نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص. ۱۵۷-۱۴۶

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 2, Summer 2017, p. 146-157

اثر منابع مورد استفاده در پروتئین خوراک بر بازده نیتروژن و بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) در بره‌های نر بلوچی تغذیه شده با سطوح مختلف پروتئین خام

الیاس ابراهیمی خرم آبادی[۱]*- محسن دانش مسگران[۲]- عبدالمنصور طهماسبی[۲]- عباسعلی ناصریان[۲]- سید علیرضا وکیلی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/٦
تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۱/۱۰

خلاصه

به منظور بررسی تأثیر استفاده هم‌زمان منابع و مقادیر متنوع پروتئین خام خوراک بر کنترل نیتروژن اوره‌ای بازگردانده شده به شکمبه و تنظیم بیان ژن ناقل اوره از چهار رأس بره نر بلوچی (۲±۳۰ کیلوگرم) دارای فیستولا در قالب طرح مربع لاتین ۴×۴ استفاده شد. تیمارهای آزمایشی از ترکیب دو منبع پروتئینی (کنجاله کلزا و پودر ماهی) و دو مقدار پروتئین خام (۱۶ و ۱۸ درصد) تشکیل شد. مقدار ماده خشک مصرفی در بره‌های تغذیه شده با کنجاله کلزا در مقایسه با بره‌های تغذیه شده با مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی به صورت معنی‌داری بیشتر بود. تیمارها تأثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده خشک نداشتند. pH مایع شکمبه، غلظت اسیدهای چرب فرار و نسبت استات به پروپیونات، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. با افزایش مقدار پروتئین‌خام خوراک، غلظت آمونیاک شکمبه، نیتروژن اوره‌ای خون، مقدار نیتروژن دریافتی و مقدار نیتروژن ادرار به طور معنی‌داری افزایش یافت. مقدار نیتروژن مدفوع تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. توازن ظاهری نیتروژن در بره‌های تغذیه شده با کنجاله کلزا در مقایسه با بره‌های تغذیه شده با مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی به صورت معنی‌داری بیشتر بود. بیان ژن ناقل اوره تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. این نتایج نشان می‌دهد که تغییر در مقدار پروتئین‌خام خوراک و نوع منبع پروتئینی به تنهایی نمی‌تواند بر بیان ژن ناقل اوره تأثیر گذار باشد. به نظر می‌رسد یکسری عوامل دیگر نیز همچون pH مایع شکمبه و pH درون سلولی در دیواره شکمبه بر بیان ژن ناقل اوره تأثیر گذار باشند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، پودر ماهی، تعادل نیتروژن، کلزا، ناقل اوره.

مقدمه

جمعیت میکروبی شکمبه با استفاده از مقدار انرژی و پروتئین مواد خوراکی توسعه پیدا کرده و به همراه مایعات و محتویات شکمبه به شیردان و سپس به روده کوچک منتقل می‌شود، جایی که بدن نشخوارکنندگان از آنها به‌عنوان منبع پروتئینی استفاده می کند. ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین میکروبی به گونه‌ای است که می‌تواند احتیاجات حیوان به پروتئین برای نگهداری اغلب نشخوارکنندگان بالغ را تأمین نماید (۱۲). با این حال، تغییر منبع ترکیب اسیدهای آمینه وارد شده به روده کوچک از پروتئین میکروبی به مخلوطی از پروتئین میکروبی و پروتئین خوراک سبب بهبود رشد و افزایش توازن ظاهری نیتروژن در بدن می گردد (۱۴، ۱۵ و ۲۹). با این حال، منابع پروتئینی مورد استفاده در خوراک به لحاظ ترکیب اسید های آمینه و فراهمی پروتئین‌خام در شکمبه و بخش های بعد از آن با یکدیگر تفاوت دارند (۶ و ۱۶). منابع پروتئینی متفاوت اثرات متنوعی بر عملکرد حیوان و ترکیب شیمیایی سرم خون دارند (۱۹). این تفاوت در عملکرد می‌تواند ناشی از تغییر محیط شکمبه و تفاوت در ترکیب اسیدهای آمینه موجود در منابع پروتئینی مورد استفاده در خوراک باشد (۱۷).

تغییر منبع ترکیب اسیدهای آمینه وارد شده به روده کوچک از پروتئین میکروبی به مخلوطی از پروتئین میکروبی و پروتئین خوراک، مستلزم اضافه نمودن یک منبع پروتئینی با قابلیت تجزیه پذیری کم در شکمبه می‌باشد. تغییر در قابلیت تجزیه‌پذیری پروتئین‌خام خوراک از اهمیت خاصی برخوردار است و تعیین می کند که چه مقدار از پروتئین جیره در شکمبه به آمونیاک تبدیل گردد (۲۵). به دلیل اینکه غلظت آمونیاک در شکمبه، همبستگی منفی با نرخ بازگشت اوره از

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و دامپروری، مجتمع آموزش عالی کشاورزی و دامپروری تربت جام،
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: Email: demon378@gmail.com)
DOI: 10.22067/ijasr.v3i1.37842

دیواره شکمبه به داخل آن دارد (۲۱)، از این رو می‌توان گفت که تغییر ترکیب اسیدهای آمینه وارد شده به روده کوچک از پروتئین میکروبی به مخلوطی از پروتئین میکروبی و پروتئین خوراک به واسطه تغییر در منابع مورد استفاده در پروتئین خوراک، به دلیل اثری که بر آمونیاک تولیدی در شکمبه و اوره تولید شده در کبد می‌گذارد، می‌تواند به کاهش بازگشت اوره به مسیر هضمی تأثیرگذار باشد. لذا امکان کنترل بازگشت اوره به مسیر هضمی از طریق اعمال تغییر در عوامل خوراکی مانند منابع مورد استفاده در پروتئین خوراک و مقدار پروتئین خام خوراک و تأثیر آن بر روی بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) و متعاقب آن تولید پروتئین‌های ناقل اوره وجود دارد. با این وجود نحوه تغییر در بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) در بافت شکمبه در پاسخ به تغییرات منابع مورد استفاده در پروتئین خوراک و مقدار پروتئین خام خوراک، تاکنون به وضوح مشخص نشده است.

از این رو فرض ما بر این است که تغییر در مقدار نیتروژن خوراک (به واسطه تغییر در مقدار پروتئین خام) می‌تواند به سبب وجود رابطه منفی که بین غلظت آمونیاک 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 (نوع ب) گردد. این تغییر در مقدار بازگرداندن اوره به شکمبه و بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) می‌تواند از طریق تغییر منابع مورد استفاده در پروتئین خوراک به دلیل تغییر در فراهمی اسیدهای آمینه برای میکروارگانیسم های شکمبه، تقویت گردد. از این رو این آزمایش طراحی شد تا نشان دهد که چگونه تغییر در منابع مورد استفاده در پروتئین خوراک و مقدار پروتئین خام خوراک به منظور بهبود بازده نیتروژن خوراک در بره های نر بلوچی می تواند بر روی نیتروژن اوره‌ای بازگردانده شده به شکمبه و تنظیم بیان ژن ناقل اوره (نوع ب)، تأثیرگذار باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات، تیمارها و طرح آزمایشی

به منظور بررسی تأثیر استفاده همزمان منابع و مقادیر مختلف پروتئین خام خوراک بر کنترل نیتروژن اوره‌ای بازگردانده شده به شکمبه و تنظیم بیان ژن ناقل اوره (نوع ب)، از چهار رأس بره نر بلوچی ۹ ماهه (۲±۳۰ کیلوگرم) دارای فیستولا در قالب طرح مربع لاتین ۴×۴ استفاده شد. آزمایش در ۴ دوره ۲۸ روزه انجام شد. هر دوره آزمایش شامل ۲۱ روز عادت‌پذیری و ۷ روز نمونه گیری و رکورد برداری بود. عوامل مورد مطالعه شامل دو منبع مختلف مورد استفاده در پروتئین خوراک (کنجاله کلزا و پودر ماهی) و سطوح پروتئین خام خوراک (۱۶ و ۱۸ درصد) بود. تیمارهای آزمایشی شامل الف- کنجاله کلزا به همراه مقدار پروتئین‌خام کم (۱۶ درصد)، ب- کنجاله کلزا به همراه مقدار پروتئین خام زیاد (۱۸ درصد)، ج- مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی به همراه مقدار پروتئین خام کم (۱۶ درصد) و د- مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی به همراه مقدار پروتئین خام زیاد (۱۸ درصد) بود. خوراک در ۲ وعده (ساعت ۹ صبح و ۴ بعدازظهر) در اختیار حیوان قرار گرفت. دام‌ها در تمام مدت شبانه روز آزادانه به خوراک و آب دسترسی داشتند. اجزای خوراکی و ترکیب مواد مغذی موجود در جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ آورده شده است.

در طول ۷ روز نمونه برداری، مصرف خوراک هر دام به صورت روزانه ثبت شد. نمونه برداری از تیمارها و غذای باقی‌مانده به صورت روزانه انجام شد و در فریزر با درجه برودت ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در پایان هر دوره، نمونه‌های جمع‌آوری شده به نسبت مقدار روزانه مربوط به هر دام مخلوط و یک نمونه جهت تجزیه شیمیایی آماده گردید.

به منظور تعیین قابلیت هضم ماده خشک مصرفی، ۱۰ درصد از کل مدفوع، به صورت روزانه برداشت شد و در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شد (۲۷).

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 ۲۴ ساعت در ظروف پلاستیکی جمع آوری گردید و به آن اسید کلریدریک 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 (۲۷). به منظور تعیین نیتروژن ادرار، حجم کل ادرار دفع شده به صورت روزانه اندازه‌گیری شد و یک نمونه (۲۰ درصد) در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

نمونه‌برداری از شیرابه شکمبه در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از وعده خوراک صبحگاهی انجام شد و pH آن بلافاصله تعیین گردید. شیرابه توسط پارچه تنظیف چهار لایه صاف و ۱۰ میلی‌لیتر از آن با حجم مساوی از اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شد و جهت تعیین نیتروژن آمونیاکی شکمبه در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه به روش تیتراسیون با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال به روش کانوی (۸) اندازه‌گیری شد.

به ۱۰ میلی‌لیتر از مایع شکمبه گرفته شده، ۲ میلی‌لیتر اسید متافسفریک افزوده شد و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار در مایع شکمبه به روش اتنسیتن و بارتلی (۳۱)، از دستگاه کروماتوگرافی گازی با ستون شیشه‌ای (۱/۶۵ متر × ۴/۶ میلی‌لیتر) فیلیپس مدل PU۴۴۱۰ استفاده شد.

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

Table 1- Composition of experimental diets

مورد Items	۱۸ درصد پروتئین خام 18% Crude protein		۱۶ درصد پروتئین خام 16% Crude protein	
	CM[1]+FM[2] کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا	CM+FM کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا
اجزای تیمارهای آزمایشی (درصد ماده خشک) Ingredients (% DM)				
سیلاژ ذرت Corn silage	33.47	32.61	33.08	32.91
علوفه یونجه Alfalfa hay	20.10	20.18	20.48	20.37
دانه ذرت Corn grain	19.86	19.94	26.66	26.53
کنجاله کلزا Canola meal	22.84	25.44	16.84	18.32
پودر ماهی Fish meal	1.91	00	1.09	00
مکمل مواد معدنی و ویتامین[۱] Vitamin and mineral premix [3]	1.51	1.52	1.54	1.56
نمک طعام Salt	0.31	0.31	0.31	0.31
ترکیب مواد مغذی موجود در تیمارهای آزمایشی Nutrient composition (by chemical analysis)				
درصد ماده خشک DM, %	88.60	89.10	88.80	89.00
انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری بر کیلوگرم) ME (MCal/Kg)	2.15	2.19	2.16	2.15
پروتئین خام (درصد ماده خشک) CP, %DM	18.30	18.03	16.01	16.59
پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام) RDP, %CP	82.36	84.28	80.60	82.50
پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه (درصد پروتئین خام) RUP, %CP	17.64	15.72	19.40	17.50
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد ماده خشک) NDF, %DM	36.40	36.80	36.30	36.60
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد ماده خشک) ADF, %DM	20.02	19.46	20.83	19.61
کربوهیدرات غیر الیافی (درصد ماده خشک) NFC, %DM	30.50	30.90	32.80	33.00
عصاره اتری (درصد ماده خشک) Ether extract, %DM	2.10	2.50	3.30	3.20
ماده آلی (درصد ماده خشک) OM, %DM	87.27	88.15	88.82	89.09

[۱] هر کیلوگرم مکمل ویتامین و مواد معدنی شامل: ۵۶ میلی‌گرم روی، ۴۶ میلی‌گرم منگنز، ۲۲ میلی‌گرم آهن، ۱۲ میلی‌گرم مس، ۰/۹ میلی‌گرم ید، ۰/۴ میلی‌گرم کبالت، ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم، ۶۶۴۰ واحد بین المللی ویتامین آ، ۲۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین د و ۱۶ واحد بین المللی ویتامین ای می‌باشد.

[1] Canola meal
[2] Fish meal
[3] The vitamin and mineral premix provided the following per kilogram DM: Zn, 56 mg; Mn, 46 mg; Fe, 22 mg; Cu, 12 mg; I, 0.9 mg; Co, 0.4 mg; Se, 0.3 mg; vitamin A, 6440 IU; vitamin D, 2000 IU and vitamin E, 16 IU.

همزمان با نمونه گیری از مایع شکمبه، با سرنگ از ورید وداج حیوان نمونه خون گرفته شد. برای تهیه سرم، بعد از خون گیری، خون به مدت نیم ساعت در درجه حرارت اتاق بدون تکان باقی ماند. سرم در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در آخرین روز هر دوره آزمایش، 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 به همراه پاپیلی‌های آن، نمونه‌ای در حدود یک سانتی‌متر مربع تهیه شد. نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به منظور انجام آنالیزهای بعدی نگهداری شد. نمونه‌ها در مرحله بعد به وسیله محلول نمکی شستشو داده شد و در داخل تیوپ های فاقد نوکلئاز در ۲۰- درجه نگهداری شد. در مرحله بعد با استخراج رایبونوکلئیک اسید از هر نمونه و تهیه دزاکسی رایبو نوکلئیک اسید حلقوی و با استفاده از روش RT-PCR بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) اندازه گیری شد. در این روش از گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز به عنوان مرجع داخلی استفاده شد. برای ژن ناقل اوره (نوع ب) از پرایمرهای (Forward -GGACCTGCCTGTCTTCACTC؛ Reverse - GATCAAGGTGCTTGGGAAAA) و برای گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز از پرایمرهای (Forward-GATTGTCAGCAATGCCTCCT؛ Reverse-GGTCATAAGTCCCTCCACGA) برای تولید آمپلیکون با سایز ۹۷ bp و ۹۴ bp استفاده شد. انجام RT-PCR برای دزاکسی رایبو نوکلئیک اسید حلقوی متعلق به ژن ناقل اوره (نوع ب) و گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز به صورت ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه برای آمپلیفیکاسیون ۴۰ سیکل انجام شد و سطوح بیان رایبو نوکلئیک اسید ژن ناقل اوره (نوع ب) نسبت به گلیسر آلدهید ۳ فسفات دهیدروژناز گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایش در قالب طرح مربع لاتین با ترتیب فاکتوریل ۲×۲، آنالیز واریانس شدند. در این طرح، چهار تیمار در قالب چهار جیره غذایی در چهار دوره مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایش با مدل MIX برنامه آماری SAS ویرایش ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مدل آماری طرح به شکل زیر بود.

$$Y_{ijklm} = \mu + P_i + L_j + A_k + B_l + (AB)_{il} + \varepsilon_{ijklm} \quad (۱)$$

در این رابطه، Y_{ijkl} متغیر وابسته، μ میانگین جامعه، P_i اثر دوره، L_j اثر حیوان، A_k اثر منبع پروتئین خام، B_l اثر مقدار پروتئین خام، $(AB)_{il}$ اثر متقابل منبع پروتئین خام و مقدار پروتئین خام، ε_{ijkl} اثر باقی‌مانده می‌باشد.

نتایج و بحث

مصرف خوراک و قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی

نوع منبع پروتئینی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر روی مقدار مصرف مواد مغذی داشت ($P< ۰/۰۵$) (جدول ۲). مصرف ماده خشک، پروتئین خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و ماده آلی در بره‌های مصرف‌کننده تیمارهای آزمایشی حاوی کنجاله کلزا در مقایسه با بره‌های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی حاوی مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی به صورت معنی‌داری بیشتر بود ($P< ۰/۰۵$). مقدار پروتئین خام تیمارهای آزمایشی به استثناء مقدار مصرف پروتئین خام ($P< ۰/۰۵$)، بر مصرف هیچ کدام از متغیرهای فوق تأثیر معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$). بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری به لحاظ قابلیت هضم مواد مغذی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

سانتوز و همکاران (۳۴) گزارش کردند که افزایش مقدار پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه در خوراک تأثیر معنی‌داری بر مصرف مواد مغذی ندارد. همچنین کاستیلو و همکاران (۱۰) نتیجه گرفتند که تغییر در مقدار پروتئین خام یا قابلیت تجزیه‌پذیری آن در خوراک تأثیر معنی‌داری بر مصرف مواد مغذی ندارد. از سوی دیگر علت افزایش مصرف مواد مغذی در خوراک‌های حاوی کنجاله کلزا در مقابل خوراک‌های حاوی مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی به درستی مشخص نیست. با این حال می‌توان گفت که افزایش فراهمی یا تعادل بهتر اسیدهای آمینه در کنجاله کلزا سبب بهبود عملکرد و در نتیجه افزایش انرژی مورد نیاز و در نهایت افزایش مصرف مواد مغذی شده است (۳۶). همچنین می‌توان مصرف سریع و کاهش اثرات انباشتگی در شکمبه و افزایش جمعیت میکروبی شکمبه و جریان اسیدهای آمینه در بخش‌های بعد از شکمبه به علت قابلیت هضم بالاتر کنجاله کلزا در مقابل پودر ماهی را از دیگر دلایل افزایش مصرف مواد مغذی در خوراک‌های حاوی کنجاله کلزا در مقابل خوراک‌های حاوی مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی دانست (۵، ۹ و ۲۲).

تخمیر شکمبه‌ای و متابولیت‌های خونی

غلظت آمونیاک، pH مایع شکمبه، اسیدهای چرب فرار، نسبت استات به پروپیونات و غلظت نیتروژن اوره ای خون در جدول ۳ نمایش داده شده است. مقدار pH مایع شکمبه تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($P> ۰/۰۵$). غلظت آمونیاک در شکمبه در بره‌های مصرف‌کننده تیمارهای آزمایشی دارای ۱۶ درصد پروتئین خام بصورت معنی‌داری نسبت به بره‌های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی دارای ۱۸ درصد پروتئین خام کمتر بود ($P< ۰/۰۵$)، با این حال نوع منبع پروتئینی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی تأثیر

معنی داری بر روی غلظت آمونیاک در شکمبه نداشت (P> ۰/۰۵). غلظت کل اسیدهای چرب فرار، غلظت اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک و نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P> ۰/۰۵).

جدول ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر مصرف خوراک و قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی[۱]

Table 2- Effect of experimental diets on feed intake and apparent nutrients digestibility[1]

مورد Item	۱۸ درصد پروتئین خام 18% Crude protein		۱۶ درصد پروتئین خام 16% Crude protein		SEM	P- value		
	CM[2]+FM[3] کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا	CM+FM کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا		Protein Source منبع پروتئین	% Crude protein درصدپروتئین‌خام	Protein Source×%CP منبع×درصد پروتئین خام
مصرف مواد مغذی (گرم در روز) Nutrients Intake (g d^{-1})								
ماده خشک DM	878.5^{b}	983.2^{a}	844.0^{b}	976.9^{a}	5.7	<.001	0.94	0.33
پروتئین خام CP	160.7^{b}	177.2^{a}	142.2^{c}	161.9^{b}	0.9	<.001	<.001	0.13
الیاف نامحلول درشوینده خنثی NDF	319.8^{b}	361.7^{a}	320.8^{b}	375.5^{a}	2.0	<.001	0.46	0.23
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF	175.8^{b}	191.3^{a}	184.1^{b}	191.7^{a}	1.1	<.001	0.62	0.12
ماده آلی OM	766.7^{b}	866.6^{a}	785.2^{b}	869.2^{a}	5.0	<.001	0.06	0.15
درصد قابلیت هضم Digestibility, %								
ماده خشک DM	75.4	74.4	74.1	71.7	2.1	0.47	0.41	0.72
پروتئین خام CP	81.7	83.5	78.1	79.0	1.6	0.51	0.21	0.82
الیاف نامحلول درشوینده خنثی NDF	47.1	51.7	52.3	54.9	4.6	0.55	0.28	0.70
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF	63.1	70.5	66.6	68.3	3.7	0.45	0.76	0.34
ماده آلی OM	75.7	74.5	73.7	71.6	2.1	0.48	0.35	0.82

[۱] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. (P< ۰/۰۵)

[1] Means within same column with different superscripts differ significantly (P<0.05)

[2] Canola meal

[3] Fish meal

مقدار pH مایع شکمبه وابسته به غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمبه است (۷). مطالعات انجام شده نشان می دهد که همزمان با افزایش مقدار کربوهیدرات سهل‌التخمیر در خوراک، غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمبه افزایش و متعاقب آن pH مایع شکمبه کاهش می یابد (۴ و ۳۰). در آزمایش حاضر یکسان بودن مقدار انرژی، نسبت کنسانتره به علوفه و مقدار مصرف کربوهیدرات قابل تخمیر در تیمارهای آزمایشی می تواند دلیلی بر بی اثر بودن تیمارهای آزمایشی بر pH شکمبه باشد.

مطالعات متعددی ثابت کرده‌اند که رابطه مستقیمی بین مقدار پروتئین خام خوراک و غلظت آمونیاک در شکمبه وجود دارد (۱۳، ۲۰ و ۳۳). کیران و موستانگوا (۲۳) دریافتند که کاهش مقدار پروتئین خام خوراک از ۱۵ درصد به ۱۰ درصد (بر اساس ماده خشک) باعث کاهش غلظت آمونیاک در شکمبه به مقدار تقریبی ۴۲ درصد می شود، همچنین کاهش مقدار پروتئین خام خوراک از ۱۸/۶ درصد به ۱۷/۵

درصد سبب نزول غلظت آمونیاک در شکمبه از ۱۲ به ۷/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در گاوهای شیری می‌گردد (۳۳). این نتایج مطابق یافته‌های آزمایش حاضر است. با افزایش مقدار پروتئین خام خوراک از ۱۶ درصد به ۱۸ درصد غلظت نیتروژن اوره ای خون به صورت معنی داری افزایش یافت. به دلیل بیشتر بودن مقدار نیتروژن دریافتی در بره های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی دارای ۱۸ درصد پروتئین خام نسبت به بره‌های مصرف‌کننده تیمارهای آزمایشی دارای ۱۵ درصد پروتئین خام و متعاقب آن افزایش غلظت و جذب آمونیاک در شکمبه و افزایش سنتز اوره در کبد، این نتیجه قابل انتظار بود. مارینی و همکاران (۲۷)، نتایج مشابهی را گزارش کردند و دریافتند که در بره‌ها با افزایش مقدار دریافت نیتروژن، غلظت نیتروژن اوره‌ای خون به صورت خطی افزایش می‌یابد.

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار، نسبت استات به پروپیونات مایع شکمبه و غلظت نیتروژن اوره‌ای خون[۱]

Table 3- Effect of experimental diets on pH, NH_3-N, VFA and BUN concentration and Ace/Pro ratio of ruminal fluid and blood urea nitrogen concentrations[1]

مورد Item	۱۸ درصد پروتئین خام 18% CP[2]		۱۶ درصد پروتئین خام 16% CP		SEM	P- value		
	CM[3]+FM[4] کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا	CM+FM کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا		Protein Source منبع پروتئین	% CP درصد پروتئین‌خام	Protein Source×%CP منبع پروتئین×درصد پروتئین خام
pH شکمبه Ruminal pH	6.50	6.48	6.49	6.49	0.004	0.35	0.62	0.99
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) NH_3-N (mg dl^{-1})	23.90[a]	24.07[a]	20.85[b]	21.35[b]	0.13	0.24	<.001	0.02
نیتروژن اوره‌ای خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) BUN (mg dl^{-1})	18.10[a]	18.77[a]	15.57[b]	16.55[b]	0.25	018	<.001	0.58
اسیدهای چرب فرار (مول در ۱۰۰ مول) VFA (mol 100 mol^{-1})								
کل Total	85.10	83.20	82.80	83.60	0.91	0.55	0.33	0.19
استات Acetate	68.08	69.00	67.24	68.79	0.48	0.06	0.21	0.52
پروپیونات Propionate	21.12	20.55	21.40	19.90	0.31	0.16	0.57	0.19
بوتیرات Butyrate	11.45	11.35	11.40	11.12	0.11	0.15	0.27	0.47
پروپیونات/استات Ace/ Propionate	3.23	3.65	3.14	3.45	0.06	0.17	0.95	0.23

[۱] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. (P< ۰/۰۵)

[1] Means within same column with different superscripts differ significantly (P<0.05)
[2] Crude protein
[3] Canola meal
[4] Fish meal

توازن ظاهری نیتروژن

تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر مقدار دریافت نیتروژن داشتند (P< ۰/۰۵) (جدول ۴). مقدار دریافت نیتروژن در بره‌های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی دارای ۱۶ درصد پروتئین خام بصورت معنی‌داری نسبت به بره‌های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی دارای ۱۸ درصد پروتئین خام کمتر بود (P< ۰/۰۵). همچنین در بره های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی دارای کنجاله کلزا در مقایسه با بره‌های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی دارای مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی مقدار دریافت نیتروژن به صورت معنی‌داری بیشتر بود (P< ۰/۰۵). تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر مقدار نیتروژن دفع شده از طریق مدفوع نداشتند (P> ۰/۰۵) (جدول ۴). تغذیه بره‌ها به وسیله تیمارهای آزمایشی دارای ۱۸ درصد پروتئین خام سبب افزایش مقدار نیتروژن دفع شده از طریق ادرار از ۱۰/۳۴ به ۱۳/۴۹ گرم در روز گردید (P< ۰/۰۵) (جدول ۴). از سوی دیگر استفاده مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی سبب کاهش دفع نیتروژن از طریق ادرار به مقدار ۰/۶۹ گرم در روز شد (P< ۰/۰۵). مقدار نیتروژن خوراک تأثیر معنی‌داری بر توازن ظاهری نیتروژن در بدن نداشت

(P> ۰/۰۵). با این حال در بره‌های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی کنجاله کلزا در مقایسه با بره‌های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی دارای مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی توازن ظاهری نیتروژن به صورت معنی‌داری بیشتر بود (P< ۰/۰۵).

جدول ٤- اثر تیمارهای آزمایشی بر مقدار دریافت نیتروژن، مقدار نیتروژن دفع شده و توازن ظاهری نیتروژن[۱]

Table 4- Effect of experimental diets on N intake, fecal and urinary N excretion and apparent N balance[1]

مورد Item	۱۸ درصد پروتئین خام 18% CP[2]		۱۶ درصد پروتئین خام 16% CP		SEM	P- value		
	CM[3]+FM[4] کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا	CM+FM کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا		Protein Source منبع پروتئین	% CP درصد پروتئین‌خام	Protein Source×%CP منبع پروتئین×درصد پروتئین خام
نیتروژن دریافتی (گرم بر روز) N Intake (g d^{-1})	25.72[b]	31.24[a]	22.76[c]	26.33[b]	0.22	<.001	<.001	0.002
نیتروژن دفعی از طریق مدفوع (گرم بر روز) Fecal N excretion (g d^{-1})	5.84	6.22	5.90	6.08	0.05	0.74	0.31	0.13
نیتروژن دفعی از طریق ادرار (گرم بر روز) Urinary N excretion (g d^{-1})	12.85[b]	14.14[a]	10.29[c]	10.39[c]	0.10	<.001	<.001	0.004
ابقاء نیتروژن (گرم بر روز) Nitrogen balance (g d^{-1})	7.00[b]	10.79[a]	6.56[b]	9.86[a]	0.20	<.001	0.10	0.26

[۱] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. (P< ۰/۰۵).

[1] Means within same column with different superscripts differ significantly (P<0.05).
[2] Crude protein
[3] Canola meal
[4] Fish meal

تغذیه بره ها توسط تیمارهای آزمایشی دارای ۱۸ درصد پروتئین خام در مقایسه با تیمارهای آزمایشی دارای ۱۶ درصد پروتئین خام سبب افزایش دفع نیتروژن از طریق ادرار به مقدار ۳/۱۵ گرم در روز گردید. این نتایج یافته‌های محققان دیگر (۳، ۲۳، ۲۷ و ۲۸) را تأیید می کند. این موضوع نشان می دهد که کاهش مقدار نیتروژن دریافتی به نحو مؤثری دفع نیتروژن از طریق ادرار به محیط را کاهش می‌دهد. در این مطالعه بین ۴۲/۳۵ تا ۴۷/۵۷ درصد از نیتروژن دریافتی به وسیله ادار دفع شده است که مقدار عددی کمتر مربوط به تیمارهای آزمایشی دارای ۱۶ درصد پروتئین خام می‌باشد. مقدار نیتروژن دفع شده از طریق مدفوع تحت تأثیر افزایش مقدار پروتئین خام و نوع منبع پروتئینی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. هریستوف و جونای (۱۸) گزارش کردند که مقدار نیتروژن دفع شده از طریق مدفوع کمتر تحت تأثیر مقدار پروتئین خام خوراک قرار می‌گیرد و نیتروژن مازاد بیشتر از طریق ادرار به محیط دفع می گردد. همچنین اگر دام‌ها دسترسی آزاد به خوراک داشته باشند، مقدار نیتروژن خوراک تأثیری بر مقدار نیتروژن دفع شده از طریق مدفوع ندارد (۲۴، ۲۷، ۲۸ و ۳۷). با این وجود خالد و همکاران (۲۲) عنوان کردند که استفاده از کنجاله کلزا در مقایسه با کنجاله تخم پنبه و پودر گلوتن ذرت باعث افزایش معنی دار در مقدار دریافت نیتروژن و توازن ظاهری آن می‌شود. در آزمایش حاضر، افزایش توازن ظاهری نیتروژن در بره‌های مصرف کننده کنجاله کلزا در مقایسه با مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی ممکن است به علت مصرف بیشتر پروتئین خام و بالاتر بودن قابلیت هضم تیمارهای آزمایشی دارای کنجاله کلزا در مقایسه با بره‌های مصرف کننده تیمارهای آزمایشی دارای مخلوط کنجاله کلزا و پودر ماهی باشد. از سوی دیگر ترکیب بهتر اسید آمینه‌ها در کنجاله کلزا منجر به استفاده مؤثرتر از اسیدهای آمینه برای اهداف آنابولیک می‌شود (۲۶).

بیان ژن ناقل اوره (نوع ب)

اثر تیمارهای آزمایشی بر روی بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) در بافت اپیتلیوم شکمبه، در جدول ۵ نمایش داده شده است. افزایش مقدار پروتئین خام از ۱۶ درصد به ۱۸ درصد و تغییر نوع منبع پروتئینی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی داری بر بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) در بافت اپیتلیوم شکمبه نداشت (P> ۰/۰۵) (جدول ۵).

این نتایج نشان می دهد که عدم تغییر در انتقال اوره به مسیر هضمی و بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) به واسطه تغییر در مقدار پروتئین خام و نوع منبع پروتئینی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی احتمالا مربوط به عدم تأثیر افزایش غلظت پروتئین خام و عدم تغییر مایع pHدر غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمبه و متعاقب آن تغییر

شکمبه می‌باشد. غلظت آمونیاک در شکمبه از طریق افزایش نفوذ پذیری اپیتلیوم شکمبه به اوره، بر انتقال اوره به شکمبه اثر مستقیم دارد. انتقال اوره از دیواره شکمبه بوسیله فعالیت اوره آز باکتریایی تسهیل می‌شود (۳۲).

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) در بافت اپیتلیوم شکمبه[۱]

Table 5- Effect of experimental diets on urea transporter-B gene expression in the ruminal epithelium tissue[1]

مورد Item	۱۸ درصد پروتئین خام 18% CP[2]		۱۶ درصد پروتئین خام 16% CP		SEM	P- value		
	CM[3]+FM[4] کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا	CM+FM کنجاله کلزا و پودر ماهی	CM کنجاله کلزا		Protein Source منبع پروتئین	% CP درصد پروتئین‌خام	Protein Source×%CP منبع پروتئین×درصد پروتئین خام
بیان ژن Gene expression	11.2	10.9	10.2	10.4	1.41	0.84	0.63	0.96

[۱] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. (P< ۰/۰۵).

[1] Means within same column with different superscripts differ significantly (P<0.05).
[2] Crude protein
[3] Canola meal
[4] Fish meal

اوره‌آز باکتریایی به سرعت اوره وارد شده به شکمبه را به آمونیاک و CO_2 هیدرولیز می‌کند. این کار باعث ایجاد شیب غلظتی مثبت به سمت شکمبه و افزایش انتشار اوره به سمت شکمبه می شود (۳۲). چنگ و والاس (۱۱) ثابت کردند، هنگامی که غلظت آمونیاک در شکمبه افزایش می‌یابد، فعالیت اوره‌آز باکتریایی کاهش می‌یابد. علت کاهش فعالیت اوره آز باکتریایی هم‌زمان با افزایش غلظت آمونیاک در شکمبه، تبدیل NH_3 به یون NH_4^+ در Pk_a= ۹/۳ و اثر مهارکننده تجمع یون NH_4^+ بر فعالیت اوره‌آز می‌باشد (۲۷). بنابراین به منظور حداکثر کردن انتقال اوره به شکمبه و استفاده از آن برای سنتز پروتئین میکروبی، غلظت آمونیاک در شکمبه باید کاهش یابد. یک روش معمول برای کاهش غلظت آمونیاک در شکمبه کنترل pH شکمبه در سطح مطلوب به منظور استفاده حداکثر از آمونیاک تولید شده برای سنتز پروتئین میکروبی است. اخیرا ابدون و همکاران (۲) ثابت کردند که در شرایط برون‌تنی و در حضور اسیدهای چرب فرار، حداکثر انتقال اوره به شکمبه درمحدوده pH مایع شکمبه بین ۶ تا ۶/۴ اتفاق می‌افتد. در آزمایش حاضر عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی به لحاظ غلظت اسیدهای چرب فرار و pH مایع شکمبه و قرار گرفتن میانگین pH مایع شکمبه در سطح ۶/۴۹ برای هر دو عامل مقدار پروتئین خام و نوع منبع پروتئینی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی می‌تواند دلیلی بر بی تأثیر بودن تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن ناقل اوره (نوع ب) باشد.

نتیجه گیری کلی

این نتایج نشان می‌دهد که تغییر در مقدار پروتئین خام خوراک و نوع منبع پروتئینی به تنهایی نمی‌تواند بر بیان mRNA ژن ناقل اوره (نوع ب) تأثیرگذار باشد. لذا به نظر می‌رسد باید یکسری عوامل دیگر نیز همچون pH مایع شکمبه و pH درون سلولی سلول‌های دیواره شکمبه بر بیان mRNA ژن ناقل اوره (نوع ب) تأثیر گذار باشند. درک نحوه کنترل دقیق فعالیت پروتئین‌های ناقل اوره (نوع ب) در دیواره شکمبه نیازمند تحقیقات بیشتری است، به‌خصوص هنگامی که تغییر در فراوانی پروتئین‌های ناقل اوره (نوع ب) نقش مهمی در تنظیم انتقال اوره به مسیر هضمی دارد.

منابع

1- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis, 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
2- Abdoun, K., F. Stumpff., I. Rabbani, and H. Martens. 2010. Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium *in vitro* by SCFA and CO2. American Journal of Physiology, 298: 190-202.
3- Archibeque, S. L., J. C. Burns, and G. B. Huntington. 2001. Urea flux in beef steers: Effects of forage species and nitrogen fertilization. Journal of Animal Science, 79: 1937-1943.
4- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, 88: 9-21.
5- Bandyk, C. A., R. C. Cochran., T. A. Wickersham., E. C. Titgemeyer., C. G. Farmer, and J. J. Higgins. 2001. Effect of ruminal vs. postruminal administration of degradable protein on utilization of low-quality forage by beef

steers. Journal of Animal Science, 79: 225-231.
6- Bateman, H. G., J. H. Clark, and M. R. Murphy. 2005. Development of a system to predict feed protein flow to the small intestine of cattle. Journal of Dairy Science, 88: 282-295.
7- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang., D. P. Morgavi., G. R. Ghorbani., W. Kautz, and J. A. Z. Leedle. 2003. Effects of bacterial direct-fed mcirobials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. Journal of Animal Science, 81: 1628-1640.
8- Conway, W. J. 1950. Microdiffusion analysis and volumetric error, 2nd ed. Crosby lock wood and son, London, UK.
9- Carneiro, A., A. Esquivel., D. E. Hogue, and M. L. Thonney. 2006. Effect of fermentable fiber and protein source on feed intake and efficiency of growing lamb. Conference on Asia Agriculture and Animal Science, 13: 1-6.
10- Castillo, A. R., E. Kebreab., D. E. Beever., J. H. Barbi., J. D. Sutton., H. C. Kirby, and J. France. 2001. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. Journal of Animal Science, 79: 247-253.
11- Cheng, K. J, and R. J. Wallace. 1979. The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flow. British Journal of Nutrition, 42: 553-557.
12- Church, D. C. 1988. In The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
13- Cunningham, K. D., M. J. Cecava., T. R. Johnson, and P. A. Ludden. 1996. Influence of source and amount of dietary protein on milk yield by cows in early lactation. Journal of Dairy Science, 79: 620-630.
14- Davenport, G. M., J. A. Boling, and K. K. Schillo. 1990. Nitrogen metabolism and somatotropin secretion in beefheifers receiving abomasal arginine infusions. Journal of Animal Science, 68: 1683-1692
15- Gill, M, and D. E. Beever. 1982. The effect ofprotein supplementation on digestion and glucose metabolism in young cattle fed on silage. British Journal of Nutrition, 48: 37-47.
16- Gleghorn, J. F., N. A. Elam., M. L. Galyean., G. C. Duff., N. A. Cole, and J. D. Rivera. 2004. Effects of crude protein concentration and degradability on performance, carcass characteristics, and serum urea nitrogen concentrations in finishing beef steers. Journal of Animal Science, 82:2705-2717.
17- Hall, M. B, and G. B. Huntington. 2008. Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. Journal of Animal Science, 82: 3237-3244.
18- Hristov, A. N, and J. P. Jouany. 2005. Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen. Pages 117-166 in: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle: Reducing the Environmental Impact of Cattle Operations. E. Pfeffer, and A.V. Hristov, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
19- Jørgensen, H., W. C. Sauer, and P. A. Thacker. 1984. Amino acid availabilities in soybean meal, sunflower meal, fish meal and meat and bone meal fed to growing pigs. Journal of Animal Science, 58: 926-934.
20- Kebreab, E., J. France., J. A. N. Mills., R. Allison., and J. Dijkstra. 2002. A dynamic model of N metabolism in the lactating dairy cow and an assessment of impact of N excretion on the environment. Journal of Animal Science, 80: 248-259.
21- Kennedy, P. M, and L. P. Milligan. 1980. The degradation and utilization of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants: A review. Canadian Journal of Animal Science, 60: 205-221.
22- Khalid, M. F., M. Sarwar., U. N. Mahr, and U. R. Zia. 2011. Response of growing lambs fed on different vegetable protein sources with or without probiotics. International Journal of Agriculture and Biology, 13: 332-338.
23- Kiran, D, and T. Mutsvangwa. 2010. Effects of partial defaunation on urea-nitrogen recycling, nitrogen metabolism, and microbial nitrogen supply in growing lambs fed low or high dietary crude protein concentrations. Journal of Animal Science, 88: 1034-1047.
24- Knowlton, K. F., J. H. Herbein., M. A. Meister-Weisbarth, and W. A. Wark. 2001. Nitrogen and phosphorus partitioning in lactating Holstein cows fed different sources of dietary protein and phosphorus. Journal of Dairy Science, 84: 1210-1217.
25- Lapierre, H, and G. E. Lobley. 2001. Nitrogen recycling in the ruminant: A review. Journal of Dairy Science, 84: 223-236.
26- Legleiter, L. R., A. M. Mueller, and M. S. Kerley 2005. Level of supplemental protein does not influence the ruminally undegradable protein value. Journal of Animal Science, 83: 863-870.
27- Marini, J. C., J. D. Klein., J. M. Sands, and M. E. Van Amburgh. 2004. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. Journal of Animal Science, 82: 1157-1164.
28- Marini, J. C, and M. E. Van Amburgh 2003. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. Journal of Animal Science, 81: 545-552.
29- Merchen, N. R, and E. C. Titgemeyer. 1992. Manipulation of amino acid supply to the growing ruminant. Journal of Animal Science, 70: 3238-3247.
30- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. Journal of Dairy Science, 80: 1005-1028.
31- Ottenstein, D. M, and D. A. Bartley. 1971. Improved gas chromatography separation of free acids C2-C5 in dilute solution. Annual Chemistry, 43: 952-955.

32- Rémond, D., F. Meschy, and R. Boivin. 1996. Metabolites, water and mineral exchanges cross the rumen wall: Mechanisms and regulation. Annual Zootechnology, 45: 97-119.
33- Reynal, S. M, and G. A. Broderick. 2005. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, 88: 4045-4064.
34- Santos, F. A., J. E. Santos., C. B. Theurer, and J. T. Huber. 1988. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. Journal of Dairy Science, 81(12): 3182-213.
35- SAS Institute. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.
36- Shingfield, K. J., S. Jaakkola, and P. Huhtanen. 2001. Effects of level of nitrogen fertilizer application and various nitrogenous supplements on milk production and nitrogen utilization of dairy cows given grass silage-based diets. Animal Science, 73: 541-554.
37- Siddons, R. C., J. V. Nolan., D. E. Beever, and J. C. MacRae. 1985. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. British Journal of Nutrition, 54: 175-187.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 2, Summer 2017, p. 146-157

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص. ۱۵۷-۱۴۶

Effect of Dietary Protein Sources On UT-B Expression and Nitrogen Efficiency in Baluchi Male Lambs Fed Low or High Crude Protein Diets

E. Ibrahimi Khoram Abadi[1]*- M. Danesh Mesgaran[2]- A. Tahmasebi[2]- A. A. Naserian[2]- A. R. Vakili[3]

Received: 28-07-2014
Accepted: 30-01-2016

Introduction The main protein degradation product in ruminant is urea. The urea synthesized in liver and lost to the environment via urine and feces. However, there is mechanism in ruminants to recycling 40 to 80% of hepatic urea-N output to the gastrointestinal track (GIT). During the process of urea nitrogen salvaging (UNS), urea entry into the ruminant gastrointestinal tract via facilitative urea transporters. The passage of urea across cell membranes is facilitated by such transporters then the urea descends a concentration gradient and derived from two separate genes: SLC14A1 (UT-B) and SLC14A2 (UT-A). There is a chance for controlling of urea-N recycling to the GIT, via manipulating the dietary factors such as level and type of dietary crude protein that affect urea transporters-B expression. However changes in urea transporter expression in the rumen tissue of ruminants in response to dietary changes have not fully understood. Hence our hypothesis was that changes in the type of dietary protein sources and the level of dietary crude protein, are important because they determine how much N is directed toward ruminal NH_3-N (25). This study aimed to show how concurrent alters in dietary protein sources and crude protein change nitrogen efficiency and ruminal UT-B expression in Baluchi male lambs.

Materials and Methods Four Baluchi male lambs (30 ± 2 kg BW) were used in a 4 × 4 Latin square design with 28-d periods (adaptation: 21 d and sampling: 7 d) and a 2 × 2 factorial arrangement of dietary treatments. Lambs had free access to clean water over the experimental period. The dietary factors studied were: 1) canola meal vs. canola meal with fish meal as the principal source of protein; and 2) dietary levels of crude protein of 16 vs. 18%. Treatments were offered to the animals twice daily for ad libitum intake (09:00 and 16:00 h). The DM, OM, and N contents were determined according to the AOAC. Volatile fatty acids were separated and quantified by gas chromatography. Ruminal NH_3-N was determined using distillation method. Total N in pooled urine was determined using the macro-Kjeldahl procedure. For UT-B gene expression analysis, total RNA was extracted via High Pure RNA Isolation Kit, followed by digestion with RNasefree DNase. About, 1 µg of RNA was used to generate first-strand cDNA using cDNA Synthesis Kits. Gene transcript abundance was quantified using real-time quantitative PCR using SYBR Green fluorescence detection. The primers used for urea transporter-B (UT-B) and ovine glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (ovine GAPDH; NCBI Accession No. BC102589) were previously reported. Ovine GAPDH was used as an internal reference to normalize UT-B mRNA expression. Briefly, the PCR primers were UT-B (forward, 5′/ggacctgcctgtcttcactc/3′; reverse, 5′/gatcaaggtgcttgggaaaa/3′) and ovine GAPDH (forward, 5′/gattgtcagcaatgcctcct/3′; reverse, 5′/ggtcataagtccctccacga/3′) with amplicon size of 97 and 94 bp, respectively. Amplification conditions for ovine GAPDH and UT-B included a predwell for 3 min at 95 °C and 35 cycles of denaturing for 30 s at 95 °C and annealing for 30 s at 58 °C. The real-time qPCR reaction mixture used for each gene consisted of 12.5 µL of Maxima SYBR Green qPCR Master Mixes, 0.5 µL of each primer (25 µ*M*), and 1.0 µL of template cDNA, made up to 25 µL. The amplification efficiency was 100.1%.

Result and Disscusion Lambs fed CM have greater nutrients intake, significantly. Crude protein level had no significant effect on nutrients intake except CP intake. Nutrients digestibility was not affected by treatments, CP content and dietary protein sources. Ruminal pH, VFA concentration and acetate to propionate ratio were not influenced by the experimental diets and dietary protein sources. Significant differences were observed for NH_3-N and BUN concentration in lambs fed treatments contain 18% CP compared to the lambs fed diets contain 16% CP. Both of CP content and dietary protein sources had significant effect on N intake and urinary N excretion.

1- Assistant Professor of Animal Sciences Department, Faculty of Agriculture and Animal Science, Torbat-e Jam Educational Complex, Iran,
2- Professor of Animal Sciences Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran,
3- Associate Professor of Animal Sciences Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
(*- Corresponding Author Email: demon378@gmail.com)

Nitrogen intake and urinary N excretion increased as dietary CP level increased. Lambs fed CM have greater N intake and urinary N excretion, significantly. Fecal N excretion was not affected by treatments, CP content and dietary protein sources. Lambs received CM diets had higher apparent N balance. Expression of urea transporter-B mRNA (expressed as copies/copy of ovine GAPDH) was not affected by treatments. Also, dietary CP content and dietary protein sources could not impact on the expression of UT-B mRNA.

Conclusion Our finding suggest in studing of manipulating the expression of UT-B mRNA, both dietary factors such as dietary crude protein level and type of protein sources and ruminal factors shch as intra and para cellular pH should be considered.

Keywords: Canola, Fish meal, N balance, Protein, Urea transporter.