مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۷۵-۶۷

ارزیابی قند کل و قندهای محلول در سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی

Evaluation of total carbohydrate and soluble sugars in transgenic potato resistant to potato tuber moth

سید حمید میرکنی[۱،۲]، حسن رهنما [۱،*]، حسن زینالی [۲]

H. Mirrokni [1,2], H. Rahnama *[1], H. Zeinali [1]

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hrahnama@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۲)

چکیده

طبق قوانین سازمان‌های نظارتی موجود در اغلب کشورهای دنیا، قبل از پذیرش و تجاری‌سازی محصولات تراریخته و فراورده‌های آن، باید ارزیابی‌های ایمنی دقیقی بر روی آن‌ها با یک روش مقایسه‌ای صورت گیرد. یکی از مراحل ارزیابی ایمنی گیاهان تراریخته، مقایسه لاین‌های تراریخته با رقم زراعی غیرتراریخته از نظر محتوی متابولیتی و ترکیبات آنها است. این بررسی به منظور شناسائی تغییرات احتمالی ناخواسته و نامطلوب حاصل از دستورزی ژنتیکی (به عنوان مثال در نتیجه ورود ژن خارجی به درون ژنوم دیگر و یا تولید متابولیت جدید) صورت می گیرد. این فرایند به اصل ضرورتاً یکسان (این‌همانی) معروف است. در این مطالعه تلاش شد میزان قند کل و همچنین قندهای محلول مانند ساکارز، گلوکز و فروکتوز در سیب‌زمینی‌های تراریخت مقاوم به بید سیب‌زمینی که در سال ۱۳۸۸ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تولید شده بودند مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور از ۴ لاین تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی که در آزمایش-های زیست‌سنجی مقاومت بالایی از خود نشان داده‌اند استفاده شد. این سیب‌زمینی‌ها از تاریخ فوق در شرایط درون شیشه‌ای نگهداری شده‌اند. نمونه‌های تراریخته به همراه گیاه شاهد به منظور تولید غده به گلخانه منتقل شده و از نمونه‌های نور دیده و نور ندیده غده‌ها و همچنین از نمونه-های برگی این گیاهان جهت آنالیز متابولیت‌ها استفاده شد. برای اطمینان از حضور تراژن در گیاهان و مواد گیاهی بررسی های مولکولی بر روی آنها انجام گرفت و نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن *cry*1Ab در همه نمونه‌های تراریخته مورد ارزیابی حضور دارد. در بررسی میزان قند کل مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخته با گیاه شاهد از لحاظ میزان قند کل موجود در بافت‌ها وجود ندارد و همچنین ارزیابی قندهای محلول نیز نشان داد که میزان قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز بین گیاهان تراریخته با گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد و در نتیجه با توجه به ترکیبات مورد بررسی و همچنین قوانین نظارتی کدکس ایمنی سیب‌زمینی‌های تراریخته از لحاظ این صفات مورد تائید بوده و مصرف آنها بدون خطر است.

واژه‌های کلیدی

ژن *cry1Ab*
سیب‌زمینی تراریخته
قند کل
قندهای محلول

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]

مقدمه

سیب زمینی از جنس سولانوم و خانواده سولاناسه، تنها عضوی است که اهمیت برجسته ای از نظر کشاورزی دارد به طوری که بعد از غلات منبع اصلی کربوهیدرات را تشکیل می دهد (Yaghbani and Mohammadzadeh, 2006). به علت دارا بودن نشاسته، محتوای ویتامینی و پروتئینی و نیز عملکرد بالا بعد از گندم و برنج به عنوان سومین منبع مهم غذایی در دنیا است (Visser *et al*. 2009; FAO, 2005).

با وجود اهمیت بالای سیب‌زمینی در نظام غذایی و صنعتی، متاسفانه این محصول نظیر دیگر محصولات و حتی بیشتر در معرض حمله آفات و آلودگی با عوامل بیماریزای گیاهی و علف‌های هرز می‌باشد (Ghasimi Hagh *et al*. 2009). بر اساس آمار مرکز تحقیقات بین المللی سیب‌زمینی، در بین آفات خسارت زای سیب‌زمینی، بید سیب‌زمینی با نام علمی (*Phthorimaea operculella* (Zeller سالانه در دنیا در حدود ۳,۳۲۴,۰۰۰ هکتار از اراضی سیب‌زمینی کاری را از بین می‌برد. پتانسیل برداشت سالانه از این اراضی در حدود ۵۰,۸۳۳,۲۰۰ تن محصول سیب‌زمینی است (www.cipotato.org).

تولید سیب‌زمینی مقاوم به بید سیب‌زمینی با اصلاح سنتی به دلیل محدودیت‌های اصلاح سنتی و نیز عمدتا به دلیل عدم وجود ژرم‌پلاسم مقاوم به آفت در سیب‌زمینی و گونه‌های خویشاوند موفقیت‌آمیز نبوده است. بنابراین، یک راهکار مناسب برای بهبود مدیریت تلفیقی آفات، توسعه ارقام مقاوم به بید سیب‌زمینی با تکیه بر مهندسی ژنتیک است (Rondon *et al*. 2007). بهره گیری از زیست فناوری نوین برای تولید مواد غذایی، فرصت‌ها و چالشهای جدیدی را فرا روی توسعه و سلامتی انسان گشوده است. این امر از یک سو، افزایش بازدهی تولید و کاهش مصرف عوامل آلاینده و مخرب محیط زیست را به همراه داشته و می‌تواند برای امنیت غذایی جمعیت روز افزون جهان، به ویژه کشورهای در حال توسعه از اهمیت فراوانی برخوردار باشد. از نگاه دیگر، استفاده از فنون جدید مهندسی ژنتیک امکان ارتقاء ارزش تغذیه‌ای و تولید غذاهای فراسودمند (Functional food) را به طور گسترده ای فراهم آورده است.

البته همزمان با ورود مواد غذایی اصلاح شده ژنتیکی در زنجیره غذایی انسان، نگرانی‌هایی در ارتباط با خطرات بالقوه ناشی از تولید و مصرف این گونه مواد ایجاد، و پرسش‌های متعددی را در زمینه احتمال بروز عوارض نامطلوب مانند حساسیت، افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، اثرات مخرب محیطی و انتقال افقی ژن‌ها (Horizontal gene transfer) در جامعه مطرح نموده است. به دلیل اهمیت موضوع، کمیته‌های بین‌المللی مسئولیت قانون گذاری و تعیین سیاست‌های لازم برای تضمین ایمنی مواد غذایی اصلاح شده ژنتیکی را بر عهده گرفته و در این راستا راهبردها و دستورالعمل‌های متعددی مطرح شده است. براساس قوانین موجود برآورد ایمنی این محصولات مبتنی بر اثبات برابری همه جانبه آنها با انواع اصلاح نشده و همچنین انجام آزمون‌های اختصاصی در زمینه حساسیت‌زایی پروتئین‌ها، سمیت متابولیت‌ها و ماده غذایی می‌باشد (Hashemi and Shoja Sadat, 2010). طبق قوانین سازمان های نظارتی موجود در اغلب کشورهای دنیا، قبل از پذیرش و تجاری سازی محصولات تراریخته و فراورده‌های آن، باید ارزیابی‌های ایمنی دقیقی بر روی آنها با یک روش مقایسه‌ای صورت گیرد. یکی از مراحل ارزیابی ایمنی غذائی گیاهان تراریخته، مقایسه لاین‌های تراریخته با ارقام غیرتراریخته آن است. این بررسی به منظور شناسائی تغییرات احتمالی ناخواسته و نامطلوب حاصل از دستورزی ژنتیکی (به عنوان مثال در نتیجه ورود ژن خارجی به درون ژن دیگر و یا تولید متابولیت جدید) صورت می‌گیرد. این فرایند به اصل تشابه ضروری (این همانی Substantial equivalence) معروف است (OECD, 2001a; Kok and Kuiper, 2003) اصل "تشابه ضروری" که از دهه ۱۹۹۰ در چند شورای بین المللی(FAO/WHO, 2005; WHO, 1995; OECD, 2001a,b) مطرح شده است، یک عنصر کلیدی در ارزیابی ایمنی غذاهای حاصل از موجودات مهندسی شده ژنتیکی می‌باشد. این مفهوم برای شناسائی شباهت‌ها و تفاوت‌های بین غذاهای تراریخته و همتاهای سنتی آنها که دارای سابقه مصرف ایمنی هستند، استفاده می‌شود و راهنمای اصلی در فرایند ارزیابی ایمنی محسوب می‌شود (FAO/WHO, 2000). جنبه‌های تعیین کننده متعددی وجود دارد که باید در کاربرد عملی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]

این مفهوم مورد توجه قرار گیرد که در نهایت منجر به شناسائی اثرات ناخواسته می‌گردد.

هرگونه تغییر در لاین تراریخته باید در محدوده تغییرات مجاز در بین ارقام غیر تراریخته باشد. به همین دلیل، سازمان‌های نظارتی در بسیاری از کشورهای دنیا نتایج مربوط به بررسی و مقایسه ترکیبات محصولات تراریخته با رقم غیرتراریخته را جهت ارزیابی ایمنی محصول تراریخته و صدور مجوز رهاسازی تجاری آنها لازم می‌دانند. این مقایسه مورد به مورد بوده و قابل تعمیم به ارقام تراریخته مشابه نیست.

راهکارهای مختلفی جهت مقایسه لاین‌های تراریخته و غیرتراریخته بکار گرفته شده است که هر کدام از این راهکارها از یک جهت به این مقایسه می‌پردازند. مهمترین این روش‌ها متابولومیکس، پروتئومیکس و ژنومیکس است که هر کدام از این روش‌ها پیامدهای حضور ژن خارجی را در سطوح مختلف ژنومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس مورد ارزیابی قرار می‌دهند. هرچند توانائی روش‌های ترانس کریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس برای تشخیص اثرات آنها تحت مطالعه می‌باشد، آنالیز ترکیبات کلیدی و ضدغذائی از اهداف ارزیابی ترکیبات محسوب می شود (Cellini *et al.* 2004).

بنظر میرسد که در حال حاضر استفاده از راهنمای موجود OECD به عنوان مبنائی برای ارزیابی مطالعات متابولومیکس می‌تواند بسیار مفید باشد. در نسخه سال ۲۰۰۲ این راهنما مشخص شده است که با آنالیز ترکیبات ذکر شده در فهرست این راهنما می‌توان تشابه رقم مورد مطالعه را با ارقام طبیعی تعیین نمود (OECD, 2002a,b). بنابراین، هدف ارزیابی ایمنی غذاهای جدید (از جمله غذاهای حاصل از فناوری تراریخته) اثبات این موضوع است که غذای جدید سطح ایمنی مشابه والد طبیعی خود (در صورت وجود) داشته و همچنین هیچ خطر اضافه یا جدیدی برای سلامت مصرف کننده ندارد. اثرات نامطلوب قابل پیش‌بینی و غیر قابل پیش‌بینی ممکن است سلامت فراورده را اثبات کند یا نکند اما برای ارزیابی مخاطرات احتمالی باید این کار انجام شود.

در نهایت اینکه، برای رهاسازی یک محصول تراریخته لازم است ارزیابی تشابه ضروری در آن انجام شود. اسناد و مدارک حاصل همراه با سایر بررسی‌های انجام شده تکمیلی در خصوص پروتئومیکس، ژنومیکس و ارزیابی های حیوانی و غیره برای ارائه به سازمان‌های نظارتی و تصمیم گیر در زمینه تجاری سازی محصولات تراریخته ضروری می‌باشد.

این تحقیق پس از اثبات وجود ژن انتقالی *cry1Ab* با هدف مقایسه قند کل و همچنین قندهای محلول همچون ساکارز، گلوکز و فروکتوز بین سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی و گیاه شاهد غیرتراریخته انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مقدمات کار جهت تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب زمینی با استفاده از ژن *cry1Ab* درسال ۱۳۸۸ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- کرج انجام پذیرفت. برای هدفمند کردن بیان ژن‌ها و تولید سیب‌زمینی Bt ایمن‌تر از نظر رعایت اصول ایمنی زیستی، از پیشبر (Phosphoenolpyruvate carboxylase) PEPC گیاه ذرت (*Zea mays*) که سبب بیان ژن در بخش‌های سبز گیاه می‌شود، استفاده شده است. برای انتقال سازه مولکولی pBPECry1Ab به گیاه سیب زمینی از اگروباکتریوم تومه فاشینز سویه AGLo1 استفاده شد (Ghasimi Hagh *et al.* 2009).

بعد از ۴ دوره کشت سیب‌زمینی‌های کنترل و تراریخته که شامل لاین‌های B2, B8, B11, B12 بودند در محیط مایع درون شیشه‌ای به شرایط گلخانه‌ای انتقال یافت و در شرایط گلخانه‌ای به مرحله غده دهی رفتند. بعد از طی شدن مراحل رشد برگ‌های میانی از بوته جدا شده و بلافاصله در ازت مایع قرار داده و بعد به فریزر ۸۰- انتقال یافتند. غده‌ها نیز پس از جمع آوری، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای بیان این ژن از پیشبری استفاده شده است (پیشبر PEPC) که تنها در بافت‌های سبز و تحت نور بیان می‌شود. به منظور بیان و تولید پروتئین Cry1Ab در یک تیمار، مقداری سیب‌زمینی تراریخته در معرض نور کنترل شده قرار داده شد تا پروتئین بیان شود اما با توجه به تولید همزمان آلکالوئیدها در سیب‌زمینی، این نور دهی به میزانی بود که درصد آلکالوئیدها از مقدار استاندارد بیشتر نشود (Fridman, 2006).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]

بنابراین نیمی از آنها به مدت یک هفته در شرایط نور و نیمی دیگر در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

بررسی ثبات ژن *cry1Ab*

استخراج DNA از برگ و غده های نور دیده و نور ندیده سیب-زمینی‌های مورد بررسی به روش دلاپورتای تغییر یافته (Dellaporta *et al.* 1983) انجام شد و کیفیت و کمیت DNA استخراجی به وسیله ژل الکتروفورز و اسپکتوفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. آزمون PCR بر روی این ژن با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *cry1Ab* (آغازگر مستقیم:-GGC-GGC-5´ GAG-AGG-ATC-GAG-AC-3´ منطبق بر نوکلئوتیدهای۷۳- ناحیه رمزکننده و آغازگر معکوس-TCG-GCG-GGA-CGT-5´ TGT-TGT-TC-3´ منطبق بر نوکلئوتیدهای ۱۲۷۶- ناحیه رمزکننده) انجام شد. شرایط انجام PCR شامل یک چرخه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه با ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و نهایتا یک چرخه اضافی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه (طویل شدن نهایی) بود که در دستگاه (PCR BIO-RAD) انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و TAE 1X برده شد و توسط دستگاه Gel-Doc عکسبرداری صورت گرفت.

جهت بررسی تعداد نسخه ژنی در لاین های تراریخت از روش سادرن بلاتینگ استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های DNA استخراج شده با آنزیم *Eco*RI هضم شده و برروی ژل آگارز الکتروفورز شدند. انتقال DNA به غشای نایلونی باردار مثبت با استفاده از روش مویین انجام شد (Smabrook and Russell, 2001). آشکارسازی نمونه ها با استفاده از پروب ژن *cry1Ab* نشان دار شده با DIG با استفاده از کیت DIG DNA labeling and detection kit (شرکت Roche) و براساس دستورالعمل موجود صورت گرفت.

اندازه‌گیری قندهای محلول (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) با استفاده از دستگاه HPLC

۰/۰۲ گرم از نمونه تر وزن شد و در ازت مایع پودر شد و درون تیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ (v/v) روی هر نمونه اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با ورتکس تکان شدید داده شد و سپس نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و فالکون‌ها درون آون یا خشک‌کن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا الکل نمونه‌ها به طور کامل تبخیر شد. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۴۷ میلی‌لیتر هیدروکسیدباریم ۰/۳ نرمال و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر سولفات‌روی ۵٪ به هر کدام از نمونه‌های خشک شده اضافه و نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ جدا و درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. همچنین ۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل جهت اندازه گیری قند کل درون ویال‌های جدا ریخته شد.

در نهایت فالکون‌ها در دستگاه آون یا خشک‌کن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و فاز آبی به‌طور کامل تبخیر شد و یک میلی‌لیتر آب با درجه خلوص HPLC به هر نمونه اضافه شد. محلول‌ها با فیلتر سر سرنگی نوع ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شدند و در یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. برای اندازه گیری قندهای محلول از دستگاه HPLC استفاده شد. بدین منظور از ستون تفکیک Eurokat H-10 µm ابعاد ۸ × ۳۰۰ میلی‌متر، میزان جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه و استفاده از آب مقطر با درجه خلوص HPLC با pH ۲/۵ به عنوان فاز متحرک (با استفاده از اسیدسولفوریک اسیدیته کاهش داده شد) و شناساگر RI استفاده شد.

اندازه‌گیری قند کل

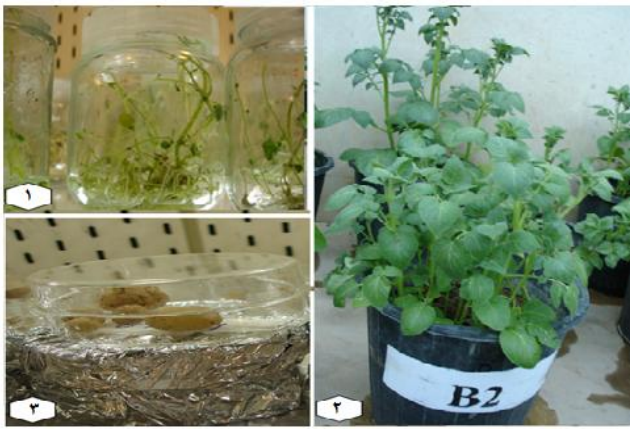
۲ میلی‌لیتر از محلول آماده شده (در دستورالعمل قندهای محلول به روش HPLC) به یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و یک میلی‌لیتر محلول فنل ۵٪ به محلول درون فالکون مرحله قبل اضافه و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ (v/v) به محلول بالا اضافه شد و در نهایت پس از ۴۵ دقیقه، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Schlegel, 1956).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت آزمایش فاکتوریل با دو عامل A در ۳ سطح (برگ، غده‌های نور دیده و غده‌های تاریکی) و عامل B در ۵ سطح (کنترل، B12, B11, B8, B2) انجام شد. تمامی آزمایش ها با سه تکرار بود. به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS و جهت رسم نمودار ها از نرم افزار Microsoft Excel استفاده شد. همچنین مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد صورت گرفت.



شکل ۱: مراحل مختلف رشد و نگهداری گیاهان تراریخته. ۱: کاشت و نگهداری گیاهان در شرایط درون شیشه ای **۲: انتقال گیاهان به گلدان و نگهداری در گلخانه ۳: قرار دادن غده‌ها در شرایط نور و تاریکی.**

Figure 1: Different stages of development and maintenance of transgenic plants. 1- Plant culture at in vito condition 2- Plant growth in greenhouse condition 3- Light treatment of potato tubers.

نتایج و بحث

سیب‌زمینی های کنترل و تراریخته B2, B8, B11, B12 در محیط مایع درون شیشه کشت شده و پس از واکشت شدن به شرایط گلخانه‌ای انتقال یافت و پس از آن نیمی از غده‌ها به مدت یک هفته در شرایط نور و نیمی دیگر در شرایط تاریکی قرار گرفتند (شکل ۱).

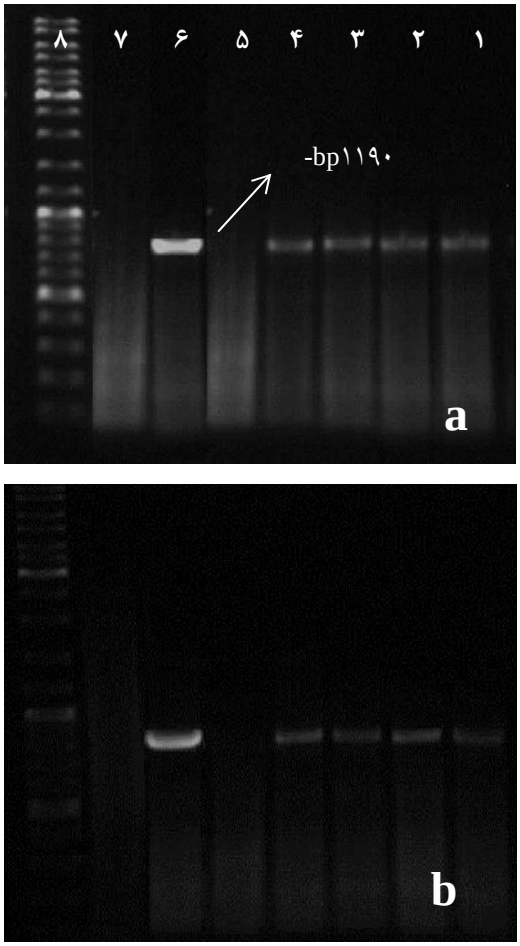
تشخیص ژن *cry*1Ab در سیب‌زمینی‌های تراریخته

ثبات ژن در نمونه‌های تراریخت در مهندسی ژنتیک از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی ثبات ژن *cry1Ab* در برگ و غده گیاهان تراریخت به وسیله تجزیه و تحلیل PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این دو ژن انجام گرفت. تجزیه و تحلیل PCR، حضور ژن را در گیاهان تراریخته موجود پس از ۴ دوره کشت تایید کرد. شکل ۲ نمونه‌ای از الگوی نتایج PCR را برای ژن *cry*1Ab نشان می‌دهد. گیاهان تراریخت همانند پلاسمید نوترکیب pBPEPcry1Ab به عنوان شاهد مثبت، نواری به طول ۱۱۹۰ جفت باز متعلق به ژن *cry1Ab* را نشان دادند. این نتیجه، تاییدی بر ثبات حضور ژن هدف در گیاهان تراریخته بوده و می‌تواند نشان دهنده وجود حداقل یک نسخه از ژن *cry1Ab* در ژنوم گیاهان باشد. گیاه شاهد و نمونه بدون DNA (آب) به عنوان شاهد منفی هیچ نواری نشان ندادند که دلیلی بر صحت و درستی PCR است. براساس نتایج به دست آمده، هم غده و هم برگ ارقام تراریخته سیب‌زمینی برای ژن انتقالی PCR مثبت بودند که این می‌تواند بیانگر ثبات وجود ژن *cry1Ab* پس انتقال به سیب‌زمینی باشد. بررسی حضور ژنهای *cry1Ab* در گیاهان ذرت تراریخت با استفاده از PCR نشان داده است که این ژن در DNA ژنومی آرد نمونه های تراریخت قابل ردیابی است در حالی که در نمونه های غیرتراریخت حضور این ژن تایید نشده است (Giuliani *et al.* 2007). نتایج حاصل از آزمون سادرن نشان داد که چهار لاین تراریخت سیب زمینی مستقل از هم هستند. نتایج این آزمون مشخص کرد که لاین B2 حداقل دارای ۴ نسخه، لاین B8 حداقل دارای ۲ نسخه، لاین B11 حداقل دارای سه نسخه و لاین B12 هم حداقل دارای ۲ نسخه از ژن *cry1Ab* در خود دارند.

اندازه‌گیری قندهای محلول (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) با استفاده از دستگاه HPLC

جدول تجزیه واریانس قندهای محلول نشان داد که برای هیچ‌کدام از قندها، عامل B و اثر متقابل معنی دار نشده است و به

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]

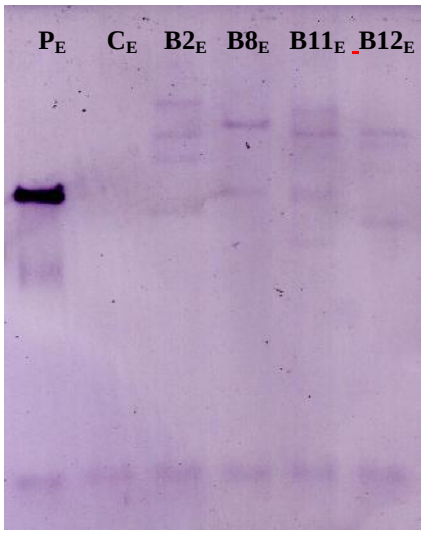


شکل ۲ : نتایج PCR برای تشخیص ژن *cry1Ab* در **نمونه‌های برگ** (a) **و غده (b)** ۱- کنترل منفی (آب)، ۲- کنترل مثبت (پلاسمید)، ۳- کنترل منفی (گیاه غیرتراریخت) ۷-۴- گیاهان تراریخت.

Figure 2: Detection of *cry1Ab* gene (1190 bp) by PCR analysis in leves (a) and tubers (b). 1- negative control (water), 2- positive control (plasmid), 3- negative control (non-transgenic plant), 4-7- transgenic plants.

این نتیجه می‌رسیم که بین ارقام تراریخته و گیاه شاهد با میانگین‌های ساکارزبه ترتیب سطح‌ها (۵/۷۵، ۵/۸۹، ۶/۰۴، ۵/۶۳ و ۵/۸۲) میلی مولار، گلوکز به ترتیب سطح‌ها(۸/۸۶، ۸/۸۷، ۸/۶۸، ۸/۷۳ و ۸/۰۴) میلی مولار و فروکتوز به ترتیب سطح ها (۱۱/۷۴، ۱۱/۴۵، ۱۰/۴۴، ۱۱/۵۵ و ۱۱/۱۴) میلی مولار تفاوت معنی داری از لحاظ غلظت قندهای محلول ذخیره شده در آن‌ها نیست (جدول ۱).

همچنین جدول تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف میزان قند فروکتوز بین برگ ،غده‌های نور دیده و غده‌های تاریکی با میانگین‌های به ترتیب (۱۱/۵۱، ۱۰/۶۹ و ۱۱/۵۹) معنی‌دار نیست



شکل ۳: تجزیه و تحلیل سادرن گیاهان تراریخت سیب‌زمینی حاوی ژن *cry1Ab*. PE پلاسمید هضم شده با آنزیم *Eco*R1، C_E گیاه غیرتراریخت هضم شده با آنزیم *Eco*R1، $B2_E$، $B8_E$، $B11_E$ و $B12_E$ به‌ترتیب گیاهان تراریخت لاین B2، B8، B11 و B12 هضم شده با آنزیم *Eco*R1.

Figure 3: Southern analysis of transgenic potato harboring *cry1Ab* gene. PE, Plasmid digested by *Eco*RI: CE, non-transgenic DNA digested by *Eco*RI: B2E, B8E, B11E, B12E, transgenic DNA digested by *Eco*RI.

جدول۱- جدول تجزیه واریانس غلظت ساکارز درگیاهان شاهد و تراریخته سیب زمینی

Table 1: Variance analysis of sucrose content in transgenic and non-transgenic potatoes

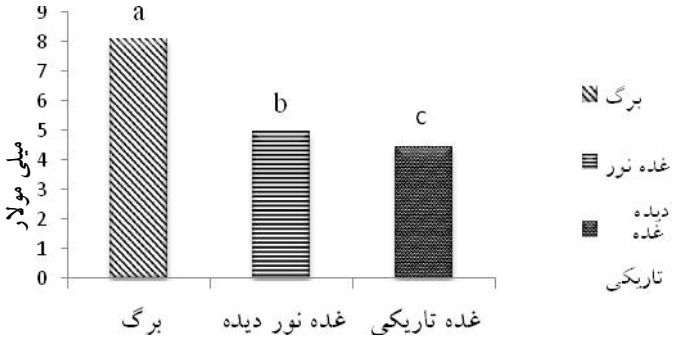
منابع تغییر	df	میانگین مربعات		
		ساکارز	گلوکز	فروکتوز
A	۲	۵۹/۱۱۸**	۱۶۸/۵۵۶**	۳/۷۲۹ ns
B	۴	۰/۲۱۵ ns	۰/۲۳۸ ns	۲/۳۳۳ ns
A×B	۸	۰/۲۰۲ ns	۰/۰۸۱ ns	۰/۸۸ ns
خطا	۲۰	۰/۴۰۴	۰/۲۴۱	۱/۳۹۲

ns : معنی دار نیست. **: درسطح یک درصد معنی دار است. عامل A : ۳ سطح (برگ،غده های نور دیده و غده های تاریکی) ، عامل B : در ۵ سطح (کنترل،B12,B11,B8,B2)

** Significant at the 1 percent levels, and ns: not statistically significant. A: 3 level (Leaves, light treated tubers, dark treated tubers); B: 5 levels (Contro, B2, B8, B11, B12)

ولی این اختلاف برای قندهای ساکارز و گلوکز معنی دار بود که نشان می‌دهد بین بافت‌های مختلف گیاهی میزان غلظت این دو قند متفاوت می‌باشد، در نتیجه میانگین‌های اثر این عامل با روش دانکن برای ساکارز و گلوکز با یکدیگر مقایسه شد.

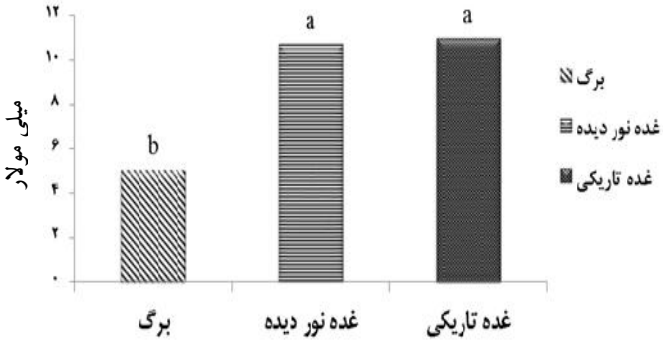
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]



نمودار ۱: مقایسه میانگین غلظت ساکارز موجود در بافت‌های مختلف گیاه

Diagram 1: Sucrose level mean comparison (mM) in different tissues of plants.

نمودار مقایسه میانگین غلظت ساکارز به روش دانکن نشان می‌دهد که مقدار ساکارز موجود در برگ از غده‌ها بیشتر بوده و بعد از برگ‌ها، ساکارز غده‌های نور دیده از غده‌های تاریکی بیشتر بوده و میزان آن‌ها در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار دارد (نمودار۱).



نمودار ۲: مقایسه میانگین غلظت گلوکز موجود در بافت‌های مختلف گیاه

Diagram 2: Glucose level mean comparison (mM) in different tissues of plants.

نمودار مقایسه میانگین غلظت گلوکز نشان می‌دهد که مقدار گلوکز موجود در برگ کمتر بوده و با غده ها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار داشته ولی بین غده‌های نور دیده با غده‌های تاریکی میزان گلوکز آنها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارد (نمودار۲).

بررسی قندهای محلول در سیب‌زمینی تراریخته و شاهد نشان داده است که قندهای محلول در گیاهان تراریخته با گیاه شاهد تفاوت معنی دار ندارد (Louise *et al.* 2006). بررسی این‌همانی گندم‌های تراریخته هم نشان داده است که لاین‌های تراریخته گندم از لحاظ مقدار قندهای محلول با گیاه شاهد یکسان اند و تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (Baker *et al.* 2006).

بررسی قند کل موجود در ارقام تراریخته

پس از اندازه‌گیری مقدار قند کل موجود در ارقام تراریخته و شاهد و تجزیه داده‌ها جدول تجزیه واریانس داده‌های قندهای محلول کل نشان داد که هیچ‌کدام از عوامل معنی دار نیست و به این نتیجه می‌رسیم که بین ارقام تراریخته و گیاه شاهد با میانگین سطح‌ها به ترتیب (۰/۳۳، ۰/۲۹، ۰/۳۰، ۰/۳۸ و ۰/۳۰) تفاوت معنی داری از لحاظ مقدار قند کل ذخیره شده در این گیاهان نیست و همچنین این مقدار بین برگ ،غده های نوردیده و غده‌های تاریکی با میانگین‌های به ترتیب (۰/۳۰، ۰/۳۴ و ۰/۳۳) تفاوت معنی داری ندارند که با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت داشت (جدول ۲).

جدول۲: جدول تجزیه واریانس میزان قند کل درگیاهان شاهد و تراریخته سیب زمینی

Table 2: Variance analysis of total sugar content in transgenic and non-transgenic potatoes

منابع تغییر	df	میانگین مربعات
A	۲	۰/۰۰۹ ns
B	۴	۰/۰۱۵ ns
A × B	۸	۰/۰۰۶ ns
خطا	۳۰	۰/۰۱

ns : معنی دار نیست. عامل A : ۳ سطح (برگ، غده های نور دیده و غده های تاریکی) ، عامل B : در ۵ سطح (کنترل،B12,B11,B8,B2)

ns: not statistical ly significant. A: 3 level (Leaves, light treated tubers, dark treated tubers); B: 5 levels (Contro, B2, B8, B11, B12)

اندازه گیری میزان قند کل بین لاین‌های غده های سیب زمینی تراریخته حاوی ژن *cry* V و غیر تراریخته نشان داد که هیچ تفاوت آماری معنی داری برای قند کل بین سیب زمینی غیر تراریخته و سیب زمینی تراریخته وجود نداشت (Raffat El-Sanhoty *et al.* 2004).

بررسی سیب زمینی تراریخته مقاوم به ویروسY سیب زمینی و مقایسه آن با ارقام غیر تراریخته نشان داده است که این لاین‌ها از

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]

نظر پارامترهای مورد بررسی مانند پروتئین کل تفاوت معنی داری با ارقام غیر تراریخته خود ندارند (El- Khishin *et al*. 2009). در مجموع نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داد که ژن *cry1Ab* در سیب زمینی‌های تراریخته پایدار بوده و از طرفی وجود این ژن میزان سایر ترکیبات مهم سیب زمینی همچون قند کل و قند های محلول در سیب زمینی را تغییر نداده و ایمنی سیب زمینی های تراریخته از لحاظ این دو صفت بررسی شده مورد تایید بوده و مصرف آنها بدون خطر می باشد می‌باشد.

منابع

Baker JM, Hawkins ND, Ward JL, Lovegrove A, Napier JA, Shewry PR, Beale NH. 2006. A metabolomic study of substabtial equivalences of filed grown genetically modified wheat. Plant Biotech J 4: 381-392.

Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engel KH, Gatehouse AMR, Karenlampi S, Leguay JJ, Lehesranta S, Noteborni HPJM, Pedersen J, Smith M. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. Food and Chemical Toxicology 42: 1089-1125.

El- Khishin D, Abdul Hamid A, El Moghazy G, Metry EA. 2009. Assessment of genetically modified potato lines resistant to potato virus Y using compositional analysis and molecular marker. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 5: 261-271.

FAO/WHO . 2000. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology.

FAO/WHO . 2005. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin; report of a Joint FAO/WHO Expert consultation on food derived from biotechnology; AO/WHO: Geneva,Switzerland http://www.who.int/foodsafety/biotech/who_study/en/index.html.

Fridman M .2006. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. J. agric. Food chem 54:8655-8681.

GhasimiHagh Z ,Rahnama H , Panahandeh J ,BaghbanKohnehRouz B ,Arab Jafari KM, Mahna N. 2009. Green-tissue-specific, C4-PEPC-promoter-drivenexpressionof *cry*1Ab makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (*Phthorimaea operculella*, Zeller). Plant Cell Rep 28:1869–1879.

Giuliano Albo A, Mila S, Digilio G, Motto M, Aime S, Corpillo D. 2007. Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying *cry*1Ab gene and comparison to the corresponding wild- type. Maydica 52: 443-455.

Hashemi M, Shoja Sadat A. 2010. Genetically modified food: opportunities and challenges. JFST 7: 89-102.

Kok E J, Kuiper H A. 2003. Comparative safety assessment for biotech crops. Trends in Biotechnology 21: 439-444.

Louise V, Shepherd T, James W, McNicol R, Mark A ,Howard V, Davies V. 2006. Assessing the potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes. Targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients. Transgenic Res 15: 409–425.

OECD. 2001a. Consensus document on key nutrient and key toxicants in low erucic acid rapeseed (Canola), series on the safety of novel foods and feeds No. 1., ENV/JM/MONO(2001)13. Organisation for economic cooperation and development, Paris. http:// www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)13.

OECD. 2001b. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients, series on the safety of novel foods and feeds No. 2, ENV/JM/MONO(2001)15. Organisation for economic cooperation and development, paris. olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)15.

OECD. 2002a. Consensus document on compositional considerations for new varieties of sugar beet: Key food and feed nutrients and antinutrients. series on the safety of novel foods and feeds No. 3, ENV/JM/MONO(2002)4.Organisation for economic cooperation and development, paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)4.

OECD. 2002b. Consensus document on compositional considerations for new varieties of potatoes: key food and feed nutrients, Anti-nutrients and toxicants. Series on the safety of novel foods and feeds No. 4, ENV/JM/MONO(2002)5. Organisation for economic cooperation and development, paris. http://www.olis.

oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)5.

Rafaat ElS, Ahamed AAE, Klaus W. 2004. Quality and safety evaluation of genetically modified potatoes Spunta with Cry V gene: Compositional analysis, determination of some toxins, antinutrients compounds and feeding study in rats. Food Technology Research Institute, Agriculture Research center, Giza, Egypt

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]

Rondon SI, DeBano SJ, Clough GH, Hamm PB, Jensen A, SchreiberA Alvarez JM, Thornton M, Barbour J, Dogramaci M. 2007. Biology and management of the potato tuberworm in the pacific northwest. PNW.594

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York .

Schlegel HG. 1956. Die verwertung organischer sauren durch chlorella in lincht. Planta. 47: 510-515.

Visser RG, Bachem, CWB, DeBer JM, Bryan GJ, Chakrabati SK, Feingold S, Gromadka R. 2009. Sequencing the potato genome: outline and first result to come from elucidation of the sequence of the world third most important food crop. Am. J. Pot. Res 10.1007/s12230-009-9097-8.

WHO. 1995. Application of the Principles of Substantial Equivalence to the Safety Evaluation of Foods or Food Components from Plants Derived by Modern Biotechnology. Report of a WHO Workshop. World Health Organisation, Geneva.

Yaghbani M, Mohamadzadeh J. 2006. Study on physiochemical properties of starch from potato cultivars in Golestan province. IJFST 12: 71-79.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal *Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal*

Evaluation of total carbohydrate and soluble sugars in transgenic potato resistant to potato tuber moth

H. Mirrokni [1,2], H. Rahnama *[1], H. Zeinali [1]

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2. College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

* Corresponding Author, Email: hrahnama@abrii.ac.ir

A B S T R A C T

Based on the regulatory frameworks in most countries, careful safety assessment based on comparison methods must be performed before the adoption and commercialization of GM crops and products. One of the safety assessments of GM plants is the comparison of key nutrients and metabolites between transgenic and non-transgenic lines. This study was designed to identify undesirable potential changes resulting from genetic manipulation (for example, as a result of the entry of foreign genes into the genome and new metabolite production) in transgenic potato resistant to potato tuber moth (*Phetorima operculella*). This process is known as substantial equivalence. This study attempted to examine total and soluble sugars such as sucrose, fructose and glucose in transgenic potato which were produced in Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. For this purpose, four transgenic lines (B2, B8, B11, B12) that have shown high levels of potato tuber moth resistance in bioassay tests were used. First, molecular analyses were performed on plant to be ensured of the presence of transgene, and the result of PCR showed that *cry*1Ab gene was present in all transgenic samples. The transgenic and control plants were transferred to greenhouse to produce the tubers. The harvested tubers were treated under light and dark conditions and then used for more analyses together with leaf samples. Evaluation of total sugar showed no significant differences between transgenic and control plants. Moreover, evaluation of soluble sugar showed that the contents of sucrose, fructose and glucose were not significantly different between transgenic and control plants. We conclude that according to evaluated components and regulatory rules of Codex, these transgenic potatoes are safe to use.

Key Words

*cry*1Ab gene, soluble sugar, substantial equivalence, total sugar, transgenic potato

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.4.7]