مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۰، شماره ۲، پاییز وزمستان ۱۴۰۰
صفحه ۲۸۵-۲۷۵

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3

DOR:20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2
2022

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی گستره تغییرات پروتئومی و متابولومی چغندرقندهای تراریخته مقاوم به بیماری رایزومانیا

Evaluating the range of proteomic and metabolic alterations in Rhizomania-resistant transgenic sugar beet plants

سارا هجری[۱]، اعظم سلیمی[۱*]، محمدعلی ملبوبی[۲]، فؤاد فاتحی[۳]

Sara Hejri[1], Azam Salimi[1*], Mohammad Ali Malboobi[2], Foad Fatehi[3]

۱- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲- پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۳- گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

1. Department of Plant Biology, Faculty of Biosciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
3. Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: salimi@khu.ac.ir
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۶)

چکیده

با وجود مزایای قابل ملاحظه محصولات تراریخته، این نگرانی در عموم مردم وجود دارد که آیا این محصولات همچون همتایان غیرتراریخته خودشان برای تغذیه انسان و دام سالم و ایمن هستند. یکی از راه‌های ارزیابی ایمنی غذایی این محصولات، مقایسه ویژگی‌های مولکولی محصولات تراریخته با والد طبیعی آنها و همچنین مقایسه با محصولات حاصل از اصلاح سنتی است که سابقه استفاده ایمن آنها وجود دارد. در این پژوهش تلاش شده که مشخص شود آیا مجموعه تغییراتی که در دو رخداد تراریختهٔ چغندرقند مقاوم به بیماری رایزومانیا در مقایسه با گیاه والد غیرتراریختهٔ حساس به بیماری روی داده، در گستره تغییرات طبیعی بوده است؟ بررسی‌ها نشان داد که تغییرات پروتئومی در هر دو رخداد تراریخته بسیار اندک و در محدوده تغییرات طبیعی است. تغییرات متابولوم در رخداد منتخب S6 اندک و با اینکه در رخداد منتخب S3 چشمگیر بوده، لیکن باز هم در گستره تغییرات طبیعی بوده است.

واژه‌های کلیدی

ارزیابی ایمنی غذایی،
پروتئوم،
چغندرقند،
گیاهان تراریخته،
متابولوم

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

Despite the significant benefits of transgenic crops, there is a general concern that if these crops, like their non-transgenic counterparts, are safe for human and animal nutrition. One way to investigate the food safety of these crops is to compare the molecular properties of transgenic crops with their natural parents as well as crops resulted from conventional breeding which have a history of safe use. This research pursued to determine whether the set of changes that occurred in the two transgenic events of rhizomania-resistant sugar beet is comparable to the parental non-transgenic plants and was within the range of natural changes? Whether genetic engineering led to the generation of compounds that are not safe for humans and animals? Investigations have shown that proteomic alterations in both transgenic lines were minimal and within the range of natural variations. Metabolomic changes in a selected S6 event were very low while there were remarkable alterations in the metabolome of S3 event, although these were within the range of natural deviations too.

Key words: Safety assessment, Proteome, Sugar beet, Transgenic plants, Metabolome

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris*) که در اقلیم‌های معتدل و نیمه گرمسیری در مناطق وسیعی از جهان از جمله ایران کشت می‌شود (Winner 2012)، به دلیل غلظت بالای ساکاروز در ریشه، بخش قابل توجهی از تقاضای جهانی شکر را تأمین می‌کند. بنابراین از ارزش تجاری بالایی برخوردار است (Finkenstadt 2014). این گیاه نسبت به بیماری ویروسی رایزومانیا آسیب‌پذیر است به نحوی که بیماری بر کمیت و کیفیت ریشه اثر می‌گذارد و تولید شکر در هکتار را به شدت کاهش می‌دهد (Biancardi and Tamada 2016). رایزومانیا مهم‌ترین بیماری چغندقند است که برای اولین بار در سال ۱۹۵۸ م در ایتالیا شناسایی شد و به سرعت در سرتاسر جهان گسترش یافت (Shahbazi et al. 2010؛ Webb et al. 2014). این بیماری ویروسی از لحاظ ظاهری موجب پیدایش لکه‌های زرد در اطراف رگبرگ، نکروزه شدن برگ، ایجاد دمبرگ طویل و رشد عمودی‌تر دمبرگ، کوتاهی قد گیاه، کوتاهی ریشه، تشکیل انبوهی از ریشه‌های جانبی نکروزه، تغییر رنگ زرد–قهوه‌ای دستجات آوندی ریشه، کاهش رشد و عملکرد گیاه و حتی مرگ می‌شود (Lennefors et al. 2006; Biancardi and Tamada 2016).

وجود دراز مدت اسپورهای استراحتی ناقل ویروس بیماری رایزومانیا، روش‌های زراعی و شیمیایی کنترل بیماری را با شکست مواجه کرده است (Rezaei et al. 2015). تاکنون، با استفاده از ارقام واجد ژن‌های *Rz1* و *Rz2* تا حد زیادی نیاز به بذور مقاوم به این بیماری تأمین شده است. لیکن با شکسته شدن این مقاومت در بسیاری از نقاط جهان، شرکت‌های تولیدکننده بذر چغندرقند در جستجوی منابع ژنی جدیدی هستند (Zare et al. 2015; Lennefors et al. 2006). با پیشرفت مهندسی ژنتیک، تولید چغندرقند مقاوم به رایزومانیا با استفاده از مکانیسم خاموشی RNA (Zare et al. 2015; Safar et al. 2021) امکان‌پذیر شده است. اما بروز نگرانی‌هایی در اذهان عمومی از آثار احتمالی مهندسی ژنتیک و بر اساس اصول توسعه فناوری‌های جدید ایجاب می‌کند که ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته انجام شود و "این‌همانی" این محصولات از طریق مقایسه ژنوم، ترانس‌کریپتوم، پروتئوم و متابولوم محصول تراریخته با محصول والد غیرتراریخته نیز بررسی شود. این ارزیابی‌ها تغییرات مولکولی در محصولات تراریخته را هم از بعد کمی و هم از بعد کیفی مورد بررسی قرار می‌دهد و در پاسخ به چند پرسش اصلی یاری می‌رساند: ۱- آیا در محتوای ترکیب مولکولی محصول تراریخته نسبت به گیاه والد تغییراتی روی داده است؟ ۲- آیا این تغییرات منجر به ظهور ترکیب سمی یا حساسیت‌زای جدید یا افزایش بیان چنین ترکیبی شده است که ایمنی غذایی این محصولات را متأثر بکند؟ ۳- آیا این تغییرات در محدوده

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3]

تغییرات ناشی از اصلاح سنتی، شرایط محیطی یا تغییرات طبیعی در افراد است (Herman and Price 2013)؟

در این مطالعه، بذرهای چغندرقند مقاوم به رایزومانیا که برای ایجاد مکانیسم خاموشی RNA مهندسی شده بود، مورد بررسی این‌همانی در دو سطح پروتئوم و متابولوم به ترتیب با دو روش 2DE-MS/MS و LC-MS قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت و برداشت گیاه: بذرهای هموزیگوت نسل سوم گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris*) با پس‌زمینه ژنتیکی مشابه که حاصل خودگرده‌افشانی بودند شامل دو رخداد تراریخته مقاوم به بیماری رایزومانیا 219-T3: S3-13.2 (S3) و 6018-T3: S6-44 (S6) و گیاه والد غیرتراریخته حساس به بیماری SBSI 9597 (به عنوان کنترل) مورد استفاده قرار گرفت (Zare et al. 2015). رخدادهای تراریخته از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (تهران، ایران) و گیاه غیرتراریختهٔ والد از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند (کرج، ایران) تهیه شد. بذرها در اتاق رشد با چرخه روشنایی/تاریکی ۱۶/۸h، رطوبت نسبی ۶۰ درصد و در دمای ۲۵/۲۰°C در روز/شب کاشته شد. بعد از پنج ماه، برگ‌ها و ریشه‌های هر گیاه برداشت و در نیتروژن مایع منجمد و در ۷۰°C- ذخیره شد.

استخراج و کمی‌سازی، تشخیص و شناسایی پروتئین‌ها: پروتئین‌های ریشه سه تکرار زیستی برای گیاهان تراریخته و والد با استفاده از روش TCA/acetone مطابق با روش Yang و همکاران (۲۰۱۳) استخراج شد و غلظت پروتئین هر نمونه با روش Bradford (۱۹۷۶) سنجیده شد. جداسازی دوبعدی پروتئین‌ها با روش IEF و SDS-PAGE، رنگ‌آمیزی ژل‌ها با نیترات نقره، اسکن ژل‌ها، تجزیه و تحلیل تصاویر با نرم‌افزار Melanie (ImageMaster) نسخه ۶/۰ (GE Healthcare، Amersham Biosciences، Uppsala، Sweden)، توالی‌یابی پروتئین با MALDI/TOF/TOF و شناسایی آنها در پایگاه‌های داده در مقاله Hejri و همکاران (۲۰۲۱) شرح داده شده است.

استخراج و کمی‌سازی متابولیت‌ها: استخراج و کمی‌سازی اسیدهای آمینه و متابولیت‌های کلیدی در برگ با روش LC/MS در مقاله Hejri و همکاران (۲۰۲۲) شرح داده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۰ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) از نرم‌افزار XLSTAT (Addinsoft، Paris، France) استفاده شد.

نتایج و بحث

پروتئومیکس

در مطالعه پروتئوم با روش 2DE-MS/MS، در مجموع ۳۲۱ لکه تکرارپذیر در ژل‌های پروتئین‌های ریشه شناسایی شد که از این تعداد ۳۲ پروتئین تغییرات قابل توجهی (بیش از دو برابر) در سطح تجمع نشان دادند (جدول ۱). به‌طوری‌که ۲۵ پروتئین در گیاه تراریخته S3 و ۲۴ پروتئین در گیاه تراریخته S6 تحت تأثیر قرار گرفته بود. هفت لکه پروتئینی در ژل‌های S3 نسبت به گیاه والد وجود نداشت درحالی‌که چهار لکه در S3 وجود داشت ولی در گیاه والد مشاهده نشد. ضمنا ۱۳ و یک لکه نیز به ترتیب فراتنظیم (افزایش بیان) و فروتنظیم (کاهش بیان) شد. چهار لکه پروتئینی در ژل‌های S6 نسبت به گیاه والد وجود نداشت درحالی‌که سه لکه در S6 وجود داشت ولی در گیاه والد مشاهده نشد. ضمنا هشت و نه لکه نیز به ترتیب فراتنظیم و فروتنظیم شد. شایان ذکر است که نبود یک لکه پروتئینی در ژل 2DE الزاما به معنای عدم بیان آن پروتئین نیست بلکه احتمال دارد سطح تجمع آن لکه به قدری کاهش یافته که با روش مورد استفاده (2DE) قابل ردیابی نبوده است. به طور کلی، کمتر از ۸ درصد پروفایل پروتئینی در رخدادهای تراریخته تغییرات قابل تشخیص نشان داد. توالی‌یابی پروتئین‌های با بیان متفاوت نشان داد هیچ پروتئین سمی یا حساسیت‌زای جدیدی به وجود نیامده یا افزایش بیان نداشته است. ضمنا این پروتئین‌ها از لحاظ عملکردی به گروه‌های متنوعی تعلق داشتند مانند پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، متابولیسم، تولید و تجزیه پروتئین‌ها، پردازش DNA و RNA،

ترارسانی علامت و انتقال سلولی. همچنین از لحاظ جایگاه درون‌سلولی در مکان‌های مختلف سیتوزول، غشای سلولی، هسته و اندامک‌هایی چون میتوکندری، کلروپلاست و شبکه آندوپلاسمی استقرار دارند (Hejri et al. 2021).

جدول ۱- نام و وضعیت تجمع پروتئین‌هایی که در ریشه چغندرقند بیان متفاوتی نشان دادند.

Table 1- Name and status of accumulation of proteins that showed different expression in sugar beet root.

Protein No.	Protein Name	Accumulation Status
1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (Fragment)	S3 *
2	Phospholipase D delta	S6 ↓
3	Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17 (Fragments)	S3 *, S6 *
4	Tyrosine--tRNA ligase 1, cytoplasmic	S6 *, S3 ↑
5	Protein PPLZ12	S3 ↑, S6 ↓
6	Proteasome subunit beta type-2	S3 ↑, S6 ↑
7	CST complex subunit STN1	S6 ↑
8	Vacuolar protein sorting-associated protein 22 homolog 1	S3 ↑, S6 ↓
9	Phenylcoumaran benzylic ether reductase, Pyrc5	S6 ↓
10	Glutaredoxin-C3	S6 ↓
11	Putative aluminum-activated malate transporter 11	S6 *
12	Cytochrome P450 714D1	S3 *, S6 ↓
13	Replication factor C subunit 4	S3 ↑
14	Probable serine/threonine-protein kinase PBL9	S3 ↓, S6 ↓
15	Cysteine proteinase inhibitor A	S3 ↑
16	Adenine nucleotide transporter BT1, chloroplastic/amyloplastic/mitochondrial	S3 +, S6 +
17	NRR repressor homolog 1	S3 ↑, S6 ↑
18	Aspartate aminotransferase P2, mitochondrial (Fragment)	S3 +, S6 +
19	Monothiol glutaredoxin-S2	S3 ↑, S6 ↑
20	Probable trehalose-phosphate phosphatase 2	S3 *, S6 *
21	Cysteine protease inhibitor 10 (Fragment)	S3 ↑
22	Ribonuclease J	S3 ↑, S6 ↑
23	Probable pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PDX2	S3 *
24	Putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g12700, mitochondrial	S3 ↑
25	Soluble inorganic pyrophosphatase	S6 ↑
26	Probable fructokinase-1	S3 *, S6 ↓
27	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	S3 *
28	Putative zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 8	S3 ↑, S6 ↑
29	Hypersensitive-induced response protein 4	S6 ↑
30	26.7 kDa heat shock protein, chloroplastic	S3 ↑, S6 ↓
31	Lectin	S3 +
32	Antiviral protein S	S3 +, S6 +

وضعیت سطح تجمع پروتئین‌ها در رخدادهای تراریخت S3 و S6 در مقایسه با گیاه غیرتراریخت (WT): * عدم حضور، + حضور، ↑ فراتنظیم و ↓ فروتنظیم. ND اطلاعاتی وجودد ندارد.

The status of protein accumulation levels for S3 and S6 transgenic plants compared with the non-transgenic plant (WT): * absent, + present, ↑ up-regulated, and ↓ down-regulated proteins. ND, no data.

متابولومیکس

در مطالعه متابولوم با روش LC-MS، گلایسین (Gly) تنها اسیدآمینه‌ای بود که در رخداد S6 تغییر کرد و سطح آن افزایش یافت. بنابراین، گستره تغییرات اسیدهای آمینهٔ آزاد در S6 اندک (حدود ۵ درصد) و برابر با ۱۷۵۰/۸ nmol g^{-1}DW در S6 و ۱۵۷۰/۲ nmol g^{-1}DW در WT بود. درحالی‌که محتوای ۱۲ اسید آمینه آزاد شامل گلایسین (Gly)، هیستیدین (His)، لیزین (Lys)، ایزولوسین (Ile)، لوسین (Leu)، فنیل‌آلانین (Phe)، گلوتامین (Gln)، آسپارتات (Asp)، آسپاراژین (Asn)، ترئونین (Thr)، آلانین (Ala) و والین (Val) در S3 افزایش یافت (Hejri et al.

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3]

2022) (جدول ۲). پس گسترده تغییرات اسیدهای آمینهٔ آزاد در رخداد S3 چشمگیر بود (بیش از ٦٣ درصد) به نحوی که محتوای کل اسیدهای آمینهٔ آزاد در رخداد S3، ١/٦ برابر بیشتر از گیاه والد بود (٢٥٣٣/٨ nmol g^{-1}DW در رخداد S3). اکثر اسیدهای آمینهٔ مذکور همچون Asn، Thr، Lys، Ile و Gly از Asp منشأ می‌گیرند. بنابراین، افزایش در محتوای Asp مستقیما موجب افزایش در سطح این اسیدهای آمینه شده است. همچنین مسیر بیوسنتز دو اسید آمینه Val و Leu از طریق دو متابولیت و چهار آنزیم در مسیر تولید Ile از Thr مرتبط است. پس، افزایش در محتوای Asp به طور غیرمستقیم بر سطح تجمع این دو اسید آمینه مؤثر بوده است.

جدول ۲- نام و وضعیت تجمع متابولیت‌هایی که در ریشه چغندرقند تجمع متفاوتی نشان دادند.

Table 2 - Name and status of accumulation of metabolites that showed different accumulation in sugar beet root.

Metabolite Name	Accumulation Status
Arg	NC
Ser	NC
Glu	NC
Gaba	NC
Pro	NC
Tyr	NC
Met	NC
Gly	S3 ↑, S6 ↑
Asn	S3 ↑
Gln	S3 ↑
Asp	S3 ↑
Thr	S3 ↑
Ala	S3 ↑
Val	S3 ↑
His	S3 ↑
Lys	S3 ↑
Ile	S3 ↑
Leu	S3 ↑
Phe	S3 ↑
Glucose	NC
Fructose	NC
Sucrose	NC
ADP	NC
AMP	NC
UTP	NC
UDP	NC
UMP	NC
Malate	NC
Succinate	NC
Trans-aconitate	NC
Citrate	NC
Fumarate	NC
Glucose-1-phosphate	NC
Glucose-6-phosphate + Fructose-6-phosphate	NC
3-phosphoglycerate	NC
Phosphoenolpyruvate	NC
ADP- Glucose	NC
UDP- Glucose	NC
ATP	S3 ↓, S6 ↓
Cis-aconitate	S3 ↓
Fructose-1,6-bisphosphate	S3 ↓

وضعیت سطح تجمع متابولیت‌ها در رخدادهای تراریخت S3 و S6 در مقایسه با گیاه غیرتراریخت (WT): ↑ فراتنظیم و ↓ فروتنظیم. NC بدون تغییر.

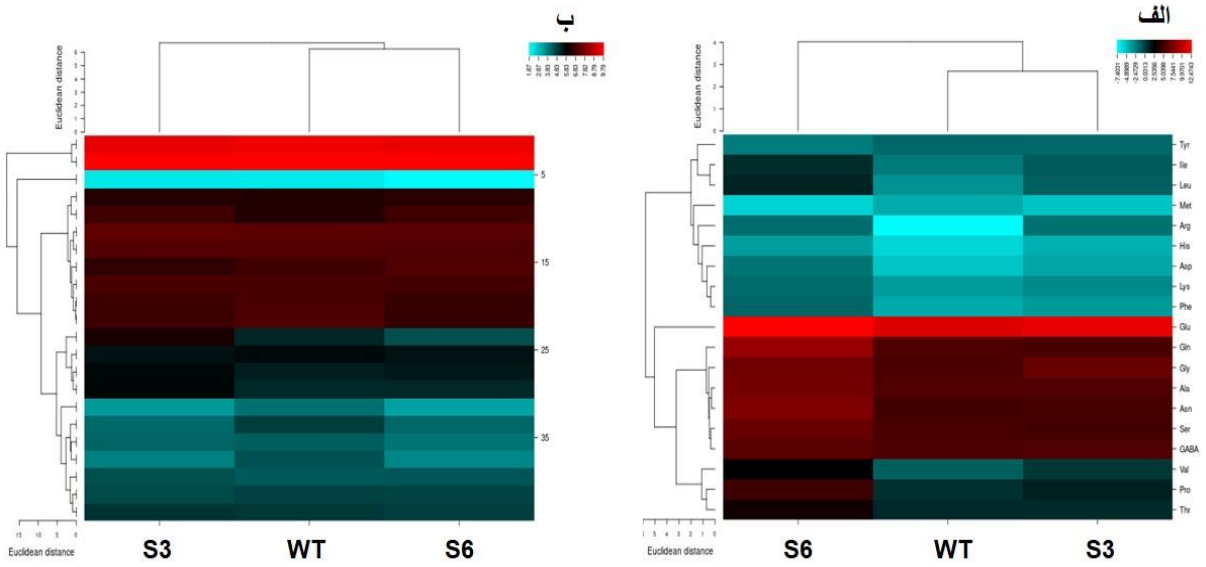
The status of metabolite accumulation levels for S3 and S6 transgenic plants compared with the non-transgenic plant (WT): ↑ up-regulated metabolite, ↓ down-regulated metabolite, and NC, no change.

در مقایسه بین متابولیت‌های کلیدی گیاهی از جمله اجزای مسیر متابولیسم ساکاروز، گلیکولیز و چرخه کربس مانند قندهای فسفاته، اسیدهای آلی و نوکلئوتیدها ...، در رخداد S6 تنها محتوای ATP به یک‌سوم گیاه والد کاهش پیدا کرد. درحالی‌که در رخداد S3 علاوه بر ATP، سطح فروکتوز-۶،۱-بیس فسفات و سیس-اکونیتات نیز به یک‌دوم گیاه والد کاهش یافت (جدول۲).

لازم به ذکر است که کاهش محتوای ATP به دلیل فعالیت مکانیسم خاموشی RNA روی داد زیرا ATP در طول این مکانیسم در سه مرحله مصرف می‌شود. بنابراین این کاهش قابل پیش‌بینی بود. در کل، گستره تغییرات متابولیتی (شامل اسیدهای آمینه و متابولیت‌های کلیدی) در S6 اندک و کمتر از ۵ درصد ولی در S3 چشمگیر و در حدود ۳۵ درصد بود (Hejri et al. 2022).

آنالیز خوشه‌ای متابولیت‌ها در نقشه حرارتی نشان داد که پروفایل متابولیت‌های کلیدی رخداد S3 به گیاه والد نزدیک‌تر بود، درحالی‌که پروفایل اسیدهای آمینهٔ رخداد S6 به گیاه والد نزدیک‌تر بود (شکل ۱).

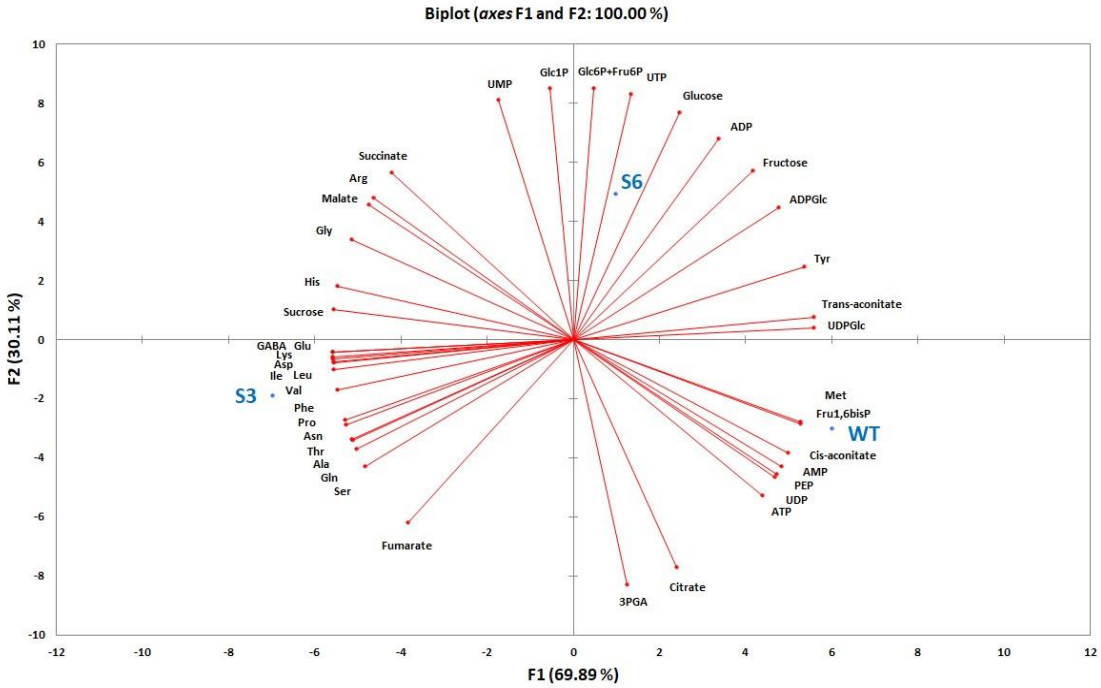
در آنالیز PCA جدایی آشکار بین والد، S6 و S3 در اولین جزء اصلی (F1) وجود دارد که ۸۹/۶۹ درصد از کل واریانس را تشکیل می‌دهد. گیاهان والد و S6 نیز توسط دومین جزء اصلی (F2) از هم جدا شدند که ۱۱/۳۰ درصد از کل واریانس را تشکیل می‌دهد (شکل ۲). پروفایل همه اسیدهای آمینه، Cis- ،UDPGlc ،ADPGlc ،Sucrose ،Fructose ،Fru1,6bP aconitate، Trans-aconitate، Succinate، Malate، ATP، AMP و UDP با F1 همبستگی دارد. درحالی‌که پروفایل ۳-PGA، Glc1P، Glc6P+Fru6P، Glucose، Citrate، Fumarate، ADP، UTP و UMP با F2 همبستگی دارد.



شکل ۱- نقشه حرارتی اسیدهای آمینه (الف) و متابولیت‌های کلیدی (ب) در برگ چغندرقند WT، S3 وS6. آبی و قرمز به ترتیب بیانگر سطح تجمع کم و زیاد

Figure 1- Heatmap of amino acids (a) and key metabolites (b) in sugar beet leaves WT, S3 and S6. Blue and red indicate low and high accumulation levels, respectively.

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3]



شکل ۲- آنالیز PCA متابولیت‌های برگ چغندرقند WT، S3 و S6. PCA1 (F1) و PCA2 (F2)، صد در صد از واریانس داده‌ها را نشان می‌دهند.

Figure 2- PCA analysis of WT, S3 and S6 sugar beet leaves metabolites. PCA1 (F1) and PCA2 (F2) represent 100% of the variance.

آیا تغییر در ژنوم به محصولات تراریخته محدود می‌شود؟

مروری بر داده‌های ژنومی و مقایسه آنها نشان می‌دهد به دلیل وجود ترانسپوزون‌ها و فرایندهایی چون مضاعف شدن ژن، انتقال ژن بین اندامک‌ها و انتقال افقی ژن، و .... ژنوم گیاهان به طور طبیعی و مداوم در حال تغییر است که موجب تنوع طبیعی بین افراد می‌شود (Herman and Price 2013). بنابراین، تصور اینکه همه اختلافات مشاهده شده بین گیاه تراریخته و غیرتراریخته به دلیل مهندسی ژنتیک است، تصور صحیحی نیست و بخشی از تفاوت‌های مشاهده شده به تفاوت‌های فردی طبیعی برمی‌گردد. پس هنگام مقایسه گیاهان تراریخته با والد وحشی، بازه تنوع طبیعی بین افراد نیز باید در نظر گرفته شود (Baker et al. 2006). همچنین در پژوهش‌های متعددی نشان داده شده است که روش‌های اصلاح سنتی شامل تلاقی برگشتی، باززایی کشت بافت، جهش‌زایی و دورگه‌گیری باعث تغییرات گسترده و متنوعی مانند جهش، حذف، الحاق و بازآرایی در محتوای ژنتیکی گیاهان می‌شود (Herman and Price 2013 Stewart and Shepherd 2013;). بنابراین، تغییر ژنتیکی ناشی از افزودن ژن خارجی نیز یک واقعیت غیرمعمول و جدید نیست و آثار ناخواسته و غیرهدف فقط به گیاهان تراریخته محدود نمی‌شود. از طرف دیگر، عوامل محیطی مختلف و شرایط رشد تغییراتی را در ترکیب مولکولی گیاهان ایجاد می‌کنند (Stewart and Shepherd 2013). از این‌رو، وجود تغییر در گیاهان تراریخته امری اجتناب‌ناپذیر و مورد انتظار است و صرف وجود تغییر در ترکیب مولکولی این محصولات به معنای نبود ایمنی غذایی نیست. پرسش مهم این است که ۱- آیا این تغییرات در محدوده تغییرات ناشی از اصلاح سنتی، شرایط محیطی یا تغییرات طبیعی در افراد است؟ ۲- آیا این محصولات به اندازه همتایان غیرتراریخت خود برای تغذیه انسان و دام ایمن هستند؟ و ۳- آیا در رخدادهای منتخب برای رهاسازی، بیان ناخواسته ترکیبات سمی و حساسیت‌زای جدید یا افزایش محتوای این ترکیبات مشاهده شده است (Herman and Price 2013)؟

نتایج حاصل از مقایسه پروتئوم و متابولوم گیاهان تراریخته با گیاهان غیرتراریخته

پژوهش‌های قبلی گزارش داده‌اند که آثار ناخواسته حاصل از الحاق ژن منفرد بر گیاهان تراریخت کمتر از تفاوت‌های موجود بین ارقام طبیعی یا افراد مختلف است. برای مثال در پژوهش‌های

Liu و همکاران (۲۰۲۰c) با کمک روش iTRAQ بر روی پروتئوم بذرهای ذرت سه رقم با ژنوتیپ طبیعی و چهار لاین تراریخته، نشان داده شد که تفاوت‌ها بین لاین‌های ذرت با ژنوتیپ طبیعی (در کل ٤٥٣ پروتئین) بیشتر از اختلاف‌ها بین لاین‌های تراریخته و غیرتراریخته (در کل ۳۵۷) بود. Liu و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهش دیگری، این بار بر روی پروتئوم لپه‌های بذر سویا از چهار لاین تراریخته در قیاس با سه گیاه طبیعی از جمله دو والد آنها، نشان دادند که تفاوت بین ارقام طبیعی (۲۳۲ پروتئین با بیان متفاوت) بیشتر از تفاوت بین لاین‌های تراریخته و غیرتراریخته (۱۷۰ پروتئین با بیان متفاوت) است. در این پژوهش از چهار لاین تراریخته، سه لاین، والد مشترکی داشتند. هم هنگام مقایسه این سه لاین با یکدیگر و هم هنگام مقایسه همه چهار لاین تراریخته باهم، هیچ پروتئینی با بیان متفاوتی مشاهده نشد. پس درج یک ژن منفرد منجر به تغییرات قابل ملاحظه‌ای نشده است. بررسی متابولوم گوجه‌فرنگی‌های تراریخته BT که در سال‌های مختلف کاشته شده بودند، نشان داد که تفاوت بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته که در گلخانه رشد کردند، حتی در فصول مختلف بسیار جزئی بود. جالب اینجاست که مقایسه ترکیب مولکولی افراد در یک ردیف که در یک مکان کاشته و در یک زمان برداشت شدند، تفاوت‌هایی را نشان داد. این آزمایش ثابت می‌کند که بیشتر گوناگونی ها از نوع تفاوت‌های طبیعی بین فردی است و به افزودن تراژن مربوط نیست (Noteborn et al. 2000).

همچنین آثار ناخواسته حاصل از الحاق ژن منفرد بر گیاهان تراریخته کمتر از آثار حاصل از اصلاح سنتی است. به عنوان مثال، در پژوهش Gong و همکاران (۲۰۱۲) بر روی پروتئوم بذر برنج، مقایسه در سه سطح انجام شد: مقایسه گیاهان تراریخته با گیاهان کنترل که حاصل اصلاح سنتی بودند، مقایسه زیرگونه‌های غیرتراریخته با هم که با تغییرات طبیعی ایجاد شده بودند و مقایسه ارقام حاصل از اصلاح سنتی با هم. در این تحقیق بیشترین تعداد پروتئین با بیان متفاوت در درجه اول بین زیرگونه‌های وحشی، در درجه دوم بین واریته‌های حاصل از اصلاح سنتی، در درجه سوم بین واریته حاصل از اصلاح سنتی و زیرگونه وحشی مشاهده شد و کمترین تفاوت بین برنج تراریخته و والد آن دیده شد. همچنین در مقایسه متابولوم چهار لاین حاصل از مهندسی ژنتیک و هفت لاین حاصل از اصلاح سنتی برنج نشان داد که هر دو روش مهندسی ژنتیک و اصلاح سنتی می‌تواند موجب بروز تغییرات زیاد در سطح متابولیکی شود. لیکن فرآیند مهندسی ژنتیک نسبت به اصلاح سنتی ممکن است فشار متفاوتی بر ژنوم میزبان ایجاد کند. همچنین اختلافات بین لاین‌های تراریخته با غیرتراریخته کمتر از تفاوت‌های بین لاین‌های حاصل از اصلاح سنتی بود (Liu et al. 2020b). بررسی متابولوم علوفه و بذر ذرت تراریخته حاوی ژن *Cry1Ac* در ده مزرعه در دو منطقه جغرافیایی مختلف در طول دو فصل رشد نیز نشان داد که ذرت تراریخته از نظر ترکیبی مشابه ذرت‌های حاصل از اصلاح سنتی است و مقادیر متابولیت‌ها در محدوده طبیعی قرار دارند (Drury et al. 2008).

علاوه بر این، مطالعات متعدد نشان داده است که آثار ناخواسته حاصل از الحاق ژن منفرد بر گیاهان تراریخته کمتر از آثار حاصل از عوامل محیطی است. برای مثال Tan و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از الکتروفورز دوبعدی و طیف‌سنجی جرمی، تفاوت پروتئومی بین بذرهای ذرت تراریخته فیتازی (PT) و بذرهای ذرت غیرتراریخته (NT) را مقایسه کردند. تعداد ٤٣ و ۳۷ پروتئین با بیان متفاوت بین NT و PT که به ترتیب در گلخانه و مزرعه کاشته شده بودند، مشاهده شد. سپس پروفایل پروتئینی بذرهای کاشته‌شده در گلخانه و مزرعه را با هم مقایسه کردند. ۷٦ پروتئین با انباشتگی متفاوت بین بذر ذرت NT گلخانه‌ای و مزرعه‌ای یافت شد درحالی‌که ۷۷ پروتئین متفاوت بین بذر PT گلخانه‌ای و مزرعه‌ای دیده شد. در پژوهشی دیگر، در آنالیز مقایسه‌ای بین آرد ذرت تراریخته و غیرتراریخته که با استفاده از تکنیک 2-DIGE انجام شد (Vidal et al. 2015)، بین آرد ذرت تراریخته و غیرتراریخته در سطح پروتئومی ۹۹ لکه متفاوت وجود داشت. بخشی از پروتئین‌ها به علت تغییرات ژنتیکی و بخشی دیگر در اثر عوامل محیطی تغییر نشان دادند لذا الحاق ژن ممکن است تعداد محدودی از پروتئین‌ها را متأثر کند ولی تعداد زیادی از پروتئین‌ها در نتیجه شرایط محیطی تغییر می‌کنند. برای مثال برخی از تغییرات مشاهده شده می‌تواند ناشی از تنش مکانیکی حین جمع‌آوری ذرت و فرایند فرآوری آن باشد. در مورد

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3]

متابولوم، Baker و همکاران (۲۰۰۶) با روش NMR و GC/MS سعی در مقایسه متابولوم سه گندم تراریخته با لاین‌های والد مربوطه داشتند که به مدت سه سال در دو مزرعه کاشته شده بودند. آنها نشان دادند که مکان و زمان رشد نسبت به ژنوتیپ تأثیر قوی‌تری بر متابولیت‌های آرد دارد و تفاوت بین خود لاین‌های والدی در مکان‌ها و زمان‌های مختلف بیشتر از تفاوت بین لاین‌های کنترل و تراریخته است. همچنین Jiao و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی ترکیب مولکولی پاپایای تراریخته مقاوم به PRSV و پاپایای غیرتراریخته نشان دادند که ترکیب مولکولی از جمله مواد مغذی مهم یا سمی بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته بسیار مشابه بود و زمان برداشت تاثیر بیشتری بر تنوع متابولیت‌ها داشت.

آیا تغییرات موجود در پروتئوم و متابولوم دو رخداد تراریخته چغندرقند در گستره تغییرات طبیعی است؟

برای دانستن اینکه آیا تغییرات مشاهده‌شده در پروتئوم و متابولوم رخدادهای تراریخته چغندرقند در مقایسه با گیاه والد در گستره تغییرات طبیعی است، مطالعات متعدد مربوط به پروفایل‌های پروتئینی و متابولومی چغندرقند در شرایط تنش بررسی شد.

به عنوان مثال، عصاره‌های پروتئینی ژنوتیپ‌های چغندرقند مقاوم و حساس به *Fusarium oxysporum* با نمونه‌های شاهد در دو و پنج روز پس از تلقیح با قارچ توسط Larson و همکارانش (۲۰۰۷) مقایسه شدند. تقریبا ۸ درصد پروتئین‌ها در ژنوتیپ حساس و ۱۲درصد پروتئین‌ها در ژنوتیپ مقاوم توسط قارچ متأثر شدند. همچنین بیان پروتئین‌های چغندرقند در آلودگی با BNYVV توسط Larson و همکاران (۲۰۰۸) ارزیابی شد. به ترتیب ۱۱درصد و ۷/٤ درصد از پروتئین‌ها در انواع حساس و مقاوم تحت تأثیر ویروس قرار گرفتند. در مطالعه پروتئوم نوک ریشه چغندرقند در شرایط کمبود آهن نشان داده شد که سطح بیان ٦۱ پروتئین از ۱٤۰ لکه شناسایی‌شده تغییر کرده است (Rellán-Álvarez et al. 2010). Yang و همکارانش (۲۰۱۲) نیز با استفاده از 2D-DIGE پروفایل پروتئینی ریشه sugar beet monosomic addition Line M14 را تحت تنش شوری مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. در این بررسی ۳٦ لکه پروتئینی تغییرات قابل توجهی را نشان داد.

در توافق با یافته‌های فوق‌الذکر، این تحقیق نیز بیانگر تعداد کم پروتئین‌های تغییریافته ریشه چغندرقند (کمتر از ۸ درصد) بود که نشان می‌دهد آثار ناخواسته الحاق ژن خارجی بر پروتئوم کم است و می‌توان این اختلافات محدود را به تفاوت‌های طبیعی مورد انتظار در میان لاین‌های گیاهی مربوط دانست.

Hu و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که محتوای کل اسید آمینه ریشه در ۱٤ واریته چغندرقند بین ۰/۳۰ درصد تا ۰/٦۲درصد است. این بدان معنی است که مقدار کل در واریته‌ای که بالاترین میزان محتوای اسیدهای آمینه را دارد، دو برابر واریته‌ای است که کمترین مقدار را دارد. چنین تفاوت‌های قابل توجهی نیز برای هر اسید آمینه مشاهده شد. Liu و همکاران (۲۰۲۰a) بیان کردند که حتی مواجهه یک روزه چغندرقند با شوری باعث افزایش فعالیت چرخه TCA و متابولیسم ساکاروز در چغندرقند می‌شود که ساکاروز را می‌کاهد و اجزای چرخه TCA را می‌افزاید. همچنین پس از هفت روز اسیدهای آمینه نیز تغییرات قابل توجهی را نشان دادند.

در این تحقیق تغییر تنها دو متابولیت در S6 (کمتر از ۵ درصد) نشانگر گستره تغییرات بسیار اندک بود، درحالی‌که این تغییرات در S3 چشمگیر بود (حدود ۳۵ درصد). گرچه این تفاوت‌ها عمدتا در محتوای اسید آمینه بود، لیکن محتوای کل اسیدهای آمینهٔ آزاد در S3 ۱/٦ برابر WT بود که با توجه به گزارش Hu و همکاران (۲۰۱۹) از لحاظ کمّی در گستره تغییرات طبیعی محسوب می‌شد.

سپاسگزاری: این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و شرکت توسعه فناوری سبز تراژن انجام شد. از فریده هدایتی، مریم خوش‌نامی و علی‌اصغر بهروز برای کمک‌های فنی ایشان تشکر می‌کنیم.

منابع

Baker JM, Hawkins ND, Ward JL, Lovegrove A, Napier JA, Shewry PR, Beale MH. 2006. A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. Plant Biotechnology Journal 4:381-392.

Biancardi E, Tamada T. 2016. Rhizomania, Springer International Publishing, Switzerland.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Drury SM, Reynolds TL, Ridley WP, Bogdanova N, Riordan S, Nemeth MA, Sorbet R, Trujillo WA, Breeze ML. 2008. composition of forage and grain from second-generation insect-protected corn mon 89034 is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). J. Agric. Food Chem. 56:4623-4630.

Finkenstadt VL 2014. A review on the complete utilization of the sugar beet. Sugar Tech 16 (4):339-346.

Gong CY, Li Q, Yu HT, Wang Z, Wang T. 2012. Proteomics insight into the biological safety of transgenic modification of rice as compared with conventional genetic breeding and spontaneous genotypic variation. Journal of Proteome Research 11(5):3019-3029.

Hejri S, Salimi A, Malboobi MA, Fatehi F. 2021. Comparative proteome analyses of rhizomania resistant transgenic sugar beets based on RNA silencing mechanism. GM Crops & Food 12(1):419-433.

Hejri S, Salimi A, Malboobi MA, Fatehi F, Yousefiara M. 2022. Investigation of possible changes induced by RNA silencing in some leaf metabolites of transgenic sugar beet events. Food Chemistry: Molecular Sciences 100073.

Herman RA, Price WD. 2013. Unintended compositional changes in genetically modified (GM) crops: 20 Years of Research. J. Agric. Food Chem. 61:11695-11701.

Hu X, Zhou J, Yang H. 2019. Comprehensive evaluation of different sugar beet varieties by using principal component and cluster analyses. In Journal of Physics: Conference Series 1176:1-14.

Jiao Z, Deng J, Li G, Zhang Z, Cai Z. 2010. Study on the compositional differences between transgenic and non-transgenic papaya (*Carica papaya* L.). Journal of food composition and analysis 23(6):640-647.

Larson RL, Hill AL, Nuñez A. 2007. Characterization of protein changes associated with sugar beet (*Beta vulgaris*) resistance and susceptibility to *Fusarium oxysporum*. J. of Agricultural and Food Chemistry 55(19):7905-7915.

Larson RL, Wintermantel WM, Hill A, Fortis L, Nunez A. 2008. Proteome changes in sugar beet in response to Beet necrotic yellow vein virus. Physiological and molecular plant pathology 72(1-3):62-72.

Lennefors B, Savenkov E, Bensefelt J, Wremerth-Weich E, Roggen P, Tuvesson S, Valkonen J, Gielen J. 2006. dsRNA-mediated resistance to beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. vulgaris). Mol Breeding 18:313-325.

Liu L, Wang B, Liu D, Zou C, Wu P, Wang Z, Wang Y, Li C. 2020a. Transcriptomic and metabolomic analyses reveal mechanisms of adaptation to salinity in which carbon and nitrogen metabolism is altered in sugar beet roots. BMC Plant Biology 20:1-21.

Liu Q, Yang X, Tzin V, Peng Y, Romeis J, Li Y. 2020b. Plant breeding involving genetic engineering does not result in unacceptable unintended effects in rice relative to conventional cross-breeding. The Plant Journal 103(6):2236-2249.

Liu W, Li L, Zhang Z, Dong M, Jin W. 2020c. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of transgenic and non-transgenic maize seeds. Journal of Food Composition and Analysis 92:1-11.

Liu W, Xu W, Li L, Dong M, Wan Y, He X, Huang K, Jin W. 2018. iTRAQ-based quantitative tissue proteomic analysis of differentially expressed proteins (DEPs) in non-transgenic and transgenic soybean seeds. Scientific reports 8(1):1-10.

Noteborn HPJM, Lommen A, Van Der Jagt RC, Weseman JM. 2000. Chemical fingerprinting for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic food crops. J Biotech 77:103-114.

Rellán-Álvarez R, Andaluz S, Rodríguez-Celma J, Wohlgemuth G, Zocchi G, Álvarez-Fernández A, Fiehn O, López-Millán AF, Abadía. J 2010. Changes in the proteomic and metabolic profiles of *Beta vulgaris* root tips in response to iron deficiency and resupply. BMC Plant Biology 10 (1):1-15.

Rezaei J, Bannayan Awal M, Nezami A, Mehrvar M, Mahmoodi B. 2015. Growth Analysis of Sugar Beet in Healthy and Rhizomania Infected Conditions. Iranian Journal of Field Crops Research 12(4):683-692. (In Farsi with English abstract).

Safar S, Bazrafshan M, Khoshnami M, Behrooz AA, Hedayati F, Maleki M, Mahmoudi SB, Malboobi MA. 2021. Field evaluation for rhizomania resistance of transgenic sugar beet events based on gene silencing. Canadian Journal of Plant Pathology 43(1):179-188.

Shahbazi HA, Sadeghian SY, Ahmadi M, Soltani J. 2010. The Possibility of Transferring of Rhizomania Resistance Genes from Genetically Broad Based Populations and Varieties into Sugar Beet Lines. Journal of Sugar Beet 26(1):15-30. (In Farsi with English abstract).

Stewart D Shepherd LVT. 2013. Metabolomics for the safety assessment of genetically modified (GM) crops. Metabolomics in Food and Nutrition 192-216.

Tan Y, Zhang J, Sun Y, Tong Z, Peng C, Chang L, Guo A, Wang X. 2019. Comparative proteomics of phytase-transgenic maize seeds indicates environmental influence is more important than that of gene insertion. Scientific Reports 9(1):1-11.

Vidal N, Barbosa H, Jacob S, Arruda M. 2015. Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (*Zea mays*) flours commercialized in Brazil, Focusing on proteomic analyses. Food chemistry 180:288-294.

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3]

Webb KM, Broccardo CJ, Prenni JE, Wintermantel WM. 2014. Proteomic profiling of sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves during rhizomania compatible interactions. Proteomes 2(2):208-223.

Winner C. 2012. History of the crop. In: Cooke DA, Scott JE (ed) The Sugar Beet Crop, Springer Science & Business Media.

Yang L, Ma C, Wang L, Chen S, Li H. 2012. Salt stress induced proteome and transcriptome changes in sugar beet monosomic addition line M14. Journal of plant physiology 169(9):839-850.

Yang L, Zhang Y, Zhu N, Koh J, Ma C, Pan Y, Yu B, Chen S, Li H. 2013. Proteomic analysis of salt tolerance in sugar beet monosomic addition line M14. Journal of Proteome Research 12(11):4931-4950.

Zare B, Niazi A, Sattari R, Aghelpasand H, Zamani K, Sabet MS, Moshiri F, Darabie S, Daneshvar MH, Norouzi P, Kazemi-Tabar SK, Khoshnami M, Malboobi MA. 2015. Resistance against rhizomania disease via RNA silencing in sugar beet. Plant Pathology 64:35-42.

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.2.11.3]