

بررسی تأثیر جایگزینی کنجاله کلزا با کنجاله سویا بر جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه با استفاده از روش PCR رقابتی

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

تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۲۸

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱

چکیده

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

واژه‌های کلیدی: کنجاله کلزا، کنجاله سویا، قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه، PCR رقابتی

مقدمه

اکوسیستم میکروبی شکمبه با هضم مواد کم ارزش به لحاظ تغذیه‌ای همچون مواد فیبری و تبدیل آن به منابع مورد نیاز نشخوارکنندگان از قبیل اسیدهای چرب غیر فرار نقش مهمی را در تأمین نیازمندیهای تغذیه‌ای دام ایفا می‌کنند (۱۰). امروزه قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه به عنوان جزء مهمی از فلور میکروبی شکمبه شناخته شده اند (۱۸ و ۱۱). قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه با تشکیل کلونی بر روی مواد فیبری موجود در شکمبه و تولید آنزیم‌های هضم کننده باعث هضم این مواد در مدت زمان ماندگاری مواد غذائی

در این محیط خواهند شد (۳ و ۲). از زمان کشف این فلور میکروبی توسط ارپین در سال ۱۹۷۵ تحقیقات زیادی در ارتباط با تأثیر فاکتورهای خارجی همچون جیره، زمان غذا دهی و تناوب غذا دهی بر روی جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی انجام گرفته است (۶، ۷ و ۱۴). بررسی کمی جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه با استفاده از روش‌های کشت سنتی به خاطر سیکل زندگی منحصر به فرد این دسته از فلور میکروبی شکمبه که شامل دو فاز جدای متحرک (ژئوسپور) و فاز تشکیل کلونی بسیار مشکل و زمان بر و در بعضی موارد نیز غیر ممکن است (۱۲)، لذا روش‌هایی که بر مبنای کشت این فلور و شمارش ژئوسپور و کلونی آنها باشد به لحاظ کاربردی از اهمیت چندانی برخوردار نمی باشد (۷). امروزه با معرفی روش‌های مولکولی بر پایه توالی‌های

۱، ۲، ۳ و ۴- اعضاء هیأت علمی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

۵- دانشجوی دکتری ژنتیک گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

Email: Hadisekhavati@gmail.com

* نویسنده مسئول:

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

نمونه‌گیری از مایع شکمبه

این آزمایش در محل گاوداری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد با استفاده از ۶ رأس گاو شیری هلشتاین چند شکم زایش با میانگین وزن زنده (560 ± 4) کیلوگرم) انجام شد. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در یک دوره زمانی ۵۰ روزه شامل ۱۴ روز عادت پذیری و یک روز نمونه‌گیری در پایان مدت دوره اعمال تیمار انجام شد. تیمارها شامل ۱- جیره حاوی کنجاله سویا ۲- جیره حاوی کنجاله کلزا بودند. ترکیبات جیره در جدول ۱ نشان داده شده است. پس از گذشت مدت زمان ۵۰ روز از اعمال تیمار مقادیر ۲۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه از هر گاو در زمان ۶ ساعت پس از مصرف خوراک با استفاده از پمپ خلاء گرفته شد و به منظور استخراج DNA از هر نمونه، ۱ میلی‌لیتر مایع شکمبه به همراه ذرات غذایی به طور تصادفی انتخاب گردید (۱۶). نمونه‌ها سریعاً در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردیدند.

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

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

مواد و روش‌ها

کشت و خالص سازی قارچ‌های بی‌هوازی

به منظور کشت و خالص سازی قارچ‌های بی‌هوازی از

جدول ۱. محتویات جیره‌های اعمال شده

تیمار ۱	تیمار ۲	ماده خوراکی
۳۲	۳۲	جو
۱۷	۱۷	ذرت
۰	۲۴	کنجاله سویا
۲۷	۰	کنجاله کلزا
۸	۸	کنجاله تخم پنبه
۶/۵	۶/۵	تفاله مرکبات
۵	۸	سبوس
۳	۳	پودر چربی
۰/۴	۰/۴	آهک
۰/۸	۰/۸	مکمل معدنی و ویتامینی
۰/۳	۰/۳	نمک
۱۰۰	۱۰۰	جمع

۲/۵ میلی مول، dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرو مول، ۱ واحد بین المللی از آنزیم Taq و هشت میکرو لیتر آب دوبار تقطیر شده بود. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل ۲۰۰۰ شرکت Biometra استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: یک مرحله با دمای واسرشت اولیه 95°C به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ مرحله با دمای واسرشت 94°C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال 57°C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر 72°C به مدت یک دقیقه بود. صحت قطعه بدست آمده از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و نشانگر وزنی ۱۰۰ M با ولتاژ ۸۰ ولت (شکل ۲) به مدت ۲۰ دقیقه مورد تأیید قرار گرفت.

ساخت قطعه کنترل استاندارد

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

استخراج DNA و انجام واکنش PCR

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

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

حجم نهائی واکنش ۲۵ میکرو لیتر می‌باشد که شامل: یک میکرو لیتر DNA استخراج شده با غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم، سه میکرو لیتر مخلوط آغازگر با غلظت ۵ پیکامول بر میکرو لیتر، ۲/۵ میکرو لیتر بافر 10X، MgCl_2 با غلظت

آغازگر مورد استفاده برای ساخت قطعه کنترل استاندارد (LaGAF) در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

خالص سازی از روی ژل به وسیله کیت Diatom DNA Elution محصول شرکت Iso Gene مسکو به عنوان رقابتگر در واکنش PCR رقابتی مورد استفاده قرار گرفت. توالی

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده به منظور انجام واکنش PCR

گونه میکروبی

قارچ بی‌هوازی

فاز لامبدا

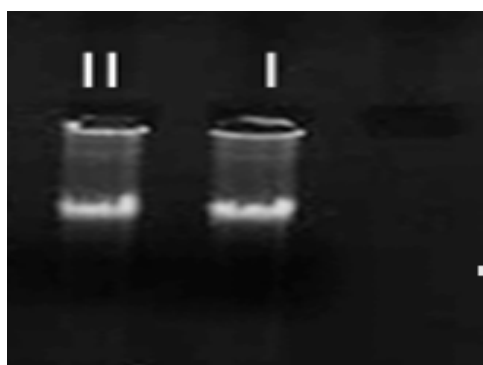
GAF1:5'-GAG GAA GTA AAA GTC GTA ACA AGG TTT C-3'
GAF2:5'-CAA ATT CAC AAA GGG TAGG ATG ATT T-3'

LaGAF1:5'- gag gaa gta aaa gtc gta aca agg ttt c GAA GTT CGC AGA ATC GTA TGT G-3'
LaGAF2:5'- caa att cac aaa ggg tag gat gat tt GCT GTG GAC ATA GTT AAT CCG-3'

قالب یک طرح کاملاً تصادفی به همراه آنالیز کواریانس انجام پذیرفت (۱۳ و ۱۶).

نتایج

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



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

اختصاصی (II)

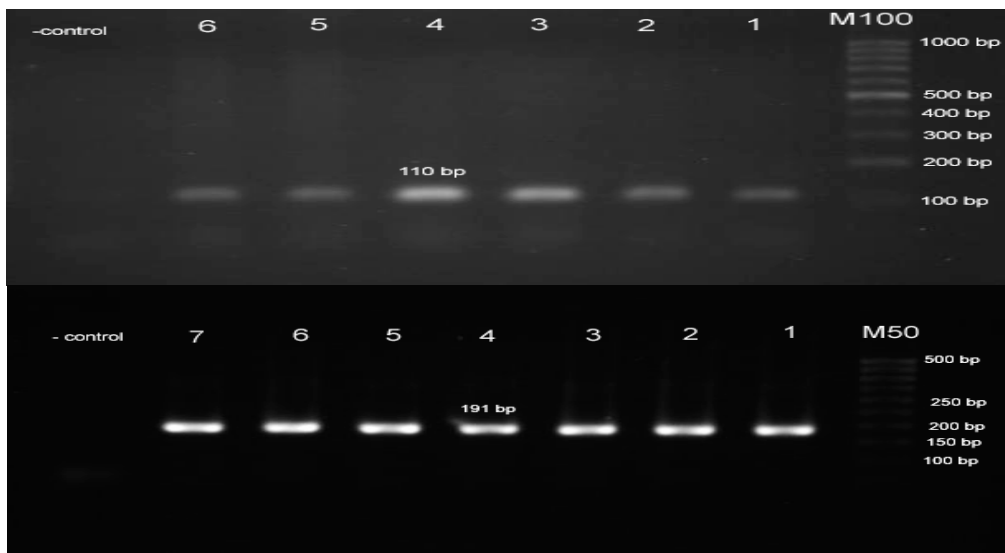
توالی رشته forward و reverse با توالی DNA فاز لامبدا از نوکلئوتید شماره ۴۶۷۰۷-۴۶۷۷۵ و ۴۶۸۱۹-۴۶۹۱۲ با شماره بانک اطلاعاتی بیوتکنولوژی^۱ (NC-1416) مکمل می‌باشد (۱۳). برای انجام PCR به منظور تکثیر قطعه کنترل استاندارد از دستگاه ترموسایکلر مدل ۲۰۰۰ شرکت Biometra استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل: یک مرحله با دمای واسرشت اولیه °C ۹۵ به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ مرحله با دمای واسرشت °C ۹۴ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال °C ۵۶ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر °C ۷۲ به مدت یک دقیقه و در انتها یک مرحله تکثیر نهایی با دمای °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه بود. صحت قطعه بدست آمده از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و نشانگر وزنی ۱۰۰ M با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲).

بررسی کمی نتایج PCR رقابتی

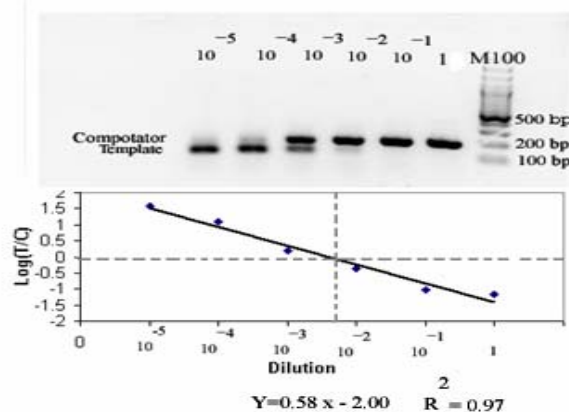
بررسی کمی محصولات PCR رقابتی به وسیله نرم افزار تحلیلگر تصویر Image J 1.38X انجام گرفت و داده‌های حاصل به وسیله نرم افزار SAS (۱۷) با روش GLM در

خالص قارچ بی‌هوازی (۵۵ نانوگرم بر میکرولیتر) با قطعه کنترل استاندارد در واکنش PCR دارای شیب خطی معادل ۰/۵۸ و ضریب تعیین (R^2) ۰/۹۷ بود که این امر نشان‌دهنده راندمان تکثیر یکسان در واکنش PCR رقابتی می‌باشد (شکل ۳).

برای اطمینان از یکسان بودن راندمان تکثیر دو قطعه کنترل استاندارد و قطعه الگو در واکنش PCR رقابتی، رابطه خطی داده‌های کمی حاصل از واکنش PCR رقابتی در نمونه کشت خالص مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). رابطه خطی در تکثیر همزمان قطعه الگو در نمونه DNA



شکل ۲. محصولات حاصل از PCR توالی 18S rDNA قارچهای بی‌هوازی شکمبه (قطعه ۱۱۰ جفت‌بازی) و توالی فاژ لامبدا (۱۹۱ جفت‌بازی).



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

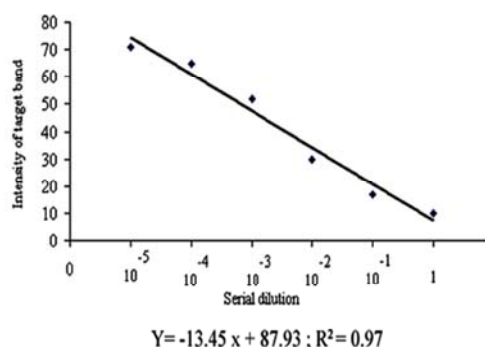
معنی داری الگوی درجه اول و درجه سوم را در سطح معنی داری ۵ درصد نشان داد (جدول ۳).

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

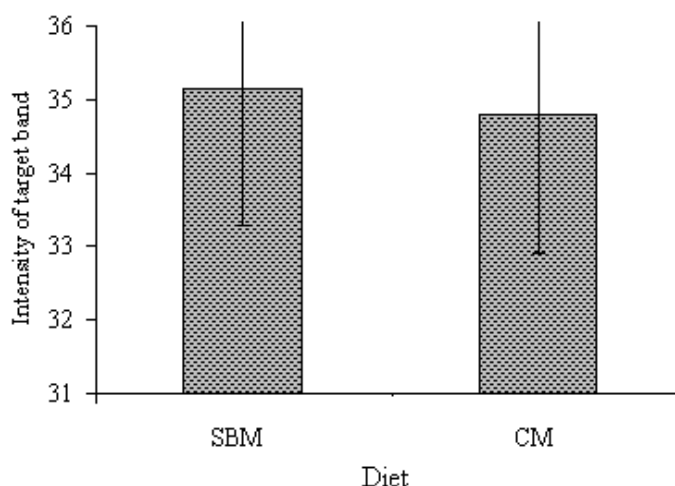
جدول ۳. تحلیل آماری الگوهای درجه اول، درجه دوم و درجه سوم بین رقت‌های انتخاب شده در واکنش PCR رقابتی و شدت باند قطعه الگو در نمونه‌های مربوط به مایع شکمبه

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

به نمونه‌های مایع شکمبه پرداخته شد. نتایج آنالیز این داده‌ها تفاوت معنی داری را بین تیمار حاوی کنجاله سویا و تیمار حاوی کنجاله کلزا نشان ندادند (شکل ۵).



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



شکل ۵. مقایسه جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی تغذیه شده با دو جیره حاوی کنجاله سویا (SBM) و جیره حاوی کنجاله کلزا (CM)

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

پس از اطمینان از راندمان یکسان تکثیر قطعه کنترل استاندارد و قطعه الگو و در واقع آزمون صحت روش PCR رقابتی (شکل ۳ و ۴)، در مرحله بعد به آنالیز داده‌های مربوط

نتیجه گیری

تغذیه‌ای دام نتایج این مطالعه در زمینه بررسی چگونگی تغییرات جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی در جایگزینی کنجاله کلزا با کنجاله سویا نشان داد جایگزینی کنجاله کلزا به عنوان یک منبع پروتئینی ارزان قیمت نسبت به کنجاله سویا اثر معنی داری بر روی جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه نداشت. بنابراین استفاده از این کنجاله در ارتباط با فعالیت و جمعیت قارچ‌ها در محیط شکمبه در این مطالعه محدود کننده نبود.

تشکر و قدر دانی

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

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

با توجه به قیمت بالاتر کنجاله سویا به عنوان یک مکمل پروتئینی نسبت به کنجاله کلزا در بازارهای کشور، و از طرفی اهمیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه در تامین نیازهای

منابع

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

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

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

M. R. Nassiri, R. Valizadeh, M. Danesh Mesgaran, A. R. Heravi Moussavi and M. H. Sekhavati^{*1}

Abstract

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

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

1 - A Contribution from Ferdowsi University of Mashhad

* - Corresponding author Email: Hadisekhavati@gmail.com