ردیابی و شناسایی گوجه‌فرنگی‌های تغییر یافته ژنتیکی با استفاده از تکنیک PCR و توالی‌یابی

فائزه فولادگر[۱]، مجید طالبی[۱*] و مسعود بهار[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۰)

چکیده

گیاهان تراریخته یکی از دستاوردهای مهم بیوتکنولوژی نوین در زمینه کشاورزی هستند و در سال‌های اخیر بر سطح زیر کشت این گیاهان افزوده شده است. طبق قانون بین‌المللی ایمنی زیستی، واردات گیاهان تراریخته بدون مجوز کمیته ایمنی زیستی به داخل کشور ممنوع است. لذا، نیاز به روش‌های دقیق برای ارزیابی تراریخته بودن یا نبودن آنها وجود دارد. در مطالعه حاضر، نمونه‌هایی از گوجه‌فرنگی از منابع مختلف مانند فروشگاه‌ها و گلخانه‌ها در سطح استان اصفهان جمع‌آوری شد تا به ظن تراریخته بودن، حضور ژن‌های ادغام شده خارجی در آنها ارزیابی شود. ابتدا، با آغازگرهای عمومی P35S F/R و NOS-1/NOS-3 که به‌ترتیب برای شناسایی پروموتور CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS مورد استفاده قرار می‌گیرند، قطعات نوکلئوتیدی به‌ترتیب ۱۹۵ bp و ۱۸۰ bp تکثیر شدند. همولوژی ۱۰۰٪ توالی نوکلئوتیدی این قطعات در مقایسه با نمونه‌های موجود در بانک ژنی تأیید نمود که محصولات مورد بررسی به لحاظ ژنتیکی دست‌ورزی شده‌اند. به‌منظور شناسایی گوجه‌فرنگی‌های تراریخته، جفت آغازگر PG F/R، اختصاصی برای تکثیر آنتی‌سنس ژن پلی‌گالاکتوروناز، به‌کار رفت. تمام نمونه‌هایی که باند مربوط به پروموتور P35S یا خاتمه‌دهنده NOS یا هر دو را داشتند، باند ۳۸۴ bp مربوط به قسمتی از آنتی‌سنس ژن PG را تکثیر کردند که پس از توالی‌یابی و هم‌ردیف‌سازی، شباهت ۱۰۰٪ این قطعه با بخشی از توالی ثبت شده ژن مزبور در بانک ژن محرز شد. نتایج این تحقیق نشان داد که گوجه‌فرنگی تراریخته در بازار ایران وجود دارد، بدون آنکه مصرف‌کنندگان از ماهیت تغییر یافته آن اطلاع داشته باشند.

کلمات کلیدی: گوجه‌فرنگی، تراریخته، PCR، ردیابی

مقدمه

با پیشرفت علم و ظهور تکنولوژی‌های نوین زیست‌فناوری، اصلاح میوه‌ها و سبزی‌ها با هدف افزایش کیفیت، مواد مغذی و زمان نگهداری آنها و همچنین تولید گیاهان مقاوم به آفات و تنش‌های محیطی از طریق تولید گیاهان تراریخته صورت می‌گیرد (۷). تاکنون آثار زیان‌آور و ابعاد مخاطره‌آمیز محصولات تراریخته و بیوتکنولوژی به‌طور قطعی و علمی به اثبات نرسیده است. اما دانشمندان و متخصصین این رشته نمی‌توانند و نباید آثار منفی احتمالی این محصولات را بر محیط‌زیست و سلامتی انسان نادیده بگیرند.

۱. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtalebi@cc.iut.ac.ir

از آنجا که بعضی از محصولات وارداتی به کشور از مبادی گمرکی وارد نشده و کنترل نمی‌شود، بنابراین شناسایی محصولات تراریخته یکی از مشکلات عمده سازمان‌های بازرگانی و تحقیقاتی است (۲). با این حال، تحقیقات اندکی در این رابطه در کشورمان انجام شده است. طبق بررسی‌های انجام شده، تنها در پژوهشی که در سال ۲۰۱۱ صورت گرفت، برای اولین بار حضور ذرت تراریخته در محصولات غذایی فراوری شده در بازار ایران با استفاده از روش PCR کیفی گزارش شد (۲۶).

برای شناسایی و تشخیص محصولات تراریخته (GMO)، روش‌های مختلفی ابداع شده‌اند. براساس نوع روش مورد استفاده، GMO ها را می‌توان در سطوح مختلف از جمله RNA، DNA، پروتئین، متابولیت‌ها یا فنوتیپ حاصل از ژن انتقال‌یافته شناسایی کرد. روش مورد استفاده باید به‌گونه‌ای باشد که بتواند محصولات مختلف GMO شامل انواع غذاها و فراورده‌های کشاورزی را به‌صورت کمّی و با حداکثر حساسیت، اطمینان، تکرارپذیری و با حداقل خطا شناسایی کند (۳۰).

در آزمون‌های آنالیزی روی مواد خام مانند بذرها، معمولاً از آزمون‌های زیستی مانند زیست‌سنجی علف‌کش برای ارزیابی فنوتیپ حاصل از ژن انتقالی (۲۰)، آزمون‌های ایمیونولوژیک برای شناسایی پروتئین حاصل و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت کاوش DNA درج شده، استفاده می‌شود (۲۴). در حال حاضر، تنها آزمون زیستی در دسترس، برای شناسایی صفت مقاومت به علف‌کش است که زیست‌سنجی علف‌کش نامیده می‌شود و شامل انجام آزمایش جوانه‌زنی در محیط کشت جامد در حضور علف‌کش است که در آن بذرهای GMO و غیر GMO ویژگی‌های متفاوتی را نشان می‌دهند (۲۰).

تشخیص براساس DNA دارای دقت و حساسیت بسیار زیادی است و قابل کمّی‌سازی نیز است. معمول‌ترین روش‌های تشخیص GMO براساس DNA، روش ساترن بلات (Southern Blot) و PCR است. در روش ساترن بلات، هیچ تکثیری صورت نمی‌گیرد و تنها از یک پروب استفاده می‌شود. درحالی که در PCR از دو آغازگر استفاده شده و به‌دلیل تکثیر DNA، مقادیر اندک نیز قابل ردیابی است (۴).

در حال حاضر، پرکاربردترین روش برای شناسایی محصولات تراریخته، استفاده از روش PCR است (۲۰ و ۲۲). راه‌انداز و خاتمه‌دهنده‌ای که اکثراً در ژن‌های دست‌ورزی شده وجود دارد، راه‌انداز CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS است (۱۰ و ۳۰). ترکیبی از دو روش غربالگری برای شناسایی این دو توالی DNA، حدود ۸۰٪ از محصولات زراعی تراریخته را در سراسر دنیا شناسایی می‌کند (۹). پروموتور CaMV35S به‌عنوان یک نشانگر جهانی در تجزیه و تحلیل ۹۵٪ گیاهان تراریخته استفاده می‌شود (۱۲) و بیش از ۵۶٪ از محصولات تراریخته دارای یک کپی از این پروموتور هستند. خاتمه‌دهنده NOS در ۳۷٪ از محصولات تراریخته تأیید شده وجود دارد (۶). در پژوهشی در سال ۲۰۰۸ برای شناسایی لاین‌های کلزای تراریخته مجاز و غیرمجاز در کشور کانادا از دو عنصر پروموتور 35S و خاتمه‌دهنده NOS استفاده شد (۸). در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۲، این دو عنصر در ردیابی و شناسایی سه لاین پنبه تراریخته R3، JK99 و RCH2 استفاده شدند (۲۷). همچنین، در پژوهشی در سال ۲۰۰۱، از این دو عنصر در غربالگری عمومی سویاهای تراریخته از طریق PCR کمک گرفته شد (۱۷). معمولاً پس از ارزیابی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از روش غربالگری عمومی و تشخیص تراریخته بودن آنها، به شناسایی نوع ژن افزوده شده به آنها اقدام می‌شود (۲۰). در پژوهشی در سال ۲۰۱۱، به‌منظور شناسایی نمونه‌های ذرت، سویا و برنج تراریخته در محصولات فراوری شده، از طریق روش Multiplex Nested PCR، از آغازگرهایی که برای تکثیر ژن‌های Cry1A(b) و CP4-EPSPS وجود دارند، استفاده شد (۵). همچنین، در پژوهشی در سال ۲۰۱۲، برای شناسایی پنبه‌های تراریخته از طریق PCR، از آغازگرهایی که برای تکثیر پروموتور 35S و خاتمه‌دهنده NOS و ژن Cry1Ac وجود دارند، استفاده شد (۲۷).

اولین موافقت برای فروش تجاری یک فراورده غذایی تراریخته، تولید گوجه‌فرنگی تراریخته با نام تجاری Flavar savar با تأخیر در رسیدگی میوه بود که توسط شرکت کالژن (Calgene) ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۹۴ تولید شد (۳ و ۳۰). آگاهی از

اینکه فرایند رسیدگی، در اثر فعال شدن ژن‌های خاص نظیر ژن رمزکننده‌ی پلی‌گالاکتوروناز (PG) رخ می‌دهد، زمینه همسانه‌سازی این ژن‌ها را فراهم کرد. تغییر ژنتیکی نرمی میوه نشان داد که می‌توان یک ویژگی معین را از راه کاهش بیان ژن داخلی به‌کمک روش‌های آنتی‌سنس و بازدارندگی توأم دست‌ورزی کرد (۲۹). با وارد کردن یک نسخه‌ی اضافی از ژن PG به ژنوم گوجه‌فرنگی، که ژن را در جهت مخالف کد می‌کند و هیبرید شدن رونوشت‌های RNAهای راست- جهت (sense) و عکس- جهت (antisense) که به‌ترتیب حاصل رونویسی ژن درونی و بیرونی‌اند و توالی مکمل یکدیگر دارند، منجر به کاهش مقدار در دسترس mRNA راست- جهت برای ترجمه به پروتئین می‌شود. کاهش بیان پلی‌گالاکتوروناز، تجزیه‌ی پکتین را کاهش می‌دهد و در نتیجه تخریب دیواره‌ی پکتینی سلول‌ها را کند کرده و نرم شدن میوه به تأخیر می‌افتد. همراه با این ژن، نشانگر یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک، کدکننده‌ی آنزیم نئومایسین فسفوترانسفراز۲ (NPTII)، که آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مانند کانامایسین و نئومایسین را غیرفعال می‌کند، تحت کنترل راه‌انداز CaMV35S و خاتمه‌دهنده NOS استفاده شده است. بنابراین، هدف از این تحقیق، ردیابی نشانگر ژنی، پروموتور و خاتمه‌دهنده و سپس شناسایی ژن انتقال یافته از طریق PCR به‌منظور ردیابی گوجه‌فرنگی‌های تراریخته در بازار ایران است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

نمونه‌هایی از گوجه‌فرنگی شامل چهار نمونه برگی از گلخانه‌ای در تیران اصفهان، سه نمونه برگی از گلخانه‌ای در نجف‌آباد، یک نمونه برگی از گلخانه‌ای در شاهین‌شهر و دو نمونه کاسبرگ از گوجه‌فرنگی‌های موجود در فروشگاهی در شهر اصفهان جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه منتقل شد. همچنین، یک نوع سویای تراریخته به‌عنوان کنترل مثبت، با نام Roundup Ready(M96-133109) اهدایی دکتر دانش از دانشگاه Minnesota، که دارای پروموتور P35S، خاتمه‌دهنده NOS و ژن CP4-EPSPS است، آماده شد.

استخراج DNA ژنومی و تعیین کمیت و کیفیت آن

به‌منظور استخراج DNA از برگ و کاسبرگ گوجه‌فرنگی، روش Jobes و همکاران (۱۴) مورد استفاده قرار گرفت. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از هر نمونه در مقایسه باغلظت استاندارد DNA فاژ لامبدا بریده شده با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Hind*III تعیین شد. با بررسی میزان کشیدگی DNA و بقایای آلودگی‌های پلی‌ساکاریدی در چاهک کیفیت DNA ارزیابی و با مقایسه ضخامت باندهای DNA استخراج شده با تراکم باندهای DNA نشانگر اندازه III، غلظت DNA نمونه‌ها تخمین زده شد. در نهایت، با اضافه کردن آب مقطر استریل، میزان غلظت نمونه‌ها تا حدود ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم شد.

واکنش PCR کنترلی

در اکثر روش‌های تجزیه وتحلیل محصولات تراریخته بر مبنایPCR، از یک ژن مرجع داخلی، که به‌طور طبیعی در تمام نمونه‌های گیاهی مورد بررسی وجود دارد، به‌عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده و کارآیی واکنش PCR و افزایش اطمینان استفاده می‌شود (۵). در این پژوهش، از جفت آغازگر RBCL-F/RBCL-R (جدول ۱) که برای تشخیص ژن زیر واحد بزرگ آنزیم ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز-اکسیژناز (RBCL) وجود دارد و در تمام نمونه‌های گیاهی مشترک است، به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندروف مدل Master Cycler Gradient شامل ۶۰ نانوگرم DNA، بافر PCR، ۱/۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۵ پیکومول از هر یک از آغازگرها و یک واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر و با برنامه دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، یک دقیقه در دمای اتصال (در هر ۱۰ چرخه به‌ترتیب ۶۵، ۶۰ و ۵۸ درجه سلسیوس) و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و نهایتاً یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برنامه‌ریزی شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

ردیف	نام جفت آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (bp)	منبع آغازگر
۱	RBCL-F RBCL-R	5`-AATCTTCTACTGGTACATGGAC-3` 5`-TCATCATCTTTGGTAAAATCAAG-3`	۴۳۳	(۲۵ و ۲۸)
۲	NOS-1 NOS-3	5`- GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG-3` 5`- TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA-3`	۱۸۰	(۱۸)
۳	P35S-F P35S-R	5`- GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3` 5`- GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3`	۱۹۵	(۱۸)
۴	NPTII-F NPTII-R	5`-GACAGGTCGGTCTTGACAAAAAG-3` 5`-GAACAAGATGGATTGCACGC-3`	۱۵۵	(۲۳)
۵	PG-F PG-R	5`-GGATCCTTAGAAGCATCTAGT-3` 5`-CGTTGGTGCATCCCTGCATGG-3`	۳۸۴	(۱۰)

غربالگری با استفاده از آغازگرهای عمومی

از آنجا که اکثر محصولات تراریخته، شامل پروموتور CaMV 35S و یا خاتمه‌دهنده NOS و ژن مارکر NPTII هستند، بنابراین شناسایی و تعیین کیفی حضور ژن تراریخته در ابتدا توسط PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی که برای این توالی‌ها وجود دارد، انجام شد (۱۵، ۲۰ و ۳۰). مواد PCR برای جفت آغازگرهای NOS-1/NOS-3، P35S-F/ P35S-R و NPTII-R/NPTII-F مشابه با PCR کنترلی آماده شد. برنامه دمایی همانند PCR کنترلی تنظیم شد. اما دمای اتصال برای آغازگر P35S ۵۶ و آغازگرهای NOS و NPTII ۵۴ درجه سلسیوس بهینه‌سازی شد.

شناسایی گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته

در این پژوهش، از جفت آغازگر اختصاصی PG-F/PG-R که برای تکثیر آنتی‌سنس ژن پلی‌گالاکتورونـاز وجود دارد (۱۱)، برای شناسایی گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته از طریق PCR اقدام شد. واکنش PCR و برنامه دمایی مشابه دیگر واکنش‌های PCR و با دمای اتصال ۶۵ درجه سلسیوس انجام شد.

بررسی محصول PCR به‌وسیله الکتروفورز ژل آگارز

جهت مشاهده باندهای حاصل از تکثیر قطعات در واکنش PCR، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شده و در چاهک ژل آگارز ۱/۲ درصد بافر TBE تخلیه شد. همچنین، نشانگر اندازه bp ۱۰۰ و ۵۰ جهت تخمین اندازه باندهای تکثیر شده در یک چاهک کنار نمونه‌ها تخلیه شد. ژل به‌مدت یک ساعت در میدان الکتریکی با شدت V/cm ۹ الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید در دستگاه Viber Lourmat Gel Document تحت اشعه فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار گرفت و عکس‌برداری شد.

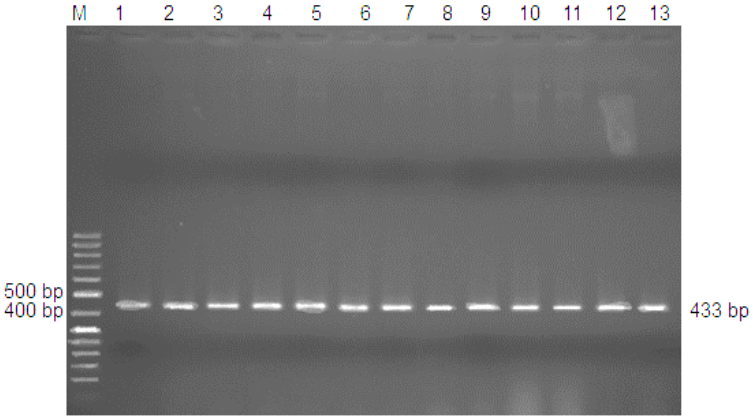
توالی‌یابی قطعات DNA تکثیرشده با آغازگرهای مورد استفاده

قطعات DNA تکثیرشده از نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از جفت آغازگرهای مورد استفاده به‌روش PCR، به‌منظور تعیین هویت آنها و تأیید صحت شناسایی نمونه‌های تراریخته با ارسال به شرکت Macrogene کره جنوبی، تعیین توالی نوکلئوتیدی شدند. پس از دریافت نتایج توالی‌یابی، الکتروگرام توالی هر نمونه با نرم‌افزار Chromas version 2.2 بررسی شد و پس از اطمینان از کیفیت مناسب آنها، در پایگاه اطلاعاتی NCBI (WWW.NCBI.nlm.nih.gov) با توالی‌های موجود در بانک ژن هم‌ردیف شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از PCR کنترلی روی نمونه‌های گوجه‌فرنگی

پس از انجام استخراج DNA، واکنش PCR با جفت آغازگر ژن کنترل داخلی RBCL F/R انجام شد. طی این واکنش، در همه



شکل ۱. تکثیر قطعه DNA ۴۳۳ جفت بازی از نمونه‌های گوجه‌فرنگی با جفت آغازگر RBCL F/R

نمونه‌های مورد بررسی یک باند ۴۳۳ جفت بازی مربوط به قسمتی از ژن RBCL تکثیر یافت (شکل ۱) و مشخص شد که DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت مناسبی برای انجام واکنش PCR برخوردار است. ژن RBCL در حال حاضر به‌طور گسترده به‌عنوان ژن کنترل داخلی در تشخیص گیاهان تراریخته، از جمله پاپایا، گوجه‌فرنگی، برنج و توت‌فرنگی استفاده می‌شود (۱۹).

نتایج حاصل از غربالگری عمومی برای تشخیص گوجه‌فرنگی‌های تراریخت

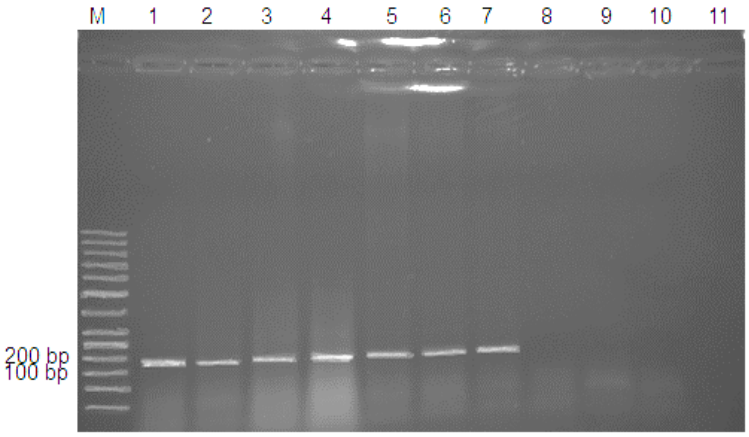
براساس استفاده از سیستم غربالگری عمومی، نسبت به ردیابی سه توالی (پروموتور CaMV 35S، خاتمه‌دهنده NOS و ژن نشانگر NptII) که معمولاً در اکثر محصولات تراریخت وجود دارد، اقدام شد (۴، ۱۵، ۲۰ و ۳۰). در این پژوهش، پس از انجام واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای NOS-1/NOS-3 روی ۱۰ نمونه گوجه‌فرنگی، شش نمونه به‌همراه نمونه کنترل مثبت سویا باند ۱۸۰ bp مربوط به قسمتی از خاتمه‌دهنده NOS را تکثیر کردند که پس از الکتروفورز روی ژل آگارز قابل مشاهده بود (شکل ۲).

خاتمه‌دهنده NOS که از ژن نوپالین سینتاز از باکتری اگروباکتریوم مشتق شده، در محصولات تراریخته برای خاتمه رونویسی ژن‌های ادغام شده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶). این خاتمه‌دهنده در ۳۷٪ از محصولات تراریخته تأیید شده وجود دارد (۶).

شکل (۳)، نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR با استفاده ازجفت آغازگر P35S-F/ P35S-R روی نمونه‌های گوجه‌فرنگی را نشان می‌دهد. این آغازگر امکان تکثیر یک قطعه ۱۹۵ bp، مربوط به قسمتی از توالی پروموتور P35S، را فراهم می‌کند. از ۱۰ نمونه گوجه‌فرنگی مورد آزمایش، در هفت نمونه باند مربوطه تکثیر شد. در یکی از نمونه‌ها (کد ۸) که توالی ۱۹۵ جفت بازی P35S در آن ردیابی شد، با جفت آغازگر NOS-1/NOS-3 تکثیر باند ۱۸۰ جفت بازی از خاتمه‌دهنده NOS ممکن نشده بود. در این مورد خاص، احتمال داده می‌شود که در فرایند تراریختگی این نمونه از خاتمه‌دهنده‌ای غیر از NOS استفاده شده باشد.

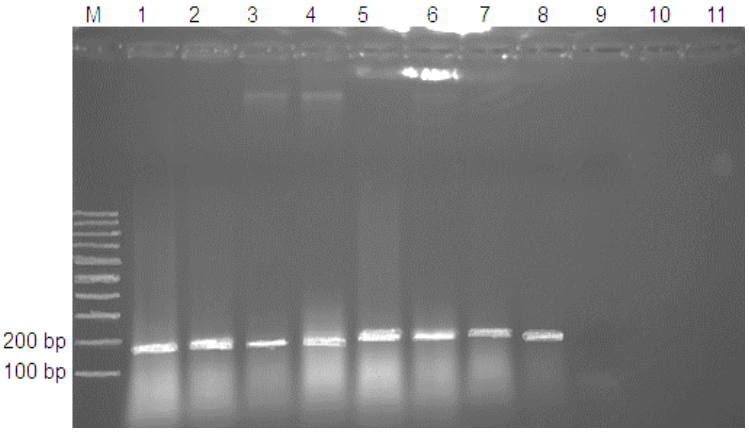
پروموتور ژن 35S RNA مربوط به ویروس موزاییک گل کلم (پروموتور 35S)، پرکاربردترین پروموتور استفاده شده برای کنترل بیان ژن‌ها در ناقل‌های گیاهی است (۱۶) و بیش از ۵۶٪ از محصولات تراریخته، دارای یک کپی از این پروموتور هستند. ردیابی P35S با واکنش PCR به‌طور گسترده در روش‌های غربالگری GMOها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶).

طی عملیات مربوط به تراریختگی گیاهی، احتمال دستیابی به گیاهان تراریخته زیاد نیست و معمولاً نمونه‌های تراریخته فراوانی کمی دارند. بنابراین، ضروری است جهت اطمینان از تراریخته بودن نمونه‌ها، حضور قسمت‌هایی از ناقل تراریختی را به‌عنوان



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR نمونه‌های گوجه‌فرنگی با استفاده ازجفت آغازگر NOS-1/NOS-3

M نشانگر اندازه (۵۰ bp)، چاهک ۱ کنترل مثبت (سویا)، چاهک‌های ۱۰-۲ نمونه‌های گوجه‌فرنگی و چاهک ۱۱ کنترل منفی(گوجه‌فرنگی بومی)



شکل ۳. الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR نمونه‌های گوجه‌فرنگی با استفاده ازجفت آغازگر P35S-F/P35S-R

M نشانگر اندازه (۱۰۰ bp)، چاهک ۱ کنترل مثبت (سویا)، چاهک‌های ۱۰-۲ نمونه‌های گوجه‌فرنگی و چاهک ۱۱ کنترل منفی (گوجه‌فرنگی بومی)

نشانگر در گیاهان تأیید کرد (۱). شاید کاربردی‌ترین نشانگر قابل گزینش، ژن NptII باشد که در برابر آنتی‌بیوتیک کانامایسین مقاومت ایجاد می‌کند (۳۰). به این دلیل، در غربالگری عمومی گوجه‌فرنگی‌های تراریخته، تشخیص ژن NptII اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد و تقریباً اکثر لاین‌های گوجه‌فرنگی تراریخت تأیید شده، از جمله ۴-۱۳۴۵، ۱N ۳۵، ۵۳۴۵، ۸۳۳۸، B-Da-F و Flavr Savr دارای ژن مقاومت به کانامایسین NptII هستند (۶). با این وجود، در این پژوهش، پس از انجام واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر NptII-F/NptII-R روی نمونه‌های گوجه‌فرنگی، هیچکدام از نمونه‌ها باند ۱۵۵ bp مربوط به تکثیر قسمتی از توالی ژن نشانگر NptII را نشان ندادند. احتمال می‌رود که پس از به‌دست آوردن گیاهان تراریخته در مراحل بعدی نسبت به حذف این ژن اقدام شده است. در واقع، از زمان ورود گیاهان زراعی تراریخته به بازار کشت‌وکار، نگرانی‌های عمومی در مورد ایمنی فرایند تراریختی، به‌ویژه در مورد ایمنی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و علف‌کش، به حدی رسیده که دولت‌ها را وادار به واکنش کرده است. بنابراین، حرکتی به سوی فناوری‌های ژن پاک صورت گرفته است که براساس آن نشانگر قابل گزینش در گیاهان مزرعه‌ای، دیگر وجود نداشته باشد و یا از یک نشانگر قابل قبول‌تر استفاده شود (۱).

یکی از مهم‌ترین مشکلات سیستم غربالگری محصولات تراریخته، نتایج غلط و گمراه‌کننده است. به این مفهوم که حضور یکی از اهداف غربالگری (پروموتور 35S، خاتمه‌دهنده NOS و ژن نشانگر NptII) لزوماً دلیلی بر حضور DNA مشتق شده از GMO نیست و ممکن است منبع پروموتور 35S ویروسی باشد که به‌طور طبیعی گیاه را آلوده کرده باشد (۱۳). به این ترتیب، غربالگری عمومی که پروموتور 35S یا خاتمه‌دهنده NOS را هدف قرار می‌دهد، نمی‌تواند بین عناصری که به‌طور طبیعی در گیاهان آلوده وجود دارد یا در دستواره‌های ژنتیکی GMOها حضور دارند، تفاوت قائل شود. به‌خصوص در مورد کلزا و دیگر اعضای خانواده براسیکا، که احتمالاً به‌طور طبیعی توسط ویروس موزائیک گل‌کلم آلوده شده‌اند، نتیجه مثبت از غربالگری پروموتور 35S ممکن است یک نتیجه‌گیری غلط (False- Positive) باشد (۲۰). همچنین، نشانگرهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک ممکن است در مرحله اولیه نمو گیاهان تراریخته حذف شوند (۲۱). بنابراین، با توجه به معایب استفاده از نشانگرهای پروموتور 35S، خاتمه‌دهنده NOS و ژن نشانگر NptII، برای شناسایی محصولات تراریخته، ضروری است از ردیابی ژن‌های اختصاصی منتقل شده به این گیاهان برای تشخیص تراریخته بودن آنها استفاده کرد.

اگرچه در این پژوهش وجود پروموتور P35S و خاتمه‌دهنده NOS در اکثر نمونه‌های گوجه‌فرنگی، تراریخته بودن آنها را اثبات کرد، ولی برای اطمینان از نتایج به‌دست آمده لازم بود شناسایی ژن ادغام شده در این نمونه‌های گوجه‌فرنگی‌های تراریخته مورد توجه قرار گیرد.

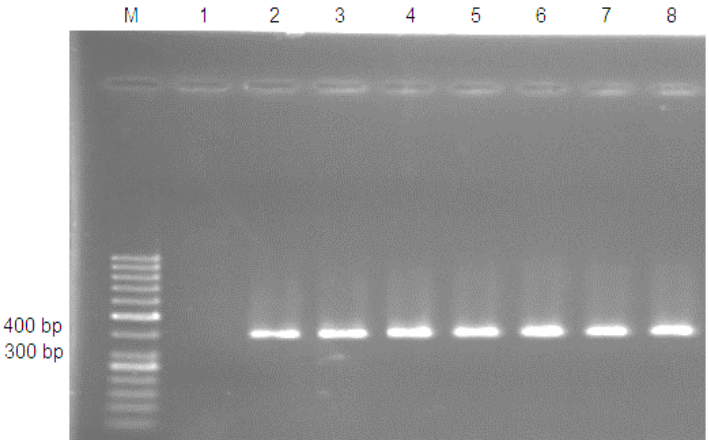
نتایج حاصل از شناسایی نمونه‌های گوجه‌فرنگی تراریخته

پس از ارزیابی نمونه‌ها با استفاده از روش غربالگری عمومی و تشخیص تراریخته بودن آنها، به شناسایی نوع ژن افزوده شده به آنها اقدام شد. از آنجا که اکثر مطالعات دست‌ورزی ژنتیکی گیاه گوجه‌فرنگی روی تأخیر در رسیدگی متمرکز شده‌اند (۳۰)، در این پژوهش، به‌منظور شناسایی گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخت، از جفت آغازگر PG-F/PG-R، که قابلیت تکثیر آنتی‌سنس ژن پلی‌گالاکتوروناز را دارد (۱۰)، استفاده شد. تمام نمونه‌هایی که باند مربوط به خاتمه‌دهنده NOS یا پروموتور P35S یا هر دو را داشتند یک قطعه DNA ۳۸۴ جفت بازی مربوط به قسمتی از آنتی‌سنس ژن پلی‌گالاکتوروناز را تکثیر کردند (شکل ۴). بنابراین، به‌نظر می‌رسد در تولید گوجه‌فرنگی‌های تراریخته مورد بررسی، صفت تأخیر در رسیدگی از طریق هدف‌گیری ژن پلی‌گالاکتوروناز به‌کمک روش آنتی‌سنس مورد توجه بوده است.

رسیدگی میوه، فرایندی فعال است که در میوه‌های خودرس مانند گوجه‌فرنگی با افزایش سریع تنفس، تولید اتیلن، نرم شدن و تغییرات رنگ و طعم همراه است. نرمی میوه بیشتر در نتیجه تجزیه دیواره یاخته‌ای به‌وسیله آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز و پکتین متیل استراز است. آنزیم پلی‌گالاکتوروناز به‌صورت Denevo، طی مراحل رسیدگی، تولید می‌شود و تخریب رشته پلی‌گالاکتورونیک اسید را به‌دنبال دارد. این رشته، چسب پکتینی تیغه میانی را که باعث اتصال یاخته‌های مجاور به یکدیگر می‌شود، تشکیل می‌دهد. آگاهی از این که فرایند رسیدگی در اثر فعال شدن ژن‌های مرتبط با آن نظیر ژن رمزکننده پلی‌گالاکتوروناز رخ می‌دهد، زمینه همسانه‌سازی این ژن‌ها را فراهم کرد (۱). در میوه‌های تراریخته، فعالیت پلی‌گالاکتوروناز در مرحله رسیدگی به مقدار زیادی کاهش یافت. افزون بر این، این کاهش فعالیت آنزیم باعث تأخیر در نرمی میوه شد. درحالی که اثری بر سایر وقایع رسیدن میوه نداشت. برای مثال، رنگدانه قرمز لیکوپن، حتی در زمان رسیدگی این میوه‌های تراریخته هنوز ذخیره می‌شد. درحالی که از تولید آنزیم نرمی میوه جلوگیری شده بود. تأثیر کاهش کارکرد پلی‌گالاکتوروناز در میوه تراریخته دارای PG کم، جلوگیری از تخریب پکتین و تولید پلی‌اورونیدهای بزرگ موجود در دیواره یاخته‌ای بود (۲۹).

نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعات ژنی P35S، NOS و PG

پس از انجام واکنش PCR با آغازگرهای P35S، NOS و PG، مشاهده قطعات ژنی تکثیر شده و بررسی غلظت و کمیت باندهای تکثیر شده روی ژل آگارز، به‌منظور تعیین هویت و



شکل ۴. قطعه ۳۸۴ جفت بازی تکثیر یافته ژن پلی‌گالاکتوروناز با استفاده از جفت آغازگر PG F/R

M نشانگر اندازه (۵۰ bp)، چاهک ۱ کنترل منفی (گوجه‌فرنگی بومی) و چاهک‌های ۸-۲ نمونه‌های گوجه‌فرنگی

تأیید صحت شناسایی نمونه‌های گوجه‌فرنگی تراریخته، محصول PCR این ژن‌ها برای تعیین توالی به شرکت Macrogene کره جنوبی ارسال شد. نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی قطعه ژنی مربوط به قسمتی از خاتمه‌دهنده NOS شباهت ۱۰۰٪ با pYBA-1159 Binary Vector- (Accession:KP100660.1) و pYBA-1139 Binary Vector (Accession: KP100659.1) را نشان داد. قطعه ژنی پروموتور P35S شباهت ۱۰۰٪ با توالی pGZ14.1021 Ti Plasmid Binary Vector (Accession:KP100426.1) و Cloning Vector pHQEFF-1 با شماره (Accession:KM5459.1) پس از هم‌ردیف‌سازی در بانک ژن نشان داد و از نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی قطعه ژنی مربوط به ژن PG در بانک ژن شباهت ۱۰۰٪ با توالی Polygalacturonase (PG) Gene. Exone1-9 Tomato به شماره (Accession:HG975522.1) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه به‌وضوح حضور گوجه‌فرنگی‌های تراریخته را در بازار ایران نشان داد، بدون آنکه مردم از ماهیت تغییر یافته آن آگاه باشند. به‌نظر می‌رسد که صفت تأخیر در رسیدگی از طریق تکنولوژی RNA آنتی‌سنس در تولید گوجه‌فرنگی‌های تراریخته بسیار مورد توجه بوده است. همچنین، این پژوهش نشان داد که به‌کمک روش PCR و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده مناسب روی پروموتور، ژن هدف و یا خاتمه‌دهنده، می‌توان محصولات تراریخته را در اسرع وقت شناسایی کرد و مردم را از چگونگی ماده مورد مصرفشان، که حق مسلم آنهاست، با خبر ساخت. با این روش می‌توان حضور محصولات تراریخته در مواد غذایی فراوری شده را نیز ارزیابی کرد. اما از آنجا که PCR معمولی قادر به کمیت‌سنجی نمونه‌ها نیست، لذا در این موارد، استفاده از PCR کمی (Quantitative real time PCR) و روش کمیت‌سنجی مطلق پیشنهاد می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. حیدری، ب. و ح. پاک نیت. ۱۳۹۱. زیست‌فناوری گیاهی؛ دستکاری ژنتیکی. ترجمه، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۲. ربیعی، ز.، ح. راشدی، س. طهماسبی انفرادی و غ. اکبری. ۱۳۹۰. کاربرد روش Real Time –PCR جهت شناسایی سیب‌زمینی دست‌ورزی شده ژنتیکی مقاوم به ویروس PVY در مقایسه با سیب‌زمینی‌های غیرتراریخته. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ۸(۲۹): ۲۹-۳۵.

۳. فارسی، م. و ج. ذوالعلی. ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. ترجمه، ویرایش دوم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
4. Ahmed, F.E. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. Trends Biotech. 20: 215-223.
5. Ao, J., Q. Li, X. Gao, Y. Yu, L. Li and M. Zhang. 2011. A multiplex nested PCR assay for the simultaneous detection of genetically modified soybean, maize and rice in highly processed products. Food Control 22: 1617-1623.
6. Bruderer, S. and K.E. Leitner. 2003. Genetically modified (GM) crops: Molecular and regulatory details. BATS Report, Center for Biosafety and Sustainability, 4: 155-169.
7. Chawla, H.S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. 2nd Ed., Science Publishers, Inc., New York.
8. Demeke, T. and I. Ratnayaka. 2008. Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and real-time event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event. Food Control 19: 893-897.
9. Griffiths, K., L. Patris, D. Croan, N. Wang and K.R. Emslie. 2003. Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Australia.
10. Guadron, T., C. Peters, E. Boland, A. Steinmetz and G. Moris. 2009. Development of a quadruplex-real-time-PCR for screening food for genetically modified organism. Eur. Food Res. Technol. 229: 295-305.
11. Hemmer, W. 1997. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS-Report 2/1997, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme, Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland.
12. Holden, M.J., M. Levine, T. Scholdberg, R.J. Haynes and G.R. Jenkins. 2010. The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. Anal. Bioanal. Chem. 396: 2175-2187.
13. Holst-Jensen, A., S.B. Rønning, A. Løvseth and K.G. Berdal. 2002. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). Anal. Bioanal. Chem. 375: 985-993.
14. Jobes, D.V., D.L. Hurley and L.B. Thien. 1995. Plant DNA isolation: A method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA. Taxon. 44: 349-386.
15. Kuiper, H.A. 1999. Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. Food Control 10: 339-349.
16. Lin, H.Y., L.C. Chiueh, and D.Y.C. Shih. 2000. Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. J. Food Drug Anal. 8: 200-207.
17. Lin, H.Y., J.W. Chiang and D.Y.C. Shih. 2001. Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay kits. J. Food Drug Anal. 9: 160-166.
18. Lipp, M., P. Brodmann, K. Pietsch, J. Pauwels and E. Anklam. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. J. AOAC Int. 82: 923-928.
19. Liu, J.Y., X. Deng, L. Kang and D.M. Chen. 2006. Detection of transgenic papaya by SYBR-green real time PCR. J. Agric. Food Chem. 32: 371-374.
20. Lubeck, M. and H. Haugaard. 2002. Detection of genetically modified plants: Methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products. Danish Forest and Nature Agency, Denmark.
21. MacCormick, C.A., H.G. Griffin, H.M. Underwood and M.J. Gasson. 1998. Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. J. Appl. Microbiol. 84: 969-980.
22. Marmiroli, N., E. Maestri, A. Malcevschi, C. Peano, R. Bordoni and G. De Bellis. 2008. Methods for detection of GMOs in food and feed. Anal. Bioanal. Chem. 392: 369-384.
23. Matsuoka, T., H. Kuribara, K. Takubo, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, K. Issiki, M. Toyoda and A. Hino. 2002. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). J. Agric. Food Chem. 50: 2100-2109.
24. Nazarenko, I., B. Lowe, M. Darfler, P. Ikonomi, D. Scuster and A. Rashtchian. 2002. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. Nucleic Acids Res. 30: e37.
25. Quan, J.X., Y.B. Zhang, C.F. Cheng, C.Z. Liang and X.T. Wei. 2002. The construction of reference system for plant genetically modified PCR detection. Res. Plant Yunnan 24: 333-340.
26. Rabiei, M., M. Mehdizadeh, H. Rastegar, H. Vahidi and M. Alebouyeh. 2013. Detection of genetically modified maize in processed foods sold commercially in Iran by qualitative PCR. Iran. J. Pharm. Res. 12: 25-30.
27. Shree Vidhya, S., P.H. Ramanjini Gowda, K.N. Yogendra, T.M. Ningaraju and T. Salome. 2012. Detection of genetically modified cotton seeds using PCR and real time PCR. Ind. J. Biotech. 11: 176-181.
28. Tan, W., J. Dong, H.L. Deng, H.Z. Wu and B.L. Xu. 2003. Protocol of the qualitative polymerase chain reaction for detection of genetically modified plant components in food, industry standard of entry exit inspection and quarantine of the People's Republic of China. SN/T 1202, China: Industry Standard.
29. White, P.J. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: An overview. J. Exp. Bot. 53: 1995-2000.
30. Zeynep Sönmezalp, C. 2004. Detection of genetically modified insect resistant tomato via polymerase chain reaction. MSc. Thesis, School of Natural and Applied Sciences, Middle East Technical University of Turkey.