

مقایسه تعداد قارچ‌های شکمبه‌ای در محیط کشت حاوی کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با فرمالدئید و یا سود با روش PCR رقابتی

طاهره محمدآبادی^{۱*} - محسن دانش مسگران^۲ - محمد رضا نصیری^۳ - مرتضی چاجی^۴

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۳۰

چکیده

روش PCR رقابتی کمی برای مقایسه تعداد قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه در محیط کشت خالص قارچ حاوی کنجاله آفتابگردان پرچرب (۱۶۵ گرم چربی در هر کیلوگرم ماده خشک) عمل‌آوری شده با فرمالدئید و سود انجام شد. ۲۱ راس گاو هلشتاین (30 ± 5 روز شیردهی) انتخاب و با جیره‌های آزمایشی که شامل کنجاله آفتابگردان تیمار نشده (شاهد) و تیمار شده با ۴ درصد هیدروکسید سدیم و ۰/۳ و ۰/۶ درصد فرمالدئید بودند، برای مدت ۷ هفته تغذیه شدند. به منظور بررسی کمی جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه تحت تیمارهای تغذیه‌ای از روش PCR رقابتی استفاده گردید. قطعه استاندارد در واکنش PCR رقابتی از ژنوم فاژ لامبدا ساخته شد و تکثیر همزمان با راندمان یکسان این قطعه با قطعه DNA قارچ در یک واکنش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. از شدت نسبی باندهای قطعه DNA الگو و کنترل استاندارد به منظور بررسی کمی جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه تحت جیره‌های مختلف استفاده گردید. آنالیز داده‌های مطالعه اخیر نشان داد که کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با سود، تعداد قارچ در محیط کشت را نسبت به شاهد افزایش، اما کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با فرمالدئید تعداد قارچ را کاهش داد ($p < 0.05$). بنابراین، به نظر می‌رسد که روش PCR رقابتی برای شمارش جمعیت قارچ‌های شکمبه تحت تیمارهای خوراکی مختلف، مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: کنجاله آفتابگردان، سود، فرمالدئید، قارچ‌های شکمبه، PCR رقابتی

مقدمه

تخمین توده زنده قارچی استفاده شود (۲۰)، همچنین این روش‌های شمارش بسیار وقت‌گیر می‌باشند (۱۰). شمارش قارچ‌های بی‌هوازی از طریق واحدهای تشکیل دهنده هیف (TFU)^۵ نیز مراحل چرخه زندگی قارچ را نشان نمی‌دهد (۲۷). رشد قارچ‌ها با مارکرهای مورفولوژیکی مانند اندازه‌گیری تجمع فسفولیپیدها در محیط کشت (۲۱)، و اندازه‌گیری کل مقدار هیدروژن یا اسید فرمیک تولید شده از تخمیر کربوهیدراتها (۱۷)، و یا اندازه‌گیری کیتین به عنوان یک ترکیب از دیواره سلولی قارچ‌ها نیز تعیین می‌شود، که استفاده از کیتین دارای اشکالاتی می‌باشد (۲۲). با پیشرفت روش‌های مولکولی شمارش، خصوصاً روش‌های پروب کردن ژن 18S rDNA که از دقت بالایی برخوردار می‌باشند، محققان توانستند گونه‌های قارچی را در شکمبه بررسی کنند (۱). PCR رقابتی ابزاری قوی برای تعیین دقیق کمیت DNA و RNA است. این روش مبتنی بر تکثیر همراه توالی مورد نظر از قطعه DNA سنتتیک رقیق شده یا قطعه رقابتگر

قارچ‌های شکمبه به عنوان یکی از گروه‌های مهم میکروارگانیسم‌های شکمبه و کلونی‌سازهای اولیه بافتهای گیاهی بوده و توانایی تجزیه لیگنین را دارند (۲). تحقیقات زیادی در ارتباط با تاثیر فاکتورهایی مانند جیره بر جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه انجام گرفته است (۹). تخمین جمعیت قارچ‌ها نسبت به دیگر میکروفلورای شکمبه مشکل است (۲۰). چندین روش برای تخمین جمعیت قارچی در شکمبه وجود دارد که روش شمارش مستقیم و یا غیر مستقیم ژئوسپورهای قارچی یا اسپورانژها از جمله آنها می‌باشند. شمارش ژئوسپورها به دلیل چرخه دو مرحله‌ای زندگی قارچ، نمی‌تواند برای

۴۰۱- استادیاران گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

*- نویسنده مسئول: Email: t.mohammadabadi@gmail.com

۳۰۲- استاد و دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

کشت بی هوازی دیویس (۸)، استفاده گردید. بدین منظور مایع شکمبه با استفاده از لوله مری از گاوهای شیری که با جیره های مربوط تغذیه شدند، قبل از مصرف خوراک صبحگاهی گرفته شد، پس از صاف کردن با پارچه متقال چند لایه به عنوان منبع قارچ بی هوازی در محیط کشت بی هوازی تحت شرایط گاز دی اکسید کربن مورد استفاده قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت کشت، ایزوله های قارچ تهیه شدند (۲۲).

محیط کشت قارچهای شکمبه شامل محلول نمکی ۱ (۳ گرم فسفات هیدروژن دی پتاسیم در ۱ لیتر آب مقطر حل می شود) و محلول نمکی ۲ (۳ گرم فسفات هیدروژن پتاسیم، ۶ گرم سولفات آمونیوم، ۶ گرم کلرید سدیم، ۰/۶ گرم کلرید کلسیم در ۱ لیتر آب مقطر حل می شود) هر کدام ۱۵۰ میلی لیتر، ۱۵۰ میلی لیتر مایع شکمبه (سانتریفیوژ شده در ۱۵۰۰ دور در دقیقه برای ۳۰ دقیقه)، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم پیتون تریپتیکاز، ۰/۵ گرم گلوکز، ۱ گرم سلویوز، ۶ گرم بی کربنات سدیم، ۱ گرم سیستین HCL و ۱ میلی لیتر رزوزین ۰/۱ درصد برای هر لیتر محیط کشت می باشد. محیط کشت تحت شرایط بی هوازی به داخل شیشه های کشت منتقل گردید و بعد برای ۱۵ دقیقه در ۱۲۰ درجه اتوکلاو شد. به این ترتیب محیط کشت اختصاصی قارچ آماده شد. ایزوله های قارچ به عنوان اینوکولانت به نسبت ۱ به ۹ در شیشه های سرمی که محتوی محیط کشت اختصاصی قارچ به همراه ۱ گرم از نمونه های آزمایشی (کنجاله آفتابگردان پرچرب (۱۶۵ گرم چربی در هر کیلوگرم ماده خشک) عمل آوری شده با فرمالدئید (۰/۳ و ۰/۶ درصد فرمالدئید) و یا سود (۴ درصد سود)) و ۱ میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین و کلرامفنیکل بودند، کشت داده شدند و به منظور خالص سازی قارچ های بی هوازی در محیط کشت سه دفعه عمل واکشت انجام شد. سپس برای مطمئن شدن از رشد قارچها در محیط کشت و خالص بودن محیط کشت قارچ از پرایمر اختصاصی قارچ های بی هوازی شکمبه استفاده شد. بعد از خالص کردن محیط کشت، نمونه ها در انکوباتور در ۳۹ درجه سانتی گراد برای ۳ روز کشت داده شدند.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

برای این منظور ابتدا استخراج DNA از محیط کشت های مختلف بعد از ۳ روز با روش بوم و همکاران (۳)، و استفاده از کیت (DIATOM DNA; Biokom, Moscow) انجام شد. کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شد و سپس رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید در زیر لامپ UV مشخص کرد که کدام نمونه دارای DNA است. برای تکثیر قطعه اختصاصی ۱۱۰ جفت بازی برای قارچ های بی هوازی شکمبه، از آغازگرهای GAF1 و GAF2 استفاده گردید (۱۰).

با استفاده از یک گروه پرایمر است (۱۳). مقادیر اولیه مولکول های هدف در نمونه از نسبت تکثیرهای تولید شده از DNA هدف و رقابتگر در طول PCR رقابتی محاسبه می شوند (۲۸). سخاوتی و همکاران (۲۵)، روش PCR رقابتی را برای تعیین قارچ های بی هوازی شکمبه هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط مزرعه ای مورد بررسی قرار دادند.

کنجاله آفتابگردان یک منبع مناسب پروتئین در جیره گاوهای شیری است، که جز پروتئین های با تجزیه پذیری بالا در شکمبه محسوب می شود (۱۱). مواد شیمیایی مختلفی برای حفاظت پروتئین ها و کاهش تجزیه آنها در شکمبه پیشنهاد شده است. فرمالدئید که با پروتئین ترکیب می شود و سود که با تشکیل پیوندهای عرضی (مانند لیزینو آلانین) موجب دناتور شدن ساختمان پروتئین می گردد، از جمله موادی هستند که بدین منظور استفاده می شوند (۲۴). همچنین عمل آوری با سود باعث هیدرولیز باندهای استری بین لیگنین و همی سلولز و افزایش هضم پذیری می شود (۴). در مورد اثر این مواد شیمیایی خصوصا فرمالدئید روی رشد و فعالیت قارچ های شکمبه اطلاعات محدود است. بنابراین هدف این مطالعه، استفاده از روش PCR رقابتی برای تعیین کمیت و توده زنده قارچهای بی هوازی شکمبه در محیط کشت حاوی کنجاله آفتابگردان پر چرب عمل آوری شده با سود و یا فرمالدئید بود.

مواد و روش ها

حیوانات و نمونه گیری از مایع شکمبه

این آزمایش در گاوداری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و آزمایشگاههای گروه علوم دامی انجام شد. در این آزمایش از ۲۱ راس گاو هلشتاین چند شکم زایش با روزهای شیردهی (۳۰±۵) و وزن زنده (۶۰±۲۰) استفاده شد. سه جیره خوراکی شامل جیره های بر پایه کنجاله آفتابگردان پرچرب عمل آوری نشده (شاهد) و یا عمل آوری شده با محلول ۴ درصد سود و ۰/۳ و ۰/۶ درصد فرمالدئید در هر کیلوگرم ماده خشک (۱۰/۶۹ درصد) بودند. جیره ها دو بار در روز (۹:۰۰ و ۲۱:۰۰) برای ۷ هفته در اختیار حیوانات قرار گرفت به گونه ای که ۱۰ درصد خوراک در آخور باقی می ماند. در انتهای آزمایش (بعد از ۷ هفته)، مایع شکمبه از هر گاو با استفاده از لوله مری قبل از مصرف خوراک صبحگاهی (ساعت ۸:۰۰ صبح) گرفته شد و برای کشت قارچهای بی هوازی در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که این آزمایش، یک آزمایش کامل با چندین مرحله بود که آزمایش اخیر بخشی از آن می باشد.

کشت و خالص سازی قارچهای بی هوازی شکمبه

به منظور کشت و خالص سازی قارچ های بی هوازی از روش

جدول ۱- پرایمرهای PCR برای تکثیر DNA هدف (قارچ‌های شکمبه) و DNA رقابتگر

پرایمر قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه

GAF1: 5'-GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC-3'

GAF2: 5'-CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATTT-3'

پرایمر قطعه رقابتگر ساخته شده از فاز لامبدا

LaGAF1:5'-gaggaagtaaaagtcgtaacaaggttccGAAGTTCGCAGAATCGTATGTG-3'LaGAF2:5'-caaattcacaagggtaggatgatttGCTGTGGACATAGTTAATCCG-3'

ثانیه) که مراحل دو تا چهار ۳۵ سیکل تکرار شدند. پس از بهینه سازی واکنش PCR رقابتی با نمونه DNA کشت خالص، رقت های 10^{-3} تا 10^{-7} کنترل استاندارد استفاده شد. در اثر انجام واکنش PCR رقابتی به علت وجود دو نوع DNA الگو (DNA قارچ بی‌هوازی و کنترل خارجی سنتز شده) در واکنش که دارای جایگاه یکسانی برای اتصال به آغازگر می باشند، انتظار می رود بر اساس طراحی کنترل خارجی به نحوی که اندازه بیشتری از قطعه اختصاصی مربوط به قارچ های بی‌هوازی شکمبه ای داشته باشد، حاصل واکنش PCR رقابتی روی ژل آگارز دو قطعه متفاوت از نظر اندازه جفت بازها می باشد. لذا برای مشاهده محصولات PCR رقابتی از ژل آگارز ۱ درصد که با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود، استفاده گردید. در روش استفاده از نمودار استاندارد برای بررسی کمی غلظت DNA الگو نیاز به مقایسه دانسیته باند مربوط به قطعه DNA هدف و باند کنترل خارجی می باشد.

بعد از قرار دادن محصولات PCR بر ژل آگارز و انجام الکتروفورز، از باندهای ایجاد شده عکسبرداری شده و توسط نرم افزار Image J 1.38x (National Institutes of Health, USA) آنالیز شدند. اثر تیمارهای مختلف بر جمعیت قارچ‌های شکمبه با نرم افزار SAS (۲۳)، و با رویه GLM تعیین شد. برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد ($p < 0.05$).

نتایج و بحث

شکل ۱ تکثیر قطعه ۱۱۰ جفت بازی قارچ شکمبه و ۱۹۱ جفت باز توالی ژنومی فاز لامبدا را در واکنش PCR نشان می دهد. شکل ۲ نیز واکنش PCR رقابتی برای DNA استخراج شده از محیط کشت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه را نشان می دهد. نتایج به دست آمده از PCR رقابتی نشان داد (جدول ۲ و شکل ۳) که تعداد قارچ در محیط کشت حاوی کنجاله آفتابگردان عمل آوری شده با سود نسبت به دیگر نمونه ها افزایش یافت ($p < 0.05$). ولی فرمالدئید تعداد قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه در محیط کشت را کاهش داد، و اثر ۰/۶ درصد

به منظور سنتز قطعه کنترل استاندارد از یک جفت آغازگر به صورت overhang که دارای توالی GAF در دو انتهای خودش بود، استفاده گردید.

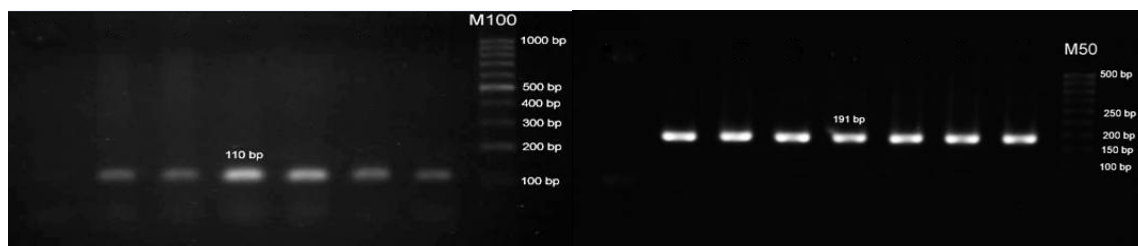
کیت Gene Pack PCR Universal و دستگاه ترموسایکلر (Biomertra, model 2000) با برنامه های حرارتی مشخص برای تکثیر قطعه ۱۱۰ جفت بازی از توالی rDNA 18S قارچ های شکمبه ای و قطعه ۱۹۱ جفت بازی کنترل خارجی یا استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش PCR شامل آب مقطر دوبار تقطیر (۷/۱ میکرولیتر)، Dilluent (۱۰ میکرولیتر)، آغازگرها (۳/۴ میکرولیتر)، DNA استخراج شده از محیط کشت خالص (۱ میکرولیتر) و Master Mix (۳ میکرولیتر) و حجم کل واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه حرارتی نیز به شرح زیر بود. ۱- ۹۴ درجه سانتی گراد (۲۴۰ ثانیه)، ۲- ۹۴ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۳- ۵۶ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۴- ۷۲ درجه سانتی گراد (۶۰ ثانیه) که مراحل دو تا چهار ۴۰ سیکل تکرار شدند. پس از مشاهده باند کنترل خارجی روی ژل آگارز ۱ درصد و تعیین اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از نشانگر وزنی M100، به منظور خالص سازی توالی کنترل خارجی از کیت Elution (Diatom DNA) استفاده گردید. آغازگرهای مربوط به قطعه رقابتگر در واکنش PCR، قطعه کنترل استاندارد را از توالی DNA فاز لامبدا تکثیر کردند و این قطعه پس از خالص سازی از روی ژل به وسیله کیت (Diatom DNA Elution) به عنوان رقابتگر در واکنش PCR رقابتی مورد استفاده قرار گرفت.

انجام PCR رقابتی

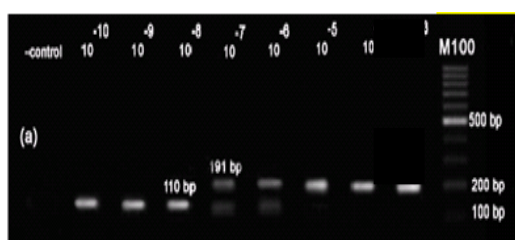
از DNA خالص سازی شده کنترل استاندارد، رقت های مختلف تهیه شد و در واکنش PCR رقابتی مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR رقابتی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و با برنامه حرارتی به شرح زیر انجام شد: ۱- ۹۴ درجه سانتی گراد (۲۴۰ ثانیه)، ۲- ۹۴ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۳- ۵۶ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۴- ۷۲ درجه سانتی گراد (۶۰ ثانیه) و ۵- ۷۲ درجه سانتی گراد (۶۰ ثانیه).

شود (۱۴)، از طرف دیگر، با برداشته شدن همی سلولز و تا حدودی لیگنین، و کاهش مقدار همی سلولز به سلولز نتیجه مثبت حاصل در دسترس قرار گرفتن سلولز برای آنزیمهای میکروارگانیسم های شکمبه است (۵). قارچهای شکمبه به دلیل رشد فیلامنت ها به داخل بافت گیاهی نفوذ کرده و طیف وسیعی از آنزیم های خارج سلولی با فعالیت بالا را ایجاد می کنند، بنابراین توانایی تجزیه تقریباً بالاتر از ۳۴ درصد لیگنین بافت گیاهی را دارند (۱۵). محققان نیز گزارش کردند، حدود ۱۶ تا ۲۰ درصد از میزان لیگنین ظرف ۴ روز انکوباسیون با قارچهای شکمبه از بین می رود و کاهش ۱۸ تا ۲۴ درصدی لیگنین در سوبسترا در طول اولین سه روز انکوباسیون مشاهده شد (۱۹). نتایج محققان (۱۸)، نشان داد، لیگنین در سورگوم عمل آوری شده با سود نسبت به مواد گیاهی عمل آوری نشده به محلول سازی مقاومتر است. نتایج به دست آمده نشان داد کنجاله آفتابگردان غنی شده با فرمالدئید، رشد و جمعیت قارچهای بی هوازی شکمبه در محیط کشت را کاهش داد. اما در مورد اثر فرمالدئید بر رشد و فعالیت قارچهای بی هوازی شکمبه اطلاعات کمی وجود دارد. به طوری که محققان گزارش کردند که عمل آوری کنجاله سویا با نیم درصد فرمالدئید باعث کاهش هضم پذیری ماده خشک می شود (۱).

فرمالدئید بر کاهش کمیت قارچ در محیط کشت بیش از ۰/۳ درصد فرمالدئید بود ($p < 0/05$). تحقیقات دیگر محققان نشان داد که عمل آوری کاه جو با سود باعث افزایش فعالیت آنزیم های سلولاز و زایلاناز قارچها و تحریک رشد قارچهای بی هوازی و تجزیه بیشتر سوبسترا توسط قارچها می شود. سود باعث افزایش تعداد جایگاه های در دسترس برای حمله میکروبی بر سطح ذرات و افزایش فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، آویکلاز^۱، زایلاناز، افزایش جمعیت قارچها در فاز جامد و مایع شکمبه، بهبود تجزیه شکمبه ای (۷)، آزاد شدن باندهای استری داخل ساختمان دیواره سلول، کاهش درگیری فیزیکی سلولز، محلول سازی همی سلولز و ترکیبات فنولی ممانعت کننده، افزایش ساکاریفیکاسیون^۲ یا تبدیل به قند شدن آنزیمی و تسهیل کلونی سازی میکروبی در دیواره سلول می شود (۱۲). محققان بیان کردند که کاهش NDF با سود به دلیل کاهش همی سلولز، نقش مهمی در افزایش هضم پذیری دارد (۶ و ۲۲). تیمارهای قلبایی باعث افزایش بخش محلول درحلال های آلی، کاهش میزان لیگنین و الیاف نامحلول در شوینده خنثی شده، همچنین این مواد آرابینوزایلان را بیش از سلولز حل کرده و باعث افزایش نرخ تجزیه ماده خشک می شوند (۱۶). آزاد شدن همی سلولز با سود باعث قابل دسترس تر شدن آن برای آنزیمها و در نتیجه افزایش راندمان بهره وری انرژی آن می



شکل ۱- تکثیر قطعه ۱۱۰ جفت بازی از توالی 18S rDNA قارچ های بی هوازی شکمبه و ۱۹۱ جفت بازی از توالی فاژ لامبدا قطعه رقابتگر یا کنترل خارجی



شکل ۲- نمونه ای از واکنش PCR رقابتی برای DNA استخراج شده از محیط کشت قارچهای بی هوازی شکمبه

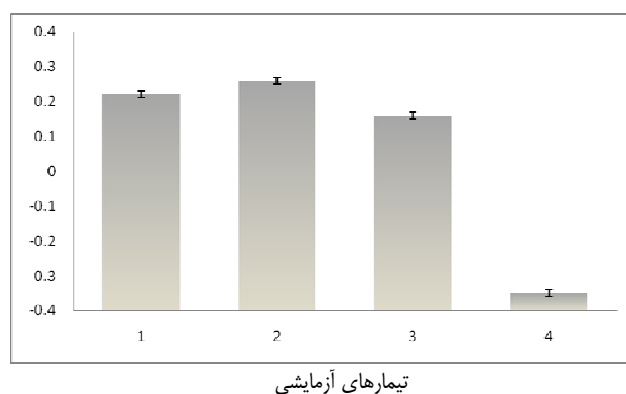
- 1- Aviclase
- 2- Saccharification

جدول ۲- تغییرات کمی جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه در محیط کشت حاوی کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با سود و یا فرمالدئید

نمونه‌های آزمایشی	نتایج رقابتی PCR رقابتی (Log T/C) در رقت‌های کنترل استاندارد				
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری نشده	-۱/۵۵ ^b	-۱/۲۵ ^b	-۰/۶۲ ^b	-۰/۳۴ ^b	۰/۳۲ ^b
کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با سود	-۱/۵۱ ^a	-۱/۱۲ ^a	-۰/۵۷ ^a	-۰/۲۲ ^a	۰/۲۶ ^a
کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با ۰/۳ درصد فرمالدئید	-۱/۶۲ ^c	-۱/۳۶ ^c	۰/۷۴ ^c	-۰/۳۰ ^c	۰/۱۶ ^c
کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با ۰/۶ درصد فرمالدئید	-۱/۷۵ ^d	-۱/۴۴ ^d	۰/۸۱ ^d	-۰/۳۹ ^d	-۰/۳۵ ^d
SEM	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱

Log (T/C): لگاریتم نسبت شدت غلظت‌های اولیه DNA هدف به DNA قطعه رقابتگر می‌باشد.

SEM: میانگین خطای استاندارد، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف و حروف غیرمشترک نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد. (p<۰/۰۵).



شکل ۳- جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه در محیط کشت حاوی کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با سود و یا فرمالدئید

تیمارهای آزمایشی شامل: ۱؛ کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری نشده (شاهد)؛ ۲؛ کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با ۴ درصد سود؛ ۳؛ کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با ۰/۳ درصد فرمالدئید؛ ۴؛ کنجاله آفتابگردان عمل‌آوری شده با ۰/۶ درصد فرمالدئید.

Log (T/C): لگاریتم نسبت شدت غلظت‌های اولیه DNA هدف به DNA قطعه رقابتگر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

که عمل‌آوری کنجاله آفتابگردان با سود باعث افزایش تعداد قارچ‌های بی‌هوازی در محیط کشت شده ولی فرمالدئید در این مورد اثر کاهشی داشت و بین دو مقدار فرمالدئید، ۰/۶ درصد تاثیر کاهشی بیشتری بر تعداد قارچ‌های بی‌هوازی داشت.

بنابراین، PCR رقابتی می‌تواند روشی مناسب برای مقایسه جمعیت و توده زنده قارچ در محیط کشت اختصاصی حاوی نمونه‌های مختلف آزمایشی باشد، و نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده

منابع

- 1- Atwal, A. S., J. S. Mahadevan, and M. S. Wolynetz. 1995. Increased milk production of cows in early lactation fed chemically treated soybean meal. *J. Dairy Sci.* 78: 595-603.
- 2- Bauchop, T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 148.
- 3- Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Janson, P. M. Wertheim-Van Dillen, and J. Van Der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503.
- 4- Canale, C. J., S. M. Abrams, G. A. Varga, and L. D. Muller. 1990. Alkali-treated orchardgrass and alfalfa: Composition and in situ digestion of dry matter and cell wall component. *J. Dairy Sci.* 73: 2404-2412.
- 5- Castro, F. B., and P. F. Machado. 1990. Feeding value of steam sugar cane bagasse in ruminant ration. *Lives. Res. rural devel.* 2 (1).
- 6- Chaudhry, A. S. 2000. Biological and chemical procedures to upgrade cereal straws for ruminants. *Nutr. Abstr. Rev. B.* 68: 319-321.
- 7- Chen, X. L., J. K. Wang, Y. M. Wu, and J. X. Liu. 2007. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal

- microbes *in vitro*. Anim. Feed Scie. Technol. 141: 1-14.
- 8- Davies, D., M. K. Theodorou, M. I. G. Lawrence, and A. P. J. Trinci. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. J. Gen. Microbiol. 139: 1395-1400.
 - 9- 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.
 - 10- 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.
 - 11- Erasmus, L. J., P. M. Botha, and H. H. Meissner. 1988. The establishment of a protein degradability data base for dairy cattle using the polyester bag technique. 1. Protein sources. S. Afr. J. Anim. Sci. 18: 23-30.
 - 12- Euna, J. S., K. A. Beauchemin, S. H. Hong, and M. W. Bauer. 2006. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. Anim. Feed Scie. Technol. 131: 86-101.
 - 13- Gaiger, A., T. Henn, E. Horth, K. Geissler, G. Mitterbauer, T. Maier-Dobersberger, H. Greinnix, C. Mannhalter, O. A. Hass, K. Lechner, and T. lion. 1995. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. Blood. 86: 2371-2378.
 - 14- Horton, G. M. J., F. M. Pate, and W. D. Pitman. 1991. The effect of steam pressure treatment, pelleting and ammoniation on the feeding value of sugarcane bagasse for cattle. Can. J. Anim. Sci. 71: 79-86.
 - 15- Krause, D. O., S. E. Denman, R. I. Mackie, M. Morrison, A. L. Rae, G. T. Attwood, and C. S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS. Microbiol. Rev. 663-693.
 - 16- Lindberg, J., E. E. Ingrid Ternrud, and O. Theander. 1984. Degradation rate and chemical composition of different types of alkali-treated straws during rumen digestion. J. Sci. Food Agric. 35: 505-506.
 - 17- Lowe, S. E., M. K. Theodorou, and A. P. J. Trinci. 1987. Isolation of anaerobic fungi from saliva and feces of sheep. J. Gen. Microbiol. 133: 1829-1834.
 - 18- McSweeney, C. S., S. E. Denman, A. D. G. Wright, and Z. Yu. 2006. Application of recent DNA/RNA-based technique in rumen ecology. Precinct, St Lucia, Qld, 4067, Australia.
 - 19- Orpin, C. G. 1983. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Anim. Feed Scie. Technol. 10: 121-143.
 - 20- Orpin, C. G. 1994. Anaerobic fungi: Taxonomy, biology, and distribution in nature. Hobson, P. N. and Wallace, R.J. (1982). Microbial ecology and activities in the rumen part I. Critical Rev. Microbiol. 9: 165-225.
 - 21- Orpin, C. G., and A. J. Letcher. 1979. Utilization of cellulose, starch, xylan and other hemicelluloses for growth by the rumen phycomycete *Neocallimastix frontlis*. Curr. Microbiol. 3: 121-124.
 - 22- 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.
 - 23- SAS. 2001. SAS User Guide (Release 7.0) SAS Ins. Ins. Cary, NC.
 - 24- Schofield, P. 2006. Gas production methods. In: D'Mello JPF, editor. Farm animal metabolism and nutrition. Wallingford, UK: CABI Publishing.
 - 25- 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. Mycol. Res. 113: 1146-1153.
 - 26- Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield, and L. Montgomery. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. J. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1079-1084.
 - 27- Theodorou, M. K., M. Gill, C. Kingspooner, and D. E. Beever. 1990. Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus-forming units- novel method for quantification of fibrolytic fungal population from the digestive-tract ecosystem. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1073-1078.
 - 28- 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 Res. 28: e18.