

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی- پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره دوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۲

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سر دبیر: دکتر منصور امیدی

دبیر هیات تحریریه و اجرایی: مهندس سمیرا کهک و مهندس مهدیه مجد

هیات تحریریه

دکتر فضل‌الله افراز (استادیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور)
دکتر منصورامیدی (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)
دکتر علی‌اکبر شاه نجات بوشهری (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)
دکتر مسعود توحیدفر (دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران)
دکتر بهزاد قره یاضی (استاد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی)
دکتر رضا معالی‌امیری (دانشیار، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی)
دکتر محمد علی ملبوبی (دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری)
دکتر سید ضیاءالدین میرحسینی (دانشیار، دانشگاه گیلان)

صفحه آرایی: مهندس افسانه شمس و مهندس ملیحه نعل‌چگر

درجه علمی- پژوهشی مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی طی نامه شماره ۸۹/۳/۱۱/۸۹۳۶۴ مورخه ۸۹/۱۱/۱۸ کمیسیون بررسی نشریات علمی کشور تأیید شده است.

مسئولیت محتوای علمی، اطلاعاتی، اسامی نویسنده(گان) و ترتیب آن‌ها به عهده مکاتبه کننده مقاله است.

دو فصل‌نامه در ویرایش و تخریص مطالب آزاد است. درج مطالب به منزله تأیید کامل محتوای آن‌ها نیست.

مقالات وارده مسترد نمی‌شود. نقل مطالب با ذکر ماخذ مجاز است.

نشانی: تهران، انتهای اتوبان همت به سمت غرب، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۶۱

پست الکترونیک: gebs.j.bs@gmail.com ، تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۷۵

پایگاه اینترنتی: www.gebsj.ir

امور چاپ: مرکز نشر دانشگاهی

تیراژ: ۵۰۰



مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دوفصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره دوم، شماره ۱، شماره پیاپی ۳، بهار و تابستان ۱۳۹۲

فهرست مطالب

مقاله های پژوهشی

- مقایسه کشت متداول گیاهان زراعی با گیاهان تراریخته مقاوم به آفات از جنبه اثر بر سلامت محیط زیست، انسان و دام
نگین عادل و بهزاد قره یاضی
۱-۲۸
- بررسی میزان باقیمانده و دوره کارنس حشره کش دیازینون در محصول خیار گلخانه ای جیرفت
محسن مروتی و مهدی آزادوار
۲۹-۳۶
- ردیابی ژن *nptII* و پیشبر *nos* در دستگاه گوارش و بافتهای موشهای صحرایی تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته
علیرضا ستارزاده، حسن رهنما، مهدی نیکمرد، بهزاد قره یاضی و محمود خسروشاهی
۳۷-۴۸
- هم ردیفی توالی آنزیم های مسیر بیوسنتز اینولین در گیاهان
هادی شوریده، سیدعلی پیغمبری، منصور امیدی، محمدرضا نقوی، اسعد معروفی و مرضیه حسینی نژاد
۴۹-۵۸
- جداسازی بخشی از *cdna* ژن ترانسفرین (*Ttf*) از رقم بم گندم زراعی تحت تیمار تنش شوری
نادر رحیمی اسفنجانی و علیرضا تاری نژاد
۵۹-۷۰
- بهبود کارایی انتقال ژن به روش غیرکشت بافت در گیاهان گندم و برنج با استفاده از آگروباکتریوم
صدیقه نصررمزی، محمدمهدی سوهانی و محسن ایمان زاده
۷۱-۸۰
- ارزیابی پاسخ های مولکولی دو رقم گندم به قارچ عامل زنگ قهوه ای
عارفه اصغری، ولی اله بابایی زاد، محمدعلی تاجیک قنبری و صفرعلی مهدیان
۸۱-۹۰

مقایسه کشت متداول گیاهان زراعی با گیاهان تراریخته مقاوم به آفات

از جنبه اثر بر سلامت محیط زیست، انسان و دام

Comparison between the Impact of Transgenic Insect Resistant Crop Plants and their Traditional Counterparts on Human Health and the Environment

نگین عادل^۱ و بهزاد قره‌یازی^{۲*}
Negin Adeli¹ and Behzad Ghareyazie^{2*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۲- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

1- College of Agriculture and Natural Resources of the Islamic Azad University at Karaj

2- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ghareyazie@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

آفات

سموم شیمیایی

محیط زیست

مهندسی ژنتیک

ایمنی زیستی

کشت بیش از ۱۷۰/۳ میلیون هکتار محصولات تراریخته در جهان در انتهای سال ۲۰۱۲ میلادی که بیش از ۷۰ میلیون هکتار آن به گیاهان تراریخته مقاوم به آفات اختصاص دارد. ضرورت بازنگری در ممانعت از تولید محصولات تراریخته در ایران را بیش از پیش نمایان می‌کند. مخالفین توسعه مهندسی ژنتیک با وجود اینکه قانون ملی ایمنی زیستی دولت را بر فراهم‌آوری تمهیدات لازم برای تسهیل رهاسازی، کاشت، تولید، مصرف و صادرات و واردات محصولات تراریخته مکلف می‌کند همچنان در تلاش هستند تا با وارد کردن ایرادات مختلف مانع از توسعه این فناوری در کشور شوند. این امر به مفهوم تجویز استمرار روش رایج تولید محصولات زراعی در کشور است. بیش از ۹۹ درصد محصولات زراعی کشور ما با استفاده از روش‌های سنتی آگروشیمیایی صورت می‌گیرد. حجم تولید محصولات ارگانیک در کشور به کمتر از یک درصد می‌رسد. بنابراین استفاده از سموم شیمیایی بخش غیرقابل تفکیک زراعت امروز کشور ماست. اما این سموم علاوه بر هزینه‌ای که در سطح خانوار و ملی تحمیل می‌کنند، موجب تهدید سلامت کشاورزان و (به دلیل بقایای سموم) مصرف‌کنندگان می‌شود. از سوی دیگر اثر منفی غیرقابل اجتناب سموم شیمیایی بر موجودات غیرهدف مانند دشمنان طبیعی آفات غیرقابل اجتناب است. در این مقاله ضمن مرور میزان مصرف، واردات و تولید داخلی سموم حشره‌کش شیمیایی و عوارض سوء آن، آخرین وضعیت تولید گیاهان تراریخته مقاوم به آفات در کشورهای جهان مورد بررسی قرار گرفته و عوارض مورد اشاره این دو سیستم مبارزه با آفات مورد مقایسه قرار گرفته است.

مقدمه

حمله حشرات از مشکلات لاینفک در کشاورزی است که علاوه بر کاهش عملکرد و کیفیت محصول صدمات زیادی را بر محیط زیست و سلامت انسان بر جای می‌گذارد (Nabati 2010; Yazdi et al., 2010). هر ساله حدود ۲۵ درصد از محصولات غذایی در سراسر جهان توسط حشرات و لارو آنها از بین می‌روند. به عنوان مثال در اروپا لارو *Ostrinia nubilalis* باعث نابودی ۲۰ درصد از محصول ذرت شد (GMO Compass, 2010).

متأسفانه دستیابی به تولید بیشینه و مبارزه سنتی و مبتنی بر استفاده از سموم شیمیایی مستلزم پرداخت بهای بسیار بالایی است. این بها می‌تواند تخلیه یا تخریب محیط طبیعی باشد که موجب می‌شود برخی فعالیت‌های کشاورزی در درازمدت ناپایدار باشند. یکی از این فعالیت‌ها استفاده از آفت‌کش‌های غیرانتخابی است که برای مبارزه با آفات حشره‌ای و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه حشره‌کش‌ها برای حل فوری مشکل حمله حشرات به محصولات زراعی بسیار موثر هستند و یکی از اجزای افزایش سریع عملکرد در محصولات حساس به آفات محسوب می‌شوند، اما زیان‌های دراز مدت آن‌ها نیز روشن است. حشره‌کش‌های غیراختصاصی نسبت به موجودات غیرهدف که می‌توانند به‌طور طبیعی جمعیت آفت را تحت کنترل داشته باشند، زیان‌آورند. این مواد بر روی حشرات مفید که به‌عنوان شکارچی یا پارازیت آفات عمل می‌کنند سمی هستند و بر روی حیوانات عالی نیز که به عنوان شکارچی بر روی آفات گیاهان عمل می‌کنند اثر زیان‌آور دارند. اثر بقایای سموم که تا بالاترین زنجیره غذایی راه می‌یابد و مفیدترین گونه‌های شکارچی را که در رأس زنجیره غذایی قرار گرفته‌اند مسموم می‌کند موضوعی اثبات شده است.

بسیاری از حشره‌کش‌ها به‌ویژه آنهایی که بر مبنای ارگانوفسفاتها هستند برای انسان هم سمیت دارند. به علاوه برای تعیین اینکه اتکای بیش از حد به حشره‌کش‌ها پایدار نیست باید توجه شود که بسیاری از حشرات نسبت به این سموم مقاومت پیدا کرده‌اند. فشار انتخاب بر روی آفت خیلی بالاست و بنابراین مقاومت می‌تواند تنها در مدت چند نسل ایجاد شود. در غیاب شکارچی‌ها که به‌طور طبیعی سطح آفات را پایین می‌آورند، یک گونه آفت می‌تواند نسبت به حالت قبل از استفاده از حشره‌کش به مشکل

بزرگتری تبدیل شود. اما این شکارچی‌ها توسط حشره‌کش‌ها از بین می‌روند. متأسفانه رفتارهایی که در درازمدت پایدار نیستند ممکن است در کوتاه‌مدت از نظر تجاری سودمند و جذاب باشند و به همین دلیل استفاده از حشره‌کش‌های غیراختصاصی به‌ویژه در جاهایی که بر کشاورزی مقررات نظارتی اعمال نمی‌شود، همچنان ادامه دارد. این تفکر منجر به ایجاد شکافی بین صنعت کشاورزی (و بسیاری از کشاورزان) از یک‌سو و نوعی اتحاد بین گروه‌هایی با علایق انسان دوستانه که تحت لوای کلی "طرفداران محیط‌زیست" و "توسعه پایدار" جمع شده‌اند از سوی دیگر شده است. به هر حال پیامدهای ناگوار استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی بر روی محیط زیست (از بین رفتن گونه‌های در حال انقراض، موجودات غیرهدف، آلودگی آب‌های زیرزمینی و ...) و سلامت انسان (سرطان‌زایی، بیماری‌های سیستم عصبی، تنفسی و زادآوری و ...) مستند به شواهد علمی معتبر است (Keifer et al., 1993; McConnell and Hruska 1996).

در پاسخ به حجم انتقادات، صنعت اگروشیمی به‌طور فعال به دنبال راه‌های کمتر زیان‌آور کنترل آفات حشره‌ای بوده و تعدادی از حشره‌کش‌های کمتر زیان‌آور را ارایه کرده است. به علاوه راهبردهای جایگزینی برای کنترل حشرات آفت مانند کنترل بیولوژیک و استفاده از واریته‌های مقاوم ارایه شده است. اما از نظر تجاری، این راهبردها بازده بالایی که قابل مقایسه با کاربرد سموم حشره‌کش باشند نداشته‌اند. از دید کشاورزان، هزینه روش‌های جایگزین بیشتر و اجرای آن‌ها نیز مشکل‌تر و پیچیده‌تر است و تضمین برابری با استفاده از حشره‌کش‌های عمومی را نیز عرضه نمی‌کنند. همچنین با وجود راهبردهای مدیریت تلفیقی آفات که استفاده از سموم شیمیایی را با استفاده از ژرم‌پلاسم مقاوم و تغییر در کاشت، داشت و برداشت را تلفیق می‌کنند در واقع خسارت حشرات در بیشتر گیاهان زراعی در دو دهه گذشته حتی کمی هم افزایش داشته است (Duck and Evola 1997). تمام این فاکتورها روی هم رفته در شرایط بدست آمده است که در حال استفاده بی‌رویه از سموم هستیم و هنوز به تغییرات لازم برای ورود به عرصه پایداری واقعی نرسیده‌ایم.

جدول ۱- سطح زیر کشت جهانی چهار محصول زراعی تراریخته در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۲ (به میلیون هکتار)
(James 2009, 2010, 2011 and 2012).

Table 1- Global area of four Biotech Crops in 2009 to 2012 (Million Hectares) (James, 2009, 2010, 2011 and 2012).

Year/ Crop سال/محصول	Canola کلزا	Corn ذرت	Cotton پنبه	Soybean سویا	Others سایر	Total مجموع
2009	6.4	41.7	16.1	69.2	0.7	134
2010	7	46	21	73.3	0.7	148
2011	8.2	51.0	24.7	75.4	0.7	160
2012	9.3	55.6	24.3	81	0.7	170.3

جدول ۲- سطح زیر کشت گیاهان تراریخته مقاوم به آفات در سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ (به میلیون هکتار) (James, 2009 and 2010).

Table 2- Global area of GM Crops resistant to pests in 2009 and 2010 (Million Hectares) (James, 2009 and 2010)

Crop and Trait محصول و صفت	2009	2010	Presentage of global area of biotech crops in 2010 درصد سطح زیر کشت گیاهان تراریخته جهان در سال ۲۰۱۰
Corn with pest resistance and herbicide tolerance traits ذرت دارای دو صفت مقاومت به آفات و تحمل به علف‌کش	26.1	28.8	19
Corn with pest resistance trait ذرت مقاوم به آفات	9.2	10.2	7
Cotton with pest resistance and herbicide tolerance traits پنبه دارای دو صفت مقاومت به آفات و تحمل به علف‌کش	2.6	3.5	2
Cotton with pest resistance trait پنبه مقاوم به آفات	12.4	16.1	11
Total of GM crops resistant to pests جمع گیاهان تراریخته مقاوم به آفات	50.3	58.6	39

جدول ۳- سموم مورد استفاده در روش‌های مبارزه شیمیایی با آفات مهم محصولات عمده کشاورزی که مشابه تراریخته مقاوم به آفات آن‌ها در بازار مصرف جهانی موجودند (Giah Co., 2010; PPO personal communications, Pars Co., 2010).

Table 3- Toxins used in chemical control methods against important pest of major crops that their transgenic insect resistance counterpart are available in global market. (Giah Co., 2010; PPO personal communications, Pars Co., 2010).

محصول	نام فارسی آفت	نام علمی آفت	سموم توصیه شده	فرمولاسیون	مصرف در هکتار	هزینه تخمینی کنترل آفات (ریال)	مصرف سالانه سم/ هکتار
برنج	کرم ساقه‌خوار برنج	<i>Chilo suppressalis</i>	۱- لیندین *	WP 25%	۵۰ گرم در ۱۰۰ مترمربع (خزانه)	۴۵۲۱۵۰	
			۲- دیازینون	G 10%	۱۵ کیلوگرم	۲۵۰۰۰	۱ کیلو
			۳- دیازینون	G 5%	۳۰ کیلوگرم	۱۷۰۰۰	۱ کیلو
			۴- کارتاپ *	G 4%	۳۰ کیلوگرم		
			۵- فپرونیل *	G 0.2%	۲۰ کیلوگرم		
			۶- فنیتروتیون	EC 50%	۱/۵ لیتر	۱۱۹۰۰۰	
			۷- دیازینون	EC 60%	۱ لیتر	۹۸۰۰۰	

کرم سبز برگخوار برنج	<i>Naranga aenescens</i> <i>Cirphis unipunctata</i>	۱- کاربایل* ۲- تری کلروفن* ۳- مالاتیون	WP 85% SP 80% EC 57%	۲-۳ کیلوگرم ۱ کیلوگرم ۲ لیتر	۶۵۰۰۰ لیتر
			WP 25% SP 80% EC 60%	۵۰ گرم در ۱۰۰ متر ۱۲ گرم در ۱۰۰ مترمربع	۹۸۰۰۰ لیتر
انواع مگس خزانه	<i>Ephydra spp.</i>	۱- لیندین* ۲- تری کلروفن*	WP 85% EC 60% EC 50%	۸۰ کیلو طعمه مسموم در هکتار ۱-۱/۵ ۱ لیتر	۴۸۳۰۰ ۹۸۰۰۰ ۱۲۹۰۰۰ لیتر
کرم ساقه‌خوار (سزامیا)	<i>Sesamia nonagrioides</i>	۱- دیازینون	WP 85% EC 60% EC 50%	۸۰ کیلو طعمه مسموم در هکتار ۱-۱/۵ ۱ لیتر	۴۸۳۰۰ ۹۸۰۰۰ ۱۲۹۰۰۰ لیتر
کرم طوقه بر (آگروتیس)	<i>Agrotis segetum</i> <i>Agrotis ipsilon</i>	۱- کاربایل* ۲- دیازینون ۳- اتریملفوس*	WP 85% EC 60% EC 50%	۸۰ کیلو طعمه مسموم در هکتار ۱-۱/۵ ۱ لیتر	۴۸۳۰۰ ۹۸۰۰۰ ۱۲۹۰۰۰ لیتر
کرم قوزه پنبه	<i>Helicoverpa spp.</i>	۱- فوزالن ۲- تیودیکارب	EC 35% DF 80%	۳ لیتر ۱-۷۵ کیلو گرم	۱۲۹۰۰۰ لیتر ۲۱۰۰۰۰
کرم برگخوار کارادرینا	<i>Spodoptera exigua</i>	۱- کاربایل* ۲- فوزالن	WP 85% EC 35%	۳ کیلو گرم ۳ لیتر	۱۲۹۰۰۰ لیتر
کرم برگخوار ذرت	<i>Mythimna loreyi</i>	۱- مونوکروتوفوس* ۲- فوزالن	SL 40% EC 35%	با نظر کارشناس	۱۲۹۰۰۰ لیتر
تریپس آگروتیس (کرم طوقه بر)	<i>Anaphothrips sp.</i> <i>Agrotis spp.</i>	۱- کاربایل* ۲- دیازینون	WP 85% EC 60%	۵۰ کیلو طعمه مسموم ۵٪ ۲ لیتر	۹۸۰۰۰ لیتر
پرودنیا (برگخوار مصری)	<i>Spodoptera littoralis</i>	۱- مونوکروتوفوس* ۲- یکی از پایرتروئیدهای مجاز	SL 40%	۲ لیتر	
کارادرینا (شب پره گاما)	<i>Spodoptera exigua</i> <i>Plusia gamma</i>	۱- کاربایل* ۲- اندوسولفان*	WP 85% EC 35%	۳ کیلو گرم ۳ لیتر	۱۴۳۰۰۰ لیتر
تریپس خانواده Aphididae	<i>Thrips tabaci</i>	۱- اکسی دیمتون متیل*	EC 25%	۱ لیتر	
شته‌ها	<i>Bemisia tabaci</i>	۲- تیومتون*	EC 25%	۱ لیتر	
و دیگر حشرات مکنده	<i>Bemisia gossypiperda</i>	۳- دیمتوات ۴- مونوکروتوفوس*	EC 40% SL 40%	۱ لیتر ۲ لیتر	۸۵۰۰۰
کرم قوزه پنبه	<i>Helicoverpa armigera</i>	۱- تیودیکارب ۲- کاربایل* ۳- اندوسولفان* ۴- ایندوکساکارب	DF 80% WP 85% EC 35% SC 15%	۱ کیلو گرم ۳ کیلو گرم ۳ لیتر ۲۰۰ تا ۲۵۰ سی سی	۹۵۱۶۸ ۲۱۰۰۰ ۱۴۳۰۰۰ لیتر ۱۹۵۰۰۰
کرم طوقه بر (آگروتیس)	<i>Agrotis segetum</i> <i>Agrotis ipsilon</i>	۱- کاربایل* ۲- دیازینون	WP 85% EC 60%	۸۰-۵۰ کیلوگرم طعمه مسموم	۹۸۰۰۰ لیتر
برگخوار (کارادرینا) و پروانه گاما	<i>Spodoptera exigua</i> <i>Plusia gamma</i>	۱- کاربایل* ۲- اندوسولفان*	WP 85% EC 35%	۳ کیلو گرم ۳ لیتر	۱۴۳۰۰۰ لیتر
کرم خاردار	<i>Earias insulana</i>	۱- کاربایل*	WP 85% EC 20%	۳ کیلو گرم	

۵ لیتر			۲- آزینفوس متیل*		
کرم‌های مفتولی	<i>Agriotes lineatus</i> <i>Homophillus coriaceus</i>	در صورت ضرورت کلرپیریفوس* و دیازینون	G 5%	۳۰ کیلوگرم	
شته‌های	<i>Aphis gossypii</i> <i>Myzus persica</i>	مبارزه با استفاده از سموم			
سیب‌زمینی	<i>Macrosiphum euphorbiae</i> <i>Aulacorthum solani</i>	شیمیایی سیستمیک بر اساس توصیه کارشناس			
سوسک کلرادو	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	۱- فوزالن	EC 35%	۲ لیتر	۱ لیتر ۱۲۹۰۰۰
		۲-اندوسولفان*	EC 35%	۱-۲ لیتر	۱۴۳۰۰۰
		۳- تیودیکارب	DF 80%	یک کیلو گرم	۲۱۰۰۰۰
بید سیب‌زمینی	<i>Phthorimaea operculella</i>	بر اساس توصیه کارشناس			

* سمومی که مصرف آن‌ها در ایران ممنوع شده و یا در حال ممنوع شدن هستند.

مهندسی ژنتیک راهکاری قابل اتکا برای مبارزه با آفات

در شرایط ذکر شده، ظهور فناوری‌هایی که اجازه می‌دهند ژن‌هایی با منشا خارجی را به گیاهان منتقل کنیم بسیار به هنگام بوده و پس از برخی تردیدهای اولیه مهندسی ژنتیک گیاهان زراعی برای افزایش مقاومت آنها به آفات، امروزه هم توسط صنعت کشاورزی و هم توسط دولت‌ها با اشتیاق زیادی بکار گرفته شده است. این فناوری امکان توسعه "منبع ژن" موجود برای یک گونه زراعی را فراهم می‌آورد. بنابراین مهندسی مقاومت ذاتی به آفات براساس ژن‌های مقاومت از سایر گونه‌های گیاهی یا ژن‌های مقاومت از گونه‌هایی متعلق به سایر سلسله‌ها یا حتی ژن‌های مقاومت به‌طور کامل جدید امکان‌پذیر شده است. به این ترتیب استفاده از حشره‌کش‌ها می‌تواند حذف شود یا حداقل به‌طور چشم‌گیری کاهش یابد. بدیهی است که کاهش مصرف حشره‌کش‌ها دارای فواید اقتصادی و زیست‌محیطی فراوان است.

به تدریج با پیشرفت زیست‌شناسی مولکولی و استفاده از زیست‌فناوری در تولید محصولات مرغوب، بدون استفاده از روش‌های زمان‌بر اصلاحی کشاورزی سنتی، از حدود دو دهه پیش انتقال ژن از باکتری باسیلوس تورینجینسیس (*Bacillus thuringiensis*) به گیاهان زراعی امکان‌پذیر شد. این باکتری (که به اختصار تحت عنوان بی تی نامیده می‌شود) یک باکتری کشنده حشرات است که در سراسر جهان برای کنترل بسیاری از آفات مهم گیاهی به‌ویژه لارو بال‌پولکداران (پروانه‌ها و بیدها)، سخت بال‌پوشان و لارو پشه‌های ناقل بیماری کوری (موسوم به *River*

blindness) آفریقا به کار می‌رود. در حال حاضر در حدود ۱ درصد از بازار سموم مورد استفاده در کشاورزی (حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها) در جهان به فراورده‌های بی تی اختصاص دارد (Jouzani et al., 2009; Jafari et al., 2009; FAO, 2009). فراورده‌های تجاری بی تی دربردارنده مخلوطی از اسپورها و کریستال‌های خشک این باکتری است. این پودرها بر روی برگ‌ها یا سایر اندام‌هایی از گیاهان که مورد تغذیه آفت قرار می‌گیرند پاشیده می‌شود.

استفاده از این باکتری در کنترل آفات، به دلیل تولید یک پروتئین با فرم کریستالی است. هنگامی که این پروتئین توسط حشرات مصرف می‌شود، در دستگاه گوارش حشره فعال شده و به فرم آندوتوکسین دلتا در می‌آید که باعث از بین رفتن آفت می‌شود. این پروتئین برای انسان به‌طور کامل بی‌زیان و بلکه مفید است (Jafari and Tohidfar 2007; Ghareyazie 2004; Betz et al., 2000; EPA 2001). بیش از ۱۰۰ نوع متفاوت از پروتئین حشره‌کش از گونه‌های مختلف بی تی کشف شده است که برای گونه‌های مختلف حشرات از آن استفاده می‌شود. به عنوان مثال، ژن *cry1Ab* به منظور از بین بردن پروانه‌ها مؤثر است در حالی که ژن *cry3* بر علیه سوسک‌ها مؤثر است (Rashidi Monfared et al., 2009; Ghareyazie 2006).

سطح زیر کشت محصولات تراریخته مقاوم به آفات در جهان در سال ۲۰۱۲ میلادی ۱۷۰/۳ میلیون هکتار در ۲۹ کشور توسط ۱۷ میلیون کشاورز بزرگ و خرده‌پا در جهان، که بیش از ۹۰

سلامتی انسان و محیط زیست عنوان شده است. در این مقاله سعی شده است که با مقایسه محصولات کشاورزی متداول که با مصرف سموم شیمیایی دفع آفات نباتی پرورش می‌یابند با محصولات تراریخته مقاوم به آفات که در ۲۹ کشور دنیا کشت می‌شوند، به بررسی این ادعاها پرداخته شود.

تاثیر سموم شیمیایی دفع آفات

جدول ۳ آفات مهم محصولات زراعی عمده‌ای را که مشابه تراریخته آن هم اکنون در کشورهای مختلف به زیر کشت انبوه رفته‌اند و روش مبارزه شیمیایی با این آفات در ایران را نشان می‌دهد. سموم مورد استفاده برای کنترل این آفات بیش از ۹۰ درصد سموم مورد استفاده برای کنترل همه حشرات زیان‌آور همه محصولات کشاورزی در ایران را شامل می‌شود.

اثر بر روی سلامتی انسان

حشره‌کش‌ها باعث سرکوب سیستم ایمنی بدن، سقط جنین (Edwards 2011)، عدم رشد فکری، اثرهای مخرب ساختمانی در بدن هنگام تولد، سرطان، تومورها (Keifer 1996) و نقص‌هایی در اعمال و بافت‌ها و سلول‌های بدن می‌شوند (Edwards 2011; Anonymous 2011; FAO 2011). حشره‌کش‌ها دارای اثرهای مخرب و سمی روی دی.ان.ا، اندام‌های تولیدمثلی، تداخل در اعمال هورمونی، عقیمی مردان و زنان و دوره‌های قاعدگی نامنظم در زنان هستند (Solati et al., 2008; Keifer 1996). نتایج بدست آمده از بررسی اپیدمیولوژیک موارد مسمومیت که با سموم حشره‌کش (ارگانوفسفره و ارگانوکلره) در بیماران بستری شده در بیمارستان شهدای عشایر خرم‌آباد در شش ماه اول سال ۸۵ بدست آمده است، نشان داد که از بین ۱۵۳ بیمار مسموم مراجعه کننده، ۷۷/۱ درصد با سموم ارگانوفسفره و ۲۲/۹ درصد با سموم ارگانوکلره دچار مسمومیت شده بودند (Mohammadi and Ataii 2008).

برخی از ترکیبات شیمیایی از گروه آفت‌کش‌ها مانند ارگانوفسفره‌ها و کربامات‌ها با فعالیت کولین‌استراز^۱ تداخل کرده و یا آن را مهار می‌سازند. تنفس، خوردن، جذب از طریق پوست و چشم راه‌هایی هستند که مهارکننده‌های کولین‌استراز می‌توانند

درصد از آنها در کشورهای در حال توسعه هستند به زیر کشت محصولات تراریخته رفت. کشورهای در حال توسعه‌ای مانند هندوستان و پاکستان نیز به ترتیب با مساحت ۱۰۸ و ۲۸ میلیون هکتار رتبه ۴ و ۸ جهانی در تولید پنبه تراریخته مقاوم به آفات را از آن خود کردند (James 2012). جدول ۱ سطح زیر کشت جهانی محصولات تراریخته از آغاز تا انتهای سال ۲۰۱۲ میلادی را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌شود با وجود کشت بیش از ۱۰ نوع محصول تراریخته در دنیا ۴ محصول سویا، ذرت، پنبه و کلزا همچنان سهم اصلی محصولات تراریخته را در بازار جهانی دارا هستند.

سطح زیر کشت گیاهان تراریخته مقاوم به آفات به تفکیک نوع محصول در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۲ در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود در سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ میلادی به ترتیب ۵۰/۳ و ۵۸/۶ میلیون هکتار از زمین‌های جهان به زیر کشت محصولاتی رفته‌اند که نسبت به آفات حشره‌ای مقاوم بودند. البته مقادیر کمتری از محصولات تراریخته مقاوم به آفات دیگر نظیر برنج تراریخته مقاوم به آفات نیز طی این سال‌ها در کشورهای ایران و چین به زیر کشت رفته‌اند که آمار دقیقی از میزان آن در دست نیست. البته فهرست محصولات تراریخته‌ای که در کشورهای مختلف جهان مجوز تولید انبوه دریافت کرده و یا به زیر کشت رفته‌اند بسیار طویل است و آینده نزدیک شاهد توسعه کشت این قبیل محصولات با تنوع بیشتری خواهد بود. جدول پیوست فهرست گیاهان تراریخته مختلفی را که دارای صفت مقاومت به آفات هستند و تا انتهای سال ۲۰۱۰ میلادی در کشورهای مختلف مجوز تولید انبوه دریافت کرده و یا به زیر کشت رفته‌اند را نشان می‌دهد.

اما با وجود رشد روز افزون گیاهان تراریخته در جهان و استفاده بیش از حد کشاورزان ایرانی از سموم شیمیایی، به دلیل مخالفت برخی مدیران دانایی ستیز و فناوری هراس، با وجود تأکیدات قانونی مبنی بر تکلیف دولت برای فراهم‌آوری تسهیلات لازم برای توسعه کشت و کار و مصرف محصولات تراریخته (موضوع قانون ایمنی زیستی)، کشت گیاهان تراریخته در ایران در هاله‌ای از ابهام قرار دارد. یکی از بهانه‌های این مدیران کم‌بهره از دانش روز احتمال بروز آثار منفی ناشی از محصولات تراریخته بر روی

^۱کولین‌استراز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که برای عملکرد صحیح سیستم عصبی مورد نیاز است.

نحوه اثر حشره‌کش بر روی حشره مهم است (Personal communication, Yasini A, PPO سیستمک (مانند متاسیستوکس) و سموم نفوذی (مانند دیازینون) نه تنها برای محیط زیست و افراد در تماس با سم خطرناک است، بلکه با نفوذ به داخل گیاه برای مصرف‌کننده هم مشکل‌آفرین است. سم دیازینون بیشترین سم حشره‌کش مورد مصرف در ایران و به ویژه زراعت برنج است. با توجه به اینکه شالیکاران برای عملیات مختلف زراعی مانند وجین دستی ناگزیر از ورود به شالیزارهایی هستند که دارای حداقل به عمق ۲۰ سانتی‌متر آب آلوده با این نوع سم خطرناک هستند، آمار مراجعه به بیمارستان‌ها و شکایت از مسمویت ناشی از سموم حشره‌کش دیازینون در فصل کشت و نواحی کشت برنج بسیار بالا است. استفاده از سموم آلی فسفره (مالاتیون، دیازینون، دوسبان، اتیون کومافوس) سبب مسمویت‌های حاد شده و کار کولین‌استراز خون را متوقف می‌کنند (Anonymous 2010). امروزه استفاده از مخلوط این سموم نیز در بین کشاورزان شیوع پیدا کرده است. در بعضی از کشورهای در حال توسعه و ایالات متحده، مسمویت آفت‌کش‌ها بیشتر ناشی از مخلوطی از حشره‌کش‌ها است (Blondell 1997; Cole et al., 2000; Keifer et al., 1996). در نیکاراگوئه مشخص شد که ۳۸ درصد از حوادث، شامل مخلوطی از حشره‌کش‌ها است (Keifer et al., 1996) داده‌ها از کالیفرنیا نشان داده است که وقتی حشره‌کش‌ها با هم مخلوط می‌شوند، اثر شدیدی روی چشم و پوست برجای می‌گذارند (Blondell 1997). تعداد زیادی از این سموم حذف شده‌اند و تعدادی دیگر در حال تعلیق هستند (جدول ۳).

تأثیر سموم شیمیایی بر روی موجودات غیرهدف و دشمنان طبیعی آفات

بندپایان در برقراری تعادل در زنجیره‌های غذایی اکوسیستم نقش بسیار مهمی دارند، اما بیشتر ترکیبات شیمیایی باعث گسیخته شدن این زنجیره‌های طبیعی می‌شوند (Gahhari et al., 2005). پراکندگی آفت‌کش‌ها به اطراف، مناطق مجاور را آلوده می‌سازد. ورود آفت‌کش‌ها به سطح آب‌های زیرزمینی به اثبات رسیده است. ورود این مواد سمی مثل دیمتوات به آب‌های آزاد، می‌تواند سبب مرگ ماهی‌ها شود که برای گونه‌های بی‌مهره،

انسان را آلوده سازند (Oakeshott et al., 2005). سالانه حدود ۳ میلیون مورد مسمومیت با سموم ارگانوفسفره تخمین زده می‌شود که از این تعداد نزدیک به ۳۰۰,۰۰۰ نفر دچار مرگ یا صدمات جدی می‌شوند (Eyer 2003).

استعمال تصادفی و ناخودآگاه

اولین قربانیان استعمال حشره‌کش‌ها کشاورزان و خانواده آنها و کارگرانی هستند که در بخش کشاورزی یا در کارخانه تولید سم کار می‌کنند، که خواسته یا ناخواسته بر اثر بی‌دقتی در دست زدن به حشره‌کش‌ها و یا پوشیدن لباس‌های نامناسب حفاظتی و تجهیزات در معرض آن قرار می‌گیرند (McConnell and Hruska 1993). کاهش بیش از ۲۵ درصد سطح کولین‌استراز سرم (Joshegani et al., 2006) در ۱۷ نفر (۲۷ درصد) از کارگران شاغل در کارخانه تولید حشره‌کش‌های گیاهی مشاهده شده است. در کارگران شاغل در کارخانه تولید حشره‌کش‌های ارگانوفسفره شهر قزوین در سال ۸۸، خطر وجود یکی از علائم تنفسی در معرض مواجهه با حشره‌کش‌های ارگانوفسفره در مقایسه با کارگران گروه شاهد، حداقل ۳/۶ برابر افزایش داشته است (Yazdi et al., 2010). علاوه بر این، حوادث بی‌شماری در اثر مصرف حشره‌کش‌ها در جهان رخ داده است که به مرگ یا بیماری منجر شده است. یکی از موارد اتفاق افتاده در بوپال هند گزارش داده شده است، که در آن بیش از ۵۰۰۰ مورد مرگ ناشی از قرار گرفتن در معرض انتشار اتفاقی آیسوکسینات متیل از کارخانه آفت‌کش بوده است (McConnell and Hruska 1993). اندوسولفان، که یک حشره‌کش ارگانوفسفره است به علت ایجاد مسمومیت‌های شغلی در هر دو کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته (Brandt et al., 2001, Murray et al., 2002) به عنوان یک حشره‌کش خطرناک شناخته شده است که مسمومیت با آن منجر به مرگ می‌شود و در صورت زنده ماندن اختلالات عصبی را در بر دارد (Brandt et al., 2001).

استعمال آگاهانه و اصولی

استفاده درست از حشره‌کش‌ها می‌تواند تا حدودی از خطرات آن بر روی سلامت انسان‌ها بکاهد (Meulenbelt and De Vries 1997; Van Der Hoek 1998). توجه به نوع سم (کلره یا فسفره) بودن آن و این که متناسب با گیاه انتخاب شود و نیز توجه به

کاهش جمعیت دشمنان طبیعی آفات، امکان کشت بدون سمپاشی وجود نخواهد داشت و طغیان آفات رخ خواهد داد.

هزینه استفاده از سموم شیمیایی در سطح کشاورز

نیازهای مختلف کشاورزان و تنوع رو به تزاید آفات، منجر به تولید حشره‌کش‌های متنوع می‌شود. تولیدکنندگان حشره‌کش‌ها باید به‌طور کامل به نیازهای خریداران آگاهی داشته باشند. کیفیت و قیمت حشره‌کش‌ها دو فاکتور مهم در انتخاب آنها توسط خریداران هستند. بطور حتم مصرف کنندگان حشره‌کش‌ها، تصمیم برای خرید حشره‌کش را بر اساس سود حاصله، بنا می‌نهند. در واقع مصرف کنندگان انتظار بازگشت هزینه مصرف حشره‌کش‌ها را به همان اندازه که در سایر روش‌های کنترل (غیر شیمیایی) سرمایه‌گذاری کرده‌اند، دارند. بنابراین صنعت حشره‌کش‌ها باید قادر به تحقق بخشیدن به نیازهای مختلف مصرف کنندگان باشد.

بسیاری از تولید کنندگان و فروشندگان سموم شیمیایی با تجزیه و تحلیل اقتصادی که در آنها هزینه‌های کل ناشی از کاربرد حشره‌کش‌ها را در نظر نمی‌گیرند، استفاده بیشتر از آنها را توجیه‌پذیر می‌کنند. بر طبق گزارشی از سازمان حفظ نباتات کشور، مبارزه با آفات نباتات زراعی از ۲۰۷۱۱۸۵۰ هکتار در سال ۸۷-۸۸ به ۲۰۹۷۳۰۳ هکتار در سال ۸۸-۸۹ رسیده است (Vishlaghi et al., 2009).

مبارزه شیمیایی با آفات علاوه بر هزینه‌های غیرمستقیم ناشی از درمان عوارض سوء مصرف سموم، هزینه مستقیم هنگفتی را نیز به کشاورزان تحمیل می‌کند. این هزینه‌ها مشتمل بر هزینه خرید سم، خرید یا اجاره سمپاش، نگهداری سم و سمپاش، هزینه کارگر برای سمپاشی و هزینه‌های ناشی از بهداشت و درمان است. اما در منابع گاهی هزینه مبارزه شیمیایی با آفات به بهای پرداخت شده بابت خرید سم و یا حداکثر هزینه کارگری سمپاشی محدود می‌شود که یا تعمدی برای ادامه استفاده از سموم شیمیایی در آن وجود دارد و یا ناشی از ساده‌انگاری و محاسبه اشتباه است. جدول ۳ به صورت انحصاری هزینه خرید سم برای هر هکتار را نشان می‌دهد. منبع معتبری که کلیه هزینه‌های استفاده از سموم شیمیایی برای کنترل آفات گیاهان زراعی در ایران را برآورد کرده باشد به دست نیامد.

سمی‌تر از ماهیان است. آب آشامیدنی انسان گاهی اوقات فراتر از سطح قابل قبول ایمنی، آلوده است (Anonymous 2011). بررسی و تعیین میزان باقیمانده حشره‌کش‌های ارگانوفسفره مالاتیون و دیازینون (که بیشتر برای کنترل کرم ساقه‌خوار برنج و آفات مرکبات استفاده می‌شود) در حوزه آبریز سد امیرکبیر کرج نشان داده است که میزان باقیمانده این سموم در ایستگاه‌های ابتدایی که در نزدیکی باغ‌ها قرار دارند، ۱ تا ۲ ماه پس از سم‌پاشی قابل شناسایی بوده و بیش از حد مجاز است (Shayegi 2008).

رسوبات لایروبی آبراه‌ها در ایالات متحده با باقیمانده سموم شیمیایی مثل پیروترئیدها بیشتر آلوده می‌شود. اثرات حشره‌کشی پیروترئیدها مربوط به استرهای کاتابولیک اسید *chrysanthemic* و اسید *pyrethric* است. این اسیدها به شدت آلپوفیل هستند و به سرعت به درون دستگاه عصبی حشرات نفوذ می‌کنند (Gyah Co. 2010). این سم علاوه بر اثر کشندگی بالا روی مغز، سیستم دفاعی بدن و سیستم عصبی (Chen et al., 1991; Cole et al., 2000) و اثرهای مخربی بر می‌گذارد (Nakamora et al., 2007). حشره‌کش و کنه‌کش آبامکتین نیز برای آبیان و زنبور عسل خطرناک محسوب می‌شود، به همین دلیل در سال ۸۸ از فهرست سموم مجاز کشور حذف شدند (جدول ۳).

شکارگر آندرالوس (*Andralus spinidense*) یکی از مفیدترین حشرات و دشمنان طبیعی آفت‌ها در مناطق شمالی و برنج‌خیز کشور است که هم از کرم ساقه‌خوار برنج و هم از کرم سبز برگ‌خوار برنج تغذیه می‌کند. اما جمعیت این حشره مفید در نتیجه استفاده بی‌رویه از حشره‌کش‌های شیمیایی که به‌طور متداول در شالیزارهای ایران مصرف می‌شود رو به کاهش است (Mohaghegh and Amirmaafi 2007; Rao and Rao 1979).

با توجه به اینکه حشره‌کش‌ها و سایر آفت‌کش‌ها اختصاصی عمل نمی‌کنند بنابراین استفاده از سموم حشره‌کش ضمن کاهش دشمنان طبیعی آفات موجب برهم خوردن تعادل اکوسیستم‌ها شده و موجب می‌شود اتکای مبارزه با آفات به سموم شیمیایی بلند مدت باشد زیرا پس از یک دوره استفاده از این سموم و

جدول ۴- وضعیت واردات مواد مؤثره و محصول آماده حشره‌کش در سال ۱۳۸۸ (Nabati 2010).

Table 4: Imports status of pesticide active ingredients and final products in 2009 (Nabati 2010).

حشره‌کش غیرخانگی Non- domestic pesticide	مواد مؤثره Active Ingredients			محصول آماده Final Product		
	متوسط قیمت وارداتی			متوسط قیمت وارداتی		
	(دلار/کیلوگرم) The average price of imported product (USD/ KG)	ارزش (هزار دلار) Price (USD \$)	میزان (تن) Amount (tons)	(دلار/کیلوگرم) The average price of imported product (USD/KG)	ارزش (هزار دلار) Price (USD \$)	میزان (تن) Amount (tons)
	6.22	3163	509	8.27	22098	2671

جدول ۵- میزان واردات و تولیدات داخلی سموم حشره‌کش در سال ۱۳۸۸ (تن).

Table 5- Rate of imports and domestic production of pesticide in 2009 (Tons)

تولید** Production**	واردات* Import*
18000	2000

*مصاحبه شخصی، با دکتر کلاتر مدیر امور سموم و سم‌پاش‌ها (Personal communication, Dr. Kalantar, PPO).

** آمارنامه کشاورزی. جلد دوم (Anonymous 2009).

(Nabati 2010).

هزینه‌های ارزی و ریالی در سطح ملی

میزان مصرف آفت‌کش‌های دنیا حدود ۲/۵ میلیون تن است. با توجه به اینکه میانگین استفاده از حشره‌کش‌ها در جهان ۲۵/۵ درصد است، از این‌رو میزان مصرف انواع سموم در ایران کمتر از ۱ درصد مصرف جهانی است. بر اساس اطلاعات موجود استان‌های تهران، قزوین، مازندران و سمنان و بیشترین تعداد واحدهای آفت‌کش‌ها را دارا هستند و حدود ۶۰ درصد واحدهای فعال دارای مجوز صنعتی در این ۴ استان مستقر هستند (Nabati 2010). جدول ۵ میزان واردات و تولید داخلی سموم حشره‌کش را در سال ۱۳۸۸ نشان می‌دهد.

نقش مهندسی ژنتیک در کنترل آفات

طی استفاده مکرر از سموم حشره‌کش، حشرات نسبت به سموم قبلی مقاومت پیدا می‌کردند. به همین دلیل در دهه ۸۰ میلادی با روی کار آمدن علم بیوتکنولوژی مدرن، مبارزات گسترده‌ای برای عدم استفاده از سموم و مواد شیمیایی در کشاورزی، صورت گرفت (Mehrabi 2006). یکی از مهمترین کاربردهای استفاده از مهندسی ژنتیک در کشاورزی انتقال ژن‌های *cry* (از باکتری

با وجود مصرف بیش از حد حشره‌کش‌ها در آمریکا هنوز ۳۷ درصد از محصولات کشاورزی این کشور در نتیجه خسارت آفات از بین می‌رود. از سوی دیگر مصرف حشره‌کش‌ها سالانه ۱/۱ میلیارد دلار به بهداشت عمومی خسارت وارد می‌کند (Anonymous 2010). در ایران بر اساس اطلاعات سامانه اطلاعات صنعتی کشور ۱۱۵ واحد تولیدی با جمع ظرفیت ۳۵۰ هزار تن در زمینه تولید آفت‌کش‌ها فعالیت دارند که سهم تولید حشره‌کش‌ها از آن ۵۲ واحد با ظرفیت ۲۱۸۰۰۰ تن (۶۲ درصد) است. در ۵ سال گذشته، بیشترین حجم واردات مواد مؤثره مربوط به علف‌کش‌ها با سهم ۳۸ درصدی و پس از آن حشره‌کش‌ها با سهم ۳۲ درصد است (Nabati 2010).

وضعیت واردات مواد مؤثره آفت‌کش‌ها در سال ۸۸ به میزان ۱۰۳۸۷ هزار دلار و به ارزش ۷۰۹۵۹ هزار دلار و واردات محصول آماده به میزان ۲۰۹۹ تن و به ارزش ۱۶۳۱۷ هزار دلار است. بیشترین قیمت از گروه آفت‌کش‌ها مربوط به حشره‌کش‌ها با قیمت هر کیلوگرم ۸/۲۷ دلار (با سهم وزنی ۲۶ درصد) است

تولید کرد. پس از آن، در فاصله سال‌های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۶، ۳۵ گیاه تراریخته تولید شد که حدود ۸۰ درصد آنها مربوط به دو کشور آمریکا و کانادا است. تا سال ۱۹۹۹، بین ۲۵ تا ۴۵ درصد تولید برخی از محصولات اصلی زراعی (ذرت، سویا و غیره) در آمریکا، با استفاده از گیاهان تراریخته صورت می‌گرفت (ISAAA 2005). در حال حاضر، بر طبق گزارشات منتشر شده از سرویس بین‌المللی دستیابی و استفاده از بیوتکنولوژی کشاورزی، در سال ۲۰۱۰ آمریکا با تولید ذرت، سویا، پنبه، کلزا، چغندر قند، یونجه، خربزه درختی، کدو با مساحت ۶۶/۸ میلیون هکتار، کماکان در صدر کشورهای تولیدکننده این محصولات قرار دارد و سه کشور پاکستان، میانمار و سوئد برای اولین بار در کنار سایر کشورها جز تولیدکننده‌گان قرار گرفتند. کشور آلمان نیز دوباره کشت محصولات تراریخته را از سر گرفته است (ISAAA 2009).

اثر بر روی موجودات غیر هدف و دشمنان طبیعی

استفاده از باکتری باسیلوس توریجینسیس (Bt) گیاه را قادر به تولید پروتئینی می‌سازد که برای حشرات کشنده است (Ghareyazie 2004; Mohsenpoor et al., 2009; Edwards 1993; Wesseling et al., 2011). در نتیجه با انتقال ژن این باکتری به گیاه، علاوه بر مقاومت در اثر حمله حشرات، مصرف سموم شیمیایی کاهش پیدا کرده و پرنده‌گانی نظیر چکاوک و هدهد که در مزارع پنبه دیده می‌شوند و همین‌طور گونه‌های در حال انقراض دیگر نیز کمتر در معرض خطر نابودی قرار می‌گیرند (Karimi Andani 2009; WHO 2009). احیای مراتع، جنگل‌ها، حفظ تنوع گونه‌های گیاهی و جانوری در مناطق کویری و بیابانی از دیگر عرصه‌های کشاورزی است که با کمک ژنتیک مولکولی روند سریع‌تری یافته‌است (Anonymous 2010b).

اثر بر سلامتی انسان

با توجه به اینکه بیش از ۸۰۰ میلیون نفر در جهان در فقر و گرسنگی به سر می‌برند، سالانه هزینه‌های هنگفتی صرف تولید و واردات سم می‌شود و انسان‌های زیادی در اثر تماس مستقیم و یا غیرمستقیم از طریق مصرف محصولات سمی دچار آسیب‌های جبران‌ناپذیری می‌شوند (Rashidi Monfared et al., 2009). استفاده از محصولات تراریخته به دلیل وجود ژن‌های مقاومت به آفات در گیاه این مشکل را حل کرده است به طوری در ۲۹

باسیلوس توریجینسیس) به گیاهان است. گیاهانی که بدین وسیله خصوصیات و صفات جدید پیدا می‌کنند تراریخته نامیده می‌شوند. این گیاهان تغییر یافته می‌توانند قابلیت مقابله با هر نوع آفات نباتات زراعی را داشته باشند (Saifinejhad et al., 2007; Mohsenpoor et al., 2009).

در سال ۱۹۹۶ کاشت محصولات تراریخته در سراسر جهان به گونه‌ای رواج پیدا کرد که ایران هم، همپا با سایر کشورها برنج تراریخته مقاوم به کرم ساقه‌خوار، که بیشترین مقدار سم برای مقابله با آن مصرف می‌شود را تولید کرد. دستیابی ایران به این فناوری مهم توجه همگان را به خود جلب کرد چرا که این برنج که طارم مولایی نامگذاری شد اولین برنج تراریخته رهاسازی شده در جهان و اولین محصول تراریخته کشورهای مسلمان و منطقه خاورمیانه است که به سطح مزرعه راه یافته است و صدها کشاورز ایرانی نیز آن را تولید کرده‌اند. بدین ترتیب کاهش مصرف سموم، محیط زیست و دشمنان طبیعی و مفید موجود در مزارع برنج مانند کفشدوزک‌ها، ماهی‌ها و به خصوص کشاورز را که در اثر تماس با این سموم دچار مشکلات زیادی می‌شد محفوظ می‌داشت (Ghareyazie 2006; Malboobi et al., 2005; Zaidi et al., 2005). امروزه نیز در اغلب کشورهای جهان کاشت این گیاهان رواج پیدا کرده است به گونه‌ای که کشورهای کوچک و در حال توسعه نیز برای رهایی از آفات به کاشت این گیاهان روی آورده‌اند.

وضعیت در سطح جهانی

آمریکا با میزان مصرف بالغ بر ۰/۵ میلیون تن از کل سهم مصرف آفت‌کش‌ها، رتبه اول را در دنیا دارد. بیشترین سهم مصرف آفت‌کش‌ها در آمریکا متعلق به علف‌کش‌ها است، به همین دلیل اولین کشوری بود که به دنبال رهایی از هزینه‌های بالا و اثرهای مخرب سموم شیمیایی با استفاده از علم بیوتکنولوژی در سال ۱۹۸۶ به کاشت تنباکو تراریخته دست یافت. همچنین در کشور فرانسه نیز نخستین آزمایش‌های مزرعه‌ای، با تنباکوی تراریخته صورت گرفت (Anonymous 2010b).

به دنبال تولید گیاهان تراریخته کشور چین در سال ۱۹۹۰، تولید گیاهان تراریخته (تنباکو) را به شکل تجاری آغاز کرد. آمریکا نیز در سال ۱۹۹۴، گیاه تراریخته گوجه‌فرنگی را به شکل تجاری

اعتنایی که خطر یا زیان این محصولات را تأیید کند، تا زمان انتشار این گزارش تحقق نیافته و احتمال وقوع آن نیز نزدیک به صفر است (ISAAA 2009; Malboobi et al., 2005).

سلامتی محصولات تراریخته به تأیید تجربی

مشکل اساسی که در رابطه با کاشت گیاهان تراریخته مطرح می‌شود مسئله جریان ژنی (شار ژنی) است. جریان ژنی انتقال ناخواسته ژن‌های نو ترکیب از گیاه تراریخته که ژن به دو صورت افقی یا عمودی انتقال پیدا می‌کند. در انتقال افقی، ژن‌ها بین گونه‌هایی که از نظر جنسی سازگار نیستند و متعلق به گروه‌های تاکسونومیکی هستند جابجا می‌شوند. در این مورد ادعا شده است که انتقال افقی ژن از باکتری‌های خاک یا باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش گیاه‌خواران، منجر به تولید سویه‌های باکتریایی جدیدی می‌شود که دارای ژن نشانگر (بویژه ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک) یا تراژن‌های اصلی باشد. اما احتمال این انتقال از گیاهان تراریخته به میکروب‌ها بسیار کم است زیرا هنوز هیچ مدرکی برای اثبات این ادعا پیدا نشده است (Rahnama 2008; Azmi et al., 2006).

در انتقال عمودی که به معنی انتقال دی.ان.ا بین گیاهانی است که حداقل سازگاری جنسی را با هم دارند، یکی از روش‌های آلودگی تراژن است که از طریق پخش دانه گرده گیاه تراریخته صورت می‌گیرد که منجر به تولید بذره‌های هیبرید می‌شود (Rahnama 2006; Azmi et al., 2009). با وجود گزارشی که در این مورد از آلودگی داده شده است با این وجود در طی ۱۶ سال تغذیه بیش از نیمی از مردم ۶ میلیارد نفری جهان از ۵۸/۶ میلیون هکتار میلیارد تن محصول تراریخته حتی یک گزارش تأیید شده مبنی بر بروز هر نوع اثر سوء و ناخواسته ناشی از تغذیه انسان یا دام از این نوع محصولات وجود نداشته است (ISAAA 2009).

سلامتی محصولات تراریخته با پشتوانه پژوهشی

درباره ایمنی زیستی و ارزیابی مخاطرات احتمالی پروتئین‌های *cry* در گیاهان تراریخته، محققان بسیاری در جهان و بخصوص در ایران، به دلیل مخالفت‌های برخی از دولت‌مردان، به بررسی این آسیب‌ها پرداخته‌اند. نتایج بررسی پروتئین‌های *cry* با استفاده از روش ۸۰ آمینو اسیدی هیچگونه آلرژی‌زایی از این گیاهان را

کشور ۹۰ درصد از کشاورزان این محصولات را کشت می‌کنند (ISAAA 2009). با ارزیابی‌هایی که پژوهشگران بر روی این گیاهان و غذاهای حاصل از آن انجام داده‌اند تاکنون هیچ نوع گزارش اثبات شده‌ای در مورد سمیت محصولات تراریخته به دست نیامده است و بارها سازمان‌های بهداشت جهانی و خواروبار جهانی عدم سمیت محصولات تراریخته را تأیید کرده‌اند (WHO 2003).

سلامتی محصولات تراریخته به تأیید سازمان‌های جهانی بهداشت

استفاده از محصولات تراریخته طی بیانیه‌های مختلف از سوی سازمان‌های بهداشت جهانی و خواروبار جهانی به کرات تأیید شده است (WHO 2003)، اما به دلیل شبهات و سؤال‌های زیادی که در مورد سلامتی غذاهای ناشی از محصولات تراریخته در بعضی از دولت‌ها بوجود آمده، با استفاده از برجسته‌ترین دانشمندان جهان در حوزه علم ژنتیک، سازمان بهداشت جهانی محصولات تراریخته و غذاهای حاصل از آن را، با انتشار مجموعه‌ای از ۲۰ سوال و پاسخ در سال ۲۰۰۳، سلامتی استفاده از این محصولات را تأیید کردند (WHO 2003). یکی از سؤالاتی که در این مجموعه مطرح شد به این شرح است:

"آیا غذاهای ناشی از محصولات تراریخته (مهندسی ژنتیک شده) سالم و بی‌زیان هستند؟"

پاسخ سازمان بهداشت جهانی به این شرح است.

"موجودات تراریخته مختلف دارای ژن‌های متفاوتی هستند که با روش‌های مختلفی منتقل شده‌اند. این امر به این مفهوم است که ایمنی غذاهای ناشی از هر یک از موجودات تراریخته باید به صورت مورد به مورد ارزیابی شود. غذاهای ناشی از موجودات تراریخته‌ای که امروزه در بازار جهانی یافت می‌شوند مورد بررسی‌ها و تجزیه و تحلیل‌های مختلف و تخمین ریسک قرار گرفته و تأیید شده‌اند و خطری برای سلامتی انسان ندارند. به علاوه در کشورهایی که این محصولات تأیید و مصرف شده‌اند هیچ اثر سویی بر روی سلامتی انسان دیده نشده است."

بر طبق بررسی‌های انجمن ایمنی زیستی ایران نیز که توسط متخصصین این حوزه صورت گرفته است، هیچ مستند علمی قابل

هکتار مبارزه شیمیایی و حدود ۲/۵ میلیون هکتار عملیات مبارزه غیرشیمیایی صورت می‌پذیرد. با وجود صدمات جانی و محیطی بسیاری که در ادامه استفاده از سموم وجود دارد و با وجود عدم هر نوع مستندی در مورد زیان‌آور بودن محصولات تراریخته، اسرار مخالفین دانایی ستیز و فناوری هراس برای مخالفت با تولید این گیاهان در داخل کشور می‌تواند برای سم فروشان و واردکنندگان سموم شیمیایی نفع داشته باشد.

کرم ساقه خوار برنج یکی از آفات کلیدی برنج در منطقه ی مازندران است. با توجه به اهمیت این آفت در ایجاد کاهش معنی‌دار در عملکرد محصول، کنترل شیمیایی علیه آن در شمال ایران از مرحله‌ی خزانه آغاز می‌شود و همین امر باعث آلودگی‌های شدید زیست محیطی و آسیب شدید به سلامتی انسان می‌شود. عملکرد مبارزه با این آفت در سال ۸۸ برابر با ۶۵۰۶۵ هکتار برآورد شده است، که این میزان مصرف سم برای کشوری که به تولید محصول تراریخته آن دست یافته است بسیار بالا و صدمات آن جبران ناپذیر است. (Ghareyazie 2004).

اصولاً کشاورزان آفت‌کش‌هایی را درخواست می‌کنند که دارای ویژگی‌های تأثیر مناسب بر کنترل آفات، هزینه خرید آفت‌کش، سهولت کاربرد بی‌خطر برای محصول، کاربر، کارگر مزرعه و مصرف‌کنندگان محصولات باشند. اگرچه بخش ترویج جهاد کشاورزی نحوه و میزان استفاده از سموم را آموزش می‌دهد اما علاوه بر این مساله، نیاز به نظارت بر مصرف آفت‌کش‌ها ضروری و اجتناب ناپذیر است.

اینکه گفته می‌شود کاشت گیاهان تراریخته به مکانیسم‌هایی که آفت نیستند و به نوعی برای گیاهان مفید هستند اثر زیانباری را بر جای می‌گذارد، دلیلی منطقی برای عدم استفاده از این گیاهان نیست، زیرا تخریب محیط زیست و اکوسیستم‌های طبیعی با کاشت گیاهان متداول زراعی صورت می‌گیرد که به دلیل استفاده بیش از حد سموم دفع آفات نباتی که یکی از اصلی‌ترین آلاینده‌های آب نیز محسوب می‌شوند علاوه بر این باعث نابودی موجودات نیز محسوب می‌شوند (FAO 2009; FAO 2011; James 2010). در دهه ۱۹۴۰ میلادی به دلیل قدرت بسیار بالای سموم شیمیایی در از بین بردن حشرات موجود در طبیعت مانند پشه آنوفل مالاریا و آفات نباتی (WHO 2009)، تنها راه حل و

نشان نداده است (Behzadi Rad et al., 2009; Josheghani et al., 2007). روش‌هایی بر اساس زنجیره پلیمرز، ردیابی پروتئین‌های نو ترکیب به وسیله تکنیک ELISA. دانشمندان با مطالعه روی پروتئین *cry1Ab* مصرف شده توسط پروانه مونا رک که یکی از آفات گیاه ذرت محسوب می‌شود ثابت کردند که جمعیت پروانه مونا رک مواجه شده با گیاه تراریخته تنها ۰/۶ درصد از کل جمعیت حشره در شمال آمریکا را دارد، یعنی دانه گرده حاوی پروتئین *cry1Ab* در شرایط آزمایشگاهی اثر ناچیزی روی پروانه مونا رک داشت (Jafari and Noroozi 2009; Dively et al., 2004). امروزه از ژن تغییر یافته پروتئین *cry1Ac* نیز در پلاسمد *pcry1Ac-npt* با دو T-DNA مجزا برای تراریزش گیاه نخود به منظور افزایش مقاومت به آفات پيله‌خوار (*Helicoverpa armigera*) استفاده شده است، اما هنوز نتایج آن در حال بررسی است (Moshtaghi 2010).

سازمان‌های بین‌المللی مانند سازمان خواربار و کشاورزی، سازمان بهداشت جهانی، کمیسیون اروپا، آکادمی فرانسه پزشکی، انجمن پزشکی آمریکا، انجمن آمریکایی و سم شناسی سلامت غذاهای حاصل از گیاهان تراریخته را مورد بررسی قرار دادند و آنها را برای سلامت انسان امن می‌دانند (ISAAA 2009).

نتیجه‌گیری

فرایند کشف و پیشرفت حشره‌کش‌ها امری طولانی مدت است. معمولاً ۸ تا ۱۰ سال زمان و میلیون‌ها دلار هزینه جهت آزمایشات و ثبت یک حشره‌کش نیاز است. در طول این فرایند نگرش و نیازهای مصرف‌کنندگان و بازارپسندی در حال تغییر است. این در حالی است که الزامات قانونی، وجود حشره‌کش‌های رقیب، قیمت و ... در طول چند سال می‌تواند تغییر کند. بنابراین تولید حشره‌کش‌های جدید بسیار ریسک‌پذیر است. مصرف‌کنندگان با توجه به منطقه جغرافیایی، شرایط آب و هوایی، تراکم آفات بومی و عملیات مدیریتی کنترل آفات نیازهای مختلفی از نظر انتخاب آفت‌کش‌ها دارند (Nabati 2010).

مسأله نظارت بر نوع و میزان مصرف سموم در محصولات کشاورزی بحث مهم و حساسی است که در کشور ما آن‌طور که شایسته است انجام نمی‌شود. سالانه در سطحی حدود ۱۲ میلیون

چاره نجات برای تأمین غذا و پیشگیری از حمله آفات به مزارع، استفاده از مواد شیمیایی بود (FAO 2009a, 2011 b and c)، اما امروزه با پیشرفت علم و دستیابی به گیاهان تراریخته دلیلی برای استفاده از سموم شیمیایی وجود ندارد. همان گونه که کشورهای بیشماری در دنیا به کشت این محصولات پرداخته‌اند و با مصرف آنها تا کنون به مشکلی برای انسان و موجودات زنده دیگر

بر نخورده‌اند.

پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۱۵ میلادی، تعداد گرسنگان جهان، با زیر کشت بردن محصولات تراریخته به نصف مقدار کنونی کاهش پیدا کند و نبود امنیت غذایی، کیفیت و سلامت غذا، با کاهش استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی و آلودگی محیط زیست افزایش می‌یابد (Ghareyazie 2006).

جدول پیوست- فهرست محصولات تراریخته مقاوم به آفات که در کشورهای مختلف مجوز تولید انبوه دریافت کرده‌اند (James 2010).

Attached table- List of GM crops resistant to pests in different countries that have recieved the license for mass production. (James 2010)

نام کشور Country	نام محصول Crop	صاحب فناوری	نوع صفت Trait	تعداد رخدادهای مصوب Number of approved events
آرژانتین Argentina	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش Pest resistance and herbicide tolerance (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	ذرت Corn	Decalb Genetics	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	ذرت Corn	بایر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	مایکوزن	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
آفریقای جنوبی South Africa	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت به آفات	1

آمریکا USA	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	Corn	مایکوژن - پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	Corn			
	پنبه	داو	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	Cotton	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	Cotton	Calgene	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	5
	Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	10
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance) Pests & Lysine	1
	Corn	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	6
	Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance) Pests & Disease	1
	ذرت	پایونیر داو -	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	7
	Corn	پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	ذرت	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	Corn	Dekalb Genetics	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت	مایکوژن	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	Corn			
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	4
	Potato	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	7
	سویا	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	Soybean			

اروپا Europe	گوجه‌فرنگی Tomato	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	پنبه Cotton	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	پنبه Cotton	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	4
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	4
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	7
	ذرت Corn	مایکوزن-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	1
اروگوئه Uruguay	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	داو	مقاومت به آفات Pest resistance	1
استرالیا Australia	پنبه Cotton	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
	پنبه Cotton	بایر	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	ذرت Corn	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1

	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Dekalb Genetics	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	مایکوزن - پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت به آفات	3
	Potato		Pest resistance	
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
	Potato		(Simultaneous resistance)	
			Pests & Disease	
	سویا	Monsanto	مقاومت به آفات	1
	Soybean		Pest resistance	
السالوادور El Salvador	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	مایکوزن - پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
انگلستان England	ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	1
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
ایران Iran	برنج	Corresponding Auther	مقاومت به آفات	1
	Rice		Pest resistance	
برزیل Brazil	پنبه	داو	مقاومت به آفات	1
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	Monsanto	مقاومت به آفات	2
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	1
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	3
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	2
	Corn		Pest resistance	
بورکینافاسو Burkina Faso	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	3
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	مایکوزن	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	سویا	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Soybean		(Simultaneous resistance)	
پاکستان	پنبه	Monsanto	مقاومت به آفات	1
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	Monsanto	مقاومت به آفات	1

Pakistan	Cotton		Pest resistance	
	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	311
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	7
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	3
	Corn		Pest resistance	
تایوان	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	2
Taiwan	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	4
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Dekalb Genetics	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	مایکوژن- پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
جمهوری چک	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	1
Czech Republic	Corn		Pest resistance	
	پنبه	آکادمی علوم چین	مقاومت به آفات	2
	Cotton		Pest resistance	
	ذرت	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	1
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
چین	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	2
China	Corn		Pest resistance	
	ذرت	مایکوژن	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	درخت تبریزی	موسسه تحقیقات جنگل	مقاومت به آفات	1
	Poplar	پکن	Pest resistance	
	برنج	دانشگاه کشاورزی	مقاومت به آفات	1
	Rice	چین Huazhong	Pest resistance	
رومانی	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	1
Romania	Corn		Pest resistance	
	پنبه	Monsanto	مقاومت به آفات	2
	Cotton		Pest resistance	
زولاندنو	پنبه	Syngenta	مقاومت به آفات	1
New Zealand	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	بایر	مقاومت به آفات	1
	Cotton		Pest resistance	

ژاپن Japan	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	ذرت Corn	پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	مایکوژن-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	Dekalb Genetics	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	سیب‌زمینی Potato	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	سیب‌زمینی Potato	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance) Pest & Disease	6
	سویا Soybean	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	پنبه Cotton	داو	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	پنبه Cotton	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
	پنبه Cotton	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	Calgene Inc.	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	بایر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	4
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	8
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance) Pest &	1

Lysine			
ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	1
Corn		Pest resistance	
ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
Corn		(Simultaneous resistance)	
ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
Corn		(Simultaneous resistance) Pests & Disease	
ذرت	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	5
Corn		(Simultaneous resistance)	
ذرت	پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	2
Corn		(Simultaneous resistance)	
ذرت	Dekalb Genetics	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
Corn		(Simultaneous resistance)	
ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
Corn	و مایکوزن / داو	(Simultaneous resistance)	
ذرت	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
Corn		(Simultaneous resistance)	
ذرت	مایکوزن - پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
Corn		(Simultaneous resistance)	
سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت به آفات	4
Potato		Pest resistance	
سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
Potato		(Simultaneous resistance) Pests & Disease	
سنگاپور	Monsanto	مقاومت به آفات	1
Singapore		Pest resistance	
ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	1
Corn		Pest resistance	
سوئیس	Syngenta	مقاومت به آفات	1
Switzerland		Pest resistance	
ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
Corn		(Simultaneous resistance)	
شیلی	Monsanto	مقاومت به آفات	1
Chile		Pest resistance	
ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	2
Corn		Pest resistance	
ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
Corn		(Simultaneous resistance)	
روسیه	Syngenta	مقاومت به آفات	1
Russia		Pest resistance	
ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
Corn		(Simultaneous resistance)	
سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت به آفات	2
Potato		Pest resistance	

فیلیپین The Philippines	سیب‌زمینی Potato	Center Bioengineering RAS, Russia	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	4
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	8
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance) Pests & Lysine	1
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	7
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance) Pests & Disease & Herbicides	1
	ذرت Corn	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	4
	سیب‌زمینی Potato	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	4
	سیب‌زمینی Potato	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance) Pests & Disease	6
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
کاستاریکا Costa Rica	پنبه Cotton	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
	پنبه Cotton	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	بایر	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	پنبه Cotton	داو-پایونیر	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	پنبه Cotton	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	داو	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	داو	مقاومت به آفات Pest resistance	2

کره جنوبی South Korea	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	2
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	Calgene	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	ذرت Corn	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	6
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	5
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance) Pests & Disease & Herbicides	1
	ذرت Corn	پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	2
	ذرت Corn	Syngenta	مقاومت به آفات Pest resistance	3
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	4
	ذرت Corn	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	9
	ذرت Corn	Dekalb Genetics	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	ذرت Corn	مایکوزن	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	سیب‌زمینی Potato	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	4
	سیب‌زمینی Potato	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	6
	گوجه‌فرنگی Tomato	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت به آفات Pest resistance	4
	پنبه Cotton	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	3
	پنبه Cotton	داو	مقاومت به آفات Pest resistance	1
	پنبه Cotton	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
	پنبه Cotton	بایر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1

	ذرت	داو	مقاومت به آفات	1
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	4
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	8
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance) pests & Disease & Herbicides	
	ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	3
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	5
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Dekalb Genetics	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn	و مایکوژن/ داو	(Simultaneous resistance)	
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت به آفات	3
	Potato		Pest resistance	
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
	Potato		(Simultaneous resistance)	
کلمبیا Columbia	پنبه	Monsanto	مقاومت به آفات	3
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	3
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	3
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	3
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	3
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	داو-پایونیر	مقاومت به آفات	1
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	مایکوژن	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
مالزی Malaysia	پنبه	Monsanto	مقاومت به آفات	3
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	3
	Cotton		(Simultaneous resistance)	

	پنبه	Syngenta	مقاومت به آفات	1
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	داو	مقاومت به آفات	3
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	پنبه	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	پنبه	بایر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	4
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	7
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance) Pests & Lysine	
	ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	2
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	7
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	مایکوزن-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت به آفات	1
	Potato		Pest resistance	
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
	Potato		(Simultaneous resistance) Pests & Disease	
مصر Egypt	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	مایکوزن-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
مکزیک Mexico	پنبه	Monsanto	مقاومت به آفات	3
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	3
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	پنبه	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	پنبه	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	پنبه	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	3
	Cotton			

	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	پنبه	داو	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	پنبه	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Cotton		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	4
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	8
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance) Pests & Lysine	
	ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	1
	Corn		Pest resistance	
	ذرت	Syngenta	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	7
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	ذرت	مایکوژن-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت به آفات	1
	Potato		Pest resistance	
	سیب‌زمینی	Monsanto	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	6
	Potato		(Simultaneous resistance) Pests & Disease	
میانمار	پنبه	Cotton and Sericulture Department	مقاومت به آفات	1
Myanmar	Cotton		Pest resistance	
هلند	ذرت	Syngenta	مقاومت به آفات	1
Netherland	Corn		Pest resistance	
	پنبه	Monsanto	مقاومت به آفات	2
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	Metahelix Life Sciences	مقاومت به آفات	1
	Cotton		Pest resistance	
هندوستان	پنبه	Nath Seeds	مقاومت به آفات	1
India	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	Jk Agri Genetics Ltd	مقاومت به آفات	1
	Cotton		Pest resistance	
	پنبه	CICR & UAS, Dharwad	مقاومت به آفات	1
	Cotton		Pest resistance	
هندوراس	ذرت	Monsanto	مقاومت به آفات	1
Honduras	Corn		Pest resistance	
	ذرت	مایکوژن-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش	1
	Corn		(Simultaneous resistance)	

ذرت Corn	داو-پایونیر	مقاومت همزمان به آفات و علف‌کش (Simultaneous resistance)	1
-------------	-------------	---	---

منابع

- Anonymous (2010a), Analysis of pesticide usage in Iran and in the world. Sabzineh Plant Protection. <http://www.sabzineh.ir>
- Anonymous (2010b). Genetic Engineering. Wikipedia. The Free Encyclopedia. February 2011. <http://fa.wikipedia.org>
- Anonymous, Department of Planning, Economic and International Affairs. Office of Statistics and Information Technology. Ministry of Agriculture, Agricultural statistics letter. Volume 2, (2009).
- Azmi A, Movahe Mohammadi H, Irvani H nad Bihamta M R. (2006). Status of transgenic plants in environment and agriculture. Journal of Humans and the Environment: 16-30.
- Behzadirad M, Naghavi M R, Abbasi A and Dastmalchi T. (2009). Phytoremediation, especial solution of biotechnology in environmental protection. Journal of Biosafety. Volume II. No1: 43-50.
- Betz, F.S. Bruce G. Harmond and Roy L. Fuchs. (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharmacol. 32, 156-173
- Blondell, J. (1997). Epidemiology of pesticide poisonings in the United States, with special reference to occupational cases. Occup Med 12, 209-20.
- Brandt, V.A., Moon, S., Ehlers, J., Methner, M.M., and Struttman, T. (2001). Exposure to endosulfan in farmers: two case studies. Am J Ind Med 39, 643-9.
- Chen, S.Y., Zhang, Z.W., He, F.S., Yao, P.P., Wu, Y.Q., Sun, J.X., Liu, L.H., and Li, Q.G. (1991). An epidemiological study on occupational acute pyrethroid poisoning in cotton farmers. Br J Ind Med 48, 77-81.
- Cole, D.C., Carpio, F., and Leon, N. (2000). Economic burden of illness from pesticide poisonings in highland Ecuador. Rev Panam Salud Publica 8, 196-201.
- Dively, G.p.; Rose, R.; Sears, M.K.; Hellmich, R.L.; Stanley-Horn, D.E.; Calvin D.D.; Russo, J.M. and Anderson, P.L. (2004). Effects on Monarch butterfly larvae (*Lepidoptera: Danaidae*) after continuous exposure to *cry1Ab*- expressing corn during anthesis. Environ. Entom. 33:116-1125.
- Duck, N. and S. Evola. 1997. Use of transgenes to increase host plant resistance to insects; opportunities and challenges. Pages 1-18 in Advances in insect control, edited by N. Carizzi and M. Koziel. Taylor and Francis, London, UK. Edwards, C.A Thornhill, W.A. Jones, B.A. Bater, J.E., and Lofty, J.R. 1984. The influence of pesticides on polyphagous predators of pests.
- Edwards Clive A. U.S. Environmental Protection Agency. (2011). Pesticides. <http://www.epa.gov>
- EPA (2001). *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant-Incorporated Protectants Bt Plant-Incorporated Protectants October 15, 2001 Biopesticides Registration Action Document. EPA, USA.
- Eyer P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. (2003). Toxicol Rev; 22:165-1
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2009) The State of Agricultural Commodity Markets. <ftp://ftp.fao.org>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and Consumer Protection (2011) Towards integrated commodity and pest management in grain storage, <http://www.fao.org>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2011) Understanding the indigenous knowledge and information systems of. <http://ftp.fao.org/docrep/fao>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2011), Pesticides as water pollutants - FAO: FAO Home, <http://www.fao.org>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009). Field Guide/Manual on the Identification and Management of Poplar pests and Produced by: Forestry Department, Manual on Forest Insect Pests with Emphasis on Pests of Poplars in the Area of the "Three North 009 Project" (North-Eastern China), <http://www.fao.org>
- Gammon DW, Lawrence Lj, Casida JE. (1982). Pyrethroid toxicology: protective effects of diazepam and Phenobarbital in the mouse and the cockroach. Toxicology and Applied Pharmacology; 66:290-296.
- Ghahari H, Sakenin H and Ostovan H. (2005). Biological effects of three insecticides Diazinon, Atrifus and Chlorpyrifos on non-target arthropods density and activity. Journal of Agricultural Science and Natural Resources. 12: 4.
- Ghareyazie B. (2004). Safety assessment of Cry1Ab protein. 1st National Biosafety Congress In Iran. 17 - 18 Feb 2004. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. Karaj, Iran.
- Ghareyazie B. (2006). The wide reflection of production of the first transgenic rice by Iran: Reported by Agrifood awareness: Iran takes the biotech lead.

Economic Research Report, 04 6 85 1 Center for strategic research.

25. GMO Compass Breeding Aims.(2010) Pest Resistant Crops. <http://www.gmocompass.org>

26. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.(2009) Are Food Derived from GM Crops Safe?. (October 2009). <http://www.isaaa.org>

27. Jafari M and Norozi P. (2009). Overview of the risk assessment of transgenic plants. Journal of Biosafety. Volume I, No 3: 49-68.

28. Jafari M and Tohidfar M. (2007). Transgenic Bt plants, safety, advantages, potential effects in agriculture and in insect and pest resistance management. Modern Genetic Journal. Volume II, No1: 5-17.

29. Jafari, M., Norouzi, P., Malboobi, M. A., Ghareyazie, B., Valizadeh, M., Mohammadi, S. A. et al. (2009). Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic cry1Ab gene. Euphytica. 165 (2), 333

30. James Clive, 2010, Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010. ISAAA Brief No.42. ISAAA: Ithaca, NY.

31. Jonoubi, P., Mousavi, A., Majd, A., Salmanian, A. H., Javaran, M. J., and Daneshian, J., (2005). Efficient regeneration of Brassica napus L. hypocotyls and genetic transformation by Agrobacterium tumefaciens. Biologia Plantarum 49 (2), 175

32. Joshaghani H R, Ahmadi A and Behnampor N. (2006). Reduction of Cholinesterase level in red blood cell in pesticide factory workers. Scientific Journal of Gorgan Medical Sciences University. Volume 8, No4: 23-27.

33. Joshaghani H R, Ahmadi A and Behnampor N. (2007). Studying the relation between changes of serum AchE enzyme with levels of liver enzymes in Chemical Pesticides factory workers. Feiz Journal, Volume 11, No4: 31-35.

34. Jouzani, G. S., Goldenkova, I. V. and Piruzian, E. S., (2008). Expression of hybrid cry3aM-licBM2 genes in transgenic potatoes (Solanum tuberosum). Plant Cell Tissue and Organ Culture 92 (3), 321

35. Karimi Andani J and Mohsenzadeh S. (2009). Pathologic studies of GM crops. Journal of Biosafety. Volume 1, No 4: 21-26.

36. Keifer, M., McConnell, R., Pacheco, A.F., Daniel, W., and Rosenstock, L. (1996a). Estimating underreported pesticide poisonings in Nicaragua. Am J Ind Med 30,195-201.

37. learen to earn, earn to learen, (2011).Pesticides://www.indiastudychannel.com

38. Malbobi et al (2005). Case study: Evaluation of the release of insect resistant transgenic rice (Tarom Molaii). Report of a joint working group of Iranian Genetics Society, Iranian Biotechnology Society and Biosafety society of Iran..

39. Mashayekhi, M., Shakib, A. M., Ahmad-Raji, M.

and Bezdi, G. K., (2008). Gene transformation potential of commercial canola (Brassica napus L.) cultivars using cotyledon and hypocotyl explants. African Journal of Biotechnology 7 (24), 4459

40. McConnell, R. and Hruska, A.J. (1993). An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: implications for prevention in developing countries. Am J Public Health 83, 1559-62.

41. Mehrabi, R., van der Lee, T., Waalwijk, C. and Kema, G. H. J., (2006). MgSlt2, a cellular integrity MAP kinase gene of the fungal wheat pathogen Mycosphaerella graminicola, is dispensable for penetration but essential for invasive growth. Molecular Plant-Microbe Interactions 19 (4), 389

42. Meulenbelt, J. and de Vries, I. (1997). Acute work-related poisoning by pesticides in The Netherlands; a one year follow-up study. Przegl Lek 54, 665-70.

43. Mohaghegh J. and Amir-Maafi M. 2007. Appl. Entomol. Zool., 42: 15-20.

44. Mohammadi GH A and Ataii R. (2008). Epidemiologic study of pesticide poisoning (Organophosphate and Organochlorine) in patients admitted in Shohada hospital Khorramabad in the first six months 2006. Yafteh Journal- Lorestan University of Medical Sciences. Volume 10, No1: 3- 10.

45. Mohsenpor M, Babaian Jelodar N and Tohidfar M. (2009). Chloroplast transformation, safe and environmentally friendly way of production of transgenic plants. Journal of Biosafety. Volume 1, No 4: 35-46.

46. Moshtaghi N, Bagheri A, Higin T J, Jalali Javaran M and Ghareyazie B. (2010). Genetic engineering of chickpea (*Cicer arietinum*) to increase the resistance to crack-eating pests (*Helicoverpa armigera*). Iranian Journal of Cereal Research. Volume 1, No1: 65-75.

47. Murray, D., Keifer M, Wesseling C., Corriols, M., Henao, S. (2002). Pesticide Illness Surveillance: Putting the Data to Work. Int J Occup Environ Health 8. 243-248

48. Nabati P. Head of Chemical Industries, Non metallic industry office and representative of the ministry of Industries and Mines in the coordination center for science and technology of pesticides. (2010). Status report of pests industry in the country.

49. Nakamura Y, Sugihara K, sone T, Isobe M, Ohata S, Kitamura S.(2007). The invitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. Toxicology;235:176-184.

50. Oakeshott JG. Devonshire AL. Claudianos C. Sutherland TD. Horne I. Campbell PM. et al.(2005). Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. Chem Biol Interact; 157-158: 269-276.

51. Personal Commiunication (2010) Ehsan Nazarbeigi deputy manager, Pars pesticides company.

52. Personal Communication (2010). Alireza Yasini, Plant Production Organization of Iran.

53. Personal Communication (2010). Dr. Kalantar, manager of toxins and sprayers affairs. Plant Production Organization of Iran.
54. Personal Communication (2010). Mr. Abedini, toxins and sprayers affairs. Plant Production Organization of Iran.
55. Personal Communicaton (2010).. Akbarpor, Plant Production Organization of Iran.
56. Plant company. (2010). <http://www.gyah.ir>
57. Rahnama H. (2009). Biosafety and assessment of possible risk in molecular agriculture. Journal of Biosafety. Volume I, No 3: 31-48.
58. Rao Y. and Rao V. N. (1979). J. Entomol. Research. 3: 106-108.
59. Rashidi Monfared S, Rezaii M and Ebrahimi A. (2009). Evaluation of Cry Proteins using allergenics databases. Journal of Biosafety. Volume I, No 4: 9-17.
60. Rahnama H. (2008). Bioethics and production of GM crops. Journal of Ethics in Science and Thechnology. Third year, No1 and 2: 1-14.
61. Seifi nezhad A, Bihamta M R, Omidi M and Salehi jozani G. (2007). Functional Genomics of Bt. Modern Genetic Journal. Volume II, No3: 5-16.
62. Shaieghi M, Khobdel M, Ghamisi A, Selseleh M, Abolhasani M and Nasirian H. (2008). Investigation and determination of the amount of organophosphate insecticides malathion and diazinon residues in Karaj Dam catchment. Environmental Science and Technology. Volume 10: 257-266.
63. Solati J, Hajikhani R and Todehzaeem R A. (2008). Investigation of the effects of permethrin insecticide on hormones and sexual behavior in adult male mice (NMRI). Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. Volume 13, No2: 42-49.
64. Van der Hoek, W., Konradsen, F., Athukorala, K., and Wanigadewa, T. (1998). Pesticide poisoning: a major health problem in Sri Lanka. Soc Sci Med 46, 495-504.
65. Vishlaghi N, Rashedi H, Emami F and Ghareyazie B. (2009). Comparison of the unintended effects of GM crops and crops produced through traditional plant breeding methods. Journal of Biosafety. Volume 1, No 3: 9-17.
66. Wesseling, C., Castillo, L., and Elinder, C.G. (1993). Pesticide poisonings in Costa Rica. Scand J Work Environ Health 19, 227-35.
67. World Health Organization. Media centre. (2010). General information related to chemical risks in food. Fact sheet N°225 May 2010. <http://www.who.int>
68. World Health Organization. Global insecticide use for vector-borne disease control. (2009). 4th edition. (Document WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.6) World Health Organization, Geneva http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598781_eng.pdf
69. Yazdi Z, Sarreshtedari M and Zohal M A. (2010). Respiratory disease in workers exposed to organophosphate materials. Journal of School of Medicine, Mashhad University of Medical Science. Year 53, No4: 206-213.
70. Zaidi, M. A., Mohammadi, M., Postel, S., Masson, L. and Altosaar, I., (2005). The Bt gene cry2Aa2 driven by a tissue specific ST-LS1 promoter from potato effectively controls *Heliothis virescens*. Transgenic Research 14 (3), 289.

بررسی میزان باقیمانده و دوره کارنس حشره کش دیازینون در

محصول خیار گلخانه‌ای جیرفت

Determination of Diazinon residue levels and preharvest intervals in green house Cucumbers in Jiroft

محسن مروتی^{۱*} و مهدی آزادوار^۲

Mohsen morowati^{1*} and Mahdi Azadvar²

۱- دانشیار پژوهش مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران

۲- استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی جیرفت و کهنوج

1- Associate Professor, Iranian research Institute of Plant Protection.

2- Associate Professor, Jiroft and Kahnooj Agricultural and Natural Resources Center

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_morowati@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

باقیمانده آفت کش
ترا ریخته
خیار
دوره کارنس
دیازینون

با وجود کشت بیش از ۱۷۰/۳ میلیون هکتار محصولات تراریخته در دنیا؛ اصرار برخی مدیران میانی فناوری هراس در کشورمان به‌ویژه در دهه اخیر موجب استمرار استفاده از آفت کش‌های شیمیایی خطرناک مانند دیازینون شده است. حشره کش دیازینون برای کنترل آفات نظیر مینوز و کرم برگخوار خیار در سطح وسیعی در گلخانه‌های خیار منطقه جیرفت و کهنوج استفاده می‌شود. به منظور بررسی میزان باقیمانده این حشره کش و تعیین دوره کارنس آن در شرایط گلخانه عملیات کاشت خیار گلخانه‌ای و اعمال تیمارها در مرکز تحقیقات کشاورزی منطقه جیرفت انجام گرفت. در قطعات تیمار از حشره کش دیازینون امولسیون ۶۰ درصد، به نسبت یک در هزار از فرم تجاری طبق توصیه شرکت سازنده استفاده شد. نمونه برداری از میوه‌های قابل برداشت و به فواصل ۱، ۳، ۷، ۱۰، ۱۴ و ۲۱ روز پس از سمپاشی انجام گرفت. طی این مدت نیز هیچ گونه سمپاشی در قطعات تیمار انجام نگرفت. نمونه‌ها بلافاصله در پوشش‌های پلاستیکی سیاه‌رنگ، بسته‌بندی و تا زمان آنالیز در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در هر مرحله نمونه برداری، حدود یک کیلوگرم میوه (۱۰-۵ عدد) بصورت تصادفی از هر پلات برداشت شد. به منظور ردیابی باقیمانده دیازینون، پس از استخراج، برای اندازه‌گیری آن از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) با آشکارساز نیتروژن فسفره (NPD) استفاده شد. نتایج بدست آمده تجزیه و تحلیل شده و بر اساس آن دوره کارنس حشره کش دیازینون در حدود ۱۰ روز با توجه به حداکثر میزان مجاز باقیمانده (MRL) ملی که معادل ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم است، تعیین شد. با توجه به اینکه در کشت خیار هر ۳ روز یکبار چین خیار انجام و محصول جمع‌آوری می‌شود و این محصول به سرعت باید به بازار عرضه شود تا حالت تازه خود را حفظ کند. بنابراین نمی‌توان از دیازینون به عنوان حشره کش مناسبی برای محصول خیار استفاده کرد و باید استفاده از روش‌های جایگزین مانند کشت محصولات تراریخته مقاوم به آفات که هم‌اکنون در بیش از ۷۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی جهان کشت می‌شوند؛ در دستور کار قرار گیرد.

تا اواخر سال ۲۰۱۲ میلادی چیزی در حدود ۱۷۰/۳ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی در دنیا به کشت محصولات تراریخته اختصاص یافته که ۶۴ میلیون هکتار آن به گیاهان تراریخته مقاوم به آفات اختصاص دارد (Adeli and Ghareyazie, 2012). بدین ترتیب با کاشت این نوع محصولات و با استفاده از استراتژی استفاده از گیاهان مقاوم به آفات، مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی به طور چشم‌گیری کاهش پیدا کرده و اینگونه محصولات فاقد هرگونه باقیمانده سموم بوده و ضمن تضمین سلامت مصرف‌کننده، از بازار مناسبی چه در داخل و چه برای صادرات نیز برخوردار خواهند بود. دو نکته در عدم استفاده از محصولات تراریخته قابل تأمل است، اول اینکه تاکنون هیچ مدرک و سندی مبنی بر وجود اثرهای سوء بر انسان و محیط زیست در محصولات تراریخته ارائه نشده است و دوم اینکه عدم کشت محصولات تراریخته به منزله ادامه کشت محصولات حساس به آفات است که موجب استمرار مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی خطرناک می‌شود. موادی که خطرناک بودن آنها چه برای انسانها و چه برای محیط زیست با پژوهش‌های بیشماری به اثبات رسیده است. در پژوهش حاضر سعی شده تا قسمتی از معضل باقیمانده آفت‌کش‌ها در محصولات کشاورزی که به مصرف تک تک افراد جامعه می‌رسد نشان داده شود. بیش از ۵۰ درصد از آفت‌کش‌های مورد استفاده در اکوسیستم، روی منطقه هدف یعنی گیاهان قرار نمی‌گیرد و به روش‌های مختلف وارد محیط زیست می‌شود. مصرف انواع آفت‌کش‌های کشاورزی در ایران نسبت به کشورهای دارای تولید ناخالص ملی مشابه بیشتر است (Anonymous 1995b). طبق آمارهای رسمی طی سال‌های ۱۳۶۵ تا ۱۳۷۰ سالانه بین ۳۵ تا ۶۰ هزار تن آفت‌کش در کشور به مصرف رسیده (Anonymous 1995a) که از این میزان استان مازندران ۳۵ درصد کل مصرف کشور را به خود اختصاص داده است (Anonymous 1995c). این میزان در سال زراعی ۸۶-۸۵ در حدود ۲۶ هزار تن بوده که ۱۹ هزار تن آن در محصولات زراعی و ۷ هزار تن آن در محصولات باغی مصرف شده است (Heidari 2010). آفت‌کش‌ها یا سم‌های شیمیایی مانند یک شمشیر دو لبه عمل می‌کنند، زیرا در بهترین حالت به صورت

موقت مشکل آفت‌ها و بیماری‌ها را کاهش می‌دهند، اما استفاده وسیع، نابجا و نادرست از آنها سبب ایجاد مشکلات جدی شده است. از جمله این مشکلات می‌توان به طغیان آفت‌های بالقوه، ظهور آفت‌های ثانویه، گیاه‌سوزی، آلودگی محیط زیست، مقاومت آفت‌ها به آفت‌کش‌ها، نابودی حشرات مفید و موجودات غیر هدف، مسمومیت‌های حاد و مزمن اشاره کرد. مسمومیت‌های ناشی از آفت‌کش‌ها علاوه بر پرسنل شاغل در بخش کشاورزی و کارخانجات تولید آفت‌کش‌های شیمیایی، در اثر مصرف مواد غذایی حاوی باقیمانده آنها نیز روی می‌دهد. آمار دقیقی درباره زیان‌ها و تلفات ناشی از مسمومیت دراز مدت شغلی در دست نیست، اما تعداد زیادی از مردم در اثر مصرف مواد غذایی دارای باقیمانده آفت‌کش‌ها در معرض مسمومیت هستند. برآورد می‌شود که درصد زیادی از مواد غذایی بخصوص انواع سبزیجات و میوه‌جات به باقیمانده آفت‌کش‌ها آلوده باشند (Hodgson & Levi 1987; Ragsdale & Kuhr 1997). یکی از مهمترین موانع در صدور محصولات کشاورزی (خصوصاً تره‌بار و سبزیجات)، مخاطرات میزان باقیمانده سموم در این محصولات است. بر اساس مصوبات کمیته کدکس مواد غذایی^۱، کشورهای عضو، که ایران نیز یکی از اعضای آن است، ملزم به رعایت موارد ایمنی غذایی و کنترل کیفی محصولات کشاورزی که وارد بازار داخلی شده و یا صادر می‌شوند، با توجه به شرایط محلی خود هستند. خیار یکی از میوه‌هایی است که از نظر میزان مصرف در بین خانواده‌های ایرانی از جایگاه خاصی برخوردار است. حشره‌کش دیازینون برای کنترل آفت‌هایی از قبیل مینوز و کرم برگ‌خوار خیار که از مهمترین آفت‌ها این محصول هستند، توصیه شده است. این حشره‌کش در سطح وسیعی در مزارع و گلخانه‌های خیار منطقه جیرفت و کهنوج بر علیه آفات مذکور استفاده می‌شود. نظر به اینکه میزان باقیمانده آن در خیار گلخانه‌ای منطقه تاکنون بررسی نشده و بعلاوه دوره کارنس آن در شرایط گلخانه ممکن است با شرایط مزرعه (هوای آزاد) متفاوت باشد و با عنایت به اینکه محصول خیار تولیدی این منطقه به میزان زیادی وارد بازارهای داخلی (استان‌های مختلف کشور) می‌شود و همچنین اخیراً صادر نیز می‌شود، انجام این پژوهش به منظور بررسی میزان باقیمانده

1- Codex Alimentarius Commission

در پژوهشی در اروپا میزان باقیمانده ۱۲ حشره کش ارگانوفسفره بویژه دیازینون در مرکبات در والنسیای اسپانیا بررسی و با استانداردهای توصیه شده مقایسه شد که میزان برخی از آنها بیش از حد استاندارد گزارش شدند (Torres et al. 1997). در کانادا نیز میزان باقیمانده تعدادی از سموم فسفره و کلره روی ۱۶ محصول کشاورزی بررسی و با استانداردهای توصیه شده مقایسه شدند که در این پژوهش ها نیز تعدادی از حشره کش ها مخصوصا دیازینون بیش از حد مجاز گزارش شده است (Frank et al. 1990). در پژوهش هایی دیگر در ایران میزان باقیمانده و دوره کارنس سم دیازینون در محصول پیاز و پیازچه اندازه گیری و با استانداردهای توصیه شده از کشورهای ژاپن، چکسلواکی و کدکس بین المللی مقایسه شده و میزان مجاز آن را توصیه کرده اند. در بررسی دیگری در کشور، میزان باقیمانده دیازینون در گیلان و هندوانه مطالعه و دوره کارنس مناسب آن تعیین و معرفی شد (Yadegarian, 2000; Hajirazagh 2000 and 2001).

مواد و روش ها

کشت خیار بصورت بذری در یک واحد گلخانه ۵۰۰ متر مربعی با پوشش پلاستیکی و اسکلت فلزی انجام گرفت. این آزمایش ها بصورت طرح بلوک های کامل تصادفی انجام شد که شامل دو تیمار دیازینون و شاهد در سه تکرار (بلوک) بود. بدین منظور دو ردیف از گلخانه انتخاب که هر ردیف به دو تیمار دیازینون و شاهد تقسیم بندی و طول هر تیمار حدود ۱۰ متر و فاصله بلوک ها (تکرار) حدود ۸۰ سانتی متر از هم بود. قبل از سم پاشی از تیمار شاهد (بدون سم پاشی) بمنظور انجام آزمایش ها ریکاورای نمونه برداری شد. آبیاری و تغذیه زیر نظر کارشناسان مربوطه انجام شد. بوته ها پس از رویش توسط طناب های سیمی که به سقف گلخانه بسته شده بودند، آویزان شدند. از دو ماه قبل از اعمال تیمارها از انجام هرگونه سمپاشی روی بوته های خیار خودداری شد. یک ساعت قبل از اعمال تیمارها نمونه برداری از میوه های قابل برداشت انجام گرفت. عملیات سمپاشی در بعدازظهر روز مورد نظر و با سمپاش پستی دستی انجام گرفت. در زمان سمپاشی دمای گلخانه معادل ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۵ درصد یادداشت شد.

این حشره کش و تعیین دوره کارنس آن در شرایط گلخانه و مقایسه آن با استاندارد ملی و با هدف تامین سلامت مصرف کنندگان داخلی و ایجاد زمینه کنترل کیفی محصول جهت صادرات، لازم و ضروری است.

دیازینون حشره کشی غیرسیستمیک، ارگانوفسفره و با فرمول شیمیایی $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ است و کاربرد گسترده ای روی محصولات زراعی دارد و بر علیه آفت هایی چون مگس مینوز و کرم های برگ خوار توصیه شده است (Tomlin 2003). حداکثر میزان باقیمانده مجاز توصیه شده این حشره کش طبق استانداردهای ملی روی خیار ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم است (Iranian National Standard 2010).

در خصوص بررسی و ردیابی بقایای آفت کش ها در محصولات مختلف و محیط زیست در مناطق مختلف کشور پژوهش هایی انجام شده است. در یکی از این پژوهش ها در مورد باقیمانده حشره کش اندوسولفان مورد استفاده در مزارع خیار در منطقه چغلوندی استان لرستان نشان داده شد که میزان این حشره کش در آب ۳ روز پس از سمپاشی حدود ۲ میکروگرم بر کیلوگرم است که پس از یک ماه این مقدار به صفر می رسد (Jafari et al. 2004). بررسی باقیمانده آفت کش های اندوسولفان و دیازینون در مزارع خیار سبز و گوجه فرنگی استان کهگیلویه و بویراحمد طی سالهای ۸۱-۸۲ نشان داد که بیشترین میزان باقیمانده مربوط به حشره کش دیازینون در محصول خیار سبز بود که حدود ۳/۵ برابر بیشتر از حد استاندارد ملی و جهانی بوده است. همچنین مقدار باقیمانده دیازینون و اندوسولفان در گوجه فرنگی و خیار سبز در برخی مناطق استان بالاتر از حد مجاز برآورد شد (Salahi et al. 2013). ایمانی و همکاران (۱۳۸۵) باقیمانده ۸ نوع آفت کش از گروه های مختلف را در محصولات گوجه فرنگی و خیار به روش تجزیه جمعی بررسی کردند. این پژوهش نشان داد که در خیار باقیمانده آفت کش های دیازینون، کلرپیرفوس، فوزالن، دیکلروس، کارباریل، پرمترین و فن پروپاترین به ترتیب پس از ۹، ۱۲، ۹، ۷، ۵ و ۴ روز به حد مجاز رسیدند و در گوجه فرنگی باقیمانده آفت کش های دیازینون، کلرپیرفوس، و فوزالن به ترتیب پس از ۸، ۱۰ و ۱۱ روز به حد مجاز کاهش یافتند (Imani et al. 2006).

در قطعات تیمار از حشره‌کش دیازینون امولسیون ۶۰ درصد، ساخت شرکت آریا شیمی که به نسبت یک در هزار از فرم تجاری طبق توصیه شرکت سازنده استفاده شد. نمونه‌برداری از میوه‌های قابل برداشت و به فواصل ۱، ۳، ۷، ۱۰، ۱۴ و ۲۱ روز پس از سمپاشی انجام گرفت. طی این مدت نیز هیچ‌گونه سمپاشی در قطعات تیمار انجام نگرفت. نمونه‌ها بلافاصله در پوشش‌های پلاستیکی سیاه‌رنگ، بسته‌بندی و تا زمان آنالیز در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در هر مرحله نمونه‌برداری، حدود یک کیلوگرم میوه (۱۰-۵ عدد) بصورت تصادفی از هر پلات برداشت شد.

به منظور ردیابی باقیمانده دیازینون، از روش استخراج ذیل استفاده شد و برای اندازه‌گیری آن از دستگاه کروماتوگرافی گازی^۲ (GC) با آشکارساز نیتروژن فسفره^۳ (NPD) استفاده شد (Tribollet & Gasser 1995). نتایج بدست آمده تجزیه و تحلیل شده و میزان باقیمانده دیازینون و دوره کارنس آن در شرایط گلخانه تعیین و با استانداردهای توصیه شده توسط شرکت سازنده و ملی مقایسه شد.

روش استخراج: در مرحله اول ۱۰ گرم از نمونه توزین و آسیاب شده و در یک بشر ۱۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و مقدار ۶۰ میلی‌لیتر استون به آن اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت ۲ دقیقه هموژن و مجدداً ۶۰ میلی‌لیتر استون به آن اضافه و به مدت ۲ دقیقه هموژن شد. مخلوط هموژن شده توسط پمپ خلا و کاغذ صافی فیلتر شده و محلول صاف شده به دکانتور انتقال داده شد. به این محلول مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سدیم سولفات ۲ درصد و ۴۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان افزوده و به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد. فاز آلی (فاز پایینی) در یک بشر جدا شده و مجدداً مقدار ۲۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به دکانتور حاوی محلول باقیمانده اضافه شد. مجدداً فاز آلی (فاز پایینی) در بشر قبلی ریخته و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان برای سومین بار به دکانتور اضافه و سپس فاز آلی (فاز پایینی) در بشر قبلی ریخته شد. محتویات بشر از قیف بوختر حاوی سولفات سدیم عبور داده شد و محلول صاف شده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا حدود ۵-۱۰ میلی‌لیتر

در روتاری تبخیر شد. در نهایت به این محلول ۱ میلی‌لیتر متانول اضافه کرده و ۱ میکرولیتر از آن را به دستگاه کروماتوگرافی تزریق و دیازینون اندازه‌گیری شد. جهت پالایش، صرفاً از فیلتر سرسنگی با مش ۰/۴۵ میکرون و قطر ۱۳ میلی‌متر استفاده شد.

شرایط دستگاه برای آنالیز: دستگاه گاز کروماتوگرافی شیمادزو Shimadzu, Japan Model: GC-2010، با ستون Cpb-5، دمای ستون: ۲۸۰ درجه سلسیوس، طول ستون: ۳۰ متر، قطر داخلی ستون: ۰/۲۵ میلی‌متر، قطر پوسته: ۰/۲۵ میکرومتر، دمای اولیه ستون: ۱۵۰ درجه سلسیوس با توقف ۵ دقیقه و بعد با رمپ ۳ درجه در دقیقه به ۲۸۰ درجه سلسیوس با زمان توقف ۱۰ دقیقه، انژکتور Splitless، دمای انژکتور: ۲۰۰ درجه سلسیوس، آشکارساز NPD، دمای آشکارساز: ۳۰۰ درجه سلسیوس و با گاز حامل هیدروژن/هوا، میزان جریان: ۳ میلی‌لیتر/دقیقه.

جهت انجام آزمایش‌های مربوط به بازیافت^۴، محلول استاندارد مادر ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از حشره‌کش (دیازینون ۹۹ درصد) تهیه و سپس با رقیق کردن محلول استاندارد مادر، محلول‌های استاندارد با غلظت‌های متفاوت (۱، ۶ و ۴۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تهیه شد. برای سنجش میزان درصد بازدهی روش کار، آزمایش‌های بازیافت با غلظت‌های ۲۰، ۱۰ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم با استفاده از استانداردهای کاری مناسب جهت اضافه کردن به ۱۰ گرم نمونه شاهد انجام شد. جهت اندازه‌گیری حشره‌کش دیازینون، نمونه‌های تغلیظ شده، هر یک در ۱ میلی‌لیتر اتانول حل شده و ۱ میکرولیتر از آنها توسط میکروسرنج طبق نمونه‌های تحت آزمایش به دستگاه تزریق شدند.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌ها میزان بازیافت حشره‌کش دیازینون از محصول خیار گلخانه‌ای بین ۷۵-۸۵ درصد برآورد شد که طبق عرف قابل قبول بین‌المللی بین ۱۲۰ تا ۷۰ درصد است و نشان می‌دهد که روش مورد استفاده در این گستره‌ها معتبر است. حد آشکارسازی^۵ (LOD) روش طبق ریکآوری‌های انجام شده معادل ۰/۰۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و حد کمی کردن^۶ (LOQ) آن معادل ۰/۰۹

4- Recovery

5- Limit of Detection

6- Limit of Quantitation

2- gas chromatography

3- Nitrogen Phosphorous Detector

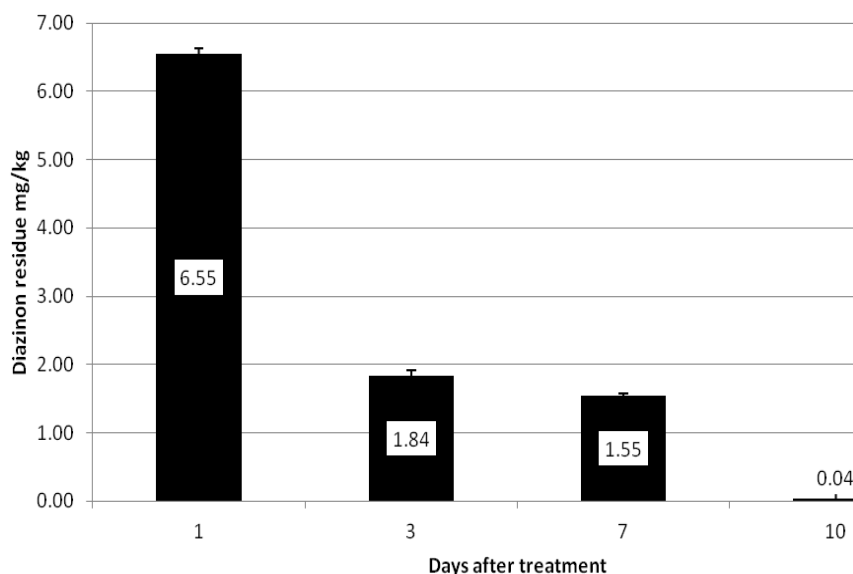
میلی گرم بر کیلوگرم است. روند کاهش و تجزیه دیازینون در نمونه های آزمایش شده در دو سال زراعی در شکل های ۱ و ۲ آورده شده است. در هر دو سال آزمایش نمونه ها پس از ده روز میزان باقیمانده دیازینون را در حد مجاز نشان می دهد. مقادیر به دست آمده از نظر یکنواختی مورد بررسی قرار گرفته و در طرح بلوک های کامل تصادفی تجزیه شدند. با توجه به نتایج، اثر تکرار معنی دار نشد و تکرارها یکنواخت بودند ($F=1/43$). همچنین مقادیر به دست آمده از نمونه برداری های ۱۰ روز پس از سم پاشی به منظور تعیین دوره کارنس توسط آزمون "t" با مقدار حد مجاز دیازینون برای خیار (۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم) مورد مقایسه قرار گرفتند و در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی داری دیده نشد.

مقادیر بدست آمده از نظر یکنواختی مورد بررسی قرار گرفته و در طرح بلوک های کامل تصادفی تجزیه شدند. با توجه به نتایج، اثر تکرار معنی دار نیست و بنابراین تکرارها یکنواخت هستند. نتایج به دست آمده در دو سال آزمایش نیز مقایسه شدند و از لحاظ آماری تفاوت معنی داری بین سالها ملاحظه نشد و بنابراین تکرارهای هر دو سال به صورت یکجا مورد بررسی آماری قرار گرفت.

با توجه به آنالیز نمونه های برداشته شده از آزمایش های تعیین دوره کارنس سم دیازینون (شکل های ۱ و ۲)، میزان باقیمانده سم دیازینون ده روز پس از سمپاشی به حد مجاز (MRL) که ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم است و توسط استاندارد ملی تعیین شده، می رسد (Iranian National Standard 2010). بنابراین دوره کارنس دیازینون بر روی خیار گلخانه ای ۱۰ روز پس از سمپاشی تحت شرایط فوق تعیین شد. در بررسی دیگری توسط نگارنده پژوهش هایی درباره دوره کارنس حشره کش ایمیداکلوپرید روی خیار گلخانه ای در ورامین انجام پذیرفت که دوره کارنس آن معادل ۳ روز برآورد و تعیین شد (Morowati et al. 2013). در مطالعات جامعی که توسط واین زیرل در دانشگاه ایلینویز انجام پذیرفت حشره کش دیازینون را با دوزهای متفاوت روی محصولات چوبی چون کلم بروکلی، کلم پیچ، گل کم، شلغم، خردل، خیار، کدو و هندوانه آزمایش و دوره کارنس آن را بین ۴ روز (هندوانه) تا ۲۱ روز (کلم) تعیین و اعلام کردند و در ادامه همین

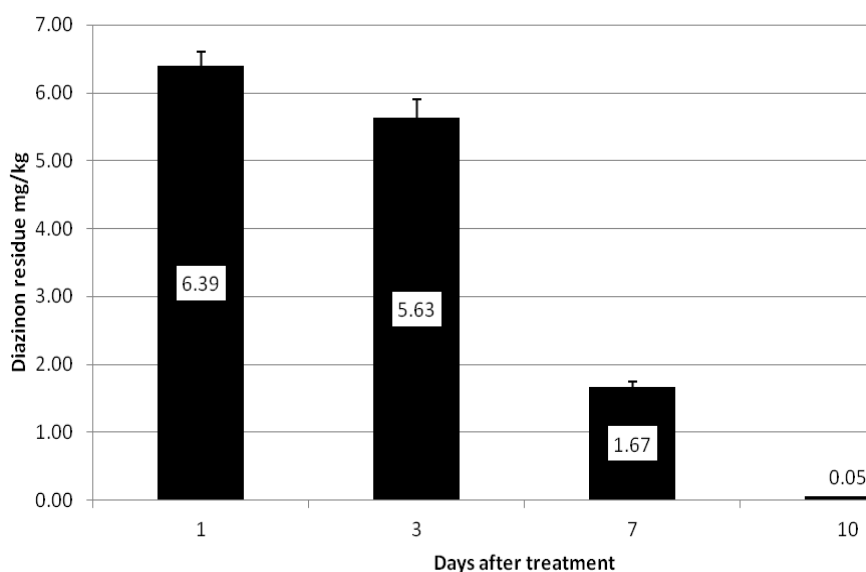
پژوهش ها دوره کارنس حشره کش دیازینون روی خیار ۷ روز تعیین شده است (Weinzierl 2000). تجزیه و از بین رفتن آفت کش ها به عواملی از جمله گونه گیاهی، فرمولاسیون شیمیایی ترکیب، روش کاربرد آنها، شرایط محیطی، پدیده های فیزیکی (عمدتاً فراریت) و تجزیه شیمیایی (که در آن نور خورشید نقش مهمی دارد) بستگی دارد. پژوهش ها نشان داده اند که برای بررسی تجزیه آفت کش ها در یک گیاه زراعی، انجام آزمایش در شرایط خاصی که آن آفت کش مصرف می شود ضرورت دارد تا بتوان فاصله زمانی مورد نیاز برای رسیدن باقیمانده آفت کش ها به حد مجاز آن قبل از برداشت محصول مورد نظر را به دست آورد (Brouwer et al. 1997). بنابراین، معمولاً در شرایط خاص و نوع محصول، دوره کارنس متغیر است. با توجه به اینکه در کشت خیار هر ۳ روز یکبار چین خیار انجام و محصول جمع آوری می شود و به سرعت این محصول باید به بازار عرضه شود تا حالت تازه خود را حفظ کند بنابراین نمی توان از دیازینون به عنوان حشره کش مناسبی برای محصول خیار استفاده کرد. با توجه به فعالیت های مختلف انجام شده در وزارت جهاد کشاورزی در راستای تولید محصول سالم مانند تهیه و تدوین استانداردهای مجاز باقیمانده سموم (MRL) و برنامه استفاده بهینه از کود و سم و کاهش مصرف آفت کش ها که در دستور کار قرار گرفته است، به دلیل هراس از خسارت به محصولات و عملکرد پایین تولید، کشاورزان بدون برنامه مدون و کارشناسی شده از آفت کش ها استفاده می کنند که باعث ایجاد باقیمانده بیش از حد مجاز آنها روی محصولات کشاورزی می شود. از طرفی اثرهای سوء احتمالی از فناوری سرنوشت ساز و مهم مهندسی ژنتیک و استفاده از محصولات تراریخته باعث عدم استقبال گسترده از این محصولات شده است و جالب اینجاست که با توجه به شواهد و مدارک بسیار که حاکی از اثرهای سوء آفت کش ها بر سلامت انسان ها و محیط زیست است، تصمیم قاطعی در عدم مصرف و یا حتی رعایت استانداردهای باقیمانده آفت کش ها گرفته نمی شود.

فناوری هراسی و تردید افکنی غیرقانونی معدودی مدیر میانی به ویژه در دهه اخیر موجب خارج شدن فناوری سرنوشت ساز و مهم مهندسی ژنتیک از دستور کار به نژادگران کشور شده و در نتیجه سالیانه بالغ بر ۵ میلیارد دلار از این نوع محصولات وارد



شکل ۱- روند تجزیه باقیمانده دیازینون روی خیار در سال اول زراعی.

Figure 1- Decomposition process of Diazinon residue on cucumber in the first year of cultivation.



شکل ۲- روند تجزیه باقیمانده دیازینون روی خیار در سال دوم زراعی.

Figure 2- Decomposition process of Diazinon residue on cucumber in the second year of cultivation

طرفداری از محیط زیست و سلامت انسان هنگامی غیرقابل باور و اعتماد می شود که با وجود مدارک بسیار که حاکی از تاثیر سوء آفت کش های شیمیایی بر سلامت انسان و محیط زیست است؛ تصمیم قاطعی در مورد حذف این نوع سموم از زنجیره تولید

کشور می شود. با وجود استقبال بی نظیر کشاورزان در کشورهای تولید کننده این نوع محصولات؛ در کشور ما کشاورزان و مصرف کنندگان ضمن نهي در مورد کشت و کار محصولات تراریخته در معرض آفت کش های شیمیایی قرار گرفته اند. اعتراض مدعیان

محصولات کشاورزی و یا حتی رعایت استانداردهای باقیمانده

آفت کش ها اتخاذ نمی شود.

منابع

1. Adeli N, Ghareyazie B. 2012. Comparison of Environmental, Human and Animal safety Aspects Between the Traditional Agrochemical-Based Insect Control and the Use of Insect Resistance Biotech Crops. Genetic Engineering and Biosafety Journal, Vol. 1, No. 2.
2. Anonymous. 1995a. Pesticides usage in agriculture, Preface, Zeiton, Special issue no. 1, Pp.4-5. (In Farsi).
3. Anonymous. 1995b. A discourse with the UNDP representative in I. R. Iran on Pesticides usage in Iran, Zeiton, Special issue no. 1. Pp. 9-11. (In Farsi).
4. Anonymous. 1995c. A discourse with the Director of Mazandaran Province Agricultural Organization on Pesticides usage in Iran, Zeiton, Special issue no. 1. Pp. 16-19. (In Farsi).
5. Brouwer DH, De Haan M, Leenheers LH, De Vreede SAF, Van Hemmen JJ. 1997. Half-lives of pesticides on greenhouse crops. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58: 976-984.
6. Frank R, Braun HE, Ripley BD. 1990. Residues of insecticides and fungicides on Ontario- grown vegetables, 186-1988. Food Additives and Contaminants, 7: 545-554.
7. Hajirazagh N. 2000. Determination of pesticide residue and pre-harvest interval of Diazinon in sweet cherry. Final project report. Iranian Research Institute of Plant Protection. (In Farsi).
8. Hajirazagh N. 2001. Determination of pesticide residue and pre-harvest interval of Diazinon in water melon and the comparison of recommended methods with customary ones. Final project report. Iranian Research Institute of Plant Protection. (In Farsi).
9. Heidari A. 2010. Strategic program of Pesticides Research. Iranian Institute of Plant Protection publication. Pp. 6. (In Farsi).
10. Hodgson E, Levi P. 1997. A textbook of modern toxicology. 2nd ed. Appleton & Longe.
11. Imani S, Talebi K, Shojaei M, Kamali K. 2006. Multi-residue determination of eight types of pesticides used on greenhouse cucumber and Tomato. Proceedings of the 17th Plant Protection Congress, Tehran, Vol. 1, Pests, pp. 147. (In Farsi).
12. Iranian National Standard. 2010. Pesticides- Maximum residue limits of pesticides- Fruit vegetables, 1st Ed., Institute of Standard and Industrial Research of Iran. (In Farsi).
13. Jafari Sh, Sepahvand M, Azadbakht N, Ahora M. 2004. Investigation on Endosulfan residue levels in water and soil resources and cucumber produced in Chagholvandi region (Lorestan Province). Proceedings of the 16th Plant Protection Congress, Tabriz, Vol. 1, Pests, pp. 179. (In Farsi).
14. Morowati M, Ebrahimnejad M, Tajbakhsh MR. 2013. Determination of residue and pre-harvest interval of Imidaclopride insecticide on greenhouse cucumber in Varamin region. J. of Sc. & Technol. Greenhouse culture, vol. 4, No. 14. (In Farsi).
15. Ragsdale N, Kuhr RJ. 1987. Pesticides: minimizing the risk. ACS.
16. Salahi A, Morowati M, Entesari M. 2013. Determination of Endosulfan and Diazinon residue levels in Tomato and cucumber in Kohgiluyeh and Boyer Ahmad Province. Genetic Engineering and Biosafety, Vol. 1, No. 2, Pp. 113- 120. (In Farsi).
17. Tomlin CDS. 2003. The Pesticide Manual. British Crop Protection Council, 1^{3th} Edition, UK.
18. Torres CM, Pico Y, Marin R, Manes J. 1997. Evaluation of organophosphorous pesticide residues in citrus fruits from the Valencia Community (Spain). J. of AOAC International, 80: 1122-1128.
19. Tribolet N, Gasser J. 1995. Analytical methods for pesticide residues in food stuffs.
20. Weinzierl R. 2000. Insect Pest Management for commercial vegetable crops, Illinois agricultural pest management handbook, Department of crop sciences, Illinois.
21. Yadegarian L. 2000. Diazinon residue levels and its pre-harvest interval in Onion and Spring onion. Final project report, Iranian Research Institute of Plant Protection. (In Farsi).

ردیابی ژن *nptII* و پیشبر *nos* در دستگاه گوارش و بافت‌های موش‌های صحرائی تغذیه‌شده با سیب‌زمینی تراریخته

Detection of *nptII* gene and *nos* promoter in digestive system and tissues of rat, fed genetically modified potato

علیرضا ستارزاده^۱، حسن رهنما^{۲*}، مهدی نیکمرد^۳، بهزاد قره‌یاضی^۴، محمود

خسروشاهلی^۵

Alireza Sattarzadeh¹, Hassan Rahnama^{2*}, Mahdi nikmard³, Behzad Ghareyazie⁴,
Mahmod Khosrovchahli⁵

۱، ۲ و ۴- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۱، ۳ و ۵- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

1, 2, 4-Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

1, 3, 5- Azad university science and research center of Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

پیشبر *nos*
دستگاه گوارش
دی.ان.ای نو ترکیب
ژن *nptII*
سیب‌زمینی تراریخته

استفاده از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در گیاهان تراریخته منجر به ملاحظات در مصرف‌کنندگان در رابطه با احتمال انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به میکروارگانیسم‌های داخلی بدن، دستگاه گوارش و احتمال جذب آنها شده است. بررسی میزان ثبات و تجزیه‌پذیری پروتئین یا ژن مورد نظر در طی مراحل هضم، می‌تواند نگرانی مربوط به سمیت یا حساسیت‌زایی آن را به حداقل برساند. برای بررسی میزان پایداری و وجود قطعات دی.ان.ای نو ترکیب سیب‌زمینی تراریخته در دستگاه گوارش و احتمال جذب آن‌ها، از مدل حیوانی موش صحرائی استفاده شد. پس از اتمام یک دوره خوراک‌دهی ۹۰ روزه موش‌های صحرائی، نمونه‌هایی از محتوای دستگاه گوارش، بافت‌های دستگاه گوارش، خون و سایر بافت‌ها برداشته شد. پس از استخراج دی.ان.ای و بررسی کمیت و کیفیت آن، اقدام به شناسایی و ردیابی قطعات مختلف تراژن با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعات داخل ژنی شد. براساس نتایج بدست آمده، ژن شاهد که شامل قطعات ژن کلروپلاستی *cp* در خوراک استفاده شده بعنوان غذا و محتویات دستگاه گوارش و قطعات ژن داخلی موش *my* به عنوان کنترل داخلی بافت‌های موش، در هر دو گروه از موش‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته و غیرتراریخته شناسایی شد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای پیشبر *nos* و ژن *nptII* و در تعدادی از نمونه‌های محتویات دستگاه گوارش گروه‌های تغذیه‌شده با سیب‌زمینی تراریخته مثبت بود و در نمونه مربوط به بافت‌ها و خون و گروه کنترل هیچ قطعه‌ای مشاهده نشد. نتایج این پژوهش نشان داد قطعات ژن داخلی سیب‌زمینی و مولکول دی.ان.ای تراژن در دستگاه گوارش بطور کامل تخریب نشده و قطعاتی از آن در دستگاه گوارش قابل تشخیص است. آنچه مسلم است دی.ان.ای موجود در یک ماده غذایی و یا دی.ان.ای منتقل شده (تراژن) در دستگاه گوارش ساختار یکسانی دارند. بنابراین، حضور قطعاتی از این ژن‌ها در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش موش طبیعی است.

بیفتند. پژوهش در زمینه انتقال ژن *nptII* و سایر ژن‌های نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک مشخص کرد که انتقال یک ژن نشانگر از یک گیاه تراریخته به باکتری خاک که قبلاً واجد آن ژن نبوده‌اند، بسیار بعید است. حتی وقتی که یک باکتری خاکری حساس به کانامایسین، ژن *nptII* حاصل از گیاه را دریافت می‌کند پخش صفت جدید در جمعیت باکتریایی بستگی به قدرت رقابتی سلول‌های تراریخته دارد. چون وجود کانامایسین در خاک‌های طبیعی هنوز شناسایی نشده است (Nielsen et al., 2000). نتیجه گرفته شده است که شرایط طبیعی خاک به ندرت فشار انتخابی لازم برای اثبات انتقال احتمالی ژن *nptII* از گیاهان تراریخته به باکتری‌های پذیرنده را فراهم می‌کند. از طرف دیگر، باکتری‌های مقاوم به کانامایسین به فراوانی در خاک‌های طبیعی وجود دارند. برای مثال، DeVries و همکاران (۱۹۹۸) دی.ان.ای استخراج شده از چهار نمونه خاک از مزارع مختلف را بررسی کرده و نشان دادند که هر چهار نمونه خاک واجد دی.ان.ای بودند که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *nptII* توسط واکنش زنجیرهای پلیمرز تکثیر پیدا می‌کنند. غلظت توالی‌های *nptII* هدف بین $10^5 \times 2$ تا $10^8 \times 3$ مولکول بر گرم خاک (وزن خشک) متفاوت بود. بنابراین، تحت بهترین شرایط فرضی، نمونه‌های خاکری تراریخته مقاوم به کانامایسین که در نتیجه جذب دی.ان.ای از گیاه تراریخته ایجاد می‌شوند $1:10000000$ جمعیت‌های خاکری مقاومت به کانامایسین را هم تشکیل نخواهند داد (Rahnama et al., 2011). در این پژوهش تلاش شده است تا با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، وجود قطعات دی.ان.ای تراژن *nptII* و پیشبر *nos* در محتویات دستگاه گوارش و همچنین بافت‌های مختلف موش‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این پژوهش را می‌توان به مراکز مسئول صدور مجوز رهاسازی ارائه کرد و به کمک این اطلاعات در مورد امکان به زیر کشت بردن تجاری سیب‌زمینی تراریخته تصمیم‌گیری کرد. با توجه به نتایج این بررسی تا حدودی به ملاحظه‌ها و تردیدها در مورد استفاده از محصولات تراریخته پاسخ داده خواهد شد.

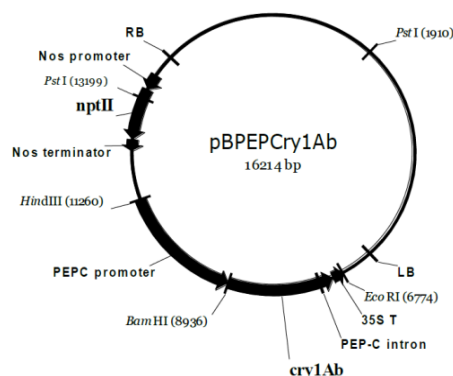
تراژن‌های موجود در گیاهان تراریخته در بیشتر موارد دارای توالی‌های پروکاریوتی هستند از جمله ملاحظه‌های موجود در این زمینه امکان انتقال این تراژن‌ها از گیاهان تراریخته به باکتری‌ها و یا میکروب‌های موجود در دستگاه گوارش انسان و حیوانات است. یکی از مهم‌ترین ملاحظه‌ها این است که ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک استفاده شده در تولید گیاهان تراریخته ممکن است وارد باکتری‌های بیماری‌زای موجود در دستگاه گوارش شوند (Folmer et al., 2000). بدین منظور ضروری است پس از تولید یک محصول تراریخته، سلامت غذائی آن از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد. ژن *nptII* فراوان‌ترین ژن نشانگر انتخابی استفاده شده در گیاهان تراریخته جهت اهداف پژوهشی است (Ziemienowicz et al., 2001). بررسی‌های انجام شده در بخشی از مقالات منتشر شده نشان داده که در ۷۷-۴۴ درصد از پژوهش‌هایی که از گیاهان تراریخته استفاده کرده‌اند، گیاهان مورد بررسی واجد ژن نشانگر انتخابی *nptII* بوده‌اند (Rahnama et al., 2011). آژانس‌های نظارتی بین‌المللی، آزادسازی تجاری کلزا، ذرت، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، گیاه کتان، کاسنی و پنبه حاوی ژن *nptII* را پذیرفته‌اند. هیچ گونه گزارشی مبنی بر اثرهای سوء NPTII یا ژن *nptII* بر انسان، جانوران یا محیط گزارش نشده است (Rahnam et al., 2004; Miki et al. 2004) در بررسی‌های انجام شده بر روی باکتری‌های خاکری در مزارع زیر کشت گیاهان تراریخته واجد ژن‌های نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، هیچ گونه باکتری تراریخته‌ای مشاهده نشده است (De Vries et al., 1998). بعلاوه، گروه‌های پژوهشی زیادی هم نتوانسته‌اند در شرایط آزمایشگاهی، انتقال افقی ژن را از گیاهان تراریخته به باکتری‌ها نشان دهند. با این وجود، ثابت شده است که باکتری‌هایی که دارای بخش‌هایی از ژن *nptII* هستند می‌توانند در نتیجه نوترکیبی با ژن‌های همسان خود (NPTII) در گیاه تراریخته، ژن خارجی گیاهی را دریافت کنند (Rahnama et al., 2011; Van den Eede et al., 2004). داده‌های اخیر مشخص کرده‌اند که انتقال ژن از گیاهان تراریخته به باکتری‌های خاک می‌تواند در شرایط طبیعی (حداقل وقتی که توالی‌های همسان مشخصی بین ژن خارجی و دی.ان.ای سلول پذیرنده وجود داشته باشد) اتفاق

مواد و روش‌ها

خصوصیات سازه ژنی استفاده شده در تولید سیب‌زمینی تراریخته: در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- کرج، سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی با استفاده از ژن *cry1Ab* تولید شده است. برای هدفمند کردن بیان ژن‌ها و تولید سیب‌زمینی Bt ایمن‌تر از نظر رعایت اصول ایمنی زیستی، از پیشبر *PEPC (Phosphoenolpyruvate carboxylase)* گیاه ذرت (*Zea mays*) که سبب تظاهر ژن در بخش‌های سبز گیاه می‌شود، استفاده شده است (Ghasimi et al., 2009). برای انتقال سازه مولکولی pBPECry1Ab به گیاه سیب‌زمینی از *اگرولباکتریوم توموفاسینس* سویه AGLo1 استفاده شد (شکل ۱). این سازه ژنی دارای ژن نشانگر *nptII* و از پیشبر *NOS* است.

رژیم غذایی، گروه‌های آزمایشی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: سیب‌زمینی‌های کنترل و تراریخته پس از کشت در شرایط گلخانه‌ای به مرحله غده‌دهی رفتند. سیب‌زمینی‌ها پس از خشک‌کردن، به شکل پودر در جیره غذایی موش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. از آنجا که سیب‌زمینی و فراورده‌های آن به وفور در سبد غذایی انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد بنابراین در این پژوهش از مدل موش صحرایی به دلیل مشابهت بسیار زیاد دستگاه گوارش با انسان نسبت به سایر حیوانات آزمایشگاهی و مزرعه‌ای موجود در ایران استفاده شد. برای انجام این آزمایش از ۱۶ موش صحرایی (۸ موش نر و ۸ موش ماده) استفاده شد. موش‌ها به چهار گروه ۴ تایی تقسیم شدند. هر یک از این دسته‌ای ۴ تایی تحت عنوان یک تیمار بودند که در هر تیمار از ۲ موش نر و دو موش ماده استفاده شد. در ۲ گروه از موش‌ها علاوه بر جیره غذایی معمولی موش (شامل پودر گندم، پودر جو، پودر ذرت، سبوس گندم، بلغور سویا، پودر برسيم، پودر یونجه، مولتی ویتامین، ویتامین C، ویتامین D3، ویتامین E، پودر شیر و بلغور گوشت) ۳۰ درصد سیب‌زمینی تراریخته و در دو گروه دوم علاوه بر جیره غذایی معمولی موش، از سیب‌زمینی غیرتراریخته استفاده شد. در دو گروه از گروه‌های چهارتایی از سیب‌زمینی نوردیده و در دو گروه دیگر از سیب‌زمینی‌های قرار گرفته در شرایط تاریکی استفاده شد. شرایط نگهداری موش‌ها براساس دستورالعمل OECD بود (OECD, 1998). پس از اتمام یک دوره

خوراک‌دهی ۹۰ روزه، پس از ۱۲ ساعت از قطع غذا یا خوراک، سلاخی و کشتار موش‌ها انجام شد؛ در دستگاه گوارش از محتویات معده، محتویات سکوم، محتویات روده، و بافت‌های دوازدهه، ژوژنوم، دودنوم، ریه، کبد، معده، قلب، کلیه، طحال، بیضه، مغز و خون بصورت جداگانه نمونه‌گیری شد و نمونه‌ها در فریزر و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ژن نشانگر *nptII* در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش، بافت‌ها و خون مورد پیگیری قرار گرفت. برای تهیه دی.ان.ای مورد نیاز از بافت‌ها و نمونه‌های مختلف برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از کیت‌های استخراج دی.ان.ای Qiagen استفاده شد. غلظت دی.ان.ای مورد استفاده ۷۰ تا ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، جهت حصول اطمینان از تراریخته بودن سیب‌زمینی مورد استفاده به‌عنوان خوراک در تغذیه موش‌ها با آغازگرهای اختصاصی (*cp* و *my*) ضروری است، بدین منظور پس از استخراج دی.ان.ای، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگر اختصاصی قطعات ژن‌های استفاده شده در تولید سیب‌زمینی تراریخته، شامل پیشبر *nos* و ژن *nptII* انجام شد (شکل ۲ و ۳).



شکل ۱- نقشه‌ی ناقل دوگانه pBPECry1Ab حاوی ژن *cry1Ab* تحت کنترل پیشبر PEPC، پیشبر *nos* و نشانگر انتخابی *nptII*

Figure 1- Map of pBPECry1Ab vector containing *cry1Ab* gene under PEPC promoter, *nos* promoter, and *nptII* selectable marker gene.

آغازگرهای مورد استفاده در بررسی الگوی بیان ژن: به منظور بررسی الگوی بیان اعضای مختلف خانواده ژنی، طراحی

قطعات ژن داخلی موش به عنوان کنترل داخلی *my* (جدول ۱)، تهیه شد. کنترل مثبت در این آزمایش به یک ژن با تعداد نسخه بالا گفته می شود که بتوان به سادگی در قسمت های مختلف مورد ردیابی قرار گیرد انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز جهت تشخیص قطعه ژن *nptII* و پیشبر *nos* با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲ و ۳) پس از استخراج دی.ان.ای از بافت های ذکر شده انجام شد (شکل ۴، ۵ و ۶؛ جدول ۴). ترکیب محلول واکنش در جدول ۳ و

آغازگرها به گونه ای صورت گرفت که با استفاده از هر جفت آغازگر تنها عضو مورد نظر به طور اختصاصی تکثیر شود. به این منظور از طریق همردیف کردن توالی های گزارش شده برای هر ژن مورد نظر در بانک ژن NCBI (National Center for Biotechnology Information) جفت آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار OLIGO ver 5 طراحی شد. یک جفت آغازگر برای کنترل مثبت که شامل قطعات ژن کلروپلاستی *cp* و

جدول ۱- فهرست جفت آغازگرهای مورد استفاده در بررسی الگوی بیان ژن های اختصاصی و کنترل.

Table 1- Names and sequences of the primer pair used for determine gene expression especially and control.

نام آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequence of primer	طول محصول PCR (bp) Length of PCR product
Pot-cp-F Pot-cp-R	5'- CTC TTT ACA TCG AAA CTT CAG AAA G-3' 5'- AAA CTA CGG ATT CGG GTC G-3'	111 bp
F-nptII R-nptII	5' GCT ATT CGG CTA TGA CTG GGC AC 3' 5' TCA TCC TGA TCG ACA AGA CCG GC 3'	400 bp
MY-F 5 MY-R 5	'5'- TTG TGC AAA TCC TGA GAC TCA T-3' 5'- ATA CCA GTG CCT GGG TTC AT-3'	100 bp
R-Nos P F-Nos P	5' AGG TGC AGA TTA TTT GGA TTG AGA GTG 3' 5' TCA TGA GCG GAG AAT TAA GGG AG 3'	300 bp

جدول ۲- زمان و دمای استفاده شده واکنش زنجیره ای پلیمرز برای آغازگرهای اختصاصی و کنترل داخلی.

Table 2- Time and annealing temperature primers specific used in the polymerase chain reaction.

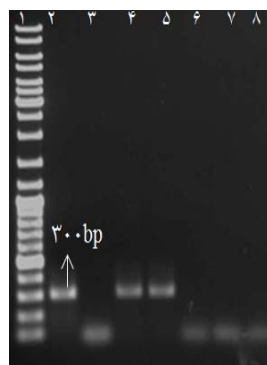
آغازگر Primer	واسرشت سازی اولیه Initial denaturation(min)	واسرشت سازی Denaturation (sec)	اتصال آغازگر Annealing (sec)	گسترش Extension (sec)	تعداد چرخه Cycle	گسترش نهایی Final elongation (min)
Pot-cp	4 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	5 min at 72 °C
nptII	5 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	5 min at 72 °C
MY	5 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	5 min at 72 °C
Nos	4 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	5 min at 72 °C

استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز به غیر از دی.ان.ای ژنومی) تهیه شد. سپس محلول مادری در میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتری تقسیم و با دی.ان.ای ژنومی و آغازگرها به خوبی مخلوط شد و

زمان و دمای واکنش زنجیره ای پلیمرز در جدول ۲ ذکر شده است. محلول مادری با در نظر گرفتن مواد مشترک بین واکنش های مورد نظر به همراه کنترل منفی (تمام مواد مورد

شکل ۳ نشان داده شده است، باندهای حاصل از تکثیر مشاهده شده با اندازه ۴۰۰ جفت باز مربوط به کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیبزمینی تراریخته است، کنترل منفی و سیبزمینی غیرتراریخته و شاهد هیچ گونه باندهای نشان نمی دهند. همانطور که در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است، باندهای حاصل از تکثیر مشاهده شده با آغازگر اختصاصی ژن های استفاده شده در تولید سیبزمینی تراریخته بیانگر تراریخته بودن سیبزمینی مورد استفاده به عنوان خوراک در تغذیه موش هاست.

نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تشخیص ژن *nptII*: نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز برای ژن *nptII* در تعدادی از نمونه های دستگاه گوارش موش های تغذیه شده با سیبزمینی تراریخته مثبت بود و در نمونه مربوط به بافت ها و خون و گروه کنترل هیچ قطعه ای مشاهده نشد (شکل های ۴ و ۵؛ جدول ۴).



شکل ۲- تشخیص پیشبر *nos* در سیبزمینی تراریخته با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز.

Figure 2- Detection of *nos* promoter in genetically modified potato by PCR reaction.

شماره گذاری ها به این ترتیب هستند: شماره ۱، نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder)؛ ۲، پلاسمید نو ترکیب حاوی پیشبر *nos*؛ ۳، کنترل منفی (آب)؛ ۴، غذای محتوی سیبزمینی تراریخته نور؛ ۵، سیبزمینی تراریخته؛ ۶، غذای فاقد سیبزمینی؛ ۷، سیبزمینی غیرتراریخته؛ ۸، غذای محتوی سیبزمینی غیرتراریخته.

Number: 1 Ladder (1Kb Ladder) 2: Recombinant plasmid contained *nos* promoter 3: negative control (water) 4: diet with genetically modified potato (GMP) 5: genetically modified potato (GMP) 6: diet without potato 7: genetically modified potato (NGMP) 8: diet with NGMP

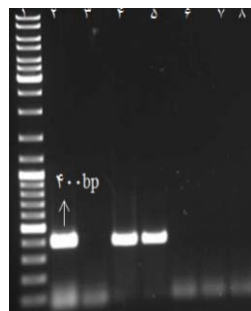
موش نر تغذیه شده با سیبزمینی تراریخته (شکل ۴؛ شماره ۲) نیز تشخیص داده شد. کنترل منفی و نمونه های محتویات سکوم سایر موش های تغذیه شده با سیبزمینی تراریخته و غیرتراریخته و گروه شاهد هیچ گونه باندهای نشان نداد که بیانگر عاری بودن محتویات سکوم نمونه های ذکر شده از قطعه ژن *nptII* است. حضور ژن کلروپلاستی *cp* با قطعه تکثیری به اندازه ۱۱۱ جفت

پس از اسپین در دستگاه PCR BIO-RAD قرار گرفت. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد برده شد و توسط دستگاه Gel-Doc عکسبرداری صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثبات تراریخته بودن سیبزمینی استفاده شده بعنوان خوراک تشخیص پیشبر *nos* در سیبزمینی تراریخته: همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، باندهای حاصل از تکثیر مشاهده شده با اندازه ۳۰۰ جفت باز مربوط به کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیبزمینی تراریخته است، که نشان دهنده تراریخته بودن سیبزمینی است؛ کنترل منفی و سیبزمینی غیرتراریخته و شاهد هیچ گونه باندهای نشان نمی دهند. **تشخیص ژن *nptII* در سیبزمینی تراریخته:** همانطور که در

تشخیص قطعه ژن *nptII* در محتویات سکوم: همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، باندهای ۴۰۰ جفتبازی حاصل از تکثیر مربوط به ژن *nptII* در نمونه کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیبزمینی تراریخته مشاهده می شود. همچنین قطعه ژن *nptII* در محتویات سکوم موش نر تغذیه شده با سیبزمینی تراریخته (شکل ۴؛ شماره ۱۵) و محتویات سکوم

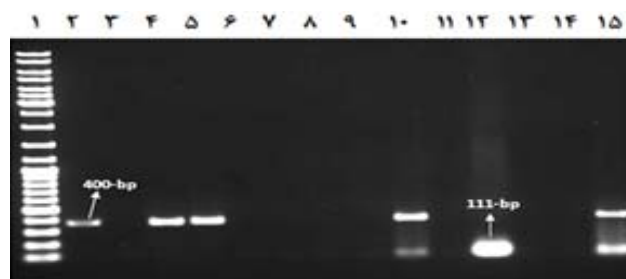


شکل ۳- تشخیص ژن *nptII* در سیب‌زمینی تراریخته با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

Figure 3- Detection of *nptII* gene in the genetically modified potato (GMP) by PCR reaction.

شماره‌گذاری‌ها به این ترتیب هستند: شماره ۱: نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder) ۲: پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *nptII* ۳: کنترل منفی (آب) ۴: غذای محتوی سیب‌زمینی تراریخته ۵: سیب‌زمینی تراریخته ۶: سیب‌زمینی غیر تراریخته ۷: غذای محتوی سیب‌زمینی غیر تراریخته ۸: غذای فاقد سیب‌زمینی.

Number: 1 (1Kb Ladder) 2: Recombinant plasmid contained *nos* 3: negative control (water) 4: diet with genetically modified potato (GMP) 5: GMP6: NGMP 7: diet with NGMP 8: diet without potato

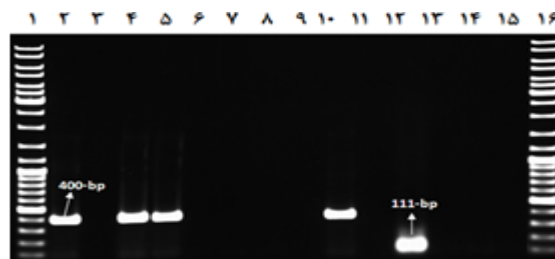


شکل ۴- تشخیص قطعه ژن کلروپلاستی *cp* و ژن *nptII* در محتویات سکوم.

Figure 4- Detection of potato-specific *cp* gene and *nptII* gene in content of the cecum

شماره‌گذاری‌ها به این ترتیب هستند: شماره ۱) نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder) ۲) موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۳) کنترل منفی (آب) ۴) سیب‌زمینی تراریخته ۵) خوراک سیب‌زمینی تراریخته ۶) سیب‌زمینی شاهد ۷) خوراک سیب‌زمینی غیر تراریخته ۸) موش نر تغذیه شده خوراک سیب‌زمینی غیر تراریخته ۹) موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۰) پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *nptII* ۱۱) موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۲) کنترل مثبت (ژن کلروپلاستی *cp*) در محتویات سکوم موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی غیر تراریخته ۱۳) موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۴) موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۵) موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته.

Line numbers: 1 (1Kb Ladder) 2: male rats were fed diet GMP 3: control without DNA 4: GMP 5: diet with GMP 6: control diet without potato 7: diet with NGMP 8: male rats were fed diet NGMP 9: female rats fed GMP 10: Recombinant plasmid harboring *nos* gene 11: female rats fed with diet GMP 12: positive control (chloroplast *cp* gene) content of the cecum male rats fed diet NGMP 13: female rats fed diet GMP 14: female rats fed diet GMP 15: male rats fed diet GMP



شکل ۵- تشخیص قطعه ژن کلروپلاستی *cp* و ژن *nptII* در محتویات معده.

Figure 5- Detection of potato-specific primer CP and *nptII* gene in content of the Stomach.

شماره گذاری ها به این ترتیب هستند: شماره ۱ و ۱۶: نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder): ۲: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۳: کنترل منفی (آب) ۴: سیب زمینی تراریخته ۵: خوراک سیب زمینی تراریخته ۶: سیب زمینی شاهد ۷: سیب زمینی غیر تراریخته ۸: موش ماده سیب زمینی غیر تراریخته ۹: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۰: پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *nptII* ۱۱: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۲: کنترل مثبت (ژن کلروپلاستی *cp*) در محتویات معده موش نر تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۳: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۴: موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته ۱۵: موش نر تغذیه شده با سیب زمینی غیر تراریخته.

Line numbers: 1 and 16 (1Kb Ladder) 2: female rats were fed with diet GMP diet 3: control without DNA 4: GMP 5: diet with GMP 6: control diet without potato 7: NGMP 8: diet with NGMP 9: female rats fed with diet GMP 10: Recombinant plasmid harboring *nos* gene 11: female rats fed with diet GMP 12: positive control (chloroplast *cp* gene) contents of the stomach male rats fed GMP diet 13: female rats fed GMP diet 14: female rats fed GMP diet 15: male rats fed diet NGMP.

در نمونه مربوط به بافت ها و خون و گروه شاهد هیچ قطعه ای مشاهده نشد (شکل ۶ و جدول ۴).

تشخیص پیشبر *nos* در محتویات معده: همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده است، باندهای ۳۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر مربوط به پیشبر *nos* در کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیب زمینی تراریخته مشاهده می شود. همچنین قطعه پیشبر *nos* در محتویات معده موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته (شکل ۶؛ شماره ۱۱) و محتویات معده موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته (شکل ۶؛ شماره ۱۶) نیز تشخیص داده شد. کنترل منفی و نمونه های محتویات معده سایر موش های تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته و غیر تراریخته و گروه شاهد هیچ گونه باندهای نشان نداد که بیانگر عاری بودن محتویات معده نمونه های ذکر شده از قطعه پیشبر *nos* می باشد. حضور ژن کلروپلاستی (*cp*) با قطعه تکثیری به اندازه ۱۱۱ جفت باز تنها در محتویات معده برخی از موش های تغذیه شده با سیب زمینی مشاهده شد.

با توجه به جدول ۴ نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز برای پروموتور

باز تنها در محتویات سکوم برخی از موش های تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته و غیر تراریخته مشاهده شد.

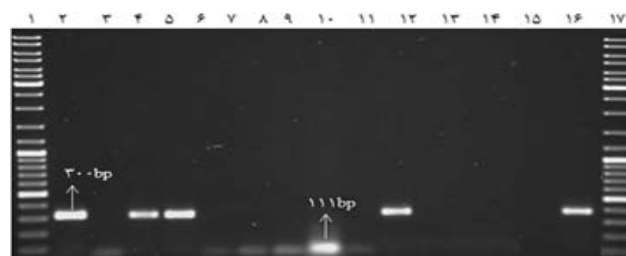
تشخیص قطعه ژن *nptII* در محتویات معده: همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، باندهای ۴۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *nptII* در کنترل مثبت (دی.ان.ای پلاسمید) و خوراک سیب زمینی تراریخته مشاهده می شود. همچنین قطعه ژن *nptII* در محتویات معده موش ماده تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته (شکل ۵؛ شماره ۲) تشخیص داده شد. کنترل منفی و نمونه های محتویات معده سایر موش های تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته و غیر تراریخته و گروه شاهد هیچ گونه باندهای نشان نداد که بیانگر عاری بودن محتویات معده نمونه های ذکر شده از قطعه ژن *nptII* است. حضور ژن کلروپلاستی *cp* با قطعه تکثیری به اندازه ۱۱۱ جفت باز تنها در محتویات معده برخی از موش های تغذیه شده با سیب زمینی مشاهده شد.

نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز برای پیشبر *nos*: نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز برای پیشبر *nos* در تعدادی از نمونه های دستگاه گوارش موش های تغذیه شده با سیب زمینی تراریخته مثبت بود و

نتایج بدست آمده از آزمایش تغذیه جوندگان نشان می‌دهد که دی.ان.ای خارجی در دستگاه گوارش به طور کامل تخریب نشده است. نتایج به دست آمده از پژوهش‌های انجام شده در جوندگان، ماهی، مرغ، خوک، گوسفند، گاو، حیوانات وحشی و انسان نشان می‌دهد که دی.ان.ای مشتق شده از خوراک هم‌چنان به میزان متفاوت و به شکل تکه تکه شده در دستگاه گوارش یافت شده و دستگاه گوارش مانع مطلق در برابر جذب مولکول‌های خارجی پس از خوردن غذا نیست (EFSA, 2009). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در موش‌های جوان انتقال دی.ان.ای به خون صورت نگرفته اما در بخش‌های مختلف محتویات دستگاه گوارش قطعه تراژن یافت شد. بررسی‌های انجام شده در حیوانات مشخص کرد که بیش از ۹۵ درصد دی.ان.ای بعد از عبور از دوازدهه، هیدرولیز شده و بازهای اسیدهای نوکلئیک آن جذب انتروسیت‌ها می‌شوند (Duggan *et al.*, 2000). پژوهش‌های گسترده‌ای در دستگاه گوارش تمام موجودات زنده که در معرض ماکرومولکول‌های موجود در محیط

nos و ژن *nptII* در تعدادی از نمونه‌های دستگاه گوارش گروه‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته مثبت بود و در نمونه مربوط به بافت‌ها و خون و گروه غیرتراریخته هیچ قطعه‌ای مشاهده نشد.

در پژوهش حاضر سرنوشت دی.ان.ای تراژن در دستگاه گوارش موش صحرایی بررسی شد و نتایج بدست آمده منطبق و تاییدکننده یافته‌های قبلی در مورد وجود دی.ان.ای خارجی در دستگاه گوارش جوندگان است. نتایج پژوهش حاضر انتقال تراژن از سیب‌زمینی تراریخته به سلول‌های موش، خون و بافت‌ها را نشان نداد. در مقابل قطعه تراژن در بخش‌های مختلف محتویات دستگاه گوارش موش‌های تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته و هم‌چنین توالی غیرتراریخته داخلی در هر دو گروه از موش‌های غیرتراریخته و تغذیه شده با مواد تراریخته تشخیص داده شد. این نتایج با بسیاری از نتایج و پژوهش‌های پیشین تطابق دارد (Hoelweg and Doerfler, 2001., Vijay *et al.*, 2008) (Chowdhury *et al.*, 2003). نتایج پژوهش ارائه شده، همراه با



شکل ۶- تشخیص قطعه ژن کلروپلاستی *cp* و پیشبر *nos* در محتویات معده.

Figure 6- Detection of potato-specific primer CP and promoter *nos* in content of the Stomach.

شماره‌گذاری‌ها به این ترتیب هستند: شماره ۱ و ۱۷: نشانگر وزن مولکولی (1Kb Ladder) ۲: پلاسمید نو ترکیب حاوی پیشبر *nos* ۳: کنترل منفی (آب) ۴: سیب‌زمینی تراریخته ۵: خوراک سیب‌زمینی تراریخته ۶: سیب‌زمینی شاهد ۷: سیب‌زمینی غیرتراریخته ۸: خوراک سیب‌زمینی غیرتراریخته ۹: کنترل مثبت (ژن کلروپلاستی *cp*) در محتویات معده موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۰: موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی غیرتراریخته ۱۱: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۲: موش نر تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته ۱۳: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی غیرتراریخته ۱۴: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی غیرتراریخته ۱۵: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی غیرتراریخته ۱۶: موش ماده تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته.

Line Numbers: 1 and 19 (1Kb Ladder) 2: Recombinant plasmid agent *nos* promoter 3: control without DNA 4: GMP 5: diet with GMP 6: control diet without potato 7: NGMP 8: diet with NGMP 9: positive control (chloroplast *cp* gene) contents of the stomach female rats fed with GMP diet 10: male rats fed with NGMP diet 11: female rats fed with GMP diet 12: male rats fed with GMP diet 13: female rats fed with NGMP diet 14 female rats fed with NGMP diet 15: female rats fed with NGMP diet 16: female rats fed with GMP diet

جدول ۴- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تشخیص قطعات دی.ان.ای نو ترکیب در دستگاه گوارش و بافت‌های موش‌های صحرایی.

Table 4- Detection of recombinant DNA fragments in gastrointestinal and tissues rats by PCR

	T- M	T-F	N-M	N-F
spleen - طحال	-	-	-	-
brain - مغز	-	-	-	-
duodenum - دوازدهه	-	-	-	-
ileum - ایلئوم	-	-	-	-
jejunum - ژوژنوم	-	-	-	-
heart - قلب	-	-	-	-
content cecum - محتویات سکوم	<i>nptII</i>	-	-	-
stomach - معده	-	-	-	-
liver - کبد	-	-	-	-
content stomach - محتویات معده	-	<i>nptII-Nos</i>	-	-
content rectum - محتویات روده	-	<i>nptII-Nos</i>	-	-
ریه	-	-	-	-
blood - خون	-	-	-	-
kidney - کلیه	-	-	-	-

N: موش تغذیه شده با سیب‌زمینی معمولی، T: موش تغذیه شده با سیب‌زمینی تراریخته، M: نر، F: ماده.

N: rats fed with diet NGMP T: rats fed with diet GMP M: male F: female

خارجی هستند صورت گرفته است. بدلیل اینکه پوشش اپیتلیال دستگاه گوارش به طور مداوم در معرض دی.ان.ای خارجی است، این بحث یا سوال پیش می‌آید که تا چه حد این دی.ان.ای در دستگاه گوارش می‌تواند در سلول‌ها گنجانیده شده و یا طی عبور از دستگاه گوارش وارد گردش خون شود (Rahnama et al., 2011). یکی از دلایل تغییر در تشخیص دی.ان.ای پردازش غذا و تخریب دی.ان.ای است. یک گروه پژوهشی سرنوشت دی.ان.ای مصرف شده از منابع مختلف خوراک توسط جوندگان را بررسی کردند و نشان دادند که دی.ان.ای مشتق شده از خوراک به طور کامل در دستگاه روده موش تخریب نمی‌شود. آنها نشان دادند که ۱ تا ۲ درصد دی.ان.ای باکتریوفاژ که به صورت خوراکی مصرف شده بود در مجموعه دستگاه گوارش سالم مانده و در مدفوع تشخیص داده شد. اندازه قطعات دی.ان.ای تشخیصی در نمونه‌های مدفوع در بازه زمانی ۱ الی ۷ ساعت پس از خوردن

غذا از چند صد جفت باز تا حدود ۱۷۰۰ جفت باز (چندین استثناء) متغیر بود (Schubbert et al., 1994; 1997; 1998; Hohlweg and Doerfler, 2001; Palka et al., 2003) در پژوهش حاضر هیچ قطعه تراژن در نمونه‌های مدفوع گروه‌های آزمایشی تشخیص داده نشد. بنظر می‌رسد دی.ان.ای در طی عبور از سیستم هاضمه موش تخریب شده و قابلیت تشخیص آن کاهش می‌یابد و به انتخاب حد تشخیص قطعه هدف وابسته است. لازم به ذکر است چون مقدار دی.ان.ای نو ترکیب مصرف شده روزانه در مقایسه به میزان کل دی.ان.ای مصرفی بسیار کم است، شناسایی دی.ان.ای خارجی وارد شده به موجود از طریق مواد غذایی، بدلیل توزیع نابرابر دی.ان.ای به روش‌های بسیار حساس نیاز دارد. یکی از دلایل دیگر تغییر در میزان تشخیص دی.ان.ای در پژوهش حاضر نوع نمونه استفاده شده به عنوان خوراک و روش آزمایشی استفاده شده است. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که رژیم غذایی

با محتوای فیبر بالا، زمان انتقال مواد غذایی در دستگاه گوارش را کم کرده و دی.ان.ای خارجی به سرعت هضم می‌شود. افزایش میزان چربی یا سلولز در رژیم غذایی تغییری در هضم غذا نشان نمی‌دهد، اما پر بودن معده در تخریب دی.ان.ای اثر گذار بوده است. در حیواناتی که قبل از دریافت دی.ان.ای پلاسمید گرسنه نگه داشته شده بودند، دی.ان.ای با سرعت بیشتری در حال تخریب بود (Palka-Santini et al., 2003). در پژوهش‌های انجام شده توسط Schubbert و همکاران (۱۹۹۸) بخش کوچکی از دی.ان.ای خورده شده (کمتر از ۰/۱ درصد) را در جریان خون موش بین ۲ تا ۸ ساعت پس از خوردن غذا و یا در طحال و سلول‌های کبد تا ۲۴ ساعت بعد از تغذیه مشاهده شد. همچنین آنها توانستند پس از خوراندن باکتریوفاژ یا دی.ان.ای پلاسمید به موش باردار، دی.ان.ای خارجی را در جنین و نوزاد حیوانات تشخیص دهند. در یک پژوهش دیگر توسط Hoelweg and Doerfler در سال (۲۰۰۱) روزانه پس از تغذیه میزان مشخصی از دی.ان.ای پلاسمید در موش‌های باردار به مدت ۸ نسل هیچ علائمی از انتقال دی.ان.ای مصرف شده تشخیص داده نشد. همان گروه با انجام یک آزمایش دیگر و تغذیه موش با سویا، قطعه خاص دی.ان.ای گیاهی را در نمونه‌های کبد و طحال تشخیص دادند. همچنین پژوهش‌ها تفاوت در پایداری دی.ان.ای خورده شده بصورت دهانی و یا تزریق داخل وریدی و عضلانی را نشان می‌دهد. پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد زمانی که دی.ان.ای خارجی بصورت داخل وریدی یا عضلانی تزریق شود، قطعاتی از دی.ان.ای خارجی در بافت‌ها و اندام‌های مختلف مانند کبد، کلیه، طحال و عضلات تشخیص داده می‌شود (Nielsen et al., 2004; Tonheim et al., 2007). یافته‌های این پژوهش‌ها، نشان می‌دهد که سلول‌های اپیتلیال دستگاه گوارش به طور معمول در معرض قطعات دی.ان.ای بوده و ممکن است دی.ان.ای به سلول‌های M^1 در Peyer (یکی از گره‌های سلول‌های لنفاوی) متصل شده و از دیواره روده به داخل رگ‌های جریان خون انتقال و موجب ورود مولکول دی.ان.ای به سلول و بافت‌های مختلف میزبان شود. نتایج این پژوهش و بررسی‌های انجام شده بر روی دی.ان.ای در دستگاه گوارش نشان دهنده این است که بیشتر

دی.ان.ای خوراک مصرف شده به شکل پراکنده در آمده و قابلیت تشخیص آن کاهش یافته، و به انتخاب اندازه قطعه قابل تکثیر وابسته است. همچنین پایداری دی.ان.ای در سیستم هاضمه به مقدار ماده تراریخته مصرف شده، مقدار دی.ان.ای نوترکیب موجود در گیاه تراریخته، فرآوری و مراحل تهیه غذا (که مقدار دی.ان.ای و بنابراین دی.ان.ای نوترکیب را قبل از مصرف کاهش می‌دهد)، مقدار دی.ان.ای آزاد شده از گیاه که در دسترس فلور میکروبی داخلی قرار می‌گیرد و در نهایت به مقدار دی.ان.ای که در طی عبور از دستگاه هاضمه پایدار باقی می‌ماند بستگی دارد. به طور کلی، تشخیص دی.ان.ای خورده شده توسط تعدادی از عوامل، از جمله تعداد نسخه ژن، پردازش غذا، پایداری دی.ان.ای در دستگاه گوارش، میزان قطعه قطعه شدن دی.ان.ای، روش تخریب دی.ان.ای، نوع نمونه، حضور بازدارنده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و حد تشخیص قطعه هدف تحت تاثیر قرار می‌گیرد. تشخیص قطعه دی.ان.ای با تعداد مولکول‌های با تعداد نسخه بالا (به عنوان مثال دی.ان.ای کلروپلاست) در مقایسه با قطعه دی.ان.ای ژن با نسخه کم (به عنوان مثال دی.ان.ای نوترکیب) بیشتر است. این امر منجر به این فرض می‌شود که قطعه دی.ان.ای خارجی در برخی از حیوانات اگر مقدار یا تعداد نسخه اولیه در مواد به اندازه کافی بالا باشد (مانند دی.ان.ای کلروپلاست) قابل شناسایی است. پردازش غذا و تخریب دی.ان.ای در محل جذب نیز، بر میزان تشخیص قطعه دی.ان.ای خارجی اثرگذار است. چون مقدار دی.ان.ای نوترکیب مصرف شده روزانه در مقایسه به میزان کل دی.ان.ای مصرفی بسیار کم است، شناسایی دی.ان.ای خارجی وارد شده به موجود از طریق مواد غذایی، بدلیل توزیع نابرابر دی.ان.ای به روش‌های بسیار حساس نیاز دارد. همه دی.ان.ای، از جمله دی.ان.ای موجود در موجودات تراریخته، از همان چهار نوکلئوتید یکسان تشکیل شده است، به این معنی که استفاده از روش‌های نوترکیب در تولید غذا تغییرات عمده‌ای را در خصوصیات شیمیایی دی.ان.ای ایجاد نمی‌کند. نظر به اینکه، دی.ان.ای تراژن در ساختار متفاوت از دی.ان.ای معمول موجود در سلول‌های حیوان و یا گیاه نیست، تنها تفاوت در ترتیب توالی‌های رونویسی است، پس هیچ دلیلی برای شک کردن به اساس عملکرد دی.ان.ای تراژن با دی.ان.ای

گیاهی طبیعی برای مصرف وجود ندارد.

منابع

1. Chowdhury EH, Kuribara H, Hino A, Sultana P, Mikami O, Shimada N, Guruge KS, Saito M and Nakajima Y (2003) Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *Journal of Animal Science* 81:2546-2551.
2. De Vries J and Wackernagel W (1998) Detection of nptII kanamycin resistance genes in genomes of transgenic plants by marker rescue transformation. *Molecular and General Genetics*, 257, 606-613.
3. Duggan PS, Chambers PA, Heritage J and Forbes JM (2000) Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiology Letters*, 191, 71-77.
4. EFSA (2009) Statement of EFSA on the consolidated presentation of opinions on the use of
5. antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *The EFSA Journal*
6. 1108, 1034-1035.
7. Folmer JD, Grant RJ, Milton C T and Beck JF (2000) Effect of Bt corn silage on shortterm lactational performance and ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83 (5):1182 Abstract 272.
8. Ghasimi Hagh Z, Rahnama H, Panahandeh J, Baghban Kohnen Rouz B, Arab Jafari KM and Mahna N (2009) Green-tissue-specific, C(4)-PEPC-promoter-driven expression of Cry1Ab makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (*Phthorimaea operculella*, Zeller) *Plant Cell Rep.* 2010 Jan;29(1):111.
9. Hohlweg U and Doerfler W (2001) On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol. Genet. Genomics* 265, 225-233.
10. Kawabata K, Takakura Y, Hashida M (1995) The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 12:825-830.
11. Miki B and S McHugh (2004) Selection marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* 170: 193-232.
12. Nielsen K M, van Elsas J D and Smalla K (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp strain BD413 (pFG4 Delta nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of anamycin on selection of transformants. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 1237-1242.
13. Nielsen KM and Townsend JP (2004) Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nat Biotechnol.* 22: 1110-1104.
14. OECD (1998) OECD Guidelines for Testing of Chemicals No. 408, Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Paris, France.
15. Palka-Santini M, Schwarz-Herzke B, Hösel M, Renz D, Auerochs S, Brondke H and Doerfler W (2003) The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol Genet Genomics* 270: 210-215.
16. Rahnama H, Maly Amir R, Salehi Jozani G, (2011) Plant genetic engineering and Selectable markers. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran's Press. (In Farsi with English abstract)
17. Rahnama H (2004) biosafety selection markers food safety. The first national conference of – Karaj. (In Farsi with English abstract)
18. Schubbert R, Hohlweg U, Renz D and Doerfler W (1998) On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol. Gen. Genet* 259:569-576
19. Tonheim TC, Leirvik J, Lovoll M, Myhr AI, Bogwald J and Dalmo RA (2007) Detection of supercoiled plasmid DNA and luciferase expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) 535
20. days after injection. *Fish Shellfish Immunol* 23: 867-876.
21. Van den Eede G, Aarts H, Buhk H-J, Corthier G, Flint HJ, Hammes W, Jacobsen B, Midtvedt T, van der Vossen J, von Wright A, Wackernagel W and Wilcks A (2004) 'The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants'. *Food and Chemical Toxicol* 42: 1127-1156.
22. Vijay P, Steinek K, and meyer HHD (2008) Development of sensitive enzyme immunoassay Cry1Ab toxin in bovin cows (MON810). *Anal. Chim. Acta* 607: 106-113.
23. Ziemienowicz, A. 2001. Plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiol. Plant.* 23: 363-374.

هم‌ردیفی توالی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز اینولین در گیاهان

Alignment of the Enzymes in Inulin Biosynthesis Pathway in Plants

هادی شوریده^۱، سیدعلی پیغمبری^{۲*}، منصور امید^۳، محمدرضا نقوی^۳، اسعد معروفی^۴ و مرضیه حسینی‌نژاد^۵

Hadi Shoorideh¹, Seyed Ali Peyghambari^{2*}, Mansour Omid³, Mohammad Reza Nghavi³, Asad Maroufi⁴ and Marzieh Hosseini Nejad⁵

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲ و ۳- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۴ و ۵- به ترتیب استادیار دانشگاه کردستان و پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد

1, 2, 3- PhD student of Plant Breeding, Associate Professor and Professor of Agricultural and Natural Resources College of Tehran University

4- Associate Professor of Agricultural College of Kordestan University

5- Assistant Professor of Institute of Food Science and Technology of Mashhad.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aliipay@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک
فروکتان
توالی اسید آمینه
دومین
گروه‌بندی

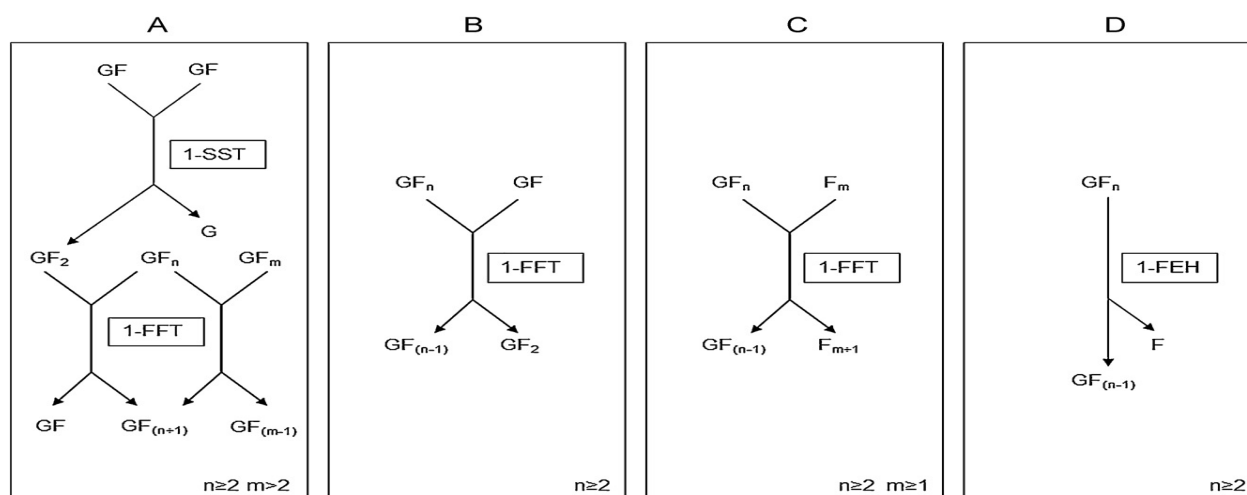
امروزه کاربرد اینولین و مشتقات آن به دلیل خصوصیات طبیعی و عملکردی آن در بسیاری از فرآورده‌های صنایع غذایی و دارویی رو به گسترش است. ترکیب پری‌بیوتیک اینولین فیزیولوژی روده بزرگ را بهبود بخشیده و فعالیت اکوسیستم میکروبی آن را افزایش می‌دهد. همچنین باعث افزایش جذب کلسیم و آهن شده و بعنوان یک ضدسرطان و ضددیابت هم مطرح است. کاسنی یکی از منابع اصلی استخراج اینولین است که سه ژن *1-SST*، *1-FFT* و *1-FEH* در بیوسنتز آن دخیل است. گروه‌بندی گیاهان با استفاده از توالی‌های اسیدآمینه این سه آنزیم بصورت توأم مشخص کرد که به کمک این توالی‌ها می‌توان شناسایی گیاهان را در دو گروه عمده تک لپه و دو لپه و با تفکیک در سطح گونه انجام داد. توالی اسیدآمینه این سه ژن شباهت زیادی با اینورتازها و بتا فروکتوزیدازهای میکروبی دارد که همه اینها متعلق به گروه بزرگ خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیل (GH32) هستند و این فرضیه را باعث می‌شود که ژن‌های فوق دارای منشا مشترکی از ژن اولیه بتا فروکتوزیداز میکروارگانیسم‌ها هستند. با انجام هم‌ردیفی‌های چندگانه و بررسی نواحی حفاظت شده این سه آنزیم دخیل در بیوسنتز اینولین در گیاهان، مشخص شد که این آنزیم‌ها با وجود تفاوت در طول شباهت زیادی به‌ویژه در ناحیه حفاظت شده بتا فروکتوزیداز دارند. از طرفی با توجه به هم‌ردیفی توالی‌های توافقی این سه آنزیم به نظر می‌رسد علت اصلی تفاوت در عملکرد آنها به جهش‌هایی در منطقه حفاظت شده بتا فروکتوزیداز مربوط است. در مجموع با شناسایی ژن‌های مسیر بیوسنتز اینولین از منابع گیاهی تولیدکننده فروکتان یا سایر منابع مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌توان اقدام به ایجاد گیاهان تراریخته تولیدکننده اینولین با کمیت و کیفیت مطلوب کرد.

مقدمه

امروزه نقش فروکتان‌ها به‌ویژه اینولین به لحاظ حفظ فلور میکروبی مفید سیستم گوارش و کنترل پاتوژن‌ها شناخته شده است و به همین خاطر کاربردهای وسیعی در صنایع غذایی و دارویی پیدا کرده‌اند (Roberfroid, 2005 & 2007). فروکتان‌های گیاهی بین ۱۰ تا ۲۰۰ واحد فروکتوسیل بسته به تنوع تاکسونومیکی گونه‌های گیاهی تولید کننده آنها دارند (van Arkel et al, 2013). فروکتان‌ها علاوه بر گیاهان دولپه‌ای متعلق به خانواده آستراسه (Asteraceae) در خانواده‌های گیاهی چون پوآسه (Poaceae) و لیلیاسه (Liliaceae) نیز وجود دارند، ولی منبع اصلی استخراج آنها همان خانواده آستراسه است. پنج گروه عمده از فروکتان‌ها در طبیعت وجود دارند که شامل اینولین، لوان، گرامینان، اینولین نئوسری و لوان نئو سری هستند (Ritsema and Smeeckens, 2003). پیوند بین دو فروکتوز در لوان از نوع پیوند فروکتوزیل (6→2)β است، ولی در اینولین که بیشتر در گیاهان خانواده آستراسه یافت می‌شود، پیوند فروکتوزیل (1→2)β بوده و گرامینان که بیشتر در خانواده پوآسه موجود است هر دو نوع پیوند را داراست. لوان نئوسری و اینولین نئوسری که بیشتر در پوآسه و لیلیاسه موجودند، دارای ۲ زنجیره لوان یا اینولین هستند که به کربن‌های ۱ و ۶ گلوکز مربوط به ساکاروز اولیه متصل هستند (Narai-kanayama et al, 2007). اینولین به‌عنوان پلی‌ساکارید ذخیره‌ای در ریشه و غده گیاهانی چون کاسنی (*Cichorium intybus*)، سیب زمینی ترشی (*Helianthus tuberosus*) و قاصدک (*Taraxacum officinale*) ذخیره می‌شود (Cairns, 2003) و نقش محافظت از گیاه در مقابل کمبود آب و تحمل به سرما را به عهده دارد (Pilon-Smits et al, 1995). یکی از گیاهان اصلی منبع اینولین کاسنی است که تجمع اینولین را در ریشه انجام می‌دهد ولی در انتهای فصل رشد به دلیل وقوع سرما کیفیت اینولین (درجه پلیمریزاسیون اینولین: تعداد واحدهای فروکتوز متصل به زنجیره) افت کرده و به زیر ۲۵ می‌رسد که علت اصلی آن فعالیت زیاد آنزیم‌های 1-FFT و 1-FEH است (شکل ۱؛ واکنش‌های B و D). مهندسان ژنتیک تلاش‌های زیادی برای حل این معضل هم از طریق خاموشی ژن FEH و هم معرفی ژن‌های 1-SST و 1-FFT به گیاهان غیرتولید کننده فروکتان

داشته‌اند (van Arkel et al, 2013).

سنتز اینولین نیازمند دو آنزیم متفاوت است که در ابتدا یک تری‌ساکارید ۱-کتوز و یک گلوکز آزاد از دو ملکول ساکاروز توسط آنزیم ساکاروز: ساکاروز ۱-فروکتوترانسفراز (1-SST, EC 2.4.1.99) بوجود می‌آید. سپس آنزیم فروکتان: فروکتان ۱-فروکتوسیل ترانسفراز (1-FFT, EC 2.4.1.100) در یک واکنش برگشت‌پذیر طویل شدن زنجیره را بوسیله انتقال واحدهای فروکتوسیل (رادیکال فروکتوز) به ۱-کتوز (یا یک اینولین بزرگتر) از یک ملکول اینولین دیگر فراهم می‌آورد. فروکتان نوع اینولین خود به دو دسته تقسیم می‌شود نوع اینولین منظم یا GFn که دارای گلوکز انتهایی به همراه n فروکتوز است و نوع اینولونوز یا Fn که فاقد گلوکز انتهایی است. مشخص شده است که اینولونوز در کاسنی یک محصول حاصل از تخریب نیست بلکه این ملکول با بکارگیری فروکتوزهای آزاد توسط 1-FFT یا بکارگیری فروکتان‌های نوع Fn به‌عنوان سوبسترای پذیرنده، ایجاد می‌شود. بدین معنی که 1-FFT می‌تواند یا فروکتوز آزاد و یا فروکتان نوع Fn را در کنار فروکتان‌های نوع GFn قرار دهد (شکل ۱؛ Van den Ende et al, 1996). تنوع در ساختار فروکتان و درجه پلیمریزاسیون در گونه‌های مختلف گیاهی دیده می‌شود که بیشتر به خواص متفاوت این فروکتوسیل ترانسفرازها نسبت داده می‌شود (Hellwege, 2000). تخریب فروکتان توسط هیدرولیزکننده‌های فروکتان (FH) یا فروکتانازها کاتالیز می‌شود. دو آنزیم 1-FH (اینولیناز) و 6-FH (لواناز) می‌توانند توسط نوع پیوندی که مورد تجزیه قرار می‌دهند، شناسایی شوند. هیدرولیز کننده‌ها در گیاهان فقط هیدرولیز نوع بیرونی فروکتان (FEH) را انجام می‌دهند که واحدهای فروکتوز را از انتهای زنجیره آزاد می‌کنند در حالی که در باکتری‌ها و قارچ‌ها هم هیدرولیز درونی (endo) و هم بیرونی (exo) انجام می‌شود. سه نوع از هیدرولیز کننده‌های بیرونی فروکتان در کاسنی شناسایی شده است (Van den Ende et al, 2001) (EC 3.2.1.80: IIB و IIA, 1-FEH). شباهت زیادی در سطوح ملکولی و بیوشیمیایی بین آنزیم‌های بیوسنتز کننده فروکتان، آنزیم‌های تخریب کننده فروکتان و اینورتازها (آنزیمی که هیدرولیز ساکاروز را کاتالیز کرده و پیوند c-o فروکتوز را برش می‌دهد که نمونه بارز آن در



شکل ۱- واکنش‌های بیوسنتز فروکتان در کاسنی. A: پلیمریزاسیون فروکتان با 1-SST و 1-FFT، B: انتقال معکوس توسط 1-FFT، C: تولید اینولونوز توسط 1-FFT و D: هیدرولیز فروکتان توسط 1-FEH (GF = ساکاروز، F = فروکتوز، G: گلوکز، GF₂: ۱-کتوز، GF_n/m: اینولین و F_m: اینولونوز) (Van Arkela et al, 2012).

Fig. 1. The reactions of fructan biosynthesis in chicory. Fructan polymerization by 1-SST and 1-FFT (A), back transfer by 1-FFT (B), inulo-n-ose production by 1-FFT (C), fructan exohydrolysis by 1-FEH (D) (GF = sucrose, F = fructose, G = glucose, GF₂ = 1-kestose, GF_n/m = inulin, F_m = inulo-n-ose) (Van Arkela et al., 2012).

ماده با ارزش، بررسی روابط تکاملی بین گونه‌های گیاهی تولید کننده اینولین جهت دست‌ورزی‌های ژنتیک انجام شده است. بنابراین، در این پژوهش به کمک نرم‌افزارها و روش‌های بیوانفورماتیک، رابطه تکاملی به منظور بررسی میزان شباهت‌ها، شناسایی نواحی حفاظت شده، دومین‌ها و خانواده پروتئینی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز اینولین با توجه به اهمیت روز افزون این ترکیب در صنایع غذایی و دارویی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

توالی ژن‌های دخیل در بیوسنتز اینولین (1-SST، 1-FFT و 1-FEH) از بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Sayers et al, 2011) برای گونه‌های موجود جمع‌آوری شد. همچنین توالی اسیدآمینه آنزیم‌های فوق‌الذکر از سایت مخزن پروتئین جهانی (UniProt) (Bairoch et al, 2005) برای گونه‌های قابل دسترس گیاهی جمع‌آوری شد. با استفاده از نسخه ۵ نرم‌افزار مگا (Tamura et al, 2011) هم‌ردیفی چندگانه برای توالی‌های اسیدآمینه به روش کلاستال دابلو (ClustalW) انجام شد و ترسیم درخت فیلوژنی

زنبور عسل باعث می‌شود تا از نکتار عسل بدست آید) وجود دارد. اینورتازها (بتا فروکتوزیدازها) سطح ساکاروز و FEH سطح فروکتان را متعادل نگه می‌دارند که هر دو دارای منشاء مشابه (به احتمال زیاد بتا فروکتوزیدازها میکروبی) هستند (Verhaest et al, 2005).

آنزیم FFT واحد فروکتوسیل را از یک فروکتان دهنده به انتهای یک گیرنده منتقل کرده که منجر به طویل شدن پذیرنده‌ها و تخریب دهنده‌ها می‌شود. ویژگی‌های FFT تعیین کننده نوع پیوند گلیکوزیدی و الگوی ساختاری فروکتان است. FEH در گیاهان منجر به تخریب فروکتان‌ها و آزادسازی فروکتوز آزاد از انتهای زنجیره می‌شود. بنابراین تعادل بین 1-FFT و 1-FEH بر تغییرات طول فروکتان یا درجه پلیمریزاسیون (DP) آنها اثرگذار است (Narai-kanayama et al, 2007).

با استفاده از توالی اسید نوکلئیک کد کننده آنزیم‌های دارای نقش یکسان و یا توالی اسیدآمینه آنها در موجودات مختلف، می‌توان روابط تکاملی بین آنها را ترسیم کرد و موجودات نزدیک به هم را از لحاظ تکاملی شناسایی کرد. بنابراین با توجه به تنوع موجود برای آنزیم‌های ذکر شده در مسیر بیوسنتز اینولین به عنوان یک

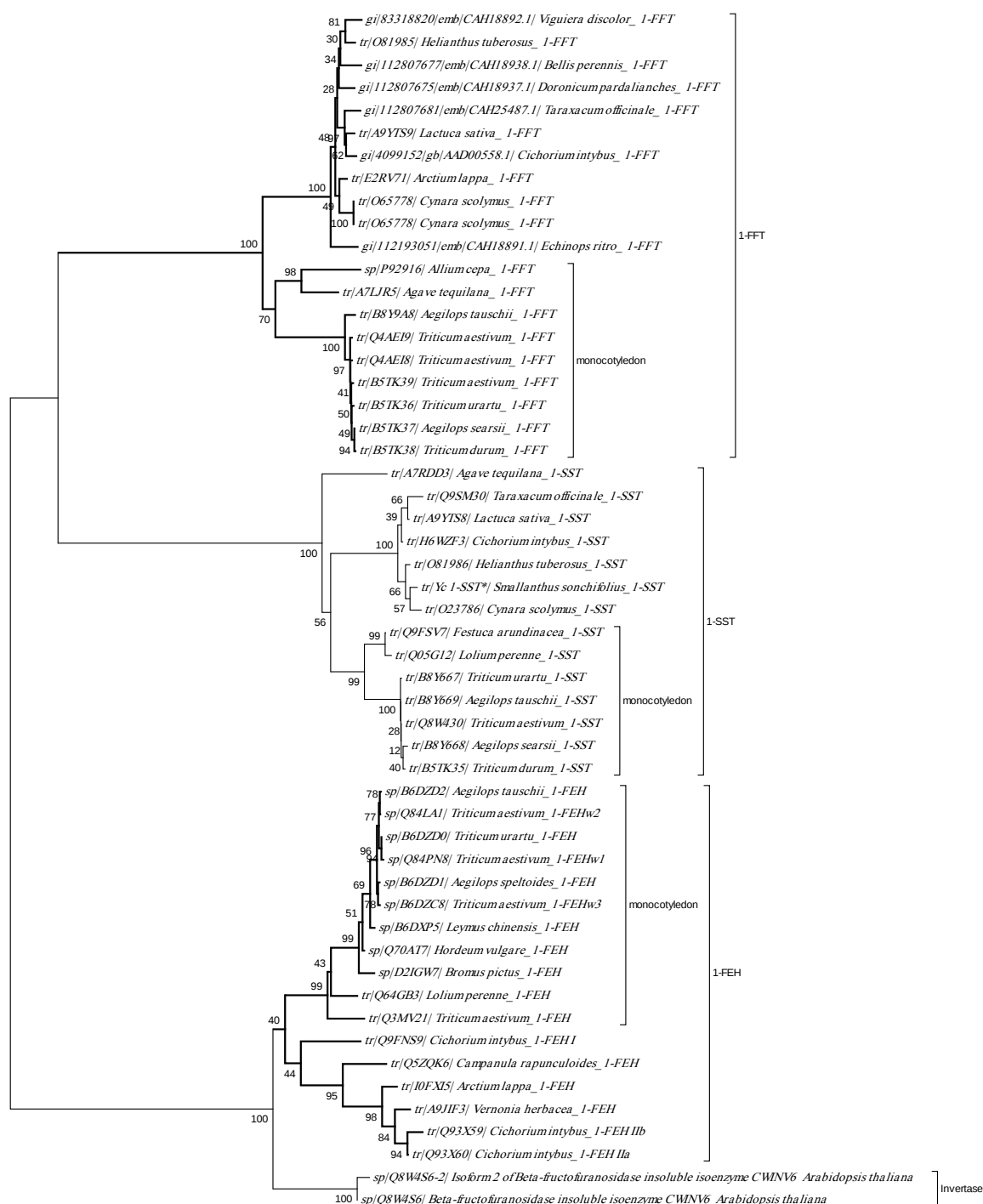
هم‌ردیفی به روش کلاستال دابلو با نرم‌افزار مگا درخت فیلوژنی آنها تهیه شد (شکل ۲). در این شکل مشاهده می‌شود تک‌لپه‌ای‌ها شامل خانواده‌های پوآسه و لیلیاسه و دولپه‌ای‌ها شامل خانواده آستراسه در دو گروه اصلی قرار گرفته‌اند که این موضوع در خصوص توالی اسیدآمینه هر سه آنزیم *1-SST*، *1-FFT* و *1-FEH* صدق می‌کند (شکل ۲). دو آنزیم *1-SST* و *1-FFT* در کاسنی (*C. intybus*) که منبع اصلی استخراج اینولین است، بیشترین شباهت را با آنزیم‌های *1-SST* و *1-FFT* در کاهو (*L. sativa*) نشان می‌دهند (شکل ۲). در بین سه نوع آنزیم *1-FEH* در کاسنی، دو آنزیم *1-FEH IIa* و *1-FEH IIb* شباهت بیشتری به یکدیگر نسبت به *1-FEH I* دارند. قابل ذکر است که توالی اسید آمینه *1-FEH* کاهو در حال حاضر موجود نیست تا با سه نوع *1-FEH* کاسنی مورد مقایسه قرار گیرد. با توجه به اینکه از توالی‌های اسیدآمینه برای ترسیم درخت فیلوژنی استفاده شده است بنابراین این شجره‌های فیلوژنی از اعتبار بیشتری نسبت به سایر روابط فیلوژنی ماحصل از توالی‌های اسیدنوکلئیک کد کننده و غیر کدکننده برخوردارند (Calonje et al, 2008). بنابراین با استفاده از این توالی‌ها می‌توان گروه‌بندی را در سطح گونه انجام داد چرا که به‌خوبی بین گونه‌های مختلف جنس تریبتیکوم تفکیک قائل شده است (شکل ۲). با استفاده از نمودار درختی (شکل ۲) مشاهده می‌شود دو آنزیم *1-SST* و *1-FFT* نسبت به یکدیگر شباهت بیشتری نسبت به *1-FEH* به‌ویژه در ناحیه بتافروکتوزیداز (شکل ۴) دارند. این موضوع با توجه به اینکه هر دو آنزیم می‌توانند بر روی ساکاروز واکنش انجام دهند، تایید می‌شود (شکل ۱). از طرف دیگر دو آنزیم *1-FFT* و *1-FEH* فعالیت مشترک برداشتن فروکتوسیل از انتهای زنجیره دارند با این تفاوت که *1-FFT* این عمل را می‌تواند بر روی ساکاروز نیز انجام داده و فروکتوسیل مربوطه را به انتهای زنجیره فروکتان و یا ساکاروز دیگر افزوده ولی *1-FEH* فقط بر روی فروکتان عمل کرده و منجر به آزاد شدن فروکتوز می‌شود. بنابراین می‌توان شباهت‌های موجود در توالی توافقی دو آنزیم *1-FFT* و *1-FEH* را به فعالیت مشترک آنها منتسب کرد و تفاوت‌های بین آنها را که با توالی توافقی *1-SST* مشترک است را به فعالیت خاص افزودن فروکتوز به انتهای ساکاروز منتسب کرد (شکل ۴). همچنین *1-FEH*

مربوط به این توالی‌ها به روش نیبرجویینگ^۱ با مدل پویسون و بوت سترپ^۲ ۱۰۰۰ جهت اطمینان از صحت گروه‌بندی صورت گرفت. همچنین از توالی اینورتازها به‌عنوان گروه بیرونی جهت ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنی استفاده شد. جهت بررسی نواحی دومین این آنزیم‌ها از دو سایت بانک اطلاعاتی نواحی حفاظت شده^۳ (CDD) (Marchler-Bauer et al, 2009) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) و سایت بانک اطلاعات آنزیم‌های فعال کربوهیدرات‌ها^۴ dbCAN (Yin et al, 2012) (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN>) استفاده شد. سایت اخیر مخصوص آنزیم‌های فعال بر روی کربوهیدرات‌ها است و از دو منبع بانک اطلاعاتی CAZy و CAT مخصوص کربوهیدرات‌ها بهره می‌گیرد که این دو از اطلاعات CDD استفاده می‌کنند. بنابراین با توجه به اطلاعات موازی سایر سایت‌ها با سایت‌های استفاده شده، نتایج آنها در اینجا آورده نشده است. برای بدست آوردن توالی توافقی این سه آنزیم و هم‌ردیف کردن آنها برای مشخص کردن مناطق حفاظت شده از نرم‌افزار DNASTar استفاده شد.

نتایج و بحث

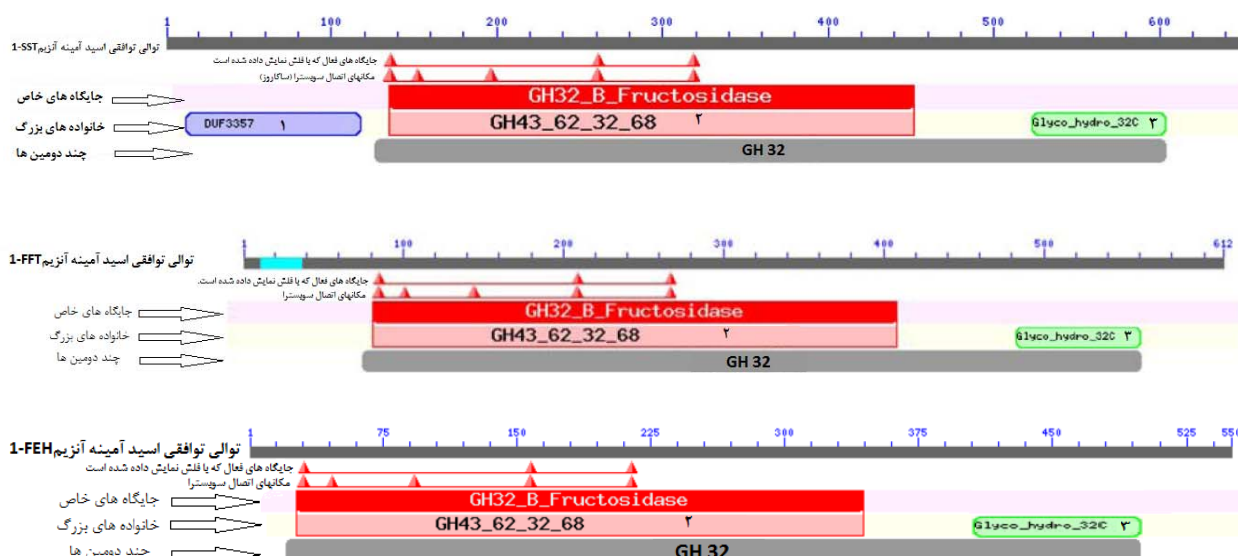
قسمت اعظم اطلاعات توالی اسید نوکلئویک آنزیم‌های مورد بررسی در بانک‌های اطلاعاتی برای گونه‌های گیاهی به‌صورت ناقص و یا فقط شامل توالی mRNA بود، بنابراین تجزیه و تحلیل آنها با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک صورت نگرفت. در نتیجه برای بررسی روابط خویشاوندی از توالی‌های اسیدآمینه استفاده شد. توالی‌های اسیدآمینه آنزیم *1-SST* بیشتر از نوع TrEMBL بودند. بدین معنی که ترجمه mRNA کد کننده این آنزیم هستند. در خصوص *1-FFT* یک مورد از توالی‌های اسیدآمینه به‌طور مستقیم از روی توالی پروتئین آنزیم بدست آمده بود و در مورد *1-FEH* بیشتر توالی‌های گروه‌های تک‌لپه‌ای به‌طور مستقیم از روی توالی پروتئین آنزیم بدست آمده بودند (شکل ۲). پس از انجام

- 1- Neighbor-joining
- 2- Bootstrap
- 3- Conserved Domains Database
- 4- Data Base for automated Carbohydrate-active enzyme Annotation



شکل ۲- درخت فیلوژنی آنزیم های 1-SST، 1-FFT و 1-FEH در بین گونه‌های مختلف گیاهی به روش نیبرجویینگ (شماره دستیابی در سایت یونی پرات به همراه اسم گونه ذکر شده است. tr: توالی اسیدآمینه در سایت EMBL از طریق ترجمه توالی mRNA بدست آمده است و sp: توالی اسیدآمینه به‌طور مستقیم از روی توالی پروتئینی آنزیم بدست آمده است. *: توالی اسیدآمینه از منبع پن و همکاران (Pan et al, 2009) اخذ شده است. gi: کد دستیابی ژن در NCBI، emb: کد دستیابی توالی اسیدآمینه در سایت EMBL و gb: کد دستیابی توالی اسیدآمینه در NCBI)

Figure 2- Phylogenetic tree of 1-SST enzyme for different plant species using neighbor-joining method (Entry at the Uniprot site noted along with species name. tr: Amino acid sequence at EMBL site obtained through translation of mRNA and sp: Amino acid sequence obtained directly from enzyme *: Amino acid sequence for this species was gotten from Pan et al., 2009., gi: Entry of gene at NCBI, emb: Entry of Amino acid sequence at EMBL site and gb: Entry of Amino acid sequence at NCBI).



شکل ۳- توالی اسید آمینه سه آنزیم 1-SST، 1-FFT و 1-FEH به همراه نمایش زیرگروه‌های خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیدی (GH32) حاوی موتیف‌های اسیدآمینه‌ای محافظت شده (جایگاه‌های خاص) که منجر به ساختار سه بعدی مشابه در آنها می‌شود (منبع: بانک اطلاعاتی نواحی حفاظت شده: CDD).

Figure 3- Amino acid sequences of three enzymes (1-SST, 1-FFT and 1-FEH) along with demonstration of Glycosyl hydrolase family (GH32) subgroups and conserved amino acid motifs (specific sites) which led to common structure of these enzymes. (Source: Conserved Domain Database).

آمینی توالی اسیدآمینه قرار دارد و به‌طور کلی طول آن بین ۹۶ تا ۱۱۹ اسید آمینه است. این دومین به خانواده پروتئینی ۱۱۸۳۷ تعلق داشته و در یوکاریوت‌ها مشاهده می‌شود، که عمل آن هنوز ناشناخته است. جدا از تفاوت در طول زنجیره این سه آنزیم تفاوت دیگر مربوط به موقعیت محافظت شده اصلی این سه آنزیم یعنی GH32 است که در آنزیم 1-SST از اسیدآمینه ۱۲۰ شروع شده و تا اسیدآمینه ۶۰۰ ادامه دارد ولی در 1-FFT از اسیدآمینه ۷۵ شروع شده و تا اسیدآمینه ۵۶۰ ادامه دارد و در نهایت در آنزیم 1-FEH از اسیدآمینه ۱۷ شروع شده و تا اسیدآمینه ۴۹۵ ادامه دارد (شکل ۳). همانگونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود ناحیه GH32 در دو آنزیم 1-SST و 1-FFT در موقعیت مشابه‌ای نسبت به 1-FEH قرار دارد و طول این ناحیه در هر سه آنزیم مشابه و حدود ۴۸۰ اسیدآمینه است که شامل دو زیر خانواده بزرگ ۲ و ۳ که به ترتیب ناحیه حفاظت شده بتا فروکتوزیدازها و انتهای کربوکسیل خانواده ۳۲ هیدرولیز کننده گلیکوزیدی است. بنابراین این موضوع بیانگر تشابه بیشتر در آنزیم 1-SST و 1-FFT نسبت به یکدیگر در مقایسه با 1-FEH است که با بررسی رابطه

بیشترین شباهت را با اینورتازها دارد (شکل ۲) که این موضوع با توجه کارکرد مشابه آنها یعنی واکنش د-گلیکوزیلاسون^۵ قابل انتظار است (Lammens et al, 2009).

جهت تعیین نواحی حفاظت شده این آنزیم‌ها در ابتدا از بانک اطلاعاتی آنزیمی کربوهیدرات‌ها (dbCAN) استفاده شد که البته فقط ناحیه مربوط به خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیدی (GH32) را در این آنزیم‌ها شناسایی کرد. با توجه به اینکه منبع اطلاعات این سایت به‌طور غیرمستقیم از NCBI است، به‌طور مستقیم از بانک اطلاعاتی دومین‌های حفاظت شده سایت NCBI (CDD) جهت شناسایی نواحی حفاظت شده و دومین‌های احتمالی این آنزیم‌ها استفاده شد. با بررسی در بانک اطلاعاتی نواحی دومین حفاظت شده دوباره این سه آنزیم همانند سایت بانک اطلاعاتی آنزیمی کربوهیدرات‌ها (dbCAN) به خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیدی منتسب شدند (شکل ۳)، با این تفاوت که برای آنزیم 1-SST ناحیه حفاظت شده شماره ۱ متعلق به خانواده بزرگ DUF3357 شناسایی شد که در موقعیت انتهای

5- Deglycosylation



شکل ۴- هم‌ردیفی سه توالی توافقی برای آنزیم‌های 1-SST، 1-FEH و 1-FFT (پیکان سر بالا بیانگر نواحی متفاوت مستعد ساختن آنزیم برای اثر بر روی ساکاروز است در ناحیه بنافروکتوزیدازی نمایش داده شده با کادر سیاه است و پیکان سر پایین بیانگر نواحی متفاوت مستعد ساختن آنزیم برای اثر بر روی اینولین است).

Figure 4- Alignment of consensus amino acid sequence of 1-SST, 1-FFT and 1-FEH enzymes. (Up arrow shows potential regions which able enzyme to affect on sucrose in the beta fructosidase domain which shown by black cadre and Down arrow shows potential regions which able enzyme to affect on inulin)

کلاستال دابلو و حصول توالی توافقی برای هر یک از آنزیم‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNASTar می‌توان هم‌ردیف کردن سه توالی توافقی آنزیم‌های *1-SST*، *1-FFT* و *1-FEH* و یافتن نقاط متفاوت در ناحیه بتا فروکتوزیداز (کادر سیاه شکل ۴) که نقش احتمالی در تفاوت عملکرد آنزیم‌ها دارند، انجام داد (نقاط نمایش داده شده با پیکان سربالا [↑] کاندید برای توانا ساختن آنزیم جهت اثر بر ساکاروز و نقاط نمایش داده شده با پیکان سر پایین [↓] کاندید برای توانا ساختن آنزیم جهت اثر بر اینولین). بر این اساس به نظر می‌رسد ناحیه حذف شده در ابتدای ناحیه بتا فروکتوزیدازی (شکل ۴) بیشترین اثر را در تغییر قابلیت این سه آنزیم داشته است به گونه‌ای که وقوع حذف بزرگ تقریباً ۳۰ اسید آمینه‌ای در *1-FEH* به ویژه ناحیه متمایز از *1-FFT* (۲۰ اسید آمینه ابتدای ناحیه حذف شده) منجر به عدم توانایی اثر این آنزیم بر روی ساکاروز شده است.

در مجموع به نظر می‌رسد که با استفاده از توالی آنزیم‌های کارکردی، می‌توان روابط فیلوژنی بین گونه‌های موجود گیاهی و حتی موجودات پست میکروبی را تعیین کرد. در ضمن با استفاده از اینگونه پژوهش‌ها می‌توان به توالی‌های دلخواه اینولیناز برای دستیابی به انواع مشتقات مطلوب حاصل از اینولین همچون دی فروکتوز انیدریدها (DFAs) که امروزه به دلیل خاصیت پری بیوتیکی و شیرین کنندگی خاص کاربردهای وسیعی در صنایع دارویی و غذایی پیدا کرده‌اند، دست یافت. هم‌چنین با شناسایی ژن‌های مسیر بیوسنتز اینولین از منابع گیاهی تولید کننده فروکتان یا سایر منابع مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌توان اقدام به تولید گیاهان تراریخته تولید کننده اینولین با کمیت و کیفیت مطلوب کرد. گیاه مطلوب برای این منظور چغندر قند است چرا که ماده اولیه ساکاروز را به وفور در خود داراست و می‌توان با افزودن دو ژن مناسب *1-SST* و *1-FFT* به ژنوم آن گیاه تراریخته مطلوب را مهندسی کرد.

فیلوژنیک این سه آنزیم (شکل ۲) و همچنین نقاط مشترک توالی توافقی آنها در شکل ۴ قابل تایید است. ناحیه بتا فروکتوزیداز در *1-SST* روی ساکاروز عمل کرده و ضمن شکستن پیوند بین گلوکز و فروکتوز منجر به تشکیل تری ساکارید ۱-کتوز هم می‌شود. این ناحیه در *1-FFT* منجر به آزاد سازی یک گروه فروکتوسیل از یک ملکول اینولین و اتصال آن به ملکول اینولین دیگر و یا ساکاروز می‌شود ولی در *1-FEH* فقط منجر به آزاد سازی یک فروکتوز آزاد از انتهای زنجیره می‌شود. اینورتازها هم واکنش مشابهی را بر روی ساکاروز انجام می‌دهند و باعث آزاد شدن فروکتوز ملکول ساکاروز می‌شوند، بنابراین تشابه اینورتازها با *1-FEH* به جهت انجام واکنش مشابه آنها یعنی واکنش د-گلیکوزیلاسیون تایید می‌شود. ناحیه انتهای کربوکسیل GH32 ساختارهای ساندویچ بتا را به وجود می‌آورد که جایگاهی برای اتصال کربوهیدرات‌ها فراهم می‌آورد. به نظر می‌رسد که جدا از سایر تفاوت‌های بحث شده تفاوت در توالی اسید آمینه ناحیه حفاظت شده بتا فروکتوزیداز عامل اصلی تفاوت عملکرد این سه آنزیم باشد. این عقیده وجود دارد که تمامی آنزیم‌های متابولیسم فروکتان از اینورتازها با تعداد کمی تغییرات جهشی به وجود آمده‌اند (Vijn and Smeekens, 1999). بیشتر این آنزیم‌ها مقدار کمی فعالیت اینورتازی یعنی تجزیه ساکاروز به گلوکز و فروکتوز را در غلظت‌های کم ساکاروز از خود نشان می‌دهند بجز FEH که به نظر می‌رسد که این توانایی اثر بر روی ساکاروز را به طور کامل از دست داده است. به نظر می‌رسد یک ژن بتا فروکتوزیداز قدیمی که هم اکنون در میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود به داخل ژنوم گیاهان نفوذ کرده و یک شاخه از آن به اینورتازها و شاخه دیگر به FEH و سایر آنزیم‌های دخیل در متابولیسم فروکتان تبدیل شده است (Verhaest et al, 2005). به همین جهت همه این آنزیم‌ها یک توالی اسید آمینه‌ای خیلی مشابه دارند که به خانواده ۳۲ هیدرولیزکننده‌های گلیکوزیل تعلق دارد. پس از هم‌ردیف کردن توالی‌های هر یک از آنزیم‌ها به روش

منابع

1. Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi N. and Yeh. L. L. 2005. The universal protein resource (UniProt). Nucleic Acids

Research, 33: Database issue D154–D159.

2. Cairns, A. J. 2003. Fructan biosynthesis in transgenic plants. Journal of Experimental Botany, 54: 549–567.

3. Calonje, M., Martín-Bravo, S., Dobeš, Ch., Gong,

- W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, Ch., Kiefer, M., Paule, J., Schmickl, R. and Koch, M. A. 2008. Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Systematics and Evolution* 282(3-4): 257-280.
4. Hellwege, E.M., Czaplá, S., Jahnke, A., Willmitzer, L. and Heyer, A.G. 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proceeding of National Academic Science of USA*, 97: 8699-8704.
5. Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K. DeWeese-Scott, C. Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang N., and Bryant S. H. 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*, 37: Database issue D205-D210.
6. Narai-kanayama, A., Tokita, N. and Aso, K. 2007. Dependence of fructooligosaccharide content on activity of fructooligosaccharide-metabolizing enzymes in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuberous roots during storage. *Journal of Food Science*, 72: 381-387.
7. Pan, W., Sunayama, Y., Nagata, Y., Taniguchi, M., Takano, M., Inoue, E., Tamagake, H. and Anzai, H. 2009. Cloning of a cDNA encoding the sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from Yacon and its expression in transgenic rice. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 23: 1479-1484
8. Pilon-Smiths, E. A. H., Ebskamp, M. J. M., Paul, M. J., Jeuken, M. J. W., Weisbeek, P. J. & Smeekens, S. C. M. 1995. Evaluation of safety on inulin and oligofructose as dietary fiber. *Plant Physiology*, 107: 125-130.
9. Ritsema T, Smeekens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 223-30.
10. Roberfroid M.B. 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *Journal of Nutrition*, 137: 2493S-2502S.
11. Roberfroid, M. B. 2005. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93: 13-25.
12. Sayers E. W., Barrett, T., Benson, D.A., Bolton, E., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Federhen, S., Feolo, M., Fingerman, I.M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D. J. Lu, Z., Madden, T. L., Madej, T., Maglott, D. R., Marchler-Bauer, A., Miller, V., Mizrahi, L., Ostell, J., Panchenko, A., Phan, L., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., Sequeira, E., Sherry, S. T., Shumway, M., Sirotkin, K., Slotta, D., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T. A., Wagner, L., Wang, Y., Wilbur, W. J., Yaschenko E. and Ye J. 2011.. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 39: Database issue, D38-D51.
13. Shigematsu, N., Okuhara, Y., Shiomi, T., Tomita, F., and Hara, H. 2004. Effect of difructose anhydride III on calcium absorption in humans. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 68: 1011-1016.
14. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*, 28: 2731-2739.
15. Van Arkela, J., Séveniera, R., Hakkerta, J. C., Bouwmeester, H. J., Koopsa, A. J., and Van der Meera, I. M. 2013. Tailor-made fructan synthesis in plants: A review. *Carbohydrate Polymers*, 93: 48-56.
16. Van Arkela, J., Vergauwen, R., Séveniera, R., Hakkerta, J. C., Van Laereb, A., Bouwmeester, H. J., Koopsa, A. J., and Van der Meera, I. M. 2012. Sink filling, inulin metabolizing enzymes and carbohydrate status in field grown chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology*, 169: 1520-1529.
17. Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., and Van Laere, A. 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal*, 2: 1281-1295.
18. Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wouterghem, D., Clerens, S.P., De Roover, J. and Van Laere, A.J. 2001. Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa and fructan 1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology*, 126: 1186-1195.
19. Van den Ende, W., Mintiens, A., Speleers, H., Onuoha, A., and Van Laere, A. 1996. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* L. during growth, storage and forcing. *New Phytologist*, 132: 555-563.
20. Verhaest, M., Van den Ende, W., Roy, K.L., De Ranter, C. J., Van Laere, A., and Anja, R. 2005. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *The Plant Journal*, 41: 400-411.
21. Vijn, I. and Smeekens, S. (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*. 120: 351-360.
22. Willem Lammens, Katrien Le Roy, Lindsey Schroeven, André Van Laere, Anja Rabijns, and Wim Van den Ende. 2009. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications *J. Exp. Bot.* 60: 727-740.
23. Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., and Xu, Y. 2012. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 40: Web Server Issue: W445-W451.

جداسازی بخشی از cDNA ژن ترانسفرین (*Ttf*) از رقم بزم گندم زراعی تحت تیمار تنش شوری

Isolation of partial cDNA of transferring gene (*Ttf*) from Bam wheat cultivar under salinity stress treatment

نادر رحیمی اسفنجانی^۱ و علیرضا تارنی نژاد^{۲*}

Nader Rahimi Esfajani¹ and Alireza Tarinejad^{2*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

1- MSc. Student of Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan
Shahid Madani University.

2- Assistant Professor of Biotechnology Department, Faculty of Agriculture,
Azarbaijan Shahid Madani University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: atarinejad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

جداسازی ژن
ژن ترانسفرین (*Ttf*)
رقم بزم گندم زراعی
تنش شوری

در میان تنش‌های غیرزنده، تنش شوری شدیدترین تنش محیطی است که پاسخ به آن، بیان ژن‌های گوناگونی را در گیاه القا می‌کند که محصولات آن‌ها به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در حفاظت از گیاهان در مقابل تنش نقش دارند. خاک‌ها به‌طور معمول دارای ۵-۱ درصد آهن کل هستند که به‌راحتی برای گیاهان قابل استفاده نیست. ترانسفرین‌ها پروتئین‌های عمومی حامل آهن در سلول‌های جانوری هستند و در پیوند شدن، متحرک کردن و تحویل دادن یون‌های فریک نقش دارند. در این پژوهش سعی شد وجود ژن ترانسفرین (که تاکنون وجود آن در گیاهان عالی گزارش نشده است) در گندم زراعی بررسی و در صورت وجود، جداسازی، کلون و سپس تعیین توالی شود. برای این منظور، بذور رقم بزم گندم زراعی در گلدان‌ها کشت و با آب نمک با ECهای ۱۰ و ۱۵ (ds/m) به ترتیب به مدت ۵ و ۱۰ روز تحت تنش شوری قرار گرفتند و در مراحل مختلف رشد بوته‌ها، از برگ‌های جوان آن‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. آر.ان.ای کل با استفاده از تریزول استخراج و سپس ساخت cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV انجام شد. از روی cDNA ساخته شده توالی ژن هدف با واکنش پی.سی.آر تکثیر شد و در نهایت، واکنش لیگاسیون بین دی.ان.ای الحاقی (بخشی از ژن ترانسفرین) و وکتور pGEM-TEasy انجام و کلنی‌های ترانسفورم شده از طریق سیستم گزینش بلو-وایت شناسایی شدند. بعد از همسانه سازی ژن *Ttf* جداسازی شده و تعیین توالی، توالی بدست آمده شباهت ۸۴ درصدی با توالی ثبت شده موجود در NCBI نشان داد. نتایج این پژوهش وجود ژن ترانسفرین در گیاهان عالی و نیز نقش آن در مقاومت به تنش شوری در آن‌ها را به اثبات رساند و این اولین گزارش از حضور ژن ترانسفرین در گیاهان عالی بعد از جلبک‌ها است.

مقدمه

(Lamberta et al., 2005).

انتقال آهن از غشا سلولی توسط ترانسفرین، از طریق یک مکانیسم فاگوسیتوتیک (اندوسیتوتیک) و با وساطت یک گلیکوپروتئین غشایی به نام گیرنده ترانسفرین انجام می‌شود. احتمال دارد گیرنده‌های ترانسفرین به استثنا سلول‌های بسیار تمایز یافته روی تمام سلول‌ها بیان شوند (در مقادیر بسیار متفاوت). بیان گیرنده‌های ترانسفرین توسط آهن خارج سلولی و از طریق عناصر پاسخگو به آهن (¹IREs) موجود بر روی ناحیه ۳' غیر ترجمه‌ای mRNA گیرنده ترانسفرین، در مرحله پس از رونویسی به طور منفی تنظیم می‌شود. IREها توسط پروتئین‌های سیتوپلاسمی ویژه به نام IRPs (پروتئین‌های تنظیمی آهن) تشخیص داده می‌شوند که در غیاب آهن به IREهای mRNA گیرنده ترانسفرین متصل می‌شوند و از تجزیه آنها جلوگیری می‌کنند. جذب آهن از ترانسفرین شامل اتصال ترانسفرین به گیرنده ترانسفرین، درونی‌سازی ترانسفرین به داخل یک کیسه اندوسیتوتیک از طریق گیرنده واسطه در اندوسیتوز و رها کردن آهن از پروتئین ترانسفرین از طریق کاهش در pH داخلی کیسه اندوسیتوتیک است (Litwin and Calderwood, 1993; Schwarz et al., 2003). pH و زیکول اندوسیتوزی ۵/۵ یا کمتر از آن است که این باعث تفکیک آهن از کمپلکس گیرنده-ترانسفرین می‌شود، اما آپوترانسفرین (ترانسفرین عاری از آهن) متصل به این گیرنده باقی می‌ماند. آهن داخل سلول باقی می‌ماند و مجموعه‌ی گیرنده‌های آپوترانسفرین به سطح سلول بازیافت می‌شوند (Dautry-Varsat et al., 1983). جلبک تک‌سلولی *Dunaliella Salina* نیز با مکانیسمی مشابه آهن را وارد سلول کرده و در واکنش‌های اسیدی درونی‌سازی می‌کند (Pick et al., 2006). این جلبک یک گیاه مدل استثنایی برای آشکار کردن مکانیسم‌های مقاومت به شوری موجودات فتوسنتتیک است که توانایی زنده ماندن در شوری‌های با غلظت بالاتر از اشباع NaCl را دارد (Fisher et al., 1997).

کمبود آهن دو پروتئین شبه‌ترانسفرین عمده در غشا پلاسمایی جلبک *D. salina* القاء می‌کند، TTF یا p150، یک پروتئین ۱۵۰

خاک‌ها به طور معمول دارای ۵-۱ درصد آهن کل هستند. بیشتر آهن موجود در خاک به شکل مواد معدنی سیلیکاتی یا اکسید و هیدروکسید آهن است که به راحتی برای گیاهان قابل استفاده نیستند. گیاهان می‌توانند آهن را به اشکال Fe^{2+} (فروس) و Fe^{3+} (فریک) جذب کنند. گیاهان دو مکانیسم عمده برای جذب آهن به کار می‌گیرند که یکی شامل کلاته کردن آهن از طریق ترشح ترکیباتی به نام سیدروفورزها که با پیوند شدن با آهن قابلیت حل شدن آن را افزایش می‌دهد و دیگری، ترشح پروتون (H^+) و احیاکننده‌ها توسط ریشه گیاهان برای کاهش مقدار pH در ناحیه اطراف ریشه برای افزایش محلولیت آهن است (Cohen et al., 1998).

گندم یک گیاه متحمل به شوری زیاد است و بسیاری از کولتivarهای آن تا شوری‌های ۱۵ ds/m با حفظ توان تولید ۵۰ درصد ماده خشک، قدرت رشد دارند. ترانسفرین‌ها پروتئین‌های عمومی حامل آهن در سلول‌های جانوری هستند و در پیوند شدن، متحرک کردن و تحویل دادن یون‌های فریک نقش دارند (Fisher et al., 1997). ترانسفرین پلازما یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی در حدود ۸۰ کیلودالتون، با دو ناحیه همولوگ در انتهای C و N برای پیوند شدن با آهن است. در اصل، همه آهن در گردش پلازما به طور طبیعی متصل به ترانسفرین است (Ponka and Lok, 1999). یون فریک برای جفت شدن با ترانسفرین فقط به مشارکت یک آنیون (به طور معمول کربنات) نیاز دارد. هم‌چنین پروتئین‌های ترانسفرین در برقراری همئوستازی آهن سلول، از طریق کمک کردن به سلول‌ها برای تنظیم میزان جذب آهن از سطح خارج سلولی، نقش ایفا می‌کنند. در کشت سلولی نیز، برای افزایش کیفیت و کمیت سلول‌ها به محیط کشت سلول، ترانسفرین اضافه می‌کنند تا سلول‌ها به اندازه کافی با آهن تجهیز شده باشند (Laskey, 1998). خانواده ترانسفرین بین مهره‌داران و بی‌مهرگان پلی را برقرار می‌کند، چرا که باقی‌مانده‌های مرتبط با پیوندشوندگی آهن و آنیون در بین انواع ترانسفرین‌ها (ترانسفرین سرم، اووترانسفرین، لاکتوفرین، ملانوترانسفرین، مهارکننده کربونیک‌انه‌یدراز، یک پروتئین از خرچنگ و یک پروتئین از جلبک سبز) حفاظت شده هستند

^۱ Iron Response Elements عناصر پاسخ به آهن، یک ساختار کوتاه حلقه-ساقه حفاظت شده هستند که توسط پروتئین‌های تنظیمی آهن (IRPs) متصل می‌شوند.

کیلودالتونی و یک پروتئین دیگر به نام idi-100 که از نظر توالی اسید آمینه‌ای تنها ۳۰ درصد به Ttf شباهت دارد (Schwarz et al., 2003). در جلبک *Dunaliella* افزایش قابل توجه مقدار پروتئین Ttf یا P150 (یک پروتئین شبه ترانسفرین) با بالا رفتن میزان شوری محیط کشت و یا تخلیه آهن از آن از طریق نشان‌دار کردن پروتئین با ^{59}Fe به اثبات رسیده است (Fisher et al., 1997; Katz et al., 2007). تایید شده است که جذب آهن در این گیاه به واسطه پروتئین Ttf که به یون‌های Fe^{3+} پیوند می‌خورد، انجام می‌گیرد (Paz et al., 2007). این پروتئین یک پروتئین سطحی غشا پلاسمایی ۱۵۰ کیلودالتونی است که براساس توالی استنباط شده از cDNA آن به خانواده پروتئین‌های ترانسفرین که تا سال ۱۹۹۶ فقط در جانوران شناسایی شده بود تعلق دارد. این اولین گزارش از وجود یک پروتئین شبه ترانسفرین در یک موجود فتوسنتتیک بود (Fisher et al., 1997). این پروتئین مشخصات مشابهی از قبیل اختصاصی بودن میل ترکیبی بالا برای یون‌های Fe^{3+} ، وابستگی شدید روی یون‌های کربنات و بیکربنات و فعالیت خیلی پایین در pH‌های اسیدی با ترانسفرین‌های جانوری نشان داد. اثبات شده است که یون‌های فلزی دیگر، جذب آهن را مختل نمی‌کنند و یک گزینش بسیار قوی در سیستم انتقال یون‌های Fe^{3+} حاکم است (Fisher et al., 1998). القا پروتئین Ttf در غلظت‌های بالای شوری احتمال دارد به دلیل کاهش آهن در دسترس موثر باشد. این کاهش ممکن است نتیجه اثر نمک روی محلولیت Fe^{3+} و یا دخالت نمک در ماشین جذب آهن باشد (Fisher et al., 1997). ثابت شده است که شرایط شوری شدید به‌طور مستقیم باعث تجمع پروتئین Ttf نمی‌شود و اثر آن به‌طور غیرمستقیم و با کم کردن قابلیت دسترسی آهن است و نیز ثابت شده است که میل ترکیبی یون‌های آهن به سختی به‌وسیله شوری شدید تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Katz et al., 2007). این نتایج نشان می‌دهد که ترانسفرین‌هایی که تا سال ۱۹۹۶ فقط در جانوران شناسایی شده بودند در سیستم‌های گیاهی نیز در انتقال آهن حضور و نقش دارند (Fisher et al., 1998). تنش شوری ناشی از نمک NaCl باعث کاهش رشد رویشی، عدم تعادل ریزمغذی‌ها، مهار فتوسنتز، کمبود آب و سمیت یونی مرتبط با Cl^- و Na^+ اضافی، در گیاهان می‌شود (Turan et al., 2010).

مدارک زیادی وجود دارد که شوری، آنزیم‌های فتوسنتزی، کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها را تحت اثر قرار می‌دهد. این نیز ثابت شده است که شوری ناشی از نمک NaCl روی کارایی فتوسنتسم II اثر منفی دارد (Qin et al., 2010). تنش شوری غشاهای زیستی را ناپایدار کرده و در محلولیت بسیاری از یون‌ها و سوبستراهای ضروری اثرگذار است (Katz et al., 2007; Jitesh et al., 2006). شوری خاک مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد و نمو گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک بوده که مهم‌ترین علت آن هم آبیاری با آب‌های شور است (Turan et al., 2010). شور شدن خاک اثرهای منفی زیادی روی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، میکروارگانیزم‌های آن و نیز گیاهان دارد. تجمع نمک‌ها در خاک pH آن را تحت اثر قرار می‌دهد که مهم‌ترین ویژگی شیمیایی خاک به شمار می‌رود چرا که روی قابلیت دسترسی مواد مغذی برای گیاهان اثرگذار است. در pH‌های بالای خاک، عناصری مثل Zn، Cu، Mn و Fe قابلیت دسترسی کم‌تری دارند. آهن در pH‌های بین ۴ تا ۷ قابلیت دسترسی بالایی دارد. آهن یک عنصر ضروری برای بقا همه موجودات زنده است. موجودات فتوسنتتیک نیاز ضروری برای آهن به‌عنوان کوفاکتور برای چندین عنصر دیگر در سیستم انتقال الکترون خود دارند (Paz et al., 2007). کمبود آهن یک عامل محدودکننده برای رشد گیاهان بوده و عملکردهای مهمی در گیاهان دارد که می‌توان به نقش آن در ساختمان و عملکرد کلروفیل، انتقال انرژی در داخل گیاه، تثبیت نیتروژن، به‌عنوان جز ساختاری برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها و نقش اصلی آن که در فرآیندهای فتوسنتز و تنفس است، اشاره کرد (Connolly and Guerinet, 2002).

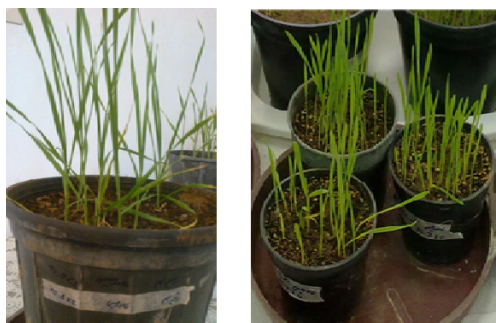
هدف از انجام این پژوهش جداسازی ژن بیان‌کننده ترانسفرین و بررسی وجود آن در ارقام ایرانی گندم زراعی بود. با توجه به اینکه گندم یک گیاه به‌طور نسبی متحمل به شوری و دسترسی پایین آهن بود، بنابراین فرضیه وجود ژن ترانسفرین در گندم کولتوار بم مقاوم به شوری شکل گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ژنتیک

در این پژوهش از بذور رقم بم گندم زراعی به‌عنوان رقم متحمل

مقدار ۲۵۰-۲۰۰ mg از آن در تیوب ml RNase Free ۱/۵ استریل ریخته شد. مقدار ۵۰۰ μ l تریزول به آن اضافه و ۴۰ ثانیه ورتکس



شکل ۱- تصویر بوته‌های رقم بام گندم زراعی. الف: ۱۵ روز پس از کاشت. ب: ۳۵ روز پس از کاشت.

Figure 1- Image of Bam wheat cultivar plants. A: 15 days after planting. B: 35 days after planting.

و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس مقدار ۲۰۰ μ l کلروفرم به آن اضافه و با محتویات تیوب مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام و فاز بالایی به تیوب ml RNase Free ۱/۵ استریل منتقل شده و آر.ان.ای با استفاده از روش ایزوپروپانول خالص‌سازی شد و آر.ان.ای در نهایت در ۲۰ μ l آب مقطر استریل حل شد. آر.ان.ای استخراج شده به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر استریل رقیق شده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و رقت ۱ به ۷۰ غلظت آن به‌طور میانگین برآورد شد. برای بررسی کیفیت آر.ان.ای، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند.

ساخت cDNA

برای ساخت cDNA، محلول واکنش شامل آب مقطر استریل به مقداری که حجم واکنش به ۲۰ μ l برسد، ۴ μ g از آر.ان.ای استخراج شده، ۵۰ μ M آغازگر معکوس، ۵۰ μ M آغازگر پلی T، ۵۰ μ M آغازگر Random Hexamer، ۱۰ mM مخلوط dNTP در حجم ۲۰ μ l در تیوب استریل ۰/۵ ml تهیه شده و ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (در دستگاه ترمومیکسر) و سپس بلافاصله ۲ دقیقه در داخل یخ قرار داده شد. در مرحله بعدی، ۴ μ l بافر تامپون ۱۰X مخصوص آنزیم M-MuLV، ۱ میکرولیتر ۱۱M DTT، ۱ میکرولیتر ۵۰mM $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر

به شوری استفاده شد. در طول مراحل انجام این تحقیق از تریزول شرکت Merck، نژاد باکتری *Escherichia coli* Top10، ساخت cDNA، مارکر VC 1kb DNA Ladder و آنزیم و بافر T4 DNA ligase شرکت ViVantis، PCR Master Mix شرکت Promega، سیستم pGEM-T Vector شرکت Fermentas، کلریدسديم شرکت Merck، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و آغازگرهای 5'-AAGGCTAGCCAGTGTGGA-3' و 3'-AGATGGTGTACTCCACGTCA-5' استفاده شد. pGEM-T یک وکتور خطی با Tی منفرد آویزان انتهایی در انتهای 3' است که به این شکل از حلقوی شدن وکتور جلوگیری کرده و کارایی واکنش لیگاسیون را با فرآورده تکثیری پی.سی.آر تولید شده با دی.ان.ای پلیمرزهای معین مقاوم به حرارت که یک A به انتهای 5' آنها اضافه می‌کنند، افزایش می‌دهد. این وکتور، یک وکتور high-copy-number بوده و شامل پروموتورهای T7 و SP6RNA پلیمرز که در طرفین ناحیه سایت‌های برشی (Multiple Cloning Region) آن قرار دارند، است. ناحیه سایت‌های برشی آن هم در داخل ناحیه کدکننده α -پپتید آنزیم β -گالاکتوزیداز واقع شده است.

کشت گیاهان و اعمال تیمار تنش شوری

در این پژوهش، بذور با تراکم ۸-۱۰ بذور در هر گلدان (گلدان‌های با ظرفیت ۵/۳ لیتر)، که با خاک معمولی پر شده بودند در عمق ۱ سانتی‌متری کشت شدند. سپس به مدت دو هفته، هر گلدان با ۴۰۰ میلی‌لیتر آب آبیاری معمولی، هر چهار روز یک‌بار آبیاری شد. پس از دو هفته که گیاهچه‌ها تا ارتفاع ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری رشد کرده بودند تنش شوری به مدت ۱۰ روز با آب نمک با EC ۱۵ ds/m (۸g نمک NaCl در یک لیتر آب مقطر) و سپس به مدت ۵ روز با آب نمک با EC ۱۰ ds/m (۴/۹۶g نمک NaCl در یک لیتر آب مقطر) جهت القا بیان ژن‌های مقاومت به تنش شوری اعمال شد (شکل ۱). پس از این دوره، برگ‌های جوان برداشت شدند و پس از شستشو با آب مقطر بلافاصله مورد استخراج آر.ان.ای قرار گرفتند.

استخراج آر.ان.ای و تعیین کمیت و کیفیت آن

نمونه‌های برگ‌ی با استفاده از ازت‌مایع در هاون چینی پودر شده و

باکتری از فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد و محصول واکنش لیگاسیون از فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد خارج شده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند، سپس نصف محصول واکنش لیگاسیون (۵ μl) به روی ۵۰ μl سلول مستعد *E.coli* اضافه و به آرامی مخلوط شدند و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها ۴۲ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و به سرعت ۲ دقیقه به روی یخ منتقل شدند. در ادامه ۸۵۰ میکرولیتر محیط کشت LBی مایع بدون آنتی‌بیوتیک به نمونه‌ها اضافه و به مدت یک ساعت با سرعت ۱۸۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند. در نهایت حدود ۲۰۰-۲۰ μl از سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده، روی محیط LBی جامد حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب و IPTG و X-Gal کشت شدند و به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس کلنی‌های سفیدرنگ با انجام پی.سی.آر روی آنها تایید شدند و با استفاده از روش استخراج پلاسمید پیشنهاد شده توسط بیرن‌بوم و دالی (۱۹۷۹)، که به اختصار Miniprep نامیده می‌شود، مورد استخراج پلاسمید قرار گرفتند. با انجام پی.سی.آر دیگری روی پلاسمیدهای استخراج شده و تایید آنها، برای توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی کره جنوبی ارسال شدند.

نتایج و بحث

تیمار تنش شوری

با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته، رایج‌ترین روش اعمال تنش شوری، با نمک NaCl روی گیاهان رشد کرده در محیط *in vitro* و نمونه‌برداری حدوداً ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش بوده است ولی در این پژوهش سعی شد شرایط اعمال تنش به‌طور تقریبی مشابه شرایط مزرعه‌ای باشد و بنابراین کشت بذور در خاک انجام شد. با در نظر گرفتن این شرایط، که ریشه گیاهان مانند شرایط *in vitro* در تماس مستقیم با محلول نمکی نبوده‌اند پیش‌بینی شد که تنش شوری روی گیاهان نسبت به شرایط *in vitro* دیرتر موثر واقع شود و از این‌رو نمونه‌های برگ‌گی ۱۰ روز پس از اعمال تنش نمونه‌برداری شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

۱ و RNasine میکرولیتر آنزیم M-MuLV به محلول واکنش اضافه شده و نمونه‌ها ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از اتمام این مراحل، cDNA حاصل به نسبت ۱ به ۱ با آب مقطر استریل رقیق شد و از cDNA رقیق شده در واکنش پی.سی.آر استفاده شد. برای نگهداری cDNA ساخته شده، نمونه‌ها در دمای ۲۰- سانتی گراد قرار داده شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و خالص‌سازی فرآورده تکثیری

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی.سی.آر) برای تکثیر ژن مورد نظر از روی cDNA و اثبات حضور فیزیکی ژن در وکتور کلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه ۲۰ میکرولیتر واکنش پی.سی.آر، ۴ μl Master mix، ۰/۲ μl آغازگر Forward، ۰/۲ μl آغازگر معکوس و ۵۰ نانوگرم cDNA، به ۱۴/۶ μl آب مقطر استریل اضافه شد. برنامه‌ی استاندارد پی.سی.آر شامل مرحله‌ی واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه مرحله‌ی تکثیر که شامل ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و ۸۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت یک مرحله‌ی پایانی شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. نیمی از فرآورده تکثیری پی.سی.آر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند، تا باندهای تکثیر شده، جدا و تجزیه شوند. پس از آنکه باند موردنظر مشاهده شد، باقی‌مانده فرآورده تکثیری پی.سی.آر تایید شده با استفاده از فنل کلروفرم و نمک NaCl ۵ مولار خالص‌سازی و رسوب داده شد.

لیگاسیون قطعات دی.ان.ای

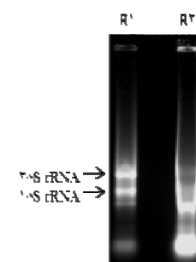
برای اتصال دو قطعه‌ی دی.ان.ای، مواد لازم برای ۱۰ μl واکنش لیگاسیون شامل ۳۰۰-۱۰۰ ng دی.ان.ای وکتور pGEM-T، دی.ان.ای الحاقی (فرآورده تکثیری پی.سی.آر) خالص‌سازی شده به نسبت ۳ برابر وکتور (۹۰۰ ng یا ۱ μl)، ۵ μl بافر T4-DNA ligase ۲×، ۵ واحد آنزیم T4-DNA ligase (۰/۵ μl) و ۳ μl آب مقطر استریل در تیوب استریل ۰/۵ ml ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

استحاله سلول‌های باکتریایی به روش شوک حرارتی (Heat-shock)

برای استحاله به روش شوک حرارتی، ابتدا سلول‌های مستعد

استخراج آر.ان.ای

استخراج آر.ان.ای از نمونه‌های برگ‌ی پودر شده با استفاده از روش ترايزول انجام گرفت. کمیت آر.ان.ای استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری به‌طور میانگین $1/276 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ برآورد شد. کیفیت آن هم با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (شکل ۲). با توجه به این شکل، تکرار شماره یک آر.ان.ای کیفیت بهتری نشان داد بنابراین برای ساخت cDNA از آن استفاده شد.



شکل ۲- نتیجه‌ی سنجش کیفیت آر.ان.ای استخراج شده. مشاهده‌ی باندهای ۲۸S rRNA و ۱۸S rRNA و عدم وجود حالت اسمیر در نمونه‌های آر.ان.ای استخراج شده، نشان‌دهنده‌ی کیفیت مناسب آر.ان.ای است. R1 و R2 دو تکرار مستقل از هم هستند.

Figure 3- Quality assessment of extracted RNA. Observation of 28S and 18SrRNA fragments and absence of smear band in the RNA samples showed the good quality of extracted RNA. R1 and R2 are two independent replications.

تکثیر cDNA جزئی ژن Transferrin

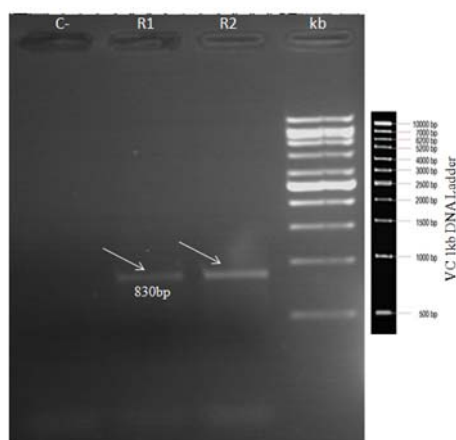
بر اساس روش RT-PCR، پس از ساخت cDNAی گندم، تکثیر cDNA جزئی ژن ترانسفرین با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی که براساس توالی‌های موجود در سایت NCBI با کد دسترسی U77059.1 طراحی شده بودند، انجام شد و باند ۸۳۰ جفت بازی که با اندازه‌ی مورد انتظار برای بخشی از ژن ترانسفرین مطابقت داشت، تکثیر شد (شکل ۳).

کلونینگ cDNA تکثیر شده در وکتور pGEM-T

cDNA تکثیر شده از واکنش RT-PCR برای بخشی از ژن ترانسفرین، پس از خالص‌سازی از روی باقی‌مانده محصول پی.سی.آر، در وکتور pGEM-T کلون شد. در این وکتور غیرفعال شدن α -پپتید با وارد شدن دی.ان.ای الحاقی، اجازه شناسایی

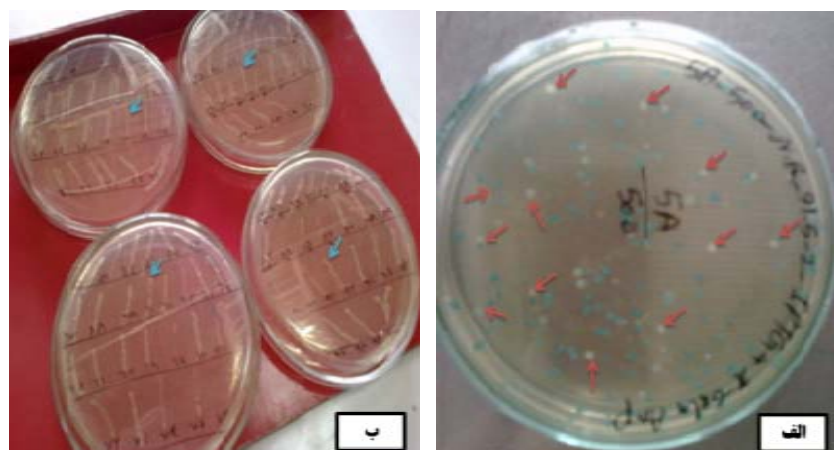
نوترکیب‌ها (کلنی‌های سفید) را از طریق غربال‌گری blue-white می‌دهد (شکل ۴). با استناد به این ویژگی وکتور، تعدادی از کلنی‌های نوترکیب (سفید) انتخاب و درستی واکنش لیگاسیون با انجام پی.سی.آر روی آن کلنی‌ها تایید شد (شکل ۵).

وکتور pGEM-T-TTf به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* انتقال یافته، و سلول‌ها روی محیط حاوی $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ آمپی‌سیلین گزینش شدند (شکل ۴ الف). برخی از قطعات الحاقی که وارد وکتور نشده‌اند ولی در محیط کشت گزینشی بلو-وایت به تصادف در مجاورت کلنی‌های نوترکیب (سفید) قرار گرفته‌اند، ممکن است هنگام انجام واکنش پی.سی.آر روی کلنی، همراه پلاسمید نوترکیب وارد تیوب واکنش پی.سی.آر شده و به‌عنوان الگوی واکنش واقع شوند. برای رفع این احتمال، از هر کلنی نوترکیب مورد نظر از طریق تماس دادن با خلال دندان استریل یک خط به طول تقریبی ۱ سانتی‌متر روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشیده شد و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش پی.سی.آر برای



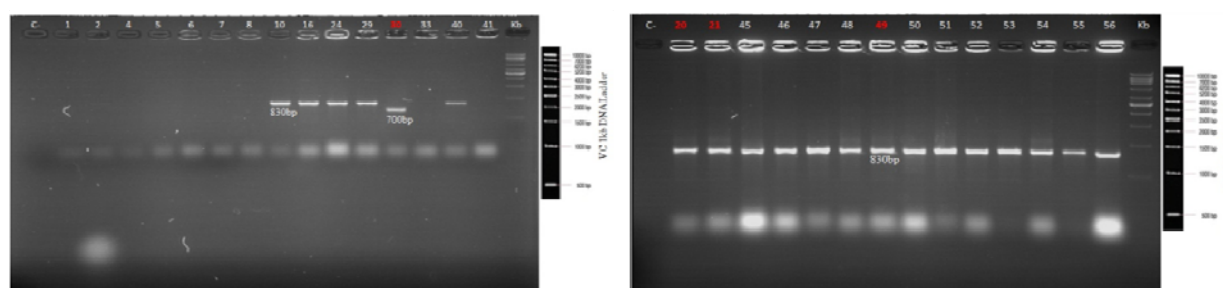
شکل ۳- الکتروفورز محصول پی.سی.آر حاصل از تکثیر cDNA جزئی ژن ترانسفرین، با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده. باند ۸۳۰ جفت بازی که با اندازه‌ی مورد انتظار برای بخشی از ژن ترانسفرین مطابقت داشت، با استفاده از آغازگرهای پیشرو و پسرو تکثیر شد. R1 و R2 دو تکرار مستقل از هم هستند.

Figure 3- Electrophoresis of PCR product Obtained from partial cDNA amplified by using specific primers of transferrin gene. 830 bp fragment in accordance with the expected size of partial transferrin gene amplified by Forward and Reverse primers. R1 and R2 are two independent replications.



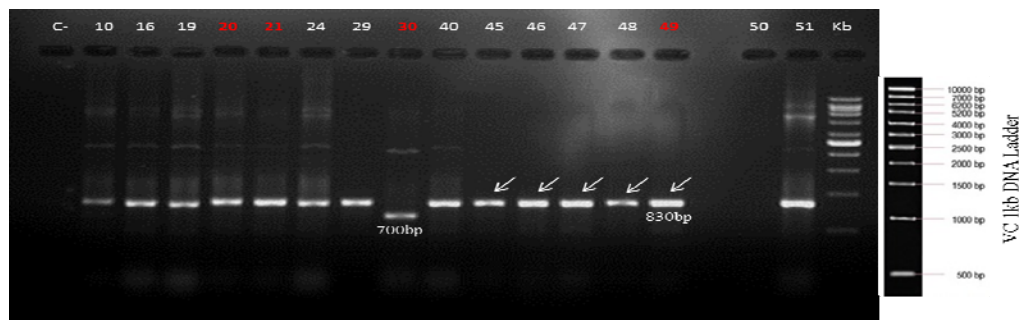
شکل ۴- الف- تصویر باکتری‌های رشد کرده روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین + IPTG + X-Gal، پس از استحالته آنها با وکتور pGEM-T-Ttf. پیکان‌ها برخی از کلنی‌های سفید را نشان می‌دهند. ب- تصویر باکتری‌های رشد کرده روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین، پس از کشت دوباره کلنی‌های موجود در شکل ۴ الف با استفاده از خلال دندان استریل. اعداد بالای کلنی‌های خطی، شماره کلنی مربوطه است. پیکان‌ها برخی از کلنی‌های خطی را نشان می‌دهند.

Figure 4- A: Bacteria image was grown on LB medium containing ampicillin + X-Gal + IPTG after transformation with the pGEM-T-Ttf vector. Arrows show some white colonies. B: Bacteria grown on solid LB medium containing ampicillin after colonies re-culture (in 4a figure) using a sterile toothpick. Numbers on the linear colonies is the number of colonies. Arrows show some linear colonies.



شکل ۵- تصویر الکتروفورز محصول پی.سی.آر حاصل از بررسی تعدادی از کلنی‌های نو ترکیب رشد کرده روی محیط انتخابی پس از استحالته با محصول لیگاسیون با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی بخشی از ژن ترانسفرین. الف و ب: هر کدام تعدادی از کلنی‌های نو ترکیب که واکنش پی.سی.آر روی آن‌ها صورت گرفته، نشان می‌دهد. مشاهده‌ی باند ۸۳۰bp حضور فیزیکی قطعه کلون شده در کلنی‌ها را تایید می‌کند. Kb: نشانگر اندازه، C-: کنترل منفی، اعداد: شماره بیست و نه کلنی از کلنی‌های رشد کرده در محیط انتخابی، اعداد به رنگ قرمز: شماره کلنی‌هایی که دی.ان.ای پلاسمید آنها برای توالی‌یابی ارسال شده است.

Figure 5- Electrophoresis image of PCR products by using specific Primers for the partial transferrin gene on a few of recombinant colonies grown on the selective medium after transformation with Ligation products. A and B respectively show a number of recombinant colonies was carried out PCR reactions on them. Observation the 830 bp fragment is confirmed physical presence of the amplified fragment in the colonies. Kb: size marker, C-: negative control, Numbers: Twenty-nine number from colonies grown on selective medium, Red numbers: Number of colonies that their DNA plasmid was sent for sequencing.



شکل ۶- تصویر الکتروفورز محصول پی.سی.آر حاصل از بررسی تعدادی از پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی بخشی از ژن ترانسفرین. مشاهده‌ی باند ۸۳۰bp حضور فیزیکی قطعه کلون شده در کلنی‌ها را تایید می‌کند. Kb: نشانگر اندازه، C-: کنترل منفی، اعداد: شماره شانزده کلنی از کلنی‌های رشد کرده در محیط انتخابی، فلش‌ها: تک‌باند واضح کلنی‌های شماره ۴۵ تا ۴۹، اعداد به رنگ قرمز: شماره کلنی‌هایی که دی.ان.ای پلاسمید آنها برای توالی‌یابی ارسال شده است.

Figure 6- Electrophoresis image of PCR products to a number of recombinant plasmid by using specific primers of the transferrin gene. Observation of 830 bp fragment confirmed physical presence of the amplified fragment in the colonies. Kb: size marker, C-: negative control, Numbers: Sixteen colonies grown on selective medium, Arrows: Obvious band of 45 to 49 colonies, Red numbers: Colonies that their DNA plasmid was sent for sequencing.

TCGCTAGCCAGTTTGGAAAGTTCCTCTCTTTTATTAACCACTGTGCGGCTTAGACTGGCGGGCTAGGTTTACTCACTCTTTCT
GCGGAGATTGTTATCGCTGGATATCTTGGCCCTGCCACGAGGTACTCGCGCTTGTCTTTCTTTCCCTGAAATCTGATGAGCAC
AGTTACCAATAATTACCATGACCCCTAGTGTCTACATGTCATTTCCTACGTTTTGTATCTTGTGCTTTGTGATTAGTTTCC
CCCTTATCAATAATCTTTACTGGGAGCCTTCGGAGGAGAGAACTCGGCTGCTTTATATGGCCAACAGGATACCGTAATTCTGG
AAACTGTTTTTCAAGAAAAGCGCGGGCTGCCAGTTGCGGGCGTATTGAGGTGGCTCCTTTCCCCAGGGAGTAAATGAACT
GCCAGGCCTCGAAGAGTAAGCCAGCTATATTCCATTCAATGACCATGACAGCAGTTCTTGTCTTAAGCATGCGTCTTCT
CGCCGGGCTCAAACCTGGTGATTGCTCCTCTCGGGGATCAACAGAGCCTGAAATGACAATCTTGTCTCTATGCTGCTGTTTC
ACTGTCCAGGGAGTGTCCCTCTTCCCTCATTCTCGCAGTGTACTTGTCAAATACACTGCCTGTCTCCTGCCCCATCACCGTT
TCGATCAGGGTAACGATTCTTGTCTTTCTTTTAAAA

شکل ۷- توالی کلنی شماره ۴۹.

Figure 7- No. 49 colony Sequence.

استخراج پلاسمید انتخاب شدند. پس از استخراج پلاسمید، برای تایید نهایی حضور cDNA کلون شده، پی.سی.آر دیگری روی دی.ان.ای پلاسمید استخراج شده با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در کلونینگ انجام شد. نتیجه این واکنش نشان داد که قطعه‌ای با اندازه‌ی تقریبی ۸۳۰ جفت باز در این وکتور کلون شده است (شکل ۶). بنابراین، تعداد ۴ عدد از نمونه‌های دی.ان.ای وکتور حاصل برای تعیین توالی به مرکز توالی‌یابی کره جنوبی ارسال شد.

نتایج توالی‌یابی cDNA کلون شده

برای بررسی توالی cDNA کلون شده، ۴ نمونه از پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های ارزیابی شده در مراحل قبلی، جهت توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی کره جنوبی ارسال شد. نتایج بدست آمده از توالی‌یابی با بخشی از توالی ثبت شده برای cDNA ژن

تایید کلنی‌های نوترکیب روی این کلنی‌های جدید انجام گرفت (شکل ۴ ب).

مراحل تایید کلنی‌ها برای حضور بخشی از ژن ترانسفرین پس از

استحاله E. coli با وکتور pGEM-T-Tf

با توجه به اینکه توالی‌یابی قطعه cDNA کلون شده برای بخشی از ژن ترانسفرین هنوز مشخص نشده بود، بنابراین تعدادی از کلنی‌های رشد کرده پس از واکنش استحاله با پلاسمید pGEM-T-Tf (حداقل ۲۹ کلنی) برای تایید وجود قطعه‌ی کلون شده در دو مرحله آزمایش شدند. بدین ترتیب که ابتدا کلنی‌های انتخاب شده به روش پی.سی.آر و با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در کلونینگ، مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۵). در مرحله‌ی دوم، تعدادی از کلنی‌هایی که در پی.سی.آر مثبت بودند (باند مورد نظر را نشان دادند) برای

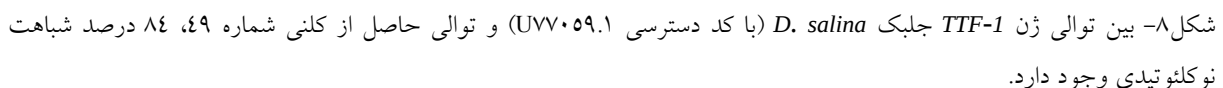


Figure 8- There is 84% nucleotide similarity between TTF-1 gene sequence of *D. salina* (with 77059.1U access code) algae and sequence of No. 49 colony.

(2013).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به شباهت سیستم‌های گیاهی و جلبک‌ها، جفت آغازگر مورد استفاده در این پژوهش بر اساس توالی CDS ژن *Ttf-1* (با کد دسترسی U77059.1) طراحی شد. با استناد به نتیجه این پژوهش و تشابهاتی که بین ژن‌های ترانسفرین انسانی و جلبک *D. salina* وجود دارد، می‌توان نتیجه گرفت که توالی کلنی شماره ۴۹ به یک ژن ترانسفرین در گیاه گندم زراعی تعلق دارد. این اولین گزارش از وجود ژن ترانسفرین در سیستم گیاهان عالی است. البته با توجه به اینکه تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر وجود ژن ترانسفرین در سیستم گیاهان عالی وجود ندارد، لازم است این آزمایش با استفاده از همین جفت آغازگر و آغازگرهای دیگر این ژن، تکرار و مجدداً تایید شود. لازم به ذکر است با اینکه اندازه‌ی باند مربوط به کلنی شماره ۴۹ در روی ژل آگارز ۸۳۰ جفت باز بوده ولی فقط ۷۰۹ جفت باز آن قرائت شده و بقیه به علت قطع شدن چارچوب قرائت، توالی‌یابی نشده است.

با اثبات وجود ژن ترانسفرین در گیاهان، دیگر نیازی به تولید گیاهان تراریخته این ژن نخواهد بود و هم‌چنین پروتئین ترانسفرین گیاهی نسبت به ترانسفرین‌های جانوری که خطر آلودگی به پاتوژن‌های انسانی را دارند، برای کاربردهای پزشکی ایمن‌تر خواهد بود.

تشکر و قدردانی: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر در اختیار قرار دادن امکانات مالی این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Cohen C K, Fox T C, Garvin D F, Kochian L V. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiology* 116: 1063-1072.
2. Connolly E L, Guerinot M L. 2002. Iron stress in plants. *Genome Biology* 3(8): 1024.1-1024.4.
3. Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish H F. 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Cell Biology* 80:2258-2262.
4. Fisher M, Gokhman I, Pick U, Zamir A. 1997. A structurally novel transferrin-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. *The Journal*

of Biological Chemistry 272(3-17): 1565-1570.

ترانسفرین در سایت NCBI (شماره دستیابی U77059.1) با استفاده از نرم‌افزار آنالین MultAlin مقایسه شد (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). نتایج بدست آمده نشان داد که یک مورد از توالی‌های تجزیه شده، با ۸۴ درصد شباهت، منطبق بر توالی ثبت شده بودند (شکل ۸). توالی کلنی شماره ۴۹ در شکل ۷ مشاهده می‌شود.

ترانسفرین سرم انسانی کاربرد گسترده‌ای در محیط‌های کشت سلولی برای تولید پروتئین‌های زیست دارویی و واکسن‌ها (برای اطمینان از تجهیز سلول‌ها به آهن) دارد و هم‌چنین استفاده از آن به‌عنوان یک سیستم درمانی و رهاسازی هدفمند دارو (با توجه به حضور گیرنده ترانسفرین در تمام سلول‌ها به استثنا سلول‌های بسیار تمایز یافته) برای درمان تعدادی از بیماری‌ها در حال بررسی و کشف است. در حال حاضر به دلیل نگرانی‌های ناشی از آلودگی‌های عوامل پاتوژنیک ترانسفرین حاصل از پلاسماهای انسانی، تولید ترانسفرین نوترکیب انسانی در سیستم‌های بیان هترولوگوس گوناگون مورد هدف واقع شده است. به‌عنوان مثال ترانسفرین نوترکیب انسانی فعال از نظر زیستی، در دانه‌های برنج (*Oryza sativa* L.) در یک سطح بیان بالا تولید شده است (تقریباً ۴۰ درصد کل پروتئین محلول یا ۱ درصد وزن خشک دانه) و هم‌چنین در گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum* L.) بیان ترانسفرین نوترکیب انسانی فعال از لحاظ زیستی، به‌طور معنی‌داری کمتر بود (۰/۲۵ درصد کل پروتئین محلول). ولی با این حال هزینه بالا و عملکرد محدود ترانسفرین نوترکیب از چالش‌های اصلی بسیاری از سیستم‌های بیان است (Zhang,

analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 1459-1472.

8. Lamberta L A, Perri H, Halbrooks P J, Masonb A B. 2005. Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding. *Biochemistry and Molecular Biology* 142(2):129-141.

9. Laskey J, Webb I, Schulman H M, Ponka P. 1988. Evidence that transferrin supports cell proliferation by supplying iron for DNA synthesis. *Experimental Cell Research* 176(1):87-95.

10. Litwin C M, Calderwood S B. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Review* 6(2):137-149.

11. Myouga F, Hosoda C, Umezawa T, Lizumi H, Kuromori T, Motohashi R, Shono Y, Nagata N, Ikeuchi M, Shinozaki K. 2008. A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20(11): 3148-3162.

12. Paz Y, Shimoni E, Weiss M, Pick U, 2007. Effects of iron deficiency on iron binding and internalization into acidic vacuoles in *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* 144(3): 1407-1415

13. Pick U, Katz A, Weiss M, Levine E, Paz K, Ventrella R. 2006. Survival at extreme salinity and iron deficiency. *Life Sciences* 200-202.

14. Ponka P, Lok C N. 1999. The transferrin receptor: role in health and disease. *International Journal Biochem Cell Biology* 31(10):1111-1137.

15. Qin J, Dong W Y, He K N, Yu Y, Tan G D, Han L, Dong M, Zhang Y Y, Zhang D, Li A Z, Wang Z L. 2010. NaCl salinity-induced changes in water status, ion contents and photosynthetic properties of *Shepherdia argentea* (Pursh) Nutt. Seedlings. *Plant Soil Environment* 56(7): 325-332.

16. Schwarz M, Sal-Man N, Zamir A, Pick U. 2003. A transferrin-like protein that does not bind iron is induced by iron deficiency in the alga *Dunaliella salina*. *Biochimistry Biophysics Acta* 1649(2):190-200.

17. Turan M A, Hassan A, Elkarim A, Taban N, Taban S. 2010. Effect of salt stress on growth and iron distribution and accumulation in shoot and root of maize plant. *African Journal of Agricultural Research* 3(7): 584-588.

18. Zhang D. 2013. Plant seed-derived human transferring: expression, characterization, and applications. *OA Biotechnology* 2(2):17.

بهبود کارایی انتقال ژن به روش غیر کشت بافت در گیاهان گندم و

برنج با استفاده از *اگروباکتریوم* (*Agrobacterium tumefaciens*)

Optimization of *Agrobacterium* -mediated transformation efficiency in wheat and rice using a non-tissue culture approach

صدیقه نصررمزی، محمدمهدی سوهانی*، محسن ایمانزاده
Sedighe Nasr-Ramzi, Mohammad Mahdi Sohani, Mohsen Imanzade

دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

Biotechnology Department, College of Agriculture, University of Guilan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msohani@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۴)

چکیده

واژه‌های کلیدی

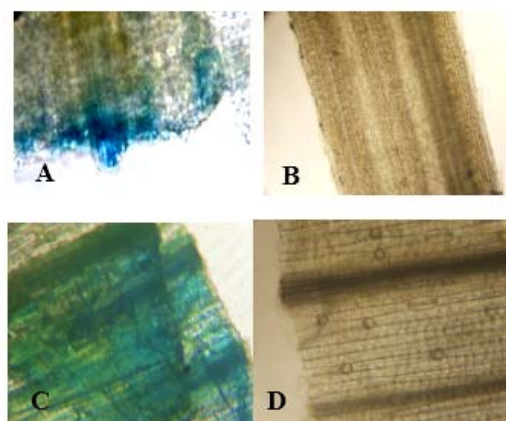
ستوسیرینگون
آزمون هیستوشیمیایی گاس
in planta
انتقال ژن
اگروباکتریوم

گیاهان تراریخته بیشتر به وسیله روش‌های مبتنی بر کشت بافت تولید می‌شوند که به آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی و گزینش دقیق ریزنمونه، غربالگری بافت‌های تراریخته و به باززایی گیاهان فوق تحت شرایط درون شیشه‌ای *in vitro* نیاز است که مشکل و زمان‌بر است. در این پژوهش تراریزش دو گیاه تک‌لپه و مهم زراعی برنج و گندم با روش به نسبت آسان *in planta* انجام و کارایی انتقال ژن آن‌ها بررسی شد. آزمایش با دو سویه‌ی *اگروباکتریوم* (EHA105 و LBA4404)، سه رقم برنج (حسن سرایی، گرده و بینام)، سه رقم گندم (آذر ۲، الوند و سرداری)، سه غلظت استوسیرینگون (μM صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰) و نیز استفاده از شرایط خلأ با استفاده از دستگاه خلأ به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. کارایی انتقال ژن با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS و واکنش پی.سی.آر با سه ژن مختلف بررسی شد. بالاترین کارایی در رقم حسن سرایی در گیاه برنج با استفاده از سویه‌ی EHA105 با حضور $100 \mu\text{M}$ استوسیرینگون همراه با استفاده از خلأ به میزان ۱/۱ درصد بود. هم‌چنین کارایی انتقال ژن رقم آذر ۲ و سرداری در بین ارقام گندم در سویه‌ی EHA105 با حضور $200 \mu\text{M}$ استوسیرینگون همراه با استفاده از خلأ به میزان ۰/۵۵ درصد بود.

مقدمه

در حال حاضر یکی از روش‌های رایج انتقال ژن غلات استفاده از اگروباکتریوم بر پایه روش‌های کشت بافت است (Hiei *et al.* 2008) باید توجه داشت که روش‌های کشت بافت به دلیل اثرهای اپی ژنتیکی و نوترکیبی کروموزومی بر سلول‌های میزبان سبب وقوع بالای تنوع سوماکلونال می‌شوند (Zhao *et al.* 2006). علاوه بر این، در طی مراحل مختلف به‌طور معمول گیاه به شرایط *in vitro* منتقل، ریزنمونه از گیاه تهیه و کالوس تولید می‌شود. در نهایت باززایی گیاه کامل لازم و ضروری است که البته باززایی برخی از گیاهان مانند غلات به سختی انجام می‌شود (Mohan. 2001). روش دیگر استفاده از اگروباکتریوم در انتقال ژن گیاهان، روش *in planta* است که بدین منظور از اگروباکتریوم در شرایط *in vivo* برای تلقیح بذور در حال جوانه‌زنی استفاده می‌شود و نیازی به کشت سلول‌ها و بافت‌های گیاهی وجود ندارد. با استفاده از روش *in planta* تنوع سوماکلونال به حداقل رسیده و به‌طور قابل توجهی در زمان، هزینه‌ها و مراحل طولانی کشت بافت صرفه‌جویی می‌شود (Supartana *et al.* 2006). این روش برای گیاهان تک لپه مانند برنج و گندم که از دیدگاه کشت بافت و باززایی سرسخت هستند بسیار مفید بوده و می‌تواند جایگزین

برای اولین بار انتقال ژن پایدار برنج تیپ ژاپونیکا به واسطه اگروباکتریوم به سلول کالوس در سال ۱۹۹۰ گزارش داده شد (Raineri *et al.* 1990). سویی‌ی استفاده شده در این پژوهش A281، حاوی پلاسمید با بیماری‌زایی قوی به نام pTi B0542 بود. گندم نیز همانند برنج یکی از محصولات مهم زراعی است که از جنبه‌های مختلفی به هم شبیه هستند اما انتقال ژن گندم دیرتر از برنج شروع شده است (Wu *et al.* 2003). اولین انتقال ژن گندم به واسطه اگروباکتریوم از طریق سیستم کشت بافت و کشت جنین نابالغ را چنگ و همکارانش (۱۹۹۷) گزارش کردند. انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم در مقایسه با روش‌های مکانیکی بمباران ذرات دارای مزیت‌های بسیاری است که از جمله آن‌ها انتقال یک قطعه دی.ان.ای با توالی‌های مشخص در دو انتها، تعداد نسخه کم از تراژن و نیز امکان انتقال قطعات بزرگ دی.ان.ای است. موفقیت این روش به نوع و سن بافت گیاهی برای آلودگی، نوع ناقل استفاده شده برای انتقال ژن، سویی‌ی اگروباکتریوم، مراحل و جزئیات عمل آلودگی به‌خصوص استفاده از ترکیب فنولی استوسیرینگون وابسته است (Dai *et al.* 2001).



شکل ۱- بیان ژن بتاگلوکورونیداز به صورت ظهور رنگ آبی در بافت برگ گیاهان برنج و گندم. ظهور رنگ آبی در نمونه ترانسفورم برنج رقم حسن سرایی با سویه EHA105 در غلظت $100\mu\text{M}$ استوسیرینگون با استفاده از خلأ (A) و نمونه شاهد از همین رقم (B). ظهور رنگ آبی در نمونه ترانسفورم گندم رقم آذر ۲ و سویه EHA105 در غلظت $200\mu\text{M}$ استوسیرینگون با استفاده از خلأ (C) و نمونه شاهد از همین رقم (D).

Figure 1 – Transgenic (left) and nontransgenic (right) leaf of rice (top) and wheat (below) expressing GUS. Formation of blue color in Hasan saraie rice cultivar, which transformation was performed by means of vacuum infiltration of EHA105 strain plus $100\mu\text{M}$ Acetosyringone (A) and control sample from the same cultivar (B). The blue color was formed in Azar 2 wheat cultivar, which transformation was performed by vacuum infiltration plus $200\mu\text{M}$ Acetosyringone (C) and control sample from the same cultivar (D).

۱/۵ درصد ضدعفونی شدند. بذور به مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد درون ظروف پتری قرار گرفتند تا جوانه بزنند و سفیدی حاصل از رشد ریشه چه در آن‌ها ظاهر شود. سویه‌های باکتری بر اساس روش گل‌وین طی سه مرحله و در سه محیط به صورت جداگانه کشت داده شدند (Gelvin, 2006).

جهت تلقیح بذور با اگروباکتریوم، ناحیه جنینی بذر جوانه زده با سوزن (به قطر ۰/۵ میلی‌متر) آغشته به هر یک از سویه‌های اگروباکتریوم تا عمق حدود یک میلی‌متری سوراخ شد (Imanzadeh, 1391). سپس نیمی از بذور تلقیح شده، به‌طور جداگانه تحت شرایط خلأ، با استفاده از دستگاه خلأ (Eppendorf, Concentrator plus) در دمای محیط و تا زمان جوش آمدن محلول درون محیط کشت القایی قرار گرفتند. بذور تلقیح شده برنج در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، در شرایط تاریکی، به مدت ۹ روز نگهداری شدند تا جوانه بزنند که این زمان برای بذور تلقیح شده گندم ۳ روز بود. سپس به منظور حذف باکتری، بذور تلقیح شده با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (mg/L ۱۰۰۰) به مدت یک ساعت تیمار شدند (Bechtold et al. 1993). گیاهچه‌های حاصل وارد گلدان حاوی خاک مناسب شده و به اتاقک کشت با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

واکنش پی.سی.آر: استخراج دی.ان.ای از گیاهچه‌ها با روش CTAB انجام شد (Murray. 1980). توالی‌های آغازگرها بر اساس بخش T-DNA ناقل شامل آغازگر رفتی 5'-GAA TCC 3'-TTG CGC GCT TGT TGC CGG TCT T-3' و برگشتی 5'-TTG CGC GCT TGT TGC CGG TCT T-3'، آغازگر رفتی 5'-GAT GTT GGC GAC CTC 3'-GTA T-3' و برگشتی 5'-GTG CTT GAC ATT GGG GAG 3'-ATT TGC 3'-GAA CAT AGC 3'-GTT GCC TTG G-3' مربوط به ژن مقاومت به اسپکتینومایسین جهت بررسی گیاهان ترانسفورم استفاده شد. آغازگرهای توالی مذکور با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>)

روش کشت بافت شود. این روش در غلاتی مانند برنج (Supartana et al. 2005; Lin et al. 2009)، گندم (Supartana et al. 2006; Janice et al. 2009; He et al. 2010; Razzaq et al. 2011) و ذرت (Chumakov et al. 2006) گزارش شده است. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی انتقال ژن دو گیاه تک‌لپه برنج و گندم با واسطه‌ی باکتری *A. tumefaciens* به روش غیرکشت بافت و عوامل دخیل است. گیاهان ترانسفورم شده با استفاده از دو آزمون رنگ آمیزی GUS برای ارزیابی تظاهر ژن بتاگلوکورونیداز و واکنش پی.سی.آر با استفاده از ۳ جفت آغازگر در داخل ناحیه T-DNA از پلاسمید گیاهی pCambia1105. IR تایید شدند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، سویه‌های باکتری، پلاسمید و مواد مورد استفاده: در این پژوهش سه رقم محلی برنج حسن سرایی، گرده و بینام از موسسه تحقیقات برنج کشور در رشت و سه رقم گندم دیم آذر ۲، الوند و سرداری از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کردستان، سنندج، تهیه شدند. دو سویه اگروباکتریوم EHA105 و LBA4404 حامل پلاسمید گیاهی pCambia1105. IR (کامبیا^۱) کانبرا، استرالیا، (AF354045) جهت انتقال ژن استفاده شد. این ناقل حاوی ژن مقاومت به هایگرومایسین (*hpt*)، ژن بتاگلوکورونیداز (*GUS-Plus*) با ایترون چالکون سینتاز^۲ در نزدیک پایانه ۵' است و حاوی پروموتور قوی CaMV35S در ناحیه T-DNA است. آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین^۳ (Rif) و مواد شیمیایی 5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide (X- Gluc) و 4'-Hydroxy-3',5'-dimethoxyacetophenone (استوسیرینگون، AS) از شرکت سیگما^۴، اسپکتینومایسین^۵ (Spec) و سفوتاکسیم^۶ (Cef) از شرکت داروپخش خریداری شدند.

انتقال ژن به بذور با اگروباکتریوم: بدین منظور، ابتدا بذور برنج و گندم جداگانه با استفاده از اتانل ۹۰ درصد و هیپوکلریت سدیم

- 1- Cambia
- 2- Chalcone synthases
- 3- Rifampicin
- 4- Sigma
- 5- Spectinomycin
- 6- Cefotaxime

طراحی شدند. واکنش‌های پی.سی.آر شامل ۱ میکرولیتر دی.ان.ای الگو، آغازگرهای رفتی و برگشتی (۱۰ pmoles) هر کدام ۱ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۱۰X buffer و ۰/۳ میکرولیتر Taq polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده و محصول پی.سی.آر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

رنگ‌آمیزی برای ارزیابی تظاهر ژن بتاگلوکونیداز: آزمایش هیستوشیمیایی گاس برای نمونه‌های ترانسفورم شده انجام شد. اثر آنزیم گاس روی سوبسترای مربوط (X-gluc) سبب تبدیل فرآورده واکنش به رنگ آبی در نمونه‌های تراریخته می‌شود. بر این اساس ابتدا قطعات برگ‌ی به طول ۱ سانتی‌متر از گیاهچه‌ها جدا شد و سپس درون تیوب‌های حاوی ۱ mL از محلول گاس (۸/۹mL آب استریل، ۱mL بافر فسفات $NaPO_4$ ۰/۵mM، ۱۰ tween 20 میکرولیتر و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر x-gluc 2mM) وارد شدند. تیوب‌ها را سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه تحت شرایط خلأ با استفاده از دستگاه خلأ قرار داده تا سطح برگ، محلول را به‌طور کامل جذب کرده و تیره رنگ شود. این کار هر بار تا جوش آمدن محلول داخل تیوب ادامه می‌یابد. تیوب‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از گذشت این مدت محلول گاس حذف و شست و شوی نمونه‌ها با استفاده از اتانول ۱۰۰ درصد انجام شد. در نهایت نمونه‌ها برای تولید رنگ آبی بررسی شدند (Bartels, 2011).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آزمایش با دو سویه‌ی اگروباکتریوم (EHA105 و LBA4404) حاوی پلاسمید pCambia1105.1R، سه غلظت AS (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱)، سه رقم برنج (حسن سرابی، گرد و بینام)، سه رقم گندم (آذر ۲، الوند و سرداری) و نیز استفاده از شرایط خلأ استفاده از دستگاه خلأ به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام و داده‌های آزمایش با استفاده از نسخه ۹ نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند.

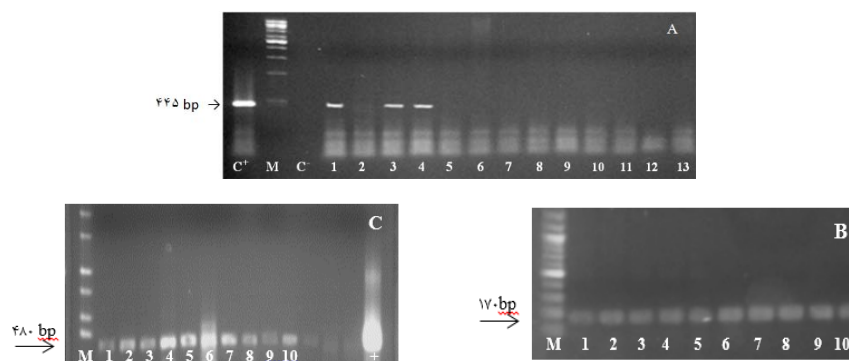
نتایج و بحث

به‌منظور تجزیه و تحلیل و تأیید تراریخته بودن نمونه‌های گیاهی

مورد بررسی، ابتدا تست هیستوشیمیایی گاس روی نمونه‌ها انجام شد. بر این اساس درصد بالایی از نمونه‌های غیر تراریخته حذف و بقیه جهت واکنش پی.سی.آر آزمون شدند. در ادامه نیز جهت کاهش حجم نمونه‌ها، هرکدام از نمونه‌ها که در آزمون پی.سی.آر یک ژن فاقد باند بودند کنار گذاشته شدند. فقط گیاهانی که نتیجه هر دو آزمون هیستوشیمیایی گاس و واکنش پی.سی.آر آن‌ها با هر سه ژن مورد بررسی مثبت بود، تراریخته تلقی شدند.

از آن‌جا که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین خارج از ناحیه‌ی T-DNA پلاسمید گیاهی pCambia1105.1R قرار دارد بنابراین ژن فوق در واکنش پی.سی.آر گیاهان ترانسفورم شده واقعی تکثیر نمی‌شود. بررسی تکثیر این ژن کمک می‌کند که بتوان تشخیص داد آیا باندهای حاصل از پی.سی.آر سایر ژن‌های وکتور مانند Hyg و GUS، حاصل از آلودگی‌های باکتریایی گیاهچه‌ها بوده است یا خیر. در این آزمایش حذف کامل اگروباکتریوم بعد از ترانسفورماسیون به طریق دیگر نیز بررسی شد. پس از تلقیح با اگروباکتریوم و تیمار گیاهچه‌ها با آنتی‌بیوتیک Cef، قطعات برگ‌ی از گیاهان T_0 تهیه و در ۱ میلی‌لیتر آب استریل در داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری آسیاب شدند. سپس ۱۰۰ μ L از سوسپانسیون فوق در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک Spec به مدت سه روز کشت شد. فقدان کلونی بر روی ظروف پتری نشان دهنده عاری بودن گیاهان مربوط به آلودگی باکتریایی بوده است.

آزمون گاس از نمونه‌های برگ‌ی و بافت‌ها انجام شد و با استفاده از میکروسکوپ برای بیان ژن بتاگلوکونیداز (GUS) بررسی شدند (شکل ۱). این ژن گزارشگر را جایگاه ژنی *Uida* رمز می‌کند و بیش‌ترین کاربرد را در گیاهان تراریخته دارد (Yu et al., 2007). آنزیم بتاگلوکونیداز، محصول این ژن است که گلوکونیدها را تجزیه و منجر به ایجاد یک محصول رنگی می‌شود. در اثر این واکنش رنگ آبی بین سلول‌های ترانسفورم تولید می‌شود (Jefferson et al., 1987). در این آزمایش از ناقل pCambia1105.1R استفاده شد که حاوی ژن *GUS-Plus* با منشأ *Staphylococcus sp.* است و حساسیت بیش‌تری نسبت به ژن *Uida* از *E. coli* دارد. این ژن هم‌چنین حاوی یک اینترون است که مانع بیان آن در باکتری شده و از آلودگی باکتریایی



شکل ۲- آزمون پی.سی.آر گیاهچه‌های ترانسفورم شده. تکثیر باند ۴۴۵bp از ژن *GUS-Plus* گیاهچه‌های ترانسفورم شده در تیمار سویه EHA105 در غلظت ۲۰۰ μM استوسیرینگون گندم رقم آذر ۲ همراه با اعمال خلأ (A). ترانسفورمسیون با استفاده از سویه EHA105 در غلظت ۱۰۰ μM استوسیرینگون همراه با اعمال خلأ در برنج رقم حسن سرایی و تکثیر باند ۱۷۰bp از ترمیناتور *nos* (B)، و تکثیر باند ۴۸۰bp از ژن مقاومت به هایگرومایسین (C)، M مارکر، + کنترل مثبت، - کنترل منفی و شماره‌ها مربوط به نمونه‌های گیاهی مورد آزمون هستند.

Figure 2 – PCR analysis of transformed wheat and rice seedlings. Amplification of a 445 bp from *GUS-Plus* gene in wheat transformed with EHA105 strain plus 200 μM Acetosyringone in Azar 2 cultivar (A); Amplification of a 170 bp from the *nos* terminator gene (B) and a 480 bp from Hygromycin resistance gene (C) in Hasan saraie rice cultivar, respectively transformed with EHA105 strain plus 100 μM Acetosyringone. M. Marker, + or C: positive control samples and numbers are correspond with the individual plants that were tested.

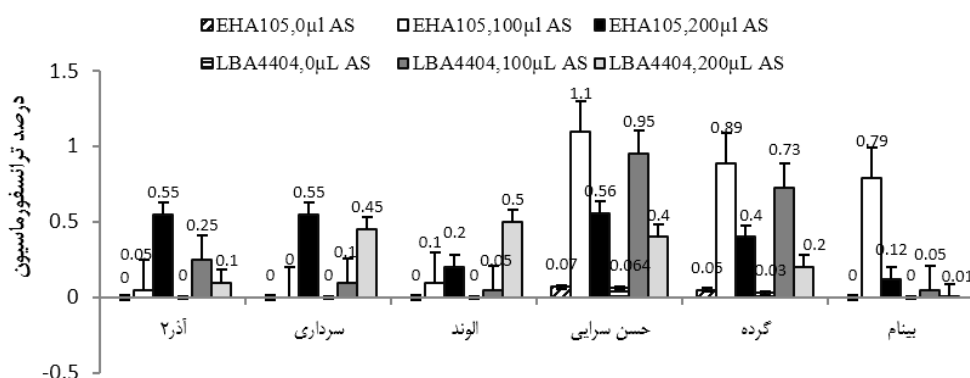
جلوگیری می‌کند.

بر اساس آغازگرهای استفاده و طراحی شده تکثیر ژن *GUS-Plus* یک قطعه به طول ۴۴۵bp (شکل ۲، A)، ژن مقاومت به هایگرومایسین یک قطعه به طول ۴۸۰bp (شکل ۲، C) و تکثیر پایانبر *nos* یک قطعه به طول ۱۷۰bp (شکل ۲، B) را تولید می‌کند. نتایج پی.سی.آر با استفاده از ژل آگارز بررسی شد و نمونه‌هایی که باندهای مورد نظر را تکثیر کرده‌اند، پی.سی.آر مثبت و گیاهان تراریخته تلقی شدند.

بررسی اثرهای متقابل سطوح AS، باکتری و رقم بر کارایی انتقال ژن با استفاده از آزمون‌های گاس و پی.سی.آر نشان داد که در بین ارقام برنج مورد استفاده در این پژوهش سویه EHA105 از آگروباکتریوم بیشترین کارایی را دارد. بیشترین کارایی انتقال ژن ارقام برنج مربوط به رقم محلی حسن سرایی و استفاده از سویه EHA105، در غلظت ۱۰۰ μM از AS به میزان ۱/۱ درصد بوده است. بیشترین کارایی انتقال ژن در رقم برنج گرده نیز دوباره همراه با سویه EHA105، در غلظت ۱۰۰ μM از AS به میزان ۰/۸۹ درصد بدست آمد. رقم بینام برنج نسبت به دو رقم دیگر کارایی انتقال ژن کم‌تری داشت اما بیشترین مقدار کارایی انتقال ژن با سویه EHA105، در غلظت ۱۰۰ μM از AS به میزان ۰/۷۹

درصد نشان داد. سویه LBA4404 نیز دارای کارایی نسبتاً متوسطی بود. این کارایی در غلظت ۱۰۰ μM از AS به ترتیب در ارقام حسن سرایی، گرده و بینام معادل ۰/۷۳، ۰/۹۵ و ۰/۰۵ درصد بود. کارایی انتقال ژن در غلظت ۲۰۰ μM از AS در بین سه رقم برنج نسبت به غلظت ۱۰۰ μM از AS کم‌تر بود به‌طوری‌که این کارایی با سویه EHA105 در رقم حسن سرایی ۰/۵۶، در رقم گرده ۰/۴ و در رقم بینام ۰/۱۲ درصد بود. هم‌چنین قابل ذکر است که این کارایی همراه با سویه LBA4404 در رقم حسن سرایی ۰/۴، در رقم گرده ۰/۲ و در رقم بینام معادل ۰/۰۱ درصد بود. قابل ذکر است که کم‌ترین کارایی انتقال ژن در غلظت ۱۰ μM از AS بدست آمد. این کارایی با سویه EHA105 در رقم حسن سرایی ۰/۰۷، در رقم گرده ۰/۰۵ و در رقم بینام ۰ درصد بود. هم‌چنین کارایی با سویه LBA4404 در رقم حسن سرایی ۰/۰۶، در رقم گرده ۰/۰۳ و در رقم بینام معادل ۰ درصد بود (شکل ۳).

در بین ارقام گندم مورد استفاده در این پژوهش سویه EHA105 از آگروباکتریوم همراه با غلظت ۲۰۰ μM از AS بیش‌ترین کارایی انتقال ژن (۰/۵۵ درصد) را داشت که در هر دو رقم آذر ۲ و سرداری مشاهده شد (شکل ۳). این مقدار در رقم



شکل ۳- کارایی انتقال ژن سه رقم برنج (حسن سرایی، گرده و بینام) و سه رقم گندم (آذر ۲، سرداری و الوند) همراه با اثرات متقابل سه غلظت استوسیرینگون (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ μM) و دو سویه ی باکتری (EHA105 و LBA4404).

Figure 3 - Transformation efficiency of three cultivars of rice (Hasan saraie, Gerdeh and Binam) and three cultivars of wheat (Azar 2, Sardari and Alvand). The interaction effects of three concentrations of acetosyringone (0, 100 and 200 μM) and two strains of *Agrobacterium* (EHA105 and LBA4404) are presented in this figure.

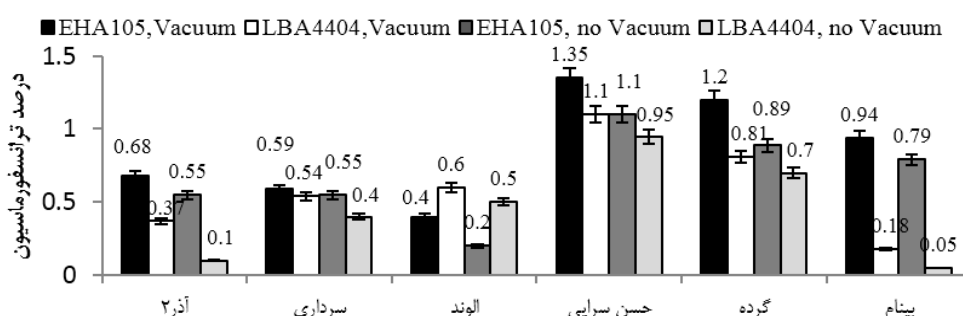
مورد استفاده در این پژوهش منجر به کاهش کارایی انتقال ژن نسبت به غلظت ۱۰۰ μM شده است که احتمال دارد به دلیل اثر سمیت و ممانعت کنندگی AS در غلظت های بیشتر باشد (Saharan et al. 2004). اما در مورد ارقام گندم استفاده شده در این پژوهش غلظت ۲۰۰ μM بیشترین کارایی را داشت. اگرچه ترکیبات القاگر مختلفی وجود دارند اما AS بیشتر استعمال می شود زیرا در غلظت های پایین نسبت به سایر ترکیبات القاگر دارای خاصیت القا کنندگی بیشتری است و از نظر تجاری در دسترس و قیمت مناسب تری دارد (Dye et al. 1997).

استفاده از ترکیب شیمیایی القاگر برای القا ژن های بیماری زا در بسیاری از دستورالعمل های مورد استفاده برای انتقال ژن غلات توصیه شده است. گیاهان تک لپه یا به هیچ عنوان AS تولید نکرده و یا آن را در مقادیر بسیار کم تولید می کنند که برای القای ژن های بیماری زا اگر باکتریوم کافی نیست بدین منظور از این ترکیب فنولی در محیط کشت القا ژن های بیماری زا استفاده شد. ویکز همکاران (۲۰۰۸) در مورد توسعه روش انتقال ژن *in planta* از غلظت ۲۰۰ μM AS استفاده کردند. هی و همکاران (۲۰۱۰) تا غلظت ۴۰۰ μM AS را در گندم قابل تحمل گزارش و مشاهده کردند که این غلظت منجر به افزایش بیان ژن بتاگلوکورونیداز شده است. غلظت های بین ۵۰ μM تا ۵۰۰ μM در مورد انتقال ژن گیاه برنج گزارش شده است، اما غلظت های بیش تر از ۵۰۰ μM

گندم الوند معادل ۰/۲ درصد بود. کارایی انتقال ژن مربوط به سویه ی LBA4404، در غلظت ۲۰۰ μM از AS در سه رقم آذر ۲، سرداری و الوند به ترتیب ۰/۱، ۰/۴۵ و ۰/۵ درصد بود است. کارایی انتقال ژن با سویه ی EHA105، در غلظت ۱۰۰ μM از AS نیز در سه رقم آذر ۲، سرداری و الوند به ترتیب به میزان ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ درصد بود. این کارایی با سویه ی LBA4404، در غلظت ۱۰۰ μM از AS نیز در سه رقم آذر ۲، سرداری و الوند به ترتیب به میزان ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد بود.

بر اساس نتایج بدست آمده سویه ی EHA105 و رقم حسن سرایی برنج همراه با غلظت ۱۰۰ μM از AS بیشترین کارایی انتقال ژن (۱/۱ درصد) و نیز ارقام آذر ۲ و سرداری در گیاه گندم با سویه ی EHA105 و با حضور ۲۰۰ μM AS بیشترین کارایی انتقال ژن (۰/۵۵ درصد) را داشته است. میزان انتقال ژن با سویه مذکور در رقم الوند معنی دار نشده و کم تر از سویه ی LBA4404 بوده است (۰/۲ درصد). به عبارت دیگر، سویه EHA105 در رقم الوند گندم کارایی کمتری نسبت به کارایی این سویه در سایر ارقام داشته است.

در مورد غلظت های مختلف AS نیز مشاهده شد که عدم استفاده از این ماده منجر به کاهش کارایی انتقال ژن شده است که نشان دهنده اثر مثبت این ترکیب فنولیک در این دو گیاه است (Zhao et al. 2001). افزایش غلظت AS تا غلظت ۲۰۰ μM در ارقام برنج



شکل ۴- کارایی انتقال ژن اثرات متقابل سویه های باکتری (EHA105 و LBA4404) و شرایط خلأ همراه با سه رقم برنج (حسن سرایی، گرده و بینام) و سه رقم گندم (آذر ۲، سرداری و الوند).

Figure 4 - Transformation efficiency of three cultivars of rice (Hasan saraiy, Gordeh and Binam) and three cultivars of wheat (Azar 2, Sardary and Alvand). The interaction effects of bacterial strains (EHA105 and LBA4404) and vacuum are presented in this figure.

مکانیسم های گیاهی هدف بالقوه برای سرکوب باکتری هستند که از جمله آن ها سیگنال دهی کلسیم است (Aslam *et al.* 2008). بر این اساس میزان سرکوب ژن های دفاعی در رقم حسن سرایی برنج و آذر و سرداری گندم احتمال دارد بیشتر از سایر ارقام بوده و میزان بیان آن ها به طور معنی دار کاهش یافته است. احتمال دیگر تأخیر در فعال شدن این ژن ها در ارقام مذکور بوده است زیرا زمان و شدت فعال شدن ژن های مقاومت اثر زیادی در واکنش سازگار یا ناسازگاری دارد (Kiedrowski *et al.* 1992) و بنابراین شاید علت موفقیت برخی سویه ها در بهره برداری بهتر از ماشین سلول میزبان در برخی ارقام شده است. از طرفی ارقام برنج و گندم استفاده شده در این آزمون "ارقام محلی" هستند. این قبیل ژنوتیپ ها بر خلاف ارقام "اصلاح شده" دارای تنوع ژنتیک داخل جمعیت و بین جمعیت بالایی هستند و واکنش های مقاومت در مقابل پاتوژن را می توان از آن ها انتظار داشت. شاید استفاده از ارقام اصلاح شده در مقایسه با ارقام محلی، به سبب تنوع ژنتیک به طور نسبی کمتر، بهتر می توانست کنش متقابل ژنوتیپ های گیاه و سویه های باکتری را آشکار کند.

بررسی کارایی انتقال ژن در شرایط خلأ و اثرهای متقابل سویه های باکتری (EHA105 و LBA4404) و ارقام برنج و سه رقم گندم استفاده شده نشان داد که ایجاد کوتاه مدت شرایط خلأ منجر به افزایش کارایی انتقال ژن می شود به طوری که کارایی انتقال ژن همراه با سویه EHA105 با استفاده از شرایط خلأ و

AS بر روی رشد باکتری اثر سمیت و ممانعت کنندگی دارد (Saharan *et al.* 2004). در زمینه بهبود انتقال ژن ارقام مختلف برنج، سویه EHA105 و غلظت $100 \mu\text{M}$ AS به عنوان یک شرایط بهینه برای انتقال ژن معرفی شده است (Hiei *et al.* 2008). هر دو سویه EHA105 و LBA4404 در گیاهان و آزمایش های مختلف سویه های مناسب برای انتقال ژن غلات معرفی شده اند. در این آزمایش و در ارتباط با ارقام برنج و گندم مورد استفاده کارایی انتقال ژن سویه EHA105 به طور معنی داری بالاتر از سویه LBA4404 بوده است. سویه EHA105 به دلیل داشتن ژن های اضافی بیماری زا نسبت به سویه LBA4404، فوق بیماری زا با دامنه میزبانی وسیع است. در انتقال ژن در بیشتر مواقع از سویه های با قدرت بیماری زا بالا و سرعت رشد سریع استفاده می شود (Wang. 2006).

بر اساس پژوهش های انجام شده در این آزمایش، سویه های مختلف باکتری دارای شدت و درجه بیماری زایی متفاوتی در ارقام مختلف گیاهان برنج و گندم بوده اند. باکتری ها تکامل یافته اند تا با به کارگیری انواع فاکتورها شامل مواد سمی، آنزیم ها، هورمون ها، پلی ساکاریدها و مهم ترین آن ها فاکتورهای پروتئینی نوع سوم ایجاد بیماری کنند. بسیاری از این فاکتورها برای سرکوب ژن های مقاومت گیاه و آزادسازی مواد غذایی به کار گرفته می شوند. این شرایط فیزیولوژیک منشا استقرار و تکثیر سلول های باکتری است (Jones and Dangle. 2001). تعدادی از

(Xu et al. 2004)، لویبا (Liu et al. 2005) و برنج (Lin et al. 2009) نیز گزارش شده است.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه‌های آماری در نهایت مشخص شد که رقم حسن سرایی در گیاه برنج و اگروباکتریوم سویه‌ی EHA105، با حضور $100\mu\text{M}$ AS همراه با استفاده از شرایط خلأ (به میزان ۱/۱ درصد) دارای برتری در کارایی انتقال ژن نسبت به سایر ارقام برنج و گندم بود. ارقام گیاه برنج مورد استفاده در این پژوهش نسبت به ارقام گندم کارایی انتقال ژن بالاتری نسبت به ارقام گیاهان گندم داشتند که دلیل آن می‌تواند تفاوت‌های عمده ژنتیک میان این گیاهان باشد. قابل ذکر است که در بین ارقام گندم مورد استفاده در این پژوهش، ارقام آذر ۲ و سرداری در سویه‌ی EHA105 از اگروباکتریوم، با حضور $200\mu\text{M}$ AS همراه با استفاده از شرایط خلأ کارایی معنی‌دار (به میزان ۰/۵۵ درصد) داشتند. با استفاده از نتایج بدست آمده از این پژوهش می‌توان کاربرد موفقیت‌آمیز روش انتقال ژن *in planta* با واسطه‌ی *Agrobacterium tumefaciens* را در انتقال ژن ارقام مختلف بومی برنج و نیز ارقام مختلف گندم گزارش داد.

لازم به توضیح است که گیاهان حاصل از انتقال ژن در این پژوهش باید سایر آزمون‌های مولکولی را بگذرانند تا تراریخته بودن آن‌ها تایید شود بنابراین این گیاهان ترانسفورم شده هستند تا تراریخته. در ضمن لازم به توضیح است که خانم صدیقه نصرمرزی و آقای محسن ایمان‌زاده سهم مساوی در انجام آزمایش داشته‌اند.

بدون استفاده از آن به ترتیب در رقم آذر ۲ ۰/۶۸ و ۰/۵۵ درصد، در رقم سرداری ۰/۵۹ و ۰/۵۵ درصد و در رقم الوند ۰/۴ و ۰/۲ درصد بوده است و نیز کارایی انتقال ژن همراه با سویه‌ی EHA105 با استفاده از شرایط خلأ و بدون استفاده از آن به ترتیب در رقم حسن سرایی برنج ۱/۳۵ و ۱/۱ درصد، در رقم گرده ۱/۲ و ۰/۸۹ درصد و در رقم بینام ۰/۹۴ و ۰/۷۹ درصد بود. همچنین در سویه‌ی LBA4404 نیز این افزایش کارایی در مقدار انتقال ژن مشاهده می‌شود به‌طوری که کارایی انتقال ژن با استفاده از شرایط خلأ و بدون استفاده از آن به ترتیب در گندم رقم آذر ۲، ۰/۳۷ و ۰/۱ درصد، در رقم سرداری ۰/۵۴ و ۰/۴ درصد و در رقم الوند ۰/۶ و ۰/۵ درصد بود. همچنین در برنج رقم حسن سرایی با استفاده از شرایط خلأ و بدون استفاده از آن به ترتیب ۱/۱ و ۰/۹۵ درصد، در رقم گرده ۰/۸۱ و ۰/۷ درصد و در رقم بینام ۰/۱۸ و ۰/۰۵ درصد بود (شکل ۴).

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش استفاده از شرایط خلأ پس از انجام تلقیح بذور، منجر به افزایش کارایی انتقال ژن شد که احتمالاً دارد به سبب بهبود راندمان ورود باکتری به داخل فضای بین سلول‌های گیاهی بوده است. ضمن اینکه آسیب ناشی از شرایط خلأ در حدی نیست که آسیب جدی به اپی کوتیل این غلات وارد کند. اولین گزارش مربوط به استفاده از خلأ جهت انتقال ژن، مربوط به گیاه آراییدوپسیس است (Bechtold et al. 1993). استفاده از خلأ جهت تلقیح، در گیاهان دیگر از قبیل کلزا

منابع

1. Aslam SN, Newman MA, Erbs G, Morrissey KL, Chinchilla D, Boller T, Tandrup Jensen T, De Castro C, Ierano T, Molinaro A, Jackson RW, Knight MR. 2008. Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Current Biology* 18:1078-1083.
2. Bartels MS. 2011. Population genetics of cell-to-cell movement of wheat streak mosaic virus. University of Nebraska-Lincoln.
3. Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. 1993. *In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*. C. R. Academy of Science. Paris Life Science 316: 1194-1199.
4. Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115: 971-980.
5. Chumakov MI, Rozhok NA, Vlikov VA, Tyrnov VS, Volokhina IV. 2006. *Agrobacterium-mediated in planta transformation of maize via pistil filaments*. *Russian Journal of Genetic* 42: 893-897.
6. Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian W, Chen S, Beachy R, Fauquet C. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium mediated transformation and particle bombardment*. *Molecular Breeding* 7: 25-33.
7. Dangi JL, Jones JDG. 2000. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
8. Dye F, Berthelot K, Griffon B, Delay D, Delmotte FM. 1997. Alkylsyringamides, new inducers of *Agrobacterium tumefaciens vir* gene induction expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 379-383.

9. Gelvin SB. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction. *Molecular Biology* 343: 77-84.
10. He Y, Jones HD, Chen S, Chen XM, Wang DW, Li KX, Wang DS, Xia LQ. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv Stewart) with improved efficiency. *Journal of Experiment Botanic* 61: 1567-1581.
11. Hiei Y, Komari T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryo or calli induced from mature seed. *Nature*. 3: 824-834.
12. Imanzade M. 1391. Possibility of *Agrobacterium* - mediated transformation of Iranian wheat (*Triticum aestivum* L.) using *in planta* approach. M.Sc. Thesis, Guilan University, Rasht, Iran. (In Farsi)
13. Janice M, Zale S, Agarwal S, Loar CM, Steber. 2009. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Report* 28: 903-913.
14. Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology* 5: 387-450.
15. Kiedrowski S, Kawalleck P, Hahlbrock K, Somssich, I E, Dangl JL. 1992. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus. *EMBO Journal* 11, 4677-4684.
16. Lin J, Zhou B, Yang Y, Mei J, Zhao X, Guo X, Huang X, Tang D, Liu X. 2009. Piercing and vacuum in filtration of mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice. *Plant Cell Report* 28: 1065-1074.
17. Liu Z, Park BJ, Kanno A, Kameya T. 2005. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. *Molecular Breeding* 16: 189-197.
18. Mohan JS. 2001. Tissue culture-derived variation in crops improvement. *Journal of Plant Breeding* 118: 153-160.
19. Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
20. Raineri D, Bottino P, Gordon M, Nester E. 1990. *Agrobacterium* transformation of rice (*Oryza sativa* L.) *Biotechnology* 8: 33-38.
21. Razzaq A, Hafize I, Mahmood I, Hussain A. 2011. Development of *in planta* transformation protocol for wheat. *African Journal of Biotechnology* 740-750.
22. Saharan V, Yadav RC, Yadav NR, Rab K. 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 3 (11): 572-575.
23. Supartana P, Shimizu T, Shiori H, Nogawa M, Nozue M, Kojima M. 2005. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) Using *Agrobacterium tumefaciens*. *Bioscience and Bioengineer* 100: 391-397.
24. Supartana P, Shimizu T, Nogawa M, Hidenari S, Nakajima T, Haramoto N, Nozue M, Kojima M. 2006. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Bioscience and Bioengineer* 102 (2): 162-170.
25. Wang K. 2006. *Methods in Molecular Biology*, vol. 343: *Agrobacterium* Protocols, 2/e, volume 1 Humana Press Inc., Totowa, NJ.
26. Wang MB, Waterhouse PM. 1997. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. *Plant Molecular Biology Report* 15: 209-215.
27. Wu H, Sparks C, Amoah B, Jones HD. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Report* 21: 659-668.
28. Xu GS, Rao YQ, Chen Y, Zhang CY, Meng JL. 2004. Genetic transformation of *Brassica napus* with *in planta* method. *Acta Agronomy Sinica* 30: 1-5.
29. Yu XD, Shalitin X, Liu M, Maymon J, Klejnot H, Yang J, Lopez X, Zhao KT, Bendehakalu L, Chentao L. 2007. Depression of the NC80 motif is critical for the photo activation of *Arabidopsis* CRY2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 7289-7294.
30. Zhao TJ, Zhao SY, Chen HM, Zhao QZ, Hu ZM, Hou BK, Xia GM. 2006. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. *Plant Cell Report* 25: 1199-1204.
31. Zhao Z, Sagulenko E, Ding Z, Christie PJ. 2001. Activities of *virE1* and *virE1* secretion chaperone in export of the multifunctional *virE2* effectors via an *Agrobacterium* type IV secretion pathway. *Journal of Bacteriology* 183: 3855-3865.

ارزیابی پاسخ‌های مولکولی دو رقم گندم به قارچ عامل زنگ قهوه‌ای

Puccinia triticina E.

Molecular Analysis of Two Commercial Wheat Cultivars in Response to Brown Rust Agent *Puccinia triticina* E.

عارفه اصغری^۱، ولی‌اله بابایی‌زاد^{۲*}، محمدعلی تاجیک قنبری^۲، صفرعلی مهدیان^۲
Arefeh Asghari¹, Valiollah Babaeizad^{*2}, Mohammad Ali Tajik Ghanbari²,
Safar Ali Mahdian

۱ و ۲- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

1 and 2- Postgraduate and Assistant Professor of Plant-Pathology in Sari
University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: babaeizad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۴)

چکیده

واژه‌های کلیدی

زنگ قهوه‌ای گندم
ژن‌های مقاومت
cDNA
qRT-PCR

بیماری‌های گیاهی یکی از محدودیت‌های بزرگ در تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌روند. زنگ قهوه‌ای با عامل *Puccinia triticina*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم است. با توجه به اینکه، استفاده بیش از حد از مواد شیمیایی در کشاورزی جهت کنترل بیماری‌ها، سبب آلودگی محیط زیست و مقاومت پاتوژن‌ها به این مواد می‌شود، پیدا کردن روشی جایگزین برای مدیریت بیماری‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. امروزه پیشرفت‌های گسترده در علم زیست‌شناسی مولکولی فهم بشر را از تعاملات بین گیاه-بیمارگر، ژن‌های دخیل در مقاومت و مسیرهای سیگنال‌دهی بهبود بخشیده است. این یافته‌ها می‌تواند راهکار ژنتیک مناسب و کارآمدی را به منظور افزایش مقاومت گیاهان به بیمارگرها پیش روی پژوهشگران قرار دهد. در این میان ژن‌های مقاومت گیاهان (R genes)، منابع ژنتیک با ارزشی هستند که می‌توان از آن‌ها در راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به عوامل تنش‌زا استفاده کرد. این پژوهش با هدف غربالگری ۵ رقم تجاری و ۱۵ لاین تا حدودی ایزوژنیک گندم و تجزیه مولکولی دو رقم تجاری گندم در تعامل با قارچ *P. triticina* انجام شد. بر اساس نتایج غربالگری، رقم مروارید به عنوان رقم حساس و رقم آرتا به عنوان ژنوتیپ مقاوم انتخاب شدند. گیاهچه‌های گندم، در مرحله دو برگه، با سوسپانسیون اسپور قارچ *P. triticina* تیمار و نمونه‌برداری از برگ‌های اول در ساعات مختلف پس از آلودگی انجام شد. آر.ان.ای کل از نمونه‌های برگه استخراج و پس از ساخت دی.ان.ای مکمل (cDNA)، بیان ژن‌ها با استفاده از روش Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیان ژن‌های *Lipase*، *PAL* و *LTP* در رقم مقاوم آرتا نسبت به رقم حساس مروارید، پس از مایه‌زنی به شدت افزایش یافت. یافته‌های حاصل از این پژوهش حاکی از نقش فعال ژن‌های فوق در مکانیسم‌های مقاومت گیاه گندم با *P. triticina* هستند.

مقدمه

گندم یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که نقش مهمی در تغذیه جوامع بشری دارد. بیماری زنگ قهوه‌ای با عامل *Puccinia triticina* Eriks. که به زنگ برگی نیز معروف است، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در برخی نقاط دنیاست (Knott, 1989; McIntosh et al. 1995). این بیماری در جهان در درجه اول و در ایران بعد از زنگ زرد، در درجه دوم اهمیت قرار دارد. بهترین شیوه کنترل این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم است. مقاومت از خصوصیات ژنتیک میزبان است که متخصصین اصلاح نباتات از آن برای تولید ارقام مقاوم استفاده می‌کنند. از لاین‌هایی که در یک بررسی مقاوم تشخیص داده می‌شوند می‌توان در برنامه به‌نژادی دیگر، به‌عنوان منبع مقاومت استفاده کرد. مقاومت ژنتیک، میزان مصرف سموم شیمیایی را کاهش داده و یا حذف می‌کند و در نتیجه به عنوان اقتصادی‌ترین و از لحاظ زیست‌محیطی، سالم‌ترین روش مبارزه با بیماری‌های گیاهی مطرح است (Roelfs et al. 1992).

دفاع در گیاهان بر پایه سدهای دفاعی اولیه و پاسخ‌های القایی استوار است (Grover and Gowthaman, 2003). این واکنش‌های اولیه، پیش‌نیاز آغاز شبکه‌های سیگنالی بوده که سبب راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی سراسری می‌شوند. به‌دنبال حمله پاتوژها ممکن است سلول‌های دورتر از نقطه رخنه هم در برابر آلودگی‌های بعدی مقاوم شوند، پدیده‌ای که به‌نام مقاومت سیستمیک اکتسابی^۱ خوانده می‌شود. در بسیاری از گونه‌های گیاهی، SAR توسط افزایش سیستمیک سالیسیک اسید^۲ به راه می‌افتد (Thomma et al. 1998). مقاومت سیستمیک القایی^۳، نوعی مقاومت است که در اثر حمله سودوموناس و ریزوباکترهای غیربیماری‌زا بر روی ریشه گیاه القا می‌شود و حفاظت سیستمیک علیه قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها ایجاد می‌کند. در بیشتر موارد پدیده ISR، مستقل از تولید و تجمع سالیسیلیک اسید و پروتئین‌های در ارتباط با بیماری‌زایی است و نیازمند پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید^۴ و اتیلن است. مکانیسم دقیق ISR به‌طور کامل

مشخص نیست ولی به‌نظر می‌رسد پاسخ‌های دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید و اتیلن توسط نکروتروف‌ها و پاسخ‌های وابسته به SA توسط بیوتروف‌ها فعال شود. به‌هرحال هم‌پوشانی بین مسیرهای سیگنالی مختلف و گاهی اثرهای سینرژیستی، بین مسیرهای مختلف وابسته به SA، اتیلن و JA گزارش شده است (Thomma et al. 1998). هر ۳ مسیر دفاعی در ارتباط با افزایش نسخه‌های ژن‌های دفاعی زیادی هستند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی^۵، به‌طور معمول به‌عنوان پروتئین‌های خاص میزبانی بوده که به‌طور طبیعی در گیاهان غیرآلوده در سطح بسیار پایین تولید، ولی پس از حمله پاتوژها، حشرات و جونده‌ها، هم‌چنین پس از جراحات و شرایط استرس‌زای محیطی افزایش می‌یابند (Van Loon et al. 2006).

PAL^۶، آنزیمی حیاتی در مسیر فنیل پروپانویید است که نقش مهمی را در مقاومت گیاهان از طریق دخالت در مسیرهای ساخت ایزوفلاونوییدها^۷ و فنیل پروپانوییدها^۸ که فعالیت فیتوالکسینی دارند ایفا می‌کند. این پروتئین هم‌چنین در ترکیبات لیگنین، سوپرین و دیگر مواد فنلی دیواره سلولی گیاه میزبان که در محل حمله بیمارگر در ساختارهایی مانند پایپلا، به‌منظور جلوگیری از گسترش هیف‌های قارچ تجمع می‌یابند، به‌عنوان یک پیش‌ماده عمل می‌کند. افزایش بیان ژن PAL در بررسی‌های متعدد، به‌عنوان ژن دخیل در مقاومت، با اثر مستقیم در افزایش SA، فعال کردن ژن *NPR1* و به‌دنبال آن بیان ژن‌های *PR* و نیز القای سریع مرگ سلولی به اثبات رسیده است (Fitzgerald et al. 2004). در پژوهش‌های انجام شده، نقش موثر PAL در پاسخ‌های دفاعی گیاهان علیه پاتوژها اثبات شده است (Zhu et al. 1995). نقش مهم PAL در پاسخ‌های دفاعی پس از عفونت با قارچ عامل زنگ ساقه (سیاه)^۹، در گندم اثبات شده است (Li and Liao, 2003).

Lipase آنزیمی است که توانایی هیدرولیز استرها را دارد و نقش اختصاصی تبدیل تری‌گلیسرید به گلیسرول و اسید چرب را ایفا می‌کند که به این عمل لیپولیز می‌گویند. لیپاز از لحاظ

5- Pathogenesis Related Proteins

6- Phenyl alanin ammonia lyase

7- isoflavonoids

8- phenylpropanoids

9- *Puccinia graminis f.sp. tritici*

1- Systemic acquired resistance (SAR)

2- Salicylic acid (SA)

3- Induce Systemic Resistance (ISR)

4- Jasmonic acid (JA)

راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به عوامل تنش‌زا استفاده کرد. این پژوهش با هدف ارزیابی درجه مقاومت ۱۵ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک و ۵ رقم تجاری گندم در پاسخ به جدایه مشخصی از قارچ عامل زنگ قهوه‌ای، بر اساس تراکم جوش یا میانگین تعداد جوش‌ها در واحد سطح انجام شد. هم‌چنین نرخ بیان ژن‌های *Lipase*, *PAL* و *LTP* در ارقام حساس و مقاوم گندم تجاری انتخاب شده، در زمان‌های مختلف پس از آلوده‌سازی به عامل زنگ قهوه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: در این بررسی جدایه زنگ قهوه‌ای مربوط به منطقه ساری (با شماره ایزوله ۲۰-۹۰)، ۵ رقم تجاری گندم شامل آرتا، دریا، مروارید، تاج و مغان ۳ و هم‌چنین ۱۵ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک گندم شامل *Lr11*, *Lr10*, *Lr9*, *Lr3*, *Lr2a*, *Lr1*, *Lr12*, *Lr16*, *Lr19*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28* و *Lr34* (با توجه به نتایج حاصل از پژوهش‌های مورفولوژیک پیشین) به منظور تعیین درجه مقاومت و حساسیت در آزمایش‌های غربالگری و سپس تجزیه مولکولی حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ارقام، انتخاب و از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد.

تکثیر اسپور: برای تکثیر جدایه قارچ، اسپور به روش تک جوش خالص و سپس بر روی برگ اول گیاهچه‌های ۷ روزه رقم حساس بولانی، مایه‌زنی شد. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در محیط تاریک، در دمای ۱۵ تا ۱۷ درجه سلسیوس و در رطوبت اشباع، به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس به گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵ درصد منتقل شدند. اسپور خالص تکثیر شده در ویال‌های پلاستیکی و در فریزر با دمای ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری و برای فعال کردن مجدد اسپورها، ویال‌های پلاستیکی به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس بن‌ماری و سپس در دسیکاتور حاوی آب مقطر به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شدند.

تولید گیاهچه‌های همسان جهت آزمون غربالگری: جهت غربالگری لاین‌های اصلی، ۲۰ عدد بذر از هر لاین به مدت ۲۴ ساعت در ظرف حاوی آب مقطر و سپس بر روی کاغذ صافی

زیست‌شناسی، دگرگونی چربی‌ها را به‌وسیله هیدرولیز باندهای *acyl glycerol* در *fatty acyl ester* آغاز می‌کند (Carriere et al. 1994). لیپازها را می‌توان زیرمجموعه‌ای از استرازها دانست که تری، دی و مونوگلیسیریدهای موجود در حفاصل بین روغن-آب را هیدرولیز می‌کنند. در پژوهش‌های انجام شده بر روی ویژگی‌های ژنتیک قارچ‌های عامل زنگ، افزایش قابل توجهی در میزان بیان چند نوع آنزیم لیپاز در برگ‌های گندم آلوده به زنگ سیاه، مشاهده شده است. این مسئله می‌تواند بیانگر نقش این پروتئین در مقاومت باشد (Duplessis et al. 2011).

LTP^{۱۰} یا پروتئین‌های انتقال دهنده لیپید، از اعضای خانواده PR14 هستند که دارای فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی قوی هستند (Molina et al. 1993). در سلول‌های گیاهی، لیپید یا چربی، از محل اصلی ساخت خود یعنی شبکه آندوپلاسمی^{۱۱} به غشاهای درون‌سلولی مانند کلروپلاست و غشای میتوکندری منتقل می‌شود که این پروتئین‌ها مسئول انتقال چربی در داخل سلول هستند (Wirtz, 1991). گروهی از این پروتئین‌ها انتقال بین‌غشایی انواع دیگری از ملکول‌های آلی به غیر از چربی را نیز تسهیل می‌کنند که *None specific-LTP* نامیده می‌شوند (Pozanski et al. 1999). افزایش بیان^{۱۲} یکی از انواع *LTP* در ژنوتیپ حساس گندم، موجب افزایش مقاومت آن در برابر *Fusarium graminearum* و قارچ عامل پوسیدگی معمولی ریشه، *Cochliobolus sativus* می‌شود (Zhu et al. 2012). نرخ بیان پروتئین *LTP* در لاین مقاوم گندم آلوده به زنگ قهوه‌ای در مقایسه با لاین حساس در سطح بالاتری قرار دارد (Hulbert et al. 2007).

یکی از رویکردهای مهندسی ژنتیک برای مبارزه با آفت‌ها و بیماری‌های گیاهی، مقاوم کردن گیاه از طریق دست‌کاری ژنتیک و انتقال ژن است. تولید گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های سمی که در مقابل آفت‌ها و بیمارگرهای خاصی بسیار سمی و مؤثر بوده و در عین حال برای انسان، گیاه، محیط زیست و حشرات مفید، زیانی ندارند، از مثال‌های کاربردی مهندسی ژنتیک در کشاورزی است. ژن‌های مقاومت گیاهان (*R genes*)، منابع ژنتیک با ارزشی هستند که می‌توان از آن‌ها در

10- Lipid Transfer Proteins

11- ER

12- Overexpress

ساعت روشنایی و رطوبت ۷۵ درصد نگهداری شدند. نمونه‌گیری از برگ‌های اول گیاهچه‌ها در زمان پیش از مایه‌زنی و در ساعات ۱۲، ۲۴ و ۴۸ پس از تلقیح انجام گرفت و پس از پودر شدن با ازت مایع در فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج آر.ان.ای و زدودن دی.ان.ا ژنومی از نمونه‌ها: محتوی آر.ان.ای کل از برگ‌های نمونه‌برداری شده در زمان‌های مختلف با استفاده از کیت RNxplus (شرکت سیناژن) انجام شد. به منظور زدودن دی.ان.ای ژنومی از نمونه‌های آر.ان.ای، از کیت RQ1 RNase-free DNase ساخت شرکت Fermentas طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

بررسی کیفیت و کمیت آر.ان.ای استخراجی: به‌منظور بررسی کیفیت آر.ان.ای استخراجی از دو روش استفاده شد. نمونه‌های استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE (40mM Tris acetate, 1 mM EDTA 1X) بررسی شدند. ژل در اتیدیوم بروماید ($0.5 \mu\text{g/mL}$) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از شستشو با آب مقطر با UV دستگاه ژل‌خوان کدک از آن عکس‌برداری شد. درجه خلوص و غلظت نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

ساخت cDNA و بررسی کیفیت: cDNA با استفاده از کیت Revert Aid First Standard cDNA (شرکت Fermentase) و بر اساس دستورالعمل، از محتوی آر.ان.ای کل استخراج شده ساخته شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. تکثیر قطعات cDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس^{۱۳} و جفت آغازگر بتا-اکتین انجام شد. ارزیابی محصول واکنش پی.سی.آر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE صورت گرفت.

بررسی میزان بیان ژن‌ها به کمک روش Quantitative real-time PCR: بیان ژن‌ها بوسیله qRT-PCR، و با استفاده از کیت Syber green و آغازگرهای مربوطه در دستگاه M*3000P (BioRad) thermal cycler انجام شد. $2 \mu\text{L}$ از cDNA رقیق شده (50 ngr) از هر نمونه به‌عنوان الگو در واکنش‌ها استفاده شد و به ترکیب: $1 \mu\text{L}$ از هر آغازگر، $7/5 \mu\text{L}$ سایبرگرین و $8/5 \mu\text{L}$

درون تشتک پتری استریل قرار داده شد. پس از مرطوب کردن کاغذ صافی با آب مقطر، برای یکنواخت‌تر شدن جوانه‌زنی، پتری‌ها در ژرمیناتور و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و بعد از ۴۸ ساعت بذور جوانه زده به گلدان‌های حاوی خاک استریل منتقل شدند. گیاهچه‌ها در اتاقک رشد با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سلسیوس، با رطوبت نسبی ۷۵ درصد و به مدت یک هفته نگهداری شدند.

برگ‌های اول گیاهچه‌های ۷ روزه، بریده و در پتری‌های حاوی محیط کشت نیمه جامد water agar نیم درصد حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر بنزیمیدازول قرار داده شدند. برگ‌های مربوط به لاین‌های ایزوژنیک و ارقام تجاری به‌طور تصادفی و با تکرارهای مساوی در کنار هم در هر پتری پخش شدند. این آزمایش ۲ مرتبه تکرار و در هر تکرار ۱۴ برگ از هر لاین بررسی شد. به منظور مایه‌زنی، از سوسپانسیون حاوی 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی توین ۲۰ استفاده و سوسپانسیون بر روی نمونه‌ها اسپری شد. پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ژرمیناتور تاریک و در دمای ۱۵ تا ۱۷ درجه سلسیوس و با رطوبت اشباع نگهداری و سپس به گلخانه با دمای ۲۰-۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۵ درصد منتقل شدند.

ارزیابی تیپ آلودگی: دوازده روز بعد از مایه‌زنی، ارزیابی میزان حساسیت هر لاین براساس شمارش تعداد جوش در سطح معینی از برگ‌های آلوده (تعداد جوش‌ها در $2/5$ سانتی متر مربع از هر برگ) و بوسیله استریو میکروسکوپ، صورت گرفت. تجزیه آماری داده‌ها در ۲ تکرار انجام شده آزمون غربالگری، با روش Duncan's Multiple Range Test، انجام شد.

مایه‌زنی و جمع‌آوری نمونه جهت تجزیه ملکولی: جهت بررسی ملکولی ارقام تجاری آرتا (ژنوتیپ مقاوم) و مروارید (ژنوتیپ حساس) بر اساس نتایج غربالگری انتخاب شدند. گیاهچه‌های ۷ روزه ارقام مورد آزمایش در تجزیه ملکولی (آرتا و مروارید)، با سوسپانسیون اسپور تهیه شده به غلظت 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر، مایه‌زنی شدند. گیاهچه‌ها در اتاق رشد به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای ۱۵ تا ۱۷ درجه سلسیوس و رطوبت اشباع و سپس در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس تناوب ۱۶

جدول ۱- جفت آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز.

Table 1- Properties and Nucleotide sequences of primers used in qRT-PCR.

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	طول نوکلئوتید (bp)	دمای اتصال (°C)
<i>TaActin</i>	F: GGAAAAGTGCAGAGAGAACG R: TACAGTGTCTGGATCGGTGG	150	60
<i>TaLipase</i>	F: CACAAAATATCGACCCACCAC R: ACTGGGTATTCTGTCGTCAGC	145	60
<i>TaLTP</i>	F: ACGTAGGTACTCCTCTCGCTGT R: GTTGATCGACCACTTCTTCTCA	148	60
<i>TaPAL</i>	F: CCAATGTTCTGTCCGTCCTT R: CTTGAGCTTGTGGGTCAGGT	150	60

قهوه‌ای (تعداد جوش در ۲/۵ سانتی‌متر مربع از هر نمونه) با روش Duncan's Multiple Range Test، نشان داد که اختلاف بین لاین‌های مقاوم در مقایسه با لاین‌های حساس در میزان حساسیت به قارچ عامل زنگ قهوه‌ای در سطح پنج درصد معنی‌دار است ($P \leq 0.05$) (شکل ۱ و ۲).

بر این اساس، در بین ارقام تجاری، رقم آرتا و در بین لاین‌های به‌طور تقریبی ایزوژنیک *Lr2a* بیشترین نرخ مقاومت را نشان دادند. هم‌چنین رقم مروارید و *Lr11* به ترتیب در بین ارقام تجاری و لاین‌های به‌طور تقریبی ایزوژنیک، بیش‌ترین میزان حساسیت را نشان دادند. در مجموع بیش‌ترین مقاومت به ترتیب در آرتا، *Lr2a*، *Lr26*، *Lr19*، *Lr28*، *Lr24* و مغان ۳ مشاهده شد و *Lr11*، *Lr16*، *Lr1*، *Lr10*، *Lr21*، *Lr12*، *Lr3*، *Lr34*، *Lr25* تجن، دریا و مروارید حساس‌ترین ارقام و ژنوتیپ‌ها ارزیابی شدند (شکل ۱ و ۲).

در این بررسی شمارش تعداد کلنی‌های قارچ عامل بیماری در تکرارهای لاین ایزوژنیک *Lr9* ناهمگن بوده که به نظر می‌رسد این امر به دلیل عدم خلوص بذور در لاین فوق باشد. از این‌رو از بیان نتایج مربوط به این لاین صرف نظر شده است.

بخشی از نتایج این بررسی در ارتباط با ژنوتیپ‌های *Lr* با یافته‌های قبلی مطابقت دارد (Afshari et al. 2005; Afshari, 2008). در پژوهش‌های انجام شده توسط افشاری و همکاران در سال ۱۳۸۶، برای لاین‌های حاوی ژن‌های *Lr34*، *Lr36*، *Lr37*، *Lr29*، *Lr28*، *Lr25*، *Lr19*، *Lr18* و *Lr9* بیماری‌زایی مشاهده نشد و در تمامی مناطق مورد بررسی واکنش مقاومت

آب (حجم نهایی: ۲۰ μL) افزوده شد. پارامترهای دمایی جهت تکثیر مطابق زیر است.

- ۱- مرحله واسرشته‌سازی اولیه: ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس.
 - ۲- مرحله واسرشته‌سازی: ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس.
 - ۳- مرحله اتصال آغازگر: ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس.
 - ۴- مرحله تکثیر: ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس.
 - ۵- مرحله تکثیر نهایی: ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس.
- و ۴۰ مرتبه چرخش بین مراحل ۲ الی ۴.

لیست آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش نیز در جدول ۱ آمده است. در تمام آزمایش‌ها از ژن $\beta\text{-Actin}$ به‌عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. تمام واکنش‌های پی‌سی‌آر در ۲ تکرار انجام گرفت. تجزیه داده‌ها: تجزیه داده‌های دستگاه Real time با نرم‌افزار Bio-Rad cfx manager انجام شد. نرخ بیان هر ژن در این روش با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak and Schmittgen, 2001) محاسبه شد.

$$\Delta\Delta\text{CT} = (\Delta\text{CT} - \text{نمونه کنترل}) - \text{نمونه آزمایش}$$

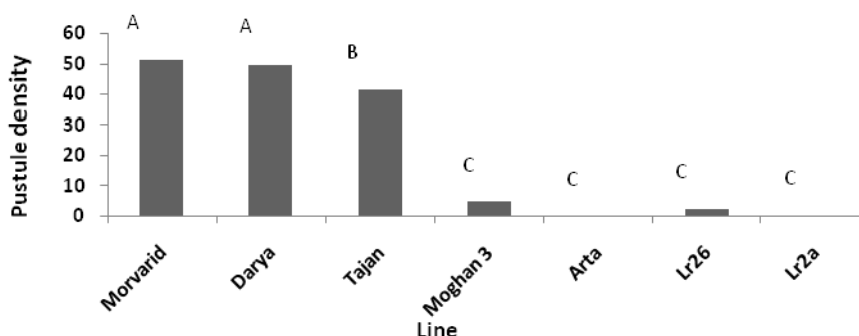
$$\Delta\text{CT} = (\text{C}_T \text{ ژن خانه‌دار} - \text{C}_T^{14} \text{ ژن هدف})$$

تجزیه داده‌ها، با محاسبه STDEV و TTEST در نرم‌افزار اکسل، انجام گرفت.

نتایج و بحث

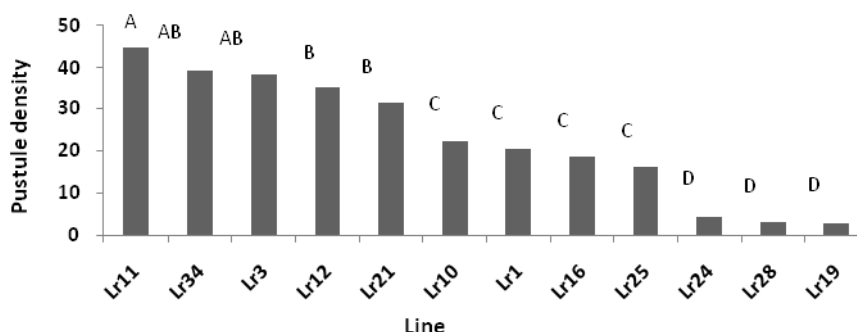
تجزیه آماری نتایج حاصل از واکنش غربالگری ۱۴ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک و ۵ رقم تجاری گندم در مقابل جدایه زنگ

14- Threshold Cycle (Ct)



شکل ۱- نتایج آزمون غربالگری ۵ رقم تجاری و ۲ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک گندم در مقابل با قارچ عامل زنگ قهوه‌ای گندم.

Figure 1- The result of screening 5 commercial and 2 near-isogenic lines of wheat in response to *P. triticina*.



شکل ۲- نتایج آزمون غربالگری ۱۴ لاین به‌طور تقریبی ایزوژنیک گندم در مقابل با قارچ عامل زنگ قهوه‌ای گندم.

Figure 2- The result of screening 14 near-isogenic lines of wheat in response to *P. triticina*.

شد و نرخ بیان این ژن پس از زمان اوج کاهش یافت و مجدداً در زمان ۴۸ (در اثر عفونت ثانویه) همزمان با تشکیل هوستوریوم و انشعابات شبکه میسیلیومی قارچ افزایش یافت. میزان رونوشت‌های این ژن در رقم مقاوم آرتا در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی، به ترتیب ۱۷/۲، ۴ و ۷/۲۲ برابر زمان صفر به عنوان شاهد بوده است (شکل ۳). نرخ بیان این ژن در رقم مروارید در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۴/۰۳، ۲/۹۸ و ۳/۹۷ برابر زمان صفر این رقم بوده است (شکل ۳). بیان ژن *PAL* در زمان اوج در رقم مقاوم آرتا ۴/۲ برابر آن در زمان مشابه در رقم حساس مروارید بود. آزمون مقایسه‌ای *t*-test نیز اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۱ و ۱ درصد به ترتیب در زمان‌های ۱۲ و ۴۸ پس از مایه‌زنی بین این دو رقم نشان داده است (شکل ۳).

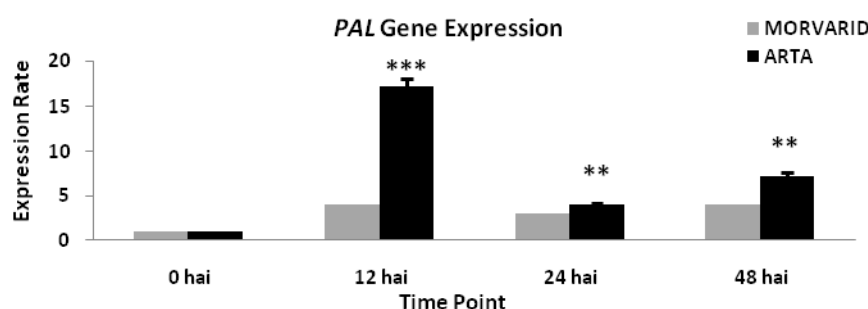
ژان‌کوان و همکاران (۲۰۰۹)، در پژوهش‌های خود بر روی

نشان دادند (Afshari et al. 2005). در پژوهش‌های انجام شده توسط افشاری در سال ۱۳۸۹، برای لاین‌های حاوی ژن‌های *Lr19*, *Lr23*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr32*, *Lr36*, *Lr2a* و *Lr14* بیماری‌زایی مشاهده نشد و در تمامی مناطق مورد بررسی واکنش مقاومت نشان دادند (Afshari, 2008).

بررسی بیان ژن‌های دفاعی در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*

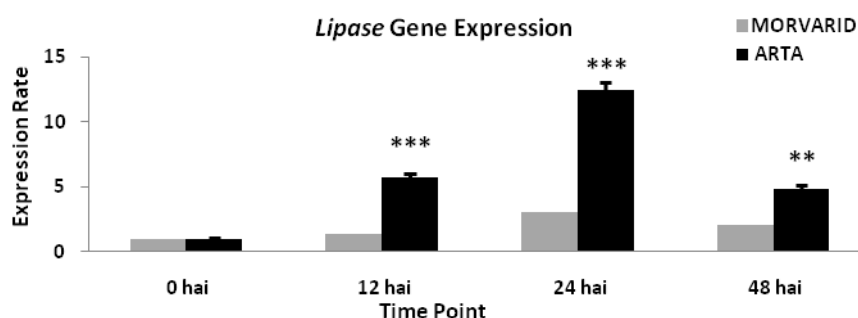
نرخ بیان ژن *PAL* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*: میزان بیان ژن *PAL* در پاسخ به آلودگی در هر دو رقم آرتا و مروارید، در ساعات پس از مایه‌زنی^{۱۵} افزایش یافت. بیشینه بیان این ژن نیز در ساعت ۱۲ پس از مایه‌زنی همزمان با جوانه‌زنی و تشکیل germ tube در هر دو لاین مشاهده

15- Hour after inoculation (hai)



شکل ۳- نرخ بیان ژن *PAL* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*. بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با **، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد با * و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 3- Effect of *P. triticina* on PAL activity in susceptible (Morvarid) and resistant (Arta) uninfected (0 hai) and infected (12, 24 and 48 hai) wheat. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two cultivars ($P<0.001=***$, $P<0.01=**$, $P<0.05=*$).



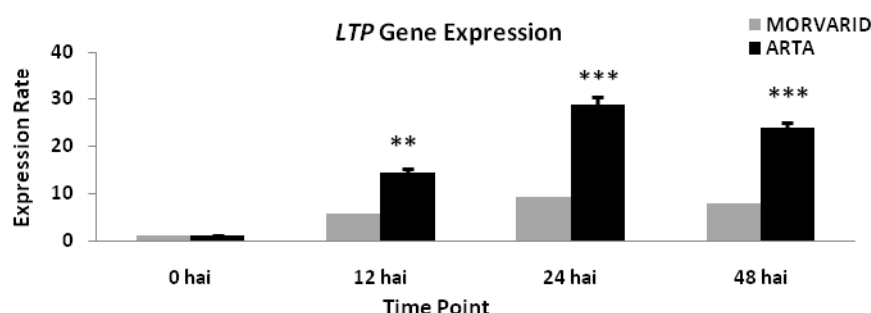
شکل ۴- نرخ بیان ژن *Lipase* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*. بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با **، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد با * و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با *** مشخص شده است.

Figure 4- Effect of *P. triticina* on Lipase activity in susceptible (Morvarid) and resistant (Arta) uninfected (0 hai) and infected (12, 24 and 48 hai) wheat. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two cultivars ($P<0.001=***$, $P<0.01=**$, $P<0.05=*$).

میخ‌رخنه به بیشینه سطح خود می‌رسد. نرخ بیان این ژن در هر دو رقم پس از زمان اوج کاهش می‌یابد. بیان این ژن در رقم آرتا در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۵/۷۵، ۱۲/۴۳ و ۴/۸۴ برابر زمان صفر به‌عنوان شاهد بوده است (شکل ۴). نرخ بیان این ژن در رقم مروارید در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۱/۳۵، ۳/۰۲ و ۲/۰۹ برابر زمان صفر این رقم بوده است (شکل ۴). بیان ژن *Lipase* در زمان اوج در رقم مقاوم آرتا ۴/۱ برابر آن در زمان مشابه در رقم حساس مروارید بوده است. آزمون مقایسه‌ای t-test نیز اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۱ درصد در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ بین این دو رقم نشان

بررسی نقش G پروتئین‌ها در زنگ قهوه‌ای گندم، افزایش فعالیت آنزیم دفاعی PAL را در همان مراحل اولیه آلودگی و سریع‌تر از سایر PR پروتئین‌ها مشاهده کردند (ZhanQuan et al. 2009). در پژوهش‌های انجام شده توسط پاول (۲۰۱۰) در رابطه با بیان ژن *PAL* در برابر زنگ زرد فعالیت ضد میکروبی آن در مراحل اولیه پس از آلودگی مشاهده شده است (Powell, 2010).

نرخ بیان ژن *Lipase* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*: بیان ژن *Lipase* در هر دو رقم آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ زنگ قهوه‌ای افزایش می‌یابد و در ساعت ۲۴ پس از آلودگی همزمان با تشکیل آپرسوریوم و به دنبال آن



شکل ۵- نرخ بیان ژن *LTP* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. trititica*. بر اساس آزمون t-test اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با **، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد با *** و اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۱ درصد با **** مشخص شده است.

Figure 5- Effect of *P. trititica* on LTP activity in susceptible (Morvarid) and resistant (Arta) uninfected (0 hai) and infected (12, 24 and 48 hai) wheat. Analysis of data by Student's t-test showed significant difference between two cultivars ($P<0.001=***$, $P<0.01=**$, $P<0.05=*$).

در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۵/۵۹، ۹/۱۷ و ۸/۰۰ برابر زمان صفر این رقم بوده است (شکل ۵). بیان ژن *LTP* در زمان اوج در رقم مقاوم آرتا ۳/۱ برابر آن در زمان مشابه در رقم حساس مروارید بود. آزمون مقایسه‌ای t-test نیز اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۱ درصد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ بین این دو رقم نشان داده است (شکل ۵).

مولینا و گارسیا اولمدو (۱۹۹۴) در پژوهش اثر ژن *LTP* در پاسخ‌های دفاعی جو به پاتوژن‌ها، مشاهده کردند که سطح بیان این ژن پس از آلودگی به قارچ عامل سفیدک پودری *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* در رقم مقاوم افزایش یافته و در ساعت ۱۶ پس از مایه‌زنی به اوج خود رسید که با نتایج این بررسی مطابقت دارد (Molina and Olmedo, 1993). بر اساس پژوهش‌های انجام شده توسط ژنگ و همکاران (۲۰۱۰) سطح بیان ژن *LTP2* در لاین مقاوم گندم پس از آلودگی به زنگ زرد افزایش یافت و در زمان ۲۴ پس از آلودگی به اوج خود رسید و سپس به‌طور منظمی کاهش یافت که با نتایج این بررسی مطابقت دارد (Zeng et al. 2010). لی و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی نقش ژن *LTP* در مقاومت گندم به قارچ عامل سفیدک پودری *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* به افزایش قابل ملاحظه رونوشت‌های این ژن در لاین مقاوم در مقایسه با لاین حساس در ساعات اولیه پس از آلودگی و سپس کاهش تدریجی آن پی بردند (Li et al. 2006).

داده است (شکل ۴).

در بررسی انجام شده توسط لو و همکاران (۲۰۰۵)، میزان بیان ژن لپاز در هر دو لاین مقاوم و حساس گندم، پس از آلودگی با عامل سیاهک معمولی گندم *Tilletia tritici*، افزایش داشته است و در ساعت ۱۶ پس از آلودگی به حداکثر سطح خود رسیده است و سپس به صورت تدریجی کاهش یافت. البته نرخ بیان این آنزیم در لاین مقاوم، همواره بیشتر از لاین حساس بوده است (Lu et al. 2005). همچنین در مطالعه انجام شده توسط باقری بجستانی و همکاران (۲۰۱۲)، نرخ بیان ژن لپاز، در لاین مقاوم گندم در برابر قارچ عامل *Fusarium graminearum* FHB، در ساعت ۱۲ پس از آلودگی به بیشترین سطح خود رسید که بیانگر نقش مثبت این ژن در مقاومت است که با نتایج این بررسی مطابقت دارند (Bagheri Bajestani et al. 2012).

نرخ بیان ژن *LTP* در ارقام آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ *P. trititica*: بیان ژن *LTP* در هر دو رقم آرتا و مروارید پس از آلودگی با قارچ زنگ قهوه‌ای، افزایش می‌یابد و در ساعت ۲۴ پس از آلودگی، همزمان با تشکیل آپرسوریوم و به دنبال آن میخ رخنه، به بیشترین سطح خود می‌رسد. نرخ بیان این ژن در هر دو رقم پس از زمان اوج به تدریج کاهش یافت. بیان این ژن در رقم آرتا در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی به ترتیب ۱۴/۵۴، ۲۸/۸۴ و ۲۳/۸۶ برابر زمان صفر به‌عنوان شاهد بوده است (شکل ۵). بیان ژن *LTP* در رقم حساس مروارید نیز

نتیجه‌گیری

نرخ بیان ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش در رقم مقاوم آرتا در مقایسه با ژنوتیپ حساس مروارید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و هم‌چنین سطح بیان این ژن‌ها در نمونه‌های شاهد (پیش از آلودگی) در هر دو لاین مورد بررسی در این آزمایش بسیار پایین بود. این نتایج حاکی از نقش مثبت این ژن‌ها در مکانیسم‌های مقاومت گیاه‌گندم در پاسخ به آلودگی قارچ عامل زنگ قهوه‌ای است. به‌طور کلی ژنوتیپ‌های مختلف عکس‌العمل فیزیولوژیک و ژنتیک یکسانی را در برابر حمله بیماری‌گرها نشان نمی‌دهند. عملکرد صفت پیچیده‌ای است که تحت تاثیر اثر متقابل ژنوتیپ و محیط است. برای دستیابی به حداکثر تولید، مقاوم بودن به آفات و بیماری‌ها ضروری است. عوامل بیماری‌زای قارچی، باکتریایی و ویروسی در مقاطع مختلف از مرحله رشد گیاه بیشترین خسارت را به محصول وارد می‌کنند. مهندسی ژنتیک همواره سعی بر دستیابی به گیاهانی را دارد که حاوی ژن‌های مطلوب مقاومت به آفت‌ها و بیماری‌ها هستند. کاهش هزینه کشاورزان از طریق

کاهش مصرف سموم، افزایش کمیت و کیفیت محصول و از سوی دیگر کاهش صدمات وارده به منابع زیستی مثل خاک و آب‌های زیرزمینی از جمله مزیت‌های حاصل از کاربرد گیاهان تراریخته است.

با توجه به نتایج این پژوهش و یافته‌های گذشته نتیجه‌گیری می‌شود که ژن *PAL* که در افزایش اسید سالیسیک به‌طور مستقیم نقش دارد و خود به‌عنوان ملکول سیگنال با فعال کردن ژن *NPR1*، موجب بیان ژن‌های *PR* (*PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5* و ...) می‌شود، در تولید گیاهان تراریخته، توصیه می‌شود. ارزیابی این ژن‌ها با استفاده از روش افزایش بیان و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی در راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم که نقش مهمی در برنامه‌های مقاومت ژنتیک و ایمنی زیستی دارند پیشنهاد می‌شود. امید است که نتایج حاصل از این پژوهش در درک بهتر مقاومت گندم به قارچ عامل زنگ قهوه‌ای و توسعه استراتژی‌های جدید در مبارزه با این بیماری از طریق تولید گیاهان تراریخته موثر باشد.

منابع

1. Afshari F 2008. Identification of virulence factors of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust in Iran. In: Proceedings of 11th International Wheat Genetics Symposium, Brisbane, Australia, 106 P.
2. Afshari F, Torabi M, Kia S, Dadrezai S, Safavi SA, Chaichi M, Nasrolahi M, Karbalai Khiavi H, Zakeri A, Bahrami Kamangar S, Patpour M, Ebrahimnejad S. 2005. Monitoring of virulence factors of *Puccinia triticina* Eriksson, the causal agent of wheat leaf rust in Iran during 2002-2004. Seed and Plant 21:485-500 (in Farsi with English abstract).
3. Bagheri Bajestani F, Ramezanzpour S, Soltanloo H, Vakili Bastam S. 2012. Study on differentially *Lipase* gene expression against different inducers of defense response in scab-resistant and susceptible wheat cultivars. J Rec Adv Agri 1(1):6-14.
4. Carriere F, Thirstrup K, Boel E, Verger R, Thim L. 1994. Structure-function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase. Protein Engineering 7(4):563-569.
5. Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel BL 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(22):9166-9171.
6. Fitzgerald HA, Chern MS, Navarre R, Ronald PC. 2004. Overexpression of (At) *NPR1* in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. Molecular Plant-Microbe Interactions 17(2):140-151.
7. Grover A, Gowthaman R. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Curr. Sci 84:330-40.
8. Hulbert SH, Bai J, Fellers JP, Pcheco MG, Bowden RL. 2007. Gene expression patterns in near isogenic lines for wheat rust resistance gene *Lr34/Yr18*. Phytopathology 97:1083-1093.
9. Knott DR 1989. The wheat rusts. Breeding for Resistance. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 201 pp.
10. Li HP, Liao YC. 2003. Isolation and characterization of two closely linked phenylalanine ammonia-lyase genes from wheat. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China, 30(10):907-12.
11. Li AL, Meng CS, Zhou RH, Ma ZY, Jia JZ. 2006. Assessment of *Lipid Transfer Protein (LTP1)* gene in wheat powdery mildew resistance. Agricultural Sciences in China 5(4):101-105.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 to the (-Delta Delta Ct) method. Methods 25:402-408.
13. Lu Z, Gaudet DA, Frick M, Puchalski B, Genswein

- B, Laroche A. 2005. Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(4):420.
14. McIntosh RA, Welling CR, Park RF. 1995. Wheat Rust: an atlas of resistance genes. CSIRO, Australia, 200 pp.
15. Molina A, Garcia-Olmedo F. 1993. Developmental and pathogeninduced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *Plant J* 6:983-991.
16. Molina A, Segura A, and Garcia-Olmedo F. 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett* 316:119-122.
17. Powell NM. 2010. Phenotypic and genetic analysis of yellow rust resistance in the UK winter wheat cultivar Claire. Research final Report. Research, Education and Extension organization. PhD thesis. University of East Anglia, Norwich.
18. Poznanski J, Sodano P, Suh SW, Lee JY, Ptak M, Vovelle F. 1999. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds: comparison with homologous proteins. *Eur. J. Biochem* 259:692-708.
19. Roelfs AP, Singh RP, Saari EE. 1992. Rust disease of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMIT, Mexico, D.F, 81pp.
20. Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:15107-11.
21. Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol* 44:135-62.
22. Wirtz KWA. 1991. Phospholipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem* 60:73-99.
23. Zeng X, Wang C, Ali M, Zhang H, Liu X, Li W, Ji W. 2010. Profiling gene expression patterns of strip rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) resistance gene in new wheat germplasm. *Pak. J. Bot* 42(6):4253-4266.
24. ZhanQuan Z, ShuiShan S, YingChun Z, WenXiang Y, DaQun L. 2009. Involvement of the heterotrimeric G protein in the defense responses of wheat to *Puccinia triticina*. *Scientia Agricultura Sinica* 42(1):117-123.
25. Zhu Q, Dabi T, Beeche A. 1995. Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Mol Biol* 29:535-50.
26. Zhu X, Li Z, Xu H, Zhou M, Du L, and Zhang Z. 2012. Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistance to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. *Funct Interg Genomics* DOI 10.1007/s10142-012-0286-z.