تولیدات دامی
دوره ۲۳ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۰
صفحه‌های ۳۳۳-۳۲۳
DOI: 10.22059/jap.2021.311885.623566

مقاله پژوهشی

تأثیر کربوهیدرات‌های دیواره سلولی خوراک بر عملکرد رشد و بیان ژن‌های درگیر در انتقال مواد مغذی و تولید موسین در روده باریک جوجه‌های گوشتی

اکبر یعقوب‌فر[1*]، رضوان یعقوب‌فر[2]، احسان زارع بنادکوکی[3]
۱. استاد، مؤسسهٔ تحقیقات علوم دامی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲. دانشجوی دکتری، گروه سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.
۳. دانشجوی دکتری، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۷/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۲/۰۱

چکیده

این آزمایش به‌منظور بررسی اثرات کربوهیدرات‌های دیواره سلولی جیره‌های غذایی مکمل‌شده با آنزیم بر عملکرد و بیان ژن‌های مؤثر در انتقال گلوکز (*GLUT2 SGLT1*)، پپتیدها (*PepT1*) و تولید موسین (*MUC2*) در روده باریک جوجه گوشتی انجام شد. در این مطالعه تعداد ۱۱۰۰ قطعه جوجه یک‌روزه مخلوط (جنس نر و ماده)، از سویه تجاری راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۱ تیمار و پنج تکرار (۲۰ پرنده در هر تکرار) به‌مدت ٤٢ روز استفاده شد. جیره‌های آزمایشی به‌ترتیب شامل جیره شاهد، جیره‌های حاوی گندم، جو، سبوس گندم، سبوس برنج و جو بدون پوشینه با و بدون آنزیم بودند. نتایج نشان داد که اثر جیره‌های غذایی حاوی گندم، جو و جو بدون پوشینه با آنزیم بر وزن زنده کل جوجه‌های گوشتی در سن ٤٢ روزگی دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). کربوهیدرات‌های دیواره سلولی گندم، سبوس گندم و سبوس برنج در جیره‌های غذایی باعث افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز لوزالمعده (جو ۳/۰۲، گندم ۵/۹۹ واحد به‌ازای میلی‌گرم پروتئین بافت روده باریک) شدند (P<۰/۰۵). بیان ژن‌های *SGLT1* و *MUC2* مورد مطالعه در پرندگانی که جیره‌های بدون آنزیم دریافت کردند بیش‌تر از پرندگانی بود که با جیره شاهد تغذیه شدند (P<۰/۰۵). بیان ژن‌های مذکور تنها در پرندگانی که جیره‌های حاوی سبوس گندم و سبوس برنج مکمل‌شده با آنزیم دریافت کردند بیش‌تر از پرندگان شاهد بود (P<۰/۰۵). مکمل‌سازی جیره‌های غذایی حاوی کربوهیدرات‌های دیواره سلولی با آنزیم بر بیان ژن‌های انتقال گلوکز (*SGLT1* و *GLUT2*)، انتقال پپتید (*PepT1*) و تولید موسین (*MUC2*) در ژژنوم روده باریک تأثیرگذار است.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، جوجه‌گوشتی، جیره غذایی، فعالیت آنزیمی، کربوهیدرات دیواره سلولی.

The effect of feed cell wall carbohydrates on the expression of nutrient transport genes and mucin production in the small intestine of broilers

Akbar Yaghobfar1*, Rezvan Yaghoubfar[2], Ehsan Zare Banadkoki[3]
1. Professor, Animal Science Research Institute, Agricultural Research, Education, and Extension Organization, Karaj, Iran.
2. Ph.D. Candidate, Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3. Ph.D. Candidate, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
Received: October 14, 2020 Accepted: February 19, 2021

Abstract
The experiment was conducted to investigate the effects of cell wall carbohydrates with diet supplemented enzyme on the function and expression of glucose transporter genes (SGLT1 and GLUT2), peptide transporter (PepT1) and mucin production (MUC2) in the small intestine of broilers. In this study, 1100 mixeddayold chickens (male and female), Ross 308 were used based on a completely randomized design with 11 treatments and five replications (20 birds per replication) for 42 days. Experimental diets included control diets, diets containing wheat, barley, wheat bran, rice bran, and hull less barley with and without enzymes, respectively. The results showed that the effect of diets containing wheat, barley and hull less barley with enzyme on the total live weight of broiler chickens at 42 days of age was significantly different (P <0.05).Cell wall carbohydrates of wheat, wheat bran and rice bran in diets increased pancreatic amylase activity (barley 3.02, wheat 5.99 U/mg CP of small intestinal tissue) (P < 0.05). The expression of the studied SGLT1 and MUC2 genes in the experimental diets without enzyme showed a significant increase compared to enzymes supplemented diet (P < 0.05). Also, among the groups of enzyme-supplemented diets, only wheat and rice bran groups were able to increase the expression of SGLT1, MUC2 and GLUT2 genes compared to the control group (P <0.05). In conclusion, supplementation of diets containing cell wall carbohydrates with enzyme affects the expression of glucose transport genes (SGLT1 and GLUT2), peptide transport (PepT1) and mucin production (MUC2) in the small intestine jejunum. This indicates the optimal function of the digestive system of broilers in terms of digestion and absorption of nutrients.

Keywords: Broilers, Cell wall carbohydrates, Diets, Enzyme activity, Gene expression.

* نویسنده مسئول
Email: yaghobfar@areeo.ac.ir

مقدمه

مواد مغذی از عوامل کلیدی کنترل بیان ژن و رونویسی به حساب می‌آیند [۲۰]. استفاده از فناوری ریزآرایی DNA امکان درک چگونگی اثر تغذیه بر تعدیل بیان ژن و ارتباط آن با سلامت و عملکرد حیوانات را فراهم می‌نماید. مطالعه نوتری‌ژنومیکس همانند سایر زمینه‌ها در صنعت طیور از اهمیت فراوانی برخوردار است، ازآنجایی‌که نوتری‌ژنومیکس علم مطالعه چگونگی تأثیر مواد مغذی خوراکی بر بیان ژن می‌باشد، می‌تواند به‌عنوان ابزاری جدید در زمینه تحقیقات تغذیه‌ای دستگاه گوارشی طیور جهت رفع مشکلات مربوط به سلامت و تولید در پرندگان مورداستفاده گیرد. یکی از مهم‌ترین راه‌کارهای نوتری‌ژنومیکس، افزایش راندمان استفاده از جیره‌غذایی طیور می‌باشد و می‌توان از این طریق به تحقیقات نوتری‌ژنومیکس امیدوار بود [۱۰ و ۱۷]. این فناوری‌های مولکولی ارزیابی سریع استراتژی‌های تغذیه‌ای را نیز امکان‌پذیر می‌سازند.

در مورد تأثیر جیره‌های غذایی بر بیان ژن‌های مرتبط با صفات تولیدی و تولیدمثل طیور اطلاعات بسیار کمی وجود دارد و با درک اهمیت و شناسایی ارتباط بین مواد مغذی خاص و تنظیم بیان ژن می‌توان یک استراتژی مهم را آغاز کرد [۱۲]. افزایش سطح کربوهیدرات‌های دیواره سلولی جیره‌ها سبب کاهش کارایی هضم و عملکرد تولیدی پرندگان می‌شود [۳]. این آثار به‌دلیل وجود ترکیبات ضدمغذی نظیر پنتوزان (آرابینوزایلان) در گندم و بتاگلوکان در جو به همراه فیبر و اسید فایتیک است [۱۹ و ۵]. افزایش ترکیبات فوق در جیره‌ها علاوه بر تغییر ویژگی‌های فیزیولوژیک و فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش [٦ و ۲۱]، بر ظرفیت جذب و انتقال مواد مغذی [۸] و بیان ژن‌های انتقال مواد مغذی از روده تأثیر مستقیم می‌گذارد. بهبود فرایند هضم و جذب مواد مغذی ناشی از خوراک با میزان هضم بیش‌تر می‌تواند، همراه با توسعه فرایندهای جذبی و افزایش بیان ژن‌های انتقال‌دهنده مواد مغذی در روده مؤثر باشند [۷].

تغییرات فیزیکوشیمیایی محیط روده، تغییرات ساختاری بافت پوششی و وجود متابولیت‌های جدید در این محیط، بر کمیت و کیفیت بیان ژن‌های مؤثر در انتقال مواد مغذی ازجمله گلوکز [٤]، اسیدهای آمینه، پپتیدها [۲۲ و ۷] تأثیر می‌گذارد. پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای محلول به میزان زیادی با گلایکوکالیکس که در غشای سلولی روده می‌باشد، منجر به ایجاد ضخامت بیش‌تر در لایه مجاور موکوس پوششی روده شده که به میزان زیادی از جذب مواد مغذی در دیواره پوششی روده می‌کاهد. ترشح موکوس روده، تغییرات زیادی در تنظیمات هورمونی روده به‌دلیل تغییر در میزان جذب مواد مغذی از روده باریک ایجاد می‌کند. ژن‌های مؤثر در تولید موسین به‌عنوان ماده اصلی ساخت موکوس پوششی بافت روده تأثیر مستقیم دارند [۱۵]. گزارش شده است که الیگوساکارید مانان در جیره‌های غذایی جوجه‌های گوشتی بیان موسین به‌عنوان یک جز مهم در سد محافظ مخاطی روده، را افزایش می‌دهد [۲۰]. در بررسی تطبیقی پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته منابع متفاوت غلات در بیان ژن‌های انتقال مواد مغذی در روده باریک جوجه‌های گوشتی گزارش‌های محدودی وجود دارد. هدف از انجام این مطالعه مقایسه اثر جیره‌های غذایی با منابع مختلف کربوهیدرات‌های دیواره سلولی مکمل‌شده با آنزیم، بر بیان ژن‌های انتقال‌دهنده مواد مغذی و تولید موسین در ژژنوم جوجه‌های گوشتی بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۱ تیمار و پنج تکرار (۲۰ پرنده در هر تکرار) با استفاده از ۱۱۰۰ قطعه جوجه یک روزه مخلوط دو جنس به‌مدت ٤۲ روز اجرا شد. قبل از شروع آزمایش، ترکیبات کربوهیدرات‌های دیواره سلولی مواد خوراکی استفاده شده، با استفاده از کیت

آزمایشگاهی مگازیم (Megazyme) اندازه‌گیری شد (جدول ۱). جیره‌های آزمایشی براساس دفترچه راهنما نیازمندی سویه راس ۳۰۸ برای دوره پایانی (۲۴-۴۲ روزگی) تنظیم شد. جیره‌های آزمایشی شامل جیره شاهد (بدون مواد آزمایشی)، جیره حاوی گندم (واریته پیشتاز) با و بدون آنزیم، جیره حاوی جو (واریته کارون) با و بدون آنزیم، جیره حاوی سبوس گندم (کارخانجات آرد شهرستان کرج) با و بدون آنزیم، جیره حاوی سبوس برنج (رامسر مازندران) با و بدون آنزیم، جیره حاوی جوبدون پوشینه (لاین‌های امیدبخش) با و بدون آنزیم بودند (جدول ۲). آنزیم تجاری به میزان ۰/۱ درصد به جیره‌های آزمایشی اضافه شد. به‌ازای هر گرم آنزیم دارای ۱۰۰۰ واحد فعال فیتاز و ۱۸۰ واحد فعال مولتی گلایکاناز بود. وزن زنده و مصرف خوراک در در پایان دوره (۴۲ روزگی) اندازه‌گیری و افزایش وزن و ضریب تبدیل محاسبه شد. پس از پایان دوره پرورش از هر واحد آزمایشی سه قطعه جوجه به‌صورت تصادفی انتخاب و بعد از وزن‌کشی انفرادی کشتار شدند. به‌منظور اندازه‌گیری بیان ژن‌های انتقال گلوکز (*SGLT1* و *GLUT2*)، انتقال پپتید (*PepT1*) و تولید موسین (MUC2) قطعاتی به طول تقریبی ۳ سانتی‌متر از منطقه میانی بافت ژژنوم جوجه‌ها جداسازی شده و بعد از شست‌وشو با محلول ۰/۰۱ بافر فسفات با اسیدیته خنثی (pH=۷/۲) در داخل ورقه‌های آلومینیومی استریل بسته‌بندی و ابتدا درون نیتروژن مایع قرار گرفت و سپس در انتهای کار به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد، اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آمیلاز (EC 3.2.1.1) و لیپاز (EC 3.1.1.3) لوزالمعده، یک گرم از بافت لوزالمعده پرندگان بعد از کشتار (سن ۴۲ روزگی از هر تکرار یک پرنده) برداشته و با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول بافر استاندارد با دو میلی‌مول محلول HEPES/KOH با pH حدود ۶/۵ کاملاً هموژنیزه و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۲۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول به‌دست‌آمده از قسمت بالای لوله جدا و با استفاده از کیت‌های اختصاصی ساخت شرکت‌های پارس آزمون (TS.M.91.4.5، ایران) و زیست‌شیمی (TI.889-64604، ایران) به‌ترتیب فعالیت آمیلاز و لیپاز طبق راهنمای شرکت سازنده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-VIS spectrophotometer Cary 100, Varian Australia PTY Ltd., Australia) اندازه‌گیری شد. آمیلاز در طول موج ۵۸۰ نانومتر، لیپاز در طول موج ۵۷۸ نانومتر و نمونه پروتئین کل در طول موج ۵۴۶ نانومتر قرائت شدند. برای تعیین غلظت آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز سرم نیز از کیت‌های اختصاصی یاد شده و روش مشابه استفاده شد [۲۵].

جدول ۱. ترکیبات کربوهیدرات‌های دیواره سلولی مواد خوراکی مورداستفاده در آزمایش (درصد)

ماده خوراکی	کربوهیدرات کل*	سلولز	همی‌سلولز	کل فیبر جیره	کل فیبر جیره محلول	کل فیبر جیره نامحلول	پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته	کربوهیدرات‌های غیرفیبری
گندم	۷۷/۷۳	۱/۸۰	۱۰/۴۰	۱۷/۲۲	۱/۰۱	۱۶/۲۱	۱۸/۸۰	۶۹/۲۰
جو	۸۵/۲۸	۴/۴۰	۲۳/۶۲	۳۰/۷۲	۴/۴۵	۲۵/۷۲	۳۵/۱۷	۵۵/۰۸
جو بدون پوشینه	۷۶/۸۲	-	-	۱۸/۶	۲/۸۰	۱۰/۵۲	۱۸/۶۹	۶۳/۰۳
سبوس گندم	۸۲/۴۰	۹/۶۰	۳۱/۶۰	۳۷/۴۰	۲/۹۰	۳۵/۹۰	۴۴/۹۰	۳۲/۵۳
سبوس برنج	۶۹/۳۸	۳۳/۶۰	۲۱/۸۰	۲۵/۵۰	۰/۵۰	۲۱/۳۰	۳۵/۰۷	۲/۷۸

کربوهیدرات‌های غیرفیبری = ۱۰۰ - (پروتئین + عصاره اتری + فیبرنامحلول در شوینده خنثی + خاکستر)

*** کل کربوهیدرات = ۱۰۰ - (پروتئین + عصاره اتری + رطوبت + خاکستر)**

جدول ۲. مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی (۲۵-۴۲ روزگی)

مواد مغذی (درصد)	شاهد	گندم	جو	سبوس‌گندم	سبوس برنج	جو بدون‌پوشینه
ذرت	۵۹/۵٤	٤۲/۵۰	٤۲/٤۱	٤۳/۸	٤٤/۸۰	٤۷/۷٤
سویا	۳۳/۲۷	۳۰/۵	۳۰/۲۷	۲٦/۲	۲٦/۵	۲۵/۱
روغن سویا	۲/۹	۲/۸۵	۳/٤۷	٦	۵/۵٤	٤
گندم	–	۲۰	–	–	–	–
جو	–	–	۲۰	–	–	-
سبوس گندم	–	–	–	۲۰	–	-
سبوس برنج	–	–	–	–	۲۰	-
جو بدون پوشینه	–	–	–	–	–	۲۰
دی کلسیم فسفات	۱/۸٤	۱/۷٤	۱/۷۱	۱/٦۷	۱/۰۰	۱/۰۰
کربنات کلسیم	۱/۱۳	۱/۱٤	۱/۱۳	۱/۲	۱/۱٤	۱/۱٤
کلرید سدیم	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۳
کربنات پتاسیم	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۱	–	۰/۱۲	۰/۱۲
دی ال- متیونین	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۵	۰/۲۳	۰/۰۸	۰/۰۸
ال- لیزین HCl	۰/۱۵	۰/۱	۰/۰۵	۰/۱	۰/۰۲	۰/۰۲
پیش مخلوط ویتامینی*	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
پیش مخلوط معدنی*	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
جمع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
مواد مغذی محاسبه‌شده						
انرژی متابولیسمی (کیلوکالری بر کیلوگرم)	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۲۹۵۰
پروتئین (درصد)	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
متیونین + سیستین (درصد)	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۸٤	۰/۸٤	۰/۸۵	۰/۸۵
لیزین (درصد)	۱/۲	۱/۱۹	۱/۱۱	۱/۱۸	۱/۱۹	۱/۱۹
کلسیم (درصد)	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۸۷	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۹۵
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/٤۵	۰/٤۲	۰/٤۳	۰/٤۳	۰/٤۲	۰/٤۲
سدیم (درصد)	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵
کلر (درصد)	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۲۳
پتاسیم (درصد)	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸٤	۰/۸۷	۰/۸۷
پلی‌ساکارید غیر نشاسته (درصد)	–	۲۲/۲۰	۲۲/۸۲	۲٤/۰۵	۲۰/۵۸	۱۹/۳۳

*** مکمل مورد استفاده در ترکیب جیره‌ها در هرکیلوگرم، دارای مواد زیر بوده است: ویتامین‌ها شامل ٤٤۰۰۰ واحد جهانی آ، ۷۲۰۰ واحد جهانی د- ۳، ٤٤۰ میلی‌گرم ای، ٤۰ میلی‌گرم ک، ۷۰ میلی‌گرم کوبالامین، ٦۵ میلی‌گرم تیامین، ۳۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۲۹۰ میلی‌گرم اسید پانتوتنیک، ۱۲۲۰ میلی‌گرم نیاسین، ٦۵ میلی‌گرم پیریدوکسین، ۲۲ میلی‌گرم بیوتین و ۲۷۰ میلی‌گرم کولین کلراید. مواد معدنی شامل (میلی‌گرم در کیلوگرم): ۹۹/۲۰۰ میلی‌گرم اکسید منگنز (MnO)، ۸۵ میلی‌گرم اکسید روی (ZnO)، ۵۰ میلی‌گرم سولفات آهن ($FeSo_4$)،۱۰ میلی‌گرم سولفات مس ($SuSo_4$)، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم (سدیم سلنیت)، ۱۳ میلی‌گرم ید (یدات کلسیم) و ۲۵۰ میلی‌گرم کلین کلراید.**

به‌منظور جداسازی RNA، بافت ژژنوم روده هموژنیزه شد و RNA با استفاده از کیت اختصاصی تخلیص Gene Jet RNA purification kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) ساخت شرکت فرمنتاز مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. جهت سنتز cDNA از mRNA نمونه‌ها از کیت ReverseTranscription

QIAGEN, Exiqon, Vedbaek,) cDNA synthesis kit Denmark) استفاده شد. انجام واکنش‌های Real-Time PCR(qPCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای هر یک از ژن‌های موردنظر [۸] انجام شد (جدول ۳). به‌منظور تعیین کارایی واکنش qPCR، رقت‌های سریال تهیه‌شده از نمونه cDNA وارد واکنش qPCR شدند. اندازگیری کمی مقدار mRNA هر نمونه (تعیین سطح بیان ژن) از طریق مقایسه منحنی‌های حاصله با منحنی استاندارد حاصل از یک ژن house keeping مانند بتااکتین صورت گرفت. در ادامه، منحنی‌های چرخه‌های به‌دست‌آمده حاصل از واکنش qPCR در گروه‌های آزمایشی انجام گرفت و بازده تکثیر مقایسه شد. انجام واکنش‌های qPCR با کمک دستگاه PCR (eppendorf) انجام شد، درون هر چاهک مخلوطی به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر متشکل از یک میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر آغازگر جلویی (Forward Primer)، یک میکرولیتر آغازگر برگشتی (Revers Primer) اختصاصی هر ژن، هفت میکرولیتر آب DEPC و ۱۰ میکرولیتر Quanti FastTM SYBR Qiagen, Exiqon, Vedbaek,) Denmark) تهیه شد. هر واکنش با سه تکرار انجام شد.

داده‌های حاصل از بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel و فرمول محاسباتی استاندارد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (رابطه ۱) و β-actin به‌عنوان گروه کنترل داخلی تجزیه شدند [۱۳].

رابطه ۱)
$$\Delta\Delta Ct = (Ct\ mean\ target\ gene - Ct\ mean\ ß.Actin) - (Ct\ mean\ control\ gene - Ct\ mean\ ß.Actin)$$

آستانه چرخه (CT) با استفاده از GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc., CA, United States) تجزیه و تحلیل شد. جهت بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون شاپیرو- ویلک استفاده شد. با توجه به این‌که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار بودند تفاوت در میزان بیان ژن‌های موردنظر با استفاده از آزمون t مقایسه شد. داده‌های مربوط به عملکرد با استفاده از نرم‌افزارآماری SAS (نسخه ۹/۱) با رویه مدل خطی عمومی برای مدل (۲) تجزیه و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

رابطه ۲) $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$

که در این رابطه، μ، میانگین مشاهدات؛ Ti، اثر تیمار (داده مربوط به iامین تیمار)؛ e_{ij}، اثر اشتباه آزمایشی (jامین مقدار اشتباه از iامین) است.

نتایج و بحث

اثر تیمارهای آزمایشی بر صفات عملکردی در جدول (٤) نشان داده شده است. بیش‌ترین افزایش وزن روزانه مربوط به جیره‌های غذایی حاوی گندم، جو و جو بدون پوشینه با آنزیم نسبت به جیره غذایی شاهد و بدون آنزیم بود (P<۰/۰۵). سبوس برنج با و بدون آنزیم کم‌ترین افزایش وزن بدن و بیش‌ترین ضریب تبدیل خوراک را نشان داد (P<۰/۰۵). جیره‌های غذایی مکمل‌شده با آنزیم تأثیر معنی‌داری بر عملکرد پرندگان از لحاظ افزایش وزن بدن داشت (P<۰/۰۵). این اثرات به‌دلیل آنزیم فیتاز و شکسته‌شدن پیوندهای عرضی بین واحدهای تشکیل‌دهنده زنجیره‌های آرابینوزایلان و بتا گلوکان در مواد آزمایشی و بازشدن باندهای کمپلکس فیتات در ساختار این اقلام بود.

جدول ۳. مشخصات ژن‌ها و پرایمرهای مورداستفاده

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Product length
PepT1	ACTGTCAATCCAATCCTG	GACAGTCACGTTCTGAAGA	282
SGLT1	CATCTTCCGAGATGCTGTCA	CAGGTATCCGCACATCACAC	169
GLUT2	CCGCAGAAGGTGATAGAAGC	ACACAGTGGGGTCCTCAAAG	181
MUC2	TCACCCTGCATGGATACTTGCTCA	TGTCCATCTGCCTGAATCACAGGT	228
β-Actin	CTGTGTTCCCATCTATCGT	TCTTCTCTCTGTTGGCTTTG	270

جدول ٤. تأثیر منابع مختلف کربوهیدرات‌های دیواره سلولی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی درکل دوره پرورش (یک تا ٤٢ روزگی)

تیمار/ صفت	خوراک مصرفی روزانه (گرم)[1]	افزایش وزن روزانه (گرم)	ضریب تبدیل غذایی
شاهد	۹۲/۷^{b}	۵۲/۵^{a}	۱/٦۵ ^{b}
گندم	۸۷/٦^{c}	٤٦/۹^{c}	۱/٦۹ ^{b}
گندم + آنزیم	۹۲/۱^{b}	٤۹/٤^{ab}	۱/۷۰ ^{b}
جو	۹۳/۸^{ab}	٤۹/۱^{b}	۱/۷۱ ^{b}
جو + آنزیم	۹۵/۱^{a}	۵۱/۳^{a}	۱/٦٤ ^{b}
سبوس گندم	۹۳/٦^{ab}	٤۳/۷^{c}	۱/۹۱ ^{b}
سبوس گندم + آنزیم	۹۲/۹^{ab}	٤۹/۱^{b}	۱/۷۲ ^{b}
سبوس برنج	۱۰۲/۵ ^{ab}	۳۷/۵^{d}	۲/۷٤^{a}
سبوس برنج + آنزیم	۹۸/۸ ^{ab}	۳۸/۵^{d}	۲/۵۵^{a}
جو بدون پوشینه	۱۰۵/۳۸^{a}	٤۹/۰۳^{b}	۲/٤۰^{a}
جو بدون پوشینه+ آنزیم	۹۷/٤۵^{b}	۵۱/۵۷ ^{ab}	۲/۰۸^{b}
SEM	۱/۱۳	۱/۰۳	۰/۰۸
p-value	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱

a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

به همین دلیل انرژی آزاد افزایش‌یافته، مواد مغذی (پروتئین، نشاسته و چربی) و مواد معدنی (کلسیم و فسفر) به میزان بیش‌تری قابل‌دسترس می‌شود و در فرایند جذب بهتر مورداستفاده قرار می‌گیرد و در نهایت رشد بیش‌تری حاصل می‌شود [۷ و ۲۲]. جیره غذایی طیور مکمل‌شده با آنزیم با شکستن باندهای هیدروژنی و کوالانسی پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته و با کاهش گران‌روی محتویات هضمی و آزادسازی مواد مغذی به‌دام افتاده سبب بهبود هضم و جذب مواد غذایی می‌شود. به همین علت سبب تسهیل عمل فیتاز روی کمپلکس‌های غیر قابل هضم فیتات می‌شود و آزادسازی و میزان جذب مواد مغذی را در این شرایط افزایش می‌دهد [۱، ۷ و ۲۲].

تیمارهای آزمایشی با منابع متفاوت (گندم، جو، جو بدون پوشینه، سبوس گندم و سبوس برنج) کربوهیدرات‌های دیواره سلولی مکمل‌شده با آنزیم، اختلاف معنی‌داری را بر فعالیت آنزیم آمیلاز لوزالمعده‌ای روده باریک جوجه‌های گوشتی داشت (P<۰/۰۵). ازآنجایی‌که آنزیم‌های دستگاه گوارش مسئول نهایی هضم اغلب مولکول‌ها و سوبستراها در روده هستند، بنابراین دارای یک نقش حیاتی در تنظیم مقدار مواد مغذی در دسترس برای جذب محسوب می‌شوند [۱۱]. فعالیت آنزیمی تحت تأثیر تنظیم جیره و شرایط تغذیه می‌باشد و به همین دلیل آنزیم‌ها روی ترکیبات ضدمغذی نظیر بتاگلوکان، پنتوزان‌ها و اسید فایتیک اثر بهبوددهنده خوبی را نشان می‌دهند [۱۱ و ۱٤]. مکمل‌سازی جیره‌های دارای غلات با آنزیم‌های با منشأ خارجی بر عملکرد و کارایی هضمی جیره و میزان ترشح آنزیم‌های با منشأ داخلی به‌دلیل اثرات دیواره سلولی پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته در دیواره بافت روده باریک از جمله آنزیم‌های مترشحه از روده و لوزالمعده اثرات متفاوتی را نشان می‌دهد [۲۳].

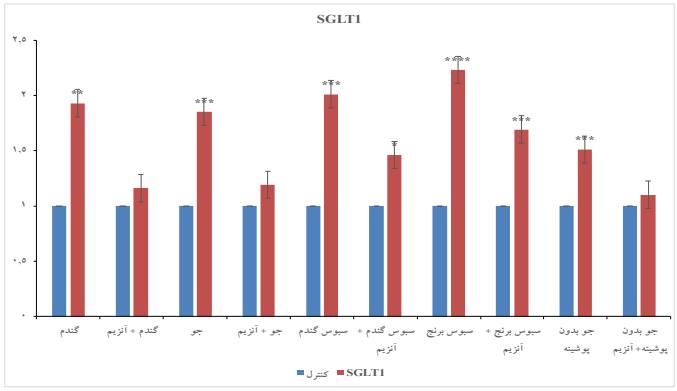
جدول ۵. تأثیر منابع مختلف کربوهیدرات‌های دیواره سلولی بر فعالیت آنزیمی لوزالمعده جوجه‌ها (واحد در میلی‌گرم پروتئین خام)

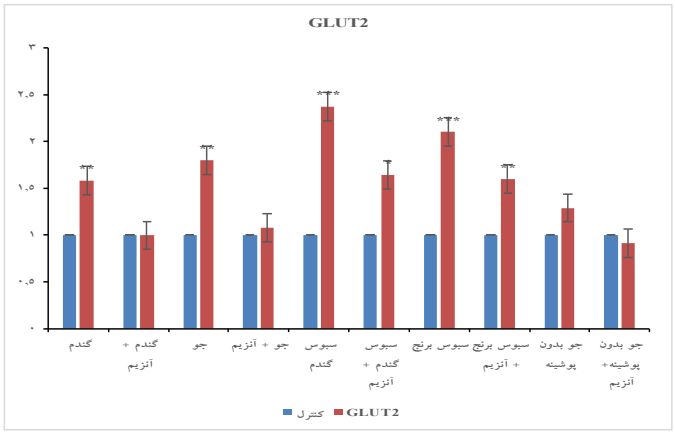
تیمار /صفت	آمیلاز	لیپاز
شاهد	۳/۹۸ cde	۱۵۸/٤۳
گندم	۵/۹۹ a	۱۹۰/۲۲
گندم + آنزیم	٤/٤۲ bcd	۱۳۵/۱۳
جو	۳/۰۲ ef	۸۸/۱۱
جو + آنزیم	۳/۲۹ def	۱٦٦/٤۸
سبوس گندم	٤/۸ abcd	۱۲٤/۹۱
سبوس گندم + آنزیم	٤/۹۹ abc	۱۹٦/۷۰
سبوس برنج	۵/۸۸ ab	۱۰۳/۱٦
سبوس برنج+ آنزیم	۵/۸۱ ab	۱۵۳/۷۲
جو بدون پوشینه	٤/۲٤ def	۱۷۰/۵۱
جو بدون پوشینه+ آنزیم	٤/۳٦ def	۱۷۳/۷۲
SEM	۰/۸۲	۷٤/۸۱
p-value	۰/۰۰۰۱	۰/٦۳

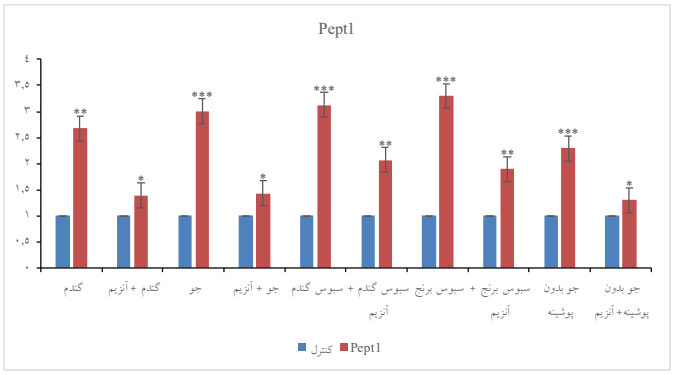
a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۰۵).

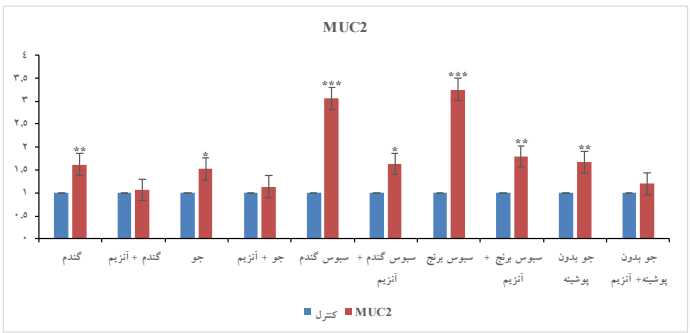
منابع کربوهیدرات‌های دیواره سلولی مانند گندم، جو، سبوس گندم، سبوس برنج و جو بدون پوشینه در جیره‌های غذایی باعث افزایش بیان ژن *SGLT1* و *MUC2* شدند. اما با مکمل‌کردن جیره‌ها با آنزیم، تنها در گروه‌های سبوس گندم و سبوس برنج این افزایش بیان مشاهده شد (P <۰/۰۵) (نمودار ۱). بیان ژن *GLUT2* تنها در گروه‌های گندم، جو، سبوس گندم، سبوس برنج افزایش یافت (P<۰/۰۵) و در گروه جو بدون پوشینه و گروه‌های مکمل‌شده با آنزیم اثر قابل‌توجهی بر بیان این ژن مشاهده نگردید (نمودار ۱). بیان ژن *PepT1* در تمامی گروه‌های آزمایشی افزایش یافته بود (نمودار ۱). هم‌چنین جیره‌های آزمایشی مکمل‌شده با آنزیم قادر به افزایش بیان ژن *PepT1* بودند (P<۰/۰۵). که حاکی از تأثیر مثبت مکمل‌سازی جیره‌ها با آنزیم در نحوه انتقال ماده مغذی مانند گلوکز از روده باریک جوجه‌ها می‌باشد. هم‌چنین در مورد بیان ژن *GLUT2* بیش‌ترین بیان این ژن مربوط به تیمار سبوس گندم (۲/۱۰) بود. در مورد ژن مؤثر در انتقال پپتید از روده باریک، بیش‌ترین بیان ژن *PepT1* با مقادیر ۳/۳۰، ۲/۸۳ و ۲/۸۲ به‌ترتیب مربوط به تیمارهای سبوس برنج، گندم و جو می‌باشد. همین‌طور کم‌ترین بیان ژن مربوط به گروه‌های مکمل‌شده با آنزیم بود [۲]. لازم به ذکر است مکمل‌سازی جیره‌های دارای سطوح بالای کربوهیدرات‌های دیواره سلولی با آنزیم نیز باعث افزایش معنی‌دار میانگین بیان ژن‌های شد، که حاکی از تأثیر مثبت این آنزیم‌ها در تعدیل انتقال پپتیدها از روده کوچک جوجه‌ها می‌باشد. به این ترتیب اضافه‌کردن گندم و جو و سبوس گندم به جیره‌های غذایی، امکان افزایش بیان ژن‌های مورد مطالعه وجود دارد و مکمل‌سازی این جیره‌های غذایی با آنزیم منجر به تعدیل و کاهش میانگین بیان ژن‌های مزبور شد.

حضور مقدار و ترکیب مناسب مواد مغذی در روده باریک برای توسعه بافت روده ضروری بوده و به‌عکس ازدیاد مواد ضدتغذیه‌ای باعث عدم توسعه بافت روده یا تغییر ویژگی‌های رشد و نمو آن می‌شود [۲٤]. افزایش سطح مصرف کربوهیدرات‌های غیر نشاسته‌ای با ساختار پرزهای روده در منطقه جذبی روده [۲۲ و ۱۰] ظرفیت جذب و انتقال مواد مغذی از سلول‌های انتروسایت روده [۱۰] و بیان ژن‌های انتقال مواد مغذی تأثیر مستقیم دارد [۱۰ و ٤]. تغییرات فیزیکوشیمیایی محیط روده به‌همراه تغییرات ساختاری بافت پوششی و وجود متابولیت‌های جدید در این محیط، همگی بر کمیت و کیفیت بیان ژن‌های مؤثر در انتقال مواد مغذی از جمله گلوکز، اسیدهای آمینه، پپتیدها و ژن‌های مؤثر در تولید موسین به‌عنوان ماده اصلی ساخت موکوس پوششی بافت روده مؤثر می‌باشند [٤، ٦، ۱۰ و ۲۲]. بهبود فرایند هضم و جذب و بهره‌وری مواد مغذی و تأثیر آن‌ها بر تغییر بیان ژن‌های مرتبط با انتقال مواد مغذی از سطح جذبی روده به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند. یکی از احتمالات بیان ژن انتقال‌دهنده مواد مغذی می‌باشد [۱۰].









نمودار ۱. مقایسه اثرات منابع مختلف کربوهیدرات‌های دیواره سلولی بر بیان ژن‌های مسئول انتقال مواد مغذی از روده کوچک جوجه‌ها.

(P <۰/۰۵)، ** (P <۰/۰۵) و * (P <۰/۰۵) از نظر آماری معنی‌دار تلقی می‌شوند).**

افزایش سطوح کربوهیدرات‌های دیواره سلولی باعث افزایش تراکم انتقال‌دهنده‌های مواد مغذی مانند گلوکز در غشاهای سلولی روده باریک شده و این افزایش به موازات افزایش سطوح mRNA مربوط به ژن *SGLT1* در این سلول‌ها می‌باشد [۱۸]. هم‌چنین این افزایش در مورد انتقال‌دهنده‌های پپتید و افزایش سطح mRNA مربوط به ژن *MUC2* گزارش شده است [۱۰و۱۷]. انتقال‌دهنده‌های اسیدهای آمینه و پپتیدها در روده جوجه‌ها تحت تأثیر عوامل مختلف نظیر انتخاب ژنتیکی، ترکیبات و میزان مصرف خوراک، نحوه رشد و نمو بافت روده، کیفیت و کمیت پروتئین جیره و سطح فیبر خوراک می‌باشد [۱۷ و ۹]. ترکیبات ضدمغذی نظیر کربوهیدرات‌های غیرنشاسته‌ای محلول در آب باعث تاخیر و اختلال رشد بافت روده و سنتز و ترشح موسین و در نهایت تغییر ساختار لایه موکوسی روده می‌شود [۱۸]. کربوهیدرات‌های قابل جذب در دوران اولیه رشد نقش به‌سزایی در توسعه طبیعی بافت روده، لایه موکوسی و عمل صحیح سلول‌های جذبی روده دارد [۲٤ و ۱٦]. تمامی اثرات ذکرشده به‌واسطه تنظیم بیان ژن انتقال‌دهنده‌های مواد مغذی از لومن روده، از خلال لایه موکوسی به سمت سلول‌های انتروسایت جدار پوششی در منطقه جذبی روده صورت می‌گیرد [۸ و ٤]. در این آزمایش جیره‌های دارای گندم، جو و سبوس برنج باعث افزایش بیان ژن *MUC2* شدند. ازآنجایی‌که جیره‌های غذایی دارای فیبر یا کربوهیدرات‌های دیواره سلولی بودند در نتیجه باعث افزایش دفع موسین ی‌شوند. که افزایش سطح مصرف اقلام خوراکی حاوی این مواد باعث افزایش بیان ژن مولد موسین و افزایش نرخ سنتز موسین شوند [۱۷]. هم‌چنین موسین در جدار پوششی روده نقش‌های حیاتی مهمی از جمله محافظت بافت روده در مقابل کیموس اسیدی معده و آنزیم‌های هضم‌کننده لوزالمعده، ایجاد سطح لغزنده برای تسهیل عبور مواد از جمله مواد خشبی و فیبری و تسهیل انتقال مواد مغذی به سمت سلول‌های جذبی روده را دارد. موسین به‌صورت دو لایه شل و سخت بوده که ترکیب و عمل آن‌ها متفاوت از هم بوده و لایه سخت دارای مکان‌های اتصالی غشایی برای جذب مواد می‌باشد [۱۷]. عوامل مختلف شامل مقدار و ترکیبات جیره‌های غذایی (فیتات، فیبر خوراکی و پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته)، کمبود اسیدهای آمینه قادر به تغییر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی موسین از جمله گران‌روی و یکپارچگی آن شده و در نهایت درجه سنتز و دفع آن را تغییر می‌دهند [۳ و ۱۵]. در این راستا نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که گروه تیمارهای گندم، جو، سبوس گندم، سبوس برنج مکمل‌شده با و بدون آنزیم، قادر به افزایش بیان ژن *MUC2* بودند. که با افزایش بیان این ژن مولد موسین سبب افزایش سنتز موسین می‌شوند و در فرایند حفظ شرایط پوششی روده تأثیرگذار می‌باشد. این مطالعه نشان داد که عملکرد دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی تحت تأثیر جیره‌های غذایی با منابع متفاوت پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی می‌باشد. چون در عملکرد دستگاه گوارش برای هضم و جذب مواد مغذی و بیان ژن‌های مرتبط با انتقال مواد مغذی و تولید موسین تأثیرگذار است.

تشکر و قدردانی

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور- معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری برای تأمین و حمایت مالی اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Brenes AM, Smith W G and Marquardt RR (1993_a) Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat and barley based diets. Poultry Science, 72: 1731-1739.
2. Chen H, Pan Y, Wong EA and Webb Jr KE (2005) Dietary protein level and stage of development effect expression of an intestine peptide transporter (cPepT1) in chickens. Journal of Nutrition, 135: 193-198.
3. Cowieson A, Acamovic T and Bedford M (2004) The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. British Poultry Science, 45(1): 101-108.
4. Ferraris RP (2001) Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. Biochemical Journal, 360(2): 265-276.
5. Finnie S, Bettge A and Morris C (2006) Influence of cultivar and environment on water soluble and water insoluble arabinoxylans in soft wheat. Cereal Chemistry, 83(6): 617-623.
6. Garcia M, Lazaro R, Latorre MA, Gracia MI and Mateos GG (2008) Influence of enzyme supplementation and heat processing of barley on digestive traits and productive performance of broilers. Poultry Science, 87: 940-948.
7. Gilbert E, Wong E and Webb K (2008) Board-invited review: peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. Journal of Animal Science, 86(9): 2135-2155.
8. Gilbert ER, Li H, Emerson DA, Webb Jr KE and Wong EA (2007) Development regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. Poultry Science, 86: 1739-1753.
9. Gilbert, E.R., H. Li, D.A, Emerson, K.E. Webb Jr, and Wong EA (2008) Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. Journal of Nutrition, 138: 262-271.
10. Gilbert ER, Li H, Emmerson DA, Webb Jr KE and Wong EA (2010) Dietary protein composition influences abundance of peptide and amino acid transporter messenger ribonucleic acid in the small intestine of 2 lines of broiler chicks. Poultry Science, 89: 1663-1676.
11. Iji P, Saki A and Tivey D (2001) Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2. Development and characteristics of intestinal enzymes. British Poultry Science, 42(4): 514-522.
12. Kies A, Van Hemert K and Sauer W (2001) Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilisation. World's Poultry Science Journal, 57(2): 109-126.
13. Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. Journal of Methods, 25: 402-408, Elsevier Science (USA).
14. Mirzaie S, Zaghari M, Aminzadeh S, Shivazad M and Mateos GG (2012) Effect of wheat inclusion and xylanase supplementation of the diet on productive performance, nutrient retention and endogenous intestinal enzyme activity of laying hens. Poultry Science, 91: 413-425.
15. Montagné L, Piel C and Lallès JP (2004) Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. Nutrition Reviews, 62(3): 105-114.
16. Moran Jr ET (2007) Nutrition of the developing embryo and hatchling. Poultry Science, 86(5): 1043-1049.
17. Mott CR, Siegel PB, Webb Jr KE and Wong EA (2008) Gene expression of transporters in the small intestine of chickens from lines divergently selected for high or low Junvenile body weight. Poultry Science, 87: 2215-2224.
18. Noy Y and Sklan D (1996) Uptake capacity in vitro for glucose and methionine and in situ for oleic acid in the proximal small intestine of posthatch chicks. Poultry Science, 75(8):998-1002.
19. Ravindran V, Selle P and Bryden W (1999) Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. Poultry Science, 78(11): 1588-1595.
20. Sales NMR, Peletgrini PB and Goersch MC (2014) Nutrigenomicd: definitions and advances of this new science. Journal of Nutrition and Metabolism. Volume 2014, Article ID 202759, 6 http://dx.doi.org/10.1155/2014/202759.
21. Silva S and Smithard R (2002) Effect of enzyme supplementation of a rye-based diet on xylanase activity in the small intestine of broilers, on intestinal crypt cell proliferation and on nutrient digestibility and growth performance of the birds. British Poultry Science, 43(2): 274-282.
22. Smirnov A, Sklan D and Uni Z (2004) Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. The Journal of Nnutrition, 134(4): 736-742.

23. Sun X, McElroy A, Novak C, Wong E, Remus J, Stevens A and Pierson W (2007) Effect of corn and enzyme supplementation on broiler performance, gastrointestinal enzymes activity, nutrient retention, intestinal mucin, and jejunal gene expression. Dissertation submitted to the Virginia Polytechnic Institute and state university in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Animal and Poultry Department of Virginia Polytechnic Institute and State University, November 19. Blacksburg, Virginia.
24. Tako E, Ferket P and Uni Z (2004) Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. Poultry Science, 83(12): 2023-2028.
25. Tanabe H, Sugiyama K, Matsuda T, Kiriyama S and Morita T (2005) Small intestine mucins are secreted in proportion to the setting volume in water if dietary indigestible components in rats. Journal of Nutrition, 135: 2431-2437.