

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

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

سید حمید میررکنی^{۱,۲}، حسن رهنما^{*۱}، حسن زینالی^۲

H. Mirrokni^{1,2}, H. Rahnema^{*1}, H. Zeinali¹

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

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

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

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

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

چکیده

طبق قوانین سازمان‌های نظارتی موجود در اغلب کشورهای دنیا، قبل از پذیرش و تجاری‌سازی محصولات تراریخته و فراورده‌های آن، باید ارزیابی‌های ایمنی دقیقی بر روی آن‌ها با یک روش مقایسه‌ای صورت گیرد. یکی از مراحل ارزیابی ایمنی گیاهان تراریخته، مقایسه لاین‌های تراریخته با رقم زراعی غیرتراریخته از نظر محتوی متابولیتی و ترکیبات آنها است. این بررسی به منظور شناسایی تغییرات احتمالی ناخواسته و نامطلوب حاصل از دست‌ورزی ژنتیکی (به عنوان مثال در نتیجه ورود ژن خارجی به درون ژنوم دیگر و یا تولید متابولیت جدید) صورت می‌گیرد. این فرایند به اصل ضرورتاً یکسان (این‌همانی) معروف است. در این مطالعه تلاش شد میزان قند کل و همچنین قندهای محلول مانند ساکارز، گلوکز و فروکتوز در سیبزمینی‌های تراریخت مقاوم به بید سیبزمینی که در سال ۱۳۸۸ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تولید شده بودند مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور از ۴ لاین تراریخته مقاوم به بید سیبزمینی که در آزمایش-های زیست‌سنجی مقاومت بالایی از خود نشان داده‌اند استفاده شد. این سیبزمینی‌ها از تاریخ فوق در شرایط درون شیشه‌ای نگهداری شده‌اند. نمونه‌های تراریخته به همراه گیاه شاهد به منظور تولید غده به گلخانه منتقل شده و از نمونه‌های نور دیده و نور ندیده غده‌ها و همچنین از نمونه-های برگی این گیاهان جهت آنالیز متابولیت‌ها استفاده شد. برای اطمینان از حضور تراژن در گیاهان و مواد گیاهی بررسی‌های مولکولی بر روی آنها انجام گرفت و نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن *cry1Ab* در همه نمونه‌های تراریخته مورد ارزیابی حضور دارد. در بررسی میزان قند کل مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخته با گیاه شاهد از لحاظ میزان قند کل موجود در بافت‌ها وجود ندارد و همچنین ارزیابی قندهای محلول نیز نشان داد که میزان قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز بین گیاهان تراریخته با گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد و در نتیجه با توجه به ترکیبات مورد بررسی و همچنین قوانین نظارتی کدکس ایمنی سیبزمینی‌های تراریخته از لحاظ این صفات مورد تأیید بوده و مصرف آنها بدون خطر است.

واژه‌های کلیدی

ژن *cry1Ab*

سیبزمینی تراریخته

قند کل

قندهای محلول

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

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

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

البته همزمان با ورود مواد غذایی اصلاح شده ژنتیکی در زنجیره غذایی انسان، نگرانی هایی در ارتباط با خطرات بالقوه ناشی از تولید و مصرف این گونه مواد ایجاد، و پرسش های متعددی را در زمینه احتمال بروز عوارض نامطلوب مانند حساسیت، افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها، اثرات مخرب محیطی و انتقال افقی ژن ها (Horizontal gene transfer) در جامعه مطرح نموده است. به دلیل اهمیت موضوع، کمیته های بین المللی مسئولیت قانون گذاری و تعیین سیاست های لازم برای تضمین ایمنی مواد غذایی اصلاح شده ژنتیکی را بر عهده گرفته و در این راستا راهبردها و دستورالعمل های متعددی مطرح شده است. براساس قوانین موجود برآورد ایمنی این محصولات مبتنی بر اثبات برابری همه جانبه آنها با انواع اصلاح نشده و همچنین انجام آزمون های اختصاصی در زمینه حساسیت زایی پروتئین ها، سمیت متابولیت ها و ماده غذایی می باشد (Hashemi and Shoja Sadat, 2010). طبق قوانین سازمان های نظارتی موجود در اغلب کشورهای دنیا، قبل از پذیرش و تجاری سازی محصولات تراریخته و فرآورده های آن، باید ارزیابی های ایمنی دقیقی بر روی آنها با یک روش مقایسه ای صورت گیرد. یکی از مراحل ارزیابی ایمنی غذایی گیاهان تراریخته، مقایسه لاین های تراریخته با ارقام غیرتراریخته آن است. این بررسی به منظور شناسایی تغییرات احتمالی ناخواسته و نامطلوب حاصل از دستورزی ژنتیکی (به عنوان مثال در نتیجه ورود ژن خارجی به درون ژن دیگر و یا تولید متابولیت جدید) صورت می گیرد. این فرایند به اصل تشابه ضروری (این همانی Substantial equivalence) معروف است (OECD, 2001a; Kok and Kuiper, 2003). اصل "تشابه ضروری" که از دهه ۱۹۹۰ در چند شورای بین المللی (FAO/WHO, 2005; WHO, 1995; OECD, 2001a,b) مطرح شده است، یک عنصر کلیدی در ارزیابی ایمنی غذاهای حاصل از موجودات مهندسی شده ژنتیکی می باشد. این مفهوم برای شناسایی شباهت ها و تفاوت های بین غذاهای تراریخته و همتهای سنتی آنها که دارای سابقه مصرف ایمنی هستند، استفاده می شود و راهنمای اصلی در فرایند ارزیابی ایمنی محسوب می شود (FAO/WHO, 2000). جنبه های تعیین کننده متعددی وجود دارد که باید در کاربرد عملی

پروتئومیکس، ژنومیکس و ارزیابی های حیوانی و غیره برای ارائه به سازمان های نظارتی و تصمیم گیر در زمینه تجاری سازی محصولات تراریخته ضروری می باشد. این تحقیق پس از اثبات وجود ژن انتقالی *cry1Ab* با هدف مقایسه قند کل و همچنین قندهای محلول همچون ساکارز، گلوکز و فروکتوز بین سیب زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب زمینی و گیاه شاهد غیرتراریخته انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

مقدمات کار جهت تولید سیب زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب زمینی با استفاده از ژن *cry1Ab* در سال ۱۳۸۸ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- کرج انجام پذیرفت. برای هدفمند کردن بیان ژن ها و تولید سیب زمینی Bt ایمن تر از نظر رعایت اصول ایمنی زیستی، از پیشبر (Phosphoenolpyruvate PEPC (carboxylase گیاه ذرت (*Zea mays*) که سبب بیان ژن در بخش های سبز گیاه می شود، استفاده شده است. برای انتقال سازه مولکولی pBPECry1Ab به گیاه سیب زمینی از اگروباکتریوم تومه فاشینز سویه AGLo1 استفاده شد (Ghasimi Hagh et al. 2009). بعد از ۴ دوره کشت سیب زمینی های کنترل و تراریخته که شامل لاین های B2, B8, B11, B12 بودند در محیط مایع درون شیشه ای به شرایط گلخانه ای انتقال یافت و در شرایط گلخانه ای به مرحله غده دهی رفتند. بعد از طی شدن مراحل رشد برگ های میانی از بوته جدا شده و بلافاصله در ازت مایع قرار داده و بعد به فریزر ۸۰- انتقال یافتند. غده ها نیز پس از جمع آوری، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای بیان این ژن از پیشبری استفاده شده است (پیشبر PEPC) که تنها در بافت های سبز و تحت نور بیان می شود. به منظور بیان و تولید پروتئین Cry1Ab در یک تیمار، مقداری سیب زمینی تراریخته در معرض نور کنترل شده قرار داده شد تا پروتئین بیان شود اما با توجه به تولید همزمان آلکالوئیدها در سیب زمینی، این نور دهی به میزانی بود که درصد آلکالوئیدها از مقدار استاندارد بیشتر نشود (Fridman, 2006).

این مفهوم مورد توجه قرار گیرد که در نهایت منجر به شناسایی اثرات ناخواسته می گردد.

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

راهکارهای مختلفی جهت مقایسه لاین های تراریخته و غیرتراریخته بکار گرفته شده است که هر کدام از این راهکارها از یک جهت به این مقایسه می پردازند. مهمترین این روش ها متابولومیکس، پروتئومیکس و ژنومیکس است که هر کدام از این روش ها پیامدهای حضور ژن خارجی را در سطوح مختلف ژنومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس مورد ارزیابی قرار می دهند. هرچند توانایی روش های ترانس کریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس برای تشخیص اثرات آنها تحت مطالعه می باشد، آنالیز ترکیبات کلیدی و ضدغذائی از اهداف ارزیابی ترکیبات محسوب می شود (Cellini et al. 2004).

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

در نهایت اینکه، برای رهاسازی یک محصول تراریخته لازم است ارزیابی تشابه ضروری در آن انجام شود. اسناد و مدارک حاصل همراه با سایر بررسی های انجام شده تکمیلی در خصوص

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

بررسی ثبات ژن *cry1Ab*

استخراج DNA از برگ و غده های نور دیده و نور ندیده سیب-زمینی های مورد بررسی به روش دلاپورتای تغییر یافته (Dellaporta *et al.* 1983) انجام شد و کیفیت و کمیت DNA استخراجی به وسیله ژل الکتروفورز و اسپکتوفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. آزمون PCR بر روی این ژن با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *cry1Ab* (آغازگر مستقیم: 5'-GGC-GGC-3' آغازگر معکوس: 5'-TCG-GCG-GGA-CGT-3' و آغازگر معکوس: 5'-GAG-AGG-ATC-GAG-AC-3' منطبق بر نوکلئوتیدهای ۷۳- ناحیه رمزکننده و آغازگر معکوس-5' TGT-TGT-TC-3' منطبق بر نوکلئوتیدهای ۱۲۷۶- ناحیه رمزکننده) انجام شد. شرایط انجام PCR شامل یک چرخه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه با ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و نهایتاً یک چرخه اضافی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه (طویل شدن نهایی) بود که در دستگاه (PCR BIO-RAD) انجام شد. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و 1X TAE برده شد و توسط دستگاه Gel-Doc عکسبرداری صورت گرفت.

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

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

۰/۰۲ گرم از نمونه تر وزن شد و در ازت مایع پودر شد و درون تیوب ۲ میلی لیتری ریخته و سپس ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۸۰٪

(v/v) روی هر نمونه اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با ورتکس تکان شدید داده شد و سپس نمونه ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی درون فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد و فالكون ها درون آون یا خشک کن در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا الکل نمونه ها به طور کامل تبخیر شد. مقدار ۱۰ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۴۷ میلی لیتر هیدروکسید باریم ۰/۳ نرمال و سپس ۰/۵ میلی لیتر سولفات روی ۵٪ به هر کدام از نمونه های خشک شده اضافه و نمونه ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی حاصل از سانتریفیوژ جدا و درون فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد. همچنین ۲ میلی لیتر از محلول حاصل جهت اندازه گیری قند کل درون ویال های جدا ریخته شد.

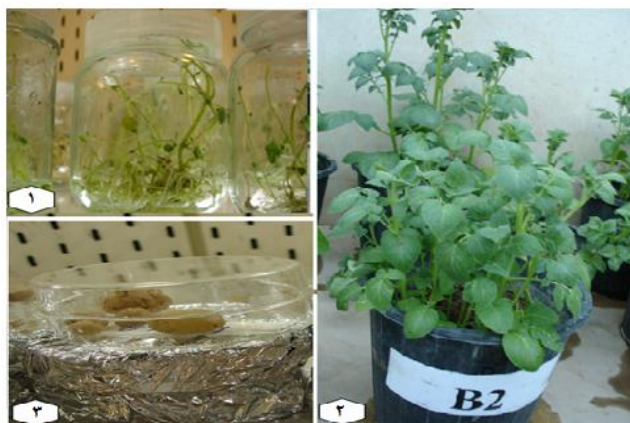
در نهایت فالكون ها در دستگاه آون یا خشک کن در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شده و فاز آبی به طور کامل تبخیر شد و یک میلی لیتر آب با درجه خلوص HPLC به هر نمونه اضافه شد. محلول ها با فیلتر سر سرنگی نوع ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شدند و در یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. برای اندازه گیری قندهای محلول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

اندازه گیری قند کل

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

تجزیه و تحلیل آماری

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



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

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

نتایج و بحث

عنوان شاهد منفی هیچ نواری نشان ندادند که دلیلی بر صحت و درستی PCR است. براساس نتایج به دست آمده، هم غده و هم برگ ارقام تراریخته سیب زمینی برای ژن انتقالی PCR مثبت بودند که این می‌تواند بیانگر ثبات وجود ژن *cry1Ab* پس انتقال به سیب زمینی باشد. بررسی حضور ژنهای *cry1Ab* در گیاهان ذرت تراریخت با استفاده از PCR نشان داده است که این ژن در DNA ژنومی آرد نمونه های تراریخت قابل ردیابی است در حالی که در نمونه های غیرتراریخت حضور این ژن تایید نشده است (Giuliani et al. 2007). نتایج حاصل از آزمون سادرن نشان داد که چهار لاین تراریخت سیب زمینی مستقل از هم هستند. نتایج این آزمون مشخص کرد که لاین B2 حداقل دارای ۴ نسخه، لاین B8 حداقل دارای ۲ نسخه، لاین B11 حداقل دارای سه نسخه و لاین B12 هم حداقل دارای ۲ نسخه از ژن *cry1Ab* در خود دارند.

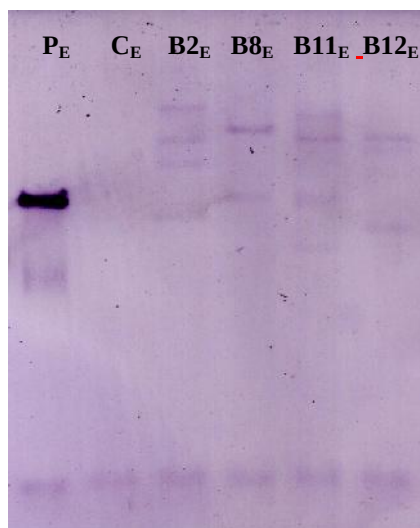
اندازه گیری قندهای محلول (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) با استفاده از دستگاه HPLC

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

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

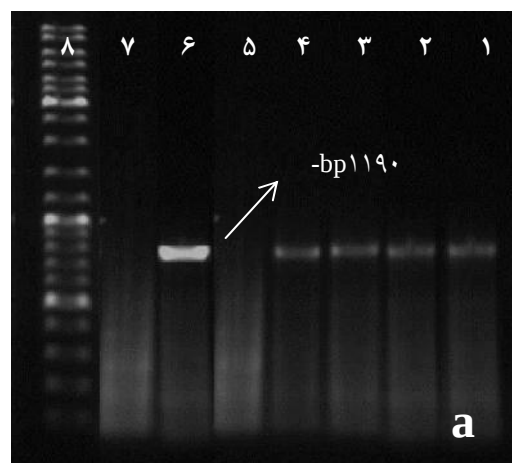
تشخیص ژن *cry1Ab* در سیب زمینی های تراریخته

ثبات ژن در نمونه‌های تراریخت در مهندسی ژنتیک از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی ثبات ژن *cry1Ab* در برگ و غده گیاهان تراریخت به وسیله تجزیه و تحلیل PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این دو ژن انجام گرفت. تجزیه و تحلیل PCR، حضور ژن را در گیاهان تراریخته موجود پس از ۴ دوره کشت تایید کرد. شکل ۲ نمونه‌ای از الگوی نتایج PCR را برای ژن *cry1Ab* نشان می‌دهد. گیاهان تراریخت همانند پلاسמיד نو ترکیب pBPEPc_{ry1Ab} به عنوان شاهد مثبت، نواری به طول ۱۱۹۰ جفت باز متعلق به ژن *cry1Ab* را نشان دادند. این نتیجه، تاییدی بر ثبات حضور ژن هدف در گیاهان تراریخته بوده و می‌تواند نشان دهنده وجود حداقل یک نسخه از ژن *cry1Ab* در ژنوم گیاهان باشد. گیاه شاهد و نمونه بدون DNA (آب) به



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

Figure 3: Southern analysis of transgenic potato harboring *cry1Ab* gene. PE, Plasmid digested by *EcoRI*; C_E, non-transgenic DNA digested by *EcoRI*; B2_E, B8_E, B11_E, B12_E, transgenic DNA digested by *EcoRI*.



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

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

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

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

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس غلظت ساکارز در گیاهان شاهد و تراریخته

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

منابع تغییر	df	میانگین درمات	میانگین درمات	میانگین درمات
ساکارز	۲	۵۹/۱۱۸**	۱۶۸/۵۵۶**	۲/۷۲۹ LS
گلوکز	۴	۰/۲۱۵ LS	۰/۲۳۸ LS	۲/۳۳۳ LS
فروکتوز	۸	۰/۲۰۲ LS	۰/۰۸۱ LS	۰/۸۸ LS
خطا	۲۰	۰/۲۰۲	۰/۲۲۱	۱/۳۹۲

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

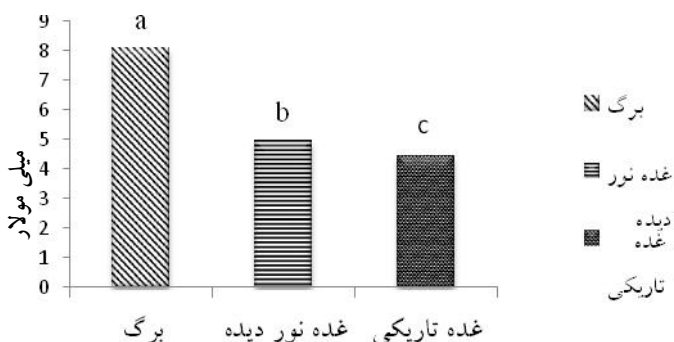
** Significant at the 1 percent levels, and ns: not statistically significant. A: 3 level (Leaves, light treated tubers, dark treated tubers); B: 5 levels (Contro, B2, B8, B11, B12)

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

گندم‌های تراریخته هم نشان داده است که لاین‌های تراریخته گندم از لحاظ مقدار قندهای محلول با گیاه شاهد یکسان اند و تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (Baker et al. 2006).

بررسی قند کل موجود در ارقام تراریخته

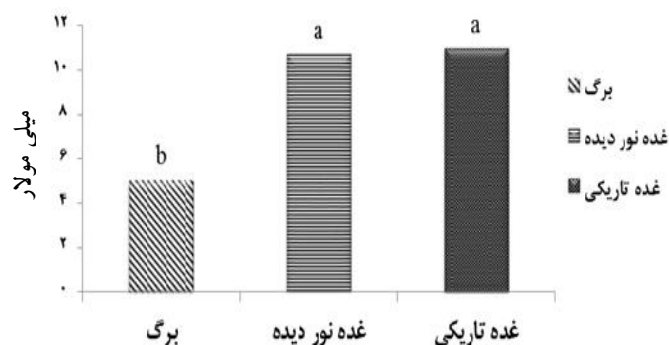
پس از اندازه‌گیری مقدار قند کل موجود در ارقام تراریخته و شاهد و تجزیه داده‌ها جدول تجزیه واریانس داده‌های قندهای محلول کل نشان داد که هیچ‌کدام از عوامل معنی دار نیست و به این نتیجه می‌رسیم که بین ارقام تراریخته و گیاه شاهد با میانگین سطح‌ها به ترتیب (۰/۳۳، ۰/۲۹، ۰/۳۰، ۰/۳۸ و ۰/۳۰) تفاوت معنی داری از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



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

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

نمودار مقایسه میانگین غلظت ساکارز به روش دانکن نشان می‌دهد که مقدار ساکارز موجود در برگ از غده‌ها بیشتر بوده و بعد از برگ‌ها، ساکارز غده‌های نور دیده از غده‌های تاریکی بیشتر بوده و میزان آن‌ها در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار دارد (نمودار ۱).



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

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

نمودار مقایسه میانگین غلظت گلوکز نشان می‌دهد که مقدار گلوکز موجود در برگ کمتر بوده و با غده‌ها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار داشته ولی بین غده‌های نور دیده با غده‌های تاریکی میزان گلوکز آنها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارد (نمودار ۲).

بررسی قندهای محلول در سیب‌زمینی تراریخته و شاهد نشان داده است که قندهای محلول در گیاهان تراریخته با گیاه شاهد تفاوت معنی دار ندارد (Louise et al. 2006). بررسی این‌همانی

جدول ۲: جدول تجزیه واریانس میزان قند کل در گیاهان شاهد و تراریخته

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

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

ns: معنی دار نیست. عامل A: ۳ سطح (برگ، غده‌های نور دیده و غده‌های

تاریکی)، عامل B: در ۵ سطح (کنترل، B12, B11, B8, B2)

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

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

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

کل و قند های محلول در سیب زمینی را تغییر نداده و ایمنی سیب زمینی های تراریخته از لحاظ این دو صفت بررسی شده مورد تایید بوده و مصرف آنها بدون خطر می باشد می باشد.

منابع

- Baker JM, Hawkins ND, Ward JL, Lovegrove A, Napier JA, Shewry PR, Beale NH. 2006.** A metabolomic study of substabtil equivalences of filed grown genetically modified wheat. *Plant Biotech J* 4: 381-392.
- Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engel KH, Gatehouse AMR, Karenlampi S, Leguay JJ, Lehesranta S, Noteborni HPJM, Pedersen J, Smith M. 2004.** Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1089-1125.
- El- Khishin D, Abdul Hamid A, El Moghazy G, Metry EA. 2009.** Assessment of genetically modified potato lines resistant to potato virus Y using compositional analysis and molecular marker. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 5: 261-271.
- FAO/WHO . 2000.** Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology.
- FAO/WHO . 2005.** Safety aspects of genetically modified foods of plant origin; report of a Joint FAO/WHO Expert consultation on food derived from biotechnology; AO/WHO: Geneva, Switzerland http://www.who.int/foodsafety/biotech/who_study/en/index.html.
- Fridman M .2006.** Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J. agric. Food chem* 54:8655-8681.
- GhasimiHagh Z ,Rahnama H , Panahandeh J ,BaghbanKohneRouz B ,Arab Jafari KM, Mahna N. 2009.** Green-tissue-specific, C4-PEPC-promoter-driven expression of *cry1Ab* makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (*Phthorimaea operculella*, Zeller). *Plant Cell Rep* 28:1869–1879.
- Giuliano Albo A, Mila S, Digilio G, Motto M, Aime S, Corpillo D. 2007.** Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying *cry1Ab* gene and comparison to the corresponding wild- type. *Maydica* 52: 443-455.
- Hashemi M, Shoja Sadat A. 2010.** Genetically modified food: opportunities and challenges. *JFST* 7: 89-102.
- Kok E J, Kuiper H A. 2003.** Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends in Biotechnology* 21: 439-444.
- Louise V, Shepherd T, James W, McNicol R, Mark A ,Howard V, Davies V. 2006.** Assessing the potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes. Targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients. *Transgenic Res* 15: 409–425.
- OECD. 2001a.** Consensus document on key nutrient and key toxicants in low erucic acid rapeseed (Canola), series on the safety of novel foods and feeds No. 1., ENV/JM/MONO(2001)13. Organisation for economic cooperation and development, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)13](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)13).
- OECD. 2001b.** Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients, series on the safety of novel foods and feeds No. 2, ENV/JM/MONO(2001)15. Organisation for economic cooperation and development, paris. [olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)15](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)15).
- OECD. 2002a.** Consensus document on compositional considerations for new varieties of sugar beet: Key food and feed nutrients and antinutrients. series on the safety of novel foods and feeds No. 3, ENV/JM/MONO(2002)4. Organisation for economic cooperation and development, paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2002\)4](http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)4).
- OECD. 2002b.** Consensus document on compositional considerations for new varieties of potatoes: key food and feed nutrients, Anti-nutrients and toxicants. Series on the safety of novel foods and feeds No. 4, ENV/JM/MONO(2002)5. Organisation for economic cooperation and development, paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2002\)5](http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)5).
- Rafaat EIS, Ahamed AAE, Klaus W. 2004.** Quality and safety evaluation of genetically modified potatoes Spunta with Cry V gene: Compositional analysis, determination of some toxins, antinutrients compounds and feeding study in rats. Food Technology Research Institute, Agriculture Research center, Giza, Egypt

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

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

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

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

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

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

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

H. Mirrokni^{1,2}, H. Rahnama^{*1}, H. Zeinali¹

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

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

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

ABSTRACT

Based on the regulatory frameworks in most countries, careful safety assessment based on comparison methods must be performed before the adoption and commercialization of GM crops and products. One of the safety assessments of GM plants is the comparison of key nutrients and metabolites between transgenic and non-transgenic lines. This study was designed to identify undesirable potential changes resulting from genetic manipulation (for example, as a result of the entry of foreign genes into the genome and new metabolite production) in transgenic potato resistant to potato tuber moth (*Phetorima operculella*). This process is known as substantial equivalence. This study attempted to examine total and soluble sugars such as sucrose, fructose and glucose in transgenic potato which were produced in Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. For this purpose, four transgenic lines (B2, B8, B11, B12) that have shown high levels of potato tuber moth resistance in bioassay tests were used. First, molecular analyses were performed on plant to be ensured of the presence of transgene, and the result of PCR showed that *cry1Ab* gene was present in all transgenic samples. The transgenic and control plants were transferred to greenhouse to produce the tubers. The harvested tubers were treated under light and dark conditions and then used for more analyses together with leaf samples. Evaluation of total sugar showed no significant differences between transgenic and control plants. Moreover, evaluation of soluble sugar showed that the contents of sucrose, fructose and glucose were not significantly different between transgenic and control plants. We conclude that according to evaluated components and regulatory rules of Codex, these transgenic potatoes are safe to use.

Key Words

cry1Ab gene, soluble sugar, substantial equivalence, total sugar, transgenic potato