مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره اول، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۴۸-۴۳

ارزیابی تغییرات آنیون‌ها و کاتیون‌های پنبه تراریخته حاوی ژن‌های کیتیناز و *cry1Ab*

بنت الهدی مدیرروستا[۱]، مسعود توحیدفر[*۲]،جلال صبا[۳]، حسین هداوند[۴]

۱ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
۲ و ۴- استادیار و کارشناس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:gtohidfar@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

یکی از جنبه‌های بیوتکنولوژی، تولید گیاهان تراریخته به منظور افزایش عملکرد، بهبود امنیت و کیفیت غذایی است. گیاهان تراریخته ضمن به همراه داشتن سودآوری، ملاحظاتی را نیز برای مصرف‌کنندگان به دنبال داشته‌اند. اگرچه بسیاری از این ملاحظات اساس علمی ندارد، اما ارزیابی ایمنی گیاهان تراریخته می‌تواند باعث اطمینان از بی‌خطر بودن این محصولات شود. یکی از جنبه‌های ارزیابی ایمنی زیستی، بررسی متابولیک گیاهان تراریخته از جنبه آنیون‌ها و کاتیون‌ها (سدیم، پتاسیم، منیزیم، استات، کلراید، نیترات، فسفات، سولفات، سوکسینات و اگزالات) است که با کروماتوگرافی یونی قابل شناسایی و اندازه‌گیری هستند. بدین منظور دو لاین پنبه تراریخته حاوی ژن *cry1Ab* و ژن کیتیناز به همراه گیاهان شاهد در شرایط کاملا یکسان در گلخانه کاشته شدند، پس از نمونه برداری و عصاره‌گیری، آنیون‌ها و کاتیون‌های آنها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی یونی اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که پنبه‌های *Bt* از نظر آنیون‌ها و کاتیون‌های اندازه‌گیری شده غیر از اگزالات، سدیم و آمونیوم اختلاف معنی داری با لاین شاهد ندارند؛ لاین‌های حاوی ژن کیتیناز نیز فقط در مقادیر اگزالات و سدیم با شاهد اختلاف نشان دادند و سایر آنیون‌ها و کاتیون‌های اندازه‌گیری شده اختلافی با شاهد نشان نداد.

واژه‌های کلیدی

آنیون‌ها
کاتیون‌ها
ارزیابی ایمنی
پنبه تراریخته

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.6.3]

مقدمه

گیاهان تراریخته حاوی صفات جدیدی هستند که به آن‌ها ویژگی‌های سودمندی همچون مقاومت در برابر حشرات، پاتوژن‌های باکتریایی، قارچی و علف‌کش‌ها را می‌دهد. در سال ۱۹۹۶ اولین گیاه تراریخته در ایالات متحده وارد بازار شد. با وجود گسترش کشت گیاهان تراریخته، هنوز در بسیاری از کشورها آزادسازی این گیاهان موضوع جنجال برانگیزی است. استاندارد"این همانی"[1] تعیین می‌کند که آیا گیاه تراریخته، از نظر ترکیبات کلیدی همچون پروتئین، کربوهیدرات، عناصر، چربی و محتوای تغذیه‌ای شبیه به همتای سنتی خود است یا خیر (Royal Society. 2002).در خصوص پژوهش در مورد ایمنی غذاهای تراریخته، به طور اساسی نیاز به تعیین این مسئله است که آیا تغییراتی علاوه بر ویژگی جدید مورد نظر در محصولات تراریخته رخ داده یا خیر (International Life Science Institute. 2004)، که با مقایسه الگوی متابولیک می‌توان به این تغییرات پی برد. در این ارزیابی‌ها پارامترهایی انتخاب می‌شوند که نماینده‌ای برای محصول مورد ارزیابی و نمایندهٔ مسیرهای اصلی متابولیک باشند. انتظار بر این است که تغییرات معنی‌دار در این پارامترها، نشان‌دهندهٔ تغییرات اساسی باشد (Konig *et al*. 2004). کمیسیون کدکس غذایی آنالیزهای مقایسه‌ای ترکیبات کلیدی همچون عناصر معدنی را برای گیاهان نوترکیب ضروری می‌داند و عنوان کرده که گیاهان باید تحت شرایط یکسان رشد کرده و مقایسه شوند (Codex Guideline).

از آنجا که مولکول‌های کوچک می‌توانند اثرهای بزرگی داشته باشند، آنالیز متابولیت‌ها، بخشی از ارزیابی تغذیه‌ای محصولات تراریخته است. آنیون‌ها و کاتیون‌ها جزئی از متابولیت‌های اولیه محسوب می‌شوند. استفاده از تکنیک کروماتوگرافی یونی، بررسی یون‌ها و نقش آن‌ها در تغذیه گیاه، فعالیت‌های فیزیولوژیک و بررسی مسیرهای بیوشیمیایی را تسهیل می‌کند. دستگاه کروماتوگرافی یونی روشی سودمند برای اندازه‌گیری یون‌های موجود در نمونه است (Metrohm).

موهانتا و همکاران (۲۰۱۱) در ارزیابی ایمنی پنبه‌های تراریخته حاوی ژن *cry1C* میزان عناصر شامل کلسیم، فسفر، مس، منگنز، روی، آهن، کادمیم و سرب را اندازه‌گیری کردند که در مقایسه با گیاه غیرتراریخته اختلاف معنی‌داری مشاهده نکردند (Mohanta *et al*. 2011).

لی و همکاران (۲۰۰۸) نیز در مقایسه برنج تراریخته حاوی ژن *bar* با همتای غیر تراریخته آن گزارش کردند که عناصر معدنی در هر دو نوع یکسان بوده و در محدوده لاین‌های تجاری است. در این ارزیابی سطوح فسفر، کلسیم، روی، پتاسیم، سدیم، منگنز، آهن، مس و منیزیم اندازه‌گیری شد. در میان عناصر اندازه‌گیری شده، فقط آهن دارای اختلاف معنی‌دار بین گیاه تراریخته با همتای غیرتراریخته بود (Li *et al*. 2008).

یوکویی و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی عناصر پنبه‌های تراریخته (*Bt + CpTI*) مشاهده کردند که ۱۲ عنصر در گیاهان تراریخته و شاهد متفاوت هستند. پتاسیم، فسفر و مس در برگ‌های پنبه تراریخته نسبت به شاهد کمتر بودند. منیزیم، بور و مولیبدن در برگ‌ها و ریشه‌های پنبه تراریخته در مقایسه با شاهد بیشتر اما در ساقه کمتر بودند. روبیدیم، آهن، منگنز، سیلسیم و روی در برگ‌ها و ساقه‌های پنبه تراریخته در مقایسه با شاهد کمتر اما در ریشه گیاهان تراریخته بیشتر بودند. کلسیم در ریشه، ساقه و برگ بیشتر از شاهد بود (Yukui *et* al. 2009).

نتایج پژوهش روئی و همکاران (۲۰۰۸) بر روی میزان عناصر در پنبه دانه‌های تراریخته نشان داد که اغلب عناصر کم مصرف شناسایی شده شامل سدیم، سلنیم، روی، نیکل، کوبالت، منگنز، کلسیم، پتاسیم، فسفر، سیلسیم، بور و مولیبدن نسبت به پنبه دانه‌های شاهد کمتر بودند در حالیکه آهن، منیزیم و مس اختلافی نشان ندادند. محتوای اغلب عناصر سنگین شناسایی شده شامل بیسموت، آلومینیوم، آرسنیک، سرب، کادمیوم و تیتانیوم نسبت به پنبه دانه‌های شاهد بیشتر بود اما کروم و جیوه تفاوتی نداشتند. در این آزمایش تمام داده‌ها حاکی از این بود که تجمع عناصر سنگین و عناصر کم مصرف در پنبه دانه‌های تراریخته زیان‌آور است (Rui *et al*. 2008).

هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر حضور ژن‌های کیتیناز و *cry1Ab* در ژنوم پنبه تراریخته بر روی ترکیب عناصر معدنی برگ در گیاه پنبه است.

1 -Substantial equivalence

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.6.3]

مواد و روش ها

این پژوهش در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام گرفت. بذور نسل سوم پنبه‌های تراریخته حاوی ژن کیتیناز جهت مقاومت به پاتوژن قارچی *Verticillium dahliae* و نیز نسل سوم پنبه‌های تراریخته حاوی ژن *cry1Ab* موسوم به پنبه *Bt* جهت مقاومت به کرم غوزه پنبه که توسط توحیدفر و همکاران (Tohidfar *et al*. 2005; Tohidfar *et al*. 2008) تراریخته شده بودند و نیز لاین غیرتراریخته (شاهد) به عنوان مواد گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از آب ژاول، بذور استریل و درون پتری جوانه‌دار و سپس به گلدان منتقل شدند، هر گلدان حاوی یک گیاه بوده و شرایط نگهداری و میزان و زمان آبیاری برای تمام گیاهان در گلخانه یکسان اعمال شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با ۳ تیمار انجام گرفت و تعداد تکرار برای تیمار اول (لاین حاوی ژن کیتیناز) ۱۵ گیاه، تیمار دوم (لاین حاوی ژن *cry1Ab*) ۲۰ گیاه و برای تیمار سوم (شاهد) ۳ گیاه بود.

استخراج و اندازه‌گیری کاتیون‌ها و آنیون‌ها

نمونه برداری از برگ‌های حقیقی شاخه رویشی گیاهان، هفت هفته بعد از کشت صورت گرفته و سپس نمونه‌ها در آون در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری و خشک شدند. نمونه ها بعد از خشک شدن پودر شده و جهت استخراج کاتیون‌ها و آنیون‌ها استفاده شدند.

برای استخراج کاتیون‌ها ۰/۲ گرم از هر نمونه خشک شده در فالکون‌های ۵۰ میلی لیتری قرار داده و به هر نمونه ۲۵ میلی لیتر محلول ۱۰٪ استیک اسید و ۰/۱ نرمال نیتریک اسید اضافه شد. فالکون‌ها ۴ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بعد از هم دما شدن با محیط، با کاغذ صافی فیلتر شدند. از این عصاره جهت اندازه‌گیری کاتیون‌ها با استفاده از ستون Metrosep C2 250 دستگاه Ion chromatography ساخت شرکت Metrohm استفاده شد (Metrohm).

جهت استخراج آنیون‌ها از هر گیاه ۰/۲ گرم پودر برگ خشک شده در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نموده و در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. نمونه‌ها با کاغذ صافی فیلتر شده و آنیون‌ها با استفاده از ستون Metrosep Asupp7 دستگاه کروماتوگرافی یونی اندازه‌گیری شدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه قرار گرفتند (Metrohm).

نتایج و بحث

مقایسه میانگین‌های آنیون‌ها با استفاده از آزمون دانکن (جدول ۱)، نشان داد که در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری از نظر میزان فلوراید، استات، کلراید، نیترات، فسفات، سولفات و سوکسینات بین گیاهان شاهد و تراریخته وجود ندارد و هر دو لاین تراریخته با شاهد در یک سطح هستند. البته این آزمون نشان داد که لاین‌های حاوی ژن کیتیناز و همچنین لاین‌های حاوی ژن *cry1Ab* مقدار اگزالات کمتری در مقایسه با شاهد دارند. تجمع اگزالات در گیاهان بر کیفیت تغذیه‌ای آنها اثر منفی دارد. تغذیه از گیاهانی که حاوی میزان اگزالات زیادی هستند ممکن است منجر به مسموم شدن و مرگ دام شود (Libert *et al*. 1987). بنابراین کاهش مقدار اگزالات در پنبه‌های تراریخته‌ی مورد بررسی، نگران کننده نخواهد بود. سوکسینات علاوه بر نقشی که در تنفس گیاه دارد، باعث افزایش تحمل گیاه به سطوح بالای برخی عناصر سنگین مانند روی می‌شود (Stoyanova *et al*. 2002).

مقایسه میانگین‌های کاتیون‌ها با استفاده از آزمون دانکن (جدول ۲) اختلاف معنی‌داری در غلظت پتاسیم و منیزیم بین گیاهان شاهد و تراریخته نشان نداد. این آزمون در لاین حاوی ژن کیتیناز کاهش معنی‌دار در میزان یون سدیم و در پنبه‌های *Bt* کاهش در میزان سدیم و آمونیوم را تائید کرد.

در رابطه با شکل ازت در گیاهان، تحقیقات نشان داده‌اند که گیاهان زراعی می‌توانند یون‌های نیترات و آمونیوم را جذب کرده و مورد استفاده قرار دهند. افزایش مقدار نیترات باعث افزایش تجمع ماده خشک می‌شود؛ که این امر اختلافات ژنتیکی در اولویت یونی را نشان می‌دهد. مقادیر زیاد آمونیوم در بافت می‌تواند رشد را به تاخیر بیاندازد ولی مقادیر زیاد نیترات زیان‌آور نیست (Koocheki *et al*. 1999). بنابراین کاهش آمونیوم در لاین *Bt* نسبت به شاهد نگران‌کننده نیست. اختلاف در میزان آمونیوم

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.6.3]

جدول ۱- مقایسه میانگین آنیون‌ها (میلی‌مولار در گرم وزن خشک) با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵

Table 1- Concentration (mMol/g) of anions in cotton leaves from *Chitinase* lines (C) and *Bt* lines (*Bt*) and nontransgenic (N) plants.

Bt	کیتیناز C	شاهد N	
54.8^{a}	35.3^{a}	59.6^{a}	فلوراید Floride
378.5^{a}	281.7^{a}	391.6^{a}	استات Acetate
974.5^{a}	973.3^{a}	1273.6^{a}	کلراید Chloride
18.7^{a}	24.8^{a}	22^{a}	نیترات Nitrate
125.6^{a}	115.9^{a}	161^{a}	فسفات Phosphate
1865.8^{a}	822^{a}	806.3^{a}	سولفات Sulphate
168.1^{a}	103.8^{b}	131.6^{ab}	سوکسینات Succinate
22.5^{b}	23.9^{b}	29.3^{a}	اگزالات Oxalate

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

Values followed by the superscript different letters within the same column are significantly different at 0.05 probability level.

ممکن است مربوط به ترکیبات خاک و یا سرعت جذب عناصر توسط گیاهان باشد (Hawkins *et al*. 1993).

میزان سدیم در لاین‌های تراریخته به طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود. تجمع سدیم در گیاه منجر به کاهش جذب کلسیم و پتاسیم می‌شود. سدیم نمی‌تواند در فعالیت‌های ویژه مانند فعال سازی آنزیم‌ها و سنتز پروتئین برای ایجاد رشد کافی، جایگزین یون پتاسیم شود. علاوه بر این جایگزینی سدیم به جای کلسیم در غشای سلول سبب کاهش خاصیت نیمه تراوایی غشا و در نتیجه خروج پتاسیم و نیترات درون سلولی می‌شود؛ لذا افزایش تجمع سدیم برای گیاه مضر است اما کاهش سدیم خطری برای گیاه ندارد و برای دست یابی به محصول زیاد در گیاهان ضروری نیست (Amin Panah *et al*. 2005).

بر اساس نتایج این پژوهش، اگر چه پنبه‌های تراریخته در برخی عناصر کم مصرف با گیاه شاهد اختلاف نشان دادند ولی در اکثر موارد با شاهد اختلافی نداشتند، ضمن اینکه این مقادیر در دامنه قابل قبول قرارداشتند. از طرفی این اختلافات می‌تواند ناشی از اثرات محیطی و یا خطا در زمان نمونه برداری باشد که می‌توان آنرا طبیعی قلمداد کرد. در حال حاضر اکثر پنبه‌های تراریخته تجاری شده در دنیا، علاوه بر اختلاف در عناصر کم مصرف حتی در میزان الیاف، خاکستر، چربی و کربوهیدرات با شاهد اختلاف

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.6.3]

دارند، با این وجود مجوز لازم برای تجاری سازی را دریافت کردند. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان تاثیر حضور ژن‌های کیتیناز و *cry1Ab* در ژنوم پنبه‌های تراریخته مورد بررسی را بر میزان آنیون‌ها و کاتیون‌ها ناچیز قلمداد کرد (Tang *et al*. 2006).

جدول ۲- مقایسه میانگین کاتیون‌ها (میلی‌مولار در گرم وزن خشک) با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵

Table 2- Concentration (mMol/g) of cations in cotton leaves from *Chitinase* lines (C) and *Bt* lines (*Bt*) and nontransgenic (N) plants

Bt	کیتیناز C	شاهد N	
26.8^{b}	28.5^{b}	44.6^{a}	سدیم Sodium
1250.8^{a}	1199.4^{a}	1303.6^{a}	پتاسیم Potassium
400.1^{a}	430.1^{a}	410.6^{a}	منیزیم Magnesium
24.7^{b}	27.2^{ab}	32.6^{a}	آمونیوم Ammonium

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است

Values followed by the superscript different letters within the same column are significantly different at 0.05 probability level

منابع

1. Amin Panah H, Soroushzadeh A.(2005). The effect of calcium nitrate on sodium and potassium distribution in seedling of rice under saline conditions.Journal of Biology of Iran. 18(2):92-100. (In Farsi).
2. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant DNA plants. Available at: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10025/CXG_046e.pdf
3. Hawkins, H.J. and O.A.M. Lewis. 1993. Effect of NaCl Salinity, nitrogen form, calcium and potassium concentration on nitrogen uptake and kinetics in Triticum aestivum. L. CV. Gamtoos. New Phytol. 124:171-177.
4. International Life Science Institute(ILSI) Task Force.(2004). Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. Task force of the International Life Science Institute (ILSI) International Food Biotechnology Committee. Comprehensive Rev Food Sci Food Saf 3(2):35–104.
5. Konig A., Cockburn A., Crevel R.W.R., Debruyne E., Grafstroem R., Hammerling U., Kimber I., Knudsen I., Kuiper H.A., Peijnenburg A.C.M., Penninks A.H., Poulsen M., Schauzu M., Wal J.M.(2004). Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. Food Chem Toxicol 42:1047–1088.
6. Koocheki A., Sarmadnia G.(1999). Physiology of crop plants. Jahad daneshgahi press. Mashhad. Iran.(In Farsi).
7. Li Xina, He Xiaoyuna, Luo Yunboa, b, Xiao Guoyingc, Jiang Xianbinc, and Huang Kunlun.(2008). Comparative analysis of nutritional composition between herbicide-tolerant rice with bar gene and its non-transgenic counterpart. Journal of Food Composition and Analysis. 21(7): 535- 539.
8. Libert B. and Franceschi V.R. Oxalate in crop plants.(1987). Journal of Agric. Food chem. 35: 926-938.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.6.3]

9. Methods available from Metrohm for the food industry . http://food.metrohm.com/overview/index.html.
10. Mohanta R .K. Singhal K. K, Ebrahimi S.H., Rajput Y.S. and Mohini M.(2011). Comparative nutritional evaluation of transgenic cottonseeds containing Cry1C protein for ruminant feeding. *Livestock Research for Rural Development.* http://www.lrrd.org/lrrd23/1/moha23014.htm
11. Royal Society.(2002). Genetically modified plants for food use and human health – an update. The Royal Society, London, UK. Available at http://www.royalsoc.ac.uk/displaypagedoc.asp?id=113 19.
12. Rui Y.K., Zhang F.S., Wang Z.R. (2008).Application of ICP-MS to detection of mineral elements and heavy metals in transgenic cotton seeds. 28(1): 188-90.
13. Stoyanova Z. and Doncheva S.(2002). The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. Brazilian Journal of Plant Physiology. 14(2).
14. Tang M., Huang K., Li X., Zhou K., He X. and Luo Y. (2006). Absence of effect after introducing Bacillus thuringiensis gene on nutritional composition in cottonseed. J Food Sci. 71(1): S38-S41.
15. Tohidfar M., Mohammadi M., Ghareyazie B. (2005). Agrobacterium- mediated transformation of cotton(*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell Tiss Org.83: 83-96.
16. Tohidfar M., Ghareyazie B., Mosavi M., Yazdani S., Golabchian R. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of cotton(*Gossypium hirsutum*) using a synthetic cry1Ab gene for enhanced resistance against Heiothis armigera. Iranian Journal of Biotechnology. 6(3):164-173.
17. Yukui R. , Wenya W. , Pinghui L. & Fusuo Z. (2009). Mineral element distribution in organs of dual-toxin transgenic (Bt+CpTI) cotton seedling. Plant Biosystems. 143(1): 137-139.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.6.3]