

# مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره دوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۲

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سردبیر: دکتر منصور امیدی

دبیر هیات تحریریه و اجرایی: مهندس سمیرا کهک

## 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 آرای: 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 ۲، شماره پیاپی ۴، پاییز و زمستان ۱۳۹۲

### فهرست مطالب

- اسامی داوران همکار در این شماره
- راهنمای نگارش مقاله
- مقاله مروری
- ارزیابی احتمال خطر زیست محیطی گیاهان زینتی  
مسعود توحیدفر و پژمان آزادی ۹۱-۱۰۰
- مقاله‌های پژوهشی
- تعیین توالی و بررسی خصوصیات مولکولی ژن بتا ۱ و ۴  
*Bacillus subtilis* B5d سویه اندوگلوکاناز  
شعله ده‌پهلوان، مریم موسیوند، مریم هاشمی و جلیل خارا ۱۰۱-۱۱۰
- تشخیص مولکولی ذرت‌های تراریخته بر اساس پیشبر P35S  
دیانا حیدری، محمدحسن شاه‌حسینی و زیور صالحی-۱۱۱-۱۱۸
- بررسی میزان باقیمانده حشره‌کش دیازینون در محصول گیلان عرضه شده در میدان میوه و تره بار مرکزی استان تهران  
مینا عسگری، محسن مروتی و سهراب ایمانی ۱۱۹-۱۲۶
- تعیین تفاوت ژن *PEPCK-C* به روش PCR-RFLP و ارتباط آن با صفات عملکردی در مرغان بومی استان خراسان رضوی  
فرشته قدمگاهی، سعید زره‌داران، مختارعلی عباسی، مجتبی آهنی‌آذری و مونا صالحی نسب ۱۲۷-۱۳۴
- اثر آنتی اکسیدانی برخی القاکننده‌های نوساقه‌زایی و ریشه‌زایی در پسته (*Pistacia vera*)، پایه‌های رویشی قزوینی و UCB-1 در شرایط درون‌شیشه  
سارا ملکی، قاسمعلی گروسی، رحیم حداد و اسماعیل نظامی‌آلانق ۱۳۵-۱۴۴
- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (Cm APX) و میزان بیان ژن کد کننده آن تحت تنش شوری در توده‌های خربزه (*Cucumis melo* L.) بومی سیستان  
سمیه منتظری نژاد و محمد سلوکی ۱۴۵-۱۵۴

با سپاس از داورانی که در این شماره ما را یاری کردند.

- ۱- دکتر کسری اصفهانی
- ۲- دکتر علی اعلمی
- ۳- دکتر مقصود پژوهنده
- ۴- دکتر علی اکبر حبشی
- ۵- دکتر نیراعظم خوش خلق سیما
- ۶- دکتر حسین علی رامشینی
- ۷- دکتر علی اکبر شاه نجات بوشهری
- ۸- دکتر خلیل طالبی جهرمی
- ۹- دکتر سیدبدرالدین طباطبایی
- ۱۰- دکتر بابک عبدالله
- ۱۱- دکتر هوشنگ علیزاده
- ۱۲- دکتر مسعود علی پناه
- ۱۳- دکتر بهزاد قره یاضی
- ۱۴- دکتر محمدحسین مرادی
- ۱۵- دکتر سیدالایاس مرتضوی
- ۱۶- دکتر پیمان نوروزی

## راهنمای نگارش مقاله در مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

استفاده شود. در موارد خاص (مانند اسامی علمی گونه‌ها) از قلم کج (Italic) استفاده شود.

۳-۱- عنوان فارسی: عنوان فارسی مقاله باید حداکثر ۱۵ کلمه و منعکس کننده محتوای کامل مقاله باشد. قلم نگارش عنوان، B- تیر با اندازه ۱۴ است.

۳-۲- عنوان انگلیسی: عنوان انگلیسی مقاله باید ترجمه دقیق عنوان فارسی باشد که بلافاصله در زیر عنوان فارسی با قلم Times New Roman، اندازه ۱۲ و به صورت Bold آورده شود.

۳-۳- چکیده فارسی: در این بخش چکیده مقاله باید بیانگر مساله، هدف، روش، نتایج به دست آمده و نتیجه‌گیری کلی از پژوهش باشد و تا حد ممکن نباید از ۳۰۰ کلمه تجاوز کند. لازم است واژه‌های کلیدی (حداکثر ۵ واژه بر اساس حروف الفباء) مرتبط با موضوع پژوهش در پایان چکیده مقاله درج شود.

۳-۴- مقدمه: در این قسمت لازم است پس از معرفی موضوع پژوهش (تعریف مساله) به منابع و پژوهش‌های انجام شده قبلی (داخلی یا خارجی) اشاره شود و همچنین هدف از اجرای پژوهش در پایان مقدمه ذکر شود.

۳-۵- مواد و روش‌ها: در این بخش از مقاله مواد و وسایل به کار رفته، شیوه اجرای پژوهش، طرح آماری و روش‌های شناسایی و ارزیابی به‌طور کامل با ذکر منبع توضیح داده می‌شوند.

۳-۶- نتایج: نتایج حاصل از پژوهش به‌صورت متن، جدول و شکل قابل ارائه است. لازم است از تکرار و ارائه ارقام به شکل‌های چندگانه (جدول، نمودار و غیره) اجتناب شود. شکل‌ها در متن مقاله باید به‌صورت سیاه و سفید ارائه شوند. لازم به ذکر است که شکل‌ها به‌صورت جداگانه، با فرمت JPG و 300DPI در انتهای مقاله هر کدام در صفحه مجزا آورده شوند. ضمناً در تدوین جدول‌ها باید از رسم خطوط عمودی در داخل جدول پرهیز شود. هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوطه باشد. توضیحات اضافی عنوان و متن جدول با استفاده از نماد ستاره (\*) در بالا و سمت چپ جمله یا عدد مورد نظر و توضیح در پانوش جدول در سمت راست با اندازه قلم ۱۰ مشخص می‌شود. عنوان و محتوای جدول‌ها به دو زبان فارسی و انگلیسی تهیه شود و اعداد داخل جدول نیز انگلیسی باشد. عنوان جدول با واژه "جدول"، شماره آن و خط تیره (به‌صورت ساده نه پررنگ) شروع می‌شود. شکل‌ها باید دارای وضوح و تمایز مطلوب باشند. عرض شکل‌ها نباید از ۷/۵ سانتی‌متر تجاوز کند. عناوین شکل‌ها به دو زبان فارسی و انگلیسی باید در پایین آن قرار گیرد و با کلمه "شکل"، شماره آن و خط تیره شروع می‌شود. روابط و معادلات

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی: نشریه‌ای علمی پژوهشی است که توسط انجمن ایمنی زیستی ایران منتشر می‌شود. هدف اصلی این مجله اطلاع‌رسانی و نشر دانش روز مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی و چاپ مقاله‌های پژوهشی (Research Paper)، تحلیلی (Review Paper) و کوتاه (Short Communication) تهیه شده در زمینه‌های مختلف مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. را که قبلاً چاپ نشده یا همزمان به مجلات دیگر فرستاده نشده باشند است. ایمنی زیستی به مجموعه‌ای از تدابیر، سیاست‌ها، مقررات و روش‌هایی اطلاق می‌شود که برای تضمین بهره‌برداری از فواید قطعی بیوتکنولوژی مدرن و پیشگیری از آثار سوء احتمالی کاربرد این فناوری بر تنوع زیستی، سلامت دام، گیاه و محیط زیست بکار گرفته می‌شود. همچنین نتایج پژوهش‌هایی که خلاصه آنها در سمینارها و کنفرانس‌های علمی ارائه شده باشند را با داوری علمی پذیرفته، چاپ و منتشر می‌کند. مسئولیت صحت و سقم محتوای علمی مقاله و ترتیب نام نویسنده (نویسندگان) بر عهده شخصی است که مقاله را به مجله ارسال می‌کند و کلیه مکاتبات با وی انجام می‌شود. دانشجویان کارشناسی ارشد و دکتری نیز برای ارسال مقاله باید موافقت کتبی استاد (استادان) راهنمای خود را کسب کرده باشند. رعایت موارد زیر در تهیه مقاله ضروری است.

### الف- راهنمای تهیه مقاله تحقیقی

روش نگارش: مقالات باید روی کاغذ سفید و بدون آرم و در ابعاد ۲۹×۲۱ سانتیمتر (A4)، با حفظ ۲/۵ سانتی‌متر حاشیه از هر طرف و ۱/۵ سانتی‌متر فاصله بین سطرها، به صورت تایپ رایانه‌ای و به زبان فارسی تهیه و ارسال شود. محتوای مقاله نباید از ۱۵ صفحه تجاوز کند. لازم است مقاله‌ها با نرم‌افزار Word 2003، در محیط ویندوز XP و با قلم B-لوتوس با اندازه ۱۲ برای متن فارسی، با قلم Times New Roman با اندازه ۱۰ برای متن انگلیسی، به صورت معمولی تایپ شده و از طریق پست الکترونیک [gebs.j.bs@gmail.com](mailto:gebs.j.bs@gmail.com) یا پایگاه الکترونیک مجله به آدرس [www.gebsj.ir](http://www.gebsj.ir) به دفتر مجله ارسال شود.

برگه مشخصات مقاله: این قسمت در دو صفحه مجزا (فارسی و انگلیسی) شامل عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی و آدرس پستی و الکترونیکی نویسنده (نویسندگان) خواهد بود. اجزاء مقاله: قسمت‌های اصلی مقاله به ترتیب عبارتند از: عنوان، چکیده، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث، سپاسگزاری (اختیاری)، منابع و چکیده به زبان انگلیسی نتایج و بحث ممکن است به‌صورت توأم یا جداگانه ارائه شود. برای قالب‌بندی تیترها از تیربندی (Heading) استاندارد MS Word

importance. Plenum Press, New York, USA, 199-265.

**Farshadfar E. 1998.** Application of quantitative genetics in plant breeding. Razi University Press, Kermanshah, Iran. (In Farsi with English abstract).

Brown B, Aaron M. 2001. The politics of nature. In: Smith J (Ed.) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, 230-257.

کنفرانس

**Vojdany P 1996.** Importance of in-situ conservation of genetic resources. In: Proceedings of 4<sup>th</sup> Agronomy and plant breeding congress. Iran, Esfahan Industrial University, 554-573. (In Farsi with English abstract).

گزارش نهایی طرح پژوهشی

**Pasban Eslam B 2004b.** Evaluation of physiologic and agronomic characters of oilseed rape cultivars for late season drought resistance. Research final Report. Research, Education and Extension organization. Iran. 83.289:25-27. (In Farsi with English abstract).

منابع برخط (On-line)

**FAO. 2009.** FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. FAO, Rome, Italy.

۱۰-۳- چکیده انگلیسی (Abstract): چکیده فارسی مقاله باید به طور کامل به انگلیسی ترجمه و با قلم Times New Roman اندازه ۱۲ و در پایان مقاله درج شود. در انتهای چکیده انگلیسی ترجمه واژه‌های کلیدی فارسی بر اساس حروف الفباء آورده شود. ضمناً نام نویسنده (نویسندگان) نوشته و آدرس آنان آورده شود.

ب- راهنمای تهیه مقاله مروری

فرستنده مقاله مروری باید نویسنده اول مقاله بوده و در زمینه موضوع مقاله در سطح کشور صاحب نظر باشد. نویسنده اول مقاله لازم است حداقل دو مورد از تحقیقات خود که به موضوع مقاله مربوط بوده، در مجله‌های معتبر علمی-پژوهشی چاپ شده و بیانگر پژوهش‌های نامبرده در پنج سال گذشته باشد، در منابع استفاده کرده باشد.

در مقاله مروری تمامی موارد ذکر شده برای مقاله پژوهشی به استثناء مواد و روش‌ها، نتایج و بحث باید رعایت شود.

ج- راهنمای تهیه مقاله کوتاه

مقاله کوتاه از نظر ارزش علمی و محتوی هم‌تراز مقاله کامل است و تنها از نظر مطالب ارائه شده، کوتاه‌تر است و بایستی حداکثر در ۴ صفحه و با رعایت تمامی موارد ذکر شده در مقاله پژوهشی و با حذف عنوان‌بندی داخل مقاله (حذف عنوان‌های مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث) تهیه شود.

در متن مقاله باید شماره‌گذاری شوند و ارجاع به جدول‌ها، شکل‌ها و روابط در متن با شماره مورد یاد شده داخل پرانتز صورت می‌گیرد.

۷-۳- بحث: در این قسمت نتایج حاصل از پژوهش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و با توجه به هدف پژوهش بحث و نتیجه‌گیری به عمل می‌آید. مقایسه نتایج حاصل از آن با نتایج پژوهش‌های مشابه در منابع داخلی و خارجی در این بخش از مقاله ضروری است. در صورت لزوم می‌توان نتایج و بحث را تماماً تحت عنوان نتایج و بحث ارائه کرد.

۸-۳- از نوشتن پاورقی اجتناب شود.

۹-۳- سپاسگزاری (اختیاری): در پایان بحث حداکثر در چهار سطر می‌توان از افراد و مراکزی که در راهنمایی و یا انجام پژوهش مساعدت کرده و یا در تامین بودجه، امکانات و لوازم پژوهش نقش موثری داشته‌اند تقدیر و سپاسگزاری کرد.

۱۰-۳- منابع: کلیه منابع مورد استفاده اعم از فارسی و انگلیسی در انتهای مقاله به زبان انگلیسی و به ترتیب حروف الفبای نام خانوادگی نویسنده اول بدون ذکر شماره آورده شود. در انتهای منابع فارسی عبارت (In Farsi with English abstract) قید شود. در متن ارجاع به منابع باید تا حد ممکن از ذکر نام نویسنده (نویسندگان) در شروع جمله خودداری و منابع در انتهای جمله و در پرانتز ارائه شوند و برای جداسازی چند منبع از یکدیگر از نقطه ویرگول ";" استفاده شود. مانند

(Thion et al.1996; Dodd et al.2006)

منابع مورد اشاره باید چاپ شده یا با اجازه چاپ (پذیرش شده) باشند و پژوهش‌های چاپ نشده قابل ذکر در لیست منابع نخواهد بود. برای مثال به موارد ذیل اشاره می‌شود.

مقاله علمی پژوهشی

**Apel K, Hirt H. 2004.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55:373-399.

**Beck EH, Heim R, Hansen J. 2004.** Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. Journal of Biosciences 29:449-459.

**Nazari MR, Maali Amiri R, Ramezanzpour SS. 2011.** Quantitative assessment of gene expression pattern of sucrose synthase under cold stress condition in chickpea. Modern Genetics Journal 2, 59-69. (In Farsi with English abstract).

کتاب

Ducke JA. 1981. Handbook of legumes of world economic

#### د- دستور خط نگارش مقاله

از مؤلفان و مترجمان محترم مقاله‌ها درخواست می‌شود در نگارش مقاله‌های ارسالی نکات زیر را، که برگرفته از "دستور خط فرهنگستان زبان و ادب فارسی" است، رعایت کنند.

خواهشمند است از به کاربردن واژه‌های عربی خودداری نموده و بعد از معادل سازی آنها از عربی به فارسی (با توجه به دستور فرهنگستان زبان و ادب فارسی) در متن مقاله مورد استفاده قرار گیرد.

فاصله‌گذاری: میان واژه‌های هر جمله یا عبارت "فاصله یک حرفی" بین واژه‌های مستقل از هم باید رعایت شود (که نمونه‌های آن را در همین نوشته ملاحظه می‌فرمایید). اما در واژه‌های مرکب، باید فاصله "درون کلمه" یا "نیم فاصله" را رعایت کرد (مانند فاصله‌ها، یک‌روز، آن‌ها، خردورز و آلرژیا).

پس از پراتر باز "(" و پیش از پراتر بسته ")", قبل از نقطه، کوما و نقطه کوما نباید فاصله گذاشته شود.

#### املاي برخی واژه‌ها، پیشوندها و پسوندها

- "می" همیشه جدا از واژه، پس از خود و با رعایت نیم‌فاصله نوشته شود (مانند می‌رود، می‌گوید، می‌شود).

- "تر" و "ترین" همواره جدا از واژه، پیش از خود و با رعایت نیم‌فاصله نوشته شود (به استثنای بیشتر، کمتر، مهمتر و بهتر).

- نشانه جمع "ها" می‌تواند به صورت سرهم یا جدا نوشته شود. اما در مواردی که واژه قبل از "ها" به چند دندانۀ یا ط یا ظ یا ه ختم می‌شود همواره جدا از واژه پیش از خود و با رعایت نیم‌فاصله نوشته شود (مانند کوه‌ها، خیاط‌ها).

- برای کلمات مختوم به های غیرملفوظ، در حالت مضاف، از علامت "ء" (یای کوتاه) استفاده شود (مانند نامه‌ او، خواسته‌ تو، نوشته‌ ما).

- همزه‌گذاری در کلمات همزه‌دار رعایت شود (مانند تأیید، رئیس، مسئله، مؤسسه و جزء).

#### استفاده از واژگان و معادل‌های صحیح

نشریه مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی ایران عبارات، معادل‌ها و واژگان زیر را مورد استفاده قرار می‌دهد. از کلیه نگارندگان محترم خواهشمند است نسبت به تهیه مقاله با استفاده از واژگان و معادل‌های صحیح اقدام فرمایند.

مقالاتی که بر اساس راهنمای تهیه مقاله برای مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی ایران تهیه نشده و با مندرجات این راهنما مطابقت نداشته باشند، مورد بررسی قرار نخواهند گرفت.

| بنویسیم                                         | ننویسیم                |
|-------------------------------------------------|------------------------|
| می‌باشد، می‌باشند                               | است، هستند             |
| لذا                                             | بنابراین               |
| می‌گردد، می‌گردند                               | می‌شود، می‌شوند        |
| گردید، گردد، گردیدند                            | شد، شود، شوند          |
| می‌نماید، می‌نمایند                             | می‌کند، می‌کنند        |
| تغییر ژنتیک یافته، تغییر یافته ژنتیکی           | ترانس ژنیک، تراریخت    |
|                                                 | دستکاری شده ژنتیکی     |
|                                                 | Transgenic             |
|                                                 | Transformation         |
| تراویزش، تراویختی                               | تراژن                  |
| Transgene                                       | برای تراویختی          |
| To transform                                    | کاوشگر                 |
| Probe، پروب                                     | Marker، مارکر          |
| Primer، پرایمر، راه‌انداز                       | آغازگر                 |
| Terminator، ترمیناتور، پایان دهنده، خاتمه دهنده | پایانبر                |
| فرار ژن                                         | مهاجرت ژنی، انتقال ژن، |
| Promoter، پروموتور                              | پیشبر                  |
| پلی‌مورفیسم، چند شکلی                           | تفاوت                  |

## ارزیابی احتمال خطر زیست محیطی گیاهان زینتی تراریخته

### Ecological Risk Assessment of Genetically-Modified Ornamental Plants

مسعود توحیدفر<sup>۱\*</sup> و پژمان آزادی<sup>۱</sup>

Masoud Tohidfar<sup>1\*</sup> and Pezhman Azadi<sup>1</sup>

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

کرج- ایران

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۳)

#### چکیده

اصلاح نباتات سنتی، کاربرد و زیبایی گیاهان زینتی را افزایش داده است اما بیوتکنولوژی می‌تواند صفات‌های جدیدی را در گیاهان زینتی ایجاد کند که با روش‌های مرسوم دورگ‌گیری امکان‌پذیر نیست، به‌عنوان مثال تولید گلبرگ‌های آبی‌رنگ در میخک و رُز نمونه‌ای از صفات‌های جدید حاصل از بیوتکنولوژی هستند. کاربردهای مهندسی ژنتیک در گیاهان زینتی به تغییر رنگ گل محدود نمی‌شود، بلکه ایجاد مقاومت به آفت‌ها و بیماری‌های گیاهی و نیز افزایش طول دوره گلدهی و طول عمر شاخه‌های بریده گیاهان زینتی و بسیاری از صفات‌های دیگر از آن جمله‌اند. پیش‌بینی می‌شود که صنعت تولید و تبادل گیاهان زینتی در آینده‌ای نه‌چندان دور با تحولی شگرف روبه‌رو شود. این تحول مرهون نقش مهندسی ژنتیک خواهد بود. هم‌زمان با پیدایش هر فناوری جدیدی، ملاحظات مهمی درمورد استفاده از آن ابراز می‌شود. تجاری‌سازی گیاهان تراریخته زینتی هم سوالاتی را درمورد اثرهای احتمالی این گیاهان در مدیریت اکوسیستم به‌وجود آورده است. این سوالات دارای خواستگاه‌های متعدد مشروع یا نامشروع هستند که این نوشتار در پی واکاوی این خواستگاه‌ها نیست، بلکه هدف از این نوشتار طرح این سوال‌ها و ارائه پاسخ به آن‌هاست. این مقاله به ارزیابی احتمال خطر زیست محیطی گیاهان زینتی تراریخته، نتایج پژوهش‌ها و قوانین و مقررات موجود می‌پردازد. بررسی این مقاله و آشنایی با نحوه ارزیابی گیاهان زینتی تراریخته می‌تواند برای اهل فن و به‌ویژه مسئولین نظارتی مفید باشد.

#### واژه‌های کلیدی

ارزیابی احتمال خطر

ایمنی زیستی

گیاهان زینتی

تراریخته

محیط زیست

## مقدمه

اختصاص قریب به ۱۷۰ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی جهان به کشت گیاهان تراریخته (حاصل از مهندسی ژنتیک) در سال ۲۰۱۲ که تولید، مصرف و رهاسازی میلیاردها تن موجودات زنده دست‌ورزی شده را به دنبال داشته است برای آگاهان و تحلیل‌گران تردیدی را برجای نمی‌گذارد که این فناوری هم‌چنان راه خود را برای سیطره بر جهان کشاورزی ادامه خواهد داد (James 2012). اگرچه پیشرفت‌های ناشی از مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی در حوزه گیاهان زراعی تحسین برانگیز و غیرقابل انکار است، اما در دو دهه اخیر شاهد تحولاتی اعجاب‌آور و تحسین برانگیز در زمینه تولید گیاهان زینتی حاصل از مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی نیز بوده‌ایم. تولید رز و میخک‌های تراریخته از دستاوردهای بیوتکنولوژی مدرن در بخش صنعت گل‌کاری است (Nakamura et al. 2011). به هر حال، موانعی وجود دارند که مانع تبدیل نتایج پژوهش‌ها به تولیدها در باغبانی و پرورش گل می‌شوند. یکی از این موانع، ملاحظات درباره اثرهای احتمالی محیطی ناخواسته و غیرمنتظره این‌گونه گیاهان است. مصرف جهانی گل و گیاهان زینتی حتی بدون در نظر گرفتن بوته‌های خشبی و نیمه‌خشبی برای باغ و فضای سبز بالغ بر ۱۰۰ میلیارد یورو در سال برآورد می‌شود (آزادی ۱۳۸۹). با توجه به اهمیت صفت‌های جدید در صنعت گل و گیاهان زینتی تلاش‌های متعددی برای استفاده از مهندسی ژنتیک در گیاهان زینتی آغاز شد. تاکنون حدود ۵۰ گیاه زینتی به طور موفقیت آمیزی تراریخته شده‌اند (Brand 2006; Shibata 2008). گیاهان زینتی باوجود برخورداری از مزیت عدم‌نیاز به دریافت گواهی ایمنی برای مصرف‌کنندگان با محدودیت‌هایی از جمله تنوع بسیار زیاد و سرسخت بودن در باززایی و انتقال ژن (Azadi et al. 2010a) مواجه‌اند. در طی سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی در ارتباط با تغییر صفت‌ها در گیاهان زینتی با استفاده از مهندسی ژنتیک ارایه شده است. به طوری‌که در آمریکا تا سال ۲۰۰۷ مجوز و معرفی ۱۶۴ گیاه زینتی تراریخته صادر شده است (جدول ۱) (Azadi 1389). همچنین تاکنون آزمایش‌های میدانی زیادی روی گیاهان تراریخته زینتی در دنیا انجام شده که در جدول دو آورده شده است.

درحال حاضر تنها گیاهان زینتی تراریخته که در بازار به‌صورت تجاری وجود دارند میخک و رز تراریخته هستند. میخک (*Dianthus caryophyllus*) تراریخته با گلبرگ آبی-ارغوانی از روش مهندسی ژن‌های دخیل در سنتز آنتوسیانین تولید شده است (Nakamura et al. 2011). در فوریه ۲۰۰۸ کمپانی Suntory ژاپنی هم اعلام کرد که به‌صورت مشترک با کمپانی Florigene رزهای آبی رنگ تولید کرده است و این محصول‌ها مجوزهای مربوطه برای کشت و کار و انبارکردن و ترابری را به‌عنوان گل‌های شاخه بریده، از آژانس‌های دولتی ژاپنی دریافت کردند (<http://suntory.com>). توسعه گیاهان زینتی تراریخته نه تنها دور از ذهن نیست بلکه قطعی و در آینده نزدیک عملی است. بنابراین لازم است احتمال خطر زیست محیطی حاصل از تولید و رهاسازی آن‌ها بررسی و مدیریت شود.

## ملاحظات ابراز شده زیست محیطی گیاهان زینتی تراریخته

**جریان ژنی:** درجه حرکت تراژن‌ها به فاکتورهای زیادی مانند سرعت جریان ژنی (دورگ گیری)، ورود ژن، میزان مهاجرت، انتشار و شایستگی نتایج بستگی دارد. در برخی از گیاهان علفی چند ساله مانند سوسن‌های یک روزه (*Heimerocallis*) و لیلیوم‌ها (*Lilium*) اندام‌های تکثیری (مثل ساقه‌ها، ریزوم‌ها، پیازها و غده‌ها) می‌توانند نقش مهمی در انتشار و استقرار بازی کنند. پژوهش بر روی کاج سوزنی (*Pinus taeda*) نشان داد که بیش از ۱۰۰۰۰۰ دانه گرده در هکتار توسط یک گیاه شانزده ساله تولید می‌شود که در حدود ۷۰ دانه گرده در هکتار بیش از یک کیلومتر منتشر می‌شوند. دانه گرده کاج حتی به فواصل زیادتر هم حرکت می‌کند این نشان می‌دهد که کنترل دانه گرده به طور عملی غیرممکن است (Williams, 2005).

**تهاجمی شدن:** گیاهان زینتی تراریخته در صورتی‌که به گیاهان وحشی یا علف‌هرز تبدیل شوند آیا می‌توانند خطرهای زیست محیطی ایجاد کنند؟ آیا چنانچه گیاه والدی وحشی یا علف‌هرز نباشد ما باید درباره یک گیاه زینتی تراریخته ملاحظات ابراز نماییم؟ با وجود این‌که تاکنون هیچ اثر سویی در مورد گیاهان زینتی تراریخته گزارش نشده است، این‌ها سوالاتی است که باید براساس پایه‌های علمی به آن جواب داده شود تا ملاحظات که در این خصوص وجود دارد از بین برود.



جدول ۱- تعداد کل مجوز رهاسازی و معرفی گیاهان زینتی غیرعلفی در سال‌های ۱۹۸۵-۲۰۰۷ در آمریکا

Table 1- Total permits for movement and introduction of non-grass ornamental crops

| جنس         | تعداد درخواست مجوز |
|-------------|--------------------|
| Genius      | No of Permission   |
| آنتوریوم    | ۵                  |
| داودی       | ۵                  |
| انواع ارکید | ۱۳                 |
| بنت القنصول | ۲                  |
| بگونیا      | ۳                  |
| گلايول      | ۸                  |
| جعفری       | ۱۴                 |
| شمعدانی     | ۲۳                 |
| اطلسی       | ۸۰                 |
| رز          | ۸                  |
| آزالیا      | ۸                  |
| جمع کل      | ۱۶۴                |

دورگ‌گیری گیاهان تراریخته با علف‌های هرز خویشاوند ممکن است علف‌های هرز را قادر به کسب صفات‌های زیان‌آوری مانند مقاومت به علف‌کش‌ها کند.

**فشار روی تنوع زیستی گیاه:** بیشترین ملاحظات ابراز شده درباره گیاهان تراریخته از جمله گیاهان زینتی این است که استفاده گسترده از آن‌ها می‌تواند منجر به تک‌کشتی شود. این درحالی است که با استفاده از مهندسی ژنتیک می‌توان ژن‌های مفید را وارد گیاه کرد و واریته‌های در حال انقراض را دوباره به چرخه تولید وارد کرد.

#### ارزیابی احتمال خطر گیاهان زینتی تراریخته با تاکید بر رُز تراریخته

رُزهای وحشی به طور معمول گل‌هایی به رنگ صورتی یا سفید دارند که حاوی آنتوسیانین‌های حاصل از سیانیدین هستند. رُزها فاقد رنگ آبی هستند زیرا در جنس رُز مسیر بیوسنتز دلفینیدین‌های آنتوسیانینی وجود ندارد. بیان ژن F3'5'H از بنفشه در رُز همراه با تولید دلفینیدین‌های آنتوسیانین، منجر به ایجاد گلبرگ‌های آبی رنگ در آن شده است. (شکل ۱) (Katsumoto et al., 2007). از آن‌جاکه رُز تراریخته جز محصولات غذایی محسوب نمی‌شود بیشتر بررسی‌های صورت گرفته نه بر سلامت غذایی، بلکه بر احتمال اثرهای سو روی تنوع زیستی و سازگاری با اصول پروتکل ایمنی زیستی کارتاها-بوده است

گل آزالیا (*Rhododendron*) سالانه بیش از ۱۴۲ میلیون دلار در آمریکا سودآوری دارد. بیشتر این گیاهان محصول برنامه‌های اصلاحی و دورگ‌گیری سنتی هستند. ژن مقاومت به بیماری قارچی فیتوفترا به‌روش سنتی به رقم *R. catawbiense* منتقل شد و این گیاهان مقاوم بدون هرگونه تجزیه احتمال خطر اکولوژیک معرفی شدند. این در حالی است که یک آزالای مقاوم، که از طریق بیوتکنولوژی تولید شود، قبل از هرگونه رهاسازی باید بررسی‌های ایمنی زیستی فصلی درمورد آن انجام شود (<http://inspection.gc.ca>). اما واقعیت آن است که اگر ارزیابی‌های ایمنی روی واریته‌های جدیدی که توسط روش‌های سنتی برای صفات‌های زراعی اصلاح می‌شوند انجام شود، ممکن است ریسک‌های محیطی و سلامتی بیشتری داشته باشند.

**علف‌هرزی شدن:** سه ساز و کاری که ممکن است باعث علف‌هرز شدن گیاه زینتی تراریخته شوند عبارتند از: (۱) صفت مهندسی شده باعث ایجاد صفات‌های علف‌هرزی از جمله خواب بذر، دوام طولانی، قابلیت جوانه‌زنی در طیف وسیعی از شرایط محیطی، قابلیت رشد رویشی سریع، چرخه زندگی کوتاه، تولید بذر زیاد و پراکندگی بالای بذر شود. (۲) جریان ژنی به خویشاوندان وحشی، به طوری که علف‌هرز جدیدی را ایجاد کند. (۳) توسعه گونه‌های علف‌هرز مقاوم به علف‌کش از طریق کاربرد مکرر علف‌کش را موجب شود (Johnson, Riordan 1999).

(<http://www.bch.biodic.go.jp/english/law.html>). در زیر به

قسمتی از ارزیابی احتمال خطر گیاهان زینتی تراریخته به‌ویژه رُز تراریخته اشاره می‌شود.

**تولید گرده و قدرت زنده‌مانی:** یکی از نکته‌هایی که در ارزیابی گیاهان تراریخته مورد بررسی قرار می‌گیرد، احتمال انتقال گرده گیاه تراریخته به گیاهان وحشی خویشاوند آن است. در صورتی که گیاه تراریخته دانه‌های گرده زنده تولید نماید سایر بررسی‌ها در این خصوص صورت می‌گیرد. به منظور بررسی قدرت زنده‌مانی دانه گرده، ابتدا گرده‌ها از گیاهان غیرتراریخته و تراریخته جمع‌آوری می‌شوند و مرفولوژی گرده‌ها با استفاده از میکروسکوپ و زنده‌مانی آن با استفاده از روش رنگ‌آمیزی استوکرامین مورد بررسی قرار می‌گیرد. درمورد رُز تراریخته نتایج نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته در خصوص مورفولوژی و درصد زنده‌مانی و جوانه‌زنی دانه‌گرده مشاهده نشده است به منظور بررسی پراکندگی دانه گرده، به طور معمول گل‌هایی که دارای کلاله و دانه‌گرده رسیده هستند در مقابل پنکه درون گلخانه قرار می‌دهند. فاصله گل‌ها از پنکه ۵۰ سانتی‌متر و سرعت باد چهار متر بر ثانیه

در نظر گرفته می‌شود.

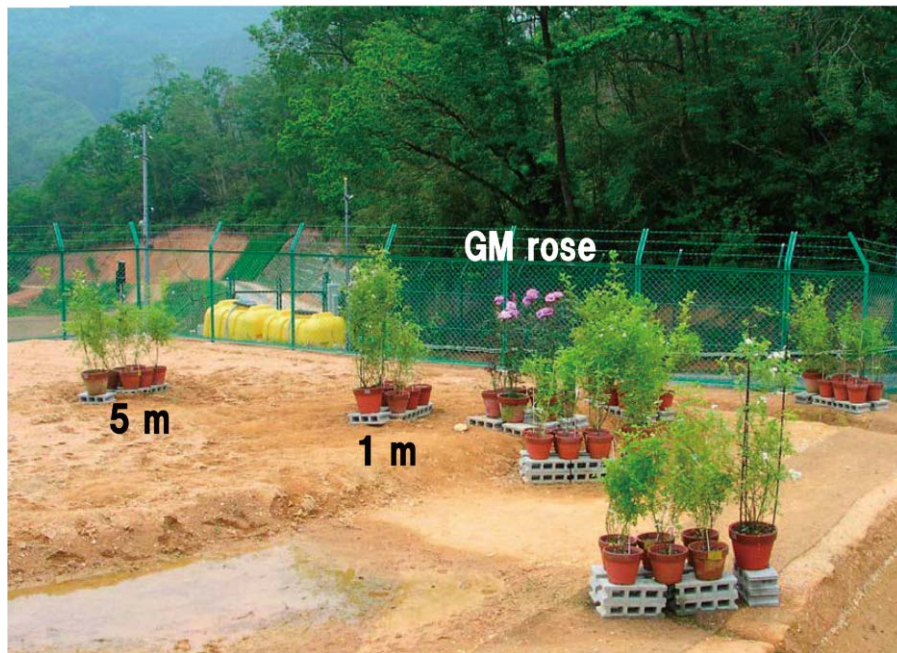
اسلایدهای میکروسکوپ آغشته به وازلین به‌صورت افقی از فاصله ۱۰ تا ۱۵۰ سانتی‌متری در هر ۱۰ سانتی‌متر قرار می‌گیرد. بعد از ۱۵ ساعت تعداد دانه‌های گرده‌های احتمالی که به اسلایده چسبیده هستند را محاسبه می‌کنند. بررسی پراکندگی دانه‌گرده در رُز تراریخته نتایج نشان داد که هیچ دانه‌گرده‌ای چه تراریخته و غیرتراریخته بر روی اسلایدها وجود نداشت. این نتیجه نشان داد که تراریخته بودن باعث افزایش تحرک دانه‌های گرده نشده است (Nakamura et al. 2011).

**شبیه‌سازی تلاقی با حشرات ناقل:** به منظور بررسی امکان انتقال ژن توسط حشرات در گیاهان تراریخته زینتی، تعدادی زنبور (*Bombus ignites*) در داخل اتاقک‌های توری دار حاوی گونه وحشی *R. Multiflora*، گیاهان میزبان (گیاهان غیرتراریخته) و لاین تراریخته قرار می‌دهند. بعد از ۲۴ ساعت گیاه وحشی *R. Multiflora* از اتاقک خارج و جنین‌ها برای تجزیه‌ی مولکولی بررسی می‌شوند. شبیه‌سازی تلاقی با ۵۰ عدد حشره و رُز تراریخته نشان داد که از میان ۳۳ بذری که از این روش به‌دست آمد هیچ‌کدام تراریخته نبودند (Nakamura et al 2011).



**شکل ۱-** تغییر رنگ گل به‌وسیله مهندسی ژنتیک با تولید دلفینیدین و ایجاد رنگ آبی سمت چپ رقم لاواند غیرتراریخته، سمت راست رز تراریخته با گلبرگ آبی قسمت وسط رز تراریخته با گلبرگ آبی کم‌رنگ حاوی مقادیر کم آنتوسیانین (Nakamura et al 2011)

**Figure 1-** Flower color changes by delphinidin production The pink-flowered rose cultivar Lavande (left) transgenic flower produced violet-colored (right) transgenic rose exhibited paler flower color and contained decreased amounts of anthocyanidin (center).



شکل ۲- آزمایش مزرعه‌ای رز تراریخته جهت بررسی امکان دورگ‌گیری با رز وحشی *R. multiflora* (Nakamura et al 2011)

**Figure 2-** Natural crossing in the field. *R. multiflora* plants were placed at distances of 1 m and 5 m from the flowering plants of one of GM rose lines

کاشته می‌شود، سپس خاک‌هایی که گیاهان تراریخته و میزبان در آن کشت شده بودند جمع‌آوری می‌شود و برای میکروارگانسیم‌هایی چون باکتری، قارچ و اکتینومایسیت‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. خاک‌های جمع‌آوری شده از رز تراریخته و غیرتراریخته نشان داد که تفاوتی در تعداد باکتری، قارچ و اکتینومایسیت مشاهده نشد، که نشان دهنده عدم وجود ترکیبات سمی در رز تراریخته بود (Nakamura et al 2011).

**بقایای آگروباکتریوم:** یکی از ملاحظات که در خصوص گیاهان تراریخته وجود دارد حضور آگروباکتریوم در بافت گیاهی است. به منظور بررسی آن ابتدا چند گرم از بافت گیاه میزبان و تراریخته پودر می‌شود، به دنبال آن مقداری آب استریل به آن اضافه می‌شود. سپس این محلول روی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مناسب رشد داده می‌شود. بعد از سه روز تعداد کلونی‌ها شمارش می‌شود و حضور باکتری مشخص می‌شود (Nakamura et al 2011).

#### ارزیابی احتمال خطر میخک تراریخته

استرالیا یک راهبرد ملی را برای بیوتکنولوژی کشاورزی دنبال می‌کند و ارزیابی احتمال خطر به‌عنوان جزیی از فرآیند قانونمندسازی است (OGTR, 2005). استرالیا همچنین به‌عنوان نقطه پیدایش گیاهان زینتی تراریخته، توانست میخک‌های

**تلاقی طبیعی در شرایط مزرعه‌ای:** به منظور بررسی امکان تلاقی گیاهان زینتی تراریخته، در این حالت گونه غیرتراریخته در فواصل ۱ و ۵ متری گیاه میزبان و لاین تراریخته قرار می‌گیرد (شکل ۲). گیاهان برای مدت ۲۳ روز برای گرده افشانی طبیعی رها می‌شوند. میوه‌های گونه وحشی غیرتراریخته بعد از سه ماه برداشت و تجزیه می‌شوند. ارزیابی تلاقی در رز تراریخته نشان داد که هیچ‌گونه تلاقی صورت نگرفته و فرزندان آن‌ها تراریخته نبودند (Nakamura et al 2011).

**اثر بقایای گیاهی:** به منظور بررسی هر گونه اثر بقایای تراریخته، لاین‌های تراریخته به‌همراه غیرتراریخته به‌طور معمول برای شش ماه در گلخانه‌های توردار و محیط آزاد کشت می‌شوند، سپس این گیاهان شخم‌زده می‌شوند. تعدادی بذر سبزی مثل کاهو در این ترکیب گیاهی و خاکی کشت می‌شود. جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. بررسی‌هایی که در ژاپن در مورد رز تراریخته انجام شد نشان داد که تفاوتی بین گیاهان میزبان و تراریخته از نظر میزان جوانه‌زنی در بذره‌های کاهو مشاهده نشد (Nakamura et al 2011).

**میکروارگانسیم‌های خاک:** در بررسی اثر گیاه تراریخته بر روی میکروارگانسیم‌های خاک، ابتدا گیاه تراریخته به‌همراه میزبان



ناحیه میخک‌های تراریخته عنوان شده‌اند عبارتند از: (۱) احتمال سمیت و حساسیت‌زایی برای انسان (۲) احتمال سمیت برای سایر موجودات (۳) احتمال علف هرزی شدن (۴) احتمال انتقال ژن به سایر موجودات.

تراریخته با رنگ جدید تولید کند (شکل ۳) (Potrea 2007)، که خلاصه‌ای از احتمال خطر اکولوژی آن در سایت <http://www.ogtr.gov.au> آورده شده است.

چهار مورد از خطرهای احتمالی که برای انسان و محیط زیست از



شکل ۳- کشت تجاری میخک و رز تراریخته. (۱) انتخاب سالیانه میخک‌های تراریخته ۲ و (۴) کشت تجاری میخک‌های تراریخته ۳ رزهای تراریخته ۵) فرایند پس از برداشت ارقام مختلف میخک تراریخته ۶) ارزیابی کیفیت میخک‌های تراریخته (Nakamura et al 2011).

**Figure 3-** Commercial production of genetically modified (GM) Carnation and Rose. Plates show annual selection of GM carnation (1), commercial planting of GM carnation (2, 4) and rose (3); post-harvest processing of different GM carnation varieties (5) and post-harvest quality control of carnation (6).

میخک‌ها به علت کشت بیش از ۲۰۰۰ ساله خود، خویشاوندان زیادی دارند. به منظور بررسی سمیت میخک تراریخته، آزمایش‌هایی با استفاده از لاین‌های سلولی انسانی و تغذیه روی موش به مدت ۱۴ روز انجام شد، نتایج نشان داد که میخک تراریخته اثر منفی روی تغذیه موش ندارد (OGTR 2005). برای تعیین اثر سمیت روی سایر گیاهان، اثر عصاره بافتی میخک تراریخته نیز روی رویش دانه و رشد گیاهچه در کاهو و کلم مورد آزمایش قرار گرفت، و هیچ اثر منفی در جوانه‌زنی مشاهده نشد. به منظور بررسی میخک تراریخته بر روی موجودات ناحیه ریزوسفر نیز شمارش تعداد باکتری و قارچ در اطراف گیاه تراریخته و شاهد انجام شد، و اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تراریخته یافت نشد (OGTR 2005).

در ارزیابی‌ها احتمال علف‌هرزی شدن میخک، مشخص شد که میخک‌ها به صورت رایج به عنوان گونه مهاجم و علف‌هرز محسوب نمی‌شوند. آزمایش‌ها نشان داد که امکان هیبرید بین میخک‌ها با گونه بومی آن وجود ندارد، فقط گونه *Silene vulgaris* به عنوان علف‌هرز برای میخک شناخته شده است (OGTR 2005). گرده افشانی در میخک توسط حشرات انجام می‌شود و گرده‌های آن‌ها قابلیت انتقال توسط باد را ندارند و به دلیل عدم وجود سیستم‌های تکثیر رویشی (اندام‌هایی نظیر استولن، ریشه، غده، پیاز و یا رانر) توسط خود گیاه امکان گسترش هم وجود ندارد (Chandler et al 2008). لازم است در

ارزیابی احتمال خطر مشخص شود که اگر جریان ژنی اتفاق افتد آیا گلبرگ آبی رنگ اثری روی گرده‌افشان‌ها یا گیاهان دارند، اگرچه تاکنون این مسئله به صورت مستقیم به اثبات نرسیده است. از آن‌جاکه فرآیند تکامل بذر در میخک حداقل پنج هفته طول می‌کشد تکامل بذر روی شاخه‌های بریده وارداتی امکان پذیر نیست، زیرا گل‌های شاخه بریده حداکثر سه تا چهار هفته در دست مشتری زنده می‌مانند. مرکز تنوع زیستی میخک، جنوب اروپا است و *D. caryophyllus* تنها گونه وحشی است که در نواحی ساحلی مدیترانه‌ای یافت می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر این‌که میخک به صورت یک گیاه علفی رشد نماید مشاهده نشده است (Hughes 1991).

OGTR نتیجه‌گیری کرد که خطرهای ناشی از تجاری‌سازی میخک‌های تراریخته با گلبرگ‌های ارغوانی یا آبی بنفش، بعید است که اثری روی سلامتی و ایمنی مردم داشته باشد (OGTR 2005). چنانچه ملاحظه می‌شود به طور معمول بین ملاحظات ابراز شده از سوی مخالفین مهندسی ژنتیک و نتایج حاصل از بررسی‌های تجزیه احتمال خطر علمی، تفاوت فاحش وجود دارد. با وجود این‌که ملاحظات ابراز شده، به طور معمول نگران‌کننده و حتی گاهی وحشت‌آفرین هستند ولی پژوهش‌های دقیق علمی، بی‌اساس بودن این ملاحظات را نشان داده و بر ایمنی کامل محصولات تراریخته به طور عام و گل‌های زینتی تراریخته به طور خاص صحه می‌گذارند.

جدول ۲- آزمایش‌های میدانی گیاهان زینتی تراریخته

Table 2- Field trial for Genetically-Modified Ornamental Plants

| کشور          | آزمایش میدانی | صفت                                                             | گیاه           |
|---------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|----------------|
| Country       | Field trial   | Trait                                                           | Plant          |
| استرالیا      | 1992          | رنگ گل، افزایش طول عمر گل/ Flower of Life, Color                | میخک           |
| استرالیا      | 2006          | رنگ گل/ Flower Color                                            | رز هیبرید      |
| امریکا        | 2003          | رنگ گل/ مقاومت به علف کش/ Resistance to herbicide, Flower Color | بگونیا         |
| امریکا        | 2003          | تحمل به خشکی/ Tolerance to drought                              | نارون امریکایی |
| امریکا        | 2006          | تحمل به خشکی/ Tolerance to drought                              | آنتوریوم       |
| امریکا        | 2002          | کیفیت/ Quality                                                  | گل همیشه بهار  |
| امریکا        | 1996          | افزایش طول عمر/ Enhanced to flower of life                      | گل اطلسی       |
| امریکا        | 2000          | تحمل به تنش/ Stress tolerance                                   | آزالیا         |
| اتحادیه اروپا | 1997          | رنگ گل/ Flower Color                                            | میخک           |
| ژاپن          | 2004          | رنگ گل/ Flower Color                                            | میخک           |

## نتایج و بحث

بزرگ در فناوری دنیا از این قاعده مستثنی نیست. از زمان ظهور این فناوری تا به حال چالش‌ها و بحث‌های جنجال برانگیزی بر علیه آن مطرح شده است که بی‌منا بودن آن‌ها پس از گذشت بیش از سیزده سال از کشت متراکم و مصرف این قبیل محصولات، بی‌نیاز از توضیح می‌کند. اگرچه، به نظر می‌رسد که سطح آگاهی عمومی هنوز با این فناوری هم‌ساز نیست و رواج اطلاعات موهوم و غلط در مورد خطرات اثبات نشده این قبیل گیاهان و فناوری مورد استفاده هم‌چنان استمرار دارد. بنابراین جامعه دانشمندان، رسانه‌های عمومی و به‌ویژه سیاست‌مداران و تصمیم‌سازان کلان‌کشورها و جوامع به‌ویژه در جهان در حال توسعه باید با نگرش منطقی، علمی و بدون هیچ ادعای اغراق‌آمیز نسبت به توسعه این فناوری و آگاه‌سازی عمومی اقدام کنند. به هر حال تاکنون هیچ مدرکی دال بر مضر بودن گیاهان تراریخته برای انسان، موجودات دیگر و محیط زیست ارایه نشده است. در عین حال و برای ایجاد اطمینان کافی در مصرف‌کنندگان، آزمایش‌های اکولوژیکی- زراعی جامع و در سطح وسیع برای ارزیابی اثرهای آن‌ها قابل توصیه است.

## منابع

- Azadi P, Chin DP, Kuroda K, Khan RS, Mii M. 2010a.** Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of Agro bacterium-mediated transformation in Lilium. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 101: 201-209
- Azadi P, Ntui VO, Supaporn H, Khan RS, Chin DP, Nakamura I, Mii M. 2011.** Increased resistance to Cucumber Mosaic Virus (CMV) in Lilium transformed with a defective CMV replicase gene. *Biotechnology Letters* doi: 10.1007/s10529-011-0550-7
- Azadi P. 2010.** Commercial production of Genetically-Modified Ornamental Plants. *Biosafety* 2: 51-66(In Farsi with English abstract).
- Brand M H. 2006. Ornamental plant transformation.** In: **Li, Y., and Pei, Y. 2006.** *Plant Biotechnology in Ornamental Horticulture.* Haworth Food and Agricultural Products Press, New York, New York. Pages 27-50.
- Chandler S, Tanaka Y. 2007.** Genetic modification in floriculture. *Crit. Rev. Plant Sci* 26: 169-197
- Ghareyazi B. 2008.** Social and economic considerations and requirements for the use of transgenic
- Goven J. 2006.** Processes of inclusion, cultures of calculation, and structures of power. *Scientific citizenship and the Royal Commission on Genetic Modification. Sci. Tech. and Human Values* 31: 565-5
- Iwata H. 2004.** Protein and gene participating in perpetual blooming of angiosperm. Patent Publication Number WO/2004/070036.

بیوتکنولوژی می‌تواند صفت‌های جدیدی را در گیاهان زینتی ایجاد کند که با روش‌های مرسوم دورگ‌گیری امکان‌پذیر نیست، پیش‌بینی می‌شود که صنعت تولید و تبادل گیاهان زینتی در آینده‌ای نه‌چندان دور با تحولی شگرف روبه‌رو شود. این تحول مرهون نقش مهندسی ژنتیک خواهد بود. تجاری‌سازی گیاهان تراریخته زینتی هم‌سوالاتی را درمورد احتمال اثرهای منفی این گیاهان در مدیریت اکوسیستم به‌وجود آورده است. ارزیابی‌های احتمال خطر باید هم‌خطرها و هم‌راه‌های در معرض قرارگیری را با استفاده از اطلاعات علمی مشخص کنند (Johnson P, Riordan, 1999). این ارزیابی‌ها زمانی که محاسبه‌های عدم قطعیت و فرضیه‌های اساسی شفاف نباشند، ضعیف محسوب می‌شوند. رویکرد ارزیابی احتمال خطر باید به‌صورت مورد به مورد و مبتنی بر علم محوری باشد تا هماهنگی در قانونمندی‌سازی محصولات تراریخته در بین کشورها ایجاد کند (Goven 2006). هیچ یک از فناوری‌هایی که ما امروزه آن را می‌شناسیم، بدون احتمال خطر نبوده و بیوتکنولوژی هم‌به‌عنوان سومین تحول

**James C. 2011.** Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: ISAAA Briefs. No. 42

**Johnson K L, Raybould A J, Hudson M D, Poppy G M. 2007.** How does scientific risk assessment of GM crops fit within the wider risk analysis? *Trends Plant Sci.* 12: 1-5

**Johnson P, Riordan R. 1999.** A review of issues pertaining to transgenic turfgrasses. *HortScience* 34: 594-598.

**Johnson P, Riordan R. 1999.** A review of issues pertaining to transgenic turfgrasses. *HortScience* 34: 594-598

**Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton T. A, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao GQ, Nehra NS, Lu CY, Dyson BK, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG and Tanaka Y. 2007.** Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating Delphinidin. *Plant Cell Physiol.* 48: 1589-1600

**Nakamura N, Fukuchi-Mizutani M, Katsumoto Y, Togami J, Senior M, Matsuda Y, Furuichi K, Yoshimoto M, Matsunaga A, Ishiguro K, Aida M, Tasaka M, Fukui H, Tsuda S, Chandler S, Tanaka Y. 2011.** Environmental risk assessment and field performance of rose (*Rosa hybrida*) genetically modified for delphinidin production *Plant*

Biotechnology 28: 251–261

**OGTR (Office of the Gene Technology Regulator).**

**2005.** Risk Analysis Framework. Commonwealth of Australia, Canberra, Australia, <http://www.ogtr.gov.au>

**Potera C. 2007.** Blooming biotech. Nature Biotech. 25: 963–965

**Shibata, M. 2008.** Importance of genetic transformation in ornamental plant Wilkinson M J, Sweet J, Poppy G M. 2003. Risk assessment of GM plants: Avoiding gridlock? Trends Plant Sci. 8: 208–212

**Tohidfar M, Malik N. 2008.** Risk assessment of food derived from genetic engineering: gene horizontal to

bacteria. Biosafety 1: 5-9 (In Farsi with English abstract)

**Tohidfar M, Nakoda B, Maliki N, Abdini R. 2008.** Environmental Risk of Transgenic plant and Risk management. Biosafety 2: 57-67(In Farsi with English abstract).

**Tohidfar M, Ranema H, Gahreyazi B, Moghtari F. 2008.** Guideline to food derived from genetic engineering, Nozhoor Press, pp 100(In Farsi with English abstract)

**Williams C G .2005.** Framing the issues on transgenic forests. Nature Biotech. 23: 530–532.





## تعیین توالی و بررسی خصوصیات مولکولی ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

### سویه *Bacillus subtilis* B5d

#### Nucleotide sequence and molecular characterization a of $\beta$ -1, 4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* strain B5d

شعله ده پهلوان<sup>۱</sup>، مریم موسیوند<sup>۲</sup>، مریم هاشمی<sup>۲\*</sup> و جلیل خارا<sup>۱</sup>

Sholeh dahpahlavan<sup>1</sup>, Maryam Mousivand<sup>2</sup>, Maryam Hashemi<sup>2\*</sup> and Jalil Khara<sup>1</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه

۲- بخش تحقیقاتی بیوتکنولوژی میکروبی و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران-

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی- کرج- ایران

1-M.Sc, Biology Department, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

2- Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research

Institute of Iran(ABRII), Agricultural Research Education and Extension

Organization (AREO), Karaj, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۰)

### چکیده

این پژوهش به منظور تعیین برخی ویژگی‌های کاتالیتیکی و خصوصیات مولکولی ژن کدکننده آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در سویه *Bacillus subtilis* B5d انجام شد. ژن کدکننده این آنزیم در سویه B5d توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر، تعیین توالی و در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد. تجزیه توالی حاصله و رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار Mega.4 و Vector NTI انجام شد. براساس نتایج حاصله قطعه تعیین توالی شده شامل ۷۹۴ نوکلئوتید بود که یک رشته پپتیدی با ۲۶۴ اسید آمینه را کد می‌کند. تجزیه توالی آمینواسیدی این ژن در سویه مورد بررسی نشان داد که آنزیم اندوبتاگلوکاناز تولیدشده توسط سویه مورد پژوهش چندبخشی بوده که قسمت باند شونده به سلولز (Cellulose Binding Domain, CBD) آن مربوط به خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۳ و قسمت کاتالیک (CD) آنزیم مورد بررسی متعلق به خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۵ است. همچنین فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d، در محدوده دمایی ۳۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۴/۶ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت کاتالیتیک آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بوده که ۴۶۱/۸۳ U/L برآورد شد. بررسی پایداری آنزیم در شرایط دمایی و pHهای مختلف نشان داد که تا دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در محدوده pH ۱۰-۵ آنزیم پایداری بهتری دارد.

### واژه‌های کلیدی

تجزیه فیلوژنی  
باسیلوس سابتیلیس  
پایداری آنزیمی  
ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز  
سویه B5d

## مقدمه

سلولازها یا آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز به وسیله میکروارگانیسم‌های مختلف شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها تولید می‌شوند. در بین این آنزیم‌ها، بتاگلوکانازها به دلیل درجه بالای پایداری دارای کاربردهای صنعتی و کشاورزی زیادی هستند. (Furtado et al. 2011). گلوکانازها به دو گروه اندو و اگزو گلوکانازها تقسیم می‌شوند. اندوگلوکانازها پیوندهای درون زنجیره‌ای را به صورت تصادفی شکسته و الیگوساکاریدها را تولید می‌کنند در حالی که اگزوگلوکانازها پیوندهای انتهای غیراحیا کننده زنجیره پلیمری را هیدرولیز و منوساکارید تولید می‌کنند (Morallefi and Seligy, 1986). آنزیم‌های اندوبتاگلوکاناز براساس نحوه عمل، شباهت توالی اسیدهای آمینه، خصوصیات سوبسترا و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی در پانزده خانواده گلیکوزید هیدرولاز (GH) طبقه‌بندی می‌شوند. در بین این خانواده‌های آنزیمی، خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها یکی از بزرگترین خانواده‌ها محسوب شده و تعداد زیادی از اندو بتا ۱ و ۴ گلوکانازها در آن قرار می‌گیرند. این خانواده متشکل از ۶۷ عضو با فعالیت‌های مختلف شامل اندوگلیکوزیل سرامیداز (EC 3.2.1.123)، سلولاز (EC 3.2.1.4)، لیچنیناز (EC 3.2.1.73)، بتامانوزیداز (EC 3.2.1.25)، گلوکان ۱ و ۳ بتاگلوکوزیداز (EC 3.2.1.58)، گلوکان‌اندو ۱ و ۶ بتاگلوکوزیداز (EC 3.2.1.75)، مانان‌اندو ۱ و ۴ بتامانوزیداز (EC 3.2.1.58)، سلولز ۱ و ۴ بتاسلویوزیداز (EC 3.2.1.91)، اندو ۱ و ۶ بتاگلاکتاناز (EC 3.2.1.-)، ۱ و ۳ بتاماناناز (EC 3.2.1.-) و اندو ۱ و ۴ بتازیلاناز (EC 3.2.1.8) است (John et al. 2010). بررسی ساختارهای سه‌بعدی برای تعداد زیادی از آنزیم‌های خانواده ۵ نشان داده که قسمت کاتالیتیکی این آنزیم‌ها دارای تاختوردگی  $(\alpha/\beta)$ 8-barrel fold بوده و با نام TIM-barrel fold نیز شناخته می‌شوند. قسمت کاتالیتیکی از نظر شکل ظاهری شبیه به یک کاسه سالاد است. این ساختار در این خانواده بسیار حفاظت شده است و تنها شکل آن بین دایره و بیضی کامل متغیر است. این نوع تاختوردگی پروتئین در آنزیم‌های خانواده ۱۰ نیز مشاهده می‌شود و به همین دلیل هر دو خانواده ۵ و ۱۰ در دسته GH-A (گلیکوزید هیدرولاز A) قرار می‌گیرند (Pollet et al. 2010). مشخصه بتاگلوکانازهای خانواده

۵، گستردگی عمل بر سوبستراهای مختلف است، به طوری که نه تنها سوبسترای خطی بتاگلوکان را مورد حمله قرار می‌دهند بلکه همچنین جایگاه فعالشان (Active-site) را با الیگوساکاریدهای شاخه‌دار وفق می‌دهند. در هیدرولیز هموبتاگلوکان‌هایی که در آن‌ها مخلوط دو پیوند بتا ۱ و ۳ و بتا ۱ و ۴ وجود دارد، تمام پیوندهای بتا ۱ و ۳ بین دو پیوند بتا ۱ و ۴ شکسته می‌شوند. همچنین پیوندهای بتا ۱ و ۴ که قبل از پیوند بتا ۱ و ۳ قرار دارند مورد حمله واقع می‌شوند در حالی که پیوند بتا ۱ و ۴ که بلافاصله پس از بتا ۱ و ۳ در انتهای برش خورده واقع شده، هیدرولیز نمی‌شوند (Rabinovich et al. 2002).

باکتری‌های متعلق به جنس *Bacillus* از جمله باکتری‌های تولید کننده آنزیم سلولاز هستند. تعیین توالی و بررسی خصوصیات مولکولی ژن‌های کد کننده آنزیم‌های اندوگلوکانازها و اگزوگلوکانازها در گونه‌های مختلف این جنس به خصوص در *B. subtilis*، *B. latus* و *B. polymxa* به فراوانی انجام شده است. همچنین در بررسی‌های متعددی جایگاه اتصال سلولز (CBD) و جایگاه کاتالیکی (CD) ژن سلولاز سویه‌های جنس باسیلوس بررسی شده است (Bischoff et al. 2007). پژوهش‌های مربوط به تعیین توالی این ژن در گونه *B. subtilis* نشان داده است که آنزیم اندوبتاگلوکاناز به صورت یک پروپروتئین (pro protein) با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون سنتز می‌شود که پس از جدا شدن یک قسمت پپتیدی از انتهای کربوکسیلی تبدیل به پروتئین فعال با وزن مولکولی ۳۵ کیلو دالتون می‌شود (Lindahl and Tronsmo 1994). نقطه ایزوالکتریک این آنزیم ۵/۴ است و متعلق به خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز است (Mawadza et al. 2000). آنزیم بتاگلوکاناز در فرآوری مواد غذایی، تهیه خوراک دام، صنایع آبجوسازی، منسوجات، آماده‌سازی پروتوپلاست مخمر، تهیه اسانس‌های روغنی و ... کاربرد وسیعی دارد (Song et al. 2010). شایان ذکر است که برای رفع هرکدام از نیازهای صنعتی خاص، بتاگلوکانازهای مورد استفاده بایستی ویژگی‌های خاصی مانند پایداری مناسب در برابر حرارت و pH و فعالیت اختصاصی بالا را دارا باشند (Rajoka, 2004; Beshay et al. 2003).

با توجه به کاربردهای متنوع بتاگلوکانازها در صنایع مختلف براساس ویژگی‌های مولکولی و کاتالیکی آنزیم مورد استفاده،

میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR(10x)، ۴ میکرولیتر  $MgCl_2(25mM)$ ، ۱ میکرولیتر  $dNTPs(10mM)$ ، ۵ میکرولیتر آغازگر پیش‌رو (5'-atgaacgggtcaatctctatctt-3')، ۵ میکرولیتر آغازگر پس‌رو (5'-actaattgggtctgtcccaaa-3')، با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۴ میکرولیتر (حاوی ۲/۵ واحد) از آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲ میکرولیتر دی.ان.ا. الگو با غلظت ۳۵ نانوگرم بر میکرولیتر و ۲۸/۶ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه به صورت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۵۱ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول پی.سی.آر روی ژل آگارز ۱ درصد با بافر TAE (1x) و ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد. بازیافت و خالص‌سازی قطعه موردنظر از ژل با استفاده از کیت High pure PCR Product purification Kit (Roche, Cat. No. 11. 732. 668. 001) انجام شد. دی.ان.ا. بازیافت شده توسط شرکت TAG Copenhagen (Danmark) تعیین توالی و پس از انجام تجزیه توسط نرم‌افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد.

#### تجزیه فیلوژنتیکی ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

توالی مربوط به ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d پس از تعیین چهارچوب قرائت پروتئین (Reading frame) توسط Blast X با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI (Invitrogen; www.invitrogen.com/VectorNTI) به آمینواسید ترجمه شد. توالی مورد بررسی با ۱۴ توالی ژن بتا اندوگلوکاناز از بانک ژن NCBI به منظور گروه‌بندی در خانواده‌های گلیکوزیل هیدرولاز مورد مقایسه قرار گرفت. پس از اعمال هم‌ردیفی با نرم‌افزار ClustalW (Thompson et al. 1994)، درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار Mega.4 با روش neighbor-joining ترسیم شد. درجه اعتبار سنجی گروه‌بندی‌های ایجاد شده با روش Bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار تعیین شد (Saitou and Nei, 1986).

#### تولید آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

ابتدا سویه مذکور در محیط NBY به صورت خطی کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

هدف بررسی حاضر تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d جدا شده از فیلوسفر درخت سیب و بررسی برخی ویژگی‌های عملکردی آنزیم ذکر شده هستند.

### مواد و روش‌ها

#### سویه باکتریایی و شرایط کشت

سویه باکتریایی *B. subtilis* B5d با پتانسیل تولید آنزیم بتاگلوکاناز از بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه شد. سویه مذکور از فیلوسفر درخت سیب در باغ‌های استان کرمان جداسازی و براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی مبتنی بر 16S rDNA به عنوان گونه *B. subtilis* تشخیص داده شده بود (Mousivand et al. 2012). فعال‌سازی سویه مورد بررسی به منظور انجام بررسی‌های بعدی روی محیط کشت NBY در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. (Lindeman et al. 1984).

#### استخراج دی.ان.ای ژنومی

برای استخراج دی.ان.ا.، سویه باکتریایی *B. subtilis* B5d در محیط NB کشت و در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۸ ساعت قرارداده شد. توده زیستی در محیط NB (حداکثر  $2 \times 10^9$  سلول در میلی‌لیتر) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز روماند (supernatante) حذف و فاز ته‌نشست برای استخراج دی.ان.ا. استفاده شد. استخراج دی.ان.ای ژنومی با استفاده از کیت Blood&Tissue DNAeasy Kit (QIAGEN, Cat.No.69504) و با توجه به دستورالعمل مربوطه از سویه B5d صورت گرفت. کیفیت و غلظت دی.ان.ا. استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتر نانودراپ (Spectrophotometr) (Thermo Scientific 2000C) و در طول موج ۲۶۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

#### تکثیر ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی.سی.آر)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی.سی.آر) به منظور تکثیر ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (*Bs celup*) انجام شد (Jung et al, 2010). واکنش پی.سی.آر در حجم ۵۰

سویه *B. subtilis* B5d در دماهای ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتی گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور آنزیم در دماهای مورد نظر قرارداد شده و پس از گذشت زمان‌های معین (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه) سنجش فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز به روش دی نیتروسالسیلیک اسید و در pH ۵/۷۵ و غلظت ۱ درصد از سوسترای لچنین انجام شد. درصد فعالیت باقی مانده آنزیم پس از گذشت زمان مربوطه در هر دما در مقایسه با کنترل محاسبه شد.

#### بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d در pH های مختلف

پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه *B. subtilis* B5d در pH های مختلف محاسبه شد. به این منظور ابتدا آنزیم به نسبت ۱:۱ با بافر مناسب (pH=۳-۱۰) رقیق و سپس آنزیم‌های رقیق شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرارداد شدند. سپس سنجش آنزیمی در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و غلظت ۱ درصد از سوسترای لچنین انجام شد. درصد فعالیت باقی مانده آنزیم بتاگلوکاناز در pH های مختلف در مقایسه با کنترل ارزیابی شد.

### نتایج و بحث

#### تکثیر ژن اندو بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

ژن اندو بتاگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d با آغازگر Bs cel up تکثیر شد. محصول پی.سی.آر یک قطعه ۱۵۰۰bp بود که پس از خالص سازی، تعیین توالی و با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این مقایسه نشان داد که قطعه تکثیر شده از استرین B5d مربوط به ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز بوده که با توالی‌های ژن بتاگلوکاناز متعلق به گونه‌های باسیلوس از قبیل *B. megaterium* (accession N.: AGG91154.1)، *B. mojavensis* (accession N.: WP010334430)، *B. subtilis* (accession N.: AHD24502.1) و *B. subtilis* (accession N.: AHC02484.1) موجود در بانک ژن پایگاه اطلاعاتی NCBI بیش از ۹۹ درصد شباهت دارد (شکل ۱).

همچنین با بررسی ساختار اولیه حاصل از ترجمه این توالی مشخص شد که ناحیه کاتالیک آنزیم بتاگلوکاناز متعلق به خانواده

سپس محیط کشت NB با یک لوپ از باکتری رشد یافته روی محیط NBY تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. به منظور تولید آنزیم، ۲ درصد از مایه تلقیح آماده شده به محیط کشت تولید آنزیم (۱۰ گرم بر لیتر مالت، ۳ گرم بر لیتر عصاره گوشت، ۴ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۵ گرم بر لیتر  $\text{CaCl}_2$ ،  $\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۳ گرم بر لیتر  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و ۱ گرم/لیتر  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  برای ۱ لیتر) افزوده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد با دور ۱۸۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. به منظور جداسازی آنزیم تولید شده، محیط‌های کشت تخمیر شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. بخش روماند (Supernatant) که حاوی آنزیم بتاگلوکاناز بود تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Hashemi et al., 2010).

#### بررسی ویژگی‌های عملکردی آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

##### تولیدی سویه *B. subtilis* B5d

به منظور تعیین ویژگی‌های عملکردی آنزیم تولید شده، فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در pH=۴/۶ دماهای ۳۰، ۵۵ و ۷۰ و غلظت ۱ درصد از سوسترای لچنین (یک درصد) اندازه گیری شد. به منظور سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه B5d از روش دی نیتروسالسیلیک اسید استفاده شد (Bailey et al., 1992). ابتدا ۱۰۰ میکرو لیتر سوسترای لچنین (۱ درصد) به مدت ۵ دقیقه در دمای مورد نظر قرارداد شده. برای تهیه pH های مختلف نیز از بافرهای سیترات و فسفات با غلظت ۵۰ میلی مولار استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر آنزیم به سوسترای اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای مورد نظر قرارداد شده و در نهایت ۶۰۰ میکرو لیتر از معرف دی.ان.اس به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرارداد شده. قندهای آزاد شده از لچنین در طول موج ۵۴۰ نانومتر و با استفاده از معادله حاصل از منحنی استاندارد گلوکز اندازه گیری شد. واحد فعالیت آنزیم (Unit) برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند در یک دقیقه، در شرایط مطلوب، یک میکرومول سوسترای را به محصول تبدیل کند.

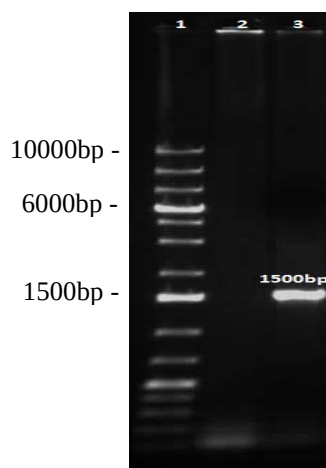
#### بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه

##### *B. subtilis* B5d در دماهای مختلف

پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط

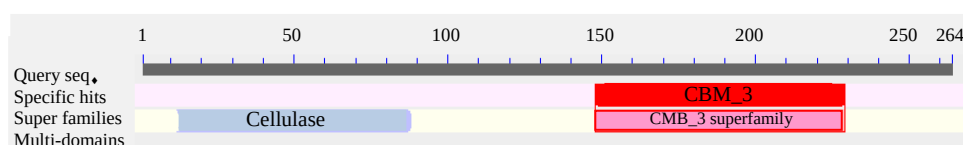
B5d ۸۱ آمینواسیدی بوده و در انتهای کربوکسیل واقع شده است این دو ناحیه توسط یک توالی اتصال دهنده ۵۹ آمینواسیدی به هم متصل می شوند (شکل ۲).

۵ گلیکوزیل هیدرولازها در انتهای ناحیه آمینی قرار گرفته و شامل ۶۷ اسید آمینه از شماره ۱۲ تا ۸۸ می شود. همچنین ناحیه CBD متعلق به خانواده ۳ در ناحیه کربوکسیل این پروتئین قرار گرفته و شامل اسیدهای آمینه ۱۴۸ تا ۲۲۹ می شود. ناحیه CBD در سویه



شکل ۱- محصول پی.سی.آر ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز استرین *Bacillus subtilis* B5d (1500 bp). چاهک شماره ۱: Ladder؛ چاهک شماره ۲ کنترل و چاهک شماره ۳ قطعه‌ی تکثیر شده از ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز

**Figure 1-** PCR product of the beta 1 and 4 endoglucanase gene of the *Bacillus subtilis* strain B5d (1500 bp). Lane 1 (Ladder), Lane 2 (control) and Lane 3 (the PCR product of  $\beta$ -glucanase gene)



1 qdvndapdeq lkdanvmyal hfyagthgqf lrdkadyals kgapifvtew gtsdasgngg  
61 vyldqsrewl nfidskkiw vwnlsdkqe sssalkpgas ktggwplsdl sasgtfvren  
121 irgsqnsskd rsetpkqekp aqensisvqy rtgdgsvnsn qirplinvkn nskttvnlkn  
181 vtvrwfyntk nkgqnfcdy akigcsnvth kfvthkpvk gadaflelgf kngtlspgas  
241 tgniqirlln edwgnfsqtg dfsf

Catalytic. Domain

CBM

شکل ۲- توالی آمینواسیدی ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز استرین *Bacillus subtilis* B5d. ناحیه کاتالیکی آنزیم بتاگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها در انتهای N و ناحیه باند شونده با سلولز متعلق به خانواده ۳ در ناحیه C این ژن قرار گرفته است. این نواحی به ترتیب توسط آمینواسید ۱۲ تا ۸۸ و اسیدهای آمینه ۱۴۸ تا ۲۲۹ کد می شود.

**Figure 2-** The amino acids sequences of  $\beta$  1, 4 endo-glucanase gene from the *Bacillus subtilis* strain B5d. The amino acids of 12 to 88 is the catalytic domain in N terminal and the amino acids of 148 to 229 is cellulose binding domain (CBM3) in C terminal of  $\beta$  1, 4 endo-glucanase.

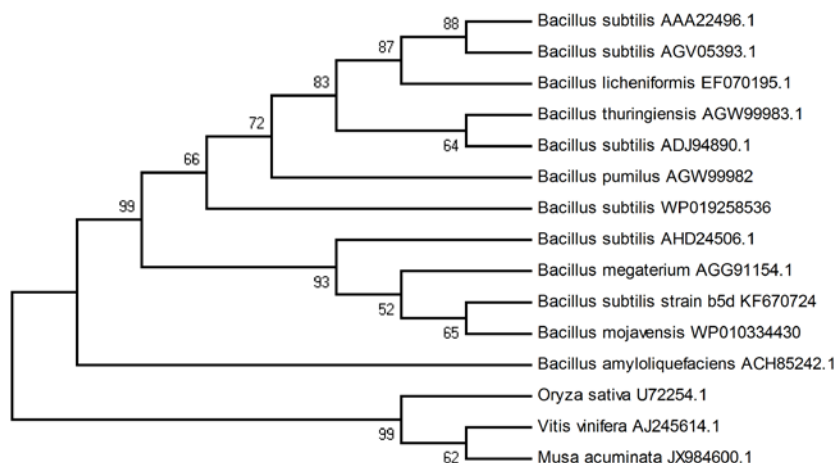
*subtilis* (accession N.: AAA22496.1), *B. subtilis* (accession N.: AGV05393.1), *B. thuringiensis* (accession N.: AGW99983.1), *B. pumilus* (accession N.: AGW99982), *B. megaterium* (accession N.: AGG91154.1), *B. mojavensis* (accession N.: WP010334430), *B. subtilis* (accession N.: ADJ94890.1), *B. subtilis* (accession N.: WPO19258536), *B. subtilis* (accession N.: AHD24502.1), *B. subtilis* (accession N.: AHC02484.1), *B. licheniformis*, *Oryza active* (accession N.: U72254.1), *Vitis vinifera* (accession N.: AJ245614.1), *Musa acuminata* (accession N.: JX984600.1). نشان داد که ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d بیشترین شباهت را با درجه بالای اعتبار به ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولاز (E. C. N: 3.2.1.4) گونه‌های *Bacillus* دارد. پژوهش‌های متعددی حضور ژن بتا ۱ و ۴ گلوکاناز در سویه‌های باسیلوس و تعلق آن را به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها تأیید می‌کند (شکل ۳).

پژوهش‌های انجام شده نشان داده است اغلب سلولازها و زیلانازها چند ناحیه‌ای (Multi domain) بوده و دارای نواحی کاتالیک (Catalytic Domain) و ناحیه باند شونده به سلولز (Cellulase) (Bindind Domain (CBD) هستند. در اغلب باکتری‌ها ناحیه باند شونده با سلولز در انتهای کربوکسیلی یا آمینی واقع شده و ۱۰۰ آمینواسیدی است. ناحیه کاتالیکی و ناحیه باند شونده به سلولز به وسیله توالی‌های اتصال دهنده (Linker sequence) به هم متصل می‌شوند. این توالی‌ها غنی از آمینواسید سرین بوده و در اغلب باکتری‌های جنس *Pseudomonas* یافت می‌شود. طول این ناحیه بین ۶ تا ۵۹ آمینواسید متغیر است (Ferreira et al. 1991).

### تجزیه فیلوژنتیک ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه

#### *B. subtilis* B5d

پس از ترجمه ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز B5d با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI توالی ژن ذکر شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد (Accession NO. KF670724). قطعه تعیین توالی شده ژن ذکر شده شامل ۷۹۴ نوکلئوتید است که یک رشته پپتیدی شامل ۲۶۴ اسید آمینه را کد می‌کند. تجزیه فیلوژنی این توالی با ۱۴ توالی مرجع در پایگاه اطلاعاتی NCBI شامل *B.*



شکل ۳- آزمون فیلوژنی براساس توالی آمینواسید ژن بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز استرین *Bacillus subtilis* B5d و برخی توالی‌های مرجع ثبت شده در پایگاه NCBI. اعداد پشت شاخه‌های درجه اعتبارسنجی گروه‌بندی‌ها را براساس روش Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد.

**Figure 3-** Fig. 3 Phylogenetic analysis based on the partial amino acid sequences of  $\beta$  1, 4 endo-glucanase genes from the *Bacillus subtilis* strain B5d and some reference sequences retrieved from NCBI GenBank. The numbers at the nodes indicate bootstrap values based on 1.000 replications.

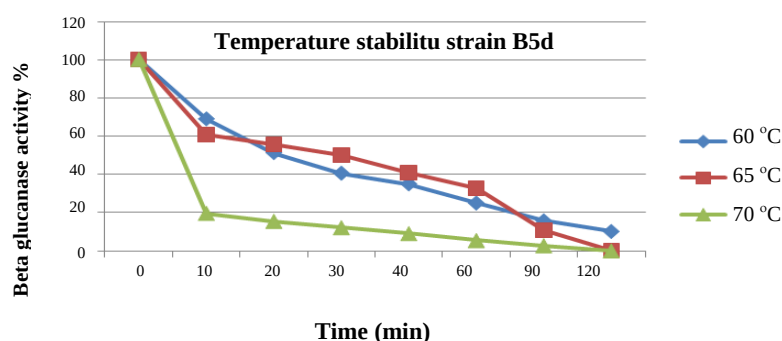
قرار گرفتن در خانواده ۱۶ گلیکوزید هیدرولازها از ژن بتاگلوکاناز گیاهان در خانواده ۱۶ گلیکوزید هیدرولازها به شدت متفاوت است. براساس یک قاعده کلی توالی مربوط به خانواده های مشابه بیشتر به هم مرتبط بوده و شباهت بیشتری دارد. چنین دیدگاهی باعث شده که توالی های مشابه در خانواده های مشابه قرار بگیرند (Diaz et al. 1997). همچنین براساس نتایج حاصل از درخت فیلوژنی مشخص شد که اگرچه جدایه B5d دارای آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولاز است و با گونه های مختلف باسیلوس در یک گروه قرار می گیرد اما تنوع در دورن خانواده آنزیمی بین گونه های مختلف باسیلوس و حتی سویه های متفاوت یک گونه مشهود است.

#### ویژگی های بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولیدی توسط سویه *B. subtilis* B5d

فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d در محدوده دمایی ۷۰-۳۰ درجه سانتی گراد و pH ۴/۶ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این ارزیابی نشان داد که آنزیم ذکر شده در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد با فعالیتی معادل ۴۶۱/۸۳ U/L بیشترین فعالیت کاتالیتیک را دارا است. فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه ذکر شده در دماهای ۳۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد به شدت کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیم در دماهای ۳۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد به ترتیب ۱۱۲/۹۸ و ۱۸۶/۴۸ U/L برآورد شد.

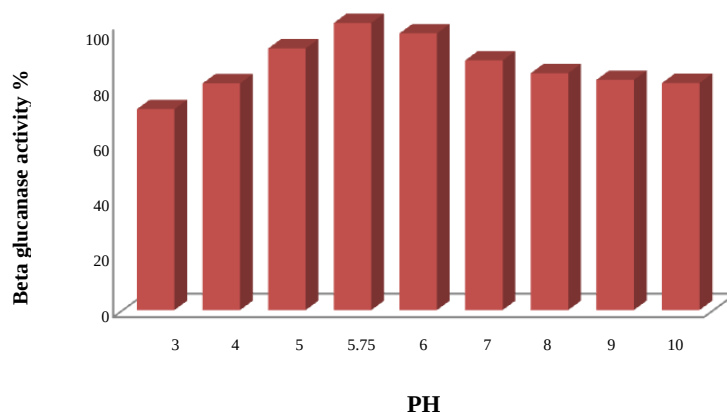
بررسی ساختار و توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز در دو سویه HR68 و *Bacillus* CH43 نشان داد که این آنزیم دارای تاخوردگی  $(\alpha/\beta)_8$  است و با اندوگلوکانازهای خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز *B. subtilis* دارای همولوژی کامل است (Mawadza et al. 2000). همچنین بررسی توالی ژن بتا ۱ و ۳-۱ و ۴ گلوکاناز *B. subtilis* A8 نشان داد که آنزیم ذکر شده متعلق به خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها است. این آنزیم پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون سنتز می کند و شامل ۲۵۶ آمینواسید در ناحیه کاتالیک و ۸۲ آمینواسید در ناحیه اتصال به سلولز (CBD) است (Jung et al. 2010). بتا ۱ و ۴ گلوکاناز *B. cereus* بیشترین شباهت را به ژن بتاگلوکاناز گونه های *Bacillus* خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولاز دارد که پروتئینی با وزن مولکولی ۵۰ کیلودالتون سنتز می کند و دارای تاخوردگی  $(\alpha/\beta)_8$  است (Yan et al. 2012).

همچنین براساس نتایج حاصل از تجزیه فیلوژنی مشخص شد که توالی ژن بتاگلوکاناز سویه مورد بررسی و سایر سویه های مرجع که آنزیم اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلیکوزیل هیدرولازها را تولید می کنند از ژن بتاگلوکاناز گونه *B. amiloliquefaciens* (accession N: ACH85242.1) که متعلق به خانواده ۱۶ گلیکوزید هیدرولازها هستند و آنزیم بتا ۱ و ۳-۱ و ۴ اندوگلوکاناز را سنتز می کند به طور کامل متمایز است. قابل ذکر است که آنزیم بتاگلوکاناز باکتری *B. amiloliquefaciens* با وجود



شکل ۴- پایداری حرارتی آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d

Figure 4- Temperature stability of *Bacillus subtilis* B5d  $\beta$  1, 4 endo-glucanase



شکل ۵- پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d در pH های مختلف

Figure 5- pH stability of *Bacillus subtilis* B5d  $\beta$  1, 4 endo-glucanase

آنزیم بتاگلوکاناز گونه‌های باسیلوس تا محدوده دمایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد است و با افزایش دما فعالیت آنزیم به سرعت کاهش می‌یابد. آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز سویه *B. subtilis* NSRS89-24 ۱۰۰ درصد از فعالیت خود را در دامنه دمایی ۴۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد حفظ کرده، افزایش دما تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد منجر به کاهش ۵۰ درصد از فعالیت آنزیمی شد و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم به صفر رسید (Leelasuphakul et al. 2006). همچنین در بررسی دیگری پایداری دمایی آنزیم بتا گلوکاناز دوسویه *Bacillus* HR43 و *Bacillus* HR68 نشان داد که هر دو آنزیم تا محدوده دمایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت داشته و با افزایش دما فعالیت آنزیمی به شدت کاهش می‌یابد (Mavadza et al. 2000).

بررسی پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه B5d در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و محدوده pH ۳-۱۰ نشان داد که بیشترین پایداری آنزیم در pH ۵-۶ است. براساس نتایج به دست آمده آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز تولید شده توسط سویه B5d توانایی حفظ ۷۰ درصد، ۷۹ درصد، ۹۱ درصد، ۹۶ درصد، ۸۷ درصد، ۸۲ درصد، ۸۰ درصد و ۷۹ درصد از فعالیت خود را به ترتیب در pH های ۳ تا ۱۰ دارا است. براساس نتایج حاصله مشخص شد که آنزیم اندوگلوکاناز سویه B5d در محدوده pH ۵ تا ۱۰ پایدار است. نتایج به صورت درصد فعالیت باقیمانده در (شکل ۵) ارایه

#### پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز *B. subtilis* B5d در دماها و pH های مختلف

پایداری آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه *B. subtilis* B5d در دماهای ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه ۶۸ درصد از فعالیت آنزیمی حفظ می‌شود. در ادامه و با گذشت زمان روند کاهشی فعالیت آنزیمی مشاهده شد. به طوری که پس از گذشت زمان‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، آنزیم به ترتیب ۵۱ درصد، ۴۰ درصد، ۳۴ درصد، ۲۴ درصد و ۱۵ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد و در زمان ۱۲۰ دقیقه به ۱۰ درصد رسید. بررسی پایداری آنزیم در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد که با گذشت زمان فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد، به طوری که بعد از ۱۰ دقیقه ۶۰ درصد از فعالیت کاتالیتیک آنزیم حفظ شود. با گذشت زمان‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه، آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز سویه B5d به ترتیب ۵۵ درصد، ۵۰ درصد، ۴۰ درصد، ۳۲ درصد، ۱۰ درصد و ۰/۲ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد. در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان فعالیت آنزیمی به طور قابل توجهی کاهش یافت و با گذشت ۱۰ دقیقه تنها ۱۹ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد و در ۶۰ دقیقه فعالیت آنزیم به ۹ درصد رسید و پس از ۱۲۰ دقیقه به صفر رسید (شکل ۴). در بررسی‌های مشابه نیز پایداری دمایی



(Jung *et al.* 2010). همان‌طور که در نتایج این بررسی نیز مشخص شد پایداری در محدوده گسترده‌ای از pH از خصوصیات آنزیم بتاگلوکاناز جنس باسیلوس است (Hakamada *et al.* 2002). با توجه به دما و pH بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه B5d به نظر می‌رسد این آنزیم گزینه مناسبی برای استفاده در خوراک دام و طیور باشد. بدین‌منظور ارزیابی شرایط تولید آنزیم با استفاده از پسماندهای کشاورزی، تعیین شرایط بهینه و محیط کشت اقتصادی برای تولید در فاز بعدی انجام خواهد شد.

### منابع

- Beshay U, Enshasy HE, Ismail I, Moawad H, Wojciechowska E, Ghany SA. 2003.  $\beta$ -glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: Effect of growth substrates and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor. *Process Biochem* 39: 307-313.
- Bailey M, Biely P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol* 23:257-70.
- Bischoff K, Liu S, Hughes SR. 2007. Cloning and characterization of a recombinant family 5 endo glucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361. *Process Biochem* 42: 1150-1154.
- Coughlan MP, Hazlewood GP. 1993. 1, 4- $\beta$ -Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem* 17: 259-289.
- Diaz R, Sapag A, Peirano A, Steiner J, Eyzaguirre J. 1997. Cloning sequencing and expression of the DNA of endoxylanase B from *Penicillium purpurogenum* Gene. 187:247-257.
- Ferreiral MA, Hazlewood GP, Barker P, Gilbert HJ. 1991. The cellodextrinase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* consists of multiple functional domains. *Biochem J.* 279: 793-799.
- Furtado GP, Ribeiro LF, Santos CR, Tonoli CC, de Souza AR, Oliveira RR, Murakami MT, Ward RG. 2011. Biochemical and structural characterization of a  $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochem* 46: 1202-1206.
- Hashemi M, Shojasadati SA, Razavi SH, Mousavi SM. 2011. The potential of brewer's spent grain to improve the production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. *New Biotechnol.* 28(2), 165-172.
- Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G. 1996. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *PNAS* 92(15):

شده‌است. بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه *B. cereus* در محدوده pH ۲-۱۰ نشان داد که آنزیم ذکر شده حدود ۹۰ درصد از فعالیت خود را در دامنه pH ۵-۹ حفظ کرد و در ۸۳ pH، درصد از فعالیت خود را حفظ می‌کند (Yan *et al.* 2012). همچنین بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳-۱ و ۴ گلوکاناز *B. subtilis* A8-8، نشان داد که آنزیم ذکر شده مشابه با آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز جدایه مورد بررسی در این پژوهش قادر است حدود ۸۰ درصد از فعالیت خود را در دامنه pH ۲-۸ حفظ کند. اگرچه بیشترین فعالیت آنزیمی در pH = ۸ مشاهده شد

7090-7094.

- Hakamada Y, Endo K, Takizawa S. 2002. Enzyme properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1570: 174-180.
- Jenkins J, Lo Leggio L, Harris G, Pickersgill R. 1995. Beta-glucosidase, beta-galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold beta/alpha architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of beta-strands four and seven. *FEBS Lett* 362(3): 281-285.
- John FJ, González JM, Pozharski E. 2010. Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: a dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. *FEBS Lett* 584(21): 4435-4441.
- Jung YJ, Lee YS, Park IH, Chandra MS, Kim KK, Choi YL. 2010. Molecular cloning, purification and characterization of thermostable  $\beta$ -1, 3-1, 4 glucanase of *Bacillus subtilis* A8-8. *Indian J. Biochem. Biophys* 47:203-210.
- Lindahl V, Tronsmo A. 1994. Nucleotide sequence of an endo-1, 4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* CK-2. *Antonie van Leeuwenhoek.* 66, 327-332.
- Lindemann J, Arny DC, and Upper CD. 1984. Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on snap bean and nonhost plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. *Phytopathol.* 74: 1329-1333.
- Leelasuphakul W, Sivanunsakul P, Phongpaichit S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1, 3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme Microb. Technol* 38: 990-997.
- Mawadza C, Hatti-Kaul R, Zvaunya R, Mattiasson B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *J. Biotechnol.* 83: 177-187.

**Moranelli M, Seligy V.1986.** Structure of a Bacillus subtilis endo-p- 1, Cglucanase gene. Nucleic Acids Res 14: 9159-9170.

**Mousivand M, Hashemi M, Makhdumi MA. 2011.** Enzyme production for animal and poultry feed by some biofilm forming Bacillus subtilis strains. IV international conference on environmental, Ind. Appl. Microbiol Spain.

**Pollet A, Delcour JA, Courtin CM .2010.** Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. Crit. Rev. Biotechnol 30(3): 176-191.

**Rajoka MI. 2004.** Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in Cellulomonas flavigena. Electronic J. Biotechnol 0717-3458.

**Rabinovich ML, Melnick MS, Bolobova AV. 2002.** The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. Biochem 67(8): 850-871.

**Saitou N and Nei M. 1986.** The number of nucleotides required to determine the branching order of three species with special reference to the human-

chimpanzee-gorilla divergence. J. Mol. Evol 24: 189-204.

**Song J, Nam K, Sun YU, Kang M, Kim CH, Kwon SK, Lee J, Lee YH. 2010.** Molecular and biochemical characterization of a novel arthropod endo- $\beta$ -1, 3-glucanase from the Antarctic springtail, Cryptopygus antarcticus horizontally acquired from bacteria. Comp. Biochem. Physiol 155: 403-412.

**Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994.** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680.

**Vijayendra S, Kashiwagi Y. 2009.** Characterization of new acid stable polysaccharides. Int. J. Biol. Macromol 44: 92-97.

**Yan H, Dai Y, Zhang Y, Yan L, Liu D. 2012.** Purification and characterization of an endo-1, 4- $\beta$ -glucanase from Bacillus cereus. Afr. J. Biotechnol 10(72): 16277-16285.

## تشخیص مولکولی ذرت‌های تراریخته براساس پیشبر P35S

### PCR detection of transgenic maize on the basis of P35S

دیانا حیدری<sup>۱\*</sup>، محمدحسن شاه‌حسینی<sup>۲،۳</sup> و زیور صالحی<sup>۴</sup>

Diana Heidari<sup>1</sup>, Mohammad hassan Shahhosseiny<sup>2,3</sup> and Zivar Salehi<sup>4</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- موسسه ایرانیان ژن فناوری (IGF)، تهران، ایران

۴- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

1- M.Sc student, Department of Biology, Pardis International, University of Guilan.

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University shahre ghods branch, Tehran, Iran.

3- Iranian Gene Fanavar institute (IGF), Tehran, Iran.

4- Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Diana2730@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۲)

## چکیده

### واژه‌های کلیدی

پیشبر P35S

ذرت تراریخته

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واردات

مهندسی ژنتیک

در دو دهه‌ی اخیر مهندسی ژنتیک با استفاده از علم بیوتکنولوژی باعث تولید محصولات تراریخته در جهان شده است. آمار رو به رشد سطح کشت محصولات تراریخته در سراسر دنیا حاکی از اهمیت ویژه‌ی تراریخته‌ها و افزایش استفاده‌ی عموم مردم از این مواد غذایی است. ذرت یکی از مهمترین محصولات تراریخته است که در بسیاری از کشورها به‌میزان زیادی کشت و مصرف می‌شود. هدف از این پژوهش شناسایی ذرت‌های تراریخته با استفاده از روش مولکولی حساس و اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی.سی.آر) است که قابلیت جداسازی موادغذایی تراریخته از غیرتراریخته را دارا است. این پژوهش انجام شده با هدف تشخیص ذرت‌های تراریخته در سبدکالای مصرف‌کنندگان ایرانی بر پایه‌ی (پی.سی.آر) و آغازگر اختصاصی P35S است. در پژوهش‌های پیشین در ایران چند نمونه ذرت مشخص یا وارداتی در ایران مورد بررسی قرار گرفته بود. در این پژوهش سه نمونه‌ی تراریخته ذرت از گمرک شیراز تهیه و دی.ان.ا.سی و هفت نمونه‌ی ذرت جمع‌آوری شده از بازارمصرف هفت شهر بزرگ و شش نمونه ذرت جهادکشاورزی، به‌روش استاندارد CTAB (ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم‌بروماید) استخراج شد. آزمون پی.سی.آر شناسایی ذرت با استفاده از ژن‌بومی اینورتاز (IVR) که در تمام ارقام ذرت وجود دارد) انجام شد. جهت شناسایی ذرت‌های تراریخته آزمون پی.سی.آر براساس پیشبر P35S (آغازگر اختصاصی CaMV 35s موجود اکثر وکتورها) با آغازگرهای اختصاصی P35S2 و P35S1 بهینه شد. محصول P35S و IVR جهت تعیین توالی و تهیه کنترل مثبت کلون شد. آزمون پی.سی.آر ژن IVR و پیشبر P35S بر روی نمونه‌ها بهینه‌سازی و آمپلیکون 226 bp و 195 bp به‌ترتیب تکثیر شد. هر دو محصول پی.سی.آر به‌روش T/A Cloning و با استفاده از پلاسمید pTZ57R و میزبان JM107E.coli کلون شد. از میان چهل و شش نمونه ذرت جمع‌آوری شده از بازارمصرف، گمرک و جهادکشاورزی ۱۰۰ درصد به‌لحاظ ژن‌بومی اینورتاز و ۵۶٫۵ درصد (۲۶ عدد) از نمونه‌ها به‌لحاظ اگزوژن P35S دارای جواب مثبت بودند. این پژوهش نشان می‌دهد که درصدبالایی از ذرت‌های مصرفی در بازار ایران براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تراریخته است. با این وجود هیچ اقدامی جهت برچسب‌گذاری و آگاهی مصرف‌کننده صورت نگرفته است.

## مقدمه

افزایش جمعیت جهان و ازدیاد تقاضا برای مواد غذایی موجب به‌کارگیری روش‌های نوین بیوتکنولوژی در تولید محصول‌های غذایی شده است. امروزه فناوری دی.ان.ای نو ترکیب به طور گسترده‌ای در کشاورزی مدرن مورد استفاده قرار گرفته است (Zang and Gou 2011). یکی از کاربردهای بیوتکنولوژی تولید محصولات تراریخته است. موجودات تراریخته، گیاهان یا جانورانی هستند که به واسطه‌ی اصلاحات انجام شده دارای ویژگی‌های جدیدی شده‌اند و یا توانایی سنتز پروتئین اضافی را پیدا کرده‌اند (Gachet et al. 1999; Ozge Ozgen Arun et al. 2013).

یکی از مهمترین مزایای مواد غذایی تراریخته مقابله با گرسنگی در جهان است. از دیگر اثرهای مثبت محصولات تراریخته کاهش آسیب‌های اکولوژیکی از طریق کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها و جلوگیری از فرسایش خاک و افزایش بهره‌وری است (Constable and Jonas et al. 2007). تولید محصولات تراریخته برای مقابله با بحران گرسنگی به‌طور چشمگیری سالانه در سراسر جهان در حال افزایش است، تا سال ۲۰۱۰ موجودات تراریخته توسط کشاورزان در ۵۹ کشور کشت شدند و سطح کشت این مواد به ۱۴۸ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۰ (James 2011) و ۱۷۰ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۲ رسید (James 2012). امروزه از مهندسی ژنتیک جهت بهبود صفات گیاهان زراعی استفاده گسترده‌ای می‌شود. سویا، ذرت، کتان، کانولا از جمله محصولاتی هستند که بیشترین سطح زیرکشت گیاهان تراریخته را به‌خود اختصاص داده‌اند (James 2011). ذرت و سویا محصولاتی هستند که امروزه اجزای اصلی بسیاری از غذاها را تشکیل می‌دهند و در سراسر دنیا به‌میزان زیادی مصرف می‌شوند (Taski-Ajdukovic et al. 2009). در این گیاهان با ردیابی توالی‌های معتبر (P35S, T NOS, nptII...) که برای بیشتر دستکاری‌های ژنتیکی استفاده می‌شود می‌توان وضعیت تراریختی را مورد بررسی قرار داد (Gachet et al. 1999).

ملاحظات دربارۀ ایمنی مواد غذایی تراریخته منجر به اقداماتی در زمینه‌ی برچسب گذاری آن‌ها در سال‌های اخیر شد. اتحادیه اروپا در سال ۱۹۹۷ میلادی مقررات برچسب گذاری محصولات

تراریخته را تصویب کرد. از آن زمان تا سال ۲۰۰۲ میلادی کشورهای انگلستان، ژاپن، استرالیا، برزیل، کره جنوبی، چین، نیوزلند، آفریقا و ... به طور رسمی این قوانین را پذیرفتند (Philips P W and Mc Nill H. 2000; Seong-Hun Lee et al. 2004). در خاورمیانه، ترکیه به‌جمع کشورهای پیوسته که برچسب‌زدن محصولات غذایی شامل تراریخته را اجبار کرده است (Taski-Ajdukovic et al. 2013).

با وجود این که حضور محصولات غذایی تراریخته در بازار مصرف در کشور ما هیچ‌گونه اقدامات جدی در زمینه‌ی برچسب‌گذاری این محصولات انجام نگرفته است. روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز پی.سی.آر کمی به‌عنوان استاندارد طلایی جهت شناسایی و تعیین مقدار تراریختی از طرف اتحادیه اروپا مورد قبول است و ثابت شده که یک روش حساس، دقیق و ساده است که امروزه به‌طور گسترده‌ای برای تشخیص حضور موجودات تراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرد (Meyer 1999; Tenegal et al. 2001; Wen-Tao et al. 2004).

بنابراین انتظار می‌رود برای هر کشوری که از مواد غذایی مهندسی شده یا محصولات آن‌ها استفاده می‌کند، شناسایی و تعیین ظرفیت کمی محصولات تراریخته باید به‌طور کامل در دسترس باشد (Adugna and Mesfin 2008). کشور ما نیز از این قاعده جدا نیست و نیاز مبرم به بررسی و کنترل مواد غذایی و تربیت افراد متخصص در این راستا احساس می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی حضور ذرت‌های تراریخته در بازار مصرف شهرهای عمده کشور با استفاده از روش پی.سی.آر است.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** مطابق استاندارد ISO 21568 که توسط موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تهیه و تدوین شده است در مجموع چهل و پنج نمونه جمع‌آوری شد: (۱) شش نمونه ذرت استاندارد با نام‌های (TN-05-150)، (TN-05-152)، (TN-05-158)، (TN-05-157) و (TN-05-156) و از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال وزارت جهاد کشاورزی واقع در کرج تهیه شد. (۲) ده نمونه ذرت تجارتي بسته‌بندی شده با نام‌های خشکپاک، گل‌ها، سایان، برتر، چاوش، سعادت، نازدانه، سیلان،

دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. (۵) مایع‌رویی دور ریخته شد و به رسوب ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد. پس از ۱۰ بار سرو ته کردن لوله سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. (۶) مایع‌رویی دور ریخته و رسوب در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت تا خشک شود. در نهایت رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE یا آب حل شد. پس از استخراج، مقدار و کیفیت دی.ان.ای استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

**آغازگرها:** جهت تکثیر ژن بومی اینورتاز از آغازگرهای *IVR1A*، *IVR1B* استفاده شد، این ژن دلیل قطعی برای شناسایی گونه‌ی ذرت است. جهت تکثیر و شناسایی پیشبر P35S نیز از آغازگرهای *35S1*، *35S2* پیشبر ویروس موزایک گل‌کلم (جدول ۱) استفاده شد (Tengal et al. 2001).

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز:** گام بعدی پس از استخراج دی.ان.ای و تهیه آغازگرها جهت غربالگری موجودات تراریخته انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی.سی.آر) است. مقادیر مورد استفاده برای واکنش پی.سی.آر هر دو آزمون شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر 10 X و یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای ۱۰ میکرومولار، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰ میکرولیتر dNTP ۰/۵ میلی‌مولار، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز (5u/μl)، ۱۴ میکرولیتر آب استریل دوبار تقطیر شده و ۵ میکرولیتر کنترل مثبت یا دی.ان.ای الگو است و مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر را درون دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی بهینه شده در این پژوهش قرار گرفته تا تکثیر انجام شود. پروفایل حرارتی استفاده‌شده در این پژوهش به صورت جدول‌های شماره دو است.

برکت، صیتی و یک نمونه ذرت کنسروی از بازار مصرف و فروشگاه‌های سطح شهر تهران جمع‌آوری شد. (۳) بیست‌وشش نمونه ذرت فله از هفت شهر مختلف کشور شامل: تهران، مشهد، اهواز، خرم‌آباد، کرمانشاه، آستارا و رشت جمع‌آوری شد. (۴) سه نمونه ذرت از کشور آرژانتین به عنوان ذرت وارداتی از گمرک شیراز با نام‌های INCE ILGAZE, MASTRO GIORGIS, AGIOS SOSTIS به عنوان کنترل مثبت تهیه شد.

**استخراج دی.ان.ای:** در ابتدا دی.ان.ای نمونه‌ها استخراج شد. در این پژوهش از روش ستیل‌تری‌متیل‌آمونوم بروماید مورد استفاده در بیشتر مقاله‌های مرتبط استفاده شد (Gachet et al. 1999; Wen-Tao et al. 2004; Cantrill 2008; Chaouachi et al. 2013; Arun et al. 2013).

مراحل استخراج دی.ان.ای به‌طور مختصر بدین ترتیب صورت گرفت: (۱) ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه به لوله حاوی ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج اضافه و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرارداده شد. سپس سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. (۲) مایع‌رویی به لوله جدید منتقل و سپس ۰/۷ حجم کلروفورم به لوله اضافه شد. سپس سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. (۳) پس از انتقال مایع‌رویی به لوله جدید دو حجم بافر رسوب CTAB به آن اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. (۴) مایع‌رویی دور ریخته و به رسوب ۳۵۰ میکرولیتر کلرید سدیم اضافه شد و پس از ۱۰ بار سرو ته کردن لوله سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. (۵) فازرویی به لوله جدید منتقل و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در

جدول ۱- ترادف آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Table 1- Sequences of primers used in this study

| نام آغازگر         | توالی آغازگر (3'.....5')                               | توالی هدف             |
|--------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------|
| IVR1A-F<br>IVR1B-R | CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC<br>GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC | Ivr (Maize invertase) |
| p35S1<br>p35S2     | GCTCCTACAAATGCCATCA<br>GATAGTGGGATTGTGCGTCA            | Promoter CaMV         |

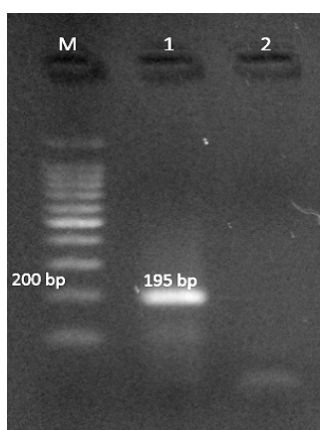
جدول ۲- پروفایل حرارتی بهینه شده برای *Ivr* و P35S.

Table 2- The thermal profile optimized for *Ivr* and P35S.

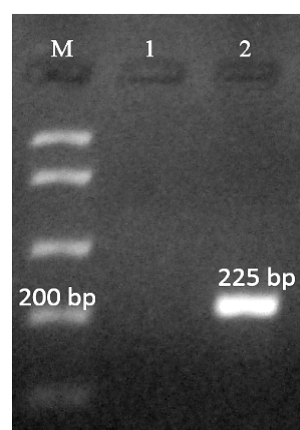
| Ivr Program        |       |           |          |
|--------------------|-------|-----------|----------|
| First Denaturation | 95 °C | 12 Min    |          |
| Denaturation       | 95 °C | 30 Second | 35 Cycle |
| Annealing          | 64 °C | 30 Second |          |
| Extension          | 72 °C | 60 Second |          |
| Final Extension    | 72 °C | 10 Min    |          |

| P35S Program       |       |           |          |
|--------------------|-------|-----------|----------|
| First Denaturation | 95 °C | 10 Min    |          |
| Denaturation       | 94 °C | 20 Second | 40 Cycle |
| Annealing          | 54 °C | 20 Second |          |
| Extension          | 72 °C | 60 Second |          |
| Final Extension    | 72 °C | 3 Min     |          |



شکل ۲- آزمون پی.سی.آر بهینه شده پروموتور P35S. M: سایز مارکر 100 bp  
1 DNA Ladder vivantis: کنترل مثبت: محصول 195 bp، ۲: کنترل منفی



شکل ۱- آزمون پی.سی.آر بهینه شده ژن IVR. M: سایز مارکر Low Range 1  
DNA Ladder fermentas: کنترل منفی ۲: محصول 225 bp

مرحله‌ی ترانسفورماسیون وکتور حاوی قطعه ژنی مورد نظر به داخل باکتری E.Coli JM107 انتقال یافت. پلاسمید کلون‌های حاصل، توسط کیت استخراج پلاسمید فرمنتاس استخراج شد.

### نتایج و بحث

بهینه کردن آزمون پی.سی.آر: آزمون پی.سی.آر به لحاظ اجزای آزمون و پروفایل حرارتی بهینه شد و نتیجه آزمون پی.سی.آر بهینه شده ژن *IVR* و P35S بر روی ژل آگارز دو درصد به ترتیب در شکل یک و دو مشاهده می‌شود.

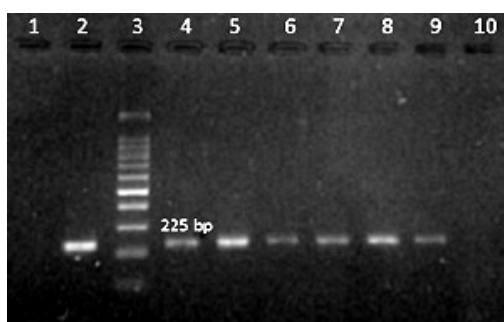
کلونینگ محصول پی.سی.آر: آمپلیکون ۲۲۵ و ۱۹۵ جفت بازی

الکتروفورز ژل آگارز: برای مشاهده محصول پی.سی.آر با قطعات 195 bp (طول قطعه P35S) و 225 bp (طول قطعه *Ivr*) از ژل آگارز ۲ درصد و نشانگر 100 bp DNA Ladder (THERMO SCIENTIFIC) و رنگ‌آمیزی با سایبرگرین (IN VITROGEN) استفاده شد.

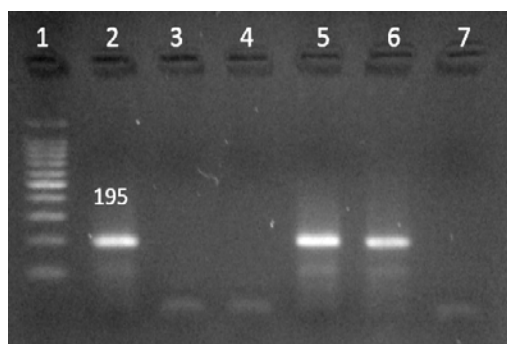
کلونینگ: هدف از کلونینگ تعیین توالی، تهیه کنترل مثبت و در نهایت ایجاد مقادیر زیادی الگو جهت ساخت کنترل مثبت کیت تشخیص مولکولی است. برای انجام کلونینگ از کیت T/A Cloning فرمنتاز استفاده شد. بدین منظور قطعه 195 bp تکثیر شده با آغازگر P35S درون وکتور PTZ57R قرار گرفت. در

بارگذاری شد (شکل ۵).

در نهایت با بررسی و غربالگری چهل و پنج نمونه ذرت مصرفی فله و بسته‌بندی تهیه شده از هفت شهر بزرگ ایران و بانک ژن و گمرک توسط آغازگرهای P35S، تعداد بیست و پنج نمونه که معادل ۵۶ درصد است دارای جواب مثبت شدند. که به تفکیک بدین شرح است. از میان ۱۰ نمونه بسته‌بندی هفت نمونه (۷۰ درصد) و از میان ۲۶ نمونه ذرت فله ۱۲ نمونه (۴۶ درصد) و از شش نمونه بانک ژن دو نمونه (۳۳ درصد) و هر سه نمونه ذرت وارداتی و یک نمونه ذرت کنسروی به لحاظ حضور P35S مثبت بودند.



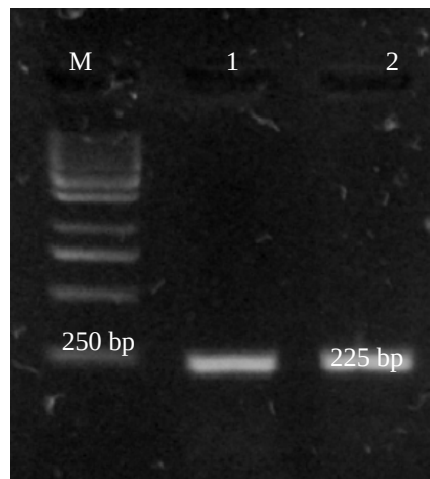
شکل ۴- آزمون پی.سی.آر ژن *IVR* چاهک شماره ۱: کنترل منفی، چاهک شماره (۲) کنترل مثبت، چاهک شماره (۳) DNA Ladder 100bp شرکت Guangzhou Geneshun Biotech Ltd، چاهک شماره (۴-۹) محصول پی.سی.آر نمونه‌های ذرت، چاهک شماره (۱۰) نمونه‌ی کنترل منفی.



شکل ۵- آزمون پی.سی.آر بهینه شده ژن P35S: سایز نشانگر ۱۰۰ جفت بازی شرکت Thermo Scientific، ۲: کنترل مثبت، ۳ و ۴: نمونه‌های منفی، ۶ و ۵: نمونه‌های مثبت، ۷: کنترل منفی.

این پژوهش به منظور آگاهی از وضعیت تراریختی ذرت‌های موجود در بازار مصرف ایران صورت گرفت، طبق نتایج به دست آمده ۵۶ درصد ذرت‌های جمع‌آوری شده تراریخته بودند. با توجه به تراریخته بودن حداقل نیمی از نمونه‌ها هیچ یک از ذرت‌های

که به ترتیب مربوط به محصول *IVR* و P35S بودند در پلاسמיד PTZ 57 R و میزبان *E.coli* Jm107 کلون شد. در شکل سه نتیجه‌ی کلونینگ محصول پی.سی.آر اینورتاز براساس آزمون تکثیری قابل مشاهده است.



شکل ۳- سایز مارکر 1KB DNA Ladder، چاهک شماره ۱: کنترل مثبت، چاهک شماره ۲: باند 225bp محصول کلونینگ *IVR*.

تطابق ترادف به دست آمده در NCBI موید تکثیر صحیح هر دو قطعه است.

**غربالگری نمونه‌ها:** برای اثبات حضور ژنوم ذرت در چهل و پنج نمونه جمع‌آوری شده ابتدا آزمون پی.سی.آر با آغازگرهای *IVR* و پروفایل حرارتی که در بالا به آن اشاره شد به همراه یک کنترل منفی حاوی آب دو بار یونیزه و کنترل مثبت حاوی دی.ان.ا استخراج شده از نمونه‌های بانک ژن انجام گرفت. سپس محصول پی.سی.آر بر روی ژل آگاروز دو درصد و با استفاده از سایز نشانگر ۱۰۰ bp شرکت THERMO SCIENTIFIC بدین شرح بارگذاری شد: چاهک شماره (۱) کنترل منفی، چاهک شماره (۲) کنترل مثبت، چاهک شماره (۳) DNA Ladder 100bp شرکت Guangzhou Geneshun Biotech Ltd، چاهک شماره (۴-۹) محصول پی.سی.آر نمونه‌های ذرت، چاهک شماره (۱۰) نمونه‌ی کنترل منفی (شکل ۴). نتایج نمایانگر موفقیت‌آمیز بودن آزمون پی.سی.آر به کار رفته جهت تکثیر ژن گیاه ذرت است. سپس نمونه‌های مثبت شده با هدف غربالگری ذرت‌های تراریخته با آغازگرهای P35S1، P35S2 توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی شد. سپس نتایج بر روی ژل آگاروز دودرصد و با استفاده از سایز نشانگر ۱۰۰ bp شرکت THERMO SCIENTIFIC

موجود حاوی برچسب تراریختی نبودند.

روش استخراج دی.ان.ا استفاده شده در این پژوهش، روش استاندارد CTAB بود. با وجود این که روش‌های متعددی برای این منظور وجود دارد ما توانستیم با استفاده از روش CTAB که کم هزینه‌تر از کیت‌های تجاری مورد استفاده برای این منظور بود به خوبی به دی.ان.ا قابل تکثیر دسترسی پیدا کنیم. در این آزمایش مقدار اولیه‌ی نمونه ۱۰۰ میلی گرم بود و به صورت اختیاری در صورت نیاز از پروتئیناز K و RNase استفاده شد. در پژوهش‌های گذشته هم چون E. Gachet, 1999 و همکارانش و همچنین Ozge Ozgen Arun, 2013 نیز از روش استخراج CTAB به همراه پروتئیناز K و نشانگر P35S جهت غربالگری ذرت استفاده شده بود. Tengal نیز در سال ۲۰۰۱ از آغازگرهای P35S و TNOS جهت شناسایی ذرت‌های تراریخته استفاده کرد. Cankar در سال ۲۰۰۸ از روش q پی.سی.آر و نشانگر P35S جهت شناسایی ذرت‌های تراریخته استفاده کرد. در این پژوهش نیز برای شناسایی یکی از پرکاربردترین این ژن‌ها یعنی CAMV35S مورد بررسی قرار گرفت. در سال ۱۳۹۱ لایلا سرمدی پنج نمونه ذرت آرژانتینی وارداتی با آغازگرهای P35S و TNOS را مورد بررسی قرارداد. در این پژوهش علاوه بر سه نمونه ذرت وارداتی آرژانتین وضعیت تراریختگی سی و شش نمونه ذرت باز و بسته بندی موجود در بازار و فروشگاه‌های شهرهای مختلف نیز مورد آزمایش قرار گرفت. مریم ربیعی نیز حضور ذرت‌های تراریخته را در غذاهای فراوری شده که به طور تجاری در ایران عرضه می‌شود را به وسیله‌ی آغازگر P35S اثبات کرده است. نتایج مشابه حاصل از همه‌ی این مقاله‌ها نشان می‌دهد که نشانگر P35S یکی از نشانگرهای مفید برای غربالگری محصولات تراریخته است. اگرچه استفاده از نشانگرهای دیگر هم چون T NOS (پایانبر) و nptII (ژن مقاومت به آنتی بیوتیک نئومایسین) در کنار P35S نتایج را تقویت می‌کند.

روشی که جهت تشنص و تکثیر ذرت مورد استفاده قرار گرفت روش حساس و دقیق پی.سی.آر است که ثابت شده است یک روش قابل اطمینان به جهت غربالگری محصولات تراریخته از میان روش‌های تشنصی برپایه دی.ان.ا است. در سال 2005 Tripathi روش‌های مختلف شناسایی محصولات تراریخته که

شامل روش‌های برپایه دی.ان.ا، روش‌های برپایه پروتئین و خصوصیات فنوتیپ بود را مورد بررسی قرار داد و اظهار داشت که مزیت روش پی.سی.آر به دیگر روش‌ها حساس و دقیق بودن از نظر حدود آشکار سازی و همچنین تشنص کیفی و کمی آن است. Seong-Hun Lee و همکارانش نیز در سال 2004 از روش پی.سی.آر جهت تشنص دو گونه ذرت NK603 و TC1507 در پژوهش خود استفاده کردند.

در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی بر روی محصولات تراریخته و گسترش آن‌ها در سرتاسر دنیا و همچنین قضیه‌ی رعایت قوانین و برچسب گذاری این محصولات انجام شده است. مقاله‌ها مشابه متعددی جهت آگاهی، شناسایی، فواید و مضرات احتمالی که در آینده ممکن است بر روی نسل‌های بعد و یا اکوسیستم بگذارند منتشر شده و بررسی وضعیت تراریختی این محصولات در کشورهای مختلف صورت گرفته است. درصدهای متفاوتی از حضور محصولات تراریخته در کشورهای مختلف گزارش شده است. کشورهای آسیایی متعددی از جمله چین، عربستان، ترکیه و اردن حضور محصولات مختلف تراریخته را گزارش کرده‌اند. در اردن در سال ۲۰۱۲ N. AL-Hmoud و همکارانش پس از پژوهش بر روی بیست و دو نمونه ذرت و سویا (۱۹ ذرت و ۳ سویا) حضور نشانگر P35S را در ۱۸/۲ درصد نمونه‌ها گزارش کرد. در کشور ما نیز مریم ربیعی بیست و پنج نمونه از انواع ذرت فرآوری شده را بررسی کرد و ۲۰ درصد تراریختی را گزارش کرد. ۱۰۰ درصد ذرت‌های آرژانتینی مورد پژوهش لایلا سرمدی حاوی توالی‌های P35S یا TNOS بود. در این پژوهش نیز ۵۶ درصد نمونه‌ها حاوی P35S بودند. این گزارش‌ها نمایانگر حضور انواع ذرت‌های تراریخته در ایران شامل ذرت‌های وارداتی، فراوری شده و دانه‌های ذرت موجود در بازار مصرف است.

به این علت که ذرت به طور عمده از کشورهای که بیشترین سطح زیر کشت گیاهان تراریخته را در دنیا دارا هستند وارد کشور ما می‌شود، استفاده از فناوری و بررسی تراریخته بودن دانه‌های ذرت با یک روش شناسایی سریع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Leila Sarmadi 1391). در نتیجه پیش‌بینی می‌شود دیگر محصولات تراریخته نظیر سویا، برنج، گوجه‌فرنگی و... نیز در



و کنترل بیشتر و همچنین اجرای قانون برچسب‌گذاری و علاوه- بر آن آموزش و فرهنگ‌سازی در این زمینه به‌شدت احساس می‌شود. بدین‌صورت حق مصرف‌کننده ضایع نشده و به او قدرت انتخاب داده می‌شود.

### سیاسگزاری

بدین‌وسیله کمال تشکر و قدردانی خود را از کمک‌های بی‌شایبه موسسه دانش‌بنیان ایرانیان ژن‌فناور و پرسنل محترم این موسسه به‌خصوص آقای سام مساحی، محمدامین محمودی و همچنین موسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال (جناب آقای دکتر مظفری) و آقای دکتر عباس عالم‌زاده به جهت در اختیار گذاشتن تعدادی نمونه وارداتی ابراز می‌کنم.

### منابع

- Adugna A and Mesfin T. 2008.** Detection and quantification of genetically engineered crops. Journal of SAT Agricultural Research Volume 6.
- Ajdukovic T, Nikolic K, Vujakovic Z, Milosevic M, et al. 2009.** Detection of genetically modified organisms in processed meat products on the Serbian food market. Meat Science, 81: 230-232.
- Ajdukovic T, Yilmaz F, Muratoglu K. 2013.** PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. Food control 32: 525-531.
- Arun Ö, Yilmaz F, Muratoglu K. 2013.** PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly Processed foods. Food Control 32: 525-531
- Cankar K, Chauvensy-Ancel V, Fortabat M, Gruden K, Kobilinsky A, Zel J, Bertheau Y. 2005.** Detection of nonauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: application to 35S in maize. Analytical Biochemistry 376:189-199
- Cantrill R. 2008.** International development of methods of analysis for the presence of products of modern biotechnology. Asia Pac J Clin Nutr 17(S1): 233-236.
- Chaouachi M, Alaya A, Ali IB, Hafsa AB, Nabi N, Berard A, Romaniuk M, Skhiri F, Said K. 2013.** Development of PCR method for the detection and quantification of a new endogenous reference gene in sugar beet "Beta vulgaris L": GMO application. Planet cell Rep 32:117-28
- Constable A, Jonas D, Cockburn A, and et al. 2007.** History of safe use as applied to the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. Food and Chemical Toxicology. 45: 2513-2525.
- Gachet E, G. Martin G, Vigneau F, and Meyer G. 1999.** Detection genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. Trend in food science & Technology, 0: 380-388.
- Helt HW. 2004.** Are there hazards for the consumer when eating food from genetically modified plants Union of the German Academies of Science and Humanities, Commission on Green Biotechnology.
- James C. 2011.** GM crops, executive summary of global status of commercialized biotech.
- James C. 2012.** GM crops, Global Status of Commercialized Biotech. ISAAA Brief No. 16.
- Khush GS. 2005.** What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. Planet Molecular biology 59:1-6.
- Lee S, Park Y, Kim J, Park K and Kim Y. 2004.** Qualitative PCR Method for Detection of Genetically Modified Maize. Lines NK603 and TC1507. Agric. Chem. Biotechnol. 47(4), 185-188
- Maryam Rabiei, Mehrangiz Mehdizadeh, Hossein Rastegar, Hossein Vahidi and Mahmoud Alebouyeh. 2012.** Detection of Genetically Modified Maize in Processed Foods Sold Commercially in Iran by Qualitative PCR. Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2013), 12 (1): 25-30 Received: December 2011 Accepted: July 2012.
- Meyer R. 1999.** Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food Control 10: 391-399.
- Meyer R, Chardonnens F, Hübner P, Lüthy J. 1996.**

Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of soy in processed meat products. Zeitschrift fur Lebensmittel - Untersuchung und - Forschung 203: 339-344.

**N. Al-Hmoud, H. Al-rousan, B.O. Hayek and M.A Ibrahim .2010.** Detection of Genetically Modified Maize and Soybean Food Product in the Jordanian Market, Biotechnology 9 (4); 499-505. ISSN 1682-296X.

**Philips P W & McNill H .2000.** A Survey of National Labeling Policies for GM Foods, AgBioForum, Journal of Agro Biotechnology Management & Economics, Vol.3, No.4, Article 7.

**Sarmadi L.1391.** Molecular analysis of the transgenic maize seed Imported to Iran. Genetic engineering and biosafety Volume1, NO.2: 103-112.( In Farsi with English abstract)

**Tengel C, Schüßler P, Setzke E, Balles J, and Sprenger-**

**Haußels M4a. 2001.** PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs, BioTechniques 31: 426-429

**Tripathi L .2005.** Techniques for detecting genetically modified crops and products. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (13), pp. 1472-1479, December, 2005

**Wen-Tao X, Kun-Lun H, Ai-Ke D and Yun-Bo L .2004.** PCR for the detection of the anti-herbicide genes in genetically modified organisms. College of Food Science and Nutrition Engineering, Chinese Journal of Agricultural Biotechnology/ Volume 3 / Issue 01 / April 2006, pp. 53-57

**Zhang D, Guo J. 2011.** The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products .J. Integr. Plant Biol. 53(7):539-551.

## بررسی میزان باقیمانده حشره کش دیازینون در محصول گیلاس عرضه

### شده در میدان میوه و تره بار مرکزی استان تهران

#### Determination of Diazinon residue levels on Cherry, *Cerasus avium* supplied to Tehran central fruit and vegetable market

مینا عسگری<sup>۱</sup>، محسن مروتی<sup>۲\*</sup> و سهراب ایمانی<sup>۳</sup>  
Mina Askari<sup>1</sup>, Mohsen morowati<sup>2\*</sup> and Sohrab Eimani<sup>3</sup>

۱- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار

۲- دانشیار، بخش تحقیقات آفت کش ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

۳- عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

1- M.Sc student, Islamic Azad University at Garmsar.

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

3- Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m\_morowati@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۴)

#### چکیده

عدم اعتماد و اطمینان به مهندسی ژنتیک و محصولات تراریخته و دیگر فناوری های نوین و کمتر شناخته شده توسط مدیران، با وجود کشت بیش از ۱۷۰ میلیون هکتار محصولات تراریخته در دنیا موجب استمرار استفاده از روش های تولید غذا با تکیه بر مصرف از آفت کش های شیمیایی خطرناک شده است. به منظور تعیین باقیمانده حشره کش دیازینون تعداد چهل نمونه گیلاس از میدان مرکزی میوه و تره بار تهران که از پنج شهر مختلف لواسان، شهریار، قزوین، مشهد و ارومیه که قطب تولید گیلاس در ایران هستند، طی مدت معینی در ماه های خرداد و تیر سال ۹۰ تهیه شده و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. جهت استخراج نمونه ها از روش استاندارد کچرز استفاده شد. پس از استخراج نمونه ها، جهت اندازه گیری دیازینون از دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف سنجی جرمی استفاده شد و مقادیر به دست آمده با حداکثر میزان مجاز ملی باقیمانده آفت کش ها مقایسه شد. نتایج نشان داد که ۱۰ درصد نمونه های مورد آزمایش دارای آلودگی بالاتر از حد مجاز به دیازینون بودند (MRL = ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) که شامل چهار نمونه از مشهد (۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم) و لواسان (۰/۲۹ میلی گرم بر کیلوگرم) بودند و مابقی ۹۰ درصد از نمونه ها بدون باقیمانده قابل ردیابی دیازینون بودند. نتایج به دست آمده می تواند در برنامه ریزی های استفاده و کاربرد آفت کش ها در مناطق پر خطر کشور در آینده استفاده شود.

#### واژه های کلیدی

باقیمانده دیازینون  
روش جدید استخراج کچرز  
کروماتوگرافی گازی  
اسپکتروسکوپی جرمی  
گیلاس

## مقدمه

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 آفت‌ها اختصاص دارد (Adeli and Ghareyazi 2012). بدین ترتیب با کاشت این نوع محصولات و با استفاده از استراتژی استفاده از گیاهان مقاوم به آفت‌ها، مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی به طور چشمگیری کاهش پیدا کرده و این گونه محصولات فاقد هرگونه باقیمانده سموم بوده و ضمن تضمین سلامت مصرف‌کننده، از بازار به نسبت 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 سو 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 آفت‌ها 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. براساس آمار منتشر شده از طرف سازمان خواربار و کشاورزی (FAO) میانگین خسارت وارده از طرف آفت‌ها به محصولات کشاورزی به طور تقریبی ۴۰ درصد است و برای مبارزه با آفت‌ها از شیوه‌های مختلف استفاده می‌شود که متأسفانه کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی در بیشتر موارد در الویت قرار دارد. باقیمانده آفت‌کش‌های شیمیایی بیشتر از آنچه تصور می‌کنیم بر شرایط اقتصادی-سیاسی و روابط بازرگانی کشورها اثر می‌گذارد. اما در داخل کشور نیز بحث امنیت غذایی و سلامت غذا با هم گره خورده و همه چیز را تحت اثر قرار می‌دهد. اکنون بسیاری از پژوهشگران پزشکی و گیاه‌پزشکی به این عقیده راسخ رسیده‌اند که علاوه بر مسمومیت‌های حاد، شیوع روز افزون انواع بیماری‌های خطرناک و به خصوص انواع سرطان بستگی مستقیم و غیرمستقیم به مصرف آفت‌کش‌ها دارد (Daniels et al. 1997). همچنین بسیاری از ناراحتی‌های ژنتیک، عقیم‌سازی و عدم باروری، اختلالات عصبی و روانی، کاهش حافظه و کند ذهنی در کودکان، اختلالات دستگاه ایمنی و سیستم هورمونی و

حساسیت در انسان را هم ناشی از مصرف آفت‌کش‌ها اعلام می‌کنند (Firestone et al. 2005, Ascherio et al. 2006, Heidari, 2010). باقیمانده آفت‌کش‌ها توسط هوا، خاک و به خصوص آب به چرخش درآمده و وارد منابع آبی مانند چاه‌ها، رودخانه‌ها، آب‌شهری، دریاچه‌ها، دریاها و اقیانوس‌ها می‌شوند و از طریق مصرف این آب‌ها و هوای آلوده وارد زیستگاه و زنجیره غذایی موجودات زنده و به خصوص انسان می‌شوند. حتی باقیمانده این آفت‌کش‌ها همراه با شیر، گوشت و محصولات کشاورزی وارد سیستم غذایی انسان‌ها می‌شود و عوارض سخت و خطرناکی که در بالا گفته شد را به بار می‌آورد.

گیلاس با نام علمی *Cerasus avium* (L.) Moench یکی از محصولات مهم و جذاب باغی در دنیا است. در کشور ما نیز این محصول به دلیل طعم و مزه مطلوب و دوره رسیدگی کوتاه میوه و تولید در اوایل فصل از اهمیت بالایی برخوردار است. طبق گزارش‌های موجود در حال حاضر این محصول در بیش از ۴۰ نقطه از جهان به طور تجاری کشت می‌شود.

در حال حاضر ۲۵۰ رقم گیلاس در دنیا کشت می‌شود که بعضی از ارقام در ایران مانند گیلاس سیاه مشهد منحصر به فرد است. تا چهار سال پیش ایران در تولید گیلاس رتبه اول جهانی را داشت که امروز رتبه سوم را به خود اختصاص داده است (Bouzari, 2009).

دیازینون از گروه حشره‌کش‌های فسفره، تماسی و گوارشی است که جهت کنترل طیف وسیعی از حشرات جونده، برگ‌خوار، ساقه‌خوار و ریشه‌خوار و مکنده در بیشتر محصولات باغی و زراعی از جمله مرکبات، سیب، گلابی، گیلاس، هلو، انگور، ذرت، سورگوم، یونجه و غیره استفاده می‌شود (Tomlin, 2003).

پژوهش‌های متعددی در رابطه با باقیمانده آفت‌کش‌ها در محصولات مختلف انجام پذیرفته که پاره‌ای از این پژوهش‌ها در پایین آمده است. نمونه‌های گیلاس عرضه شده در میدان بار شهر تورنتو، کانادا را جهت ردیابی باقیمانده زولون مورد آزمون قرار دادند و باقیمانده زولون در هفده نمونه گیلاس مشاهده شد (Frank et al. 1990).

باقیمانده آفت‌کش‌های اتری‌مفوس، فوزالون و آزی‌نفوس متیل را در گیلاس و کمپوت آن مورد بررسی قرار داد. با توجه به نتایج

(2010). با توجه به مصرف بالای این حشره‌کش برعلیه آفت‌های مهم و خسارت‌زای گیلاس، پژوهش‌های فعلی انجام شد تا از میزان باقیمانده احتمالی این آفت‌کش بروی گیلاس آگاهی حاصل شود.

### مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** تعداد چهار نمونه گیلاس به صورت تصادفی از میدان میوه و تره بار مرکزی تهران طی ماه‌های خرداد و تیر سال ۹۰ تهیه و جمع‌آوری شدند. ابتداء نمونه‌ها وزن شدند، سپس براساس محل ارسال نمونه و تاریخ نمونه‌برداری کدگذاری شدند. نمونه‌های تهیه شده پس از ارسال به آزمایشگاه توسط دستگاه خردکن، مخلوط شدند و در ظروف یکبارمصرف و در کیسه‌های فریزر قرار داده و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و سرانجام جهت انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

**روش استخراج دیازینون به وسیله روش کچرز:** به منظور استخراج حشره‌کش دیازینون از گیلاس تازه و تعیین باقیمانده آن طبق روش کچرز با مختصر تغییراتی که در آن صورت گرفت، انجام شد (Anastassiades et al. 2003). ابتدا از نمونه هموژن شده گیلاس ۱۵ گرم وزن کرده و داخل لوله‌های سانتریفوژ دردار انتقال داده و به آن ۱۵ میلی‌لیتر استونیتریل (حاوی یک درصد اسیداستیک) و سپس یک گرم پودر کلرایدسدیم، شش گرم سولفات منیزیم و ۱/۵ گرم سدیم‌نیترات به نمونه افزوده شد و سپس توسط ورتکس (هایدولف آلمان) به مدت یک دقیقه تکان داده شد. بعد از آن به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ (۵۰۰۰ دور بر دقیقه) شد. از محلول سطحی نمونه سانتریفوژ شده به میزان پنج میلی‌لیتر برداشته و به لوله سانتریفوژ ۱۴ میلی‌لیتری انتقال داده شد و ۵۰ میلی‌گرم PSA (Primary Secondary Amine) و ۱۵۰ میلی‌گرم سولفات منیزیم و ۰/۰۷۵ گرم GCB (Graphic Carbon Black) به آن اضافه شد. سپس توسط ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شد و به مدت یک دقیقه سانتریفوژ (۵۰۰۰ دور بر دقیقه) شد. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره به ویال در پیچ‌دار ریخته و در دستگاه تبخیرکننده تحت خلا (آیلا ژاپن) به طور کامل خشک شد. نمونه تغلیظ شده پس افزودن مقدار یک میلی‌لیتر حلال استونیتریل حاوی ۱۵۰ میکرولیتر تری‌فنیل فسفات جهت

آزمایش‌ها در مورد سم زولون دیده شد که با گذشت دوره کارنس حشره‌کش در میوه گیلاس، باقیمانده حشره‌کش کمتر از حداکثر میزان مجاز تعیین شده توسط کدکس بوده و بعد از شستن میوه نیز ۶۶ درصد از باقیمانده حشره‌کش کاسته می‌شود و بعد از تهیه کمپوت از نمونه‌ها نیز ۸۲ درصد از میزان باقیمانده کاسته شد که در همه موارد میزان باقیمانده پایین‌تر از حداکثر میزان مجاز مشاهده شد (Madani, 1996). باقیمانده دو حشره‌کش فوزالن و اکامت روی گیلاس شسته شده و شسته نشده مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری با احتمال ۹۹ درصد بین باقیمانده فوزالن در نمونه‌های شسته شده و شسته نشده وجود دارد. در صورتی‌که در مورد باقیمانده اکامت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (Talebi Jahromi et al. 1998). پژوهشی روی باقیمانده و دوره کارنس آفت‌کش دیازینون در گیلاس انجام شد. با در نظر گرفتن کمترین میزان باقیمانده مجاز دوره کارنس این حشره‌کش بعد از آزمایش‌های به عمل آمده ۱۲ روز تعیین شد (Haji Razagh, 1998). با استفاده از روش میکرواستخراج (HS-SPME) با استفاده از فاز جامد و دستگاه GC/MS آفت‌کش‌های دیازینون، فنیتروتیون، فنتیون، پاراتیون، برومفوس متیل، برومفوس اتیل و اتیون از نمونه‌های گیلاس استخراج و مورد بررسی قرار دادند (Triantaphyllos et al. 2003). باقیمانده دیازینون در محصول هندوانه پس از سم‌پاشی‌های انجام شده مورد بررسی قرار گرفت و این نتیجه حاصل شد که در میوه هندوانه یک روز و در پوست هندوانه دو روز پس از سم‌پاشی میزان باقیمانده به حد مجاز می‌رسد (Hosseinmardi, 2001). همچنین باقیمانده آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در محصول سیب سردخانه‌های منطقه ارومیه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون نمونه‌ها نشان داد که مقادیر به دست آمده برای دیازینون، کمتر از حداکثر مجاز استاندارد کدکس بوده و بدین جهت قابل قبول هستند (Yadegarian et al, 2002). در بررسی میزان باقیمانده و دوره کارنس آفت‌کش‌های مانکوزب و دیازینون در محصول خیار گلخانه‌ای، نتایج به دست آمده نشانگر دوره کارنس حشره‌کش دیازینون بین ۷-۱۰ روز با توجه به حداکثر میزان مجاز کدکس که معادل ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم است، بود (Morowati et al,

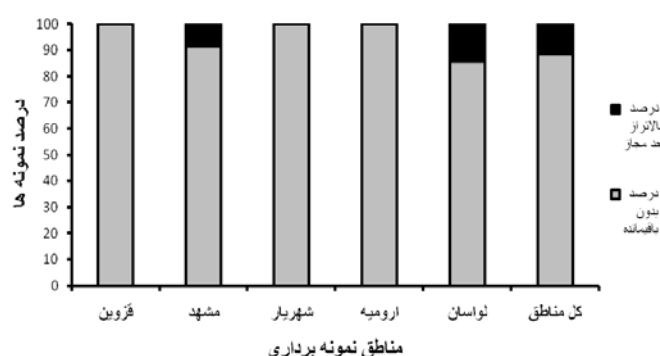
باقیمانده سموم مورد استفاده قرار می گیرد، به دلیل استفاده از حلال های متفاوت به میزان بسیار بالا و وقت گیر بودن و هزینه بالای آن خیلی مقرون به صرفه نیست. از عیب های روش استخراج مایع-مایع، پرزحمت بودن، وقت گیر بودن و مصرف زیاد حلال های آلی موردنظر و به وجود آمدن مشکلاتی به جهت تشکیل امولسیون می توان اشاره کرد. به خاطر بالا بودن حجم حلال های آلی در آزمایش موردنظر، مانند دی کلرومتان جهت استخراج، مشکلاتی در تصفیه و تبخیر کردن حلال برای تغلیظ آنالیت نیز باید اشاره شود. در عمل تبخیر کردن با تبخیر کننده چرخان باید دقت کرد تا دمای حمام آب گرم از نقطه جوش حلال بالاتر نرود. زیرا امکان از دست دادن آنالیت به وجود می آید. علاوه بر این ها چون بیشتر حلال های آلی مورد استفاده در این آزمایش سمی است خطر بیماری زایی و آلودگی محیط، ایراد دیگری بر این روش محسوب می شود. همچنین طولانی بودن مراحل آنالیت باعث اتلاف و هدر رفتن مواد و در نتیجه سبب بالا رفتن درصد خطا می شود. روش و اطمینان بالا می تواند جایگزین مناسبی برای این روش باشد. (Anastassiades *et al.* 2003) برای سنجش میزان درصد بازدهی روش کار مورد استفاده جهت استخراج و اندازه گیری آفت کش دیازینون از نمونه های گیلاس، تعیین مقدار درصد بازیافت به ترتیب ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱ برای آفت کش دیازینون توسط روش شرح داده شده انجام شد

شناسایی و اندازه گیری به مقدار یک میکرولیتر به دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف سنجی جرمی تزریق شد. برای سنجش میزان بازدهی روش کار مقدار ۱۵، ۳۷/۵ و ۷۵ میلی لیتر از محلول ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر استاندارد دیازینون برای به دست آوردن غلظت های ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱ میلی گرم بر گرم به ۱۵ گرم نمونه سم پاشی نشده (شاهد) اضافه شد و کلیه مراحل استخراج مطابق با نمونه های قبلی انجام و تعیین شد. مقدار سم یافت شده و درصد بازیافت در این سه غلظت به ترتیب ۱۰۴/۱۷، ۱۱۳/۲۵ و ۹۸/۲۷ درصد به دست آمد. میزان حد تشخیص و حد اندازه گیری این روش برای این حشره کش ۰/۰۳ و ۰/۰۹ است. یک میکرولیتر از هر یک از استانداردهای دیازینون را با غلظت های ۱۰، ۵، ۱، ۰/۵ و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر را در سه تکرار به دستگاه GC/MS تزریق کرده که میانگین نتایج به دست آمده با استفاده از برنامه r, excele برای آفت کش های مورد نظر محاسبه می شود.

**شرایط دستگاه:** دستگاه GC/MS مدل شیمادزو ژاپن با برنامه دمایی ۲۸۰-۶۰ درجه سانتی گراد (با سرعت افزایش دما سه درجه سانتی گراد بر دقیقه) و دمای محل تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد و دمای آشکارساز ۳۲۰ درجه سانتی گراد گاز حامل هلیوم با سرعت جریان یک میلی لیتر بر دقیقه تزریق شدند. میزان تزریق از محلول استاندارد و نمونه به دستگاه یک میکرولیتر بود.

## نتایج و بحث

روش استخراج جداسازی مایع-مایع که در بیشتر آزمایشگاه های



شکل ۱- درصد آلودگی نمونه ها به حشره کش دیازینون

Figure 1- Graph analysis for pesticide Diazinon.

در آن‌ها رعایت شده و سم‌پاشی‌ها براساس توصیه‌های فنی صورت گرفته است. با توجه به نتایج احتمال دارد در شهر مشهد و لواسان نحوه و یا مقدار سم‌پاشی به درستی رعایت نشده است که باید نکات و دستورالعمل‌های لازم تذکر داده شود. شرایط اقلیمی می‌تواند دلیل دیگری در تفاوت آلودگی‌ها در شهرهای مختلف باشد.

در پژوهشی که روی آفت‌کش‌های اتری‌مفوس، فوزالون و آزی‌نفوس متیل در گیلاس و کمپوت آن مورد بررسی قرار گرفت، نتایج آزمایش‌ها نشان داد که حشره کش فوزالون با گذشت دوره کارنس در میوه گیلاس، باقیمانده حشره کش کمتر از حد میزان مجاز ملی تعیین شده توسط کدکس بوده و بعد از شستن میوه نیز ۶۶ درصد از باقیمانده حشره کش کاسته می‌شود و بعد از تهیه کمپوت از نمونه‌ها نیز ۸۲ درصد از میزان باقیمانده کاسته شد که در همه موارد میزان باقیمانده پایین‌تر از حد میزان مجاز مشاهده شد. نتایج آزمایش‌ها برای آزی‌نفوس متیل در نمونه گیلاس با گذشت دوره کارنس نشان می‌دهد که میزان باقیمانده به طور تقریبی کمتر از حد میزان مجاز و یک مورد بالاتر از آن بوده و با شست‌وشوی میوه این مقدار به زیر حد میزان مجاز رسید. میزان باقیمانده آفت‌کش بعد از شست‌وشو به میزان ۴۰ درصد و بعد از تهیه کمپوت حدود ۶۵ درصد نسبت به مقدار اولیه کاهش یافت. نتایج آزمایش‌ها برای باقیمانده حشره کش اکامت نشان داد که میزان باقیمانده حشره کش بالاتر از حد میزان مجاز بوده و حتی بعد از شستن میوه و تهیه کمپوت نیز میزان آن بالاتر از حد میزان مجاز مربوطه است. با توجه به دزهای مصرفی و نتایج گرفته شده می‌توان گفت که آفت‌کش فوزالون مناسب و بی‌خطر برای این میوه و آفت‌کش آزی‌نفوس متیل با رعایت کلیه موارد مصرف به شرط شست‌وشوی میوه قبل از مصرف کم‌خطر است و آفت‌کش اکامت برای این میوه با وجود گذشت دوره کارنس مربوطه در منطقه آب و هوایی هشتگرد مناسب نیست (Madani, 1996) باقیمانده دو حشره کش فوزالون و اکامت روی گیلاس شسته شده و شسته نشده اندازه‌گیری شد. دوازده روز بعد از سم‌پاشی درخت گیلاس به وسیله فوزالون به نسبت دو در هزار میانگین باقیمانده آن روی گیلاس شسته شده  $0.05 \pm 0.38$  و روی گیلاس شسته نشده  $0.05 \pm 1.57$  میلی گرم بر کیلوگرم بود. سم‌پاشی

درصد بازیافت‌های به دست آمده از نمونه‌های شاهد نشان می‌داد که درصد بازیافت آفت‌کش دیازینون ۹۸/۲۷، ۱۱۳/۲۵ و ۱۰۴/۱۷ درصد و نشان می‌دهد که روش مورد استفاده در این گستره‌ها معتبر بود و در مقایسه با روش استخراج جداسازی مایع-مایع در بررسی مشابه درصد بازیافت دیازینون ۷۵-۸۰ درصد گزارش شد (Dashtbozorgi et al. 2012).

در نتیجه روش کچرز به دلیل درصد بازیافت بهتر از کارایی بالایی برخوردار است. با توجه به نتایج آزمایش بازیافت می‌توان نتیجه گرفت مقدار حد تشخیص و حد اندازه‌گیری این روش نسبت به روش جداسازی مایع-مایع (حداقل ۰/۱ و ۰/۵) نیز بسیار بهتر بود. که برای حشره کش دیازینون به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰۹ به دست آمد. نتایج مربوط به رسم منحنی کالیبراسیون نشان داد که منحنی‌های کالیبراسیون برای آفت‌کش مورد بررسی خطی و مقدار ضریب همبستگی آن‌ها نزدیک واحد شد.

بررسی که توسط روش استخراج مایع-مایع برای استخراج دیازینون در محصول گیلاس انجام شد، درصد ریکاوری بین ۸۰-۱۰۱ درصد گزارش شد درحالی‌که در روش کچرز درصد ریکاوری برای دیازینون بین ۹۸-۱۱۳ درصد گزارش شد. علاوه بر بالا بودن درصد ریکاوری، زمان تجزیه که حدود ۱۵ دقیقه طول می‌کشد بسیار بهتر از روش استخراج مایع-مایع آمبروس است، که این زمان بسیار طولانی‌تر است. درحال حاضر روش کچرز یک روش استاندارد مناسب است که جایگزین مناسبی برای دیگر روش‌های استخراج در آزمایشگاه‌ها است و درحال حاضر در بسیاری از آزمایشگاه‌های جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Haji Razagh, 1998).

نتایج حاصله از تجزیه نمونه‌ها نشان داد که ۱۰ درصد از نمونه‌ها دارای باقیمانده دیازینون بیش از حد بیشتر میزان مجاز ملی آن که معادل ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم است، بودند و بالاترین میزان آلودگی مربوط به یک نمونه از مشهد و معادل ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم بود، سه نمونه مربوط به شهر لواسان بودند که آلودگی آن‌ها بالاتر از حد مجاز بود. و مابقی ۹۰ درصد از نمونه‌ها بدون باقیمانده قابل ردیابی دیازینون و مربوط به قزوین، شهریار و ارومیه بودند.

احتمال می‌رود نمونه‌هایی که فاقد دیازینون هستند دوره کارنس

با اکامت یک در هزار بعد از انقضای همین مدت در گیلاس شسته شده  $0/62 \pm 0/14$  و در گیلاس شسته نشده  $0/89 \pm 0/2$  میلی گرم بر کیلوگرم باقیمانده بر جای می گذارد. مقایسه میانگین ها نشان می دهد که اختلاف معنی داری با احتمال ۹۹ درصد بین باقیمانده فوزالن در نمونه های شسته شده و شسته نشده وجود دارد. در صورتی که در مورد باقیمانده اکامت اختلاف معنی داری مشاهده نشد (Talebi et al. 1998).

با استفاده از روش میکرو استخراج با استفاده از فاز جامد و دستگاه GC/MS آفت کش های مختلف از جمله دیازینون را از نمونه های گیلاس استخراج و مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش میزان درصد بازیافت حشره کش دیازینون در آب گیلاس در غلظت های بین  $0/5 - 50$  یک بر میکروگرم بین  $66 - 40$  درصد و در آب گیلاس رقیق شده (با  $50$  درصد آب) بین  $74 - 92$  درصد گزارش شد (Triantaphyllos et al. 2003).

پژوهشی روی باقیمانده و دوره کارنس حشره کش های دیازینون و ایمیداکلوپراید روی خیار گلخانه ای در شهرستان ورامین با استفاده از روش Amburus و همکاران (۱۹۸۱) انجام دادند، نتایج حاصل از آزمون شانزده نمونه خیار نمونه برداری شده از چهار گلخانه، آلودگی در چهارده نمونه آشکار شد ( $87/5$  درصد آلودگی) که میانگین میزان باقیمانده در سه گلخانه بالاتر از میزان حد مجاز بود که پس از مقایسه میانگین گلخانه ها با حد مجاز مجاز، سطح باقیمانده ایمیداکلوپراید در خیار گلخانه ای ورامین بالاتر از حد مجاز به دست آمد که می توان نتیجه گرفت این حشره کش به صورت بی رویه در سطح گلخانه ها سم پاشی شده و توصیه های فنی رعایت نمی شود. براساس نتایج حاصل از تجزیه ۱۶ نمونه خیار نمونه برداری شده از چهار گلخانه (به منظور تعیین میزان باقیمانده سموم)، آلودگی در ده نمونه آشکار شد ( $62/5$  درصد آلودگی) که میانگین دیازینون در سه گلخانه زیر میزان مجاز و فقط در یک گلخانه بالاتر از حد مجاز به دست آمد. میانگین باقیمانده چهار گلخانه توسط آزمون  $t$  با حد بیشتر میزان مجاز تعیین شده و میانگین دیازینون در گلخانه های ورامین پایین تر از حد مجاز ( $0/1$  میلی گرم بر کیلوگرم) به دست آمد. که می توان نتیجه گرفت سم پاشی براساس توصیه های فنی صورت گرفته و دروه کارنس در آن ها رعایت شده است (Morowati et

al. 2010). در ایتالیا باقیمانده آفت کش های ارگانوفسفره را در هلو و سیب (Branca et al. 1990)، باقیمانده آفت کش های ارگانوفسفره و ارگانوکلره را در پودر هویج در آلمان (Their et al. 1989)، باقیمانده آفت کش های ارگانوفسفره را در مرکبات وارداتی از کشورهای مختلف به کشور آلمان (Anastasiade et al. 1997) و باقیمانده آفت کش ها را در انگورهای ترکیه (Turgut et al. 2010) و باقیمانده آفت کش های ارگانوفسفره را در محصول سیب سردخانه های منطقه ارومیه مورد بررسی قرار دادند (Yadegarian et al. 2002). نتایج حاصل از تجزیه نمونه ها نشان داد که مقادیر به دست آمده برای دیازینون، کمتر از حداکثر مجاز استاندارد کدکس بوده و بدین جهت قابل قبول هستند. احتمال دارد موارد توصیه شده برای سم پاشی دیازینون در این پژوهش ها به درستی انجام شده و یا دوره کارنس در آن ها به خوبی رعایت شده است.

پژوهش دیگری جهت بقایای دیازینون در گوجه فرنگی، خیار و خربزه مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه میزان سم در نمونه های خربزه مربوط به تربت جام و شیروان، نشان داد که باقیمانده سم دیازینون در خربزه تربت جام  $4/98$  برابر حد مجاز و در خربزه شیروان  $4/11$  برابر حد مجاز بود. باقیمانده دیازینون در خیار به جز در خیار مشهد، بیش از حد مجاز بود. به طوری که میزان این سم، در خیار دزفول  $6/1$  برابر، در خیار رفسنجان  $4/4$  برابر، در خیار جیرفت  $4/2$  برابر، در خیار کرمان  $2/1$  برابر و در خیار شیروان  $1/8$  برابر حد مجاز بود، اما میزان سم در گوجه فرنگی و خیار کشت شده در مشهد کمتر از حد مجاز تعیین شد. نتایج نشان می دهد که سم پاشی حشره کش دیازینون به صورت بی رویه روی خربزه و خیار (به جز خیار مشهد) صورت گرفته است. احتمال دارد در مشهد نکات لازم برای سم پاشی انجام شده است (Rezvani Moghadam et al. 2009).

باقیمانده آفت کش ها در محصولات گلخانه ای (خیاردرختی و گوجه فرنگی) مورد ارزیابی قرار گرفت و آن را با حد استاندارد آن مقایسه کردند. نتایج با استفاده از اندازه گیری نمونه استخراج شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به شناساگر نیتروژن-فسفر نشان داد که دیازینون در محصول خیار به طور متوسط  $65/5$  برابر حد استاندارد کدکس و در محصول



وارداتی نیز می شود. بنابراین هراس از عدم سلامت و ایمنی محصولات ترایخته توسط دست اندرکان و تصمیم گیرندگان موجب کاهش اهمیت فناوری مهم و جدید مهندسی ژنتیک و استفاده از محصولات ترایخته شده است، و در بروز وضعیت فعلی می تواند دخیل باشد، وضعیتی که مدیران معتقد به وجود اثرهای سو احتمالی محصولات ترایخته بر سلامت انسان باید پاسخگوی آن باشند، حال آنکه اثرهای سو مصرف آفت کش ها بر سلامت انسان، دام و محیط زیست بارها اثبات شده است، اما کماکان مصرف آن در دستور کار کشاورزی کشور قرار دارد.

### منابع

- Adeli N, Ghareyazie B. 2012.** Comparison between the Impact of Transgenic Insect Resistant Crop Plants and their Traditional Counterparts on Human Health and the Environment. *Biosafety Journal*, Vol. 1, No. 2.
- Anonymous. 1995a.** Pesticides usage in agriculture, Preface, Zeiton, Special issue no. 1, Pp.4-5 (In Farsi with English abstract).
- 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 with English abstract).
- 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 with English abstract).
- 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.
- 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.
- 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 with English abstract).
- 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 with English abstract).
- Heidari A. 2010.** Strategic program of Pesticides Research. Iranian Institute of Plant Protection publication. Pp. 6 (In Farsi with English abstract).

گوجه فرنگی به طور متوسط ۴۰ برابر حد مجاز استاندارد است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان باقیمانده موجود در محصولات خیار و گوجه فرنگی اندازه گیری شده بسیار زیاد است و دلیل این امر می تواند استفاده بی رویه از آفت کش ها و یا نامناسب بودن شرایط تجزیه آفت کش ها در گلخانه ها باشد و باید برای برطرف کردن آن چاره ای اندیشید (Mahdavi et al. 2010). اگرچه مصرف بهینه آفت کش ها و کاهش مقدار باقیمانده و آثار مخرب زیست محیطی آن ها با استفاده از روش های پیشرفته آموزش و ترویج کشاورزی امکان دارد، اما همین نیاز به آموزش و ترویج برای کاهش اثرهای زیان بار آفت کش های شیمیایی از عیب های تکیه بر روش های سنتی تولید غذا در ایران است که موجب افزایش هزینه تولید و عدم امکان رقابت با محصولات

- Hodgson E, Levi P. 1997.** A textbook of modern toxicology. 2nd ed. Appleton & Longe.
- 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 with English abstract).
- Iranian National Standard. 2010.** Pesticides- Maximum residue limits of pesticides- Fruit vegetables, 1st Ed., Institute of Standard and Industrial Research of Iran (In Farsi with English abstract).
- Jafari Sh, Sepahvand M, Azadbakht N, Ahora M. 2004.** Investigation on Endosulfan residue levels in water and soil resources and cucumber produced in Chaghholvandi region (Lorestan Province). *Proceedings of the 16th Plant Protection Congress, Tabriz*, Vol. 1, Pests, pp. 179 (In Farsi with English abstract).
- 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 with English abstract).
- Ragsdale N, Kuhr RJ. 1987.** Pesticides: minimizing the risk. ACS.
- 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 with English abstract).
- Tomlin CDS. 2003.** The Pesticide Manual. British Crop Protection Council, 13th Edition, UK.
- 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.

**Tribolet N, Gasser J. 1995.** Analytical methods for pesticide residues in food stuffs.

**Weinzierl R. 2000.** Insect Pest Management for commercial vegetable crops, Illinois agricultural pest management handbook, Department of crop sciences, Illinois.

**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 with English abstract).

## تعیین تفاوت ژن *PEPCK-C* به روش PCR-RFLP و ارتباط آن با صفات

### عملکردی در مرغان بومی استان خراسان رضوی

#### Identification of *PEPCK-C* polymorphism using PCR- RFLP method and its association with economic traits in native fowl of Khorasan Razavi province

فرشته قدمگاهی<sup>۱</sup>، سعید زره داران<sup>۲</sup>، مختارعلی عباسی<sup>۳</sup>، مجتبی آهنی آذری<sup>۴\*</sup> و مونا صالحی نسب<sup>۵</sup>  
Fereshte Ghadamgahi<sup>1</sup>, Saeed Zerehdaran<sup>2</sup>, Mokhtar Ali Abbasi<sup>3</sup>, Mojtaba Ahani Azari<sup>4\*</sup>  
and Mona Salehi Nasab<sup>5</sup>

۱- کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان

۲- استاد و عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار و عضو موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

۴- استادیار و عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان

۵- دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

1- M.Sc student, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

2- Professor, Ferdosi Mashhad University of Agricultural Sciences.

3- Associate professor, Animal Research Institute, Karaj.

4- Assistant professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

5- PhD student, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mojtaba-9@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۹)

#### چکیده

این پژوهش با هدف تعیین تفاوت ژن *PEPCK-C* در جمعیت مرغان بومی استان خراسان رضوی انجام گرفت. این ژن کد کننده آنزیمی با همین نام درون سلول های اغلب موجودات است. این آنزیم نقش کلیدی در چرخه نوسازی گلوکز (گلوکوئئوژنز) دارد. دو نوع متفاوت از این ژن به شکل های نوع سیتوزولی (*PEPCK-C*) و نوع میتوکندریایی (*PEPCK-M*) وجود دارد. در این پژوهش نمونه های خون به طور تصادفی از ۱۰۰ قطعه نژاد مرغ بومی منطقه خراسان رضوی جمع آوری شد. دی.ان.ای به روش نمکی بهینه یافته استخراج و سپس با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه ای با طول ۱۰۰۰ جفت باز تولید شد. این قطعه از پیشبر تا اگزون شماره سه ژن *PEPCK-C* را پوشش می دهد. به منظور تعیین ژنوتیپ های مختلف، روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم برشی *BstE II* به کار گرفته شد. برای بررسی ارتباط تفاوت این ژن با صفات عملکردی از روش GLM، نرم افزار SAS استفاده شد. سه الگوی ژنوتیپی AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی ۰/۴۶، ۰/۳۵ و ۰/۱۹ در این جمعیت مشاهده شد. تفاوت ژن *PEPCK-C* اثر معنی داری بر صفات وزن تولد ( $P<0/01$ )، وزن در ۱۲ هفتگی ( $P<0/0001$ ) و میانگین وزن تخم مرغ بین ۲۸ تا ۳۲ هفتگی ( $P<0/002$ ) داشت. اثر تفاوت این ژن روی دیگر صفات مورد پژوهش معنی دار نبود. براساس نتایج این پژوهش، پرندگان با ژنوتیپ BB بالاترین وزن تولد، وزن در ۱۲ هفتگی و میانگین وزن تخم مرغ را داشتند. براساس نتایج این پژوهش انتخاب براساس تفاوت ژن *PEPCK-C* می تواند در بهبود ژنتیکی صفات وزن بدن و وزن تخم مرغ در مرغان بومی خراسان رضوی موثر باشد.

#### واژه های کلیدی

ژن *PEPCK-C*

تفاوت

صفات عملکردی

مرغ خراسان رضوی

PCR-RFLP

## مقدمه

مهمترین عواملی که پیشرفت در هر فعالیت تولیدی و اقتصادی را تضمین می‌کند، تلفیق دانسته‌های علمی با امکانات عملی است و این امر به‌ویژه در برخی از رشته‌های تولیدی مانند فعالیت‌های دامپروری ضروری و اجتناب ناپذیر است. یکی از اهداف ژنتیک مولکولی در زمینه اصلاح‌نژاد دام، بررسی تفاوت‌های موجود در ژن‌های مرتبط با صفات تولیدی مهم و اقتصادی است.

مرغان بومی به‌عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (Kimanimanesh et al. 2003). افزایش بی‌سابقه جمعیت، رشد اقتصادی کشورهای جهان، بالا رفتن سطح زندگی مردم، افزایش میانگین طول‌عمر و تسریع در الگوپذیری کشورهای درحال توسعه از کشورهای پیشرفته باعث افزایش تقاضا برای پروتئین با منشأ دامی شده‌اند. این افزایش تقاضا راندمان کمی و کیفی تولیدات دامی را افزایش داده است (Maaz, 2000, Rasulian, 2001). مرغ‌های بومی به‌دلیل عدم نیاز به فناوری، مقاومت به برخی بیماری‌ها و شرایط سخت آب و هوایی و افزایش درآمد خانوارهای روستایی و همچنین استفاده مطلوب و بهینه از مازاد موادغذایی، تولید محصولات ارگانیک و ایجاد اشتغال اهمیت زیادی دارند (Kianimanesh et al. 2002). با بهبود خصوصیت‌های ژنتیک مرغان بومی در دراز مدت می‌توان گامی موثر در جهت خودکفایی و در نتیجه قطع وابستگی از واردات طیور برداشت (Shamsaei, 1986). بنابراین ارتقا وضعیت تولیدی آن‌ها جهت اقتصادی‌تر شدن پرورش در روستاها امری بسیار مهم و اجتناب ناپذیر است.

ژن فسفوانول‌پیرووات کربوکسی‌کیناز (PEPCK) (Phosphoenolpyruvat Carboxykinase) کد کننده آنزیمی با همین نام است و در ژنوم بیشتر موجودات زنده دو نوع متفاوت از این ژن وجود دارد (David et al. 1990). نوع اول این ژن سیتوزولی است (Cytosolic PEPCK-C) (Phosphoenolpyruvat )

Carboxykinase Mitochondrial)) که اندازه آن هشت کیلوباز است و نوع دوم آن میتوکنندریایی (Phosphoenolpyruvat Carboxykinase Yacov) که اندازه آن ۴/۳ کیلوباز است (et al. 1984). فسفوانول‌پیرووات کربوکسی‌کیناز آنزیم کلیدی در چرخه نوسازی گلوکز (گلوکونئوژنز) است. این آنزیم با استفاده از یک مولکول GTP و دکربوکسیلاسیون‌آگزالواستات این ماده را به فسفوریلاسیون اسیدهای کربوکسیلیک نظیر گلیکولات و تیوگلیکولات می‌شود (David et al. 1990). واکنش گلوکونئوژنز در کبد و کلیه‌ها انجام و باعث تبدیل مواد غیرقندی مانند برخی از اسیدهای آمینه به گلوکز می‌شود. گلوکز وارد چرخه کربس شده و در نهایت باعث تولید انرژی می‌شود (Malone et al. 2007). ژن کدکننده این آنزیم به‌عنوان یک ژن کاندیدا برای شناسایی تنوع آلی و ارتباط آن با صفات اقتصادی مرتبط با پرورش طیور شناخته شده است و به‌طور عمده ناحیه پیشبر این ژن جهت تعیین ژنوتیپ به‌کار می‌رود. وجود توالی CCAAT در پیشبر ژن باعث افزایش اتصال پروتئین‌های نسخه‌برداری می‌شود. توالی CCAAT همچنین عامل اتصال پروتئین در وضعیت‌های چندانگانه تغذیه‌ای، رشدی و تنظیم هورمونی است. هورمون‌هایی مانند تیروئید و گلوکوکورتیکوئید باعث افزایش اتصال آر.ان.ا پلیمراز II به پیشبر ژن و افزایش اتصال پروتئین به توالی CCAAT می‌شوند و نسخه‌برداری ژن مربوطه را تنظیم می‌کنند (Jurado et al. 2002).

در بررسی پارسانژاد و همکاران (۲۰۰۲)، که روی جوجه‌های نژاد لگه‌ورن صورت گرفت، مشخص شد که چندشکلی در ژن PEPCK-C می‌تواند بر طیف وسیعی از صفات‌ها اثر داشته باشد. این ژن همچنین در بروز بیماری‌های توموری طیور که به‌شدت به سوخت و ساز گلوکز وابسته است نیز مؤثر هستند. آن‌ها روی ناحیه‌های به طول ۳۷۹۲ جفت‌باز از این ژن، در هشت جمعیت

مختلف لگهورن سفید با روش *RFLP*، ۱۹ جهش تک نوکلئوتیدی شناسایی کردند. همچنین پارسانژاد و همکاران (۲۰۰۳)، با استفاده از تکنیک *RFLP*، شش ژنوتیپ *CC*، *BC*، *BB*، *AC*، *AB* و *AA* برای این محدوده (۳۷۹۲ جفت‌باز) از ژن تعیین کردند. امام‌قلی‌بگلی و همکاران (۲۰۱۰)، برای ژن *PEPCK-C* در مرغان بومی یزد تفاوت مشاهده نکردند.

عمرانی‌بیدی و همکاران (۱۳۸۹)، تفاوت ژن *PEPCK-C* را در مرغان بومی سیستان در دو توده خزک و دشتیاری با روش *PCR-RFLP* بررسی کردند.

تجزیه و تحلیل نتایج، وجود ارتباط ژنوتیپ‌های این ژن با صفات عملکردی در گله‌های مربوطه را نشان داد. از آنجایی که ترکیب ژنتیکی نژادهای محلی پایه و اساس اصلاح‌نژاد طیور را تشکیل می‌دهند، استفاده از تنوع ژنتیک موجود در مرغان بومی می‌تواند زمینه را برای تولید پرندگان با عملکرد رشد و تولید تخم‌مرغ در عین سازگاری با شرایط روستایی فراهم کند (Hoffman, 2005). هدف از این پژوهش، بررسی تفاوت ژن *PEPCK-C* و ارتباط آن با صفات عملکردی در جمعیت مرغان بومی خراسان رضوی است.

### مواد و روش‌ها

مرکز پشتیبانی و اصلاح‌نژاد مرغان بومی خراسان رضوی در مشهد (کیلومتر پنج جاده مشهد-قوچان) واقع شده است. عملیات اصلاح‌نژادی در این مرکز از سال ۱۳۸۴ آغاز شد. در نسل‌های بعدی، رکوردهای مربوط به صفات‌های وزن بدن در یک‌روزگی، هشت و ۱۲ هفتگی، سن و وزن بلوغ جنسی و تعداد تخم‌مرغ تولیدی در ۱۲ هفته اول تولید اندازه‌گیری شد. مشابه با سایر مراکز اصلاح‌نژاد مرغان بومی، انتخاب پرندگان برتر در هر نسل در دو مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول، پرندگان براساس وزن هشت و ۱۲ هفتگی انتخاب می‌شوند. در سن ۲۰ هفتگی، ماده‌ها به قفس‌های انفرادی منتقل شده و تولید تخم آن‌ها به مدت ۱۲ هفته ثبت می‌شود. در مرحله دوم انتخاب،

مرغان براساس سن بلوغ جنسی، تعداد تخم‌مرغ تولیدی و میانگین وزن تخم‌مرغ در هفته‌های ۲۸، ۳۰ و ۳۲ و خروس‌ها براساس عملکرد خواهرانشان انتخاب می‌شوند. شدت انتخاب اعمال‌شده در نرها حدود ۵ درصد و در ماده‌ها حدود ۴۰ درصد است، به طوری که در نهایت تعداد ۸۰۰ مرغ و ۸۰ خروس انتخاب می‌شوند و برنامه آمیزی به صورت هر خروس به ازای ۱۰ مرغ اجرا می‌شود.

جوجه‌های تولیدی شجره‌دار با وزن‌کشی در روز اول و انجام واکسیناسیون‌های لازم به سالن پرورش منتقل و سپس در سنین هشت و ۱۲ هفتگی وزن‌کشی شده و جداسازی مرغ و خروس انجام می‌گرفت. با شروع تخم‌گذاری گله، نسبت به ثبت سن بلوغ جنسی اقدام و بعد از رسیدن به ۵ درصد تولید ثبت وزن و تعداد تخم‌مرغ طی ۱۲ هفته اول تولید آغاز و همچنین وزن تخم‌مرغ در سنین ۲۸، ۳۰ و ۳۲ هفتگی به صورت روزانه ثبت می‌شود. در پژوهش حاضر، از داده‌های مربوط به وزن بدن در هنگام تولد، وزن بدن در هشت و ۱۲ هفتگی، سن بلوغ جنسی، وزن بلوغ جنسی، تعداد تخم‌مرغ تولیدی در ۱۲ هفته اول تولید و میانگین وزن تخم‌مرغ بین ۲۸ تا ۳۲ هفتگی، نسل هفتم (۱۳۹۱) مرکز پشتیبانی و اصلاح‌نژاد مرغان بومی خراسان رضوی مورد استفاده قرار گرفت. خون‌گیری به میزان یک سی‌سی از رگ بال ۱۰۰ مرغ بومی این مرکز که به طور تصادفی انتخاب شدند، انجام و نمونه‌ها به لوله‌های حاوی EDTA منتقل و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. دی.ان.ا. به روش نمکی بهینه یافته استخراج شد.

غلظت ژل آگارز برای الکتروفورز دی.ان.ای استخراجی یک درصد بوده و دی.ان.ای استخراجی بدون شکستگی و آلودگی مشاهده شد. پس از مرحله استخراج، دی.ان.ا. با استفاده از یک جفت آغازگر با توالی F: 5'GCTGGGACTGAATGGAAGAGGAG3' R: 5'CTGTTGAGTCGGATGGGTGTCAG3' (Parsanejat et al. 2002) و طول قطعه ۱۰۰۰ جفت‌باز از پیشبر تا اگزون شماره ۳ ژن *PEPCK-C* تکثیر شد. برنامه

پژوهش با رویه مدل‌های خطی عمومی (GLM) نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. برای بررسی ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات عملکردی از رابطه ۱ استفاده شد.

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + G_j + e_{ijk} \quad \text{رابطه ۱}$$

در این مدل:

$Y_{ijk}$ : مشاهده‌های مربوط به صفات‌های مورد بررسی

$\mu$ : میانگین کل

$H_i$ : اثر ثابت نوبت جوجه‌کشی

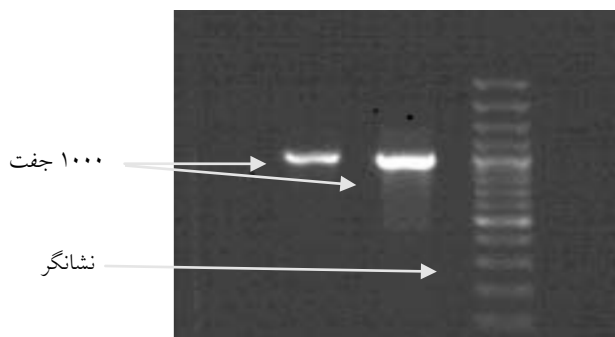
$G_j$ : اثر ژنوتیپ‌های مربوط به ژن مورد بررسی

$e_{ijk}$ : اثر باقیمانده

برای مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات صفات‌های عملکردی در ژنوتیپ‌های مختلف از روش توکی استفاده شد.

## نتایج و بحث

نتایج هضم با آنزیم‌های برشی نشان داد که برای قطعه‌های تکثیرشده توسط یک جفت آغازگر (شکل ۱)، دو جایگاه برشی برای آنزیم *BstE* II وجود داشت و این آنزیم تعدادی از محصولات را به قطعات ۳۰۰ جفت‌باز و ۷۰۰ جفت‌باز برش داد (شکل ۲)، که قطعات با طول ۱۰۰۰ جفت‌باز، آلل A و قطعه‌های با طول ۳۰۰ جفت‌باز و ۷۰۰ جفت‌باز، آلل B نام‌گذاری شده و ژنوتیپ‌های به‌دست آمده به شرح جدول (۱) است.



شکل ۱- محصول‌های پی.سی.آر (قطعه‌های ۱۰۰۰ جفت‌بازی) تکثیر شده توسط جفت آغازگر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

**Figure 1-** The products of PCR (Parts 1000bp) amplified by primer on agaros gel 1.5 percent

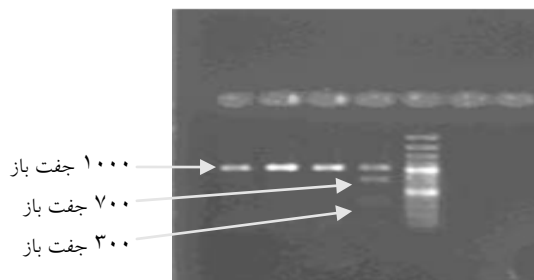
حرارتی استفاده شده برای تکثیر نواحی مورد نظر در ژن *PEPCK-C*، شامل دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشته‌سازی ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هشت دقیقه است.

اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۲ درصد مشخص شد. تکنیک استفاده‌شده در این پژوهش مبتنی بر *PCR-RFLP* بود. آنزیم برشی مورد استفاده برای هضم محصول‌های پی.سی.آر، آنزیم *BstE* II (*EcoRI*)، ساخت شرکت پدیده نوژن پارس (مشهد) با جایگاه برشی 5'-GGTNACC3' بود. پروتکل هضم آنزیمی شامل استفاده از دو واحد آنزیم (۰/۲ میکرولیتر) برای هر نمونه از محصول‌های پی.سی.آر، دو میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱۶ میکرولیتر آب مقطر و سه میکرولیتر از محصول‌های پی.سی.آر (به علت غلظت بالای محصولات) برای هر واکنش آنزیمی در نظر گرفته شد. سپس تمامی نمونه‌های حاوی آنزیم به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از اتمام زمان هضم آنزیمی برای بررسی قطعات برشی از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. برای تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی از روی تعداد ژنوتیپ‌های به‌دست آمده در جمعیت مورد بررسی فایل اطلاعات ژنوتیپ‌های مشاهده شده در نرم‌افزار Pop gene 1.31 (Yeh et al. 1997) فراخوانده‌شده و پس از تعاریف اولیه در این نرم‌افزار شامل دیپلوئید بودن موجود، تعداد جایگاه، جمعیت‌ها، تعداد ژنوتیپ‌های مشاهده‌شده و نام‌گذاری آن‌ها، محاسبه‌های فوق در این نرم‌افزار انجام شد. پژوهش برقراری تعادل هاردی واینبرگ در جایگاه مورد بررسی در این پژوهش نیز با استفاده از نرم‌افزار Pop Gene و با آزمون کای‌مربع انجام شد. پس از تشخیص ژنوتیپ‌های مربوط به ژن *PEPCK-C*، آزمون آماری به منظور بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های مذکور با صفات‌های عملکردی انجام شد. آزمون آماری کلیه داده‌های این

خزک، ۰۴ درصد و در نژاد دشتیاری ۱۶ درصد بوده است. کم بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده می-تواند ناشی از تلاقی های جور شده مثبت در جمعیت مورد بررسی باشد.

میزان کل  $\chi^2$  محاسبه شده برابر با ۶/۰۰ بود که در سطح احتمال ۵ درصد دارای تفاوت معنی داری است، بنابراین جمعیت در تعادل هاردی-واینبرگ نیست (جدول ۱). این عدم تعادل، نبود شرایط برقراری تعادل، وجود انتخاب و همچنین تلاقی های غیر تصادفی را در توده نشان می دهد.

اثر ژنوتیپ در سنین وزن تولد، وزن در ۱۲ هفتگی و میانگین وزن تخم مرغ معنی دار ( $p < 0.05$ ) و برای صفات وزن در ۸ هفتگی، سن بلوغ جنسی، وزن بلوغ جنسی و تعداد تخم مرغ غیر معنی دار بود. پرندگان با ژنوتیپ BB دارای وزن تولد، وزن ۱۲ هفتگی و میانگین وزن تخم مرغ بیشتر (به ترتیب ۳۸/۰۶، ۱۵۰۲/۷۵ و ۸۴/۹۵ گرم)) و حیوانات با ژنوتیپ AA دارای وزن تولد، ۱۲ هفتگی و میانگین وزن تخم مرغ تولیدی کمتری (به ترتیب ۳۶/۲۶، ۱۲۵۴/۶۱ و ۷۰/۴۲ گرم)) بودند. از طرفی با مقایسه میانگین ها، می توان به اثر آلل B پی برد که این آلل در افزایش وزن بدن در سنین تولد، ۱۲ هفتگی و میانگین وزن تخم مرغ مؤثر بوده است، به طوری که حالت هموزایگوتی این آلل در هر سه صفت اثر بیشتری بر وزن بدن نسبت به حالت هتروزیگوتی نشان داده است، (جدول ۲). پارسا نژاد و همکاران (۲۰۰۳)، در محدوده ۳۷۹۲ جفت باز از ژن *PEPCK-C*، شش تفاوت مشاهده کردند که ژنوتیپ AA بیشترین اثر را بر روی اولین سن تخم گذاری و ژنوتیپ BB بیشترین اثر را بر روی وزن تخم مرغ داشته و همچنین بیشترین مصرف خوراک را در پرندگانی با ژنوتیپ های AA و AB نژاد لگهورن گزارش کردند. نتایج این پژوهش با نتایج پارسا نژاد و همکاران (۲۰۰۳)، در همبستگی ژنوتیپ BB با صفت وزن تخم مرغ مطابقت داشت.



شکل ۲- هضم آنزیمی قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی (تولید شده با جفت آغازگر) با آنزیم *BstE II* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

**Figure 2-** digestion of 1000 bp fragment (generated with primers) with *BstE II* enzymes on agaros gel 1.5 percent

باتوجه به شکل ۱ و ۲ الگوی بانندی متفاوت AA، AB و BB در بین نمونه ها مشاهده شد که این تفاوت نشان دهنده وجود سه ژنوتیپ متفاوت در جمعیت مورد بررسی در این پژوهش بود. فراوانی آللی برای آلل A، ۰/۶۳ و برای آلل B، ۰/۳۶ مشاهده شد. بیشترین فراوانی در این جمعیت مربوط به ژنوتیپ AA بوده و همچنین فراوانی آللی A هم بیشتر از فراوانی آللی B است. نتایج این پژوهش با بررسی های قبلی (Omrani Bidi et al., 2011)، برای ژن *PEPCK-C* در دو توده نژاد سیستم شامل خزک و دشتیاری مطابقت نداشت. در پژوهش ذکر شده ژنوتیپ BB مشاهده نشده بود. همچنین پارسا نژاد و همکاران (۲۰۰۳)، شش ژنوتیپ AC، BB، BC، CC و همکاران (۲۰۱۰)، نیز برای ژن *PEPCK-C* در مرغان بومی یزد تفاوت مشاهده نکردند. این تفاوت ها ممکن است به دلیل تفاوت در تعداد طيور مورد پژوهش و یا متفاوت بودن نژادها باشد.

میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت مورد بررسی ۳۵ درصد بود که نشان دهنده تنوع ژنتیک به نسبت کم در این مرکز برای این ژن است. میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این جمعیت، ۴۶/۵۸ درصد محاسبه شد. در پژوهش قبلی (Omrani Bidi et al., 2011)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده در بین مرغان بومی

جدول ۱- فراوانی و تعداد ژنوتیپ‌ها و نتایج تعادل هاردی واینبرگ در مرغان بومی خراسان رضوی

**Table 1-** Frequency of genotypes and results of Hardy-Weinberg equilibrium in the domestic fowl Khorasan Razavi

| ژنوتیپ | فراوانی | تعداد مشاهده شده | تعداد مورد انتظار | آماره $\chi^2$ |
|--------|---------|------------------|-------------------|----------------|
| AA     | 0.46    | 46               | 40.20             | 0.83           |
| AB     | 0.35    | 35               | 46.58             | 2.88           |
| BB     | 0.19    | 19               | 13.20             | 2.54           |
| جمع    | 1       | 100              | 100               | 6.26*          |

\*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ( $p < 0.05$ )

جدول ۲- مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف ژن *PEPCK-C* بر روی صفات مورد پژوهش (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در مرغان بومی خراسان رضوی.

**Table 2-** Comparison of different genotypes means for *PEPCK-C* gene on the characteristics of the study (mean  $\pm$  SD) in Khorasan Razavi native birds.

| صفت (گرم)                       | AA                    | AB                  | BB                   | احتمال معنی‌داری |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| وزن تولد                        | $36.26^b \pm 0.34$    | $36.65^b \pm 0.34$  | $38.05^a \pm 0.09$   | 0.013            |
| وزن ۸ هفتگی                     | $665.93 \pm 40/45$    | $722.58 \pm 44/25$  | $745/67 \pm 38/15$   | 0.070            |
| وزن ۱۲ هفتگی                    | $1254.^c 60 \pm 0.51$ | $1467.44^b \pm 1.1$ | $1502.75^a \pm 0.81$ | 0.0001           |
| سن بلوغ جنسی                    | $165.72 \pm 0.64$     | $167.78 \pm 1.12$   | $165.34 \pm 0.71$    | 0.72             |
| وزن بلوغ جنسی                   | $2007.67 \pm 0.59$    | $1963.74 \pm 1.33$  | $1865.61 \pm 0.76$   | 0.088            |
| تعداد تخم مرغ در ۲۸ تا ۳۲ هفتگی | $35.8 \pm 0.58$       | $32.18 \pm 0.93$    | $36.15 \pm 0.88$     | 0.128            |
| وزن تخم مرغ                     | $70.42^b \pm 0.69$    | $72.53^b \pm 0.82$  | $84.95^a \pm 0.37$   | 0.002            |

در هر ردیف میانگین‌ها با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند.

گرچه ارتباط معنی‌داری بین صفات وزن در هشت هفتگی و وزن بلوغ جنسی با ژن موردنظر مشاهده نشد ولی میانگین این صفات در مرغان دارای ژنوتیپ BB از نظر عددی بالاتر از ژنوتیپ‌های دیگر بود. ارتباط معنی‌داری بین صفات سن بلوغ جنسی و تعداد تخم مرغ تولیدی با ژن موردنظر مشاهده نشد (جدول ۲). در نتیجه این ژن روی این صفات در مرغان بومی خراسان رضوی مؤثر نیست.

*PEPCK-C* یک آنزیم کلیدی در سنتز گلوکز است. این آنزیم به شدت توسط انواع رژیم غذایی و هورمون‌ها تنظیم می‌شود. AMP حلقوی، گلوکو کورتیکوئیدها و هورمون‌های طبیعی از عوامل اصلی افزایش بیان ژن *PEPCK-C* به شمار می‌روند (Hanson, 1997).

این پژوهش ارتباط ژنتیک و فنوتیپی صفات تولیدی مرغ بومی ایران در استان خراسان رضوی را مورد بررسی قرار داده است. براساس نتایج حاصل از این پژوهش، ژن *PEPCK-C* می‌تواند اثر معنی‌داری بر صفات‌های وزن تولد، وزن در ۱۲ هفتگی و میانگین وزن تخم مرغ تولیدی داشته باشد. به نظر می‌رسد پرندگان دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب برای این ژن (BB) از مقدار بیشتری آنزیم *PEPCK-C* برخوردار بوده و در نتیجه سنتز گلوکز در بدن این پرندگان از منابع غیرقندی مانند برخی از اسیدهای آمینه بیشتر می‌شود. گلوکز وارد چرخه کربس شده و در نهایت باعث تولید انرژی می‌شود. افزایش تولید انرژی در این پرندگان شرایط را برای رشد بهتر و تولید تخم مرغ سنگین‌تر فراهم می‌آورد. بنابراین با توجه به نتایج



### سپاسگزاری

بدین وسیله از مساعدت مسئولین سازمان جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور و همچنین کارشناسان مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی مشهد سپاسگزاری می شود.

### منابع

David EA, Fraces AE, Sohcli AC, Yoshitake S and Vern LS, 1990. Mammalian and avian liver Phosphoenolpyruvat Carboxykinase. The journal of biological chemistry. 265: 7377-7384.

Emamgoli begli H, Zerehdaran S, Hassani S, Abbasi MA and Khan Ahmadi A, 2010. Polymorphism in prolactin and PEPCK-C genes and its association with economic traits in native fowl of Yazd province. Iranian journal of biotechnology. 8: 172-177 (In Farsi with English abstract).

Hanson RW, 1997. Regulation of phosphoenolpyruvat carboxykinase gene expression. Annual Review Biological chemistry. 66: 581-611.

Hoffman I, 2005. Research and investment in poultry genetic resources-challenges and options for sustainable use. World Poult Sci 61:57-70.

Jurado LA, Song S, Roesler WJ and Park EA, 2002. Conserved Amino Acids within CCAAT Enhancer-binding proteins regulate Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene expression. Journal of biological chemistry. 277: 27606-27612.

Kyanymanesh H, Nejatyjvarmy A. Kamali M., 2003. Fars Native Fowl estimate genetic and environmental parameters, Journal of Construction Research, 5, pp: 9 (In Farsi with English abstract).

Kyanymnsh HR, Nejatyjvarmy and Ariana AH., 2002. Study of economically important genetic traits in Mazandaran native fowls. The first seminar on genetics and breeding of livestock, poultry and aquaculture country, Faculty of Agriculture, Tehran University (In Farsi with English abstract).

Maaz, 2000. Statistical analysis of the world's poultry industry, poultry industry magazine, Issue 52 (In Farsi with English abstract).

Malone S, Chen ZH, Bahrami AR, Walker RP, Gray JE, Leegood RC, 2007. Phosphoenolpyruvate

حاصل از این پژوهش می توان از ژنوتیپ BB در برنامه های اصلاح نژادی برای بالا بردن وزن بدن در این سنین و وزن تخم مرغ استفاده کرد. با توجه به کم بودن وفور مرغان دارای این ژنوتیپ، انتخاب براساس افزایش این ژنوتیپ می تواند راهکار مناسبی برای ارتقا بازده مرغ بومی خراسان رضوی باشد.

carboxykinase in Arabidopsis: changes in gene expression, protein and activity during vegetative and reproductive development. Plant and Cell Physiology, 48:441-450.

Omrani Bidi J, Alipanah M, Turkmanzehi A, Hosseini S. and Nasiri M, 2011. PEPCK-C gene polymorphism in Native Fowl Sistan and Baluchestan. Master Thesis of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol ( In Farsi with English abstract).

Parsanejad R, Torkamanzehi A, Zadworny D and Kuhnlein U, 2003. Alleles of Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) trait association and interaction with mitochondrial PEPCK in a strain of Leghorn chickens. Poultry Science 82: 1708-1715 ( In Farsi with English abstract).

Parsanejad R, Zadworny S and Kuhnlein U, 2002. Genetic variability of the cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in White Leghorn chickens (In Farsi with English abstract). Journal Poultry Science 81:1668-1670.

Rasoulia S. 2001. Genetic study of some economic traits in domestic fowl in West Azerbaijan Province. Master's Thesis in Animal Science, Faculty of Agriculture, Higher Education Center, Imam Khomeini (ra).

Shamsae A. 1986. Identification and breeding of native chickens, Animal Husbandry Research Institute, the Research Journal, pp: 50.

Yaacov H, Morrist S M and Hanson W, 1984. Induction by CAMP of the mRNA encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken. The journal of biological chemistry. 259:15603-15608.

Yeh FC, Yang RC, Timothy BJ, Ye Z, Judy M, 1997. Pop Gene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center. Univ. Alberta.



## اثر آنتی اکسیدانی برخی القا کننده های نوساقه زایی و ریشه زایی در پسته (*Pistacia vera*)، پایه های رویشی قزوینی و UCB-1) در شرایط

### درون شیشه

#### The antioxidative effect of some shoots and root inducers in *Pistacia vera* (Qazvini and UCB-1 rootstocks) under *in vitro* conditions

سارا ملکی<sup>۱</sup>، قاسمعلی گروسی<sup>۲\*</sup>، رحیم حداد<sup>۲</sup> و اسماعیل نظامی آلانق<sup>۳</sup>

Sara maleki<sup>1</sup>, Ghasemali Garoosi<sup>2\*</sup>, Raheem Haddad<sup>2</sup> and Esmaeil Nezami Alanogh<sup>3</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه

بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام

خمینی (ره)، قزوین، ایران

۳- کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی

امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

1-M.Sc student, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

2-Associate professor, Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

3-Technician (M.Sc), Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: agaroosi90@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۰)

### چکیده

پایه های رویشی پسته قزوینی و UCB-1 از ارقام شناخته شده در دنیا هستند که به لحاظ سازگاری به خشکی و شوری (قزوینی) و سرما و بیماری های ورتیسلیومی (UCB-1) دارای اهمیت هستند. به منظور بهبود کیفیت رشد رویشی و میزان ساقه زایی و همچنین افزایش راندمان ریشه زایی، اثر اسکوپولتین و منبع آهن (Fe-EDTA و Fe-EDDHA) همراه با پژوهش تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز بررسی شد. همچنین بررسی خصوصیت های کینتیک با استفاده از مقادیر مختلف کاتیون های  $Ca^{2+}$ ،  $Mg^{2+}$  و دماهای متفاوت و همچنین اثر غلظت های مختلف EDTA بر فعالیت این آنزیم هدف دیگر این پژوهش بود. نتایج نشان داد که اسکوپولتین ضمن افزایش میزان نوساقه زایی و بهبود کیفیت رشد رویشی، در فعالیت آنزیم پراکسیداز نقش مؤثری ایفا کرد که اختلاف معنی داری در سطح  $\alpha=0.05$  با تیمار شاهد داشت. جایگزینی Fe-EDDHA با Fe-EDTA در محیط کشت، راندمان ریشه زایی را تا دو برابر افزایش داده و یک رابطه مستقیم بین میزان ریشه زایی و فعالیت آنزیم پراکسیداز دیده شد، بنابراین فعالیت آنزیم پراکسیداز می تواند به عنوان نشانگر پیش بینی کننده ریشه زایی در پسته مورد توجه باشد. بررسی فعالیت کینتیک آنزیم پراکسیداز بیانگر نقش مثبت کاتیون ها، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه فعالیت آنزیم و اثر بازدارندگی EDTA روی فعالیت این آنزیم بود.

### واژه های کلیدی

اسکوپولتین  
پسته  
پراکسیداز  
ریشه زایی  
نوساقه زایی  
Fe-EDDHA

## مقدمه

پایه رویشی پسته قزوینی (*Pistacia vera cv. Qazvini*) به عنوان یکی از ارقام با ارزش مقاوم به شوری و سازگار به کشت در مناطق خشک و نیمه خشک است (Mohammadi et al. 2007; Morgan et al. 1992). UCB-1 ( $P. \times P. atlantica$ ) و *intergerima* نیز از پایه های هیبرید رویشی شناخته شده در دنیا است که به لحاظ مقاومت به سرما و پژمردگی ورتیسلیومی (*Verticillium sp.*) دارای اهمیت است (Morgan et al. 1992). تکثیر پسته با استفاده از روش های مرسوم از قبیل کشت بذر، قلمه زدن و خوابانیدن، به دلیل بالا بودن میزان هتروزیگوسیتی، سخت ریشه زایی و آلودگی به بیماری های باکتریایی و قارچی بسیار سخت و هزینه بر است (Onay. 2000). در این راستا بیوتکنولوژی گیاهی توانسته است با غلبه بر مشکلات یاد شده به عنوان جایگزین مناسبی برای تکثیر این درختان باشد (Abousalim and Dolcet-Sanjuan and Claveria. 1995; Jain Mantell. 1994; and Häggman. 2007; Onay. 2000). با وجود این، نوساقه زایی پسته در شرایط درون شیشه (*in-vitro*) همواره با مشکلاتی از جمله سوختگی سرشاخه (shoot tip necrosis (STN)، آبکی شدن نوساقه های تشکیل شده (hyperhydricity)، تولید کالوس زیاد در پایین ساقه (base callus at the cut edge) و غالبیت انتهایی (axillary dominant) همراه است (Abousalim and Bairu et al. 2009, Crane and Iwakiri. 1985, Mantell. 1994, Dolcet-Sanjuan and Claveria. 1995, Küden et al. 1994). پژوهش های اولیه نشان داد که استفاده از آنتی اکسین به واسطه تعدیل اکسین داخلی و خارجی می تواند فرآیندهای مورفولوژیکی در شرایط درون شیشه را در کشت های کالوس گوجه فرنگی و جو بهبود بخشد (Jelaska et al. Cassells. 1979). اسکوپولتین (نوعی آنتی اکسیدانت با ترکیبی طبیعی) (1984). احتمال دارد با کلاته کردن اکسین تولید شده در راس ساقه ها و جوانه های انتهایی و در نهایت با کنترل غالبیت انتهایی باعث فعال شدن جوانه های جانبی می شود (Imbert and Wilson. 1970; Malik et al. 2011). بدین منظور استفاده از این ماده با هدف افزایش نوساقه زایی به واسطه کنترل غالبیت انتهایی و همچنین اثر دنباله آن در رفع نارسایی های یاد شده در این گیاه نیاز به بررسی

بیشتری داشت. توانایی گیاه در تولید ریشه به عملکرد متقابل فاکتورهای متعدد داخل سلولی و خارج سلولی از جمله آهن بستگی دارد (Frenkel and Hess. 1974). نقش کلیدی آهن در فرآیندهای متعدد رشدی از جمله سنتز کلروفیل و دی.ان.ای و هورمون های رشدی به خوبی روشن شده است (Dunlap and Robacker. 1988). با توجه به این که آهن موجود در محیط کشت MS (Murashige & Skoog) حاوی آهن به شکل کلاته ( $Fe-EDTA$ ) است (Murashige and Skoog. 1962)، سینگ و کریکوریان (۱۹۸۰) نشان دادند که غلظت توصیه شده  $Na_2EDTA$  (۳۷/۳ میلی گرم بر لیتر) بیش از اندازه مورد نیاز برای کلاته کردن  $Fe^{2+}$  ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O = 27.8 \text{ mg/L}$ ) است؛ به طوری که مقدار مازاد این ماده می تواند اثر سو روی دسترسی سایر کاتیون های دوفرفیتی توسط گیاه داشته باشد (Singh and Kirkoran. 1980). از طرف دیگر، براساس یافته های دیگران، جایگزینی  $Fe-EDDHA$  با  $Fe-EDTA$  اثر فزاینده ای در ریزازدیادی گونه های مختلفی داشته است (Antonopoulou et al. 2007; Rashid and Street. 1973; Molassiotis et al. 2003). با وجود این براساس دانسته های ما اطلاعاتی در ارتباط با نقش این ماده در ریشه زایی پسته وجود ندارد. از سوی دیگر پراکسیدازها ( $EC 1.11.1.7$ ) هموپروتئین هایی با حلقه پورفیرینی آهن هستند که کاتالیز رادیکال های آزاد ناشی از تجزیه پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) را بر عهده دارند (Brill. 1966). پژوهش های انجام شده روی این گروه از اکسیدازها به نقش کلیدی آن ها در واکنش های متعددی از جمله به عنوان آنتی اکسیدانت رادیکال های آزاد، دخیل بودن در رشد و نمو گیاهی، تنظیم هورمون های رشدی، کنترل ساز و کار دفاعی و کنترل رشد طولی سلول ها اشاره داشته اند (Jackson et al. 2001; Schnabelrauch et al. Campa. 1991). امروزه گزارش های معدودی از پژوهش های انجام شده از خصوصیت های کیتیک آنزیم های پراکسیداز موجود در گیاهان عالی در دسترس است (Padmarajaiah et al. 2009) و تلاش ها در این راستا برای شناسایی هرچه بیشتر ویژگی های کیتیک این گروه از آنتی اکسیدانت ها و همچنین یافتن ارتباط بین تغییرهای مورفولوژی قابل مشاهده مانند نوساقه زایی، جنین زایی و ریشه زایی با فعالیت آنزیم های کلیدی درگیر در این فرآیندها مانند

شدت نور 1-2.5 μmol.m-2.s-1 65 نگهداری شدند (Nezami A et al. 2010). یادداشت برداری ها بعد از یک مرتبه زیرکشت در تیمارهای مربوطه انجام شد.

**اثر اسکوپولتین در نوساقه زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز:** به منظور بررسی اثر اسکوپولتین به عنوان یک آنتی اکسین (در غلظت های پایین) روی کیفیت رشد و میزان نوساقه زایی، اثر آن در غلظت های ۰/۰ و ۳/۰ میلی گرم در لیتر به طور جداگانه با استفاده از محیط کشت GNH، مورد پژوهش قرار گرفت. اسکوپولتین با فیلتر استریل و بعد از اتوکلاو شدن محیط کشت به آن اضافه شد. بعد از گذشت ۲۱ روز از اعمال تیمار، صفت های مانند تعداد نوساقه های کل و سالم، وزن تر (fresh weight) کل و سالم تولیدی و میزان رشد طولی یادداشت برداری شدند. به ازای هر تیمار چهار شیشه مربای ۱۸۰ میلی لیتری با درب کریستالی حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت (به عنوان تکرار) و در هر تکرار چهار ریز نمونه کشت شد. به منظور بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه برداری (سه تکرار به ازای هر تیمار) در پنج فاصله زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کشت) انجام گرفت.

**اثر منبع آهن روی ریشه زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز:** به منظور ریشه زایی، پایه ی نوساقه های رشد یافته (با طول ۱/۵ تا ۲ سانتی متر) به مدت ۱۰ دقیقه در داخل ۱۰۰۰ پی پی ام هورمون NAA فرو برده شده (پالس هورمونی) (Delijam, 2013) و سپس به منظور بررسی اثر نوع آهن روی راندمان ریشه زایی، نوساقه های پیش تیمار شده در دو تیمار (a) بدون هورمون حاوی Fe-EDTA توصیه شده در محیط کشت MS (جدول ۳) و (b) GNH بدون هورمون حاوی ۱۸۷ میلی گرم در لیتر Fe-EDDHA (Antonopoulou et al. 2007) منتقل و بعد از اعمال هفت روز تاریکی در دمای دو درجه سانتی گراد  $25 \pm$ ، به شرایط نوری ۱۶/۸ ساعت تاریکی بر روشنایی با لامپ های فلورسنت با شدت نور 1-2.5 μmol.m-2.s-1 65 منتقل و در دمای یاد شده نگهداری شدند. به ازای هر تیمار پنج شیشه مربای ۱۸۰ میلی لیتر با درب کریستالی حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت (تکرار) و در هر تکرار چهار ریز نمونه کشت و به منظور بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز (۳ تکرار به ازای هر تیمار) نمونه برداری از هفته دوم تا پنجم بعد از

پراکسیداز، با هدف معرفی این آنزیم ها به عنوان نشانگرهای پیش بینی کننده (Predictive markers) (Gaspar et al. 1992) کماکان مورد توجه پژوهشگران است. براساس فرضیه بنسون (۲۰۰۱) تولید رادیکال های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) در گیاهان در شرایط درون شیشه مرتبط با مقاومت گیاه در برابر تمایز، رشد و نمو (plant recalcitrance) است (Benson, 2000)؛ در حالی که تولید بیش از حد رادیکال های آزاد می تواند منجر به تنش های اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی شود (Vatankhah et al. 2010). از سوی دیگر براساس گزارش های موجود به دلیل وجود تنش های اکسیداتیو حاصل از رشد و نمو، الگوی فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان در طول این فرایندها به طور هوشمندانه با هدف حفظ سلول ها از تنش های حاصله تغییر می یابد (Gupta and Datta. 2005; Tang and Newton. 2005; Libik et al. 2005). در این پژوهش اثر اسکوپولتین به عنوان یک آنتی اکسیدانت طبیعی در نوساقه زایی و همچنین اثر منبع آهن (Fe-EDTA و Fe-EDDHA) در ریشه زایی همراه با تغییرات ایجاد شده در سطح فعالیت آنزیم پراکسیداز و همچنین خصوصیت های کیتیک این آنزیم با استفاده از برخی کاتیون های دو ظرفیتی، تغییرات دما و EDTA مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش ها

**مواد گیاهی:** در این پژوهش از نوساقه های درون شیشه ی پایه های رویشی پسته قزوینی و UCB-1 که قبلاً در شرایط درون شیشه در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) استقرار یافته بود (Delijam, 2013)، استفاده شد. تمام آزمایش ها بر روی هر دو پایه انجام و از آن ها یادداشت برداری شد. زیرکشت (sub-culture) ریز نمونه ها هر سه تا چهار هفته یکبار در محیط کشت GNH (Garooosi, Nezami & Haddad) (Nezami A et al. 2010) حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP، ۳ درصد ساکارز، و ۰/۵۷ درصد آگار که پس از تنظیم pH: ۵/۷ اتوکلاو شده بود، انجام شد. کشت ها در اتاق رشد تحت شرایط محیطی با دمای دو درجه سانتی گراد  $25 \pm$  و ۱۶/۸ ساعت تاریکی بر روشنایی با لامپ های فلورسنت با

سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمامی آزمایش ها مطابق روش تغییر یافته جنس و ماهی (۱۹۵۵) با استفاده از سه میلی لیتر مخلوط واکنش (۱۰۰ میلی مولار گوئیکول، ۱۰۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH:۷)، ۷۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن به همراه ۲۰ میکرو لیتر از عصاره استخراج شده) به مدت ۴ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری (UV-3200 Labomed) - UV- visible اندازه گیری شد (Chance and Maehly, 1955).

**تجزیه و تحلیل آماری:** محاسبات آماری و رسم نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزارهای Excel و SAS 9.1 انجام شد. جهت مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح  $\alpha=0.05$  استفاده شد.

### نتایج و بحث

**اثر اسکوپولتین در نوساقه زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز:** به منظور بررسی اثر اسکوپولتین روی میزان نوساقه زایی و همچنین بهبود کیفیت رشدی، این ماده در دو غلظت ۰/۰ (شاهد) و سه میلی گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش همراه با یادداشت برداری فاکتورهای رشدی مانند میزان نوساقه زایی کل و سالم، وزن تر تولیدی و رشد طولی نوساقه ها، تغییرهای فعالیت آنزیم پراکسیداز در بازه زمانی کوتاه مدت (۲۴ تا ۷۲ ساعت)، ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کشت در شرایط یاد شده بررسی شد. نتایج نشان داد که اسکوپولتین در مقایسه با تیمار شاهد موجب افزایش معنی داری در میزان نوساقه زایی کل (۴/۲ و ۲/۶) و همچنین نوساقه های سالم (بهبود کیفیت رشد: کاهش سرسوخنگی، کالوس پایه و آبکی شدن نوساقه های رشد یافته) (۴/۱۲۵ و ۲/۴۶) به ترتیب در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 شد. نتایج همچنین بیانگر نقش منفی اسکوپولتین در رشد طولی پایه رویشی قزوینی (۲/۵۳۴ سانتی متر) و عدم اختلاف معنی دار (با وجود افزایش جزئی رشد طولی) در پایه هیبرید رویشی UCB-1 بود (جدول ۱). با توجه به اثبات خاصیت آنتی اکسیدانی اسکوپولتین در مقادیر ۲/۵ تا ۱۰ میلی گرم در لیتر (Imbert and Wilson 1970)، گزارش های ارایه شده توسط دیگران در هماهنگی با نتایج این پژوهش بیانگر اثر استفاده از آنتی اکسین ها

کشت با فاصله زمانی هفت روزه انجام شد. همچنین صفت های درصد ریشه زایی، تعداد ریشه به ازای هر گیاهچه، طول ریشه های تشکیل شده و قطر تقریبی ریشه در هفته چهارم یادداشت برداری شد.

**ویژگی های کیتیک آنزیم پراکسیداز:** نمونه برداری از نوساقه های (۲۱ روزه) رشد یافته در شرایط درون شیشه برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز انجام و بلافاصله پس از افزودن ۰/۰۲ گرم پلی ونیل پیریدن (PVP) به ازای ۲۰۰ میلی گرم وزن تر، نمونه ها در داخل حاوی نیتروژن مایع و بافر استخراج (۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH:۷) و یک میلی مولار سدیم متابای سولفیت) هموژنیز شدند. عصاره به دست آمده به مدت ۲۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد با سرعت ۲۰۰۰۰ گرم سانتریفیوژ (Hermel Z36) و به دنبال آن محلول رویی حاصل جهت بررسی های آنزیمی بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان تغییرهای فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور یون های منیزیم ( $Mg^{2+}$ ) و کلسیم ( $Ca^{2+}$ ), هر دو در غلظت های (۰/۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی مولار) با استفاده از سه میلی لیتر مخلوط واکنش (محلول ۱۰۰ میلی مولار گوئیکول، ۱۰۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH:۷)، ۷۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن به همراه ۲۰ میکرو لیتر از عصاره استخراج شده) مورد پژوهش قرار گرفت. به منظور مشخص شدن دمای بهینه فعالیت آنزیم، مخلوط واکنش در دماهای ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و سپس تغییرهای فعالیت آنزیمی بررسی شد. در نهایت به منظور بررسی میزان اثر بازدارندگی EDTA روی آنزیم مورد بررسی، این ماده در مقادیر ۰/۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی مولار به کار برده شد.

**سنجش پروتئین کل:** سنجش غلظت پروتئین طبق روش بردفورد (۱۹۷۶) با استفاده از سرم آلبومین گاوی جهت رسم منحنی استاندارد صورت گرفت (Bradford, 1976). بدین منظور ۹۸۰ میکرو لیتر از محلول بردفورد ۲۰ درصد با ۲۰ میکرو لیتر از هر کدام از عصاره های استخراج شده در کیوت شیشه ای یک میلی لیتری مخلوط و غلظت پروتئین در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری (UV-3200 Labomed) - UV- visible اندازه گیری شد.

در افزایش شاخه های جانبی، کاهش رشد طولی و تغییرهای غیرقابل پیش بینی در شرایط مختلف محیطی در گیاهان چوبی و زینتی بود (Lakshmanan et al. 1997; Maleki et al. 1991; al. 2013; Roberts and Hooley. 1988).

در ارتباط با اثر اسکوپولتین روی فعالیت آنزیم پراکسیداز نکات زیر به دست آمده است: (۱) فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۲۴ ساعت بعد از کشت در شرایط کنترل (فاقد اسکوپولتین) در پایه های رویشی قزوینی و UCB-1 به ترتیب معادل ۰/۷۸۴ و ۰/۷۸۴ (واحد= U/mg protein) بود، که بعد از کاهش محسوس در مدت ۴۸ ساعت، به بیشترین مقدار در مدت ۷۲ ساعت بعد از کشت (زمان ظهور جوانه های رویشی) (۰/۵۱۱ و ۱/۰۴۸) (واحد) رسید. فعالیت آن بعد از ۱۵ روز (رشد ۱/۵ تا ۲/۰ سانتی متری نوساقه ها) کاهش معنی داری (۰/۲۳۶ و ۰/۱۸) داشت که در نهایت در اواخر دوره رشدی (۳۰ روز بعد از کشت) به ترتیب در هر دو

پایه رویشی به ۰/۵۹۲ و ۰/۵۶۹ رسید. (۲) پس از اعمال تیمار اسکوپولتین (در غلظت ۳ میلی گرم در لیتر)، فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایه رویشی قزوینی و UCB-1 الگوی متفاوت اما منظمی را نشان داد؛ به طوری که در پایه رویشی قزوینی از ۰/۲۷۶ واحد (در مدت ۲۴ ساعت بعد از کشت) به ۰/۷۰۴ واحد (اواخر دوره رشدی) و در UCB-1 از ۱/۰۷۱ به ۰/۵۷۵ واحد در مدت زمان مشابه رسید. (۳) فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور اسکوپولتین در ابتدا جوانه زنی (۷۲ ساعت بعد از کشت) در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 قابل مقایسه با هم (به ترتیب ۰/۵۰۷ و ۰/۵۱۳ واحد) و در مدت ۱۵ روز بعد از کشت، با اختلاف معنی داری بیشتر از شرایط کنترل (۰/۵۳۵ و ۰/۶۰۳ واحد) بود (جدول ۲). دلیل این اختلاف احتمال دارد وابسته به ساز و کارهای مولکولی درون سلولی در هریک از ژنوتیپ ها باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

جدول ۱- اثر اسکوپولتین روی نوساقه زایی در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1)

Table 1- Effect of scopoletin on shoot regeneration of *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks

| پایه های رویشی Rootstocks | اسکوپولتین Scopoletin (mg/L) | تعداد نوساقه کل به ازای ریزنمونه Total shoot N0. Per explants | تعداد نوساقه سالم به ازای ریزنمونه Healthy shoot N0. Per explant | وزن نوساقه کل به ازای ریزنمونه Total weight per explant (g) | وزن نوساقه سالم به ازای ریزنمونه Healthy weight per explant (g) | رشد طولی به ازای ریزنمونه (cm) |
|---------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| قزوینی                    | 0.00                         | 3.33b                                                         | 3.08b                                                            | 1.15b                                                       | 0.37a                                                           | 2.53a                          |
| Qazvini                   | 3.00                         | 4.20a                                                         | 4.13a                                                            | 1.22a                                                       | 0.46a                                                           | 1.90b                          |
| UCB-1                     | 0.00                         | 2.00b                                                         | 1.75b                                                            | 0.64a                                                       | 0.20a                                                           | 1.87a                          |
|                           | 3.00                         | 2.60a                                                         | 2.46a                                                            | 0.63a                                                       | 0.24a                                                           | 2.44a                          |

داده ها میانگین ۴ تکرار با ۴ ریز نمونه به ازای هر تیمار بوده و حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $\alpha=0.05$  با آزمون چند دامنه ای دانکن است.

Means with the different letter within a column are significantly different ( $\alpha=0.05$ ), according to Duncan's Multiple Range Test. The values indicate means of four replications with 4 cultures per treatment.

جدول ۲- اثر اسکوپولتین روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در مراحل مختلف رشدی در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1)

Table 2- Effect of scopoletin on peroxidase enzyme activity in different growth stages in *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks.

| پایه های رویشی Rootstocks | اسکوپولتین Scopoletin (mg/L) | ۲۴ ساعت 24h (U/ mg protein) | ۴۸ ساعت 48h (U/ mg protein) | ۷۲ ساعت 72h (U/ mg protein) | ۱۵ روز 15 days (U/ mg protein) | ۳۰ روز 30days (protein U/ mg) |
|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| قزوینی                    | 0.00                         | 0.767                       | 0.304                       | 1.048                       | 0.236                          | 0.592                         |
| Qazvini                   | 3.00                         | 0.276                       | 0.479                       | 0.507                       | 0.535                          | 0.704                         |
| UCB-1                     | 0.00                         | 0.748                       | 0.688                       | 1.511                       | 0.180                          | 0.569                         |
|                           | 3.00                         | 1.071                       | 0.880                       | 0.513                       | 0.603                          | 0.575                         |

داده ها میانگین ۳ تکرار هستند.

The values are given the mean of three replications.

جدول ۳- اثر منبع آهن روی ریشه زایی در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1)Table 3- Effect of iron source on rooting of *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks.

| قطر ریشه<br>Root diameter<br>(mm) | طول ریشه به ازای ریزنمونه<br>Root length per rooted<br>plantlet (cm) | تعداد ریشه به ازای گیاهچه ریشه دار شده<br>Root N0. Per rooted plantlet | درصد ریشه زایی<br>Rooting<br>percentage | منبع آهن<br>Iron source | پایه های رویشی<br>Rootstocks |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 0.70b                             | 0.81a                                                                | 1.75b                                                                  | 31.25b                                  | Fe-EDTA*                | قزوینی                       |
| 1.70a                             | 1.20a                                                                | 6.00a                                                                  | 62.50a                                  | FeEDDHA**               | Qazvini                      |
| 0.79a                             | 1.49a                                                                | 2.10b                                                                  | 62.50b                                  | Fe-EDTA                 | UCB-1                        |
| 1.00a                             | 1.60a                                                                | 4.70a                                                                  | 75.00a                                  | Fe-EDDHA                |                              |

Fe-EDTA\* mg/L= 27/8 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O +mg/L 37/3 Na<sub>2</sub>EDTA \*\*, Fe-EDDHA =mg/L 187\*Fe-EDTA= 27.8 mg/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O +Na<sub>2</sub>EDTA, \*\*FEEDDHA=187 mg/Lداده ها میانگین ۴ تکرار با ۵ ریزنمونه بازی هر تیمار بوده و حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح  $\alpha=0.05$  با آزمون چند دامنه ای دانکن است.Means with the different letter within a are significantly different ( $\alpha=0.05$ ), according to Duncan's Multiple Range Test. The values indicate means of four replications with 5 cultures per treatment.

EDDHA به جای Fe-MS، به عنوان منبع آهن در هر دو پایه رویشی پسته، افزایش معنی داری یافت به طوری که درصد ریشه زایی در پایه رویشی قزوینی از ۳۱/۲۵ به ۶۲/۵ درصد و در پایه هیبرید رویشی UCB-1 از ۶۲/۵ به ۷۵/۰ رسید (جدول ۳). اثر دوچندان Fe-EDDHA نسبت به Fe-EDTA روی افزایش راندمان ریشه زایی در سایر درختان میوه از جمله هسته داران (Molassiotis et al. 2003, Antonopoulou et al. 2007) تایید کننده نتایج این پژوهش است. به عنوان مثال، افزودن ۱۸۷ میلی گرم در لیتر Fe-EDDHA به محیط کشت ریشه زایی پایه هیبرید رویشی هلو و بادام (GF677) راندمان ریشه زایی را در این گیاه از ۳۰ درصد به ۱۰۰ درصد افزایش داد (Antonopoulou et al. 2007) یکی از دلایل محتمل در دیده شدن اثر بارز Fe-EDDHA روی افزایش میزان ریشه زایی دخالت در مسیرهای آنزیمی درگیر در این فرآیند است.

بر اساس نتایج جدول چهارم، بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله ریشه زایی نشان می دهد که در حالت کلی فعالیت پراکسیدازی پایه هیبرید رویشی UCB-1 بیش از دو برابر قزوینی است، به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم در این پایه هیبرید رویشی در حضور Fe-EDTA در هفته چهارم ۷/۶۱۲ واحد و در شرایط استفاده از Fe-EDDHA در هفته سوم ۷/۱۳۳ واحد بوده و این میزان در پایه رویشی قزوینی در هفته چهارم در حضور Fe-EDTA ۳/۵۴ و در حضور Fe-EDDHA در هفته سوم ۳/۸۳ واحد بود.

اثر منبع آهن روی ریشه زایی پسته و فعالیت آنزیم پراکسیداز: نوساقه های تکثیر شده در محیط کشت نوساقه زایی (به طول ۱/۵ تا ۲/۰ سانتی متر) بعد از اعمال تیمار اکسین NAA با غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام به شیوه پالسینگ به مدت ۱۰ دقیقه به محیط کشت های GNH حاوی آهن MS (Fe-EDTA) و Fe-EDDHA با غلظت ۱۸۷ میلی گرم در لیتر منتقل و راندمان ریشه زایی همراه با تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل کالوس در نوساقه های تیمار شده پس از دو هفته از شروع آزمایش دیده شده و ریشه های تشکیل شده در هفته سوم و چهارم قابل مشاهده بودند (داده ها نشان داده نشده اند).

نتایج جدول سه نشان می دهد که نوع آهن مورد استفاده اثر معنی داری در افزایش فاکتورهای ریشه زایی مانند درصد ریشه زایی، تعداد و طول ریشه تشکیل شده به ازای گیاهچه داشت به طوری که استفاده از Fe-EDDHA در پایه های رویشی قزوینی و UCB-1 به ترتیب منجر به ۶۲/۵ و ۷۵ (درصد ریشه زایی)، ۶/۰ و ۴/۷۰ (تعداد ریشه به ازای هر نوساقه Fe-EDDHA) و ۱/۲۰ و ۱/۶۰ سانتی متر (طول ریشه به ازای گیاهچه) شد که اختلاف معنی داری در سطح  $\alpha=0.05$  با شرایط کنترل (آهن MS) داشت. بر اساس برخی گزارش ها، Fe-EDTA محیط کشت MS به دلیل رسوب و به دنبال آن کمبود آهن برای استفاده گیاه و همچنین تولید ترکیب های سمی، رشد گیاه را با محدودیت مواجه ساخته است (Hangarter and Stasinopoulos, Dalton et al. 1983)؛ (1991). در این پژوهش راندمان ریشه زایی با استفاده از Fe-



جدول ۴- اثر منبع آهن روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در مرحله ریشه زایی در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1)

**Table 4-**Effect of iron source on peroxidase enzyme activity in rooting phase in *Pistachia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks.

| پایه های رویشی<br>Rootstocks | منبع آهن<br>Iron Source | هفته دوم<br>week 2nd<br>(U/ mg protein) | هفته سوم<br>week 3rd<br>(U/ mg protein) | هفته چهارم<br>week 4th<br>(U/ mg protein) | هفته پنجم<br>week 5th<br>(U/ mg protein) |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| قزوینی                       | Fe-EDTA                 | 3.97                                    | 2.61                                    | 3.54                                      | 2.76                                     |
| Qazvini                      | FeEDDHA**               | 2.48                                    | 2.63                                    | 3.83                                      | 3.09                                     |
| UCB-1                        | Fe-EDTA                 | 5.30                                    | 4.86                                    | 7.61                                      | 6.94                                     |
|                              | FeEDDHA**               | 5.27                                    | 7.13                                    | 4.66                                      | 3.43                                     |

Fe-EDTA\* mg/L= 27/8 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O +mg/L 37/3 Na<sub>2</sub>EDTA \*\*, Fe-EDDHA =mg/L 187

داده ها میانگین ۳ تکرار است.

\*Fe-EDTA= 27.8 mg/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O +Na<sub>2</sub>EDTA, \*\*FeEDDHA=187 mg/L

The values are given the mean of three replications.

در فعالیت آنزیم نسبت به یون منیزیم فعالیت آن را به ترتیب به ۲/۰۳ و ۱/۶۰ واحد در پایه های رویشی افزایش داد (شکل 1-B). استفاده از EDTA در هر دو پایه رویشی مورد پژوهش باعث کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد، به طوری که استفاده از ۵۰ میلی مولار EDTA فعالیت آنزیمی را در پایه رویشی قزوینی به ۰/۳۷۲ و در UCB-1 به ۰/۱۶۶ واحد تقلیل داد (شکل 1-C). نتایج به دست آمده از اثر دماهای مختلف روی فعالیت آنزیم پراکسیداز بیانگر بیشترین فعالیت آن (۱/۳۱۵ و ۰/۷۷۸) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد (دما بهینه) در هر دو پایه رویشی قزوینی و UCB-1 بود (شکل 1-D). از آن جاکه آنزیم پراکسیداز به عنوان یکی از آنزیم های پایدار در دماهای بالا شناخته می شود (Burnette, 1977) در تایید گزارش ما، نتایج ارایه شده توسط دیگران، در بیشتر گونه های گیاهی از قبیل *Solanacea*، *Crucifera* و درختان میوه، نیز فعالیت بهینه این آنزیم را بین ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد بیان داشتند (Bania and Mahanta, 2012; Rehman et al. 1999; Guida et al. 2011).

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که (۱) اسکوپولتین احتمال دارد با کنترل میزان اکسین داخل سلولی و اکسین اضافه شده به محیط کشت موجب افزایش میزان نوساقه زایی می شود. (۲) بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در شاهد نشان داد که فعالیت آن در دوره های زمانی مختلف رشد دارای نوسان است؛ به طوری که، در ابتدای جوانه زنی (۷۲-۲۴ ساعت بعد از کشت ریزنمونه) به حداکثر میزان و در پایان دوره ۱۵ روزه فعالیت به حداقل ممکن، و دوباره فعالیت آن تا پایان دوره ۳۰ روز پس از کشت رو به فرونی گذاشت. در حالی که در حضور اسکوپولتین تغییرهای

با توجه به این که آنزیم پراکسیداز به عنوان یک نشانگر پیش بینی کننده (Predictive marker) در برخی گیاهان محسوب می شود (McDonald and Wynne. 2003, Gaspar et al. 1992) بنا براین، با توجه به مشاهده درصد بالای ریشه زایی، همراه با فعالیت بالای آنزیم پراکسیداز در پایه هیبرید رویشی UCB-1 نسبت به پایه رویشی قزوینی و وجود ارتباط مستقیم بین این دو پدیده فیزیولوژیکی در این پژوهش، احتمال دارد فعالیت این آنزیم می تواند به عنوان نشانگر مولکولی مناسبی در سایر ارقام و پایه های رویشی پسته (*Pistacia vera*) قابل بررسی باشد.

**خصوصیات کیتیک آنزیم پراکسیداز:** بررسی های کیتیک آنزیم پراکسیداز با استفاده از نوساقه های ۲۱ روزه رشد یافته در شرایط درون شیشه انجام شد. بدین منظور اثر یون های کلسیم و منیزیم (در غلظت های ۰/۰ تا ۵۰ میلی مولار)، دما (۲۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد) و همچنین EDTA به عنوان بازدارنده فعالیت این آنزیم (در مقادیر ۰/۰ تا ۵۰ میلی مولار) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج شکل یک، فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمامی موارد مورد پژوهش در پایه رویشی قزوینی اختلاف معنی داری با پایه هیبرید رویشی UCB-1 داشت.

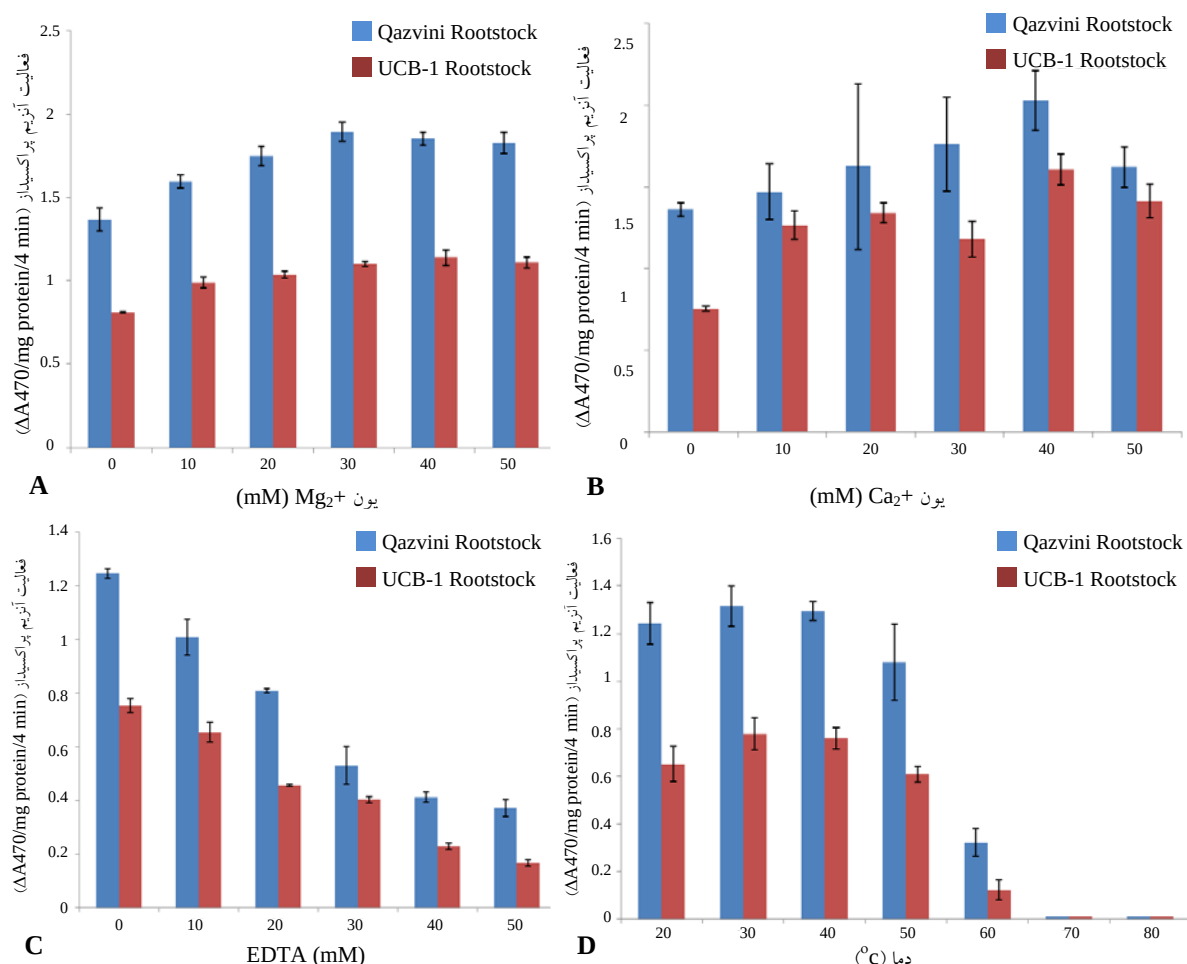
نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایه رویشی قزوینی ۱/۸۹۲ و در UCB-1 ۱/۱۳۹ واحد، به ترتیب در حضور ۳۰ و ۴۰ میلی مولار یون منیزیم حاصل شد (شکل 1A) و نتایج ارایه شده در پژوهشی در ارتباط با اثر کاتیون های دوفرفیتی در افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز (*Phytolacca dioica* Ombu tree) نیز تایید کننده این موضوع است (Guida et al. 2011). در حالی که استفاده از ۴۰ میلی مولار از یون کلسیم با افزایش معنی دار

سانتی گراد فعالیت آنزیم را به بیشترین میزان رساندند درحالی که اثر بازدارندگی EDTA روی فعالیت آنزیم محرز بود.

### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انجام شد که بدین وسیله نویسندگان قدردانی خود را اعلام می کنم.

آنزیم پراکسیداز با یک روند منظم کاهش (در UCB-1) یا افزایش (در قزوینی) همراه بود. (۳) استفاده از Fe-EDDHA به جای Fe-EDTA راندمان ریشه زایی را در پایه های رویشی مورد پژوهش تا دو برابر افزایش داد. (۴) نتایج بیانگر بالابودن فعالیت آنزیم پراکسیداز و همچنین میزان ریشه زایی در پایه هیبرید رویشی UCB-1 نسبت به پایه رویشی قزوینی بود. بنابراین به نظر می رسد که بتوان فعالیت این آنزیم را به عنوان یک نشانگر پیش بینی کننده در *Pistacia vera* معرفی کرد. (۵) افزودن کاتیون های منیزیم و کلسیم در مقادیر ۳۰-۴۰ میلی مولار (وابسته به نوع پایه رویشی) به محیط کشت و تیمار دمای ۳۰ درجه



شکل ۱- اثر کاتیون های دوظرفیتی  $Mg^{2+}$  (A)،  $Ca^{2+}$  (B)، دما (C) و EDTA (D) روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در *Pistacia vera* (پایه های رویشی قزوینی و UCB-1). داده ها با میانگین ۳ تکرار  $\pm$  معیار اشتباه هستند.

**Figure 1-** Effect of divalent cations  $Mg^{2+}$  (A),  $Ca^{2+}$  (B), temperature (C), and EDTA (D) on peroxidase enzyme activity in *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks. The values are mean  $\pm$  Standard error (n=3)

## منابع

- Abousalim A and Mantell SH. 1994.** A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in in vitro shoot cultures of *Pistacia vera* cv. Mateur. *Journal of horticultural science* 69: 357-366.
- Antonopoulou C, Dimassi K, Therios I, Chatzissavvidis C and Papadakis I. 2007.** The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on in vitro rooting of the peach rootstock GF-677 explants. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 559-561.
- Bairu MW, Stirk WA and Van Staden J. 2009.** Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 98: 239-248.
- Bania I and Mahanta R. 2012.** Evaluation of peroxidases from various plant species. *International journal of scientific and research publications* 2: 1-5.
- Benson E. 2000.** Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*: 163-170.
- Bond S. 1991.** Control of rhizome growth in *Alstroemeria*, University of Nottingham.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- Brill AS. 1966.** Peroxidases and catalase. *Comprehensive biochemistry* 14: 9.
- Burnette FS. 1977.** Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *Journal of Food Science* 42: 1-6.
- Campa A. 1991.** Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. *Peroxidases in chemistry and biology* 2: 25-50.
- Cassells AC. 1979.** The Effect of 2, 3,5 Triiodobenzoic Acids on Caulogenesis in Callus Cultures of Tomato and Pelargonium. *Physiologia Plantarum* 46: 159-164.
- Chance B, and Maehly AC. 1955.** [136] Assay of catalases and peroxidases. *Methods in enzymology* 2: 764-775.
- Crane JC and Iwakiri BT. 1985.** Vegetative and reproduction apical dominance in pistachio. *HortScience* 20: 1092-1093.
- Dalton C, Iqbal K and Turner D. 1983.** Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiologia Plantarum* 57: 472-476.
- Delijam MA. 2013.** In vitro micropropagation of Pistachio (*Pistacia vera*, cv. Qazvini). *Agricultural Biotechnology*, Imam Khomeini International University (IKIU) (In Farsi with English abstract).
- Dolcet-Sanjuan R and Claveria E. 1995.** Improved shoot-tip micropropagation of *Pistacia vera* L. and the beneficial effects of methyl jasmonate. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 938-942.
- Dunlap JR and Robacker KM. 1988.** Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture media. *Plant physiology* 88: 379-382.
- Frenkel C and Hess CE. 1974.** Isozymic changes in relation to root initiation in mung bean. *Canadian Journal of Botany* 52: 295-297.
- Gaspar Th, Kevers C, Hausman JF, Berthon JY and Ripetti V. 1992.** Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie* 12: 757-765.
- Guida V, Tamburino R and Parente A. 2011.** Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 44: 64-69.
- Gupta S and Datta S. 2003.** Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biologia plantarum* 47: 179-183.
- Hangarter R and Stasinopoulos T. 1991.** Effect of Fe-catalyzed photooxidation of EDTA on root growth in plant culture media. *Plant physiology* 96: 843-847.
- Imbert MP and Wilson LA. 1970.** Stimulatory and inhibitory effects of scopoletin on IAA oxidase preparations from sweet potato. *Phytochemistry* 9: 1787-1794.
- Jackson P, Galinha C, Pereira C, Fortunato A, Soares N, Amâncio S, and Ricardo C. 2001.** Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant physiology* 127: 1065-1076.
- Jain SM and Häggman H. 2007.** *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*: Springer.
- Jelaska S, Rengel Z, and Cesar V. 1984.** Plant regeneration from mesocotyl callus of *Hordeum vulgare* L. *Plant Cell Reports* 3: 125-129.
- Küden AB, Kaska N, Tanriver E, Tekin H, and Ak BE. 1994.** Determining the chilling requirements and growing degree hours of some pistachio nut cultivars and regions. In *Determining the chilling requirements and growing degree hours of some pistachio nut cultivars and regions*, I International Symposium on Pistachio 419, 85-90.
- Lakshmanan P, Lee C and Goh C. 1997.** An efficient in vitro method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L. *Plant Cell Reports* 16: 572-577.
- Libik M, Konieczny R, Pater B, Ślesak I and Miszalski Z. 2005.** Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant Cell Reports* 23: 834-841.
- Maleki S, Garoosi GA, Haddad R, and Nezami AE. 2013.** A step towards providing micropropagation protocol in *Pistacia vera* cv. Qazvin: with emphasis on the effect of scopoletin. In: *Proceeding of 1st National conference on the latest scientific research and Pistachios*. Iran, TorbatHeidarrieh University (In Farsi with English abstract).
- Malik A, Kushnoor A, Saini V, Singhal S, Kumar S,**

- and Yadav Y. 2011.** In vitro antioxidant properties of Scopoletin. Journal of chemical pharmaceutical research 3: 659-665.
- McDonald M and Wynne J. 2003.** Adventitious root formation in woody tissue: Peroxidase—A predictive marker of root induction in *Betula pendula*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 39: 234-235.
- Mohammadi AH, Banihashemi Z, and Maftoun M. 2007.** Interaction between salinity stress and Verticillium wilt disease in three pistachio rootstocks in a calcareous soil. Journal of plant nutrition 30: 241-252.
- Molassiotis AN, Dimassi K, Therios I and Diamantidis G. 2003.** Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) explants in vitro. Biologia Plantarum 47: 141-144.
- Morgan DP, Epstein L and Ferguson L. 1992.** Verticillium wilt resistance in pistachio rootstock cultivars: assays and an assessment of two interspecific hybrids. Plant disease 76: 310-313.
- Murashige T and Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Nezami AE, Garoosi GA, and Haddad R. 2010.** The effect of PGRs on in vitro shoot multiplication of GF677 hybrid (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) rootstock on GNH medium. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 1.
- Onay A. 2000.** Micropropagation of pistachio from mature trees. Plant cell, tissue and organ culture 60: 159-163.
- Padmarajaiah N, Anantharaman S and Ashwinee K. 2009.** Development and Evaluation of Kinetic Spectrophotometric Assays for Horseradish Peroxidase by Catalytic Coupling of Paraphenylenediamine and Mequinol. Analytical Sciences 25: 1243-1248.
- Rashid A and Street HE. 1973.** The development of haploid embryoids from anther cultures of *Atropa belladonna* L. Planta 113: 263-270.
- Rehman K, Yaqub M, Sheikh M and Arshad M. 1999.** Extraction and evaluation of peroxidases from various vegetable sources. Int. J. Agri. Biol 1: 170-173.
- Roberts J and Hooley R. 1988.** Plant growth regulators: Blackie and Son Ltd.
- Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizadeh H and Lamport D. 1996.** Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val—Tyr—Lys as putative intermolecular cross link site. The Plant Journal 9: 477-489.
- Singh M and Kirkoran AD. 1980.** Chelated iron in culture media. Annals of Botany 46: 807-809.
- Singh S and Syamal M. 2000.** Anti-auxin enhances *Rosa hybrida* L. micropropagation. Biologia plantarum 43: 279-281.
- Tang W and Newton R. 2005.** Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Plant Physiology and Biochemistry 43: 760-769.
- Vatankhah E, Niknam V and Ebrahimzadeh H. 2010.** Activity of antioxidant enzyme during in vitro organogenesis in *Crocus sativus*. Biologia plantarum 54: 509-514.

# فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (Cm APX) و میزان بیان ژن کد کننده آن تحت تنش شوری در توده‌های خربزه (*Cucumis melo L.*)

## بومی سیستان

### The activity of ascorbate peroxidase (Cm APX) enzyme and expression level of it's encoding gene in salt stress condition in three Sistan melon Landraces (*Cucumis malo L.*)

سمیه منتظری نژاد<sup>۱\*</sup>، محمود سلوکی<sup>۲</sup> و براتعلی فاخری<sup>۲</sup>  
Somayeh Montazerinezhad<sup>1\*</sup>, Mahmood Solouki<sup>2</sup> and Barat Ali Fakheri<sup>2</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه زابل

۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه زابل

1- M.Sc graduate student, Agricultural Biotechnology, University of Zabol.

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology,  
University of Zabol.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: montazerinezhad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱)

## چکیده

شوری از جمله عوامل نامساعد محیطی است که رشد و عملکرد گیاهان زراعی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تنش‌ها باعث بروز دامنه وسیعی از واکنش‌ها در گیاهان، از تغییر بیان ژن و متابولیسم سلول تا تغییر در سرعت رشد و عملکرد می‌شوند. در این پژوهش به منظور بررسی میزان بیان ژن Cm APX و تغییرات آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز (APX) در سه توده خربزه بومی سیستان، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده و تنش شوری (۲۵۰ و ۳۵۰ میلی مولار NaCl) اجرا شد. پس از آن پاسخ آنزیمی و بیان نسبی ژن آسکوربات پراکسیداز (Cm APX) با استفاده از روش Real Time PCR در سه توده خربزه قندک، سفیدک و سفیدک خط دار انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، در سطح شوری ۲۵۰ mM بیان ژن Cm APX در هر سه توده نسبت به نمونه کنترل افزایش نشان داد اما این افزایش بیان در توده قندک و سفیدک در سطح پنج درصد معنی دار شد. در سطح شوری ۳۵۰ mM بیان ژن Cm APX در هر سه توده مورد بررسی کاهش یافت. در این سطح شوری، بیان ژن Cm APX در توده سفیدک خط دار به صورت معنی داری نسبت به نمونه کنترل در سطح پنج درصد کاهش نشان داد. افزایش بیشتر فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز در کنار بیان پایدارتر و بیشتر ژن (Cm APX) در توده قندک نشان داد که این توده بهتر توانست تنش شوری را تحمل نماید و کاهش بیان این ژن در توده سفیدک خط دار به همراه کاهش فعالیت آنزیمی آن نشان‌دهنده حساسیت این توده به شرایط تنش شوری است. پیشنهاد می‌شود که دیگر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین ارتباط آنها با هم در توده‌های خربزه بومی سیستان مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی:

بیان ژن

تنش شوری

خربزه

ژن Cm APX

Real Time-PCR

مقدمه

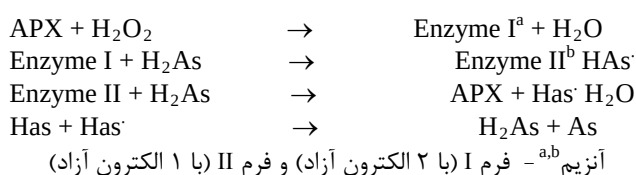
خربزه (*Cucumis melon* L.) یکی از محصولات مهمی است که اغلب در خاک خشک و نیمه خشک کشت می شود و به عنوان یک گیاه با تحمل متوسط نسبت به شوری شناخته شده است (Yasar et al, 2006). گیاهان دامنه وسیعی از شرایط نامساعد محیطی به خصوص تنش شوری، کمبود آب مورد نیاز، کاهش و افزایش دما را در طی دوران زندگیشان تحمل می کنند و تعدادی از پاسخ ها که شامل سازگاری متابولیکی برای مقابله با این شرایط است، ارائه می دهند (Bohnert et al, 1995; Bressan et al, 2009; Hasanuzzaman et al, 2012; Kosova et al, 2013). شوری در خاک یا آب یکی از تنش های اصلی در مناطق خشک و نیمه خشک است که می تواند رشد و محصول گیاه را به شدت محدود کند (Koca et al, 2007; Allakhverdiev et al, 2000; Ghorbanli et al, 2012). شواهد نشان می دهد که تنش شوری باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان مختلف و از جمله تولید دو نوع رایکال آزاد [سوپراکسید ( $O_2^-$ )، هیدروکسیل (OH)، پرهیدروکسی ( $HO_2$ ) و رادیکالهای آلوکسی (RO)] و مولکول های غیر رادیکالی شامل [پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، اکسیژن واحد ( $O_2$ )] می شود (Gill and Tuteja, 2010) که می توانند مولکول های بزرگی مانند کربوهیدرات، چربی ها، اسیدهای نوکلئیک و ساختار غشا را تخریب کنند (Bian and Jiang, 2009; Sharma et al, 2012). برای زنده ماندن در چنین شرایطی گیاهان سازوکارهای دفاعی خاصی را گسترش می دهند و فرآیندهایی برای سازگاری جهت افزایش تحمل شان به شرایط نامساعد را ایجاد می کنند (Xu et al, 2008; Mirzaee et al, 2013).

دامنه وسیعی از آنزیم های آنتی اکسیدان در انواع ترکیبات سلولی مربوط به گیاهان مختلف شناسایی شده است (Asada, 1992; Jimenez et al, 2001; Gill and Tuteja, 2010). سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، مونودئیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، دئیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR)، و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) به عنوان قسمتی از سامانه آنتی اکسیدانی می تواند سلول را

در مقابل گونه های فعال اکسیژن (ROS) حفظ کند (Asada, 1994; Gill and Tuteja, 2010).

سلول های گیاهی برای مقابله با ROS تولید شده تحت شرایط تنش با دو استراتژی اصلی یعنی کاهش ROS در کل ساختار ساختمان گیاه و همچنین سازگاری فیزیولوژیکی با ROS مقابله می کنند (Mittler, 2004). آسکوربات پراکسیدازها یک نقش کلیدی در پاکسازی ROS و حفاظت سلول ها در مقابل اثرهای مخرب آن در جلبک و گیاهان عالی دارند (Mishra and Jhe, 2011).

پژوهش های بسیاری در ذرت (Molazem and Azimi, 2011) و گندم (Esfandiari et al, 2007) نشان می دهد که فعال شدن آنزیم های آنتی اکسیدان برای تحمل به تنش های غیرزنده مانند پاسخ به تنش شوری وابسته است (Mirzaee et al, 2013). دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز از مهمترین آنتی-اکسیدان ها هستند که باعث شکسته شدن  $H_2O_2$  به آب و مولکول اکسیژن می شوند (Yong et al, 2008). در کلروپلاست، آسکوربات پراکسیداز  $H_2O_2$  تولید شده را از طریق چرخه آسکوربات-گلوکاتایون سم زدایی می کند (Asada, 1992). واکنش آسکوربات پراکسیداز با  $H_2O_2$  به شرح زیر است (Dabrowska et al, 2007):



در حقیقت APX با قدرت چسبندگی زیادی که با  $H_2O_2$  دارد می تواند در رفع مسمومیت به گیاه کمک کند. درحالی که دیگر آنزیم های آنتی اکسیدان می توانند سرعت این واکنش را بالا ببرند اما قدرت چسبندگی کمی با  $H_2O_2$  دارد و نمی تواند به خوبی آن را مهار کند. آنزیم APX مانند یک سیگنال مولکولی می تواند پراکسید هیدروژن را تنظیم کند (Panchuk et al, 2005). آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش مهمی در فعالیت روزنه ها از طریق

سه تکرار و سه توده خربزه بومی سیستان (سفیدک، قندک و سفیدک خط دار) و سه سطح شوری (صفر، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی مولار NaCl) در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل اجرا شد. هنگامی که دومین برگ ظاهر شد، به گیاهان شاهد فقط محلول هوگلند (Hogland and Arnon, 1950) اضافه شد. برای اعمال تنش در مورد گیاهان تحت تنش، از محلول با سطح شوری مورد نظر برای آبیاری گیاهان استفاده شد؛ این کار به مدت سه روز و به تدریج جهت سازگار شدن گیاهان انجام گرفت و سپس دومین برگ برداشت شد و در دمای  $8^{\circ}\text{C}$  تا زمان استخراج نگهداری شد.

**جداسازی آر.ان.ای و ساخت cDNA:** استخراج آر.ان.ای کل توسط کیت CinnaPure RNA شرکت کیاژن انجام شد. کیفیت آر.ان.ای استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شد. تشکیل دو باند آر.ان.ای ریبوزومی 28s و 18s در روی ژل نشان دهنده کیفیت بالای آر.ان.ای تخلیص شده بود. برای بررسی کمی میزان استخراج، از اسپکتوفتومتر استفاده شد. مقدار جذب نوری در طول موج های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد و درصد خلوص آن محاسبه شد. نسبت بدست آمده برای طول موج ۲۶۰/۲۸۰ در این آزمایش در محدوده ۱/۸ تا ۲ بود که نشان دهنده خلوص قابل قبول آر.ان.ای بود. تیوب ها برای نگهداری در دمای  $8^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد قرار داده شدند. برای از بین بردن دی.ان.ای ژنومی از DNase شرکت سیناژن استفاده شد. دومین مرحله بعد از استخراج آر.ان.ای، سنتز cDNA از روی آن جهت انجام مراحل بعدی است. این واکنش با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR (شرکت Vivantis، کشور اسپانیا) انجام گرفت. در ساخت cDNA از ۱۰۰۰ نانوگرم آر.ان.ای در همه نمونه ها استفاده شد.

**انجام روش QRT-PCR:** در این تحقیق از دستگاه Real Time-PCR Set Corbett (3000) و کیت Hot Tag EvaGreen qPCR master mix (ROX) شرکت سیناژن برای ارزیابی کمی بیان ژن APX استفاده شد.

تنظیم غلظت  $\text{H}_2\text{O}_2$  در سلول گیاهان تحت تنش شوری دارند، چرا که غلظت این ترکیب به عنوان یکی از سیگنال های مهم در به حرکت درآوردن سلول های محافظ روزنه عمل می کند (Chen and Gallie, 2004).

APX در پاسخ به تعدادی از تنش های محیطی از قبیل شوری، خشکی، شدت طول موج های بلند، سرما، کمبود عناصر میکرو، تنش آهن، نور بیش از اندازه، اشعه UV و هوای آلوده فعال می شود (Bonifacio et al, 2011; Tewari et al, 2013; Wang et al, 2013).

با توجه به پیشرفت های گذشته، متأسفانه هنوز سازوکارهای مولکولی و بیوشیمیایی دخیل در تحمل به شوری اغلب ناشناخته باقی مانده اند. بنابراین نیاز به دستیابی اطلاعات کافی در زمینه اساس مولکولی و ژنتیکی مقاومت به تنش ها است (Bauer et al, 1993). این اطلاعات استراژی های مناسبی را جهت دستکاری گیاهان و اصلاح آنها با استفاده از روش های مولکولی و اصلاح نباتات سنتی ایجاد خواهند کرد (Razavi et al, 2001).

اگرچه افزایش و یا کاهش تعداد رونوشت های یک ژن دلیل بر نقش کلیدی آن در واکنش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نمی باشد، اما جستجو برای این گونه ژن ها راهی است که می توان در جهت شناسایی و جداسازی ژن های پاسخ دهنده به تنش ها بکار برد (Lievens et al, 2001).

هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن Cm APX در سه توده خربزه بومی سیستان با استفاده از روش Real Time-PCR و همچنین فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان آسکوربات پراکسیداز APX و ارتباط آنها با هم تحت تنش شوری است.

### مواد و روش ها

**مواد گیاهی و تیمارهای تنش:** ابتدا بذرها با محلول هیپوکلرید سدیم ۱ درصد ضد عفونی و در آب مقطر با دمای  $25^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس در گلدان های پلاستیکی که حاوی ماسه کاملاً شسته با آب مقطر بود کشت شد و تا ظهور دومین برگ به نحوی که خروج اولین قطرات آب از ته گلدان مشاهده شود، آبیاری شد. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش های Real Time PCR

Table 1- sequence of the primers used in Real Time PCR reactions

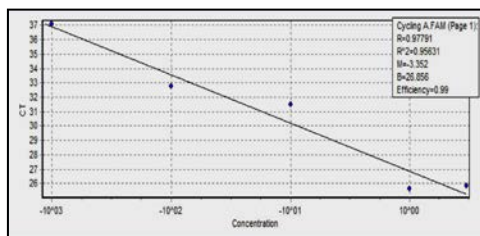
| Gene     | Forward Primer         | Reverse Primer           |
|----------|------------------------|--------------------------|
| Cm APX   | TCAGCAAAAAAAGCATCCTC   | ACTACCAACCCTCTCATC       |
| 18s rRNA | GGACAGGATTGACAGATTGATA | CTCGTTCGTTATCGGAATTAATTA |

شد. جهت تجزیه داده ها از نرم افزار REST (Pfaffel et al, 2002) استفاده شد.

**استخراج عصاره آنزیمی و فعالیت سنجی آسکوربات پراکسیداز:** ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ وزن شد و سپس چهار سی سی سی بافر Ice - cold extraction به آن اضافه و در هاون سرد کاملاً ساییده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۶۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس فاز بالایی محلول سانتریفوژ شده به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد (Azevedo Neto et al, 2006). در نهایت میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) به کمک روش (Nakano and Asada, 1981) سنجیده شد.

### نتایج

منحنی استاندارد ژن مرجع با استفاده از رقت های ترتیبی ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ نانوگرم در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به منحنی استاندارد ژن مرجع 18s rRNA و منحنی استاندارد ژن مورد پژوهش، بازده واکنش برای ژن 18s rRNA و محاسبه شد که برای ژن 18s rRNA برابر با ۰/۹۹ و میزان  $R_2$  برابر ۰/۹۵، و برای ژن Cm APX برابر با ۰/۹۴ و میزان  $R_2$  برابر ۰/۹۸ به دست آمد.



شکل ۱- منحنی استاندارد ژن Cm APX، محور افقی: لگاریتم

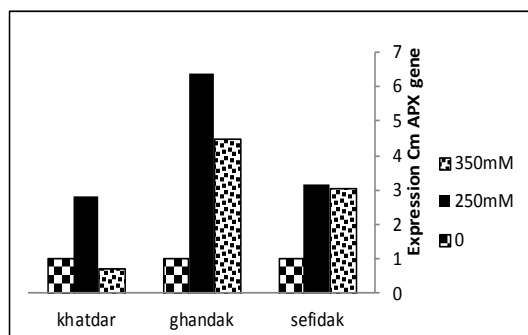
غلظت cDNA- محور عمودی: سیکل آستانه (Ct)

Figure 1- Standard curve Cm APX gene, horizontal axis: logarithm cDNA concentration- vertical axis: Cycle Threshold (Ct).

برای انجام واکنش Real Time-PCR ابتدا توالی mRNA ژن Cm APX را از سایت NCBI ذخیره نموده و سپس با توجه به آن توالی آغازگرهای مورد نظر طراحی شد. آغازگرها توسط نرم افزارهای AlleID7 و CLC Main Workbench 5 و نرم افزارهای آنلاین مانند Primer3 از نظر محل اتصال و ویژگی های مطلوب مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت، همچنین توسط NCBI Blast از یکتا بودن بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل شد. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول، چهار میکرولیتر Master mix، یک میکرولیتر نمونه cDNA و تا حجم ۲۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل استفاده شد. برای هر واکنش سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش پلیت مورد نظر به دستگاه منتقل شد. این واکنش با شرایط دمایی ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (فعالسازی ابتدایی آنزیم) و ۴۰ تکرار با چرخه های ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (واسرشت شدن)، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد (دمای  $T_m$  آغازگر)، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (بسط ترکیبی) و افزایش دما از ۵۰ درجه تا ۹۹ درجه هر ثانیه یک درجه (منحنی ذوب) انجام شد. در ارزیابی الگوی بیان ژن ها از دو روش ارزیابی مطلق و ارزیابی نسبی می توان استفاده نمود. از آنجایی که ژن مرجع 18s rRNA نسبت به GAPDH و بتا اکتین ثبات بیشتری را از نظر بیان نشان می دهد ژن قابل اطمینان تری جهت انتخاب به عنوان کنترل داخلی و انجام نرمال سازی محسوب می شود (Tsuji et al., 2002). و به عنوان استاندارد داخلی برای نرمال کردن در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). در این پژوهش بیان نسبی ژن ها با روش pfaffel محاسبه شد (Pfaffel, 2007). به این صورت که هر تیمار با گیاهان شاهد (کنترل) مربوط به توده مورد نظر مقایسه



پس از به دست آوردن Ct هر دو ژن 18srRNA و Cm APX برای تمام نمونه‌ها، تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار REST 2009 انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، در سطح شوری mM ۲۵۰ بیان ژن Cm APX در هر سه توده خربزه (قندک، سفیدک، سفیدک خط دار) نسبت به نمونه کنترل افزایش نشان داد اما این افزایش بیان فقط در توده قندک و سفیدک در سطح ۵ درصد معنی دار شد. در سطح شوری mM ۲۵۰ افزایش بیان ژن Cm APX در توده سفیدک به بالاترین حد رسید و با افزایش شوری تا سطح mM ۳۵۰، بیان آن کاهش یافت. بیان ژن Cm APX در توده قندک در سطح شوری mM ۲۵۰ نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی داری در سطح پنج درصد نشان داد؛ اما در سطح شوری mM ۳۵۰ میلی مولار کاهش یافت. در توده سفیدک خط دار، افزایش بیان ژن Cm APX در سطح شوری mM ۲۵۰ در سطح پنج درصد معنی دار نبود. اما در سطح شوری mM ۳۵۰، بیان ژن Cm APX به صورت معنی داری نسبت به نمونه کنترل در سطح ۵ درصد کاهش یافت (شکل ۳، جدول ۲).

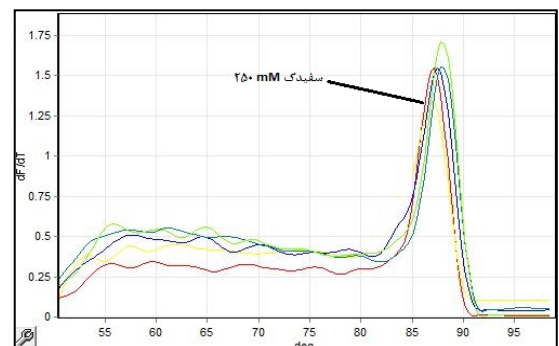


شکل ۳- بیان ژن Cm APX در سه توده خربزه بومی سیستان (سفیدک، قندک و سفیدک خط دار) تحت تیمار با تنش شوری  
Figure 3- Cm APX gene expression in three Sistan melon Landrace (Sefidak, Ghandak and Sefidak Khatdar) treated with salt stress.

در بسیاری موارد تجمع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پی تجمع رونوشت ژن رخ می‌دهد. به همین منظور به بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز که در بخش قبل میزان بیان آن بررسی شد پرداخته شد. نتایج تجزیه آماری داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که

الکتروفورز فرآورده واکنش پی.سی.آر در ژل آگارز نشان دهنده تکثیر باند اختصاصی در واکنش بود. سپس واکنش Real Time PCR، طبق چرخه دمایی بیان شده در قسمت مواد و روش‌ها انجام شد.

**بیان نسبی ژن Cm APX:** برای هر دو ژن Cm APX و 18s rRNA عمل تکثیر صورت گرفت و سپس منحنی تغییرهای فلورسانس بر حسب دما نیز با استفاده از نرم افزار دستگاه Real Time PCR SetCorbett (3000) رسم شد، کاهش ناگهانی شدت نور فلورسانس برای ژن Cm APX و 18s rRNA به ترتیب در دمایی حدود ۸۷°C و ۸۶°C درجه دیده می‌شود. این مسئله بیانگر این است که Tm محصول ژن Cm APX، ۸۷°C و برای ژن 18s rRNA، ۸۶°C است. پس از مشتق‌گیری از منحنی تغییرهای فلورسانس منحنی درجه دومی به دست می‌آید. در این منحنی هر peak نمایانگر یک محصول است که وجود یک پیک مشترک برای تمامی محصولات، نشان دهنده اختصاصی بودن محصول واکنش Real time PCR است. شکل دو منحنی ذوب برای ژن Cm APX را نشان می‌دهد.



شکل ۲- منحنی ذوب ژن Cm APX، پیک موجود در آن نشان دهنده دمای ۸۷ درجه سانتیگراد، Tm محصول ژن Cm APX می‌باشد. به عنوان مثال رنگ قرمز، منحنی ذوب ژن Cm APX مربوط به توده سفیدک در سطح شوری mM ۲۵۰ است.

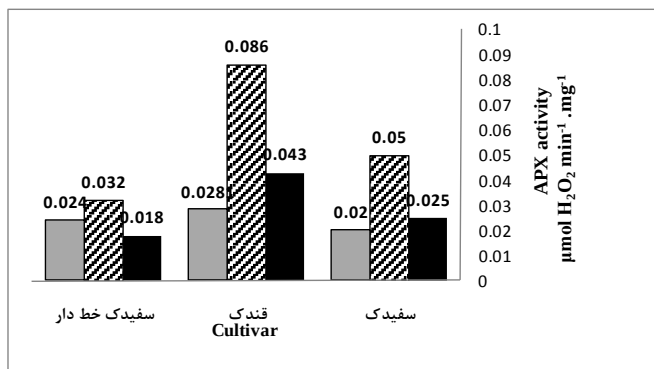
Figure 2- Melt Curves of Cm APX gene, The peak indicates a melting temperature (Tm) of 87 °C in Cm APX gene product. For example, the red color is the melting curve of Cm APX gene in Sefidak landrace at 250 mM.

جدول ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

Table 4- Mean comparison for activity of ascorbate.

peroxidase (APX)

| آسکوربات پراکسیداز<br>$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ | تیمار<br>Treat ment             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 0/902 a                                                                                                   | قندک (توده)<br>Ghandak          |
| 0/551 b                                                                                                   | سفیدک<br>Sefidak                |
| 0/202 c                                                                                                   | سفیدک خط دار<br>Khatdar Sefidak |
| 0/323 a                                                                                                   | شوری (میلی، مولار)<br>0         |
| 0/446 b                                                                                                   | 350                             |
| 0/626 c                                                                                                   | 250                             |



شکل ۴- اثر متقابل سطوح شوری و رقم (توده) روی فعالیت آنزیم APX. سطوح شوری عبارتند از صفر (■)،

نمک (NaCl) ۳۵۰ mM و ۲۵۰ mM

Figure 4- Interaction between salinity and cultivar on APX activity. The salinity levels were 0 (■), 250 (▨) and 350 (■) mM NaCl.

تیمار شوری تاثیر معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم APX در سطح یک درصد داشت. در واقع میزان فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد با افزایش سطح شوری (غلظت کلرید سدیم) تا سطح ۲۵۰ mM افزایش یافت اما پس از آن کاهش نشان داد (شکل ۴). میزان افزایش فعالیت آنزیم APX در سطح شوری ۲۵۰ mM و ۳۵۰ mM نسبت به شاهد به ترتیب برابر ۴۸/۴۰ و ۲۷/۵۷ درصد بود (جدول ۴).

در این آزمایش مشخص شد که توده قندک با ۰/۹ میکرومول  $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  پروتئین گرم بر میلی در دقیقه در سطح شوری ۲۵۰ mM (1 protein) در سطح شوری ۲۵۰ mM و توده سفیدک خط دار با

جدول ۲- آنالیز بیان ژن Cm APX در توده های خربزه بومی سیستان تحت تیمار با تنش شوری با استفاده از نرم افزار REST 2009

Table 2- gene expression Analysis Cm APX in Sistan melon Landrace (Sefidak, Ghandak and Sefidak Khatdar) treated with salt stress.

| P(H0)               | Cm APX ارزیابی نسبی بیان ژن ** | توده/سطح شوری         |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 0.073 <sup>ns</sup> | 3.05                           | سفیدک/۳۵۰ میلی مولار  |
| 0.023 *             | 3.15                           | سفیدک/۲۵۰ میلی مولار  |
| 0.046 *             | 4.478                          | قندک/۳۵۰ میلی مولار   |
| 0.033 *             | 6.390                          | قندک/۲۵۰ میلی مولار   |
| 0.049 *             | 0.723                          | خط دار/۳۵۰ میلی مولار |
| 0.08 <sup>ns</sup>  | 2.810                          | خط دار/۲۵۰ میلی مولار |

\*<sup>ns</sup> به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح آماری ۰/۵ و عدم معنی داری است.

\*\* در ارزیابی نسبی، میزان افزایش یا کاهش بیان ژن در هر تیمار به صورت نسبت بیان می شود که در این حالت امکان اندازه گیری میزان بیان ژن در تیمار کنترل وجود ندارد و به عبارت دیگر عدد یک در نظر گرفته می شود.

<sup>ns</sup>, \* means non-significant and significant at 1% probability levels, respectively

\*\* In comparative assessment, increase or decrease in gene expression in each treatment is expressed as ratio where in this case, it is not possible to measure gene expression in the control treatment and in other words, it is considered 1.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمار شوری بر عملکرد آنزیم آسکوربات پراکسیداز

Table 3- Analysis of variance of antioxidant activity.

| منابع تغییرات<br>S.O.V | درجه آزادی<br>df | آسکوربات پراکسیداز<br>APX<br>$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ |
|------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| توده Landrace          | 2                | 0.044**                                                                                                               |
| شوری Salinity          | 2                | 0.027**                                                                                                               |
| توده × شوری            | 4                | 0.046**                                                                                                               |
| Landrace × salinity    |                  |                                                                                                                       |
| خطا Error              | 16               | 0/000007                                                                                                              |

\*\* تفاوت معنی دار در سطح آماری ۰/۱ را نشان می دهد.

\*\* means significant at 1% probability

۰/۲ در سطح شوری ۳۵۰ mM به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان APX بودند (جدول ۴ و شکل ۴).

## بحث

تحت شرایط نامساعد محیطی، تعداد زیادی رادیکال آزاد اکسیژن در سلول‌های گیاهی تجمع می‌یابند و باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و در نهایت منجر به کاهش رشد و حتی در موارد شدیدتر مرگ گیاه می‌شود. گیاهان در مقابل این شرایط به وسیله دو سامانه آنزیمی و غیرآنزیمی می‌توانند ROS را تخریب کنند. سامانه‌های غیرآنزیمی شامل آنتی اکسیدان‌هایی از قبیل گلوتاتیون (GSH)، آسکوربیک اسید (ASA) ((Ascorbic acid)، فلاونوئید و سامانه آنزیمی شامل آنزیم‌های آنتی اکسیدانت از قبیل آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) است. پراکسید هیدروژن به صورت طبیعی اغلب از زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و بعضی از واکنش‌های آنزیمی در کلروپلاست گیاهان ایجاد می‌شود (Liu et al., 2013). عدم تعادل بین تولید و تخریب پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) باعث تجمع آن در سلول‌ها می‌شود و نقاط کلیدی سوخت و ساز و سازوکارهای دفاعی سلول را مورد حمله قرار می‌دهد؛ در نتیجه این امر تنش اکسیداتیو در سلول شدت بیشتری می‌یابد (Esfandiari et al, 2007). APX یک آنزیم کلیدی در سامانه مهار آنزیمی ROS است که می‌تواند  $H_2O_2$  تولید شده در کلروپلاست‌ها را از بین ببرد (Shen et al, 1997). تنش شوری موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی و تجمع پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) در پاسخ به تنش می‌شود (Blokina et al, 2001).

فعالیت APX در بسیاری از گیاهان مانند گندم (Sairam et al, 2004)، پنبه (Gooset et al., 1994)، برنج (Morita et al, 1999) برگ‌های آرابیدوپسیس و کلزا (Chai et al, 2001) در معرض تنش شوری افزایش می‌یابد. گمان می‌رود که یک واکنش دفاعی برای تحمل به شوری به گیاه کمک می‌کند. بنابراین افزایش فعالیت ژن APX می‌تواند باعث تحمل و زنده ماندن گیاه تحت تنش شوری شود. در این پژوهش بیان ژن Cm APX در سه توده

خربرزه بومی سیستان تحت تنش شوری نشان داد که این گیاه در چنین شرایطی برای تخریب  $H_2O_2$  ایجاد شده در سلول‌های گیاهی سامانه آنزیمی خود را فعال نموده و در نتیجه بیان ژن Cm APX افزایش می‌یابد. طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق در سطح شوری ۲۵۰mM افزایش بیان ژن Cm APX در هر سه توده مورد بررسی به بالاترین حد رسید و با افزایش شوری از این مقدار، افزایش کمتری در میزان بیان آن مشاهده شد که با نتایج محققان دیگر مطابقت داشت (Esfandiari et al, 2007; Kazemi et al, 2011). در توده سفیدک خط دار این کاهش میزان بیان ژن Cm APX به پایین‌تر از میزان بیان این ژن در نمونه کنترل رسید که این می‌تواند دلیل بر حساس بودن این توده به شوری بیشتر از ۲۵۰mM باشد.

بدیهی است، تحقیقات بیشتری برای نشان دادن چگونگی سازوکار افزایش بیان ژن APX تحت تنش شوری مورد نیاز است. پژوهش‌های گذشته نیز نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم APX به شدت به بیان ژن APX وابسته است و می‌تواند بعد از تیمار با عوامل تنش زا افزایش یابد؛ از قبیل حمله پاتوژن، فشار مکانیکی، جراحت، تشعشع UVB (Rao et al, 1996)، خشکی (Mittler and Zilinskas, 1994). استرس شوری (Lopez et al, 2004; Mittova et al, 2004 a,b; Gomez et al, 2004) تحریک انرژی (Karpinski et al, 1997; Yoshimura et al, 2000)، همچنین کاهش یا افزایش دما، افزایش اکسیژن بعد از یک دوره کاهش آن (Blokina et al, 2001). برای مثال فعالیت APX در برگ ارقام نخود فرنگی تحت تنش شوری افزایش یافت (Hernandez et al, 2001). همچنین بیان ژن APX در *Betula platyphylla* به صورت قابل ملاحظه‌ای بعد از تیمار با شوری (NaCl) افزایش یافت (Wang et al, 2009). بیان ژن APX در سیب زمینی شیرین پس از جراحت برای مدت زمان طولانی افزایش یافت (Park et al, 2004). خشکی همراه با افزایش دما بیان ژن APX را در *Anthurium. andraeanum* به اوج خود رساند (Koussevitzky et al, 2008) و همچنین شوری همراه با کاهش دما بیان ژن APX را در *A. andraeanum* افزایش داد (Liu et al, 2013). در این تحقیق روند بیان ژن Cm APX در توده‌های

شوری را تحمل نماید و کاهش بیان این ژن در توده سفیدک خط دار به همراه کاهش فعالیت آنزیمی آن نشان دهنده حساسیت این توده به شرایط تنش شوری است. بیان ژن Cm APX و همچنین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)، در سطح شوری ۳۵۰ mM در همه توده ها کاهش یافت. در این سطح شوری، بیان ژن Cm APX در توده سفیدک خط دار به صورت معنی داری نسبت به نمونه کنترل کاهش نشان داد. در ادامه این پژوهش می توان دیگر ژن های مربوط به آنزیم های آنتی اکسیدان و همچنین ارتباط آنها با هم در توده های خربزه بومی سیستان مورد بررسی قرار گیرد، همچنین می توان تغییرهای این ژن در دیگر توده های حساس و مقاوم و در سایر سطوح شوری را نیز بررسی نمود.

#### منابع

- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N. 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiology*, 123(3): 1047-1056.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologica Plantarum*, 85: 235-241.
- Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer CH, Mullineaux PM (eds) *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 77-104.
- Azevedo Neto AD, Prisco JT, Eneas-Filho J, Braga de Abreu CE, Gomes-Filho E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56: 235-241.
- Baure, D, Muller, H, Reich, J, Reich, H, Ahrenkiew, V, Warthoe, P and Strauss, M. 1993. Identification of differentially expressed Mrna species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucl Acide Res*, 21: 4272-4280.
- Bian S, Jiang Y. 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Science Horticulturae.*, 120: 264-270.
- Blokhina OB, Chirkova TV, Fagerstedt KV. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1179-

مورد بررسی با روند فعالیت این آنزیم مشابه بود، به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم APX با بیشترین میزان بیان آن همخوانی داشت. در سه توده مورد بررسی مطابق آنچه در جدول چهار ارائه شده با افزایش بیان ژن Cm APX تا سطح شوری ۲۵۰mM فعالیت آنزیم APX نیز افزایش یافته است (شکل ۴) و سپس در پی افزایش بیان این ژن در شوری ۳۵۰mM فعالیت آنزیم APX نیز کاهش می یابد.

#### نتیجه گیری

طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش، افزایش بیان ژن Cm APX در توده قندک به همراه افزایش فعالیت آنزیمی در سطح شوری ۲۵۰mM، نشان داد که این توده بهتر توانست شرایط تنش

1190.

- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell*, 7(7): 1099-1111.
- Bonifacio A, Martins MO, Ribeiro CW, Fontenele AV, Carvalho FE, Margis-Pinheiro M, Silveira JA. 2011. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. *Plant Cell Environ*, 34:1705-1722.
- Bressan R, Bohnert H, Zhu JK. 2009. Abiotic stress tolerance: from gene discovery in model organisms to crop improvement. *Molecular Plant*, 2:1-2.
- Chai L, Wang JM, Fan Zy, Liu Zb, Li Xf, Yang Y. 2001. Ascorbate peroxidase gene from *Brassica napus* enhances salt and drought tolerances in *Arabidopsis thaliana*. *African Journal of Biotechnology*, 10 (79): 18085-18091.
- Chen Z, Gallie DR. 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomata movement. *The Plant Cell*, 16: 1143-1162.
- Dabrowska, G, Kata, A and Goc, A. 2007. Characteristics of the plant Ascorbate peroxidase family. *Journal of Acta biologica cracoviensia Series Botanica*, 49(1): 7-17.
- Esfandiari E, Shakiba MR, Mahboob SA, Alyari, H, Firozabad M. 2007. Effect of water stress on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation of wheat seedlings. *Agriculture Science*, 19(2): 130-138.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.
- Ghorbanli M, Ahmadi F, Monfared A, Bakhshi

- Khaniki GH. 2012.** Effect of salt stress and its interaction with ascorbate on catalase, ascorbate peroxidase activity, proline and malondialdehyde in *Cuminum cyminum* L. four weeks after germination. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28 (1): 14-27.
- Gomez JM, Jimenez A, Olmos E, Sevilla F. 2004.** Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 55: 119–130.
- Gosset DR, Millhollon EP, Lucas MC. 1994.** Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*. 34, 106–714.
- Hajiboland R. 2012.** Effect of micronutrient deficiencies on plants stress responses. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds) *Abiotic stress responses in plants*. Springer: 283–329.
- Hasanuzzaman H, Nahar K, Alam MM, Fujita M. 2012.** Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase system. *Australian Journal of Crop Science*. 6 (8): 1314-1323.
- Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, Río LA, 1995.** Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*, 105 (2): 151-167.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950.** The water culture method for growing plant without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347: 32–33.
- Jimenez A, Creissen G, Kular R, Firmin J, Robinson S, Phil M. 2002.** Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta*. 214: 751-758.
- Karpinski S, Escobar C, Karpinski AB, Creissen G, Mulineaux PM. 1997.** Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *The Plant Cell*, 9: 627–640.
- Koca H, Bor M, Ozdemir F, Turkan I. 2007.** The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3): 344-351.
- Kosova K, Vitamvas P, Urban MO, Prasil IT. 2013.** Plant proteome responses to salinity stress comparison of glycophytes and halophytes. *Functional Plant Biology*, 40: 775–786.
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev VA, Mittler R. 2008.** Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Biological Chemistry*, 283: 34197-342.
- Lievens, S, Goormaching, S and Holsters, M. 2001.** A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation : looking back and looking forward. *Nucleic Acids Research*, 29: 3459-3468.
- Liu HC, Tian DQ, Liu JX, Ma GY, Zou QC, Zhu ZJ. 2013.** Cloning and functional analysis of a novel ascorbate peroxidase (APX) gene from *Anthurium andraeanum*. *Zhejiang University Science*, 14 (12): 1110-1120.
- Lopez F, Vansuy tG, Casse-Delbart TF, Fourcrot P. 1996.** Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt-stressed *Raphanus sativus* plants. *Plant Physiology*, 97: 13–20.
- Mirzaee M, Moieni A, Ghanati F. 2013.** Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two Canola (*Brassica napus* L.) cultivars Tabacco. *Agricultural Science Technology*, 15: 593-602.
- Mishra A, Jha B. 2011.** Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Botanica Marina*, 54: 195–199.
- Mittler R, Zilinskas BA. 1994.** Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal*, 5: 397–405.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Vanbreusegem F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science*, 9: 490-498.
- Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M. 2004a.** Salinity upregulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1105–1113.
- Mittova V, Theodoulou FL, Kiddle G, Volokita M, Tal M, Foyer CH, Guy M. 2004b.** Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L. pennellii* – role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. *Plant, Cell and Environment*, 27: 237–250.
- Molazem D, Azimi J. 2013.** Morphological changes of maize cultivars under condition of soil salinity. *International Journal of Agriculture and Crop Science*, 6: 866-868.
- Morita S, Kaminaka H, Masumura T, Tanaka K. 1999.** Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative signaling, *Plant and Cell Physiology*, 40: 417–22.

**Nakano Y, Asada K. 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22: 867-880.

**Panchuk II, Zentgraf U, Volkov RA. 2005.** Expression of the APX gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 222: 926-932.

**Park SY, Ryu SH, Jang IC, Kwon SY, Kim JG, Kwak SS. 2004.** Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 271: 339-346.

**Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002.** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucleic Acids Research*, 30:36-46.

**Pfaffl MW. 2007.** Relative quantification in: Real-time PCR, Dorak MT (ed). Taylor and Francis Group, UK.

Rao MV, Paliyath G, Ormerod DP. 1996. Ultraviolet-B-and-ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 110:125-136.

**Razavi, K, Mohsen-zadeh, S and Malbiibi, M. A. 2001.** molecular aspects of osmotic stresses. International Symposium on prospect of saline agriculture in the GCC countries, 18-20th of March, Dobai. Sairam RK, Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86 (3). pp. 407-421.

**Sharma D, Rawat I, Goel HG. 2012.** Antioxidant and prebiotic of some cucurbits. *Research Journal of Medicinal Plant*. 6 (7): 500-510.

**Shen WB, Huang LQ, Xu LL. 1997.** Ascorbate peroxidase in plants. *Chemistry of Life*, 17(5):24-26.

**Singh N, Mishra A, Jha B. 2013.** Over-expression of the peroximal ascorbate peroxidase (SbpAPX) gene cloned from halophyte *Salicornia brachiata* confers salt and drought stress tolerance in transgenic *Tabacco*. *Marine Biotechnology*. 6 (7): 500-510.

**Tewari RK, Hadacek F, Sassmann S, Lang I. 2013.** Iron deprivation-induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in *Brassica napus* leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 91:74-83.

**Tsuji N, Kamagata C, Furuya M, Kobayashi D, Yagihashi A, Morita T. 2002.** Selection of an internal control gene for quantitation of mRNA in colonic tissues. *Anticancer Research*, 22: 4173-8.

**Wang C, Yang CP, Wang YC. 2009.** Cloning and expression analysis of an APX gene from *Betula platyphylla*. *Journal of North-East Forestry University*, 37(3):79-81.

**Wang J, Zeng Q, Zhu J, Liu G, Tang H. 2013.**

Dissimilarity of ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle mechanism in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under experimental free-air ozone exposure. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 165:39-49.

**Xu J, Zhang Y, Guan Z, Wei W, Han L, Chai T. 2008.** Expression and function of two dehydrins under environmental stresses in *Brassica juncea* L. *Molecular Breeding*, 21: 431-438.

**Yasar BF, Kusvuran S, Ellialtioglu S. 2006.** Determination of anti-oxidant activities in some melon (*Cucumis melo* L.) varieties and cultivars under salt stress. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 81:627-630.

**Yong Z, Hao-Ru T, Ya L. 2008.** Variation in antioxidant enzyme activities of two strawbree cultivars with short-term low temperature stress. *Journal of Agricultural Sciences*, 4: 456-462.

**Yoshimura K, Yabuta Y, Ishkawa T, Shigeoka S. 2000.** Expression of spinach ascorbate peroxidase. *Plant Physiology*, 123: 223-233.

## **Ecological Risk Assessment of Genetically-Modified Ornamental Plants**

**Masoud Tohidfar<sup>1\*</sup>, Pezhman Azadi<sup>1</sup>**

1- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education & Extension Organization, Karaj, Iran.

\* Corresponding Author, Email: gtohidfar@abrii.ac.ir

### **ABSTRACT**

Classic plant breeding has increased the beauty and utility of ornamental plants, but through the application of biotechnology completely new traits could be developed in plants. Creation of blue color petal in carnation and rose are examples demonstrating the optional of biotechnology in creating novel traits out of the scope of the conventional hybridization. Application of genetic engineering in ornamental plants is not limited to changes in color. Resistance to pests and diseases, enhancement of flowering, extended cut flowers life and modification of flower structure are examples of other important traits that could be modified using modern biotechnology. It is predicted that genetic engineering will revolutionize ornamental plants industry in the future. With the introduction of any new technologies, concerns are raised about their safe use and deployment. Concerns have also been raised about the possible negative impacts of commercialization of genetically modified (GM) ornamental plants on the ecosystem. The concerns have several different origins and providing responses to these concerns and not addressing them is the main objective of this paper. This article considers GM ornamental plants in the context of current ecological risk assessment principles, research results achieved, and current regulatory frameworks. This article can be very useful for biotechnologists, biosafety specialists, and authorities concerned.

### **Key Words**

Risk assessment, Transgenic ornamental plants, Biosafety.

## Nucleotide sequence and molecular characterization of $\beta$ -1,4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* strain B5d

Sholeh Dahpahlevan<sup>1</sup>, Maryam Mousivand<sup>2</sup>, Maryam Hashemi<sup>2\*</sup> and Jalil Khara<sup>1</sup>

1- M.Sc, Biology Department, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

2- Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran(ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Karaj, Iran.

\* Corresponding Author, Email: hashemim@abrii.ac.ir

### ABSTRACT

The present investigation was conducted to characterize enzymatic and molecular aspects of a beta 1 and 4 endoglucanase gene in *Bacillus subtilis* strain B5d. The gene was amplified with specific primers and its sequence was deposited in the NCBI (accession number of KF670724). Sequence and phylogenetic analyses were performed using the Vector NTI and Mega 4 software. The PCR product comprised of 794 bp, encoding a peptid of 264 amino acids in length. Amino acid sequence analysis showed that the gene encoding beta 1 and 4 endoglucanase in *B. subtilis* B5d had multiple domains including cellulose binding domain belongs to family 3 and catalytic domain belong to glycoside hydrolase family 5. The enzyme activity was assessed in temperature range of 30-70 °C and pH 4.6. The results showed that the maximum catalytic activity of the enzyme occurred at 55 °C and was estimated at 461.83 U/L. The stability of the enzyme was measured at different pH and temperatures values and the results showed that the enzyme was stable at pH 5-10 and temperature values up 60 °C.

### Key Words

Beta 1 and 4 endoglucanase, *Bacillus subtilis*, Phylogenetic analysis, Enzyme stability.



## **PCR detection of transgenic maize in Iran on the basis of P35S**

**Diana Heidari<sup>1\*</sup>, Mohammad hassan Shahhosseiny<sup>2,3</sup> and Zivar Salehi<sup>4</sup>**

1- M.Sc student, Department of Biology, Pardis International, University of Guilan.

2- Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University shahre ghods branch, Tehran, Iran.

3- Iranian Gene Fanavar institute (IGF), Tehran, Iran.

4- Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan.

\* Corresponding Author, Email: Diana2730@yahoo.com

### **ABSTRACT**

In the past two decades, biotechnology in genetic engineering has led the production of genetically modified organisms (GMOs) all around the world. The statistics of GMO cultivation has lightened the significant importance of GMOs worldwide, and shows that they are widely consumed by public. Maize is one of the most important transgenic crops which has widely cultivated and consumed in many countries. The aim of this study is the detection of genetically modified maize in Iran markets. First, three samples of transgenic maize were prepared from Shiraz's Custom and their DNA was extracted using Cetyl Tri-methyl Ammonium Bromide (CTAB) method. The control PCR test of native maize was performed on Invertase (IVR) gene which is present in all corn types. For detection of genetically modified maize, the PCR test based on P35S promoter which present in most transformation vectors was optimized using specific primers (P35S1 and P35S2). Then, DNA of 37 maize samples collected from seven major cities of Iran and six maize samples from Jihad Agriculture Organization were extracted. PCR tests for the IVR gene and P35S were performed. Respectively, the 226 bp and the 195 bp amplicons were amplified. PCR products were cloned by T/A cloning in JM107 using *pTZ57R* plasmid for sequencing and preparing the positive controls. 46 samples collected from the market, Customs and Jihad Agriculture Organization were shown to be 100% positive for the native IVR gene and 56.5% (26 samples) positive for the exogenous P35S. This study showed that a high percentage of transgenic maize is present in Iran's consumption market. However, no action has been taken toward labeling and the consumer awareness of these food products.

### **Key Words**

Transgenic maize, PCR, P35S Promoter.

## Determination of Diazinon residue levels in Cherry, *Cerasus avium* supplied to Tehran central fruit and vegetable market

Mina Askari<sup>1</sup>, Mohsen morowati<sup>2\*</sup> and Sohrab Eimani<sup>3</sup>

1- M.Sc student, Islamic Azad University at Garmsar.

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

3- Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran.

\* Corresponding Author, Email: m\_morowati@yahoo.com

### ABSTRACT

Some of the top decision makers in the ministry of Jihad-e-Agriculture, ministry of Health and the Department of the environment emphasize on a ban on genetically modified products and are in favor of continuous use of synthetic pesticides while over 170 million hectare of the transgenic products are cultivated all around the world. To determine the diazinon residue level in sweet cherry, 40 samples were collected from Tehran Central Market. These products were produced in five main cherry producing cities such as Lavasan, Shahriar, Qazvin, Mashhad and Urumia. Samples were prepared and extracted by the standard method of QuEChERS. The GC/MS analysis was used to determine the levels of Diazinon residue in the samples. The amount of pesticides measured was compared with the national and Codex MRLs. 10% of the samples contained Diazinon residue levels higher than the MRL value (0.05 mg/kg) including 4 samples from Mashhad (0.3 mg/kg) and Lavasan (0.29 mg/kg). The remaining samples (90%) had no detectable residue levels of this insecticide. The results obtained in this study can be used for the future planning of pesticides application in the high risk areas of the country. Therefore, the continuous blockade of taking advantage of alternative products and methodologies which could reduce the pesticide usage like production of transgenic plants may result in the production of toxic food baskets for the consumers which may result in the spread of incurable diseases in the society.

### Key Words

QuEChERS, Diazinon residue, Cherries, GC/MS.

## Identification of *PEPCK-C* polymorphism using PCR- RFLP method and its association with economic traits in native fowl of Khorasan Razavi province

Fereshte Ghadamgahi<sup>1</sup>, Saeed Zerehdaran<sup>2</sup>, Mokhtar Ali Abbasi<sup>3</sup>, Mojtaba Ahani Azari<sup>4\*</sup> and

Mona Salehi Nasab<sup>5</sup>

1- M.Sc student, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

2- Professor, Ferdosi Mashhad University of Agricultural Sciences.

3- Associate professor, Animal Research Institute, Karaj.

4- Assistant professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

5- PhD student, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

\* Corresponding Author, Email: mojtaba-9@yahoo.com

### ABSTRACT

This study aimed to determine the *PEPCK-C* gene polymorphism in a population of native fowl in Khorasan Razavi. This gene encodes an enzyme with the same name in most organisms. This enzyme plays a key role in the gluconeogenesis. There are two types of this gene namely, cytosolic (*PEPCK-C*) and mitochondrial (*PEPCK-M*) types. In this study, blood samples were randomly collected from 100 native fowl of Khorasan Razavi. DNA was extracted using modified salting out method and then a fragment with the length of 1000 bp using a pair of primers was amplified. This fragment covers the promoter and exon 3 of *PEPCK-C* gene. For genotyping, the PCR-RFLP method using the *BstEII* digesting enzyme was performed. The GLM procedure of SAS 9.1 was used to study the association of the *PEPCK-C* gene polymorphism with economic traits. Three genotype patterns including AA, AB and BB were observed with frequencies of 0.46, 0.35 and 0.19, respectively. The effects of genotypes were significant for birth weight ( $P<0.01$ ), weight at 12 weeks of age ( $P<0.0001$ ) and average egg weight between 28 to 32 weeks of age ( $P<0.002$ ). Other studied traits were not significantly influenced by genotypes of this gene. Based on the results of this study the BB genotype had the greatest impact on birth weight, weight at 12 weeks of age and average egg weight. Therefore, the selection based on the polymorphism of this gene could be useful for improving body weight and egg weight of Khorasan Razavi native fowl.

### Key Words

*PEPCK-C* gene, Economic Traits, Polymorphism, Khorasan Razavi, Native fowl.

## The antioxidative effect of some shoot and root inducers in *Pistacia vera* (Qazvini and UCB-1 rootstocks) under *in vitro* conditions

Sara maleki<sup>1</sup>, Ghasemali Garoosi<sup>2\*</sup>, Raheem Haddad<sup>2</sup> and Esmaeil Nezami Alanogh<sup>3</sup>

1-M.Sc student, 2-Associate professor, 3-Technician (M.Sc) in  
Department of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

\* Corresponding Author, Email: agaroosi90@yahoo.com

### ABSTRACT

**P** *Pistacia vera* cv. Qazvini and UCB-1 rootstocks are two worldwide well-known pistachio rootstocks. They are valuable because of their tolerance to salinity and drought (Qazvini), and the resistance to cold and to Verticillium diseases (UCB-1). To improve vegetative and growth quality of pistachio and also to enhance the rooting efficiency, the effect of Scopoletin, iron source (Fe-EDDHA and Fe-EDTA) on growth characteristics as well as peroxidase activity was studied. In addition, the effect of the different concentrations of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> cations, the temperatures and EDTA concentrations were investigated at various levels. The results indicated that Scopoletin increased the shooting percentage and enhanced the growth quality. It also affected the peroxidase activity ( $\alpha=0.05$ ) significantly in comparison with the control. Results also revealed that applying Fe-EDDHA instead of Fe-EDTA in the culture media increased the rooting efficiency up to two fold in comparison with the control. There was also a direct relationship between the rooting rate and the enzyme activity, suggesting peroxidase as a predictive marker in the rooting phase of *Pistacia vera*. The kinetic properties of enzyme revealed the positive role of cations, 30°C (as an optimum temperature) and a negative role of EDTA on the enzyme activity.

### Key Words

Fe-EDDHA, Peroxidase, *Pistacia vera*, Rooting, Scopoletin, Shooting.

**Evaluation of enzyme and relative gene expression of Ascorbate Peroxidase (*Cm APX*) under salt stress in sistan melon Landrace (*Cucumis malo L.*)**

**Somayeh Montazerinezhad<sup>1\*</sup>, Mahmood Solouki<sup>2</sup> and Barat Ali Fakheri<sup>2</sup>**

1- M.Sc graduate student, Agricultural Biotechnology, University of Zabol.

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol.

\* Corresponding Author, Email: montazerinezhad@gmail.com

## ABSTRACT

Salinity is one of the undesirable environmental factors which affects both growth and crop production. The stresses cause a wide range of reactions in plants including the change in gene expression and cellular metabolism and the change in growth rate and production. To study the activity of the antioxidant enzyme Ascorbate Peroxidase (APX) and the expression level of its encoding gene in three Sistan melon Landraces (*Cucumis malo L.*), a factorial experiment was conducted in completely randomized design with three replications under control and salinity conditions (250mM and 350mM of NaCl). The relative expression of APX was compared by Real time PCR and enzyme activity was assayed in three melon landraces of Ghandak, Sefidak and Sefidak khatdar. According to the results, at 250 mM salinity level, the CmAPX gene expression showed an increase in comparison to control in all the three landraces and this increase in expression was significant at 5% in Ghandak and Sefidak landraces. At 350 mM salinity level, CmAPX gene expression was decreased in all the three studied landraces. At this level of salinity, the expression of CmAPX gene in the Khatdar Sefidak landrace significantly decreased (at 5% level) in comparison to control. More increase in antioxidant activity of APX with stable expression of CmAPX gene in Ghandak landrace was detected that shows this landrace could tolerate against salt stress better than the others. Decreased expression of this gene in Sefidak khatdar landrace with reduced enzymatic activity showed sensitivity of this landrace to salinity. We suggest that other genes related to antioxidant enzymes as well as their relationship with each others be examined in Sistan melon landraces.

## Key Words

CmAPX, Gene Expression, Salt Stress, Melon, Real Time PCR.



# *Genetic Engineering and Biosafety Journal*

*Vol.2, No.2, Issue 4, Fall 2013 and Winter 2014*

Copyright and publisher

## **BIOSAFETY SOCIETY OF IRAN**

*Managing Director: B. Ghareyazie*

*ghareyazie@yahoo.com*

---

*Editor-In-Chief: M. Omid*

*momidi@ut.ac.ir*

---

*Secretary of the Editorial Board: S. Kahak*

*s.kahak@yahoo.com*

---

Address: Pajouhesh Blvd., 17 Km of Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran

P.O.Box.14155-6343

Tel:(+98)2144580375

*gebs.j.bs@gmail.com*