Archive of SID

Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 50, No 1, Spring 2018 (161-169)
DOI: 10.22059/ijfcs.2018.248084.654422

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص.۱۶۹- ۱۶۱)

سنجش تراریختی احتمالی در نمونه‌های بذر ذرت و خوراک دام و طیور بر مبنای راه‌انداز *35S* و خاتمه‌دهنده *nos*

جلال شعبانی[۱]، علیرضا طالعی[۲*]، حسین هنری[۳]

۱ و ۲. کارشناس ارشد و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۲۹)

چکیده

افزایش سطح زیر کشت گیاهان تراریخته ژنتیکی، موافقین و مخالفینی را در عرصه بین‌المللی پیدا کرده است. با توجه به مزایا و مضرات احتمالی این محصولات، سازمان‌ها و نهادهایی قوانین مربوط به ایمنی استفاده از این محصولات برای تغذیه انسان و دام و همچنین محیط زیست را وضع نموده‌اند. از این‌رو، محصولات تغییریافته ژنتیکی، به‌واسطه برچسب GMO از سایر محصولات متمایز می‌شوند. راه‌انداز *35S* و خاتمه‌دهنده *nos* که از عناصر ژنتیکی پرکاربرد در ترانسفورماسیون گیاهی هستند، به‌عنوان عناصر هدف، جهت تشخیص احتمال GMO بودن نمونه‌های آزمایشی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. مواد آزمایشی این پژوهش شامل سه نمونه بذر ذرت، یک نمونه کنجاله سویا و سه نمونه خوراک طیور بود. دو عنصر ژنتیکی هدف در تمامی نمونه‌های آزمایشی شناسایی شدند. همچنین اندوژن‌اینورتاز و اندوژن‌لکتین که به‌ترتیب به‌عنوان معیار تعیین وجود ژنوم ذرت و سویا مورد استفاده قرار گرفتند، در تمامی نمونه‌های حاوی ذرت و سویا شناسایی شدند. با توجه به پذیرش پروتکل کارتاهنا از جانب کشور ایران، امید آن می‌رود که قوانین برچسب‌گذاری محصولات GMO با جدیت بیشتری دنبال گردد.

واژه‌های کلیدی: بذر ذرت، غربالگری، تولیدات گیاهی تغییر یافته ژنتیکی، راه انداز *35S* و خاتمه‌دهنده *nos*.

Perception of possible transformation in samples of corn seed and feed for livestock and poultry based on *35S* promoter and *nos* terminator

Jalal Shabani[1], Alireza Taleei[*2] and Hosein Honari[3]

1,2. MSc and Professor in Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

3. Associate Professor in Department of Biology, University of Imam Hossain, Tehran, Iran.

(Received: December 18, 2017– Accepted: May 19, 2018)

ABSTRACT

The increased areas under cultivation of genetically modified plants have proponents and opponents in the international arena. According to potentially usefulness and harms of these products, organizations have established regulatory rules to safety use of them for feeding humans and livestock. Hence, genetically modified products have been distinguished from non-GMOs through labeling. Two more applicable genetic elements in plant transformations, *35S* promoter and *nos* terminator, were considered as targeted elements for detection of GMO products in this research. Three maize grain cultivars, one soybean meal sample, and three bird's food samples were used as experimental materials. The two-targeted genetic elements were detected in all samples. The Invertase and Lectin sequences as endogens were used for determining the presence of corn and soybean genomes as criteria. The two endogens were identified in all those of samples, which have the related genomes. In accordance to accepting of Cartagena Protocol in Iran, it's been hopped that labeling rules of GMO products follow more seriously.

Keywords: Screening, genetically modified crop products, corn seed *35S* promoter, *nos* terminator.

* Corresponding author E-mail: ataleei@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

موجودات تغییریافته ژنتیکی (GMOها)، حاصل انتقال یک یا چند ژن از یک یا چند ارگانیسم، به موجود پذیرنده آن از جمله گیاهان می‌باشند، به گونه‌ای که این انتقال ژن به طریق طبیعی و یا با روش‌های تلاقی در به‌نژادی کلاسیک ممکن نباشد (Demyttenaere, 2018). مهندسی ژنتیک در طی دو دهه أخیر، توانسته است تولید محصولات تراریخته ژنتیکی را در گستره علم بیوتکنولوژی افزایش دهد. سطح زیر کشت گیاهان تراریخته در جهان طی چند سال گذشته با روندی تصاعدی افزایش داشته است، به‌طوری که سطح زیر کشت این محصولات از سال ۱۹۹۶ با ۱/۷ میلیون هکتار تا سال ۲۰۱۶ با ۱۸۵/۱ میلیون هکتار، مجموعاً به ۲ میلیارد هکتار رسیده است (ISAAA, 2016). با توجه به آمار رو به رشد سطح زیر کشت این محصولات در سرتاسر جهان، اهمیت این محصولات در سبد غذایی بشر و همچنین مزایا و مضرات احتمالی آن بر سلامت و محیط زیست انسانی، توجه بسیاری از پژوهشگران عرصه ایمنی زیستی به این محصولات جلب شده است (Alexandrova *et al*., 2005). به‌دلیل اهمیت این موضوع، طی دو دهه گذشته، سازمان‌های بین المللی مسئول، تبیین قوانین و تعیین سیاست‌های لازم جهت تضمین سلامت مواد غذایی تراریخته را بر عهده گرفته و در این راستا راهبردها و دستورالعمل‌های متعددی ایجاد شده است (ISAAA, 2016). پروتکل ایمنی زیستی جهان شمول کارتاهِنا[1] از جمله این سیاست‌ها می‌باشد که بر اساس آن، برآورد سلامت محصولات تراریخته تنها بر اساس اثبات‌شدن برابری همه جانبه آنها با محصولات غیرتراریخته و همچنین انجام آزمایش‌های تخصصی در زمینه حساسیت‌زا بودن پروتئین‌ها، سمیت متابولیت‌ها و مواد غذایی حاصل از فرآوری آنها تأیید می‌شود. هدف این پروتکل عبارت است از نقل و انتقال ایمن مواد و محصولات تراریخته در دنیا و همچنین اطمینان از این مسئله که GMOها تنوع زیستی را به خطر نمی‌اندازند (Alexandrova *et al*., 2005). با توجه به کاربرد بیوتکنولوژی در توسعه پایدار، جمهوری اسلامی ایران نیز در سال ۲۰۰۱ میلادی، پروتکل کارتاهِنا را امضا و از سال ۲۰۰۴ رسماً به اجرای آن متعهد شده است (Hashemi & Shojae Al-sadati, 2012). اولین موجود تغییریافته ژنتیکی تجاری‌سازی شده، گوجه‌فرنگی Flavr Savr بود که در سال ۱۹۹۴ معرفی شد (Fraiture *et al*., 2015). با برچسب‌گذاری این محصول، وضع قوانین و مقررات جدید کمیسیون اتحادیه اروپا در ارتباط با برچسب‌گذاری محصولات تغییریافته ژنتیکی از سال ۱۹۷۷ آغاز شد (Bonfini, 2002).

با توجه به این مهم که از ژن‌های مقاومت به آنتی-بیوتیک به‌عنوان ژن‌های نشانگر در مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود، نگرانی‌هایی در زمینه انتقال این ژن‌ها به انسان و حیوانات مصرف‌کننده این‌گونه محصولات وجود دارد. بر اساس گزارش‌های انجمن پزشکی انگلستان، امکان انتقال ژن‌های نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک از محصولات تراریخته به میکروب‌های عامل بیماری در دستگاه گوارش انسان و حیوانات مصرف‌کننده این محصولات وجود دارد. این خطر می‌تواند منجر به تولید میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده و مشکل افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک را در جوامع بشری افزایش دهد (Hileman, 1999). به طوری که در یک آزمایش صورت‌گرفته در هلند، پیش‌بینی شد حداقل ۶ درصد از ژن‌های تراریخته گوجه‌فرنگی، در صورت تغذیه بتوانند سالم باقی بمانند، وارد روده بزرگ انسان شده و در آنجا جذب باکتری‌ها شوند و در نتیجه ممکن است باعث مقاومت این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک شوند (Vossen *et al*., 1998). انتقال افقی تراژن از گیاهان تراریخته به گیاهان موجود در محیط اطراف، احتمال ایجاد علف‌های‌هرز مقاوم به علفکش و همچنین تهدید تغییر تنوع پوشش گیاهی، به‌علاوه تغییر نظام‌زیستی منطقه با توجه به حذف بسیاری از موجودات مفید طبیعت از جمله حشرات پارازیت آفات و ریز سازواره‌های مفید خاک که می‌تواند عارضه‌ای خطرناک و ناشی از مصرف بی‌رویه سم گلایفوسیت در مزارع گیاهان تراریخته و وجود سم Bt در این گیاهان باشد، از جمله دغدغه‌های امروز حامیان محیط زیست و NGOهای حامی کشاورزی زیستی هستند. از دیگر مشکلات محصولات تراریخته در بخش کشاورزی، می‌توان به عدم امکان استفاده از بذر کشت سال قبل و وابستگی کشاورزان به شرکت‌های چند ملیتی تولیدکننده این بذرهای تراریخته ژنتیکی اشاره نمود. دلیل این موضوع، القای ژن خاتمه‌دهنده در ژنوم بذرهای تراریخته در طی

1 . Cartagena protocol

www.SID.ir

Archive of SID

فرآیند تولید می‌باشد که این مهم امکان کشت بیش از یک مرتبه آن بذر را از کشاورزان گرفته و آنها را به این نحو به خود وابسته می‌کنند. این محدودیت به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، تهدیدی برای توسعه کشاورزی به‌شمار می‌رود (Hashemi & Shojae Al-sadati, 2012).

سویا، ذرت، پنبه و کلزا چهار محصول عمده تراریخته-شده در دنیا هستند که در سال ۲۰۱۶، به‌ترتیب مساحتی معادل ۹۱/۴، ۶۰/۶، ۲۲/۳ و ۸/۶ میلیون هکتار سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده‌اند (ISAAA, 2016). از طرفی اغلب این محصولات در حال حاضر برای تأمین نیاز غذایی کشور، وارد می‌شوند. بسیاری از کشورهای دنیا از جمله روسیه کشت و واردات محصولات تراریخته به کشورشان را ممنوع اعلام کرده‌اند. برخی نیز از جمله کشورهای حوزه اتحادیه اروپا، ورود یا عرضه محصولات تراریخته را منوط به برچسب‌دار بودن آنها کرده‌اند. کشور ایران علی‌رغم پذیرفتن پروتکل کارتاهنا، هنوز اقدامی جدی و گسترده جهت برچسب‌دارنمودن محصولات GMO انجام نداده است. از این‌رو هدف این آزمایش ارزیابی چندین محصول موجود در بازار مصرف، جهت تعیین وجود احتمالی عناصر تراریختی در آنها بود.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی

بذر سه رقم ذرت به‌همراه یک نمونه کنجاله سویا به‌عنوان مواد اولیه مورد آزمایش، در مرحله نخست این پژوهش در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه مهندسی‌ژنتیک گروه زراعت و اصلاح‌نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران مورد بررسی قرار گرفتند. ارقام ذرت عبارت بودند از ذرت تهیه‌شده در استان خوزستان، ذرت وارداتی از بندر امام-خمینی و ذرت تهیه‌شده در شهرستان دزفول. پس از استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و مشاهده نتایج، جهت تأیید نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش مرحله اول، بذرهای سه رقم ذرت ذکرشده جوانه‌دار شدند و استخراج DNA از جوانه آنها صورت گرفت. مدت زمان لازم برای رسیدن جوانه‌ها به اندازه مطلوب ۱۲-۱۰ روز بود. علاوه بر این، سه نمونه خوراک طیور نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. بدین منظور یک نمونه خوراک طیور پلت‌شده از شهرستان تربت حیدریه و دو نمونه دیگر شامل یک نمونه خوراک طیور پلت‌شده و یک نمونه پودر مخلوط خوراک طیور از استان البرز تهیه شدند. نمونه‌های پلت‌شده حاوی ذرت و کنجاله سویا بودند. نمونه پودر مخلوط نیز طبق ادعای فروشنده حاوی بذر ذرت، کنجاله سویا و به نسبت بیشتری بذر گندم بود. تمامی نمونه‌های مورد آزمایش تحت یک روش آزمایشگاهی مورد آزمون قرار گرفتند.

آماده سازی نمونه‌ها

به‌منظور استخراج DNA از نمونه‌های آزمایشی، در ابتدای کار، این مواد در هاون و با کمک نیتروژن مایع (دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) به‌طور کامل پودر شدند. سپس برای هر نمونه آزمایشی، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر همگن و یکنواخت به‌دست آمده در یک ویال ۲ میلی‌لیتری ریخته و پس از اختصاص کد به هر ویال، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA، تعیین کمیت و کیفیت

استخراج DNA از تمامی نمونه‌ها به‌روش CTAB انجام گرفت. مقدار ۷۵۰ میکرولیتر از بافر استخراج DNA به تیوب دو میلی‌لیتری حاوی پودر نمونه مورد آزمایش اضافه شد. این تیوب‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه، در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد حمام آب‌گرم قرار داده شدند. بعد از اتمام این مرحله، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع فاز بالایی به تیوب جدید منتقل و معادل ۰/۷ حجم این مایع، به آن کلروفرم اضافه شد. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. در مرحله بعد، مایع فاز بالایی با دقت به یک تیوب جدید منتقل و دو برابر حجم آن، بافر رسوب CTAB به آن اضافه و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به-مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی دور ریخته شد و به رسوب باقیمانده، ۳۵۰ میکرولیتر کلریدسدیم با غلظت ۱/۲ مول بر لیتر و ۳۵۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. پس از ده مرتبه سر و ته کردن تیوب، به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی به تیوب جدید منتقل و ۰/۶ حجم آن به آن ایزوپروپانول اضافه شد. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه

www.SID.ir

Archive of SID

سانتریفیوژ و مایع رویی به آرامی دور ریخته شد و به رسوب باقیمانده در انتهای تیوب، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ ٪ اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله آخر، مایع رویی به آرامی دور ریخته شد و پس از خشک‌شدن کامل مایع داخل تیوب‌ها، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تعیین کمیت DNA استخراجی توسط دستگاه نانودراپ و تعیین کیفیت آن با الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ انجام شد.

تکثیر DNA با روش PCR

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این آزمایش، از چهار جفت آغازگر استفاده شد. جفت آغازگر *Inver*F/*Inver*R برای تأییدشدن وجود ژنوم ذرت در نمونه مورد آزمایش به‌کار رفت (Fernandes *et al*., 2014). جهت تأیید وجود ژنوم سویا در نمونه‌های مورد آزمایش، از جفت آغازگر *LectinF*/*LectinR* استفاده شد (Berdal & Holst-Jensen, 2001). جفت آغازگر P-*35S*F/P-*35S*R و همچنین جفت آغازگر T-*nos*F/T-*nos*R نیز به‌عنوان آغازگرهای نشانگر هدف به‌کار رفتند. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیناکلون تهیه شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مقدار ۲ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده معادل ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۷/۵ میکرولیتر بافر مستر میکس PCR (Ampliqon Taq DNA Polymerase Master Mix RED 1.25ml)، یک میکرولیتر از هر آغازگر رو به جلو و عقب‌گرد و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر داخل یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری مخلوط و با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر، در دستگاه ترموسایکلر حرارتی قرار داده شد. جهت تأیید صحت و دقت آزمایش از یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت استفاده شد. نمونه کنترل منفی حاوی تمام اجزای مخلوط آماده‌شده برای PCR به‌جز DNA الگو بود. به این ترتیب که این نمونه شامل ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس PCR (Ampliqon Taq DNA Polymerase Master Mix RED 1.25ml)، یک میکرولیتر از هر آغازگر رو به جلو و عقب‌گرد از توالی‌های هدف (P-*35S* و T-*nos*) در هر نمونه و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر بود. مراحل آماده‌سازی نمونه کنترل مثبت هم مشابه نمونه کنترل منفی بود؛ با این تفاوت که از پلاسمید PBI-322 که حاوی توالی‌های P-*35S* و T-*nos* می‌باشد به‌عنوان DNA الگو استفاده شد. برای ایجاد کنترل مثبت توالی P-*35S*، جفت آغازگر P-*35S*F/P-*35S*R و برای تهیه کنترل مثبت توالی T-*nos*، جفت آغازگر T-*nos*F/T-*nos*R به‌کار رفتند. مشخصات هر یک از آغازگرها در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- طول توالی تکثیرشونده، طول قطعه، سریال ژنومی، توالی و مرجع آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر توالی‌های ژنی P-*35S*، T-*nos*، اینورتاز و لکتین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

Table 1- Characterizations of sequence, length, accession number, amplified sequence length, and reference of P-*35S*, T-*nos*, Inver, and Lectin primers using PCR.

Primer	Amplicon length	Length of primer	Accession number	Sequence of primer	Reference
Inver F	225 bp	25 bp	XM_008670214.3	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC	Ehlers *et al* (1997)
Inver R		25 bp		GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC	
Lectin F	210 bp	20 bp	NM_001354824.1	CTTTCTCGCACCAATTGACA	Berdal and Holst-Jensen (2001)
Lectin R		20 bp		TCAAACTCAACAGCGACGAC	
P-*35S* F	195 bp	21 bp	KX252716.1	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG	ISO 21569 (2005)
P-*35S* R		24 bp		TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTC	
T-*nos* F	180 bp	24 bp	MF116010.1	CGATGACGTTATTTATGAGATGGG	ISO 21569 (2005)
T-*nos* R		24 bp		GACACCGCGCGCGATAATTTATCC	

الکتروفورز ژل آگارز

پس از تهیه ژل آگارز ۲ درصد، محصولات PCR در چاهک‌های ژل آگارز بارگذاری و با جریان v ۹۰ به‌مدت ۹۰ دقیقه، الکتروفورز انجام شد. در هر چاهک، محصول نهایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌همراه ۲ میکرولیتر دای و ۰/۳ میکرولیتر ژلرد مخلوط و بارگذاری شد. برای مشخص‌کردن طول قطعات حاصل از تکثیر PCR، یک نشانگر اندازه با قابلیت تفکیک قطعات با طول توالی ۱۰۰ نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفت که از شرکت سیناکلون تهیه شد.

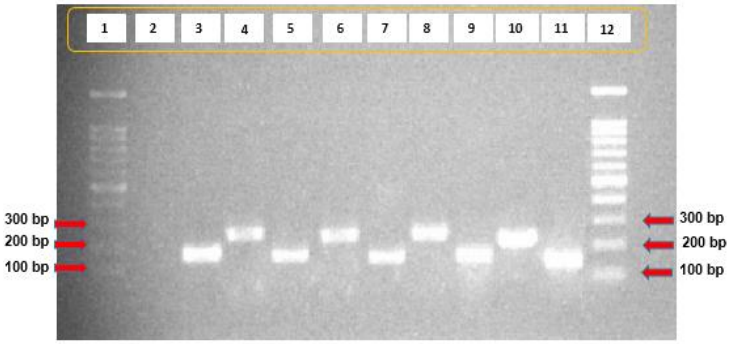
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

شناسایی راه‌انداز 35S در بذر ذرت و کنجاله سویا

توالی به‌دست آمده از واکنش PCR برای P-*35S* در این مطالعه که با سه تکرار انجام شد، دارای طول قطعه ۱۹۵ جفت‌باز بود. همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، راه‌انداز *35S* در بذر ذرت وارداتی از بندر امام، بذر ذرت تهیه‌شده از خوزستان و همچنین بذر ذرت تهیه‌شده از دزفول تشخیص داده شد. علاوه بر توالی هدف، برای تایید گونه گیاهی مورد آزمایش، ژن اینورتاز که یک اندوژن در گیاه ذرت می‌باشد، با طول توالی ۲۲۵ جفت‌باز نیز برای هر رقم ذرت در ژل الکتروفورز بارگذاری شد. در نمونه کنجاله سویا نیز از ژن لکتین با طول قطعه ۲۱۰ جفت‌باز که یک اندوژن تأییدشده برای گیاه سویا محسوب می‌شود، برای تأیید وجود ژنوم سویا در نمونه مورد آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاکی از وجود راه‌انداز *35S* در این نمونه کنجاله سویا بود.



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز راه‌انداز *35S* چاهک‌ها به‌ترتیب از چپ به راست؛ ۱- نشانگر اندازه. ۲- کنترل منفی. ۳- کنترل مثبت راه‌انداز *35S*. ۴- ژن اینورتاز در بذر ذرت دزفول. ۵- راه‌انداز *35S* در بذر ذرت دزفول. ۶- ژن اینورتاز در بذر ذرت وارداتی از بندر امام. ۷- راه‌انداز *35S* در بذر ذرت وارداتی از بندر امام. ۸- ژن اینورتاز در بذر ذرت خوزستان. ۹- راه‌انداز *35S* در بذر ذرت خوزستان. ۱۰- ژن لکتین در کنجاله سویا. ۱۱- راه‌انداز *35S* در کنجاله سویا. ۱۲- نشانگر اندازه.

Figure 1- Agarose gel electrophoresis of P-*35S*. The wells are from left to right as: 1. Size marker. 2. Negative control. 3. Positive control for P-*35S*. 4. *Inver* in Dezfool sample. 5. P-*35S* in Dezfool sample. 6. *Inver* in Imam Port sample. 7. P-*35S* in Imam Port sample. 8. *Inver* in Khoozestan sample. 9. P-*35S* in Khoozestan sample. 10. *Lectin* in soybean meal. 11. P-*35S* in soybean meal. 12. Size marker.

تشخیص خاتمه‌دهنده *nos* در بذر ذرت و کنجاله سویا

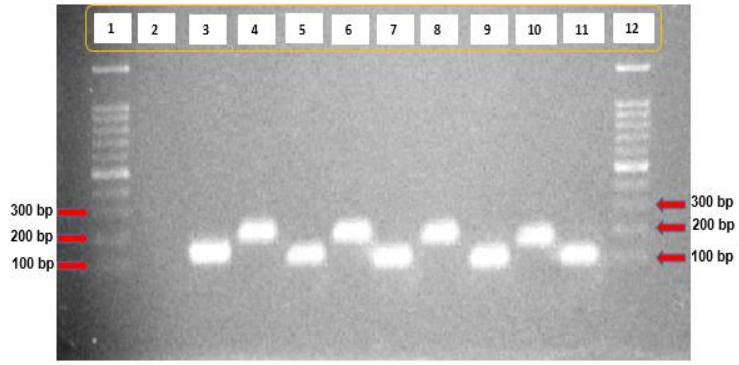
الکتروفورز ژل آگارز برای T-*nos* نشان داد که این خاتمه‌دهنده در تمامی سه رقم بذر ذرت و کنجاله سویا مورد آزمایش وجود دارد. طول قطعه هدف T-*nos* در این پژوهش ۱۸۰ جفت‌باز بود. همچنین ژن‌های اینورتاز با طول قطعه ۲۲۵ جفت‌باز و لکیتن با طول توالی ۲۱۰ جفت‌باز نیز به‌عنوان ژن‌های تأییدکننده گونه گیاهی در تمامی نمونه‌ها به‌خوبی شناسایی شدند (شکل ۲). این آزمایش با سه تکرار انجام شد.

جوانه‌های ذرت

به‌منظور تأیید نتایج به‌دست آمده از استخراج DNA از بذر ذرت و الکتروفورز محصول PCR این DNA، بذرهای سه رقم ذرت مورد آزمایش (تهیه‌شده از دزفول، واردشده از بندر امام و تهیه‌شده از خوزستان)، در شرایط درون شیشه‌ای جوانه‌دار شدند. مدت زمان لازم برای رسیدن جوانه‌ها به‌اندازه کافی و مناسب جهت استخراج DNA حدود ۱۲-۱۰ روز بود. نتایج به‌دست آمده از الکتروفورز ژل آگارز بر روی محصولات PCR در هر دو نمونه بذری و جوانه بذر یکسان بودند. آزمایش بر روی جوانه‌های بذر ذرت نیز با سه تکرار انجام شد. در جوانه‌های هر سه رقم ذرت ژن اینورتاز که به‌عنوان اندوژن گیاه ذرت به‌کار رفت، شناسایی شد. همچنین همان‌گونه که در بذر این سه رقم ذرت، توالی‌های P-*35S* و T-*nos* شناسایی شدند، در جوانه‌های حاصل از بذر آنها نیز این اجزای ژنتیکی شناسایی شدند (شکل ۳). نمونه‌گیری از جوانه بذرهای این سه رقم ذرت به‌صورت همزمان انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز خاتمه‌دهنده *nos*. چاهک‌ها به‌ترتیب از چپ به راست؛ ۱- نشانگر اندازه. ۲- کنترل منفی. ۳- کنترل مثبت خاتمه‌دهنده *nos*. ۴- ژن اینورتاز در بذر ذرت دزفول. ۵- خاتمه‌دهنده *nos* در بذر ذرت دزفول. ۶- ژن اینورتاز در بذر ذرت وارداتی از بندر امام. ۷- خاتمه‌دهنده *nos* در بذر ذرت وارداتی از بندر امام. ۸- ژن اینورتاز در بذر ذرت خوزستان. ۹- خاتمه‌دهنده *nos* در بذر ذرت خوزستان. ۱۰- ژن لکتین در کنجاله سویا. ۱۱- خاتمه‌دهنده *nos* در کنجاله سویا. ۱۲- نشانگر اندازه.

Figure 2- Agarose gel electrophoresis of T-*nos*. The wells are from left to right as: 1. Size marker. 2. Negative control. 3. Positive control for T-*nos*. 4. *Inver* in Dezfool sample. 5. T-*nos* in Dezfool sample. 6. *Inver* in Imam Port sample. 7. T-*nos* in Imam Port sample. 8. *Inver* in Khoozestan sample. 9. T-*nos* in Khoozestan sample. 10. *Lectin* in soybean meal. 11. T-*nos* in soybean meal. 12. Size marker.

پلت‌های خوراک طیور

نمونه‌های پلت‌شده خوراک طیور که از استان البرز و شهرستان تربت‌حیدریه تهیه شده بودند به‌عنوان نمونه‌هایی از جامعه خوراک طیور که به‌صورت پلت در اختیار پروش-دهندگان طیور قرار می‌گیرد، در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در هر دو نمونه که حاوی ذرت و سویا بودند، ژن‌های اینورتاز و لکتین، اندوژن‌های به‌کارفته در این آزمایش برای این دو گونه گیاهی، در هر دو نمونه استان البرز و شهرستان تربت‌حیدریه شناسایی شدند. همچنین دو عنصر ژنتیکی هدف در این پژوهش یعنی P-*35S* و T-*nos* نیز در هر دو نمونه شناسایی شدند. این آزمایش با سه تکرار انجام شد (شکل ۴).

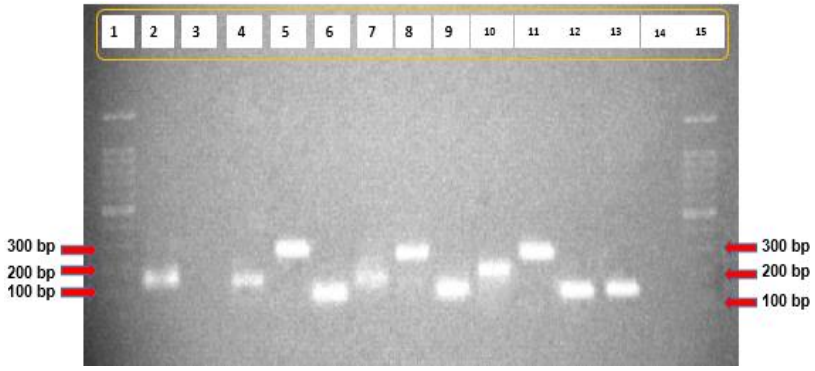
نمونه مخلوط خوراک طیور

یکی دیگر از نمونه‌های مورد استفاده برای تغذیه طیور، خوراکی است که از مخلوط و پودر کردن بذر ذرت، بذر گندم، کنجاله سویا و ... به‌دست می‌آید. جهت آزمون وجود یا عدم وجود عناصر P-*35S* و T-*nos* در این نوع از خوراک طیور، آزمایشی با سه تکرار بر روی این نمونه خوراک مخلوط انجام شد. نتایج نشان داد که در این نمونه هر دو عنصر ژنتیکی P-*35S* و T-*nos* وجود داشتند؛ اما با توجه به وجود مخلوطی از مواد، مشخص‌کردن این سوال که هر یک از این عناصر متعلق به کدامیک از اجزای این مخلوط است، اجرایی نبود. دو اندوژن مورد استفاده در این پژوهش یعنی اینورتاز و لکتین، در این نمونه مخلوط خوراک نیز شناسایی شدند (شکل ۵). در یک آزمایش موردی در طول مدت چهار سال، از ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۵ با توجه به ممنوعیت کشت گیاهان GM در لهستان، نمونه‌های وارداتی حاوی گیاه کلزا را مورد بررسی قرار دادند. آنها برای داشتن شاهدی بر اینکه از کشورهای همسایه چه نمونه‌هایی (GM یا غیر GM) وارد می‌شود، کشور مبدأ هر نمونه را ثبت نمودند. ضرورت تحقیق خود را این‌گونه توجیه کردند که چون گیاه کلزا به‌طور طبیعی قابلیت تلاقی با گونه‌های خویشاوند را دارا است و ژن انتقالی کلزای GM می‌تواند به‌راحتی به سایر این خویشاوندان منتقل شود، می‌بایست به کنترل وجود کلزای GM در علوفه دام‌ها و به‌طور خاص‌تر در مقوله و بحث مربوط به تولید گیاهانی که به‌عنوان گیاهان GMO-free مطرح می‌شوند توجه بیشتری داشت؛ در غیر این-صورت، احتمال گسترش بدون کنترل کلزای GM بسیار بالا خواهد بود (Mazur *et al.*, 2017). یکی از موارد مورد تأکید درباره برچسب‌گذاری محصولات تراریخته و متمایز بودن آنها از سایر محصولات، حق انتخاب مصرف‌کننده می-باشد و این قانون در اتحادیه اروپا به رسمیت شناخته شده است. در فرآیند شناسایی محصولات GMO، گام نخست

www.SID.ir

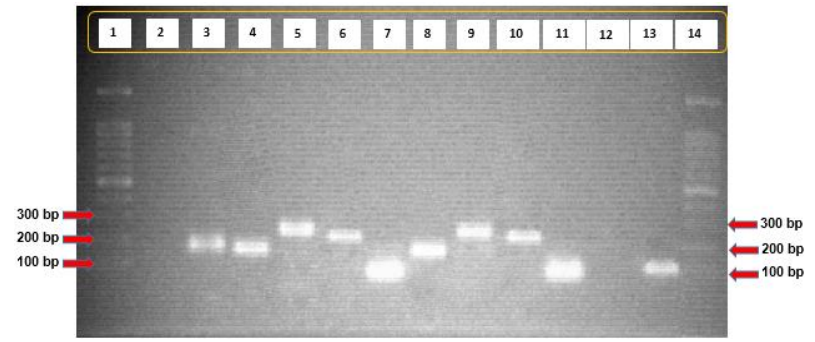
Archive of SID

یک مرحله غربالگری است و نمونه‌هایی که حاوی هر گونه ماده GM باشند را نشان می‌دهد، چرا که مشخص شده است موجودات تغییریافته ژنتیکی حاوی عناصر غربالگری هستند و این غربال عموماً نشانه‌ای از شناسایی بالقوه هر گونه GMO شناخته‌شده‌ای است (Rosa *et al*., 2016). این مرحله از روش‌هایی استفاده می‌کند که بتوانند توالی‌های تنظیمی، ژن‌ها و یا سازه‌های با مورد استفاده فراوان در ترانسفورماسیون گیاهی را شناسایی کنند. از جمله این عناصر راه‌انداز *35S* و خاتمه‌دهنده *nos* هستند که در اغلب ترانسفورماسیون‌های گیاهی به‌عنوان عناصر تنظیمی تراژن الحاقی عمل می‌کنند.



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز جوانه‌های ذرت. چاهک‌ها به‌ترتیب از چپ به راست؛ ۱- نشانگر اندازه. ۲- کنترل مثبت راه‌انداز *35S*. ۳- کنترل منفی. ۴- راه‌انداز *35S* در جوانه ذرت وارداتی از بندر امام. ۵- ژن اینورتاز در جوانه ذرت وارداتی از بندر امام. ۶- خاتمه‌دهنده *nos* در جوانه ذرت وارداتی از بندر امام. ۷- راه‌انداز *35S* در جوانه ذرت دزفول. ۸- ژن اینورتاز در جوانه ذرت دزفول. ۹- خاتمه‌دهنده *nos* در جوانه ذرت دزفول. ۱۰- راه‌انداز *35S* در جوانه ذرت خوزستان. ۱۱- ژن اینورتاز در جوانه ذرت خوزستان. ۱۲- خاتمه‌دهنده *nos* در جوانه ذرت خوزستان. ۱۳- کنترل مثبت خاتمه دهنده *nos*. ۱۴. کنترل منفی. ۱۵- نشانگر اندازه.

Figure 3- Agarose gel electrophoresis in maize seedling. The wells are from left to right as: 1. Size marker. 2. Positive control for P-*35S*. 3. Negative control. 4. P-*35S* in Imam Port sample. 5. *Inver* in Imam Port sample. 6. T-*nos* in Imam Port sample. 7. P-*35S* in Dezfool sample. 8. *Inver* in Dezfool sample. 9. T-*nos* in Dezfool sample. 10. P-35S in Khoozestan sample. 11. *Inver* in Khoozestan sample. 12. T-*nos* in Khoozestan sample. 13. Positive control for T-*nos*. 14. Negative control. 15. Size marker.

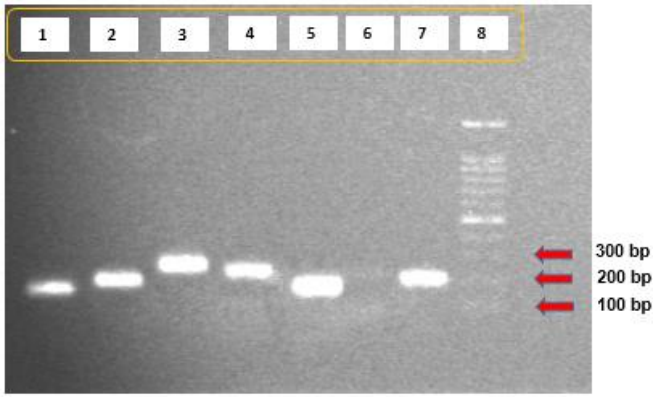


شکل ۴- الکتروفورز ژل آگارز پلت‌های خوراک طیور. چاهک‌ها به‌ترتیب از چپ به راست؛ ۱- نشانگر اندازه. ۲- کنترل منفی. ۳- کنترل مثبت راه‌انداز *35S*. ۴- راه‌انداز *35S* پلت خوراک طیور نمونه تربت‌حیدریه. ۵- ژن اینورتاز پلت خوراک طیور نمونه تربت‌حیدریه. ۶- ژن لکتین پلت خوراک طیور نمونه تربت‌حیدریه. ۷- خاتمه‌دهنده *nos* پلت خوراک طیور نمونه تربت‌حیدریه. ۸- راه‌انداز *35S* پلت خوراک طیور نمونه البرز. ۹- ژن اینورتاز پلت خوراک طیور نمونه البرز. ۱۰- ژن لکتین پلت خوراک طیور نمونه البرز. ۱۱- خاتمه‌دهنده *nos* پلت خوراک طیور نمونه البرز. ۱۲- کنترل منفی. ۱۳- کنترل مثبت خاتمه‌دهنده *nos*. ۱۴- نشانگر اندازه.

Figure 4- Agarose gel electrophoresis in poultry feed pellets. The wells are from left to right as: 1. Size marker. 2. Negative control. 3. Positive control for P-*35S*. 4. P-*35S* in Torbat-e Heydarieh sample. 5. *Inver* in Torbat-e Heydarieh sample. 6. *Lectin* in in Torbat-e Heydarieh sample. 7. T-*nos* in Torbat-e Heydarieh sample. 8. P-*35S* in Alborz sample. 9. *Inver* in Alborz sample. 10. *Lectin* in Alborz sample. 11. T-*nos* in Alborz sample. 12. Negative control. 13. Positive control for T-*nos*. 14. Size marker.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- الکتروفورز ژل آگارز نمونه مخلوط خوراک طیور. چاهک‌ها به‌ترتیب از چپ به راست؛۱- کنترل مثبت ژن T-*nos*. ۲- ژن P-*35S* در نمونه مخلوط خوراک طیور. ۳- ژن اینورتاز در نمونه مخلوط خوراک طیور. ۴- ژن لکتین در نمونه مخلوط خوراک طیور. ۵- ژن T-*nos* در نمونه مخلوط خوراک طیور. ۶- کنترل منفی. ۷- کنترل مثبت ژن P-*35S*. ۸- نشانگر اندازه.

Figure 5- Agarose gel electrophoresis in mixed bird feed. The wells are from left to right as: 1. Positive control for T-*nos*. 2. P-35S in mixed bird feed. 3. *Inver* in mixed bird feed. 4. *Lectin* in mixed bird feed. 5. T-*nos* in mixed bird feed. 6. Negative control. 7. Positive control for P-*35S*. 8. Size marker.

همان‌طور که در نتایج این پژوهش دیده می‌شود، تمامی نمونه‌های مورد آزمایش دارای این دو عنصر ژنتیکی بودند، اما از آن‌جا که پیاده‌سازی قوانین برچسب‌گذاری، تا به‌حال در ایران به‌طور گسترده عملی نشده است، نوع عامل تراریختی و مقدار آن برای این‌گونه محصولات مشخص نیست. در دسترس‌بودن اطلاعات مبدأ و ماهیت یک نمونه UGM[1] (به‌ویژه اطلاعات مولکولی)، وجود روش‌های تشخیص قابل اعتماد و در دسترس‌بودن مواد مرجع مناسب، از لزومات اولیه برای تشخیص یک نمونه UGM هستند (Holst-Jensen *et al*., 2011). تمامی نمونه‌های مورد آزمایش در این پژوهش، در گروه موادی قرار می‌گیرند که هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد پس‌زمینه ژنتیکی آنها از جنبه وجود تغییر ژنتیکی به‌صورت مهندسی‌ژنتیک موجود نیست. لذا تصمیم‌گیری در مورد این‌که آیا این نمونه‌ها جزو دسته GM گروه‌بندی شوند یا خیر، بسیار دشوار است. برای پی‌بردن به ماهیت دقیق این نمونه‌ها و نمونه‌هایی از این دست، مطمئن‌ترین روش توالی‌یابی پهنه ژنوم این محصولات است. اما با توجه به هزینه‌های بالای این فن‌آوری و عدم وجود سیستم ابزار لازم برای انجام این فرایند در کشور، در حال حاضر می‌بایست به روش‌های دیگری اتکا نمود. از جمله این روش‌ها می‌توان به جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی ویژه GMO، طراحی آغازگرهایی برای ژن‌هایی که بیشترین احتمال برای وجود آنها در نمونه‌ها انتظار می‌رود و انجام PCR ساده یا qPCR اشاره نمود. لذا عدم آگاهی از نوع ترانسفورماسیون صورت‌گرفته و ژن(های) الحاقی، حصول موفقیت کامل را با چالش بزرگی مواجه می‌کند. این نکته را نیز باید در ذهن داشت که ممکن است ژن(هایی) به گیاه منتقل شده باشند، که تا به حال در هیچ پایگاه اطلاعاتی به ثبت نرسیده باشند و حتی در صورت تشخیص نوع عامل تراریختی، هنوز نمی‌توان از عدم وجود سایر تراژن‌ها اطمینان داشت. طبق مصوبه اتحادیه اروپا، برای نمونه‌های UGM در اروپا، نیازی به سنجش کمیت مقدار GM در آنها وجود ندارد مگر اینکه جزو دسته UGMهایی باشند که تحت پوشش ماده شماره ۴۱۹/۲۰۱۱ قوانین این کمیسیون قرار گرفته باشند (European Commission, 2001). روش‌های با اختصاصیت پایین، احتمال بالاتری برای تشخیص UGM دارند؛ چرا که ممکن است UGM مد نظر محقق، از همتای خودش در یک GMO دیگر اندکی متفاوت باشد. با این‌حال، ممکن است با ترکیب چند آزمایش با اختصاصیت پایین برای اهداف گوناگون، از طریق همگرایی شناسایی‌های ناشی از تفسیر داده‌ها، به یک تشخیص اختصاصی دست یافت (Holst-Jensen *et al*., 2011).

نتیجه‌گیری کلی

در هر فرآیند مربوط به شناسایی محصولات GMO، گام نخست غربال‌کردن نمونه‌هایی است که پتانسیل تراریخته-

1 . Unknown genetically modified

www.SID.ir

Archive of SID

بودن را دارا می‌باشند. یکی از راه‌های ارزیابی این پتانسیل، بررسی وجود عناصر ژنتیکی است که به‌وفور در محصولات GMO یافت می‌شوند. در این پژوهش راه‌انداز *35S* و خاتمه‌دهنده *nos* به‌عنوان عناصر هدف جهت پی‌بردن به این پتانسیل در نمونه‌های مورد آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. از آنجایی که حضور یا عدم حضور این عناصر به‌طور غیرمستقیم گویای وجود یا عدم وجود این پتانسیل در نمونه‌های مورد آزمون است؛ لذا اثبات یا نفی GMO بودن یک نمونه، مستلزم اعمال آزمون‌های تکمیلی از جمله بررسی وجود تراژن‌های هدف از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و یا توالی‌یابی و تعیین کمیت آن به‌واسطه qPCR در ژنوم نمونه مورد مطالعه است.

REFERENCES

1. Alexandrova, N., Georgieva, K. & Atanassov, A. (2005). Biosafety regulations of GMOs: national and international aspects and regional cooperation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19(sup3), 153-172.
2. Berdal, K. G. & Holst-Jensen, A. (2001). Roundup Ready® soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *European Food Research and Technology*, *213*(6), 432-438.
3. Bonfini, L. (2002). Review of GMO detection and quantification techniques. *Institute for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods Unit*.
4. Demyttenaere, J. C. (2018). Natural or Synthetic? The Legal Framework in the EU for the Production of Natural Flavouring Ingredients. In *Biotechnology of Natural Products*. 281-305. Springer, Cham.
5. Ehlers, B., Strauch, E., Goltz, M., Kubsch, D., Wagner, H., Maidhof, H., Bendiek, J., Appel, B. & Buhk, H. J. (1997). Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundheitsblatt*, 40(4).118-121.
6. European Commission. (2001). Directive 2001/18/EC of the European Parliament and the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Official Journal of the European Communities* L106: 1-38.
7. Fernandes, T. J., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. & Mafra, I. (2014). A survey on genetically modified maize in foods commercialised in Portugal. *Food Control*, *35*(1), 338-344.
8. Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., & Roosens, N. H. (2015). Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. *Biomedical Research International*. 22 pages.
9. Hashemi, M. & Shojae Al-sadati, S.A. (2012). Genetically- modified food: opportunities and challenges. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 7(24).89-102. (In Farsi)
10. Hileman, B. (1999). UK moratorium on biotech crops urged. *Chemical & Engineering News*, 77(21), 7-7.
11. Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., Allnutt, T., Broll, H., De Loose, M., Grohmann, L., Henry, C., Hougs, L., Moens, W., Morisset, D. & Ovesna, J. (2011). Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials. *EUR 2500 EN*.
12. ISAAA. (2016). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA BriefNo. 52. ISAAA: Ithaca, NY.
13. ISO 21569. (2005). Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods. Switzerland.
14. Mazur, M., Sieradzki, Z., Król, B. & Kwiatek, K. (2017). Multiplex PCR assays for qualitative detection and identification of the GT73, Ms8, Rf3 and T45 varieties of genetically modified oilseed rape. *Journal of Animal Feed Science*, 26(2), 148-156.
15. Rosa, S. F., Gatto, F., Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Kreysa, J. & Querci, M. (2016). Development and applicability of a ready-to-use PCR system for GMO screening. *Food chemistry*, 201, 110-119.
16. Van der Vossen, J. M. B. M., Havekes, W. A. L. M., Koster, D. S., Brink, B. T., Minekus, M., Havenaar, R., Overeem, J., Hendriks, N. & Hofstra, H. (1998). Development and application of in vitro intestinal tract model for safety evaluation of genetically modified foods. Food safety evaluation of genetically modified foods as a basis for market introduction: market introduction genetically modified foods. *The Hague: Ministry of Economic Affairs*, 1998, p. 81-98.

www.SID.ir

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop