اکتین نرمال شده‌اند.



شکل ۱. قطعه‌های افزونش‌شده توسط آغازگرها همراه با نشانگر با اندازهٔ ۱۰۰ جفت باز. a) قطعهٔ افزونش‌شده از ژن تریپسین و b) قطعهٔ افزونش‌شده از ژن بتا اکتین

Figure 1. Amplified fragments using primers along with 100 bp ladder. a) Amplified fragment of trypsin gene and b) amplified fragment of β-actin gene



شکل ۲. بیان نسبی ژن در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی آرد میوهٔ بلوط نسبت به گروه شاهد در دو سن ۲۱ و ۴۲ روزگی. a) تیمار ۱۵درصد در سن ۲۱ روزگی، b) تیمار ۲۰درصد در سن ۲۱ روزگی، c) تیمار ۱۵درصد در سن ۴۲ روزگی و d) تیمار ۲۰درصد در سن ۴۲ روزگی

Figure 1. Expression of trypsin gene in broiler fed diets containing oak acorn relative to control group on days 21 and 42. a) 15% oak acorn on day 21, b) 20% oak acorn on day 21, c) 15% oak acorn on day 42 and c) 15% oak acorn on day 42.

بحث

در این پژوهش بین میزان استفاده از میوهٔ بلوط و وزن نسبی پانکراس در سن ۲۱ روزگی تفاوت معنی‌دار دیده نشد اما در سن ۴۲ روزگی، وزن نسبی پانکراس در تیمار ۲۰ درصد بلوط، تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و ۱۵ درصد بلوط نشان داد. تأثیر خوراک‌های حاوی تانن بر وزن پانکراس در چندین پژوهش بررسی شده است. برای مثال، در بررسی وجود تانن سورگوم

Archive of SID

www.SID.ir

در جیرهٔ طیور، با افزایش سوخت‌وساز پانکراس منجر به پررشدی (هایپرتروفی) پانکراس شد (Mahmood *et al.*, 2006). مصرف خوراک‌های حاوی تانن بالا مانند کنجالهٔ دانه سال (Sal seed) قابلیت هضم پروتئین و فعالیت آنزیم‌های گوارشی (تریپسین، کیموتریپسین و آمیلاز) را کاهش داده و وزن نسبی پانکراس را افزایش می‌دهد (Mahmood, 2006). همچنین، نتایج یک تحقیق نشان داد، حضور تانن در جیرهٔ غذایی جوجه‌ها، قابلیت هضم پروتئین و فعالیت آنزیم‌های گوارشی (تریپسین، کیموتریپسین، آمیلاز، دی‌پپتیداز) را در روده کاهش داده و درنهایت وزن نسبی پانکراس را افزایش داده است (Mahmood, 2007). با توجه به ارتباط معکوسی که بین اندازهٔ بدن جوجه و اندازهٔ پانکراس وجود دارد (Mahmood & Smithard, 1993)، با افزایش سن اندازهٔ پانکراس نسبت به‌اندازهٔ بدن کاهش می‌یابد، از سوی دیگر، تانن موجود در جیره با پروتئین جیرهٔ باندشده و می‌تواند پروتئین را از دسترس آنزیم‌های هضم‌کننده (از جمله تریپسین) خارج می‌کند. درنتیجه ترشحات آنزیم تریپسین از پانکراس برای چیرگی بر تأثیر تانن افزایش می‌یابد و پانکراس دچار پررشدی می‌شود (Ahmed, 1991) که می‌تواند تأییدی بر نتیجهٔ این تحقیق باشد. البته، بررسی‌های چندی گزارش کردند که محتوای تانن موجود در جیره تأثیری بر وزن پانکراس و فعالیت ویژهٔ تریپسین ندارد (Keshavarzi; 2015; Mariscal *et al.*, 2004)، هرچند در دئودنوم فعالیت ویژهٔ تریپسین با بیشترین سطح تانن سورگوم (۱۰ گرم در کیلوگرم جیره) به ۶/۷ درصد افزایش‌یافته بود (Mariscal *et al.*, 2004). اما نتایج بررسی نشان داد، پرندگانی که از راه جیرهٔ حاوی سورگوم، تانن را دریافت کردند، وزن نسبی بدن، پیش معده، سنگدان و پانکراس در آن‌ها به ترتیب به میزان ۳/۲۹ درصد، ۳/۰۹ درصد، ۰/۴۷ درصد و ۰/۴۴ درصد کاهش‌یافته است (Abdulla *et al.*, 2016).

بیان ژن تریپسین در دورهٔ ۲۱ روزگی پرورش با تیمار ۱۵ درصد بلوط تفاوتی با تیمار شاهد نداشت و میزان بیان ژن در این دوره نسبت به گروه کنترل حدود ۰/۷۵ برابر بود. تانن‌های موجود در بلوط به دلیل تلخی و خاصیت گسی مصرف خوراک را کاهش می‌دهند و به دلیل مصرف کم‌خوراک توسط پرندگان با جیرهٔ حاوی تانن توانایی کولهٔ سیستوکینین (CCK) برای تحریک ترشحات پانکراس کاهش می‌یابد و به‌موجب آن ترشح تریپسین کم می‌شود (Mahmood, 1997). همچنین ممکن است تریپسین در بافت‌های دیگری به غیر از پانکراس بیان شده باشد. در مرغ بیان ژن تریپسین افزون بر پانکراس در تیموس، طحال و کبد نیز صورت می‌گیرد (Kat *et al.*, 1995). در دورهٔ ۲۱ روزگی با تیمار ۲۰ درصد بلوط، بیان ژن تریپسین نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و میزان بیان حدود ۳/۳ برابر گروه شاهد شد که مخالف با نتیجهٔ پژوهش در لارو پروانه بود (Marija *et al.*, 2013). در این پژوهش تانیک اسید موجود در جیرهٔ لارو پروانه منجر به کاهش فعالیت ویژهٔ تریپسین شد. افزون بر این بیان ژن تریپسین تحت تأثیر ترکیب‌های جیره قرار می‌گیرد (Stratowa & Rutter, 1996; Fernando, 1995). در پژوهشی روی موش، میزان mRNA تریپسین پانکراسی پس از تزریق کلسیم به موش افزایش یافت و سطح mRNA تریپسین پس از ۸ ساعت تغذیه با کلسیم به میزان ۱۱ برابر بیشتر شد (Stratowa & Rutter, 1996). همچنین رونویسی ژن تریپسین پشه به هر دو میزان کمی و کیفی پروتئین غذا وابسته است. هموگلوبین، گاما-گلوبین و آلبومین سطح بالای تحریک mRNA تریپسین را ایجاد کرد در حالی آگارز، محلول‌های نمکی، ژلاتین و هیستون سطح mRNA تریپسین را کاهش داد (Fernando, 1995).

در دورهٔ ۴۲ روزگی با تیمار ۱۵ و ۲۰ درصد بلوط، بیان ژن تریپسین نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت و میزان بیان برای هر دو تیمار به ترتیب ۰/۷۷ و ۱/۳ بود که به‌احتمال می‌تواند متأثر از سن باشد. با افزایش سن و توسعهٔ دستگاه گوارش، ممکن است دستگاه گوارش با تانن جیره سازگار شده یا توسعهٔ ریزگیاهان (میکروفلورای) دستگاه گوارش تأثیر تانن را مهار کنند یا مجموعهٔ تانن-پروتئین را تخریب کنند. برای مثال، گزارش شده که استفاده از جیرهٔ پایهٔ سورگوم (حاوی ۱ درصد تانن) در جوجهٔ گوشتی، با تأثیر بر گیاهان (فلور) روده منجر به تغییر درصد زیادی از لاکتوباسیلوس و درصد کمتری از

Archive of SID

www.SID.ir

کلستریدیوم در زوائد روده شد (Fagundes *et al*., 2017). نتایج یک بررسی نشان داد، با افزایش سن وزن نسبی پانکراس کاهش می‌یابد و به دنبال آن میزان ترشح تریپسین نیز کاهش می‌یابد (Mahmood, 1997). همچنین ممکن است تریپسین در بافت‌های غیر پانکراسی بیان شده باشد و بیان آن در پانکراس تغییری نکند (Koshikawa, 1998). نتایج این تحقیق نشان داد، در انسان به‌جز پانکراس، بیشترین بیان ژن تریپسین در طحال است. در موش ریه، طحال، کبد، پوست، کلیه، مغز، نای، معده، رودۀ کوچک و رودۀ بزرگ نیز فعالیت تریپسین را نشان دادند که در پانکراس، پوست، رودۀ کوچک، مری، معده، مایع مغزی، طحال و کلیه فعالیت تریپسین بالا بود (Koshikawa, 1998). به‌طورکلی تأثیر تانن تحت تأثیر عامل‌های متفاوتی مانند فراسنجه‌های مورد بررسی (افزایش وزن، مصرف خوراک و بازدۀ خوراک)، منبع و غلظت تانن، عامل‌های مربوط به حیوان (گونه، سن، سطح تولید) و تحت تأثیر ترکیب رژیم غذایی قرار می‌گیرد (Jansman, 1993) که نیاز به بررسی دارد.

نتایج بررسی همبستگی بین بیان ژن تریپسین و وزن نسبی پانکراس در سن ۴۲ روزگی پرورش در تیمارهای مختلف بین وزن نسبی پانکراس و بیان ژن تریپسین همبستگی معنی‌داری نشان داد ($P<0/01$). اگرچه در این بررسی، در این سن افزایش معنی‌داری برای بیان ژن تریپسین مشاهده نشد ولی این همبستگی می‌تواند مربوط به آنزیم‌های دیگر پانکراس از جمله آمیلاز، کیموتریپسین، لیپاز و کربوکسی پپتیدازها باشد. به‌طورکلی، تغذیۀ میزان زیاد تانن باعث افزایش اندازۀ پانکراس به دلیل افزایش اندازۀ یاخته‌های آن (پررشدی) در جوجه‌ها می‌شود که این افزایش اندازه در اثر فعالیت زیاد این اندام برای خنثی کردن تأثیر تانن از راه تولید بیشتر آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین و آمیلاز است، در نتیجه پانکراس دچار پررشدی می‌شود. در بررسی تأثیر جیرۀ حاوی تانن‌های گیاهی (به‌ویژه گالوتانن‌های قابل آبکافت یا هیدرولیز) را در سطوح ۱۳/۵، ۲۵ و ۵۰ گرم در کیلوگرم جیره را بر فعالیت آنزیم‌های پانکراس بررسی شد (Ahmed *et al*., 1991). نتایج نشان داد، با افزایش سطح تانن‌ها در جیره، وزن پانکراس بیشتر شد. همچنین فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و تریپسین پانکراس در پرندگان تغذیه‌شده با بالاترین سطح تانن در مقایسه با گروه شاهد دو برابر بالاتر بود. جلوگیری از فعالیت تریپسین در مجرای روده، همزمان با افزایش تانن جیره، افزایش یافت (Ahmed *et al*., 1991).

نتیجه‌گیری کلی

بر پایۀ داده‌های به‌دست‌آمده، این نخستین تحقیق درزمینۀ بیان ژن تریپسین در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با آرد میوۀ بلوط است. نتایج این پژوهش نشان داد، به‌رغم بیان بالای ژن تریپسین در سن ۲۱ روزگی با تیمار ۲۰ درصد بلوط، بیان این ژن در سن ۴۲ روزگی با تیمارهای ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوۀ بلوط تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. با توجه به تأثیر تانن بر پروتئین جیره و آنزیم‌های گوارشی، نتایج این بررسی نشان داد، میزان ۲۰ درصد آرد میوۀ بلوط می تواند تأثیر منفی بر عملکرد پانکراس داشته باشد ولی با افزایش سن و سازگاری دستگاه گوارش به تانن جیره، این تأثیر ناچیز می‌شود ولی به‌هرحال تانن جیره منجر به افزایش وزن پانکراس می‌شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه یاسوج به خاطر پشتیبانی مالی و نیز کارشناس آزمایشگاه مرکزی دانشکدۀ کشاورزی سرکار خانم مهندس حاجی‌زاده برای کمک به انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abdulla, J. Rose, S. P., Mackenzie, A. M., Mirza, W. & Pirgozlive, V. (2016). Exogenous tannase improves feeding value of a diet containing field beans (Vicia faba) when fed to broiler. *British Poultry Science*, 57(2), 246-250
2. Ahmed, A. E. (1991). *Anti-nutritional role of dietary tannins in the domestic Fowl (Gallus domesticus).* Ph.D. Thesis, University of Newcastle UponTyne, UK.

Archive of SID

www.SID.ir

3. Armstrong, W. D., Featbersbn W. R. & Rogler, J. C. (1974). Effects of bird resistant sorghum grain and various commercialtannins on chick performance. *Poultry Science*, 53, 2137-2142.
4. Fagundes, N. S., Pereira, R., Bortoluzzi, J., Rafael, J. M., Napty, G. S., Barbosa, J. G. M., Sciencia, M. C. M. & Menten, J. F. M. (2017). Replacing corn with sorghum in the di*et al*ters intestinal microbiota without altering chicken performance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, doi: 10.1111/jpn.12614.
5. Fernando, G., Carolina, V., Barillas-Mury, I. & Michael, A. (1995). Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the Mosquito (Aedes aegypti). *Insect Biochemistry Molecular of Biology*, 25(2), 241-246.
6. Ghaedi, L., Hooshmand, M., Parsaei, S. & Hojati, F. (2012). Effect of different processing methods on the performance of broiler chickens fed with acorn. *5th Congress of Animal Sciences*, 29-30 Aug, Isfahan University of technology, Isfahan, Ira. (in Farsi)
7. Houshmand, M., Kojati, F. & Parsaie, S. (2015). Dietary nutrient manipulation to improve the performance and tibia characteristics of broiler fed oak acorn (Quercus Brantii Lindl). *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, 17, 1.
8. Jansman, A. J. M. (1993). Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutrition Research Reviews*, 6, 209-236.
9. Jansman, A. J. M. (1993). Tannins in feedstuffs for simple stomached animals. *Nutrition Research Reviews*, 6, 209-236.
10. Kai, W., GAN, L., Lee, I. & Hood, L. (1995). Isolation and characterization of the chicken trypsinogen gene family. *Journal Biochemistry*, 307, 471-479.
11. Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Ozay, O. & Ozkose, E. (2005). Chemical composition and its relationship to in vitro gas production of several tannin containing trees and shrub leaves. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 18, 203-208.
12. Kekos, D. & Kaukios, B. (1985). Acid hydrolysate of acorn polysacharid as substrates of candida utilisis growth. *Biology of Technology*, 7, 345-348.
13. Keshavarzi, S. (2015). *Performance of broiler chickens fed diets containing oak corn (Quercus brantii lindl) at different production phases*. M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Yasouj University, Yasouj.
14. Koshikawa, N., Hasegawa, S., Nagashima, Y., Mitsuhashi, K., Tsubota, Y., Miyata, S., Miyagi, Y., Yasumitsu, H. & Miyazaki, K. (1998). Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes and neurons in human and Mouse. *American Journal Pathology*, 153, 3.
15. Lemos, J. A., Anthonyon, J. & Marcelo, T. (1996). Trypsin and aminopeptidase gene expression is affected by age and food composition in Anopheles gambiae. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 26(7), 651-658.
16. Mahmood, S. & Smithard, R. (1993). A comparison of effects of body weight and feed intake on digestion in broiler cockerels with effects of tannins. *British Journal Nutrition*, 70, 701-709.
17. Mahmood, S., Ajmal Khan, M., Sarwar, M. & Nisa, M. (2008). Use of chemical treatments to reduce antinutritional effects of tannins in salseed meal: Effect on performance and digestive enzymes of broilers. *Livestock Science*, 116, 162-170.
18. Mahmood, S., Khan, M. A., Sarwar, M. & Nisa, M. (2006). Chemical treatments to reduce antinutritional factors in salseed (Shorea robusta) Meal: Effect on nutrient digestibility in colostomized pullets and intact broilers. *Poultry Science*, 85, 2207-2215.
19. Mahmood, S., Khan, M. A., Sarwar, M., Nisa, M., Lee, W. S., Kim, S. B., Hur, T. Y., Lee, H. J. & Kim, H. S. (2007). Use of chemical treatments to reduce tannins and trypsin inhibitor contents in salseed (Shorea robusta) meal. *Asian-Ausrtalasian Journal of Animal Science*, 9, 1462-1467.
20. Mahmood, S., Smithard, R. & Sarwar, M. (1997). Effects of Salseed (Shorea robustal) tannins restricted feed intake and age on relative pancreas weight and activity of digestive enzymes in male broilers. *Animal Feed Science Technology*, 65, 215-230.
21. Marija, M., Vesna, P. M., Larisa, I., Milena, V., Dajana, T., Vera, N. & Jelica, L. (2013). Effects of tannic acid on trypsin and leucine aminopeptidase activities in Gypsy moth larval midgut. *Archives of Biological Sciences*, 65(4), 1405-1413.
22. Mariscal-Landin, G., Avellaneda, J. H., Reis de Souza, T. C., Aguilera, A., Borbolla, G. A. & Mar, B. (2004). Effect of tannins in Sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. *Animal feed Science Tecnology*, 117, 245-264.
23. Moazeni, S. M., Mohammadabadi, M. R., Sadeghi, M., Moradi Shahrbabak, H. & Esmailizadeh A. K. (2016a). Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. Journal of Livestock Science and Technologies, 4 (2), 51-56.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Moazeni, S. M., Mohammadabadi, M. R., Sadeghi, M., Moradi Shahrbabak, H., Esmailizadeh, A. K. & Bordbar, F. (2016b). Association between UCP gene polymorphisms and growth, breeding value of growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Open Journal of Animal Sciences*, 6, 1-8.
25. Mohammadifar, A., Imani, S.A., Mohammadabadi, M. R. & Soflaei, M. (2013). The effect of TGFB3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 5(4), 125-36.
26. Mohammadabadi, M. R., Nikbakhti, M., Mirzaee, H. R., Shandi, A., Saghi, D. A., Romanov, M. N. & Moiseyeva, I. G. (2010). Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 46 (4), 505-509.
27. Rostagno, H. S., Feptberston, W. R. &. Rogkr, J. C. (1973). Studies on the nutritional value of sorghum grains with varying tannin contents for chicks: Growth studies. *Poultry Science*, 52,765-772.
28. Santos-Bulga, C. & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *FAO Journal Science*, 80, 1094-1117.
29. Short, H. L. (1976). Composition and squirrel use of acorns of black and white oak groups. *Journal of Wildlife Management*, 40,479-483.
30. Stratowa, C. H. & Rutter, W. J. (1986). Selective regulation of trypsin gene expression by calcium and by glucose starvation in a rat exocrine pancreas cell line. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences of the United States of America Proc*. 83, 4292-4296.
31. Varmqany, S., Jafari, H., Gharedaghi, A. A. & yaghoobfar, A. (2004). The use of the fruit of the oak tannin in the diet of broiler chickens. Of Animal Husbandry and Aquaculture. *Journal of Research and Builders*, 70, 51-58.
32. Wen, C., Wang, L. C., Zhou, Y. M., Jiang Z. Y. & Wang, T. (2012). Effect of enzyme preparation on egg production, nutrient retention, digestive enzyme activities and pancreatic enzyme messenger RNA expression of late-phase laying hens. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 180-186.
33. Yang, F., Lei, X., Rodriguez-Palacios, A., Tang, C. & Yue, H. (2013). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in chicken embryo fibroblasts infected with avian leukosis virus subgroup. *BMC Research Notes*, 6(1), 1.

Archive of SID

www.SID.ir