

مهندسی ژنتیک و اینمی زیستی

دو فصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و اینمی زیستی، دوره اول، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۱

صاحب امتیاز: انجمن اینمی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سردبیر: دکتر منصور امیدی

دبیر هیات تحریریه و اجرایی: مهندس سمیرا کهک

هیات تحریریه

دکتر فضل الله افراز (استادیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور)

دکتر منصور امیدی (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)

دکتر علی اکبر شاه نجات بوشهری (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)

دکتر مسعود توحیدفر (استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران)

دکتر بهزاد قره‌یاضی (دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی)

دکتر رضا معالی امیری (دانشیار، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی)

دکتر محمد علی مليوبی (دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری)

دکتر سید ضیاء الدین میرحسینی (دانشیار، دانشگاه گیلان)

صفحه آرایی: مهندس سمیرا کهک

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

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

دو فصل نامه در ویرایش و تخلیص مطالب آزاد است. درج مطالب به منزله تایید کامل محتوای آنها نیست.

مقالات واردہ مسترد نمی‌شود. نقل مطالب با ذکر مأخذ مجاز است.

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

صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۶۱

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

امور چاپ: مرکز نشر دانشگاهی

تیراژ: ۵۰۰

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيْمِ

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دوفصلنامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره اول، شماره ۲، شماره پیاپی ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۱

فهرست مطالب

ب	اسامی داوران همکار در این شماره
ج-د	راهنمای نگارش مقاله
مقاله مروری	
۶۳-۷۲	مقایسه مرحله پیری طبیعی و پیری پس از برداشت با تاکید بر جنبه‌های مولکولی و ژنتیک
مقاله‌های پژوهشی	
سمیرا کهک، علی محمد شکیب، جلال صبا، سیامک اسدی، مانا احمدراجی ۷۳-۸۲	بررسی افزایش بیان ژن <i>BnFUL</i> در گیاهان تواریخته کلزا
بنفسه فتاح، محمدمهدی سوهانی، عبدالله حاتم‌زاده، علیرضا افشاری‌فر، بهروز گلعنی، محمدحسین رضادوست، محمدرضا میرزایی، امیرحسین زمانی ۸۳-۹۲	کشت بافت و تراریختن نارنج (<i>Citrus aurantium</i>) با استفاده از ژن کد کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CTV)
اطهر یقطین، مختار جلالی‌جواران، قاسم کریم‌زاده ۹۳-۱۰۲	انتقال ژن‌های اینترفرون گاما انسانی- اولئوسین به گیاه گلنگ (<i>Carthamus tinctorius</i> L.)
لیلا سرمدی، عباس عالم‌زاده، بهزاد قره‌یاضی ۱۰۳-۱۱۲	بررسی مولکولی وضعیت تواریختگی دانه‌های ذرت وارداتی به ایران
عباس صلاحی‌اردکانی، محسن مروتی، مهرناز انتصاری ۱۱۳-۱۲۰	باقیمانده آفت‌کش‌های اندوسلوفان (Endosulfan) و دیازینون (Diazinon) در مزارع گوجه‌فرنگی و خیار سبز استان کهگیلویه و بویراحمد
سمیه رحیم‌نهال، جمال فیاضی، خلیل میرزاده، محمد تقی بیکی‌نصیری، هدایت امروشن‌فکر ۱۲۱-۱۲۸	بررسی چندشکلی اگزون دو ژن BoLA-DRB3 در جمعیت گامیش استان خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP

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

- ۱- دکتر کسری اصفهانی
- ۲- دکتر علی اعلمی
- ۳- دکتر مسعود توحیدفر
- ۴- دکتر علی اکبر شاهنجات بوشهری
- ۵- دکتر حمید عبداللهی
- ۶- دکتر فرامرز علی نیا
- ۷- حمید فرهمند
- ۸- دکتر بهزاد قره‌یاضی
- ۹- دکتر ابوالقاسم محمدی
- ۱۰- دکتر رضا معالی امیری
- ۱۱- دکتر امیر موسوی
- ۱۲- دکتر سید ضیاء الدین میرحسینی

راهنمای نگارش مقاله در مجله مهندسی ژنتیک و اینمنی زیستی

کج (Italic) استفاده شود.

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

۲-۳- 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 (حداقل ۵ واژه بر اساس حروف الفباء) مرتبط با موضوع پژوهش در پایان چکیده مقاله درج شود.

۳-۳- 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.

۴-۳- مواد و روش‌ها: در این بخش از مقاله مواد و وسائل به کار رفته، شیوه اجرای پژوهش، طرح آماری و روش‌های شناسایی و ارزیابی به طور کامل با ذکر منبع توضیح داده می‌شوند.

۵-۳- نتایج: نتایج حاصل از پژوهش به صورت 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 به صورت سیاه و سفید ارائه شوند. لازم به ذکر است که شکل‌ها به صورت جداگانه، با فرمت JPG و 300DPI در اندازه 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 پانوشت 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 (به صورت ساده نه پررنگ) شروع می‌شود. شکل‌ها باید دارای وضوح و تمایز مطلوب باشند. عرض شکل‌ها نباید از ۷/۵ سانتی متر تجاوز کند. عنوانین 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 در متن مقاله باید شماره‌گذاری شوند و ارجاع به جدول‌ها، شکل‌ها و روابط در متن با شماره مورد یاد شده داخل پرانتز صورت می‌گیرد.

۶-۳- بحث: در این قسمت نتایج حاصل از پژوهش مورد تجزیه

مهندسی ژنتیک و اینمنی زیستی: نشریه‌ای علمی پژوهشی است که توسط انجمن اینمنی زیستی ایران منتشر می‌شود. هدف اصلی این مجله اطلاع‌رسانی و نشر دانش روز مهندسی ژنتیک و اینمنی زیستی و چاپ مقاله‌های پژوهشی (Research Paper)، تحلیلی (Review Paper) و کوتاه (Short Communication) تهیه شده در زمینه‌های مختلف مهندسی ژنتیک و اینمنی زیستی. را که قبلاً چاپ نشده یا همزمان به مجلات دیگر فرستاده نشده باشند است. اینمنی زیستی به مجموعه‌ای از تدابیر، سیاست‌ها، مقررات و روش‌های ایالات متحده 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. مسؤولیت صحت و سقم محتوای علمی مقاله و ترتیب نام نویسنده (نویسنده‌گان) بر عهده شخصی است که مقاله را به مجله ارسال می‌کند و کلیه مکاتبات با وی انجام می‌شود. دانشجویان کارشناسی ارشد و دکترا 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 باید 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 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 (نویسنده‌گان) خواهد بود.

اجزاء مقاله: قسمت‌های اصلی مقاله به ترتیب عبارتند از: عنوان، چکیده، واژه‌های کلیدی، مقدمه، ماد و روش‌ها، نتایج و بحث، سپاسگزاری (اختیاری)، منابع و چکیده به زبان انگلیسی نتایج و بحث ممکن است به صورت توأم یا جداگانه ارائه شود. برای قالب‌بندی تیرها از تیریندی (Heading) استانداردد MS Word استفاده شود. در موارد خاص (مانند اسمای علمی گونه‌ها) از قلم

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 4th Agronomy and plant breeding congress. Iran, Esfahan Industrial University, 554-573. (In Farsi).

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).

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 (نویسنده) نوشته و آدرس آنان آورده شود. عنوان انگلیسی، با قلم Times New Roman اندازه ۱۲ و به صورت Bold است.

ب- راهنمای تهیه مقاله مروری

فرستنده مقاله مروری باید نویسنده اول مقاله بوده و در زمینه موضوع مقاله در سطح کشور صاحب‌نظر 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 محتوى هم‌تراز مقاله کامل است و تنها از نظر مطالب ارائه شده، کوتاه‌تر است و بایستی حداقل 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.

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 توأمًا تحت عنوان نتایج و بحث ارائه کرد.

۷-۳- پانوشت‌ها با قلم Times New Roman و اندازه ۱۰ تهیه شده و در هر صفحه به صورت مجزا از شماره یک شروع می‌شوند.

۸-۳- سپاسگزاری (اختیاری): در پایان بحث حداقل 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.

۹-۳- منابع: کلیه منابع مورد استفاده اعم از فارسی و انگلیسی در انتهای مقاله به زبان انگلیسی و به ترتیب حروف الفباء نام خانوادگی نویسنده اول بدون ذکر شماره آورده شود. در انتهای منابع فارسی عبارت (In Farsi with English abstract) در متن ارجاع به منابع باید تا حد ممکن از ذکر نام نویسنده (نویسنده) در شروع جمله خودداری و منابع در انتهای جمله و در پرانز 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, Ramezanpour 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).

کتاب

Ducke JA. 1981. Handbook of legumes of world economic 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).

مقایسه مرحله پیری طبیعی و پیری پس از برداشت با تأکید بر جنبه‌های

مولکولی و ژئوتکنیک

سعید نواب پور

استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

چکیده

پیری برگ یک مرحله نمو است که به لحاظ ژئوتکنیک و فیزیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. ژن‌های زیادی در این مرحله فعال می‌شوند و افزایش قابل توجهی از نسخه برداری را نشان می‌دهند. از مشخصه‌های باز پیری کنترل روند تغییرات بسیار منظم و کنترل شده فعل و انفعالات فیزیولوژیک است. از جمله مهمترین این رخدادها توقف فتوستتر، تجزیه کلروپلاست، کاهش چشم‌گیر کلروفیل و شکستن پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های بزرگ است. پیری در گیاه بوسیله طیف وسیعی از عوامل داخلی و خارجی اتفاق می‌افتد. بروز پیری می‌تواند تحت اثر تنش‌های مختلف محیطی رخ دهد. از آنجا که گیاهان امکان حرکت ندارند پیری به عنوان یک سازوکار تکاملی فیزیولوژیک امکان مقابله با شرایط تنش را هموار می‌سازد. از موارد جالب توجه در بروز پیری، القای آن پس از برداشت است. این موضوع در برخی سبزی‌ها نظیر اسفناج، بروکلی، کاهو و کلم به خوبی دیده می‌شود. تعداد قابل توجهی از ژن‌های فعل در مرحله پیری شناسایی، جداسازی و همسانه‌سازی شده است. بیان نسبی این ژن‌ها در طیف گسترده فاز پیری و حتی پیش از بروز فتوتیپی پیری برگ تا آخرین مرحله پیری ملاحظه شد. براین اساس چنین به نظر می‌رسد که باید عوامل کنترلی نسبتاً زیادی در بیان این ژن‌ها دخیل باشند.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن

پیری برگ

پیری پس از برداشت

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول

مقدمه

چشمگیر کلروفیل و شکستن پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های بزرگ است (Hörtensteiner and Feller, 2002; Navabpour et al., 2011). اما نکته مهم و در خور توجه اینکه همه این فرایندها کاملاً هدفمند و جهت‌دار هستند. هدف اصلی پیری در گیاه انتقال و بازیافت مواد آلی از برگ‌ها و اندام‌های پیر به دانه و سایر اندام‌های ذخیره‌ای است (Smart, 1994).

زمان القای پیری در گیاه

القای پیری در گیاه بوسیله طیف وسیعی از عوامل داخلی و خارجی حادث می‌شود (Nam, 1997). اساساً پیری مرحله نهایی نمو برگ است و زمان آغاز آن در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است. برای مثال برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس تقریباً بالافاصله پس از رسیدن به حداقل رشد رویشی وارد فاز پیری می‌شوند (Hanfrey et al, 1996). در حالی که پیری در برگ‌های گندم زمانی حادث می‌شود که سیگنال پر شدن دانه‌ها رخ می‌دهد. در مورد درختان خزان کننده القای پیری با تغییر شرایط آب و هوایی پاییز انجام می‌شود. در هر حال در کلیه موارد وقوع پیری به صورت یک برنامه هدفمند تحت کنترل عوامل ژنتیک است. علاوه بر این‌ها بروز پیری می‌تواند تحت تاثیر تنش‌های مختلف محیطی رخ دهد (Gan and Amasino, 1997). از آنجا که گیاهان امکان حرکت ندارند پیری به عنوان یک سازوکار تکاملی فیزیولوژیک امکان مقابله با شرایط تنش را هموار می‌سازد. تنش‌های عناصر غذایی و خشکی منجر به بروز پیری زودرس در گیاه می‌شود (Crafts- Brandner et al, 1998). در واقع گیاه در یک فرایند هموستاتیک انتقال مواد را در شرایط تنش از برگ‌های مسن‌تر به سوی جریان تولید دانه هدایت می‌کند. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد گیاهان تحت تنش اکسیداتیو ناشی از پرتو تابی UV-B یا پرتو اوزون علائم پیری را بروز می‌دهند (Navabpour and Bagherieh Najjar, 2008). در عمل پرتو اوزون با عبور از غشا پلاسمایی سبب تولید رادیکال‌های فعل اکسیژن⁴ (ROS) می‌شود. چنانچه شدت پرتو بالا باشد سلول فرست هیچگونه تمهید دفاعی را پیدا نمی‌کند و با وقوع لکه نکروزه مرگ سلولی حادث می‌شود. این پدیده بسیار شبیه به

منظره چشم‌نواز پاییزی درختان خزان، تلالو طلایی رنگ کشتزار گندم در زمان رسیدگی در عین زیبایی حکایت از تغییرات فیزیولوژیک و بنیادی در سطح سلولی و مولکولی دارد. در عرصه جهانی در هر دقیقه حدود ۲۰۰۰ تن کلروفیل تجزیه می‌شود. نزدیک به ۲۰۰ میلیون تن کاروتونوئید تخریب و بی‌گمان مقادیر به مراتب بیشتری از پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و سایر مولکول‌های بزرگ تجزیه می‌شوند (Thomas, 1996). جنبه‌های زیادی به لحاظ بنیادی و کاربردی در پژوهش پروسه کاتابولیک پیری وجود دارد. ایده‌هایی چون تعویق و تاخیر پیری و یا تنظیم زمان‌بندی مراحل رشد که زمانی جنبه لوکس و فانتزی داشت به لطف استفاده از روش‌های نوین مولکولی در عرصه کاربردی مطرح هستند. تولید موتانت‌های Gd₂d₂ سویا با تاخیر معنی‌دار پیری موجب افزایش حدود ۵۰ درصدی عملکرد دانه شده است. همچنین ایجاد گیاه تاریخته توتون با تولید فزاینده هورمون سایتوکینین ضمن تعویق مرحله پیری در جهت تولید اندام رویشی کیفی بیشتر عمل کرده است. معرفی تعداد بی‌شماری از موتانت‌های مختلف گیاهی با ارزش اقتصادی و پژوهشی تنها بخش کوچکی از دستاوردهای این فناوری پویا در زمینه کنترل ژنتیک مرحله فیزیولوژیک پیری است. فرایند پیری برگ¹ در ظاهر ویرانگر و در باطن مفید و ارزشمند است. اساساً مفهوم پیری در سلول‌های گیاهی از آنجه در سلول‌های جانوری وجود دارد متفاوت است. پیری در سلول‌های جانوری با سالخوردگی² مترادف است. پدیده سالخوردگی فرایندی غیرفعال³ و بدون اهمیت است در حالی که پیری برگ یک مرحله نمو است که به لحاظ ژنتیک و فیزیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. ژن‌های زیادی در این مرحله فعال می‌شوند. تعدادی از ژن‌ها افزایش قابل توجهی از نسخه‌برداری را نشان می‌دهند (Navabpour et al, 2003). از مشخصه‌های بارز پیری برگ روند تغییرات بسیار منظم و کنترل شده فعل و انفعالات فیزیولوژیک است. از جمله مهمترین این رخدادها توقف فتوستز، تجزیه کلروپلاست، کاهش

1- Leaf Senescence

2- Aging

3- Passive

آسپاراژین سیستیاز (King et al, 1990)، کاتالاز و متالوتایین (Page et al, 2001) نشان داد.

پیری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول^۸

انواع مختلفی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PCD) در گیاه رخ می‌دهد (Greenberg, 1996). از آن جمله تمایز جنسیت گل‌های نر و ماده در گیاهان یک پایه (مثل ذرت) از بافت‌های اولیه سلول‌های مولد گل (Chang, and Pareddy, 1994)، تشکیل آوند چوبی با مرگ سلول‌های مولد اولیه (Fukuda, 1997) و مرگ سلولی برگ‌های گیاه مونسترا که سبب تولید حفره‌هایی در برگ می‌شود. نوع دیگر PCD بروز واکنش HR در حمله عوامل Morel and Dangl, 1997) است (به‌ویژه فرم ناسازگار) است (Pennel, and Lamb, 1997). چنین مواردی از PCD شباهت قابل توجهی به مرگ سلولی در موجودات جانوری دارد (Pennel, and Lamb, 1997). اگرچه براساس نظر بسیاری از پژوهشگران پیری نیز از مصاديق PCD تلقی می‌شود و این امر با توجه به اینکه نتیجه نهایی پیری مرگ سلولی است قوت می‌یابد، ولی باید پذیرفت که روند طبیعی پیری به لحاظ فیزیولوژیک و بروز فنتوپیپی متفاوت از اغلب موارد Nooden and Guiamet, 1996) از جمله تفاوت‌های مهم در این زمینه این است که فرایند پیری یک مرحله کاملا هدفمند با پشتونه حضور فعال عوامل ژنتیک است. تمامیت مولکول دی‌ان‌ای تا لحظه‌های پایانی مرحله پیری حفظ می‌شود و این امر به کترول دقیق و منظم فعل و انفعالات فیزیولوژیک مهم در این مرحله کمک می‌کند. روند بروز پیری به طور معمول در طی چندین روز (مدتها قبل از تظاهر فنتوپیپی) تنظیم و کدگذاری می‌شوند و تغییرات ژنتیک بسیاری در سطوح مولکولی حادث می‌شود (Bagherieh-Najjar et al, 2007; Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Matile et al, 1998). بدیهی است این همه دقت عمل و سیستم‌های کترولی به صرف وقوع مرگ سلول از نظر بیولوژیک و فیزیولوژیک منطقی به نظر نمی‌رسد.

واکنش فوق حساسیت^۵ (HR) در حمله نژاد ناسازگار^۶ پاتوژن است (Sanderman et al, 1998). در حالی که پرتوتابی در شدت‌های پائین‌تر با تولید رادیکال‌های اکسیژن سبب کاهش میزان بیان ژن‌های فتوستتری و در مقابل افزایش فعالیت ژن‌های تجزیه کننده پروتئین‌ها (شبیه آنچه در پیری رخ می‌دهد) می‌شود (Page et al, 2001). اعمال تیمار پرتوتابی UV-B بر گیاه سبب افزایش چشم‌گیر مقادیر ROS و کاهش نسخه‌برداری ژن‌های فتوستتری و ساختمانی و افزایش ژن‌های کاتابولیک شد (Mackerness et al, 1997; Navabpour and Bagherieh Najjar, 2008). آلدگی گیاه با عوامل بیماری‌زای سازگار^۷ نیز منجر به تحریک پیری می‌شود و در بیشتر موارد زردی برگ‌ها (شاخصه فنتوپیپی پیری) ملاحظه می‌شود (Matthews, 1991). بروز پیری در سلول‌های آلدود به عنوان مانع فیزیولوژیک در جهت ممانعت از پراکندگی عامل بیماری‌زای تلقی می‌شود. برخی عوامل بیماری‌زای با تولید هورمون سایتوکینین در جهت دوام حیات سلول و Coghlilan, and Walters, 1992) در حمله عوامل بیماری‌زای ناسازگار موضوع متفاوت به نظر می‌رسد. در واقع در این واکنش مرگ سلولی بدون تظاهر علائم پیری حادث می‌شود. به نظر می‌رسد گیاه با القای سریع واکنش فوق حساسیت (HR) در محل آلدگی از رشد و پراکنش عامل بیماری‌زای جلوگیری می‌کند (Morel and Dangl, 1997). از موارد جالب توجه در بروز پیری، القای آن پس از برداشت است. این موضوع در برخی سیزیجات نظیر اسفناج، بروکلی، کاهو و کلم به خوبی دیده می‌شود. در عمل تنش شدیدی که پس از برداشت این محصولات به دلیل قطع منابع تامین آب و مواد غذایی حاصل می‌شود سبب تحریک بروز پیری در سلول‌ها می‌شود (Navabpour and Sabouri, 2010; Page et al, 2001). در سطح سلولی تقریباً تمام تغییرات فیزیولوژیک (شامل تجزیه کلروفیل و پروتئین‌ها، تحلیل غشای سلولی تغییر بیان ژن‌ها) که در خلال پیری برگ حاصل می‌شود در اندام برداشت شده دیده می‌شود (King and Moriss, 1994). تغییرات بیان ژن‌ها نیز تشابه قابل توجهی را در مورد برخی همسانه‌های مورد بررسی نظری

5- Hypersensitive Response (HR)

6- Incompatible Pathogens

7- Compatible Pathogens

ژن‌های درگیر در فرآیند پیری در طیف گستردۀ زمانی و حتی پیش از بروز فنتیپی پیری برگ تا آخرین مرحله پیری ملاحظه می‌شود (Buchanan-Wollaston, 1997; Buchanan-Wollaston et al, 2007).(and Ainsworth, 1997; Nam, 1997; Navabpour et al, 2007) براین اساس چنین به نظر می‌رسد که باید عوامل کترولی نسبتاً زیادی در بیان این ژن‌ها دخیل باشند. از آنجا که کلیه فرآیندهای مهم فیزیولوژیک و فعل و افعالات بیوشیمیایی در سطح سلول ماحصل میزان فعالیت ژن‌هاست، بررسی الگوی افتراقی بیان ژن‌های حائز اهمیت زیادی است. در این راستا روش‌های مختلفی مدنظر است از جمله مهمترین آن‌ها لکه‌گذاری نورترن^{۱۳}، ارزیابی کمی نسخه‌برداری در زمان واقعی^{۱۴} و میکروواری^{۱۵} هستند. تکنیک تکنیک لکه‌گذاری نورترن هر چند قدیمی‌ترین روش است ولی همچنان در بسیاری از آزمایشگاه‌های مولکولی کاربرد دارد. در عمل اندازه‌گیری کیفی میزان بیان ژن‌ها با استخراج آر.ان.ا و انتقال آن به غشا حساس سلولزی و دورگ غشا در شرایط بافری مناسب با کاوشگرهای رادیواکتیو ژن‌های مورد نظر صورت می‌پذیرد. با انجام دورگ‌گیری و قرار دادن غشا بر روی فیلم رادیوگرافی شدت رنگ لکه‌ها پس از ظهور فیلم می‌بین بیشتر ژن‌های مورد نظر در بافت و شرایط تیماری مذبور خواهد بود (Buchanan-Wollaston, 1997; Navabpour et al, 2003) ارزیابی کمی نسخه‌برداری در زمان واقعی یک روش درون شیشه‌ای^{۱۶} برای اندازه‌گیری رونوشت‌های توالی‌های شناخته شده است. این روش حساسیت و انعطاف‌پذیری بالایی دارد. در عمل پس از استخراج آر.ان.ا از بافت مورد نظر رشته دی.ان.ا مکمل (cDNA) ساخته می‌شود و با اتصال رنگ درج شونده اتیدیوم بر ماید در هر چرخه واکنش زنجیره‌ای میزان فلورستن حاصل توسط کامپیوتربصورت منحنی پلات می‌شود. بطور معمول با استفاده از ژن خانه‌دار^{۱۷} که واجد ثبات قابل قبول بیان در شرایط مختلف تیماری است، میزان بیان نسبی ژن‌های مورد پژوهش که با کمک آغازگرهای اختصاصی تکثیر شده اند مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد (Buchanan-Wollaston et al, 2003). با کاربرد این

بررسی بیان برخی ژن‌ها و تغییرات فیزیولوژیک در خلال پیری تعداد قابل توجهی از ژن‌های فعال در مرحله پیری شناسایی، جداسازی و همسانه‌سازی شده است (Buchanan-Wollaston, 1997; Navabpour et al, 2007). بدین منظور از روش‌های مختلف مولکولی نظری غربالگری افتراقی^۹، دورگ‌گیری کاوشی^{۱۰}، DDRT-PCR^{۱۱} و cDNA-AFLP^{۱۲} استفاده شد. روش‌های مذبور مذبور واجد مزیت نسبی هستند. دو روش اول قدیمی‌تر هستند، روش غربالگری افتراقی کاربرد بیشتری نسبت به دورگ‌گیری کاوشی داشته و از مزایای مهم آن اینکه طیف وسیع‌تری از ژن‌ها را در شرایط مختلف تیماری یا محیطی شناسایی می‌کند. در عین حال روش دورگ‌گیری کاوشی پاسخ روش‌تری در شناسایی ژن‌هایی با افتراق بیان بالا را فراهم می‌کند (Buchanan and Ainsworth, 1997). روش DDRT-PCR اگرچه امکان شناسایی طیف وسیعی از ژن‌ها را در شرایط مختلف محیطی و تیماری فراهم می‌آورد ولی از معایب مهم آن ایجاد باندهای کاذب، عدم حساسیت بالا و پایین بودن راندمان تکرارپذیری است. در روش cDNA-AFLP با اتکا به استفاده از آغازگرهای اختصاصی، انجام تکثیر پس‌سی.آر و استفاده از ژل آکریلامید مشکلات مذبور به طور قابل توجهی مرتفع می‌شود (Navabpour et al, 2007). نواب‌پور و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش cDNA-AFLP و کاربرد ۲۵۶ آغازگر ترکیبی به شناسایی و همسانه سازی ژن‌های افتراقی در شرایط تیماری پرتوتابی اشعه فرابنفش، تنش شیمیایی نیترات نقره و مرحله پیری طبیعی در کلزا پرداختند (Navabpour et al, 2007). نتایج این پژوهش به شناسایی ۳۲ گروه افتراقی بیان ژن‌های جدید منجر شد که در شش گروه تقسیم‌بندی شدند. در میان ژن‌های مذبور فاکتورهای رونویسی از اهمیت بیشتری برخوردار بودند (Navabpour et al, 2007). پیچ و همکاران (۲۰۰۱) نیز با تکنیک cDNA-AFLP به شناسایی ژن‌های مشترک و افتراقی مرحله پیری طبیعی و پیری پس از برداشت در کلم بروکلی اقدام کردند (Page et al, 2001). نتایج پژوهش‌های زیادی نشان می‌دهد بیان نسبی

13- Northern Blot

14- Quantitative Real Time-PCR

15- Microarray

16- In Vitro

17- House Keeping

9- Differential Screening

10- Subtractive Hybridization

11- Differential Display Reverse Transcription-PCR

12- cDNA- Amplified Fragment Length

آسپارتیک پروتئاز در روزهای پس از برداشت بروکلی در شرایط دمای ۲۰ درجه سانتی گراد طی روزهای ۴ و ۶ بیان بالایی داشت در حالی که در دمای ۵ درجه سانتی گراد کاهش نسبی فعالیت این ژن طی روزهای مذبور محسوس بود. وضعیت بیان همسانه CL2 کد کننده پروتئین سیستئین پروتئاز به نحو جالب توجهی متفاوت بود. نتایج برخی پژوهش‌های دیگر نیز میین تنوع بیان پروتئازها در خلال پیری در اندامهای مختلف گیاه نظیر برگ، ساقه، گل، Guerrero et al, 1998; King et al, 1995; Navabpour and Sabouri, 2010; Stephenson and Rubinstein, 1998.

همسانه CL3 کد کننده پروتئین سیستئین پروتئاز از ژن‌های کاملاً اختصاصی است که در مراحل پایانی پیری برگ بیان می‌شود (Lohman et al, 1994; Noh and Amasino, 1999) این ژن به طور چشم‌گیری در روزهای پس از برداشت بروکلی بیان شد. بیان این ژن در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی گراد از ۴ روز پس از برداشت آغاز و در ششmin روز به طور قابل توجهی دیده شد. این مساله در شرایط دمایی ۵ درجه سانتی گراد در هشتmin روز پس از برداشت ملاحظه و در روز دوازدهم تشديد شده. نتایج پژوهش‌های ویور و همکاران (Weaver et al, 1998) در بررسی بیان این ژن در برگ‌های جدا شده آرابیدوپسیس میین بیان بسیار ضعیف این ژن بود. همچنین اعمال تیمارهای شیمیایی در جهت تحریک ژن‌های واپسیه به پیری منجر به بیان این ژن نشد (Navabpour et al, 2003). از این رو چنین بهنظر می‌رسد که همبستگی بالایی در مسیر ژنتیک بیان این ژن در مراحل پیری برگ در گیاه و پیری پس از برداشت وجود دارد.

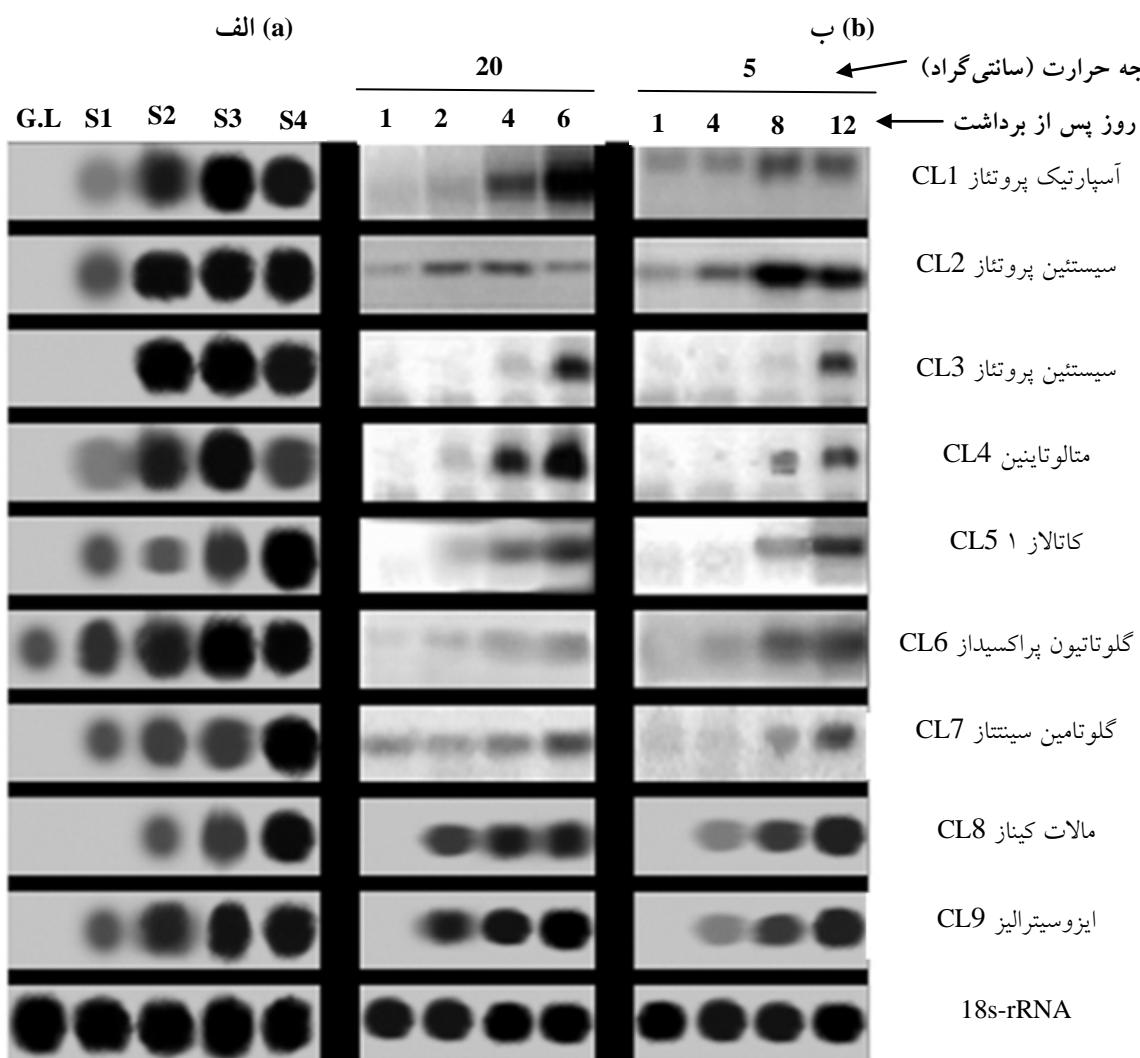
سه همسانه CL4 کد کننده پروتئین متالوتایشن، CL5 کد کننده پروتئین آنزیمی کاتالاز و CL6 کد کننده پروتئین گلتواتایون پروکسیداز از جمله ژن‌های آنتی اکسیدان است (Butt et al, 1998; Navabpour et al, 2011). دو همسانه CL4 و CL5 الگوی بیان مشابهی در مراحل مختلف پیری در کلزا نشان دادند، در حالی که الگوی بیان همسانه CL6 تا اندازه‌ای متفاوت بود. این همسانه‌ها در مرحله برگ سبز گیاه بیان بسیار ضعیفی داشتند در حالی که تمام آنها در مرحله پیری برگ افزایش بیان بالایی نشان دادند. نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است

روش ارزیابی کمی بیان ژن کاتالاز در ارقام گندم در شرایط سطوح تنش شوری تحلیل مناسبی از الگوی روند بیان افتراقی این ژن در القای مقاومت نسبی به تنش شوری را فراهم کرد (Navabpour et al, 2011).

روش میکرواری ظرفیت بالایی در ارزیابی کافی بیان تعداد زیادی ژن در شرایط تیماری را داراست. این روش بر اساس طیف سنجی تراشه‌های واجد تعداد زیادی نمونه (معمولاً cDNA) که سطح رونوشت را با طیف رنگ‌های نور مرئی مرتبط می‌سازد، عمل می‌کند. نقاط با نور سفید بیشترین بیان و پس از آن قرمز، نارنجی، زرد، سبز، آبی روشین و آبی تیره قرار می‌گیرند. هزینه‌های بالای تجهیزات اولیه و تراشه‌های مربوطه کاربرد این روش را در بسیاری از آزمایشگاه‌های مولکولی محدود کرده است. در بررسی انجام شده در گیاه طبیعی آرابیدوپسیس و لاین ترازیخته NahG (ناتوان در تولید مولکول پیام اسید سالیسیلیک) بیشتر ژن‌ها سطح مشابهی از بیان را نشان دادند. تعداد محدودی ژن تفاوت قابل توجهی نشان داد که بطبع در ارتباط با مسیر Buchanan-ژنتیک تولید یا واکنش به اسید سالیسیلیک بوده‌اند (Wollaston et al, 2003). بدیهی است در ادامه امکان جداسازی، همسانه‌سازی و انجام پژوهش‌های تکمیلی در این راستا فراهم خواهد بود.

الگوی بیان برخی ژن‌های دخیل در فرایند پیری برگ در گیاه کلزا در مراحل مختلف پیری و تحت اثر تیمار تنش اکسیداتیو نیترات نقره با کاربرد تکنیک لکه گذاری نورترن در شکل ۱ الف نشان داده شده است. همچنین روند فعالیت همان ژن‌ها در مرحله پس از برداشت بروکلی در شرایط انبارداری دمای ۲۰ و ۵ درجه سانتی گراد در شکل ۱ ب آورده شده است.

تجزیه و تحلیل بیان برخی ژن‌های واپسیه به پیری نشان داد که کلیه همسانه‌های مورد بررسی به طور روشنی با افزایش سن گیاه کلزا افزایش فعالیت نشان دادند و در اغلب موارد یک روند خطی افزایش ملاحظه شد (شکل ۱-الف). همچنین بررسی بیان این ژن‌ها به طور متقابل در شرایط پس از برداشت در بروکلی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲-ب). سه همسانه اول که از دسته ژن‌های تجزیه کننده پروتئین‌ها هستند الگوی بیان تقریباً مشابهی در مراحل پیری کلزا داشتند. همسانه CL1 کد کننده پروتئین



شکل ۱- بیان ژن های وابسته به پیری: الف- در خلال مراحل نمو در برگ کلزا، ب- طی روزهای پس از برداشت در گلچه بروکلی، با استفاده از روش لکه گذاری نورترن (اقتباس از منابع ۲۸، ۳۱، ۳۲ نگارنده).

الف- استخراج آر.ان.ا با استفاده از ۵ گرم برگ کلزا در هر مرحله صورت پذیرفت. ب- استخراج آر.ان.ا با استفاده از ۵ گرم ماده گلچه بروکلی تحت اثر تیمار آزمایشی صورت پذیرفت.

انتقال آر.ان.ا به غشای سولولری انجام شد. کاوشگرهای رادیواکتیو خالص سازی و تک رشته شد و با غشا مربوطه دورگ شدند. با انتقال غشا به کاست رادیوگرافی و ظهور فیلم X-Ray نتایج مرتب شد. به منظور حصول اطمینان از بارگیری برابر آر.ان.ا از rRNA-18s استفاده شد.

مراحل نمو در کلزا به ترتیب شامل

G.L: مرحله بلوغ / S1: مرحله اول پیری، آغاز زرد شدن برگها / S2-S4: بطور متوسط به ترتیب ۲۰٪، ۵۰٪ و ۸۰٪ زرد شدگی برگها.

Figure 1- Senescence gene expression: a) During leaf growth stages in Brassica b) Days after harvesting of broccoli florets. By using northern blot technique (Result of author see references: Navabpour et al., 2003; Navabpour and Saburi, 2010; Navabpour et al., 2011, for more details)

a- RNA has been extracted by using 5gr of Brassica leaf. B- RNA has been extracted by using 5gr of treated broccoli florets.

RNA has been transferred into membrane and hybrid by radioactive signal standard pure probes. Result has been collected by developing radiographic x-ray film. In order of equal RNA loading into the gel r-RNA-18s has been used.

Growth stages in Brassica include:

GL: Mature leaf, S1: Senescence stage1 (starting of leaf yellowish), S2-S4: Including 20%, 50% and 80% of average leaf yellowish.

King et al, 1991). نتایج پژوهش کینگ و موریس (Kamachi et al, 1994) نشان داد افزایش میزان بیان این ژن ناشی از افزایش قابل توجه میزان آمونیوم تولید شده در خلال فرایند پیری در بروکلی بوده است. محصول پروتئینی همسانه‌های CL8 و CL9 آنزیم‌هایی هستند که در چرخه اسید گلی‌اکسیلیک حائز اهمیت هستند و جالب اینکه در خلال مرحله پیری نیز حضور دارند (Smart, 1994). فعالیت چرخه مزبور به همراه اکسیداسیون بتا و گلوکوجنیز امکان تبدیل اسید چرب به قند را فراهم می‌آورند. میزان افزایش فعالیت ژن‌های مزبور در بررسی Ettinger and Harada, (1990).

نتیجه‌گیری

فرایند پیری برگ قویا تحت کنترل ژنتیک بوده و الگوی بیان ژنهای زیادی در خلال آن تغییر می‌کند. بسیاری از فعل و انفعالات مولکولی و فیزیولوژیک مهم مشتمل بر چرخه‌های تنفسی و واکنش‌های کاتابولیک با تغییرات آنزیمی عوامل سیگنالی تنظیم می‌شوند. این واقعیت که عوامل گوناگون داخلی (نمود-هورمون) و محیطی می‌توانند محرك آغاز مرحله پیری برگ باشند نشان می‌دهد که مسیرهای مختلف ژنتیک (Signalizing Pathways) با اثرهای متقابل بردارهای مربوطه به طور مستقل یا غیر مستقل بر یکدیگر تاثیر گذاشته و در نهایت بیان ژنهای مرتبط با پیری را تنظیم می‌کند. عوامل پیام‌رسان حد واسطه تحت تاثیر برخی محرك‌ها برای مثال تنش خشکی با فعال نمودن فاکتورهای رونویسی (Transcription Factor) سبب بیان ژن‌های پیری می‌شوند. جالب اینکه در بسیاری از موارد ژن‌های نهایی هدف بطور مستقیم هیچ واکنشی به عامل محرك (شوری) نشان نمی‌دهند.

(Buchanan-Wollaston et al, 2003; Hanfrey et al, 1996) مورد بروکلی روند بیان هر سه همسانه الگوی بیان مشابهی را در شرایط مختلف تیماری طی روزهای پس از برداشت نشان دادند. همسانه CL4 (پروتئین متالوتایین) نقش مهمی در سمزدایی Murphy and Taiz, (1995) از طرفی شواهد انکارناپذیری در نقش این ژن در خلال پروسه پیری وجود دارد، به نظر می‌رسد این ژن در کمک به بقای سلول به منظور انتقال کلیه مواد پروتئینی و ذخیره‌ای به دانه و اندام‌های ذخیره‌ای فعالیت مهم و موثری می‌کند (Buchanan-Wollaston et al, 2003; Navabpour et al, 2003). همسانه CL6 کد کننده پروتئین گلوتاتایون پراکسیداز در تجزیه اسیدهای چرب ایفای نقش می‌کند. این ژن به انواع تنش‌های محیطی و مصنوعی نظیر شوری و تیمارهای شیمیایی واکنش نشان می‌دهد. بیان این ژن نقش مهمی در کاهش تنش اکسیداسیونی ناشی از تاثیر عوامل شیمیایی نظیر نیترات نقره در آراییدوپسیس ایفا کرده است (Navabpour et al, 2003). دو سازوکار واکنش مستقیم و آنزیمی در تنظیم سطح رادیکال‌های فعال اکسیژن برای این ژن معرفی شده است. در واکنش مستقیم پاکسازی رادیکال‌ها از طریق واکنش با گروه تیول پروتئین تولید شده توسط ژن گلوتاتایون صورت می‌گیرد. سازوکار آنزیمی از طریق احیا فسفولیپید هیدروژناز و کمپلکس هیدروپروکسی با هدف اختصاصی حفاظت غشا سلول در برابر نقش اکسیداسیون انجام می‌شود (Navabpour et al, 2001; Page et al, 2001). با توجه به روند افزایشی بیان این ژن طی روزهای پس از برداشت در هر دو شرایط دمایی و بیان بالای این ژن پس از اعمال تیمارهای تنش‌زا چنین به نظر می‌رسد که مسیر ژنتیک مشترکی در پیری برگ و پیری مصنوعی (تحریک بوسیله عوامل شیمیایی و محیطی) در ارتباط با کنترل این ژن دخالت دارند. این موضوع در مورد دو همسانه CL4 و CL5 نیز تا حد زیادی صادق است. همسانه‌های CL7، CL8 و CL9 که به ترتیب کد کننده پروتئین‌های گلوتامین سیتاتاز، ملات کیتاز و ایزوستیرالیز هستند. از دسته ژن‌های دخیل در انتقال مواد محسوب می‌شوند. همسانه CL7 در تبدیل اسیدهای آمینه حاصل از تجزیه پروتئین‌ها در خلال فرایند پیری برگ به پیتید گلوتامین ایفای نقش می‌کند

منابع

1. Bagherieh-Najjar MB, Navabpour S, Hille J, and Dijkwel PP. 2007. Isolation and molecular characterization of the rec-qsim gene in *Arabidopsis* rice (*Oryza sativa*) and rape (*Brassica napus*). *Int. J. of plant produc.* 1: 23-33.
2. Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.
3. Buchanan-Wollaston V, and Ainsworth C. 1997. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Mol. Biol.* 33: 821-834.
4. Buchanan-Wollaston V, Earl, S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, and Pink D. 2003 .The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotech.* 1(1):3-22.
5. Butt A, Mousley K, Morris K, Beynon J, Can C, Holub E, Greenberg JT, and Buchanan-Wollaston V. 1998. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J* 16(2) 209-221.
6. Chang PC, and Pareddy DR. 1994. Morphology and development of the tassel and ear. In: *The Maize Handbook* Springer, New York, pp. 37-47.
7. Coglan SE, and Walters SR. 1992. Photosynthesis in green islands on powdery mildew-infected barley leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40: 31-38.
8. Crafts- Brandner SJ, Holzer R, and Feller U. 1998. Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiol. Plant.* 102:192-200.
9. Ettinger WF, and Harada JJ. 1990. Translational or posttranslational processes affect differentially the accumulation of isocitrate lyase and malate synthase protein and enzyme activities in embryos and seedlings of *Brassica napus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 281: 139-143.
10. Fukuda H. 1997. Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9: 1147-1156.
11. Gan S, and Amasino RM. 1997. Making sense of senescence. *Plant Physiol.* 113: 313-319.
12. Greenberg JT. 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12094-12097.
13. Guerrero C, de la Calle M, Reid MS, and Valpuesta V. 1998. Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily (*Hemerocallis spp.*) during flower senescence. 36: 565-571.
14. Hanfrey C, Fife M, and Buchanan-Wollaston V. 1996. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 30: 597-609.
15. Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, and Bleeker AB. 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 553-564.
16. Hörtensteiner S, and Feller U. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* 53: 927-937.
17. Kamachi K, Yamaya T, Mae T, and KOjima. 1991. A role for glutamine synthetase in the remobilisation of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* 96:411-417.
18. King GA, and Moriss SC. 1994. Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* 199: 1000-1500.
19. King GA, Davies KM, Stewart RJ, and Borst WM. 1995. Similarities in gene expression during the postharvest-induced senescence of spears and the natural foliar senescence of asparagus. *Plant Physiol.* 108: 125-128.
20. King GA, Woolard DC, Irving DE, and Borts WM. 1990. Physiological changes in asparagus spear tips after harvest. *Physiol. Plant* 80: 393-400.
21. Lohman KN, Gan S, John MC, and Amasino RM. 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 92: 322-328.
22. Mackerness S, Jordan BR, and Thomas B. 1997. UV-B effects on the expression of genes encoding proteins involved in photosynthesis, In: *Plants and UV-B: Responses to Environmental Change*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 113-134.
23. Matile P, Duggelin T, Schellenberg M, Rentsch D, Bortlik K, Peisker C, and Thomas H. 1998. How and why is chlorophyll broken down in senescent leaves? *Plant Physiol. Biochem.* 27:595-604.
24. Matthews REF. 1991. Disease symptoms and effects on metabolism. In: *Plant Virology*. 3rd end. London: Academic Press, 380-422.
25. Morel JB, and Dangl JL. 1997. The hypersensitive response and induction of cell death in plants. *Cell Death Diff.* 4: 671-683.
26. Murphy A, and Taiz L. 1995. Comparison of metallothionein gene expression and non-protein thiols in 10 *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiol* 109: 1-10.
27. Nam HG. 1997. The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Op. Biotech.* 8: 200-207.
28. Navabpour S, Morris K, Harrison E, Makerness S, Buchanan-Wollaston V. 2003. Expression of senescenceenhanced genes in response to oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 54,2285-2292.
29. Navabpour S, Bagherieh-Najjar MB, Soltanloo H.

2007. Identification of novel genes expressed in *Brassica napus* during leaf senescence and in response to oxidative stress. *Int. J. of Plant Prod.* 1(1): 35-44.
30. Navabpour S, and Bagherieh Najjar MB. 2008. Molecular and biochemical analysis of oxidative stress and UV-B radiation in *Brassica napus*. *J. Agric. Sci. Natur. Resour.* Vol. 15(5) 23-33.
31. Navabpour S, and Sabouri H. 2010. Molecular and biochemical characterization of post-harvest senescence in broccoli. *Sci. and Tech. of Hort.* 12(2):23-34.
32. Navabpour S, Bagherieh-Najjar MB, and Haddad R. 2011. Comparison of induced gene response to stressful treatment in *Spinacia oleracea* and *Brassica napus*. *J. of Agric. Biotech.* 10(1)11-10.
33. Navabpour S, Kazemi G, and Ramezanpour SS. 2011. Evaluation of catalase gene expression and morphological traits in two wheat cultivar under salt stress. *J. of Iranian Gen.Society.* In Press.
34. Noh YS, and Amasino RM. 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Mol. Biol.* 41: 181-194.
35. Nooden LD, and Guiamet JJ. 1996. Genetic control of senescence and ageing in plants. In: *Handbook of the Biology of Ageing*. 4th Edn (eds E.L. Schneider, W. Rowe and J. Orland). Academic Press, London, pp. 94-118.
36. Page T, Griffiths G, and Buchanan-Wollaston V. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* 125: 718-727.
37. Pell EJ, Schlaginhaufen CD, and Arteca RN. 1997. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100: 264-273.
38. Pennel R, and Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants: *Plant Cell.* 9: 1157-1168.
39. Sanderman H, Ernest D, Heller W, and Langebartels C. 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci.* 3: 47-49.
40. Smart CM. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126: 419-448.
41. Stephenson P, and Rubinstein B. 1998. Characterization of proteolytic activity during senescence in daylilies. *Physiologia Plantarum.* 104: 463-473.
42. Thomas H. 1996. Scientists crack secret of keeping grass green. *The Sunday Times* 7 July.
43. Weaver LM, Gan S, Quirino B, and Amasino RM. 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37: 455-469.

بررسی افزایش بیان ژن *BnFUL* در گیاهان تراریخته کلزا

سمیرا کهک^۱، علی محمد شکیب^{۲*}، جلال صبا^۳، سیامک اسدی^۴، مانا احمد راجی^۵

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه زنجان
- ۲- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
- ۳- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
- ۴ و ۵- به ترتیب کارشناس ارشد و کارشناس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

کلزا
گیاه تراریخته
BnFUL
بیان ژن
تعداد نسخه
ریزش دانه

کلزا یکی از گیاهان مهم روغنی است که در سال‌های اخیر کشت آن در ایران توسعه زیادی پیدا کرده است. یکی از مشکلات کلزا ریزش دانه قبل و در حین برداشت است که بسته به شرایط آب و هوایی می‌تواند تا ۵۰ درصد باعث کاهش محصول شود. تولید گیاهان متحمل به ریزش دانه می‌تواند موجب افزایش عملکرد شود. عوامل ژنتیک و محیطی متعددی بروی این صفت اثر دارند. از جمله عوامل ژنتیک وجود ژن *FUL* در این گیاهان است که افزایش بیان آن می‌تواند مانع از بازشدن غلاف و ریزش دانه شود. ژن *FUL* که از کلزا رقم Quantum جداسازی و به سه رقم مختلف گیاهان تراریخته کلزا انتقال داده شده بود در این پژوهش استفاده شد. برسی‌های مولکولی روی گیاهان تراریخته در نسل T₂ با استفاده از آزمون‌های بی‌سی‌آر، لکه‌گذاری سادرن و Real Time-PCR انجام گرفت. آزمون بی‌سی‌آر نشان داد که علاوه بر ژن داخلی گیاه، تراژن *BnFUL* نیز در گیاهان تراریخته وجود دارد. آزمون لکه‌گذاری سادرن نشان داد که در گیاهان تراریخته حداقل یک نسخه از تراژن وجود دارد. آزمون Real Time-PCR نشان داد که بیان ژن *BnFUL* در گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافته است. همچنین سطح بیان این ژن در لاین‌های مختلف نیز اختلاف نشان دادند. بخشی از این تفاوت در بیان می‌تواند ناشی از تعداد نسخه‌های مختلف تراژن و یا اثرهای محل ورود تراژن در ژنوم باشد.

مقدمه

می‌شوند (Dinneny and Yanofsky, 2005). ژن *FUL* متعلق به خانواده ژنی MADS-box است که برای انساط و تمایز پوسته‌های میوه پس از باروری مورد نیاز است. افزایش بیان تراژن در گیاه *Brassica juncea* باعث کاهش توسعه ناحیه حاشیه پوسته غلاف شده که می‌تواند برای کاهش ریزش دانه استفاده شود (Ostergaard et al., 2006). در این پژوهش بیان ژن *BnFUL* پس از انتقال به گیاهان کلزا مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها**انتقال ژن و تولید گیاهان تاریخته**

ژن *BnFUL* قبل از کلزا رقم Quantum جداسازی (Seifi and Shakib, 2005) و به روش انتقال توسط اگروباکتریوم و با استفاده از ناقل پلاسمیدی pABAS204 حاوی ژن *BnFUL* به گیاهان کلزا از سه رقم Okapi، Licord و RGS003 متقل شد (Asadi, 2008).

کشت گیاهان تاریخته

این پژوهش در سال ۱۳۸۹-۹۰ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران^۱ انجام گرفت. بنور گیاهان تاریخته نسل T₂ کلزا *BnFUL* و RGS003 از رقم Okapi و Licord حاوی تراژن به همراه گیاهان شاهد غیرتاریخته در گلخانه کشت شدند. در مرحله پنج برگی گیاهان ارقام پاییزه (Okapi، Licord) برای سرماده‌ی به مدت دو ماه به فیتوترون با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد متقل و پس از آن برای ادامه رشد در شرایط کنترل شده داخل گلخانه قرار گرفتند.

استخراج دی‌اوکسی‌نوکلئیک اسید (دی.ان.ای) ژنومی نمونه‌برداری از برگ گیاهان تاریخته و شاهد (غیرتاریخته) انجام گفت. نمونه‌ها بالافصله پس از جدا کردن از گیاه در ازت مایع پودر شدند. سپس برگ‌ها در هاون استریل با استفاده از ازت مایع پودر شدند. استخراج دی.ان.ای به روش دلایپورتا و همکاران (1998) انجام گرفت. کیفیت و کمیت دی.ان.ای‌های استخراج

روغن گیاهی یکی از کالاهای مصرفی در سبد غذایی مردم است. کلزا یک گیاه مهم روغنی است و در میان گیاهان روغنی مقام دوم را به خود اختصاص داده است (MacLeod and Ogilvy, 1982). کلزا^۲ گیاهی متعلق به خانواده براسیکاسه،^۳ یک‌ساله و خودگشن با حدود ۳۰ درصد دگرگشتنی است. گیاهان خانواده براسیکاسه به طور معمول دانه‌های خود را به وسیله سازوکار شکستن غلاف پراکنده می‌کنند. اگرچه باز شدن غلاف یک سازوکار مفید برای پراکنده‌ی دانه‌ها در طبیعت است، اما یکی از مشکلات مهم زراعت کلزا است. در صورتی که برداشت به تاخیر بیافتد ریزش دانه می‌تواند تا ۵۰ درصد عملکرد محصول را کاهش دهد (Child and Evans, 1989; Prince et al., 1996) دانه‌های کلزای ریخته شده، برروی زمین باقی می‌مانند و در تناوب با گیاه بعدی به عنوان علف هرز باعث ایجاد مشکلاتی می‌شوند (Gulden et al., 2003). باز شدن غلاف از نظر ریخت‌شناسی^۴ به شکل منطقه شکوفایی وابسته است. منطقه شکوفایی شامل یک لایه‌ی چند سلولی است که دیواره میانی^۵ را از مرز پریکارپ^۶ پوشش غلاف جدا می‌سازد، (شکل ۱) (Wang et al., 2007). در گیاه آرابیدوپسیس تعدادی ژن شناسایی شده‌اند که در شکل‌گیری و تنظیم منطقه باز شدن غلاف شرکت Gu et al., 1998; Lilgegren et al., 2000; Dinneny and Darnd (Dinneny and Yanofsky, 2005) شده‌اند که در شکل‌گیری و تنظیم منطقه باز شدن غلاف شرکت Spence et al., 1996; Roberts et al., 2002). این ژن‌ها شامل *IND ALC SHP2 FUL SHP1* و *RPL* هستند. بعضی از این ژن‌ها با اثر برروی منطقه شکوفایی باعث تشدید ریزش دانه می‌شوند. که ژن‌های *SHP2 SHP1* و *RPL* از *ALC* و *IND* از این جمله هستند. در مقابل ژن‌های *FUL* و *IND* با اثر برروی سلول‌های منطقه شکوفایی باعث کاهش ریزش دانه

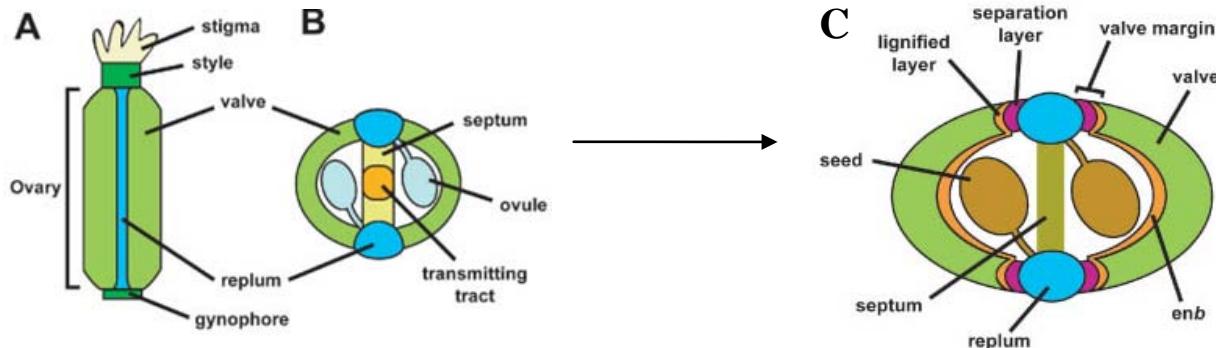
1- *Brassica napus* L.

2- Brassicaceae

3- morphology

4- replum

5- valve margin



شکل ۱- شماتیک غلاف و قسمت‌های مختلف آن

(Dinneny and Yanofsky, 2004). **A**- ساختار بیرونی غلاف. **B**- برش عرضی غلاف بالغ. **C**- برش عرضی غلاف مختلط آن**Figure 1- Schematic view of pod.**

A-Exterior structure of pod. B- Transverse cross section of pod. C- Transverse cross section of mature pod (Dinneny and Yanofsky, 2004)..

گرفتند، سپس در هاون استریل با استفاده از ازت مایع پودر شدند. استخراج آر.ان.ای کل از گیاهان فوق با استفاده از RNasy Mini Kit شرکت QIAGEN انجام گرفت. به منظور اطمینان از کیفیت و کمیت آر.ان.ای استخراج شده، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های Nanodrop ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Nanodrop 2000) خوانده شد. آر.ان.ای‌های استخراج شده بوسیله بارگذاری در ژل آگارز نیز تعیین کیفیت شدند. آر.ان.ای‌ها با آنزیم DNase I تیمار شدند. ساخت cDNA با استفاده از کیت (BIO-RAD, iScript cDNA synthesis kit) انجام گرفت.

شده، بوسیله بارگذاری در ژل آگارز و با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Nanodrop 2000) تعیین شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (آزمون پی.سی.آر)

آزمون پی.سی.آر با استفاده از دی.ان.ای‌های استخراج شده و آغازگرهای اختصاصی ژن *BnFUL* که کمترین اختصاصیت را با ژن‌های خانواده MADS-box دارا هستند (با توالی F:AAGATAGAGAGATGGGAAG (R:CGCGAGGTAACCCAATCAACGACGATGTAC انجام گرفت.

آزمون Real Time-PCR

بیان ژن مورد نظر توسط Real Time-PCR در سه تکرار آزمایشی با استفاده از کیت (BIO-RAD, iQ Syber Green Supermix) (iCycler iQ realtime-PCR, Bio-Rad) درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول کیت به همراه یک میکرولیتر از هر آغازگر و یک میکرولیتر cDNA و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر ریخته شد. ابتدا جهت آزمون Real Time-PCR منحنی‌های استاندارد رسم شد. بر این اساس و با استفاده از آغازگرهای ژن *BnFUL* و آغازگرهای ژن گلیسرول-۳-فسفات دهیدروژناز^۷ (*GAPDH*) (با توالی

آزمون لکه‌گذاری سادرن

برای این منظور دی.ان.ای‌ها توسط آنزیم *Hind* III به مدت یک شب مورد هضم قرار گرفتند و سپس در ژل آگارز یک درصد بارگذاری شدند. مراحل انتقال به غشا، شستشو و رنگ‌آمیزی با استفاده از دستورالعمل سمبروک و راسل (۲۰۰۱) انجام گرفت.

استخراج ریبونوکلئیک اسید (آر.ان.ای) و ساخت دی.ان.ای مکمل (cDNA)

نمونه‌برداری از غلاف، ۴ هفته پس از گردەافشانی انجام گرفت. نمونه‌ها بلا فاصله پس از جدا کردن از گیاه در ازت مایع قرار

7- Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

پروژه‌های ایجاد گیاهان ترا ریخته لاین‌های حاوی تک نسخه ترازن مطلوب هستند تا در نسل‌های بعدی از ثبات ژنتیکی بهتری برخوردار باشند این موضوع می‌تواند در ادامه این بررسی مورد توجه قرار گیرد.

نمودارهای ذوب آزمون Real Time-PCR نشان دادند که آغازگرهای ژن‌های *BnFUL* و *GAPDH* به صورت اختصاصی عمل کردند زیراکه در نمودارهای ذوب برای هر ژن یک نقطه اوج اختصاصی مشاهده می‌شود و نمودارهای تکثیر نشان دادند که میزان بیان در نمونه‌های مختلف متفاوت است. به طور کلی نتایج آزمون Real Time-PCR نشان داد که بیان ژن *BnFUL* در گیاهان تاریخته از هر سه رقم نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است. در گیاهان تاریخته رقم Licord بیشترین افزایش بیان مشاهده می‌شود و گیاهان تاریخته رقم‌های Okapi و RGS003 به ترتیب پس از Licord مقام‌های دوم و سوم را دارند (شکل ۹). این نتایج نشان می‌دهد که حضور نسخه‌ی یا نسخه‌های جدیدی از ژن *BnFUL* در گیاه کلزا باعث افزایش بیان این ژن شده و با توجه به گزارش استرگاردن و همکاران در سال ۲۰۰۶ می‌تواند در کاهش ریزش دانه موثر باشد.

اثر تعداد نسخه تراژن بر سطح بیان ژن پیچیده است. هرچند انتظار می‌رود که افزایش تعداد نسخه ژن باعث افزایش بیان شود، اما به تجربه دیده می‌شود که گاهی تعداد نسخه‌های زیاد باعث هم‌فرونشانی^۹ و خاموشی ژن^{۱۰} می‌شود (Vaucheret et al., 1998). تعداد نسخه تراژن می‌تواند به طور مثبت یا منفی با میزان بیان تراژن ارتباط داشته باشد (Hobbs et al., 1993). در برخی موارد، یک نسخه منفرد از تراژن می‌تواند خاموش شود (Elmayan et al., 1996). به طور کلی، فرض می‌شود که انتخاب گیاهان با تعداد نسخه کمتر پدیده هم‌فرونشانی ژن را کاهش خواهد داد (Dai et al., 2001). دایی و همکاران در سال ۲۰۰۱ بیان کردند که گیاهان برنج تاریخته‌ای که تعداد نسخه‌های زیادتری از تراژن را داشتند سطح فعالیت ژن گاس^{۱۱} کمتری داشتند و پیشنهاد کردند که بیان کم ژن ممکن است به خاطر مکانیسم خاموش شدن باشد (Dai et al., 2001).

و F:AGAGCCGCTTCCTTCTCAACATCAT
(R:TGGGCACACGGAAGGACATAACC)
خانه‌دار^۱ نمودارهای تکثیر و ذوب رسم شدند و آزمون سطح بیان
ژن انجام گرفت. میزان بیان ژن با استفاده از روش T-ΔΔC² میزان بیان ژن
حدود آستانه ژن GAPDH نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان
ژن در گیاهان تاریخته نسبت به شاهد (غیرتاریخته) سنجیده شد.

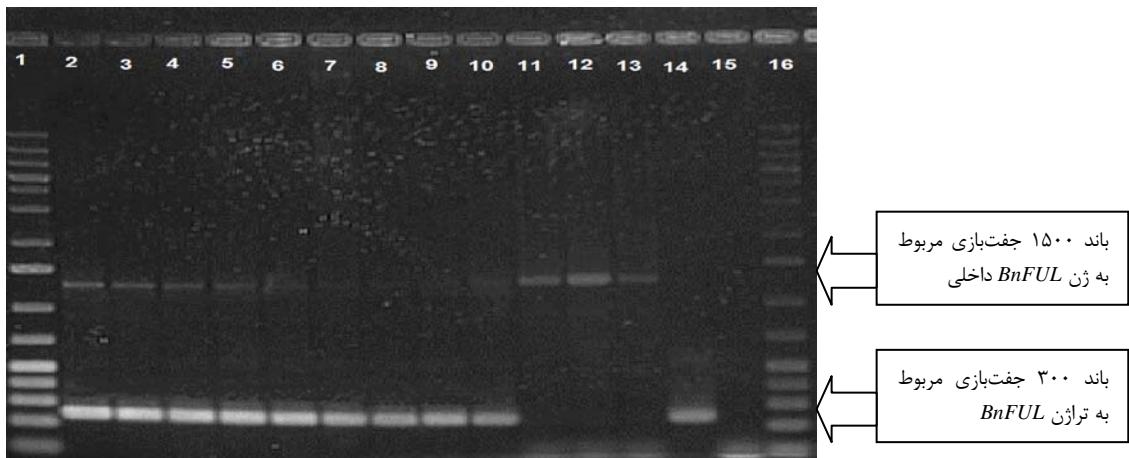
نتایج و بحث

بررسی گیاهان تاریخته فرضی با استفاده از آزمون پی.سی.آر، حضور تراژن در گیاهان تاریخته از هر سه رقم را تایید کرد. با توجه به شکل ۲ دو سری باند مشاهده می‌شود، یکسری باند که در تمام گیاهان (اعم از تاریخته و شاهد) مشاهده می‌شود مربوط به ژن *BnFUL* داخلی گیاه است که به دلیل حضور ایترون‌ها قطعه بزرگ‌تری را نسبت به ژن *BnFUL* وارد شده به گیاهان تاریخته دارد و سری دوم که کوچکتر است قطعه تکثیری ژن وارد شده به گیاهان تاریخته (تراژن) است. قطعه تکثیری اول مربوط به ژن داخلی گیاه در گیاهان تاریخته و شاهد قابل مشاهده است در صورتی که در پلاسمید مشاهده نمی‌شود. قطعه تکثیری دوم مربوط به ژن وارد شده به گیاهان تاریخته است که در گیاهان تاریخته و پلاسمید قابل مشاهده است. قابل ذکر است که اندازه قطعه تکثیری ژن داخلی در گیاهان شاهد و تاریخته یکسان است و اندازه قطعه تکثیری ژن وارد شده در گیاهان تاریخته و پلاسمید یکسان است (شکل ۲). این نتایج نشان می‌دهند که گیاهان تاریخته علاوه بر ژن *BnFUL* داخلی دارای تراژن *BnFUL* نیز هستند در حالی که گیاهان شاهد تنها دارای ژن *BnFUL* داخلی هستند. این آزمون اولین گام در اثبات حضور تراژن در گیاهان تاریخته است.

نتایج آزمون لکه‌گذاری سادرن نشان داد که گیاهان تراریخته از رقم Okapi دارای حداقل سه نسخه از تراژن، گیاهان تراریخته از رقم Licord یک نسخه از تراژن و گیاهان تراریخته از رقم RGS003 دو نسخه از تراژن را دارا هستند (شکل ۳). از آنجایی که در

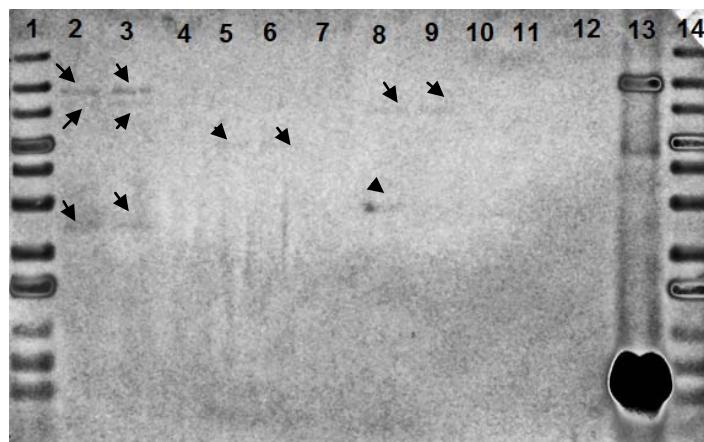
- 9- co-suppression
- 10- gene silencing
- 11- GUS activity

8- housekeeping gene



شکل ۲- تکثیر ژن *BnFUL* در گیاهان تراریخته و غیرتراریخته با استفاده از آزمون پی.سی.آر (چاهک‌های ۱ و ۱۶ ۱ kb plus ladder؛ چاهک‌های ۲ تا ۱۰ گیاهان تراریخته؛ چاهک‌های ۱۱ تا ۱۳ گیاهان شاهد؛ چاهک ۱۴ پلاسمید و چاهک ۱۵ کنترل منفی با آب)

Figure 2- Amplification of *BnFUL* gene in transgenic and nontransgenic plants using PCR.
(wells 1 and 16 1 kb plus ladder; wells 2 to 10 transgenic plants; wells 11 to 13 wild type plants; well 14 plasmid and well 15 negative control of water)

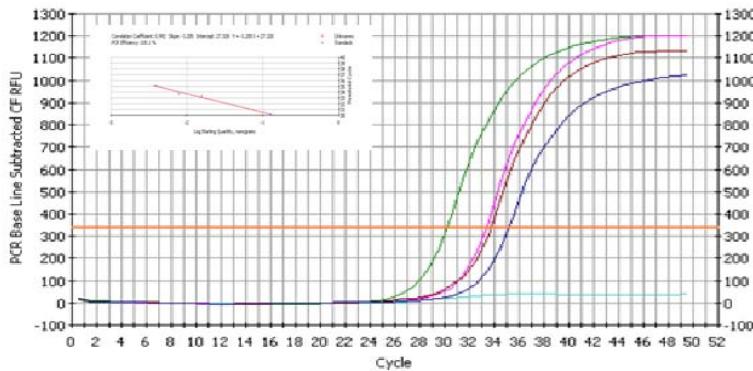
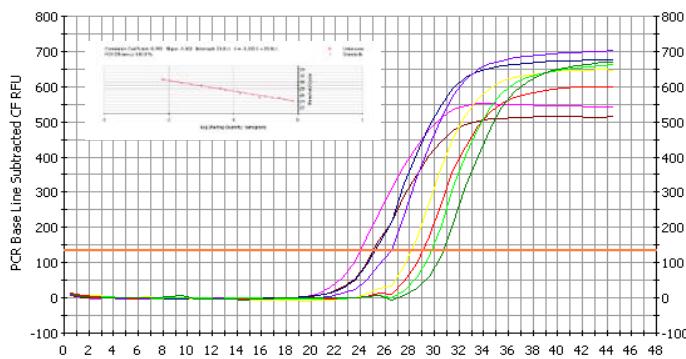


شکل ۳- نتیجه آزمون لکه‌گذاری سادرن.

چاهک‌های ۱ و ۱۴ ۱ kb plus ladder؛ چاهک‌های ۲ و ۳ هضم آنزیمی دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم Okapi؛ چاهک ۴ دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم RGS003؛ چاهک‌های ۵ و ۶ هضم آنزیمی دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم RGS003؛ چاهک ۷ دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم Licord؛ چاهک ۸ و ۹ هضم آنزیمی گیاه تراریخته از رقم Licord؛ چاهک ۱۰ دی.ان.ای گیاه تراریخته از رقم Licord، چاهک ۱۱ هضم آنزیمی گیاه شاهد، چاهک ۱۲ دی.ان.ای گیاه شاهد و چاهک ۱۳ هضم آنزیمی پلاسمید)

Figure 3- Southern blot analysis results.

(1 and 14 wells: 1 kb plus ladder; 2 and 3: digested DNA from transgenic plants of Okapi cultivar; 4: DNA from transgenic plant of Okapi cultivar; 5 and 6: digested DNA from transgenic plants of RGS003 cultivar; 7: DNA from transgenic plant of RGS003 cultivar; 8 and 9: digested DNA from transgenic plants of Licord cultivar; 10: DNA from transgenic plant of Licord cultivar; 11: digested DNA from ctr. Plant; 12: DNA of ctr. Plant and 13:digested DNA from Plasmid)

شکل ۴- نمودار استانداردسازی آزمون *BnFUL* برای ژن *BnFUL* realtime-PCR**Figure 4-** Standard Curves in realtime_ PCR for *BnFUL* gene.شکل ۵- نمودار استانداردسازی آزمون *GAPDH* برای ژن *GAPDH* realtime-PCR**Figure 5-** Standard Curves in realtime-PCR for *GAPDH* gene

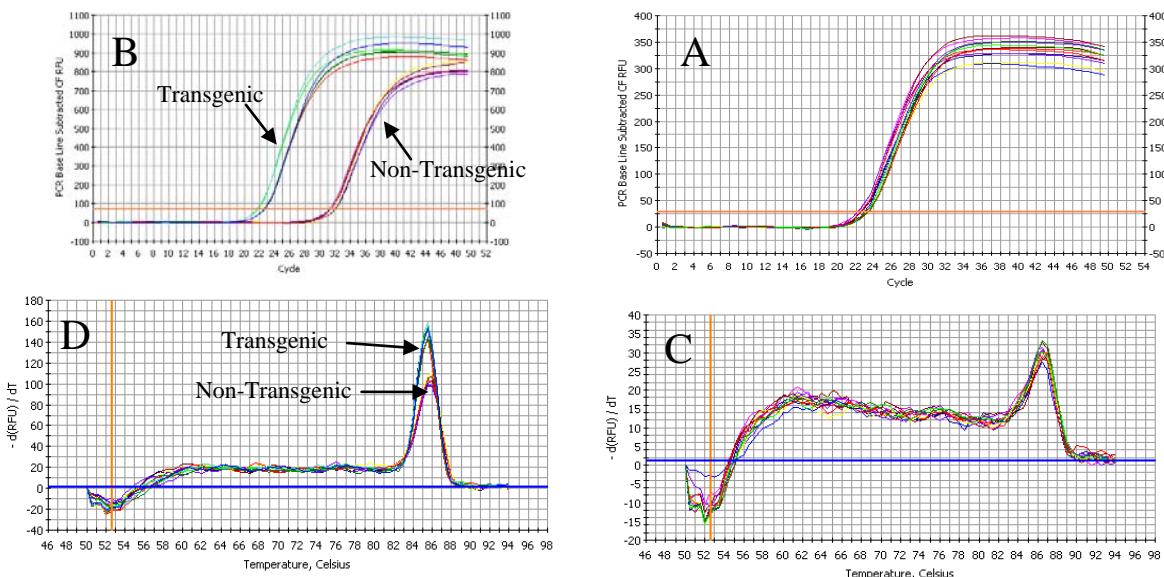
تعداد نسخه متفاوتی از تراژن در گیاهان تراریخته رقم‌های مختلف مشاهده می‌شود. در گیاهان تراریخته رقم RGS003 تعداد یک نسخه تراژن وارد شده است و در نتایج آزمون Real Time-PCR می‌بینیم که این گیاهان نسبت به گیاهان تراریخته رقم دیگر بیان کمتری دارند. در صورتی که بیان ژن را در گیاهان دو رقم دیگر مقایسه کنیم خواهیم دید که گیاهان تراریخته رقم Okapi با تعداد نسخه تراژن بیشتر نسبت به گیاهان تراریخته رقم Licord بیان کمتری را دارند. این موضوع به احتمال زیاد با اثر محل ورود تراژن در ژنوم گیاهان تراریخته ارتباط دارد. با توجه به نتایج این پژوهش انتظار می‌رود لاین‌های تراریخته تولید شده قادر باشند در شرایط نامناسب محیطی تحمل بهتری به ریزش نشان دهند. در این زمینه بررسی‌های فنوتیپی برای ارزیابی تحمل آنها به ریزش دانه در شرایط تنفس ضروری است.

در انتقال‌های مستقل، تراژن در محل‌های متفاوتی در ژنوم گیاه وارد می‌شود. این موضوع باعث می‌شود که سطوح بیان تراژن در انتقال‌های منفرد با تعداد نسخه یکسان از تراژن، متفاوت باشد. در نتیجه، تفاوت‌های کمی در بیان تراژن به تفاوت اثرهای دی.ان.ای کروموزومی مجاور تراژن نسبت داده می‌شود. این تفاوت‌های کمی که به محل ورود تراژن در ژنوم بستگی دارند با عنوان اثر Blundy et al., 1991; Dean et al., 1998 (Shanahan et al., 1991; Melynarova et al., 1994; Peach and Veltern, 1991). ساختار کروماتین در اطراف هر محل تراژن^{۱۲} متفاوت است و ممکن است باعث تفاوت در دسترسی عوامل رونویسی شود (Dean et al., 1998).

در پژوهش حاضر، با توجه به نتایج آزمون لکه‌گذاری سادرن

12- position effect

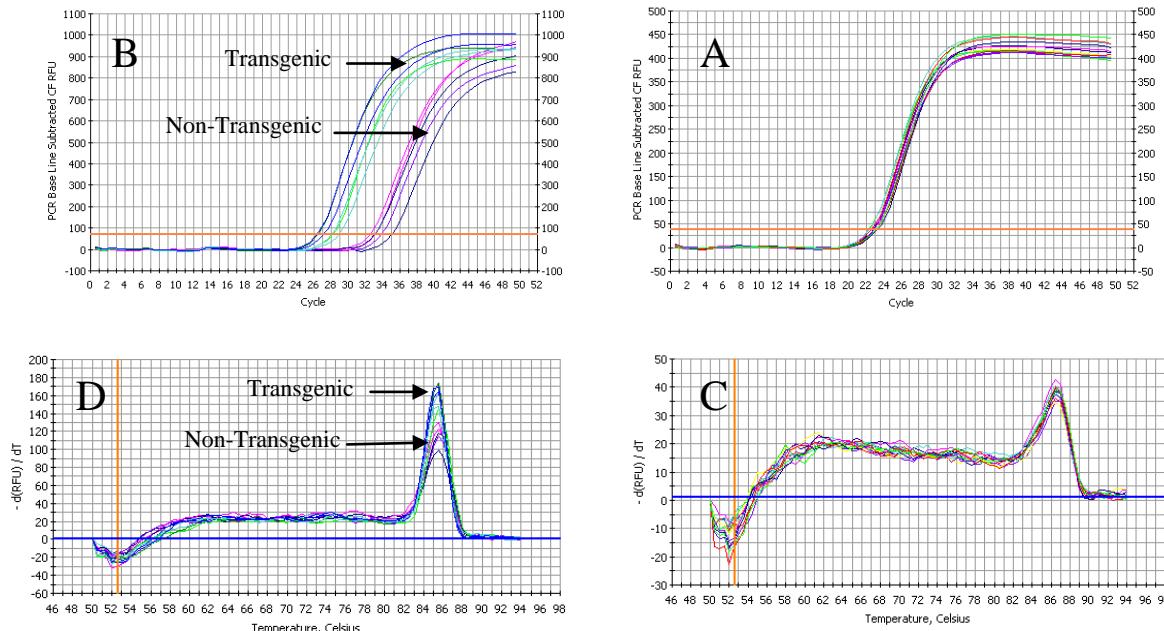
13- transgene locus



شکل ۶- نمودارهای تکثیر و ذوب مربوط به گیاهان تراریخته و شاهد رقم Licord

A-نمودار تکثیر ژن *GAPDH*. B-نمودار تکثیر ژن *BnFUL*. C-نمودار ذوب ژن *GAPDH*. D-نمودار ذوب ژن *BnFUL*

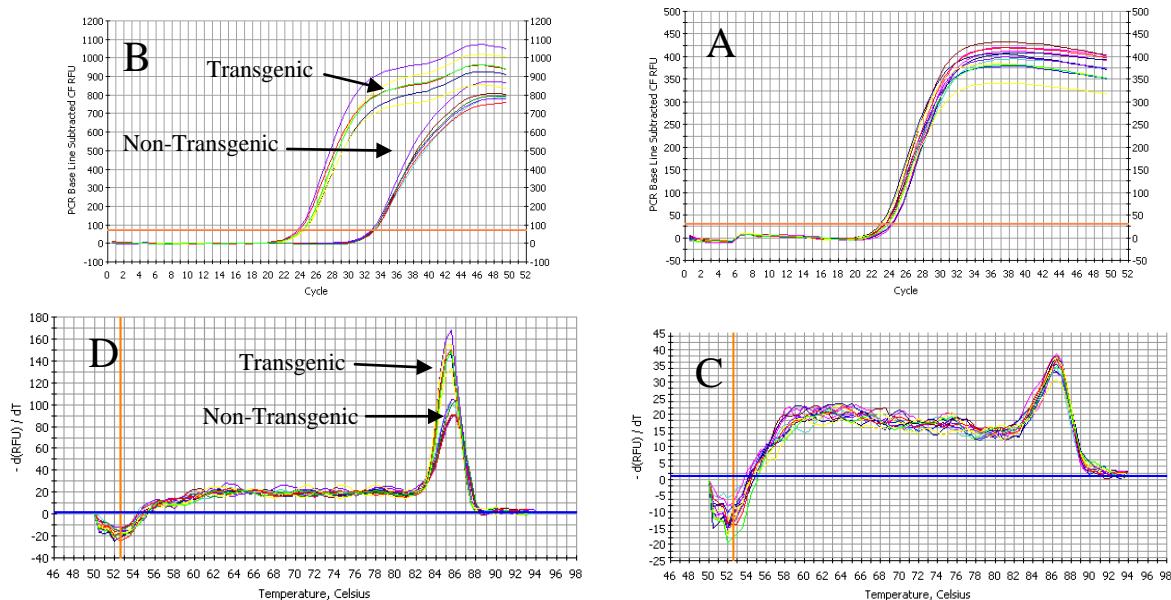
Figure 6- Amplification Curves and Melt Curves of transgenic and non-transgenic plants of Licord cultivar.
A-Amplification Curve of *GAPDH* gene. B-Melt Curve of *BnFUL* gene. C- Amplification Curve of *GAPDH* gene.
D-Melt Curve of *BnFUL* gene.



شکل ۷- نمودارهای تکثیر و ذوب مربوط به گیاهان تراریخته و شاهد رقم RGS

A-نمودار تکثیر ژن *GAPDH*. B-نمودار تکثیر ژن *BnFUL*. C-نمودار ذوب ژن *GAPDH*. D-نمودار ذوب ژن *BnFUL*

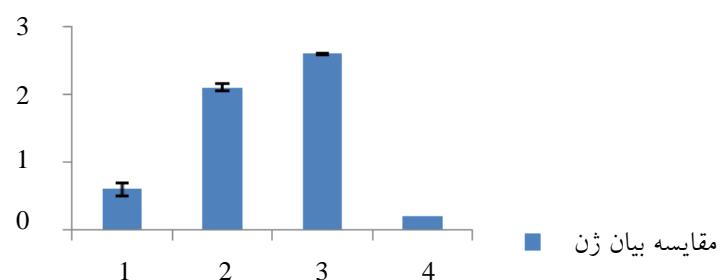
Figure 7- Amplification Curves and Melt Curves of transgenic and non-transgenic plants of RGS cultivar.
A-Amplification Curve of *GAPDH* gene. B-Melt Curve of *BnFUL* gene. C- Amplification Curve of *GAPDH* gene.
D-Melt Curve of *BnFUL* gene.



شکل ۸- نمودارهای تکثیر و ذوب مربوط به گیاهان تراریخته و شاهد رقم .Okapi

A-نمودار تکثیر ژن *GAPDH* .B-نمودار ذوب ژن *BnFUL* .C-نمودار تکثیر ژن *GAPDH* .D-نمودار ذوب ژن *BnFUL*

Figure 8- Amplification Curves and Melt Curves of transgenic and non-transgenic plants of Okapi cultivar.
A-Amplification Curve of *GAPDH* gene. B-Melt Curve of *BnFUL* gene. C- Amplification Curve of *GAPDH* gene.
D-Melt Curve of *BnFUL* gene.



شکل ۹- نمودار مقایسه بیان ژن *BnFUL* در گیاهان شاهد و تراریخته
(ستون شماره ۱ مربوط به گیاهان شاهد، ستون شماره ۲ مربوط به گیاهان تراریخته رقم Licord، ستون شماره ۳ مربوط به گیاهان تراریخته رقم RGS003
و ستون شماره ۴ مربوط به گیاهان تراریخته رقم Okapi)

Figure 9- Comparing in gene expression for *BnFUL* gene in transgenic and non-transgenic plants.
(The first Colum is related to non-transgenic plants, The second Colum is related to transgenic plants of licord Cultivar, The third Colum is related to transgenic plant of RGS003 cultivar, The forth Colum is related to transgenic plants of Okapi cultivar.)

منابع

- Asadi S. 2008. Study over-expression of the *FUL* gene in oilseed rape. M Sc. Thesis, University of Zabol.
- Blundy KS, Blundy MAC, Carter D, Wilson F, and Park WD. 1991. The expression of class I patatin gene fusions in transgenic potato varies with both gene and cultivar. Plant Molecular Biology 16, 153-160.
- Child RD, and Evans DE. 1989. Improvement of recoverable yields in oilseed rape (*Brassica napus*) with growth retardants. Aspect Applied Biology. 23:135-144.
- Dinneny JR, and Yanofsky MF. 2005. Drawing lines and borders: how dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. BioEssays 27:42-49.

5. Dai Sh, Zheng P, Marmay Ph, Zhang Sh, Tian W, Chen Sh, Beachy RN, and Fauquet C. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7:25-33.
6. Dean C, Jones J, Favreau M, Dunsmuir P, and Bedbrook J. 1998. Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nucleic Acid Research* 16, 9267-9283.
7. Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB. 1983. A plant DNA minipreparation version II. *Plant Molecular Biology*, 1:19-21.
8. Elmayan T, and Vaucheret H. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35s transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal*. 9:787-797.
9. Gu Q, Ferrandiz C, Yanofsky MF and Martienssen R. 1998. The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*. 125:1509-1517.
10. Hobbs ShLA, Warkentin TD, and DeLong CMO. 1993. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology*, 21: 17-26.
11. Lijegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, and Yanofsky MF. *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. 2000. *Nature*. 404:766-770.
12. MacLeod J, and Ogilvy S. 1982. Harvesting winter oilseed rape. *Journal of Scientific Food Agriculture*. 33:1265-1266.
13. Mlynarova LA Loonen, Heldens J, Jansen RC, Keizer P, Stiekema WJ, and Nap JP. 1994. Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. *Plant Cell*, 6:417-426.
14. Ostergaard L, Kempin ShA, Bies D, Klee HJ, and Yanofsky MF. 2006. Pod shatter-resistant *Brassica* fruit produced by ectopic expression of the *FRUITFULL* gene. *Biotechnology Journal*. 4:45-51.
15. Peach C, and Velten J. 1991. Transgene expression variability position effect of CAT and Gus reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Molecular Biology*, 17:49-60.
16. Price JS, Hobson RN, Neale MA and Bruce DM. 1996. Seed losses in commercial harvesting of oilseed rape. *Journal of Agriculture Engineering Research*. 65:183-191.
17. Robles P, and Pelaz S. 2002. Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int. Dev. Biot*. 49:633-643.
18. Seifi AR, Shakib AM. 2005. Construction of a cDNA library and its isolation. Final Reports, Agricultural Research, Education and Training Organization, 84/1469.
19. Shakib AM, Seif, A, Ahmad Raji M, Oroojloo M. 2007. Cloning of BnSHP gene on suitable vector and transferring into oilseed rape. Final Reports, Agricultural Research, Education and Training Organization, 86/1199.
20. Spence J, Vercher Y, Gates P, and Harris N. 1996. Pod shatter in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*. *Journal of Microscopy*. 2:195-203.
21. Sambrook J, and Russel D. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
22. Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, and Vernhettes S. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal*. 16:651-659.
23. Wang R, Ripley VL and Rakow G. 2007. Pod shatter resistance evalution in cultivars and breeding lines of *Brassica napus*, *B. juncea* and *Sinapis alba*. *Plant Breeding*. 126:588-595.

کشت بافت و تراریزش نارنج (*Citrus aurantium*) با استفاده از ژن کد

کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CTV)

بنفشه فتاح^۱، محمدمهری سوهانی^{۲*}، عبدالله حاتم‌زاده^۳، علیرضا افشاری‌فر^۴، بهروز گلعین^۵، محمدحسین رضادوست^۶، محمدرضا میرزاچی^۷، امیرحسین زمانی^۸

۱، ۷ و ۸- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان

۲، ۳ و ۶- به ترتیب استادیار، دانشیار و مریب دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان

۴- عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی- دانشگاه شیراز

۵- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات مرکبات کشور- رامسر

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

Agrobacterium tumefaciens

اپی‌کوتیل

اندامزایی مستقیم

تنظیم کننده‌های رشد

زخمزنی

در این پژوهش به منظور به دست آوردن گیاهان تراریخته نارنج، از ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و هیبوکوتیل نارنج استفاده و بهبود اندامزایی مستقیم و تولید شاخساره در ریزنمونه‌ها با استفاده از تیمارهای مختلف بررسی شدند. تراریزش از طریق هم‌کشی ریزنمونه‌ها با *Agrobacterium tumefaciens* سویه‌ی EHA105 حامل وکتور FGC5941 pFGC5941 و ژن کد کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CTV) انجام شد. پس از تراریزش، ریزنمونه‌ها به محیط کشت اختیابی حاوی علف‌کش بستا با ترکیبی از سطوح تنظیم کننده‌های رشد BAP (۰،۰۰۰،۰۰۰،۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰،۰۰۰،۰۰۰،۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. اثر زخم زدن بر اندامزایی مستقیم و تولید شاخساره و اثر استفاده از وکیوم بر کارایی تراریزش، بررسی شدند. تأیید تراریخته بودن شاخساره‌ها در محیط اختیابی حاوی علف‌کش بستا و انجام واکنش پی‌سی‌آر با ژن‌های اختصاصی صورت گرفت. بهترین کارایی اندامزایی یا تولید شاخساره (۵۷ درصد) با استفاده از ترکیب تنظیم کننده‌های رشد به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد ضمن این که، زخم زدن اثر معنی‌داری بر تولید شاخساره نداشت. بالاترین میزان شاخساره‌های تراریخته به میزان ۱۱/۰۰۰ دزصد در تیمار وکیوم به دست آمد. در نهایت شاخساره‌های تراریخته بر روی دانه‌الهای رشد یافته در شرایط *in vitro* ریزی‌بیوند شدند.

مقدمه

(2004). پنا و همکاران از سویه‌ی EHA105 اگروباکتریوم برای ترانسفورماسیون قطعات اپی‌کوتیل دانهال‌های رشد یافته در شرایط *in vitro* و بخش‌های میان‌گرهای ساقه گیاهان جوان (Pena *et al.* 1995a; 1995b; 1997) استفاده کردند (Bar-Joseph *et al.* 1989). گزارش‌های زیادی از واردکردن تعدادی از ژن‌های مهم به مرکبات از جمله ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات منتشر شده است (Yang *et al.* 2000).

هدف از این پژوهش افزایش کارآیی اندام‌زایی مستقیم در ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل نارنج در محیط انتخابی و بررسی شرایط و عوامل دخیل در افزایش کارآیی تاریخته‌سازی شاخصاره‌های نارنج پس از هم‌کشتی با اگروباکتریوم بوده است.

مواد و روش‌ها

جهت تهیه ریزنمونه، میوه‌های تازه‌ی نارنج از مرکز تحقیقات مرکبات کشور، رامسر تهیه شد. بذور نارنج از میوه‌های تازه و سالم خارج شده و پس از جدا کردن پوسته خارجی، ضد عفونی سطحی شدند. برای ضد عفونی، بذرها در محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم به همراه توئین $^{20} \text{Ba}$ غلظت ۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به آرامی تکان داده شده سپس ۳ مرتبه با آب استریل ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد هر مرتبه به مدت ۳ دقیقه شستشو شدند. در ادامه بذور به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته و ۳ مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذرها ضد عفونی شده به محیط جوانه‌زنی شامل نمک‌های محیط کشت MS ۱/۲ ویتامین‌های کامل محیط کشت MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکاراز منتقل و برای مدت ۴ تا ۶ هفته در 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

ژن موزاییک پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CP-P25) مربوط به نژادهای CTV1 و CTV2، ایزوله شده در قطب علمی ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز، استفاده شد. توالی‌های مذکور در یک ناقل خاموشی به نام ABRC pFGC5941 (Zamani 2008).

در این پژوهش از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* نژاد

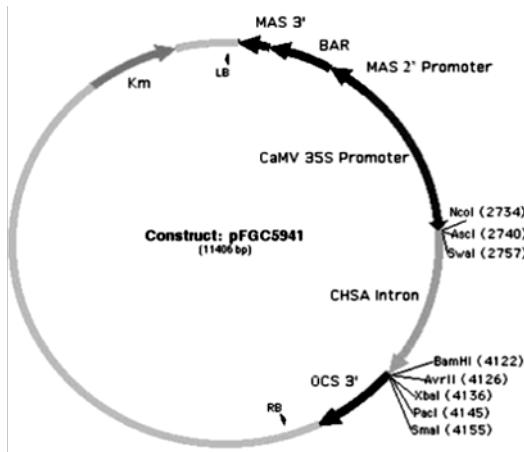
درخت نارنج (*Citrus aurantium*) به دلیل ویژگی‌های خوب زراعی به خصوص مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و اثر آن بر عملکرد و کیفیت میوه‌ی پیوندک مورد توجه بوده و در بیشتر مناطق مرکبات خیز دنیا پایه‌ی مادری است. اما ضعف بزرگ این گیاه عدم تحمل به ویروس تریستزای مرکبات (CTV¹) است که از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت مرکبات به شمار می‌آید و منجر به نابودی میلیون‌ها اصله درخت در سرتاسر دنیا شده است (Bar-Joseph *et al.* 1989). بنابراین، یکی از اهداف مهم در اصلاح مرکبات ایجاد مقاومت نسبت به بیماری تریستزا است. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای ایجاد مقاومت به ویروس تریستزا انجام شده است. این روش‌ها بیش‌تر متکی بر خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS²) است که بر اساس بیان توالی‌های ویروسی در گیاه استوار است (Dominguez *et al.* 2002).

مرکبات دارای محدودیت‌هایی برای اصلاح به روش‌های سنتی هستند که بیشتر با زیست‌شناسی تولید مثل آن‌ها مانند چند جنبینی نوسکار، سطح بالای هتروزیگوستی و دوره‌ی طولانی جوانی آن‌ها در ارتباط است (Grosser and Gmitter 1990). امروزه انتقال ژن با استفاده از مهندسی ژنتیک به یک روش جایگزین مناسب برای اصلاح مرکبات و دیگر گونه‌ها تبدیل شده است زیرا با استفاده از این روش می‌توان علاوه بر حفظ ویژگی‌های مطلوب یک رقم، یک صفت دلخواه را در یک دوره زمانی تا حدودی کوتاه‌تر به آن افروز (Bond and Roose 1998).

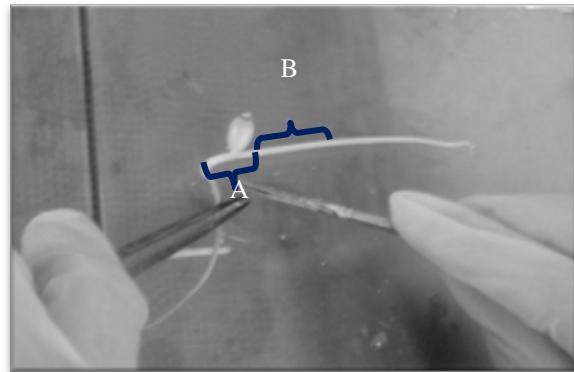
انتقال ژن به ریزنمونه‌های جوان به واسطه‌ی اگروباکتریوم روشی متداول برای تولید گیاهان مرکبات تاریخته است. تراریزش نارنج از طریق کشت بافت ریزنمونه‌های مختلف از جمله اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل، هم‌کشتی آن‌ها با اگروباکتریوم و سپس بازازایی از ریزنمونه‌ها به گیاه تاریخته انجام می‌شود (Moore *et al.* 1992; Pena *et al.* 1995a). بازازایی بیشتر به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم است. در روش مستقیم، ابتدا جوانه‌ها و سپس شاخصاره بر روی ریزنمونه‌ها تولید می‌شود اما، در روش بازازایی غیرمستقیم قبل از ظهور اندام‌ها کالوس تشکیل می‌شود (Phillips;

1- Citrus tristeza virus

2- Post transcriptional gene silencing



شکل ۱- نقشه ژنتیکی ناقل خاموشی pFGC5941

Figure 1- Map of pFGC5941 silencing vector

شکل ۲- قسمت‌های مورد استفاده‌ی گیاهچه‌های حاصل از بذور نارنج برای تهیه‌ی ریزنمونه. (A) ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل، (B) ریزنمونه‌ی اپیکوتیل.

Figure 2- Explant sources from sour orange (*C. aurantium*). A) Hypocotyl segments-derived explant, B) Epicotyl segments-derived explants.

هیپوکوتیل، گره کوتیلدونی و بخشی از اپیکوتیل و دیگری نزدیک‌ترین بخش اپیکوتیل به گره کوتیلدونی بود (شکل ۲). در تیمار زخم‌زنی، یک برش طولی به اندازه‌ی تقریبی ۲ میلی‌متر در دو انتهای ریزنمونه‌ها ایجاد و اثر آن در کارایی اندام‌زایی بررسی شد.

قطعات اپیکوتیل و هیپوکوتیل آماده شده جهت تراریزش در سوسپانسیون اگروباکتریوم تهیه شده در محیط تلقیح شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکاراز و ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون با pH=۵/۷ غوطه‌ور شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد به آرامی تکان داده شدند. تعدادی از ریزنمونه‌ها پس از شناور شدن در محلول باکتری، با دستگاه وکیوم (Eppendorf) تحت شرایط خلا قرار گرفتند تا میزان اثر آن بر کارایی تراریزش بررسی شود. عمل وکیوم مدت ۳۰ ثانیه و تا خروج حباب از محلول محیط کشت انجام شد. ریزنمونه‌های تلقیح شده از محلول باکتری خارج و بر روی کاغذهای صافی استریل خشک شدند. در نهایت ریزنمونه‌ها به پلیت‌های حاوی محیط هم‌کشتی شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ویتامین‌های محیط B5، ۳۰ گرم در لیتر ساکاراز، ۸ گرم در لیتر آگار و تنظیم کننده‌های رشد مربوط با pH=۵/۷ متنقل شدند.

در آزمایش‌های مربوط به بررسی اثر سیتوکینین و اکسین بر

EHA105 استفاده شد. ناقل خاموشی pFGC5941 با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن (Bio-Rad) به اگروباکتریوم انتقال یافت. کد شناسایی این پلاسمید در بانک اطلاعاتی AY310901 و شماره‌ی آن CD3-447 است. pFGC5941 دارای ژن *nptII* عامل ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین در باکتری، ژن ⁴ BAR عامل ایجاد مقاومت به علف‌کش غیرانتخابی آمونیوم گلوفوزینیت با نام تجاری بستا^۱ به عنوان ساختار انتخابی گیاهی، پرموتر قوی ^۶ NOS و ترمیناتور ^۷ CaMV35S است (شکل ۱).

به منظور القای حداکثری ژن‌های بیماری‌زا (vir) اگروباکتریوم Gelvin، از دستورالعمل کشت سه روزه‌ی گلوین استفاده شد (2006). باکتری‌های رشدیافته در محیط القا با انجام سانتریفیوژ در ۶۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند و رسوب حاصل در محیط MS مایع و غلاظت $1-8/OD_{600}=0$ حل و برای تراریزش ریزنمونه‌ها استفاده شد.

گیاهچه‌های اتوله حاصل از بذور نارنج کشت شده در تاریک، برای تهیه‌ی ریزنمونه‌ها استفاده شدند. ابتدا لپه‌ها، ریشه و برگ‌ها و ساقه‌های زاید جدا شده و سپس از گیاهچه‌ها دو نوع ریزنمونه به طول تقریبی ۸ تا ۱۰ میلی‌متر تهیه شد که یکی شامل

4- Phosphinothricin acetyl transferase

5- Basta

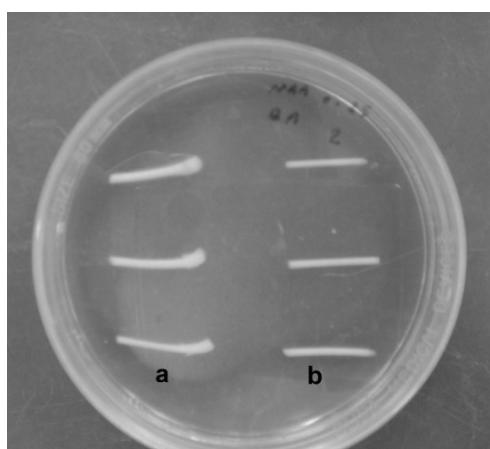
6- Cauliflower mosaic virus 35s

7- Nopaline synthase

جدول ۱- توالی های مستقیم و معکوس آغازگرهای مورد استفاده در پی.سی.آر

Table 1- Forward and reverse primer sequences used in PCR

ردیف Row	آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequence of primer	(bp) PCR Length of PCR product
1	CTV F	5'-GCTCTAGAGGCGCGCCTGCTGCTGAGTCTTCTTCG-3'	393
2	CTV R	5'-GC GGATCCATTAAATCCGTGGTGTACATCACTT-3'	
3	NOS F	5'-GAATCCTGTTGCCGGTCT-3'	167
4	NOS R	5'-TTGCGCGCTATATTGT-3'	
5	KAN F	5'-ATGTTGCTGTCTCCCAGGTC-3'	382
6	KAN R	5'-GAAAGCTGCCTGTTCAAAG-3'	



شکل ۳- ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (a) و اپیکوتیل (b) حاصل از دانهال‌های رشد یافته در تاریکی در سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA

Figure 3- Hypocotyl- (a) and epicotyl- (b) segment-derived explants from seedlings grown in the dark in media supplemented with combinations of BAP and NAA

دستورالعمل ادوارد (۱۹۹۱) استخراج و واکنش پی.سی.آر انجام شد. واکنش‌های پی.سی.آر با آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن موزاییک CTV شامل CTV F و CTV R و آغازگرهای ترمیناتور NOS شامل NOS F و NOS R انجام شد (جدول ۱). علاوه بر

بازیابی، تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد ۱، ۰ و ۲ میلی‌گرم در لیتر^۸ BAP و ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر^۹ NAA از زمان انتقال ریزنمونه‌ها به محیط هم‌کشتی اعمال شد. پس از انتقال به محیط هم‌کشتی پلیت‌ها به مدت ۳ روز در تاریکی و در دمای ۲۷±۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحلهٔ بعد ریزنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط انتخابی شامل نمک‌های کامل محیط MS و ویتامین‌های محیط B5 ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و همان ترکیب تنظیم کننده‌های رشد همراه با ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتابکسیم و ۵۰ میکرومولار علف‌کش بستا با pH=۵/۷ منتقل یافته و در دمای ۲۷±۱ درجه سانتی‌گراد در فتوپریود ۱۶ ساعته قرار گرفتند. پس از ۴ الی ۵ هفته، ریزنمونه‌هایی که دارای جوانه‌هایی به طول ۱-۲ میلی‌متر شدند به محیط رشد شاخصاره شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS و ویتامین‌های محیط B5 ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، ۱ میلی‌گرم در لیتر^{۱۰} GA₃ ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتابکسیم و ۲۵ میکرومولار علف‌کش بستا با pH=۵/۷ منتقل و هر ۲ هفته محیط کشت تعویض شد.

جهت تایید تاریخته بودن گیاهان بازیابی شده در محیط انتخابی، از نمونه‌های برگی گیاهچه‌های بازیابی شده دی. ان. ا. طبق

8- Benzylaminopurine

9- Naphthaleneacetic acid

10- Gibberellic Acid

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح BAP و NAA بر اندازایی مستقیم شاخصاره از ریزنمونه های نارنج

Table 2- Analysis of variance of effect of BAP and NAA on direct shoot organogenesis in explants of sour orange

Source	DF	MS
BAP	2	15.55**
NAA	2	1.48*
BAP*NAA	4	0.68 ns
error	36	0.43

*: معنی دار در سطح ۱٪، **: معنی دار در سطح ۰.۵٪، ns: غیر معنی دار

طول حداقل ۱-۲ میلی متر در مدت زمان حداقل ۶ هفته در محیط انتخابی تولید کرده بودند. بر این اساس، بیشترین میزان باززایی شاخصاره با مقادیر ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA به دست آمد و با دیگر تیمارها در سطح ۱ درصد اختلاف معنی داری نشان داد. در این سطح از تنظیم کننده های رشد میزان باززایی شاخصاره به ۵۷ درصد رسید. بین سطوح مختلف BAP اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد و بین تیمارهای مختلف NAA اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۲). علاوه بر این در محیط کشت های فاقد BAP هیچ اندام زایی مشاهده نشد در حالی که در محیط کشت های فاقد NAA اندام زایی صورت گرفت.

این نتایج با گزارش هایی مبنی بر لزوم وجود سیتوکینین BAP در باززایی گیاهچه و نقش حاشیه ای اکسین ها در این امر مطابقت دارد (Pena *et al.* 2004). پژوهش ها نشان داده اند که بهترین باززایی ریزنمونه های نارنج در حضور BAP در محیط کشت به دست می آید (Silva *et al.* 2008). BAP سیتوکینینی است که در مقایسه با سایر سیتوکینین ها بالاترین تعداد جوانه را در ریزنمونه های مرکبات ایجاد می کند (Moreira-Dias *et al.* 2001; Almeida *et al.* 2002; Silva *et al.* 2005; Schinor *et al.* 2006). در تعدادی از پژوهش های انجام شده روی مرکبات، باززایی در محیط کشتی انجام شده است که فقط حاوی تنظیم کننده BAP بوده است (Ghorbel *et al.* 1998). همچنین نشان

این، به منظور اجتناب از تراریخته دانستن یک گیاه به سبب حضور اگروباکتریوم در سطح آن، یک واکنش پی.سی.آر با آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن خارج KAN T-DNA ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در باکتری - عامل ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در باکتری - شامل KAN F و KAN R انجام شد (جدول ۱). در ادامه الکتروفورز محصولات پی.سی.آر روی ژل آکارز ۱ درصد بررسی و مشاهده شد.

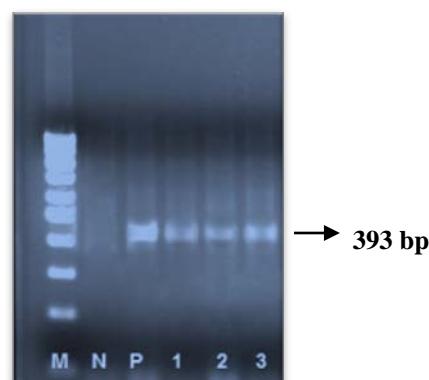
پس از این که شاخصاره های حاصل از باززایی ریزنمونه ها به اندازه حداقل ۱۰-۲۰ میلی متر رسیدند، از ریزنمونه ها جدا شده و به منظور دستیابی سریع تر و آسان تر به گیاه تراریخته کامل، بر روی دانه های نارنج رشد یافته در محیط درون شیشه ریزپیوندی شدند.

آزمایش ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. هر تیمار دارای ۵ تکرار و هر تکرار یک پتی دیش ۱۵×۸۰ میلی متر حاوی ۶ عدد ریزنمونه بود. به عبارتی هر تیمار دارای ۳۰ عدد ریزنمونه بود (شکل ۳). آنالیز داده ها به وسیله نرم افزار SAS انجام شد.

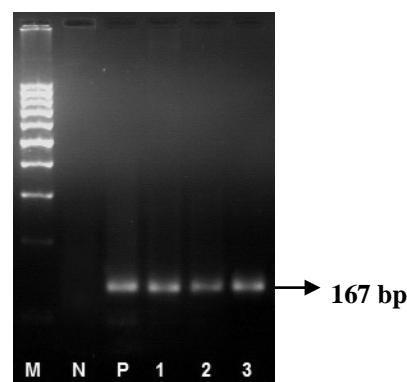
نتایج و بحث

در این پژوهش اثر ترکیبی از سطوح تنظیم کننده های رشد BAP و NAA برای اندام زایی ریزنمونه های هیپوکوتیل و اپی کوتیل تلقیح شده های نارنج بررسی شد.

فقط ریزنمونه هایی باززایی شده تلقی شدند که جوانه هایی به



شکل ۴- الکتروفورز محصولات واکنش پی.سی.آر شاخصاره‌های تراریخته با آغازگرهای ژن *CTV*, M: 100bp ladder, N: Negative control, P: Positive control, ۱، ۲، ۳: Transformed shoots.



شکل ۵- الکتروفورز محصولات واکنش پی.سی.آر شاخصاره‌های تراریخته با آغازگرهای ژن *NOS*, M: 100bp ladder, N: Negative control, P: Positive control, ۱، ۲، ۳: Transformed shoots.

شده استفاده شدند. ایجاد برش طولی انتهایی تغییر معنی‌داری در درصد ریزنمونه‌های جوانه‌دار (۵۳٪ در مقابل ۵۷٪) و میانگین تعداد شاخصاره (۲۵ در مقابل ۳۲) ایجاد نکرد. پژوهش‌های آناتومیک اندام‌زایی از اپی‌کوتیل نشان داده است که تشکیل نقاط مریستمی در کامبیوم مسئول تشکیل جوانه است (Almeida *et al.* 2003a) و زخم زنی سبب القا و تشکیل نقاط مریستمی یا تکثیر سلولی در ریزنمونه‌ها می‌شود (Escudero and Hohn 1997). از طرفی، برش طولی در تیمار زخم‌زنی سبب تماس بیشتر اگروباکتریوم با منطقه کامبیوم می‌شود و احتمال دارد حضور باکتری و اثر آن بر کامبیوم علت عدم افزایش معنی‌دار در

داده شده است که تقسیمات سلولی و تمایز سلول‌های تراریخته بیشتر در محیط بازازی حاوی ترکیبی از BAP و NAA تحریک می‌شود تا BAP به تنها (Ghorbel *et al.* 2000) این پژوهش‌ها هم‌چنین نشان می‌دهد که احتمال دارد در بیشتر ژنتیک‌ها برای تراریزش بافت بالغ افزودن NAA در غلظت‌های مناسب به محیط بازازی در توسعه بخش‌های تراریخته نقش دارد (Ghorbel *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2003b; Molinari *et al.* 2004) در تیمار زخم‌زنی، فقط بهترین سطح تنظیم کننده‌های رشد که بیشترین درصد اندام‌زایی را داشته‌اند (۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰.۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) برای کشت ریزنمونه‌های تیمار



شکل ۷- ریزپیوندی شاخساره‌های تراریخته بر روی دانهالهای رشد یافته در شرایط درون شیشه.

Figure 7- Micro grafting of transformed shoots on *in vitro* grown seedlings.

نکرده است، از آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن KAN استفاده شد که یک ژن خارج T-DNA است. شاخساره‌ها فقط در صورتی که ژن KAN در آن‌ها تکثیر نشده (و هر دو ژن CTV و NOS در آن‌ها تکثیر شده بود) تراریخته تلقی شدند (عکس ژل نشان داده نشده است).

از ۶۹ شاخساره‌ی باززایی شده از ریزنمونه‌هایی که از طریق هم‌کشتی با اگروباکتریوم تلقيق شده بودند، ۶ شاخساره تراریخته و از ۸۰ شاخساره‌ی باززایی شده از ریزنمونه‌هایی که با انجام وکیوم تلقيق شدند، ۹ تای آن‌ها تراریخته بودند. درصد تراریزش از تقسیم تعداد شاخه‌های تایید شده با پی.سی.آر بر تعداد کل شاخساره‌های باززایی شده محاسبه شد.

نتایج محاسبات نشان می‌دهد که با انجام وکیوم، با وجود افزایش میزان ریزنمونه‌های جوانه‌دار از ۵۷ درصد تا ۶۰ درصد و افزایش میانگین تعداد شاخساره از ۳/۲۵ به ۴/۳۱ شاخساره به ازای هر ریزنمونه، اختلاف در این شاخصه‌های باززایی معنی‌دار نبود ولی کارایی تراریزش با انجام وکیوم از ۸/۷۰ درصد به ۱۱/۲۵ درصد افزایش یافت.

ایجاد خلا و فراصوت برای نفوذ بیش‌تر اگروباکتریوم به ریزنمونه‌ها و افزایش راندمان تراریزش استفاده شده است. مقایسه‌ی ترکیبی از این دو روش با روش تلقيق متعارف به



شکل ۶- شاخساره‌های باززایی شده در محیط رشد شاخساره.

Figure 6- Regenerated shoots in shoot induction medium

اندامزایی در این آزمایش بوده است. با بررسی غلظت‌های مختلف اگروباکتریوم، ممکن است بتوان کارآیی اندامزایی را افزایش داد و در نهایت درصد بالاتری از تراریزش به دست آورد (Almeida et al. 2003a).

باززایی روی محیط انتخابی، موجب افزایش کارایی تراریزش می‌شود، با این حال تمامی گیاهان باززایی شده لزوماً تراریخته نیستند و به دلایل مختلفی ممکن است شاخه‌های غیرتراریخته یا شیمر بر روی محیط انتخابی رشد کنند و یا سلول‌های تراریخته پس از مدتی تمام یا بخشی از ژن مورد نظر را از دست بدند (Filho et al. 2001). به منظور محاسبه‌ی کارایی تراریزش در آخرین مرحله‌ی باززایی، علاوه بر محاسبه‌ی میزان باززایی، تعداد شاخساره‌هایی که احتمال داشت تراریخته باشند با استفاده از پی.سی.آر غربالگری شدند. به منظور تایید تراریخته بودن گیاه، واکنش پی.سی.آر با آغازگرهای ژن‌های داخل مرزهای چپ و راست T-DNA اگروباکتریوم استفاده شد (جدول ۱). دی.إن.إ. گیاه غیرتراریخته کنترل منفی و پلاسمید pFGC5941 حامل ژن CTV کنترل مثبت بوده است (شکل ۴ و شکل ۵).

علاوه بر این، برای تایید صحت ورود T-DNA به ژنوم گیاه و اطمینان از اینکه T-DNA اگروباکتریوم موجود در بخش‌های سطحی یا بین‌سلولی شاخساره‌ها در واکنش پی.سی.آر خطأ ایجاد

شرایط در این پژوهش قطعات اپیکوتیل و هیپوکوتیل به دلیل راندمان بالای باززایی استفاده شدند (Almeida et al. 2002). برای غلبه بر مشکل بزرگ ریشه دار کردن شاخصاره‌های تراریخته و همچنین سرعت و سهولت دست‌یابی به گیاه تراریخته کامل، شاخصاره‌های تراریخته‌ی تایید شده با پی.سی.آر و مقاوم در محیط انتخابی حاوی علفکش بستا که طول آن‌ها به ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر رسیده بود (شکل ۶) روی دانهاله‌های نارنج رشد یافته Pena et al. 1995a, 1995b (شکل ۷). از آنجا که ریشه‌زایی یکی از مهم‌ترین مراحل تولید گیاهان چوبی در شرایط *in vitro* است، لازم است یک پژوهش مستقل در خصوص شرایط ریشه‌زایی در شاخصاره‌های حاصل از اندام‌زایی مستقیم در نارنج انجام شود.

واسطه‌ی اگروباکتریوم (روش شناوری) در پرتقال شیرین نشان داد که تراریزش زمانی که ریزنمونه‌ها ۱۰ دقیقه در خلا و سپس ۲ ثانیه در فراصوت قرار گرفتند به طور معنی‌داری بالاتر از روش شناوری بوده است (Oliveira et al. 2009).

پژوهش‌های پیشین بر روی نارنج نشان داده است که گونه‌ای بسیار سرسخت نسبت به تراریزش است و کارایی آن در بین مرکبات پایین‌ترین است (Gutierrez et al. 1997). سرسختی به سبب کارایی پایین تلفیق ژن خارجی در ژنوم میزان و استعداد کم اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم گیاه به وجود می‌آید. تراریزش در نارنج وابسته به عوامل متعدد مانند تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت و ترکیب‌های آن است و به طور اصولی یکی از مشکلات این گیاه کارایی پایین اندام‌زایی است (Moreira-Dias et al. 2000; Silva et al. 2010) بنابراین، به منظور بهینه‌سازی

منابع

1. Almeida WAB, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ, Pavan A, Rodriguez APM. 2003a. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. *Scientia Agricola* 60: 23-29.
2. Almeida WAB, Mourao Filho FAA, Pino LE, Boscariol RL, Rodriguez APM, Mendes BMJ. 2003b. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Plant Science* 164: 203-211.
3. Almeida WAB, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ, Rodriguez APM. 2002. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Scientia Agricola, Piracicaba* 59: 35-40.
4. Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 291-316.
5. Bond JE, Roose ML. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington Navel orange. *Plant Cell Reports* 18: 229-234.
6. Dominguez A, De Mendoza AH, Guerri J, Gambra M, Navarro L, Moreno P, Pena L. 2002. Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Chist.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 10: 1-10.
7. Edwards K, Johnstone C, Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349
8. Escudero J, Hohn B. 1997. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *The Plant Cell* 9: 2135-2142.
9. Filho JCB, Kobayashi AK, Pereira LFP, Hissano Z, Vieira LGE. 2001. *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1: 27-34.
10. Gelvin SB. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction. *Methods in Biology* 343: 77-84.
11. Ghorbel R, Dominguez A, Navarro L, Penna L. 2000. High efficiency genetic transformation of Sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *Tree Physiology* 20: 1183-1189.
12. Ghorbel R, Navarro L, Duran-Vila N. 1998. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 73: 323-327.
13. Grosser JW, Gmitter-Jr FG. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews* 8: 339-374.
14. Gutierrez EMA, Luth D, Moore GA. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in citrus and production of Sour orange (*Citrus aurantium*) plants expressing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 16: 745-753.
15. Molinari HBC, Bespalhok JC, Kobayashi AK, Pereira LFP, Vieira LGE. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata*

- L. Raf.) using thin epicotyl sections. *Scientia Hort* 99: 379-385.
16. Moore GA, Jacano CC., Neidigh JL. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 11: 238-242.
17. Moreira-Dias JM, Molina RV, Guardiola JL, Garcia-Luis A. 2001. Day-length and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. *Scientia Horticulturae* 87: 275-290.
18. Moreira-Dias JM, Molina RV, Bordon Y, Guardiola JL, Garcia-Luis A. 2000. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. *Annals of Botany* 85: 103-110.
19. Oliveira MLP, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC. 2009. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 28: 387-395.
20. Pena L, Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, Navarro L. 1995a. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*. 14: 616-619.
21. Pena L, Cervera M, Juarez J, Ortega C, Pina JA, Duranvila N, Navarro L. 1995b. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Science*. 104: 183-191.
22. Pena L, Perez RM, Cervera M, Juarez JA, Navarro L. 2004. Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Annals of Botany* 94: 67-74.
23. Phillips RC. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, Columbia 40: 342-345.
24. Schinor EH, Paoli LG, Azevedo FA., Mourao Filho FAA, Mendes BMJ. 2006. Organogenese in vitro a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus sp.* *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal 28: 463-466.
25. Silva RP, Costa MAPC, Souza AS, Almeida WAB. 2005. Regeneração de plantas de laranja-Pera via organogênese *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 40: 1153-1159.
26. Silva RP, Souza AJ, Mendes BMJ. Mourao Filho FAA. 2010. Sour orange bud regeneration and *in vitro* plant development related to culture medium composition and explant type. *Revista Brasileira De Fruticultura* 32: 1-8.
27. Silva RP, Mendes BMJ, Mourao Filho FAA. 2008. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azeda. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 43: 1331-1337.
28. Yang, ZN, Ingelbrecht IL, Louzada E, Skaria M, Mirkov TE. 2000. *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradise* Macf.). *Plant Cell Reports* 19: 1203-1211.
29. Zamani AH. 2008. Cloning of citrus tristeza virus (CTV) coat protein coding gene. Thesis submitted for MSc. degree, University of Guilan, Rasht, Iran (In Farsi with English abstract).

انتقال ژن‌های اینترفرون گامای انسانی-اولئوسین به گیاه گلرنگ

(*Carthamus tinctorius L.*)

اطهر یقطین^۱، مختار جلالی جواران^{۲*}، قاسم کریم‌زاده^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jalali.mokhtar@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

چکیده

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم

انتقال ژن

ژن‌های اینترفرون گامای انسانی-اولئوسین

کشاورزی مولکولی

گلرنگ

استفاده از گیاهان به عنوان منبع تولید دارو از قدیم مورد توجه بشر بوده است. زیست‌فناوری پیشرفته این امکان را فراهم می‌کند که پروتئین‌های با ارزش دارویی در گیاهان تولید شود. در این پژوهش ترکیب سازه ژنی اینترفرون گامای انسانی-اولئوسین که تحت پیشبرونده بدتری Napin در پلاسمید pBI121 و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس کلون شده و به اگروباکتریوم سویه LBA4404 انتقال یافته بود، به گیاه گلرنگ منتقل شد. ریزونمهای لپهای از گیاه گلرنگ رقم زراعی پدیده برای تراریزش مورد استفاده قرار گرفتند و تعدادی گیاه تاریخته احتمالی به دست آمد. گیاهان تاریخته بر روی محیط MS همراه با ویتامین B5 حاوی ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و نیز ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین انتخاب شدند. تجزیه مولکولی گیاهان تاریخته (T_0) با استفاده از پی.سی.آر، وجود سازه ژنی اینترفرون گامای انسانی به همراه اولئوسین را در گیاهان تاریخته تایید کرد.

مقدمه

دارند و خواص ضد ویروسی آنها به اثبات رسیده است. تولید ایترفرون گاما در بدن در واکنش به فعالیت میکروب‌ها و محصولات آنها رخ می‌دهد و به عنوان عامل مختل کننده همانندسازی و رشد ویروس‌ها شناخته می‌شود (Kontsek and Kontsekova, 1997). به همین علت است که علاقه شدیدی برای تولید ایترفرون از منابع دائمی، ایمن و ارزان وجود دارد. به علاوه از این جهت که این پروتئین وزن زیادی ندارد ۲۰–۲۵ کیلو دالتون) (Sareneva et al., 1996)، جهت انتقال در ترکیب با اولئوسین مناسب به نظر می‌رسد (Ling, 2007).

GUS با روشن شدن این مسئله که اتصال ژن اولئوسین و ژن GUS تحت کنترل پیشبرنده بذری موجب هدف گیری صحیح پروتئین تولید شده به اجسام روغنی می‌شود، این فرضیه به وجود آمد که شاید بتوان پروتئین اولئوسین را برای هدف گیری پروتئین خارجی مورد استفاده قرار داد. چنین سیستمی روشی بسیار مناسب برای ذخیره پروتئین نوترکیب در اجسام روغنی بذر و در نتیجه تخلیص راحت‌تر پروتئین نوترکیب ارایه می‌کند (Van Rooijen and Moloney, 1995).

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سوosh LBA4404 جهت انتقال ترکیب سازه ژنی ایترفرون گاما-اولئوسین تهیه شده توسط باقری و همکاران در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد (Bagheri et al., 2008). این باکتری دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین جهت بیان در باکتری و گیاه است. به علاوه این باکتری دارای ژن‌های ایترفرون گاما (500 bp) و اولئوسین (900 bp) بوده و ژن اولئوسین در ناحیه بالادستی ژن ایترفرون قرار گرفته است (شکل ۱).

جهت تایید وجود ژن در باکتری، PCR Colony انجام شد (جدول ۱). آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس مورد استفاده، به ترتیب مربوط به ژن‌های اولئوسین و ایترفرون گاما بوده و عبارت هستند از

F: 5'- TTGGATCCATGACGGATACAGCTAGAAC-3'

R: 5'-CATGAGCTCTTACCGACCGACCGTTTGGA-3'

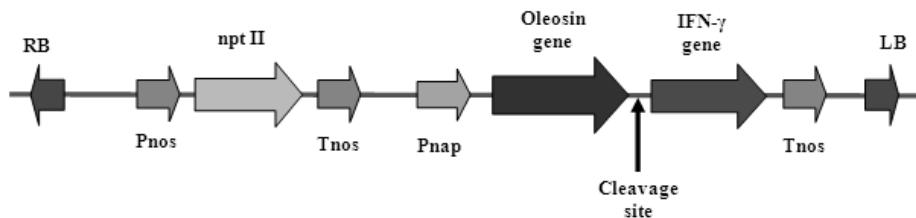
استفاده از گیاهان به عنوان سیستم‌های تولید پروتئین، در مقایسه با سایر سیستم‌ها مزایای ویژه‌ای از قبیل موارد زیر دارد: ۱- صرف هزینه کمتر در این سیستم نسبت به سایر سیستم‌های تولید پروتئین حیوانات، فرماتورها و بیورآکتورها. ۲- نیاز به ساختار ساده و تخصص کمتر جهت کاشت، داشت و برداشت، و در مجموع کار با گیاهان. ۳- عدم وجود عوامل بیماری‌زای مشترک با انسان از قبیل پریون، ویریون و... در گیاهان و عدم احتمال آلوده‌سازی محصول نهایی. ۴- توانایی گیاهان عالی در تولید پروتئین‌های یوکاریوتی با تاخور دگری و گلیکوزیلاسیون صحیح و فعالیت قابل قبول (Horn et al., 2004).

بیان ژن در بافت‌های مختلف گیاهی امکان‌پذیر است، اما بیان پروتئین در بذر موجب تجمع پایدار آن در غلظت نسبتاً بالا و حجم کم و فشرده می‌شود که برای ذخیره‌سازی و استخراج مناسب است. استفاده از بذور روغنی و بیان پروتئین نوترکیب در ترکیب با اولئوسین تمام مزایای بیان در بذر از جمله ظرفیت بالای تولید، افزایش پایداری و از همه مهم‌تر سهولت در تخلیص را دارد. اولئوسین سبب هدف گیری صحیح پروتئین به اندام‌های روغنی بذر شده و سبب استخراج راحت‌تر و ارزان‌تر از آن می‌شود (Van Rooijen and Moloney, 1995).

گلنگ (Carthamus tinctorius L.) یک گیاه دارای بذر روغنی است که امروزه با هدف استخراج روغن از آن کشت می‌شود. دانه گلنگ دارای ۲۵ تا ۴۰ درصد روغن و ۱۲ تا ۲۰ درصد پروتئین است (Yazdi-Samadi and Abd-Mishani, 2007). وجود سطوح بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع لینولئیک و اولئیک در روغن حاصل از بذر گلنگ سبب کیفیت مرغوب آن شده و از نظر مواد مغذی با روغن زیتون قابل مقایسه می‌سازد (Dajue and Mündel, 1996).

خودگشتنی، خوراکی نبودن بخش‌های رویشی گیاه، پایداری در آب و هوای گرم و خشک و سطح زیر کشت پایین گلنگ (Singh and Nimbkar, 2007) سبب شد تا به عنوان گیاه میزبان جهت انتقال ژن ایترفرون گامای انسانی در ترکیب با اولئوسین انتخاب شود.

ایترفرون‌ها از جمله پروتئین‌هایی هستند که ارزش درمانی بالای



شکل ۱- تصویر شماتیک سازه pBI121-IFN- γ -Oleosin حاوی پیشبرنده Napin، ژن اولثوسین، جایگاه برش و ژن ایترفرون گاما، Pnos و Tnos: پیشبرنده و خاتمه دهنده Nos، Pnap: پیشبرنده Napin

Figure 1- schematic diagram of pBI121-IFN- γ -Oleosin construct containing Napin promoter, oleosin gene, cleavage site and γ -interferon gene, Pnos and Tnos: nos promoter and terminator, Pnap: Napin promoter.

جدول ۱- شرایط پی.سی.آر جهت تکثیر ژن‌های ایترفرون گاما - اولثوسین.

Table 1- PCR conditions to amplify interferon gamma-oleosin.

تعداد چرخه cycles	مرحله phase	حرارت °C Temperature (°C)	مدت زمان (دقیقه) Time (min)
1	Hot start واسرشت‌سازی اولیه	95	5
	Denaturation واسرشت‌سازی	95	1
30	Annealing اتصال آغازگر	62	1
	Extension کسترش	72	1.5
1	Final Extension گسترش نهایی	72	10

استریل، در محیط کشت جوانه‌زنی که حاوی محیط کشت ۱/۲MS بدون هورمون‌های گیاهی بود، کشت شدند و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ۶ روز برگ‌های لپه‌ای پس از حذف جوانه انتهایی به مدت ۲ روز بر روی محیط کشت MS (pH=۵/۸) حاوی هورمون قرار داده شدند. هورمون‌های مورد استفاده به میزان ۰/۰۹ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ در نظر گرفته شد. جهت ترازیش، کشت اگروباکتریوم حاوی ژن‌های سازه ایترفرون گاما انسانی- اولثوسین که توسط باقری و همکاران تهیه شده بود، در محیط LB مایع دارای ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در

به منظور کشت باکتری و گیاه به ترتیب از محیط کشت LB' Murashige and Skoog (Bertani, 1951) و محیط کشت MS' (Gamborg *et al.*, 1962) به همراه ویتامین‌های محیط کشت B5 (Bertani, 1951) استفاده شد. آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و سفووتاکسیم نیز به ترتیب جهت گزینش اگروباکتریوم در محیط کشت باکتری و گیاه مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور تهیه ریزنمونه، بذرهای گلنگ رقم زراعی پدیده که از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شده بود، ابتدا توسط اتانول ۷۰ درصد و پس از یک بار آبشویی به وسیله هیپوکلریت ۱ درصد ضد عفونی شده، سپس ۳ بار توسط آب مقطر استریل آبشویی شد. بذرها بعد از خشک شدن بر روی کاغذ صافی

1- Lauri and Bertani

2- Murashige and Skoog

نتایج و بحث

در ابتدا حضور سازه ژنی ایترفرون گاما-اولئوسین در اگروباکتریوم تأیید شد (شکل ۲).

کمترین میزان آنتی بیوتیک غلاظت ۴۰ میلی گرم در لیتر در محیط کشت باززایی بود که در آن ریزنمونه‌های غیر تلقیح شده (شاهد) قادر به رشد نبودند و به تدریج ریزنمونه‌ها به رنگ زرد و قهوه‌ای درآمدند و از بین رفتند (شکل ۳).

ریزنمونه‌ها، ۲ تا ۳ روز بر روی محیط هم کشتی قرار گرفته و سپس به محیط کشت انتخابی (حاوی کاناامایسین ۴۰ میلی گرم در لیتر و سفاتوکسیم ۲۰۰ میلی گرم در لیتر و بدون هورمون) منتقل شدند. پس از دو تا سه هفته، ریزنمونه‌های تلقیح شده، جوانه‌هایی تولید کردند. در حالی که هیچ گونه باززایی بر روی ریزنمونه‌های شاهد (بدون تلقیح با اگروباکتریوم) دیده نشد.

ریزنمونه‌ها هر سه هفته یکبار به محیط جدید مشابه واکشت شدند. تعدادی از جوانه‌های تولید شده بر روی محیط گزینشگر (حاوی آنتی بیوتیک)، سبز و زنده مانده و بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت به کاناامایسین از بین رفتند (شکل ۴-الف). به نظر می‌رسد نوساقه‌های زنده مانده و باززایی شده احتمالاً ژن ایترفرون گاما-اولئوسین و مقاومت به آنتی بیوتیک را دریافت کرده‌اند (شکل ۴-ب).

ریزنمونه‌هایی که در این شرایط سبز باقی ماندند، به محیط کشت طویل‌سازی ساقه (حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفاتوکسیم و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر kinetin) منتقل شدند (شکل ۵). در نهایت تعدادی نمونه که در محیط بدون هورمون ریشه‌دار شده بودند، پس از طویل شدن بر روی محیط مربوطه، به پرلیت و خاک سبک منتقل شدند (شکل ۶).

گیاهان گلرنگ تاریخته احتمالی^۳ پس از انتخاب روی محیط حاوی کاناامایسین، به وسیله پی.سی.آر با آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. نتیجه پی.سی.آر با این آغازگرهای تکثیر قطعه bp ۱۴۰۰ بود که در گیاهان تاریخته قابل تشخیص است، ولی در گیاهان غیرتاریخته باندی مشاهده نشد (شکل ۷).

آزمایش‌ها نشان داد که میزان باززایی در نمونه‌های تلقیح شده بسیار کمتر از نمونه‌های غیر تلقیح شده است. علل دقیق مربوط

دمای ۲۸ درجه سانتی گراد بر روی تکان دهنده^۴ ۲۰۰ rpm انجام شد (Bagheri *et al.*, 2008). رسوب سلول‌های باکتری در محیط مخصوص آلدوسازی اگروباکتریوم^۵ شامل نمک‌های MS همراه با ۲۰ گرم گلوكز (pH=۵/۲) و فاقد هورمون به صورت سوسپانسیون در آمده و جهت تراریزش از آن استفاده شد. برگ‌های لپه‌ای به مدت ۱۰ دقیقه در محیط سوسپانسیون اگروباکتریوم قرار داده شدند و سپس به محیط هم کشتی که محیط MS همراه با ویتامین B5 و حاوی ۰/۰۹ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر TDZ و فاقد آنتی بیوتیک بوده انتقال پیدا کردند. مدت زمان نگهداری در این محیط و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. در هنگام آماده سازی ریزنمونه‌ها باید دقت شود تا مریستم انتهایی، در انتهایی دمبرگ باقی نماند. زیرا به دلیل رشد سریع، با آنتی بیوتیک کترول نمی‌شود. به علاوه چنانچه انتهایی دمبرگ بیش از حد قطع گردد، از توان باززایی کاسته می‌شود. بهترین مدت زمان تماس قاعدة دمبرگ‌های گلرنگ با سوسپانسیون باکتریایی، ۱۰ دقیقه گزارش شده است (Sankara Rao and Rohini, 1999).

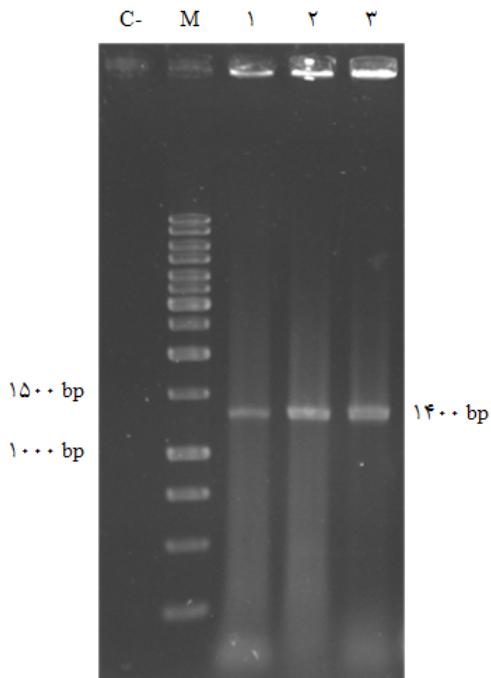
پس از مرحله هم کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط القای شاخه‌زایی حاوی همان تیمار هورمونی به همراه ۲۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک سفاتوکسیم و ۴۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک کاناامایسین انتقال یافته و هر سه هفته به محیط جدید مشابه واکشت شدند. پس از ۶ هفته، نوساقه‌ها از قاعده دمبرگ‌های لپه‌ای جدا شده و به محیط طویل شدن شاخه حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر کیتین^۶ انتقال یافته‌اند. به منظور بررسی گیاهان باززایی شده بر سطح محیط کشت انتخابی (احتمالاً تاریخته) جهت استخراج دی.ان.ای ژنوم گیاهی روش CTAB مورد استفاده قرار گرفت (Ausubel *et al.*, 1994).

پس از حصول اطمینان از کیفیت و کمیت دی.ان.ای استخراجی تکثیر آن توسط روش پی.سی.آر و آغازگرهای اختصاصی انجام شد. در نهایت قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

3- Shaker

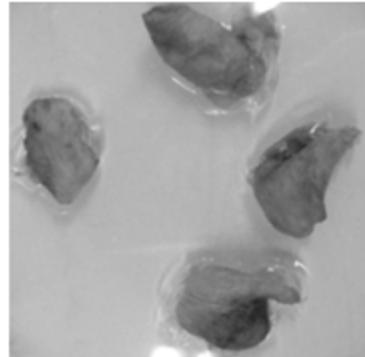
4- Infection Medium

5- kinetin



شکل ۲- تأیید حضور سازه ژنی ایترفرون گاما-اولووسین در اگروبکتریوم به روش PCR Colony PCR: مارکر مولکولی Ladder Mix (شرکت فرمتاز)، ۱، ۲ و ۳: چاهک‌های اگروبکتریوم دارای ژن.

Figure 2- colony PCR analysis of interferon gamma-oleosin of *agrobacterium*; C-: negative control, M: Ladder Mix, lane 1, 2 and 3: *agrobacterium* containing genes.



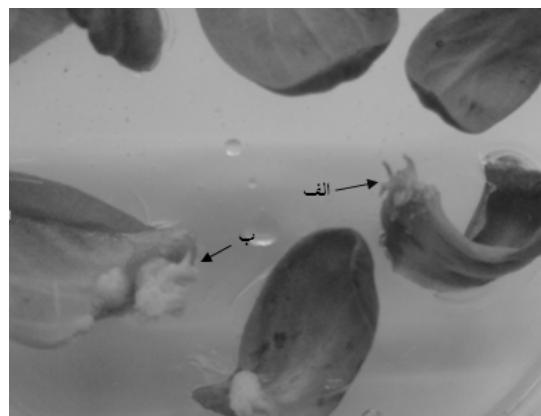
شکل ۳- عدم باززایی و از بین رفتن ریزنمونه‌های غیر تاریخته گلنگ در محیط حاوی ۴۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین.

Figure 3- noregeneration and destroying of safflower explants in medium containing 40 mg l^{-1} kanamycin.

می‌شود و در نهایت سلول‌های آسیب دیده نکروزه می‌شوند (Richter and Ronald, 2000). به طور معمول در انتقال ژن با اگروبکتریوم به گیاهان، استوسرینینگون سبب افزایش خاصیت بیماری‌زایی و در نتیجه افزایش بازده تراریزش در گیاهان می‌شود (Stachel *et al.*, 1986). اما پژوهش‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً دارد ایجاد واکنش فوق حساسیت موجب غیرفعال شدن بیماری‌زایی باکتری شده و اثری بر تراریزش گلنگ ندارد. در

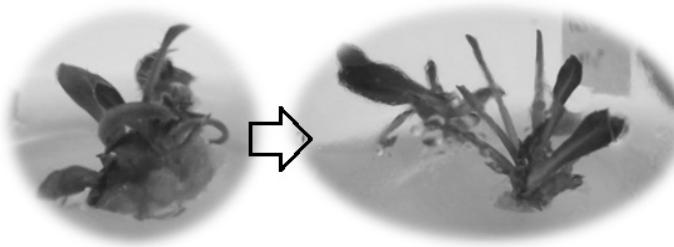
به این امر شناخته شده نیست، اما گفته می‌شود ممکن است یکی از دلایل آن ایجاد واکنش فوق حساسیت^۷ (HR) در ریزنمونه‌های گلنگ در مواجهه با اگروبکتریوم باشد (Orlikowska *et al.*, 1995). واکنش فوق حساسیت یکی از پاسخ‌های دفاعی گیاه است که بیشتر به سرعت سبب مرگ سلولی نواحی اطراف محل آلودگی شده و موجب تجمع مواد ضد میکروبی در آن بخشن

7- Hypersensitive Reaction



شکل ۴- (الف) سفید شدن و از بین رفتن جوانه‌های غیر تراریخته گلرنگ بر روی محیط گرینشگر؛ (ب) جوانه‌های باززایی شده احتمالاً تراریخته

Figure 4- a) white regeneration of non-transformed plants on screening medium; b) putative transformed plants



شکل ۵- انتقال ریزنمونه‌های باززایی شده گلرنگ به محیط طویل سازی.

Figure 5- transferring of regeneration plant to shoot elongation medium



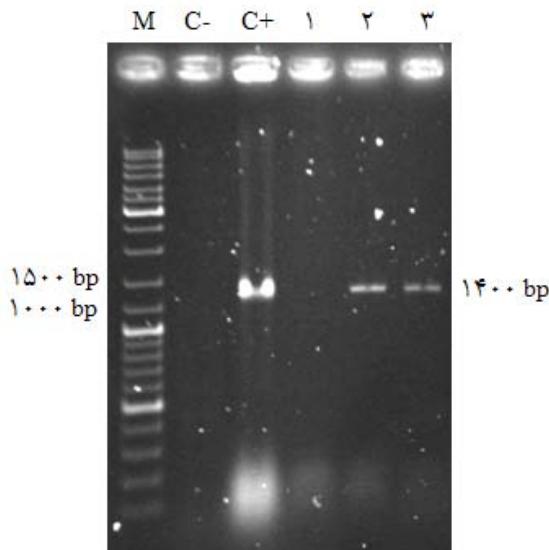
شکل ۶- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده گلرنگ به پرلیت و خاک

Figure 6- transferring of rooted plants to perlite and soil

کاهش رشد و باززایی در گیاهان تراریخته و غیر تراریخته می‌شود (Rohini and Sankara Rao, 2000) و به نظر می‌رسد این امر به علت اثرهای بازدارندگی آنتی‌بیوتیک باشد. جهت انتقال ژن، باززایی مستقیم گیاه از قطعات برگ لپهای نسبت به باززایی به واسطه تشكیل کالوس بسیار مناسب‌تر به نظر می‌رسد. به این

مورد عدم تأثیر استوسیرینگون بر تراریزش نتایج مشابهی توسط Rohini and Sankara Rao, (2000). به همین علت استوسیرینگون در این آزمایش مورد استفاده قرار نگرفت.

در مجموع وجود آنتی‌بیوتیک کانامایسین در محیط کشت سبب



شکل ۷- آنالیز دی.ان.ای ژنومی با استفاده از تکنیک پی.سی.آر؛ M: مارکر مولکولی Ladder Mix (شرکت فرماتاز)، چاهک C- کنترل منفی (بدون دی.ان.ای)، چاهک C+: کنترل مثبت، چاهک ۱: دی.ان.ای ژنومی گیاه غیر تاریخته، چاهک‌های ۲ و ۳: دی.ان.ای ژنومی استخراج شده از گیاهان تاریخته حاوی ژن‌های اینتی فرون گاما-اولو سیز.

Figure 7- PCR analysis of transgenic plants; M: Ladder Mix, C-: negative control, C+: positive control, lane 1: genomic DNA of non-transformed plant, lane 2 and 3: extracted genomic DNA of putative transgenic plant containing genes. interferon gamma-oleosin.

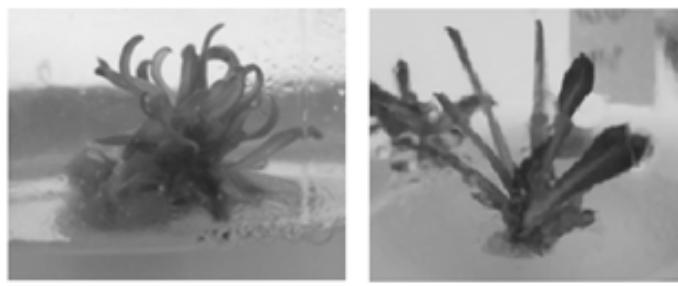
افزايش می دهد. در حالی که TDZ تولید گیاهچه های قوی را افزایش می کند (Orlikowska and Dyer, 1993). همچنین وجود IBA در محیط کشت، سبب افزایش شیشه ای شدن می شود (Sankara Rao and Rohini, 1999). بهترین ترکیب تیماری جهت القای باز زایی در گلرنگ که یک گیاه علفی^۹ به شمار می رود، ترکیب NAA و TDZ است. در صورتی که به طور معمول TDZ جهت بازرا کردن گیاهان چوبی^{۱۰} به کار می رود (Huetteman and Preece, 1993).

سن گیاه مادری جهت تهیه ریزنمونه به منظور القای بازیابی اهمیت فراوان دارد. ریزنمونه‌های ۴ تا ۷ روزه خیلی بیشتر از ریزنمونه‌های ۲ تا ۳ روزه و ۸ تا ۱۵ روزه بازرا می‌شوند (Nikam and Shitole, 1999). نتایج مشابهی از اثر سن گیاه مادری بر میزان بازیابی در آفتابگردان (Paterson and Everett, 1985)، لوبیا و نخود (Angelini and Allavena, 1989) گزارش شده است.

می توان گفت باززایی مطلوب گلرنگ به عوامل مختلفی از جمله

علت که تغییرات سوماکلونال^۸ ناشی از کشت کالوس را می‌توان با استفاده از این روش حذف کرد (Ying *et al.*, 1992). شیشه‌ای شدن به معنی ظهر ناهنجاری‌هایی مانند بافت‌ها یا اندام‌هایی با ظاهر غیرطبیعی، آغشته به آب، ضخیم، نیمه شفاف و شکننده در کشت بافت گیاهی است (Gaspar, 1991). گلرنگ یک گیاه مخصوص نواحی خشک و نیمه خشک و گرم است و می‌تواند به خوبی از سد شرایط کم آبی عبور کند. به همین علت به افزایش میزان رطوبت در محیط واکنش نشان می‌دهد. یکی از اولین علایم وجود رطوبت اضافی در محیط، شیشه‌ای شدن است که با کلروز و نکروز گیاه همراه است (شکل ۸). این پدیده به راحتی توسط ایجاد شرایط بهینه در دما، ترکیبات محیط کشت و تهویه کنترل می‌شود. به همین علت استفاده از محیط طربیل‌سازی حاوی ترکیب نمک‌های MS و سیتوکنین پایین و نیز استفاده از آکار به جای فیتاژل (Debergh *et al.*, 1992) سبب شد این پدیده به شدت کاهش باید.

استفاده از TDZ در ترکیب با NAA نسبت به استفاده از BAP در ترکیب با NAA، سب بازیابی، بهتر در گل نگ می‌شود (Debergh et al., 2000).



ب

الف

شکل ۸- نمونه‌ای از گیاه‌چه الف) طبیعی و ب) شیشه‌ای شده گلنگ.

Figure 8- sample of a) normal and b) vitrified plant

ریزنمونه‌های ۵ تا ۷ روزه شناخته شدند. به علاوه باززایی و تولید نوساقه فقط در ناحیه قاعده ریزنمونه برگ‌های لپهای کامل و بدون برش اتفاق افتاد و نتایج مشابه از سایر پژوهش‌ها نیز حاصل شده است (Basalma *et al.*, 2010).

ژنوتیپ گیاه، سن گیاه مادری، محل تهیه ریزنمونه و اندازه ریزنمونه بستگی دارد. به عنوان مثال در این پژوهش هیچ موفقیتی در باززا کردن گیاهان از هیپوکوتیل و برگ ارقام مورد استفاده به دست نیامد. همچنین به طور تجربی بهترین سن جهت باززایی،

منابع

1. Angelini RR, and Allavena A. 1989. Plant regeneration from immature cotyledon explant cultures of bean (*P. coccineus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19(2): 167-174.
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York City, NY: John Wiley & Sons, Inc.
3. Bagheri Kh, Jalali Javaran M, Mahboudi F, Moeini A, and Zebarjadi A. 2008. Designing and construction of gamma interferon-oleosin fusion and transformation in *Brassica napus*. *Modern Genetic Journal*, 3(3): 49-57. (In Farsi).
4. Basalma D, Uranbey S, and Mirici S. 2010. TDZ × IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *African Journal of Biotechnology*, 7(8): 960-966.
5. Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62:293-300.
6. Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Arnold S, Zimmerman R, and Ziv M. 1992. Reconsideration of the term 'Vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30(2): 135-140.
7. Dajue L, and Mündel HH. 1996. Safflower, *Carthamus tinctorius* L. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
8. Gaspar T. 1991. Vitrification in micropropagation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, (17): 116-126.
9. Gamborg O, Miller RA, and Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1): 151-158.
10. Horn M, Woodard S, and Howard J. 2004. Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*, 22(10): 711-720.
11. Huetteman CA, and Preece JE. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(2): 105-119.
12. Kontsek P, and Kontsekova E. 1997. Forty years of interferon. *Acta Virologica, Slovakia*, 41: 349-354.
13. Ling H. 2007. Oleosin fusion expression systems for the production of recombinant proteins. *Biologia*, 62(2): 119-123.
14. Murashige T, and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15(3): 473-497.
15. Nikam T, and Shitole M. 1999. *In vitro* culture of Safflower L. cv. Bhima: initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55(1): 15-22.
16. Orlikowska TK, and Dyer WE. 1993. *In vitro* regeneration and multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plant Science*, 93(1-2): 151-157.
17. Orlikowska TK, Cranston HJ, and Dyer WE. 1995. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of the safflower cultivar 'Centennial'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40(1): 85-91.

18. Paterson K, and Everett N. 1985. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Science*, 42(2): 125-132.
19. Richter TE, and Ronald PC. 2000. The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology*, 42(1): 195-204.
20. Rohini V, and Sankara Rao K. 2000. Embryo transformation, a practical approach for realizing transgenic plants of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Annals of Botany*, 86(5): 1043-1049.
21. Sankara Rao K, and Rohini V. 1999. Gene transfer into Indian cultivars of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology*, 16: 201-206.
22. Sareneva T, Mortz E, Tolo H, Roepstorff P, and Julkunen I. 1996. Biosynthesis and N-glycosylation of Human Interferon-gamma: Asn25 and Asn97 Differ Markedly in How Efficiently They are Glycosylated and in Their Oligosaccharide Composition. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 242(2): 191-200.
23. Singh V, and Nimbkar N. 2007. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*, 4: 167-194.
24. Stachel SE, Nester EW, Zambryski PC. 1986. A plant-cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83:379-383.
25. Van Rooijen GJH, and Moloney MM. 1995. Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Biotechnology*, 13(1): 72-77.
26. Yazdi-Samadi B, and Abd-Mishani S. 2007. Breeding field crops. Markaz Nashr Daneshgahi, 6th. Ed. Tehran, Iran. (In Farsi).
27. Ying M, Dyer WE, and Bergman JW. 1992. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cv.'Centennial'. *Plant Cell Reports*, 11(11): 581-585.

بررسی مولکولی وضعیت تاریختگی دانه‌های ذرت وارداتی به ایران

لیلا سرمدی^۱، عباس عالمزاده^{۲*} و بهزاد قره‌یاضی^۳

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات

دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alelmzadeh@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۴)

چکیده

واژه‌های کلیدی

ایمنی زیستی
پروتکل کارتاها
ذرت
گیاهان تاریخته
واردادات

پژوهش حاضر به منظور بررسی وضعیت تاریختگی دانه‌های ذرت وارداتی به کشور با استفاده از روش‌های مولکولی صورت گرفته است. به همین منظور ۵ نمونه ذرت وارداتی به نام‌های PREVENTER، INCEILGAZ، IRON LINDREW، AGIOS SOSTIS و MASTROGIORGIS از کشور آرژانتین از بندر امام خمینی در ماهشهر از گمرک کشور دریافت شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای نواحی تنظیمی پیشر *CaMV 35S* و پایان‌دهنده *nos* طی واکنش پی‌سی‌آر وضعیت تاریخته بودن یا نبودن نمونه‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از ژن اینورتاز که در ژنوم تمام ارقام ذرت وجود دارد به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نتایج نشان داد که دانه‌های ذرت وارداتی از کشور آرژانتین تاریخته هستند و در ژنوم خود نواحی تنظیمی پیشر *CaMV 35S* و پایان دهنده *nos* را دارند. با توجه به پیوستن ایران به پروتکل ایمنی‌زیستی کارتاها، باید در برگه ثبت مشخصات مواد گیاهی وارداتی، وضعیت تاریختگی آنها مشخص شود اما در اسناد همراه با دانه‌های ذرت وارداتی هیچ‌گونه اظهاری در مورد تاریخته بودن این دانه‌ها در برگه‌های ثبت مشخصات آنها وجود نداشت.

مقدمه

پژوهش‌های مختلف مشخص شده است که در جوامع مختلف از جمله ایران مردم نسبت به این گیاهان نظر مثبتی دارند (Zare and Alemzadeh, 2010; Rastgooy and Alemzadeh, 2011; Gomrok *et al.* 2009).

دانه‌های روغنی از جمله محصولات استراتژیک و با ارزش کشاورزی است که دستخوش این تغییرات قرار گرفته است و بیشترین سطح زیر کشت گیاهان تاریخته را به خود اختصاص داده است. از جمله می‌توان به دانه‌های روغنی اشاره کرد که در آنها الگوی اسیدهای چرب به وسیله روش‌های جهش‌زاوی مرسوم و یا روش‌های دی‌ان‌ای نوترکیب تغییر یافته است و یا دانه‌های روغنی که مقاوم به علف‌کش شده‌اند (Sarad *et al.* 2004).

کشور ما، یکی از بزرگترین مصرف‌کننده‌های روغن و دانه‌های روغنی با سرانه مصرف بالا نسبت به میانگین جهانی، بیش از ۸۰ درصد نیاز دانه‌های روغنی خود را از طریق واردات تأمین می‌کند و عملده این واردات را از کشورهایی انجام می‌دهد که بیشترین سطح زیر کشت گیاهان تاریخته را به خود اختصاص داده‌اند. واردات دانه ذرت به کشور بعد از دانه سویا و پنبه دانه، بیشترین میزان واردات را تشکیل می‌دهد. قابل توجه است که ۳۲ درصد سطح زیر کشت این گیاه، از ۱۵۹ میلیون هکتار ذرت کشت شده در دنیا، تاریخته است (James. 2011). با توجه به این که بخش عملده‌ای از روغن مورد نیاز کشور به صورت وارداتی تأمین می‌شود و سرانه بخش زیادی از محصولات وارداتی از بزرگترین کشورهای تولید کننده محصولات تاریخته انجام می‌شود، با کشت گیاهان تاریخته در داخل به روش علمی و تایید شده، نه تنها از خروج میزان زیادی ارز از کشور جلوگیری می‌شود بلکه می‌تواند به عنوان یکی از قدمهای اصلی برای رسیدن به خودکفایی در زمینه تولید دانه‌های روغنی مورد توجه قرار گیرد (Rajaie. 2010).

با توجه به ورود گیاهان تاریخته، محصولات و فرآورده‌های آنها به عرصه تجارت بین‌المللی، صادرات و واردات این گیاهان به طور گسترده‌ای در جهان صورت می‌گیرد که به موازات آن پژوهش‌های زیادی نیز در کشورهای مختلف به منظور ردبایی این گیاهان و محصولات آنها در محموله‌های وارداتی صورت گرفته است. طی پژوهشی که در سال ۲۰۱۰ در آفریقای جنوبی به

با توجه به رشد روز افزون جمعیت، بزرگترین چالش در دنیا تأمین غذا و امنیت آن است. به دنبال افزایش جمعیت، رقابت برای زمین، آب و سایر منابع تولید، بشر را به راهکارهای جدیدی به منظور تولید غذای بیشتر و با کیفیت‌تر رهمنون می‌سازد (Bertoni and Marsan. 2005; British Medical Association. 2004). بدیهی است که تأمین غذای این جمعیت در حال رشد در عصر حاضر، تنها با استفاده از روش‌های سنتی میسر نبوده و انسان ناگزیر از بکارگیری دانش و فناوری‌های نو در جهت افزایش تولیدات کشاورزی است. از مهمترین دستاوردهای مهندسی ژنتیک در زمینه کشاورزی، تولید گیاهان تاریخته^۱ هستند که با استفاده از آنها می‌توان غذای جمعیت رو به رشد جهان را تأمین کرد. در واقع بیوتکنولوژی نوین از راهکارهایی است که با دستاوردهای مفید در زمینه کشاورزی از جمله گیاهان تاریخته منجر به تولید محصول بیشتر و غذای کافی و ایمن تر برای انسان و دام شده است (James. 2011). ظهور گیاهان تاریخته در عرصه کشاورزی به منظور تأمین مواد غذایی با داشتن صفات مطلوب، علاوه بر افزایش عملکرد در واحد سطح و تولید بیشتر، نقش ویژه‌ای در کاهش هزینه‌های تولید و استفاده کمتر از مواد شیمیایی داشته است. طبق تازه‌ترین گزارش سرویس بین‌المللی برای دستیابی و استفاده از بیوتکنولوژی کشاورزی (ISAAA)^۲ در شانزدهمین سال تجاری سازی این محصولات (از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۱)، سطح زیر کشت محصولات تاریخته در دنیا با رشد هشت درصدی نسبت به سال ۲۰۱۰ از ۱۴۸ میلیون هکتار، به ۱۶۰ میلیون هکتار رسیده است (James. 2011). در سال ۲۰۱۱ چهار محصول تاریخته اصلی تجاری سازی شده یعنی ذرت، سویا، کلزا و پنبه به بالاترین میزان سطح زیر کشت خود رسیدند (James. 2011). به طوری که بیش از ۹۸ درصد گیاهان تاریخته تولیدی در دنیا را این چهار محصول تشکیل می‌دهند. پیش‌بینی می‌شود که سطح زیر کشت محصولات تاریخته تا سال ۲۰۱۵ به حدود ۲۰۰ میلیون هکتار برسد (James. 2011). طی

1- Transgenic plants

2- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications

گرفته مشخص شد، دانه‌های وارد شده به کشور طبق استناد و مدارک همراه آنها، به نام کشتی حامل آنها وارد می‌شوند و نام و برچسبی که نشانی از تاریخته بودن یا غیر تاریخته بودن آنها باشد، وجود ندارد.

استخراج و خالص‌سازی دی.ان.ای ژنومی
دی.ان.ای ژنومی بر اساس پروتکل پایه CTAB^۳ به روش سقایی معروف^۴ و همکاران (۱۹۸۴) از دانه‌های پودر شده در ازت مایع استخراج شد. روش CTAB طبق استاندارد ایزو ۲۱۵۷۱ (ISO 21571) روش مناسبی برای استخراج دی.ان.ای دانه‌های ذرت است (Hemmer. 1997). سپس دی.ان.ای حاصل با اتانول رسوب داده شد.

طراحی آغازگر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
به منظور شناسایی تاریختگی نمونه‌ها، برای نواحی تنظیمی پیشبر CaMV 35S^۵ و پایان دهنده nos^۶ که در بیشتر گیاهان تاریخته (به‌ویژه ذرت و سویا) وجود دارند، آغازگرهای اختصاصی طراحی شد. این دو عنصر ژنتیک تقریباً در همه گیاهان تاریخته وجود دارند (Ahmed. 2002; Anklam *et al.* 2002; Hemmer. 1997). به منظور شناسایی و غربال کردن ذرت‌های تاریخته، از جفت آغازگر (35S-1/35S-2) برای توالی پیشبر CaMV 35S و از جفت آغازگر (118-f/HA-nos 118-r) برای پایان دهنده nos استفاده شد. از ژن اینورتاز^۷ نیز به عنوان ژن شناسایی دی.ان.ای ژنومی ذرت (کترل داخلی) استفاده شد که برای تکثیر آن از جفت آغازگر (IVR1-F/IVR2-R) استفاده شد (Ehlers *et al.* 1997). آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش به همراه ناحیه مورد هدف آنها بر روی دی.ان.ای مورد بررسی در (جدول ۲) نشان داده شده‌اند. عمل تکثیر با استفاده از این آغازگرهای در حجم ۲۰ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (شامل ۱۰ mM تریس، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۲۰۰ μM از هر یک از dNTPها، ۰/۳ μM از هر یک از آغازگرهای، ۱ واحد

3- Cetyltrimethyl ammonium bromide

4- Saghai-Marof

5- Cauliflower Mosaic Virus

6- Nopaline synthase

7- Invertase

منظور ردیابی گیاهان تاریخته صورت گرفت هیچ سویای تاریخته‌ای که کشت شود یافت نشد اگر چه نتایج نشان دادند که سویای تاریخته غیر قانونی وارد شده است (Marx. 2010). در سال ۲۰۰۶ طی پژوهشی در کره جنوبی مشخص شد که طی حمل و نقل دانه‌های وارداتی سویای تاریخته، تعدادی گیاهان سویای تاریخته در اطراف جاده‌های اطراف بندر اینچون (Incheon Port) مشاهده شد که احتمال دارد در اثر پخش دانه‌های تاریخته وارداتی بوجود آمده بودند (Kim *et al.* 2006).

طی پژوهش دیگری از ۸ استان مختلف کره جنوبی نمونه‌های سویا و ذرت جمع‌آوری شد و از لحاظ تاریختگی مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج نشان دادند در مزارع سویا و ذرت تاریخته کشت نمی‌شود اما چندین گیاه ذرت تاریخته از کنار جاده‌ها جمع‌آوری شد که احتمال دارد در زمان انتقال دانه‌های ذرت تاریخته در محیط پخش شده‌اند (Lee *et al.* 2009).

هدف از انجام این پژوهش بررسی وضعیت تاریختگی دانه‌های ذرت وارداتی به کشور بود. به همین منظور ۵ نمونه ذرت وارداتی از گمرک بندر امام خمینی دریافت و همراه با یک نمونه غیرتاریخته داخلی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای نواحی تنظیمی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

به منظور ارزیابی وضعیت تاریختگی دانه‌های ذرت وارداتی، ۵ نمونه دانه ذرت وارداتی که در شش ماهه دوم سال ۱۳۸۹ وارد کشور شده بود، به نامهای AGIOS SOSTIS و PREVENTER INCEILGAZ LINDREW IRON MASTROGIORGIS از کشور آرژانتین که بعد از آمریکا و بزریل، بیشترین سطح زیر کشت گیاهان تاریخته را در دنیا دارا است، از گمرک بندر امام خمینی دریافت شد. همچنین نمونه دانه ذرت داخلی به عنوان شاهد تهیه شد. نمونه برداری به طریق توده‌ای و کاملاً تصادفی از هر بسته، حدود صد گرم انجام شد. نمونه برداری طبق استاندارد ایزو (ISO 21568)، متناسب با تعداد بسته در هر محموله انجام شد (جدول ۱). در بررسی‌های صورت

جدول ۱- نمونه‌برداری طبق استاندارد اینزو (ISO 21568 & ISO 13690)

Table 1- sampling according to ISO standards (ISO 21568 & ISO 13690).

تعداد نمونه‌ها از هر بسته	تعداد بسته‌ها در هر محموله
برداشتن از هر بسته	تا ۱۰ بسته
از ۱۰ بسته به طور تصادفی	۱۰ تا ۱۰۰ بسته
گرفتن ریشه مربع از کل بسته‌ها (ISO 13690)	بیشتر از ۱۰۰ بسته

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده به همراه ناحیه هدف آنها و طول قطعه‌ای که تکثیر می‌شود.

Table 2- Sequences of primers, target DNA, and amplicon length used in this study.

آزمون	آغازگر	توالی (۱۵' به ۳')	هدف	توالی دی.ان.ای (جفت باز)	اندازه تکثیر شده
شناسایی دی.ان.ای ذرت	IVR1-F	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC	<i>Invertase gene</i>		226
	IVR2-R	GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC			
غربالگری تواریخته بودن	35S-1	GCTCCTACAAATGCCATCA	P-35S		195
	35S-2	GATA GTGGATTGTGCGTCA			
	HA-nos 118-f	GCATGACGTTATTATGAGATGGG	T-nos		118
	HA-nos 118-r	GACACCGCGCGCGATAATTATCC			

نتایج و بحث

در این پژوهش با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی وضعیت تواریختگی دانه‌های ذرت با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که روشی با دقت و سرعت بالا برای شناسایی گیاهان تواریخته است، بررسی شد (Bellocchi *et al.* 2008; Zel *et al.* 2008; Marmiroli *et al.* 2008; Lipp *et al.* 2001; Meyer 1999). با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی به منظور تکثیر ژن رمز کننده اینورتاز به عنوان کنترل داخلی یک قطعه ۲۲۶ جفت بازی از ژنوم ذرت‌های مورد آزمایش تکثیر شد (شکل ۱). در بررسی وضعیت تواریختگی دانه‌های ذرت وارداتی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای دو ناحیه پیشبر *CaMV 35S* و پایان *nos* طی واکنش پی.سی. آر اقدام به تکثیر قطعاتی از این دو ناحیه شد. نتایج نشان دادند که ۵ نمونه دانه ذرت وارداتی از کشور آرژانتین تواریخته هستند (شکل ۲ و ۳). بر اساس نتایج

آنژیم دی.ان.ا. پلیمراز و μg ۱ از دی.ان.ای ژنومی برای آغازگر (IVR1-F/IVR2-R) تحت چرخه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، $65/3$ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگر (35S-1/35S-2) تحت چرخه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، $51/7$ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگر (HA-nos 118-f/HA-nos 118-r) تحت چرخه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، 61 درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. ۳۵ بار چرخه‌ها تکرار شد و بعد از آن قطعات برای تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

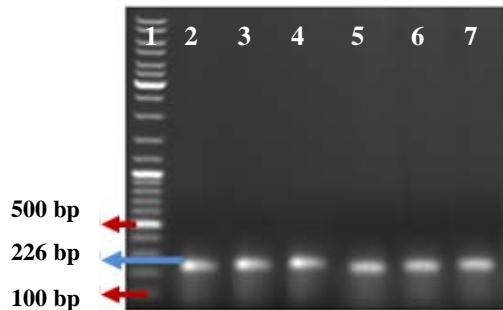
جدول ۳- انواع ذرت‌های تواریخته ثبت شده در کشور آرژانتین.

Table 3- Transgenic corns were planted in Argentina.

مشخصات	موجود تواریخته	نام موجود	کد شناسه
ذرت مقاوم به بیماری و آفات با استفاده از ژن <i>cry1Ab</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	MON 810	۱۴۷۵۰
ذرت مقاوم به بیماری و آفات با استفاده از ژن‌های <i>cry1A.105</i> و <i>cry2Ab2</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	MON 89034	۴۳۷۷۳
ذرت مقاوم به بیماری، آفات و علفکش گلایفوسینت با استفاده از ژن‌های <i>cp4 epsps</i> و <i>cry3Bb1</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	MON 88017	۱۵۱۰۶
ذرت مقاوم به بیماری، آفات و علفکش گلایفوسینات آمونیوم با استفاده از ژن‌های <i>cry1Ab</i> و <i>pat</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	Bt 11	۱۴۷۹۷
ذرت مقاوم به علفکش گلایفوسینت با استفاده از ژن <i>cp4 epsps</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	NK 603	۱۴۷۷۶
ذرت مقاوم به بیماری و آفات با استفاده از ژن <i>vip3Aa20</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	MIR 162	۱۰۰۸۸۵
ذرت مقاوم به علفکش گلایفوسینت با استفاده از ژن <i>epsps</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	GA 21	۱۴۷۹۴
ذرت مقاوم به بیماری، آفات و علفکش گلایفوسینت آمونیوم با استفاده از ژن <i>cry1Ab</i> و <i>pat</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	Bt 176	۱۴۷۵۱
ذرت مقاوم به بیماری، آفات و علفکش گلایفوسینت آمونیوم با استفاده از ژن‌های <i>cry1Ac</i> و <i>pat</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	DBT 418	۱۴۷۷۰
ذرت مقاوم به بیماری، آفات و علفکش گلایفوسینت آمونیوم با استفاده از ژن‌های <i>cry1Fa2</i> و <i>pat</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	TC 1507	۱۴۸۴۱
ذرت مقاوم به علفکش گلایفوسینت آمونیوم با استفاده از ژن <i>pat</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	T14	۱۴۷۶۶
ذرت مقاوم به علفکش گلایفوسینت آمونیوم با استفاده از ژن <i>pat</i>	<i>Zea mays</i> - Maize, Corn	T25	۱۴۷۶۷

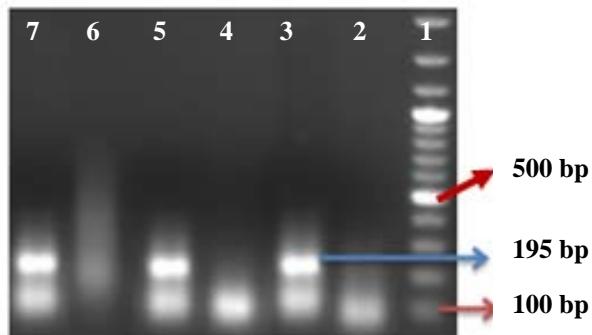
اتاق تهاتر ایمنی‌زیستی^۸، ذرت‌های تواریخته از کشور آرژانتین که در ساختار ژنوم خود دارای پیشبر *CaMV 35S* و پایان دهنده *nos* هستند، ذرت‌های تواریخته (YieldGard) MON 810، MON 88017، MON 89034، MON 803، Bt 11 و NK 603 هستند (جدول ۳). در حالی که بیش از ۸۰ درصد زمین‌های زیر کشت ذرت در دنیا، از ذرت‌های MON 810 پوشیده شده است و کشت این لاین

بدست آمده مشخص شد که ۳ نمونه از ۵ نمونه دانه‌های ذرت وارداتی از کشور آرژانتین، به نام‌های (۳) AGIOS SOSTIS (۵) MASTROGIORGIS و (۷) INCEILGAZ توالی پیشبر *CaMV 35S* (قطعه ۱۹۵ جفت بازی) و پایان دهنده *nos* (قطعه ۱۱۸ جفت بازی) هستند (شکل ۲ و ۳) و ۲ نمونه از دانه‌های ذرت وارداتی به نام‌های (۴) IRON LINDREW و (۶) PREVENTER در ژنوم خود دارای پایان دهنده *nos* و فاقد پیشبر *CaMV 35S* بودند (شکل ۳). طبق اطلاعات ثبت شده در



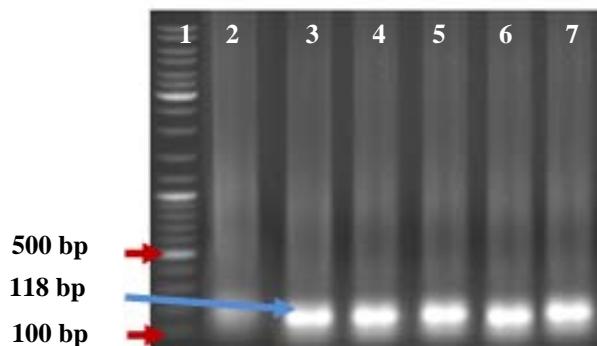
شکل ۱- شناسایی ژن اینورتاز در ژنوم نمونه‌های ذرت مورد بررسی با استفاده از جفت آغازگر IVR1-F/ IVR2-R. ۱. نشانگر اندازه ۱۰۰ bp. ۲. کنترل منفی از ذرت داخلی غیر ترازیخته، ۳-۷. نمونه‌های ذرت وارداتی مورد آزمایش.

Figure 1- Detection of *invertase* gene in DNA from maize seeds using IVR1-F/ IVR2-R primers. 1. 100 bp size marker, 2. Non transgenic maize as negative control, 3. Imported maize seeds.



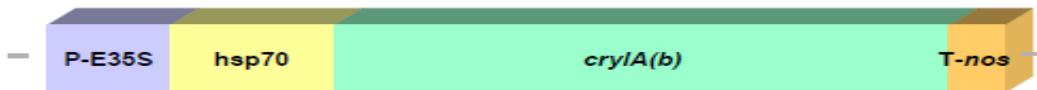
شکل ۲- شناسایی توالی پیشبر *CaMV 35S* در ژنوم نمونه‌های ذرت مورد بررسی با استفاده از جفت آغازگر 35S-1/35S-2. ۱. نشانگر اندازه ۱۰۰ bp. ۲. کنترل منفی از ذرت داخلی غیر ترازیخته، ۳-۷. نمونه ذرت مورد آزمایش.

Figure 2- Detection of *CaMV 35S* promoter in DNA from maize seeds using 35S-1/35S-2 primers. 1. 100 bp size marker, 2. Non transgenic maize as negative control, 3. Imported maize seeds.



شکل ۳- شناسایی توالی پایان دهنده *NOS* در ژنوم نمونه‌های ذرت مورد بررسی با استفاده از جفت آغازگر HA-nos 118-f /HA-nos 118-r. ۱. HA-nos 118-f /HA-nos 118-r ۱۰۰ bp. ۲. کنترل منفی از ذرت داخلی غیر ترازیخته، ۳-۷. نمونه ذرت‌های وارداتی.

Figure 3- Detection of *NOS* terminator in DNA from maize seeds using HA-nos 118-f /HA-nos 118-r primers. 1. 100 bp size marker, 2. Non transgenic maize as negative control, 3. Imported maize seeds.



شکل ۴- کاست ژنی MON 810. ساختار ژنی استفاده شده برای انتقال به ذرت (Aguilera *et al.* 2003).

Figure 4- Construct MON 810. The construct used for the transformation of maize.

(2011). نتایج ارایه شده در این پژوهش، نشان‌دهنده تاریخته بودن دانه‌های ذرت وارد شده به کشور است. این در حالی است که پژوهش‌ها نشان می‌دهند که محصولات تاریخته اعلام نشده به سایر کشورها هم وارد می‌شوند اما واردات آنها به صورت غیر قانونی است (Marx. 2010). طی پژوهشی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پسی.سی.آر مشخص شده است که ۳ لاین ذرت تاریخته در سال ۲۰۰۰ از آمریکا وارد ژاپن شده‌اند (Matsuoka *et al.* 2000) که این نشان‌دهنده ورود ذرت‌های تاریخته به کشورهای وارد کننده این محصول است. در ایران با توجه به واردات عمده دانه‌های روغنی از کشورهایی که بیشترین سطح زیرکشت گیاهان تاریخته را در دنیا دارا هستند بکارگیری این فناوری و تولید گیاهان تاریخته در داخل و اجرای قوانین از ملزمات است. طی پژوهش‌هایی که در سال‌های اخیر در کشورهای منطقه صورت گرفته مشخص شده است که بسیاری از محصولات تاریخته در بازارهای این کشورها به فروش می‌رسد که عمده آنها وارداتی هستند (Abdel-Mawgood *et al.* 2010؛ Abdel-Mawgood *et al.* 2012؛ Al-Salameen *et al.* 2012).

با توجه به این که ایران یکی از بزرگترین وارد کننده‌های دانه ذرت از کشورهای تولیدکننده ذرت تاریخته است بررسی تاریخته بودن دانه‌های ذرت وارداتی با یک روش شناسایی مناسب و سریع حائز اهمیت است. با توجه به آمار مستند و پژوهش‌هایی به عمل آمده در رابطه با سلامت و سودمندی این محصولات، عدم تولید این گیاهان در کشور از اهمیت خاصی برخوردار می‌شود. تا امروز میلیون‌ها هکتار زمین زیر کشت محصولات تاریخته رفته و هیچ نوع مشکل بهداشتی ناشی از مصرف محصولات تاریخته و یا فرآورده‌های آنها در انسان مشاهده نشده است و بارها سلامت و کیفیت آنها به اثبات رسیده است (Helt. 2004؛ Meyer *et al.* 1996). با توجه به در نظر

به طور تجاری هر ساله در حال افزایش است (Singh *et al.* 2007)، احتمال می‌رود که ذرت‌های تاریخته مورد استفاده در این پژوهش که هم دارای ناحیه پیشبر *CaMV 35S* و هم دارای پایان دهنده *nos* هستند، از ذرت MON 810 گرفته شده باشند. این لاین با داشتن ژن (*cryIA(b)*) مقاومت اختصاصی به کرم ساقه *Bruderer and Ostrinia nubilalis* (Leitner. 2003) دارد (Aguilera *et al.* 2008). طبق اطلاعات ثبت شده در اتاق تهاتر ایمنی‌زیستی، به احتمال زیاد نمونه‌های ۴ و ۶ که دارای پایان دهنده *nos* هستند اما فاقد پیشبر *CaMV 35S* هستند، از ذرت تاریخته 162 MIR که مقاوم به حشرات است یا GA 21 که مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت است گرفته شده‌اند (جدول ۳). این دو ذرت آرژانتینی در ژنوم خود فاقد پیشبر *CaMV 35S* و دارای پایان دهنده *nos* هستند. سایر ذرت‌های تاریخته از کشور آرژانتین، به نام‌های 176 Bt مقاوم به کرم ساقه خوار اروپایی در ساختار ژنوم خود دارای T-35S و P-35S و T-35S و P-35S مقاوم به کرم ساقه خوار اروپایی در ساختار ژنوم خود دارای T-Tr7 و P-35S مقاوم به حشرات و علف‌کش گلایفوسینیت آمونیوم در ساختار ژنوم خود دارای T-35S و T14 و T25 مقاوم به علف‌کش گلایفوسینیت آمونیوم در ساختار ژنوم خود دارای T-35S و P-35S هستند (جدول ۳).

با توجه به این که دستاوردهای مهندسی ژنتیک که مهمترین آنها در زمینه کشاورزی گیاهان تاریخته هستند، می‌تواند در کمترین زمان ممکن بسیاری از محدودیت‌ها را در ایجاد خصوصیات جدید و کمیت و کیفیت بهتر محصولات غذایی از سر راه بردارد، این فناوری به سرعت جایگاه ویژه‌ای را در کشورهای بزرگ تویید کننده محصولات کشاورزی در دنیا پیدا کرده است (James.

در اسنادی که همراه کالا وارد می‌شود، نامی از تاریخ‌گذاری بودن محصول و سایر اطلاعات لازم آورده نمی‌شود. در حالی که عمده‌ترین واردات دانه‌های روغنی از بزرگترین کشورهای تولید کننده محصولات تاریخ‌گذاری صورت می‌گیرد. بدین ترتیب هرگونه واردات محصولات کشاورزی باید با در نظر گرفتن حقوق مصرف کننده بر اساس قوانین مندرج در قانون ایمنی زیستی کارتهاینا که به تصویب مجلس شورای اسلامی رسیده است، بررسی شود. با توجه به اهمیت خاصی که محصولات تاریخ‌گذار در دنیا دارند و پیوستن ایران به پروتکل ایمنی زیستی کارتهاینا، با بررسی تاریخ‌گذاری بودن دانه‌های ذرت وارداتی اهمیت تولید این محصولات در کشور با در نظر گرفتن حقوق مصرف کننده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌شود که باید رسیدگی جدی در این رابطه صورت گیرد. در واقع تولید و استفاده از گیاهان تاریخ‌گذار در نظر گرفتن استانداردهای جهانی راجع به کیفیت و سلامت آنها که با انجام آزمایش‌های ارزیابی ایمنی، مجوز کشت و مصرف می‌گیرند، بیانگر امنیت و سلامت این محصولات است. آنچه مسلم است استفاده از محصولات سالم مهندسی ژنتیک جز با بالا بردن سطح آگاهی مردم به آشنایی هر چه بیشتر با سلامت و سودمندی گیاهان تاریخ‌گذار، فرهنگ‌سازی درباره پذیرش این محصولات و حمایت‌های دولت‌ها در این زمینه ممکن نیست. در واقع با ظهور گیاهان تاریخ‌گذار، راهکاری موثر در جهت تولید غذای سالم و کافی ایجاد شده است که تولید آنها به همکاری سازمان‌های اجرایی نیاز دارد و نتیجه مطلوب هنگامی بدست می‌آید که قانون اجرا شود و فرهنگ‌سازی و اطلاع‌رسانی صحیح برای مردم که مهمترین مصرف کنندگان هستند صورت گیرد.

منابع

1. Abdel-Mawgood AL, Gassem MA, Alsadon AA, Alghamdi SS, AL-Doss AA. 2010. Monitoring of genetically modified food in Saudi Arabia. African Journal of Food Science 4 (8): 536-540.
2. Aguilera M, Querci M, Balla B, Prospero A, Ermolli M, Van Den Eede G. 2008. A qualitative approach for the assessment of the genetic stability of the MON 810 trait in commercial seed maize varieties. Food Analytical Methods 1: 252-258.
3. Ahmed FE. 2002. Detection of genetically modified

گرفتن سلامت این محصولات و حقوق مصرف کننده، با آزاد بودن واردات گیاهان تاریخ‌گذار و مصرف آن، تولید این محصولات در داخل کشور از اهمیت خاصی برخوردار است. بدین ترتیب با توجه به نتایج بدست آمده که دلیل بر ورود ذرت تاریخ‌گذار به کشور است و با توجه به پیوستن ایران به پروتکل کارتهاینا و تصویب قانون ملی ایمنی زیستی، تولید محصولات تاریخ‌گذار در داخل باید به طور جدی مورد بررسی قرار گیرد. موارد مهمی که در رابطه با واردات محصولات تاریخ‌گذار در پروتکل کارتهاینا و قانون ملی ایمنی زیستی درج شده است اما در عمل به آنها توجهی نمی‌شود، به شرح ذیل هستند: طبق ماده ۷ قانون ملی ایمنی زیستی ایران که در سال ۱۳۸۸ به تصویب مجلس شورای اسلامی رسیده است، کلیه اشخاص حقیقی و حقوقی که قصد واردات، صادرات و یا حمل و نقل داخلی و فرامرزی موجودات زنده تاریخ‌گذار موضوع این قانون را دارند، موظفند: الف- اطلاعات موردنیاز و مستندات علمی ارزیابی مخاطرات احتمالی براساس مفاد پروتکل ایمنی زیستی کارتهاینا را به دستگاه‌های اجرایی مرتبط مندرج در ماده (۴) این قانون را دریافت کنند. ب- شرایط لازم از نظر بسته بندی و حمل و نقل و برچسب‌گذاری را رعایت کنند. همچنین طبق پروتکل کارتهاینا، در محموله‌های صادراتی کالاهای کشاورزی که احتمال حضور سازواره‌های زنده اصلاح شده وجود داشته باشد، باید به وضوح در اسناد ارسالی به این مسئله اشاره شده باشد. افزون بر این، درج نام و هویت موجود زنده تاریخ‌گذار و استفاده مورد نظر از آن یا محصولات ناشی از آن، از موارد مهمی است که در پیوست ۱ و ۲ پروتکل ایمنی زیستی کارتهاینا (CBP) (Cartagena Biosafety Protocol (CBP))، عنوان شده است اما طبق بررسی‌های انجام شده، در گمرک ایران

organisms in food. Trends in Biotechnology 20 (5): 215-223.

4. Al-Salameen F, Kumar V, Al-Aqeel H, Al-Hashash H, Hejji, AB. 2012. Detection of genetically modified DNA in fresh and processed foods sold in Kuwait. GM Crops and Food Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 3 (4): 283-288.

5. Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H, Van Den Eede G. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in

- agricultural crops and plant derived food products. European Food Research and Technology 214: 3–26.
6. Bellocchi G, Acutis M, Paoletti C, Confalonieri R, Trevisiol P, Grazioli E, Delobel C, Savini C, Mazzara M, Van den Eede G. 2008. Expanding horizons in the validation of GMO analytical methods: fuzzy-based expert systems. *Food Analytical Methods* 1: 126–135.
 7. Bertoni G, Marsan PA. 2005. Safety risks for animals fed genetic modified (GM) plants. *Veterinary Research Communications* 29: 13–18.
 8. British Medical Association. 2004. Genetically modified foods and health: A second interim statement. Available at www.agenbio.org/adc/uploads/pdf/bma.pdf.
 9. Bruderer S, Leitner KE. 2003. Genetically modified (GM) crops: Molecular and regulatory details. Technical Report, Basel Switzerland: BATS, 70-73.
 10. Ehlers B, Strauch E, Goltz M, Kubsch D, Wagner H, Maidhof H, Bendiek J, Appel B, Buhk HJ. 1997. Identification of genetically modified maize by PCR. *Bundesgesundheitsblatt* 40 (4): 118–121.
 11. Gomrok S, Alemzadeh A, Izadi M. 2009. Genetically modified organisms: public acceptance in Yasuj and Dehdasht Province. *Journal of Biosafety* 1 (3): 19–30. (In Farsi with English abstract)
 12. 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, Universitat Gottingen In: Available at: <http://www.akademienunion.de/pressemitteilungen/2006-06/english.html>.
 13. Hemmer W. 1997. Foods derived from genetically modified organism and detection methods. Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss Science Foundation (BATS).
 14. James C. 2011. Global status of commercialized biotech GM crops: 2011. ISAAA Brief No. 43. ISAAA, Ithaca, NY.
 15. Kim CG, Yi H, Park S, Yeon JE, Kim Dy, Lee KH, Lee TC, Paek IS, Yoon WK, Jeong Sc, Kim HM. 2006. Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize around cultivated fields and at a grain receiving port in korea. *Journal of Plant Biology* 49 (3): 218–223.
 16. Lee B, Kim CG, Park JY, Park KW, Kim HJ, Yi H, Jeong SC, Yoon WK, Kim HM. 2009. Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize in cultivated fields and along the transportation routes of the Incheon Port in South Korea. *Food Cotrol* 20 (3): 250–254.
 17. Lipp M, Bluth A, Eyquem F, Kruse L, Schimmel H, Van den Eede G, Anklam E. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research* Technology 212: 497–504.
 18. Marmiroli N, Maestri E, Gullì M, Malcevschi A, Peano C, Bordoni R, De Bellis G. 2008. Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392: 369–384.
 19. Marx GM. 2010. Monitoring of genetically modified food products in South Africa. Available at: <http://etd.uovs.ac.za/ETD-db/theses/available/etd-10042011-094627/unrestricted/MarxGM.pdf>.
 20. Matsuoka T, Kawashima Y, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A. 2000. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 41 (2): 137–143.
 21. Meyer R. 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10 (6): 391–399.
 22. 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.
 23. Rajaie A. 2010. Six suggestions to achieve self-sufficiency in oilseeds production. The third international seminar on oilseeds and oils. IRIB International Conference Center, Iran, Tehran. (In Farsi with English abstract)
 24. Rastgoor L, Alemzadeh, A. 2010. Transgenic organisms. What is the public opinion in Khorasan Razavi Province? *Journal of Biosafety* 2 (4): 15–28. (In Farsi with English abstract)
 25. Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 81 (24): 8014–8018.
 26. Sarad N, Rathore M, Singh NK, Kumar N. 2004. Genetically engineered tomatoes: New vista for sustainable agriculture in high altitude regions. Proceedings of 4th Crop Science Congress. Australia, 262, 501.
 27. Singh CK, Ojha A, Kamle S, Kachru DN, Nachru, DN. 2007. Assessment of cry1Ab transgene cassette in commercial Bt corn MON810: gene, event, construct and GMO specific concurrent characterization. Available at: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/362>
 28. Zare S, Alemzadeh A. 2012. Public perception of people in Bushehr about GMOs. *Journal of Biosafety* 4 (1): 87–98. (In Farsi with English abstract)
 29. Žel J, Mazzara M, Savini C, Cordeil S, Camloh M, Štebih D, Cankar K, Gruden K, Morisset D, Van den Eede G. 2008. Method validation and quality management in the flexible scope of accreditation: An example of laboratories testing for genetically modified organisms. *Food Analytical Methods* 1: 61–72.

باقیمانده آفتکش‌های اندوسولفان (Endosulfan) و دیازینون

در مزارع گوجه‌فرنگی و خیار سبز استان کهگیلویه و

بویراحمد

عباس صلاحی‌اردکانی^{۱*}، محسن مردمی^۲ و مهرناز انتصاری^۳

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کهگیلویه و بویراحمد

۲- موسسه تحقیقات کیاپزشکی کشور

۳- شرکت زیست پژوهان خاور میانه

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۴)

چکیده

واژه‌های کلیدی

اندوسولفان

دیازینون

باقیمانده آفتکش

گوجه‌فرنگی

خیار سبز

ترازیخته

اصرار بر عدم استفاده از مهندسی ژئوتک و محصولات ترازیخته از سوی مدیران میانی در وزارت جهاد کشاورزی و سازمان حفاظت محیط زیست موجب استمرار روش‌های تولید غذا با تکیه بر سوم دفع آفات نباتی شیمیایی خطرناک شده است. به منظور تعیین باقیمانده سوموم، مزارع خیارسیز و گوجه‌فرنگی در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد مورد بررسی قرار گرفت و ضمن نمونه برداری، میزان باقیمانده سوموم اندوسولفان و دیازینون با استفاده از روش‌های استاندارد بین المللی در این مزارع مشخص شد. بیشترین مقدار باقیمانده مربوط به سم دیازینون در محصول خیارسیز بود. متوسط باقیمانده این سم در شهرستان‌های گچساران ۰/۴۶۲، بویراحمد ۰/۶۶۹ و کهگیلویه ۰/۲۰۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (mg/kg) محصول تشخیص داده شد. مقدار مجاز باقیمانده این سم براساس استانداردهای جهانی، در خیارسیز ۰/۱ mg/kg است. متوسط مقدار باقیمانده سم دیازینون در گوجه‌فرنگی در شهرستان‌های گچساران و دنا نیز بیشتر از حد مجاز جهانی و مقدار آن‌ها به ترتیب ۰/۵۰۴ و ۰/۵۳۴ mg/kg تعیین شد. مقدار مجاز باقیمانده این سم در محصول گوجه‌فرنگی براساس استانداردهای جهانی ۰/۵ mg/kg است. براساس نتایج این تحقیق، متوسط باقیمانده سم دیازینون در میوه خیارسیز در کل استان حدود ۳/۵ برابر بیشتر از حد مجاز جهانی و مقدار آن ۰/۳۵۵ mg/kg بود. میزان باقیمانده سم اندوسولفان در گوجه‌فرنگی و خیارسیز نیز در اکثر مناطق استان بیشتر از حد مجاز جهانی تشخیص داده شد. نتایج این تحقیقات نشان داد که علاوه بر بالا بودن میزان باقیمانده سوموم اندوسولفان و دیازینون در محصولات خیارسیز و گوجه‌فرنگی، فاصله مجاز بین آخرین سم پاشی تا برداشت محصولات (دوره کارنس)، تعداد مجاز دفعات سم پاشی، مصرف میزان مجاز سم و همچنین فاصله زمانی بین دو سم پاشی توسط اکثر کشاورزان رعایت نشده است. استمرار بر ممانعت از تولید محصولات ترازیخته که بی نیاز از مصرف سوموم شیمیایی هستند، موجب تزریق سوموم اندوسولفان و دیازینون در سبد غذایی مصرف کنندگان ایرانی خواهد بود.

مقدمه

دهد.

حدود ۱۰۰۰ هکتار از زمین‌های استان کهگیلویه و بویراحمد به کشت محصولات خیار سبز و گوجه‌فرنگی اختصاص داشته (Agricultural statistics letter of Iran, 2009) گستردگی از سموم حشره‌کش، به‌ویژه اندوسولفان (Endosulfan) و دیازینون (Diazinon) (جهت کترل آفت‌ها در این مزارع استفاده می‌شود. چنانچه این سموم بیش از حد مجاز در بدن انسان تجمع پیدا کنند، ضمن ناهمانگ کردن حرکات بدن، موجب تحریکات ماهیچه‌ای، تخریب کبد و غدد درون‌ریز، رعشه، تشنج و بالاخره مرگ سریع انسان می‌شوند (Van Emden and Van Emden, 1962; Peakall, 1996; Palikhe, 2002; Carson, 1962).

تاکنون حدود ۱۰ میلیون نوع ترکیبات شیمیایی به صورت مصنوعی ساخته شده است. دفتر اروپایی ثبت مواد شیمیایی، لیستی از ۱۱۰/۰۰۰ ترکیب شیمیایی را که بطور تجاری تولید می‌شوند تهیه کرده است و سالانه بین ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ ماده جدید به این لیست اضافه می‌شود. در سال ۱۹۸۴ شورای پژوهش‌های ملی آمریکا گزارش داده که فقط برای ۲ درصد از فرآورده‌های تجاری شیمیایی اطلاعات کافی به منظور ارزیابی کامل زیان‌های آن‌ها در دسترس است. ترکیبات آلی فسفره که بخش عمده‌ای از سم‌های حشره‌کش را شامل می‌شود در ردیف دوم فهرست سیاه قرار گرفته است (Van Emden and Peakall, 1996).

سم‌های آلی فسفره بر روی سیستم عصبی اثر گذاشته و فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (Acetyl cholin esterase) را از بین می‌برند. تحریکات عصبی توسط استیل کولین از یک سلول عصبی به سلول دیگر منتقل و سپس استیل کولین توسط آنزیم استیل کولین استراز از بین می‌رود. سموم فسفره آلی با مختلط کردن کار این آنزیم، باعث می‌شوند که استیل کولین از بین نرفته و به صورت مداوم باعث تحریک عصبی شود. در نتیجه، تحریک بی در بی عصبی باعث تشنج و مرگ می‌شود (Palikhe, 2002).

هدف کلی این پژوهش، تعیین میزان باقیمانده سموم اندوسولفان و دیازینون در خیار سبز و گوجه‌فرنگی در استان کهگیلویه و بویراحمد بود تا براین اساس بتوان به اهداف فرعی از قبیل تعیین اختلاف میزان باقیمانده سموم مذکور با استاندارد جهانی، تعیین مدت زمان آخرین سمپاشی تا برداشت محصول (دوره کارنس) و

در انتهای سال ۲۰۱۱ میلادی بیش از ۱۶۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی جهان به کشت محصولات تاریخته اختصاص یافت که ۶۴ میلیون هکتار آن به گیاهان تاریخته مقاوم به آفت‌ها اختصاص دارد (Adeli and Ghareyazie, 2012). به این ترتیب، با کاشت این نوع محصولات و با استفاده از راهبرد استفاده از گیاهان مقاوم به آفت‌ها، مصرف سموم شیمیایی دفع آفت‌های گیاهی به طور چشم‌گیری کاهش پیدا کرده و مهم‌تر از آن اینکه این محصولات به صورت طبیعی فاقد باقیمانده سموم بوده و ضمن تضمین سلامتی مصرف کنندگان از بازار صادراتی مناسبی نیز برخوردار خواهد بود. با وجود صراحت قانون اینمنی زیستی بر تولید، رهاسازی، کاشت و مصرف محصولات تاریخته و با وجود واردات چند میلیارد دلاری این نوع محصولات و مصرف آن در کشور، گروهی از مدیران میانی در کشور با انگیزه‌های مختلف مانع اجرای قانون و تولید این نوع محصولات شده‌اند. آن‌ها به طور عملده بر اثرهای احتمالی سو ناشی از مصرف محصولات تاریخته بر سلامتی انسان و مسائل زیست محیطی تکیه کرده و به این ترتیب با ایجاد هراس در بین مصرف کنندگان و مدیران ارشد کشور تا امروز مانع تولید محصولات تاریخته شده‌اند و این در حالی است که فناوری مهندسی ژنتیک توسط دانشمندان ایرانی بومی‌سازی شده و نام ایران به عنوان اولین کشور جهان که در سال ۱۳۸۳ برنج تاریخته مقاوم به آفت کرم ساقه‌خوار را به تولید انبوه رساند، در تاریخ ثبت شده است. اصرار مخالفین تولید محصولات تاریخته به ویژه آن دسته از مخالفینی که ادعای زیان‌آور بودن این نوع محصولات را دارند از دو جنبه قابل تأمل است. اول اینکه تا کنون هیچ مدرکی مبنی بر وجود هر نوع اثر منفی در مورد گیاهان تاریخته ارائه نشده است. دوم اینکه عدم کشت محصولات تاریخته به منزله ادامه کشت محصولات حساس به آفت‌ها است که موجب استمرار مصرف سموم شیمیایی دفع آفت‌های گیاهی خطرناک می‌شود. سمومی که زیان آور بودن آن‌ها به ویژه به صورت باقیمانده سموم به استنادهای بی‌شماری به اثبات رسیده است. این مقاله در صدد است تا نتیجه اصرار بر عدم کشت محصولات مقاوم (تاریخته) را از جنبه باقیمانده سموم در استان کهگیلویه و بویراحمد نشان

ارتفاع از سطح دریا، سطح زیرکشت، نوع محصول، نوع آبیاری، تاریخ کاشت، تاریخ اولین سم‌پاشی، تعداد دفعات سم‌پاشی، نوع سموم مصرفی، میزان سموم مصرفی و فاصله بین آخرین سم‌پاشی تا برداشت محصول، در فرم‌های اطلاعاتی مخصوص ثبت شد.

نمونه‌های بدست آمده را در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص گذاشته و ضمن درج مشخصات مربوط به هر نمونه، آن‌ها را در ظروف حاوی یخ قرار داده و در حالت فریز شده به آزمایشگاه منتقل شدند. همچنین تعداد ۳ نمونه خیار سبز و ۳ نمونه گوجه‌فرنگی بصورت تصادفی از فروشگاه‌های عرضه محصولات کشاورزی در شهرهای یاسوج، دهدشت و گچساران، انتخاب شد. وزن هر کدام از این نمونه‌ها یک کیلوگرم و هر نمونه مخلوطی از ۴ نمونه تصادفی بود که از فروشگاه‌های عرضه محصولات کشاورزی خریداری شدند و ضمن درج اطلاعات مربوطه و نگهداری در شرایط فریز شده به آزمایشگاه منتقل شدند.

عملیات آزمایشگاهی

تعیین میزان باقیمانده سموم دیازینون و اندوسولفان در آزمایشگاه: برای این منظور از روش ذیل که تنها روش استاندارد بین‌المللی بوده و در تمام نقاط جهان رایج است استفاده شد. این عمل درخصوص سم دیازینون، در آزمایشگاه باقیمانده سموم مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و درخصوص سم اندوسولفان در آزمایشگاه وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و به کمک پرسنل و امکانات موجود در این آزمایشگاه‌ها انجام شد (Ciba, 1989; Baumann *et al*, 1996).

آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های خیار سبز و گوجه‌فرنگی، در شرایط استاندارد (بصورت یخ‌زده و در دمای پایین) به آزمایشگاه منتقل و در فریزر نگهداری شدند. سپس با استفاده از دستگاه همزن برقی، هر نمونه نیم کیلوگرمی آسیاب و ده گرم از آن جهت تعیین باقیمانده حشره‌کش انتخاب شد. مقدار فوق در داخل دستگاه همزن با ۶۰ استون مخلوط و بمدت ۲ دقیقه و ۲ بار مخلوط شد.

استخراج باقیمانده سموم به روش مایع به مایع - (Liquid liquid extraction) : نمونه حاوی استون از قیف بوخرن عبور

تعیین میزان و نحوه مصرف سموم دیازینون و اندوسولفان در محصولات خیار سبز و گوجه‌فرنگی در استان دست یافت. تا قبل از این پژوهش، هیچ‌گونه پژوهشی در خصوص تعیین میزان باقیمانده سموم اندوسولفان و دیازینون در خیار سبز و گوجه‌فرنگی در استان کهگیلویه و بویراحمد صورت نگرفته است، بنابراین در سایر نقاط، پژوهشگران مختلفی میزان باقیمانده این دو سم را در محصولات مختلف اندازه‌گیری کرده‌اند (Hajiabadi *et al*, 2000; Dikshit *et al*, 1980; Frank *et al*, 1991; Verma, 1979; Rezvani *et al*, 2009

مواد و روش‌ها

عملیات صحرایی

نمونه‌برداری از میوه‌های خیار سبز و گوجه‌فرنگی در مزارع استان کهگیلویه و بویراحمد: از مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد (شهرستان‌های بویراحمد، دنا، کهگیلویه و گچساران) که کشت خیار سبز و گوجه‌فرنگی در آن‌ها رایج بود بازدید شد. نمونه‌برداری از مزارع خیار سبز و گوجه‌فرنگی براساس سطح زیرکشت این محصولات در هر شهرستان به شرح جدول ۳ انجام گرفت. جامعه آماری خیار سبز و گوجه‌فرنگی در استان کهگیلویه و بویراحمد به ترتیب معادل ۵۰۳ و ۲۹۴ هکتار است که از جامعه مذکور ۵۳ مزرعه بعنوان جامعه نمونه‌برداری از محصول خیار سبز و ۲۴ مزرعه بعنوان جامعه نمونه برای نمونه‌برداری از محصول گوجه‌فرنگی انتخاب شد تا براساس استاندارد جهانی، نتایج حاصله از این پژوهش قابل تعمیم به کل استان باشد (Codex Stan CAC/GL 40/1993). انتخاب تعداد مزارع و همچنین تعداد نمونه‌برداری‌ها بر اساس سطح زیرکشت در هر شهرستان و با توجه به وجود دو شرایط اقلیمی سردسیری و گرمسیری در استان صورت گرفت. تعداد نمونه‌های انتخاب شده برای خیار سبز ۱۰۶ و برای گوجه‌فرنگی ۴۸ عدد بوده و برای هر نمونه ۰/۵ کیلوگرم از هر محصول برداشت شد. نمونه‌برداری بصورت کاملاً تصادفی و به روش کادراندازی با استفاده از کادرهای با ابعاد ۰/۵ × ۰/۵ متر (۰/۲۵ متر مربع) انجام گرفت. طی این بازدیدها، ضمن نمونه‌برداری از میوه‌های خیار سبز و گوجه‌فرنگی، اطلاعات مربوط به هر مزرعه شامل نام منطقه،

جدول ۱- سطح زیرکشت و جامعه آماری نمونه برداری از محصولات خیارسیز و گوجه‌فرنگی در استان کهگیلویه و بویراحمد

Table 1- Cultivated area and statistic society of cucumber and tomato products in Kohgyloyeh va Boyerahmad province

توضیحات Explanation	تعداد نمونه‌های انتخاب شده جهت تعیین باقیمانده سموم						نام شهرستان Name of country	
	No. of selected samples for determination of pesticide residues		No. of investigated fields		Cultivated area (ha)			
	گوجه فرنگی Tomato	خیارسیز Cucumber	گوجه فرنگی Tomato	خیارسیز Cucumber	گوجه فرنگی Tomato	خیارسیز Cucumber		
وزن تقریبی هر نمونه ۰/۵ کیلوگرم بوده است. Weight of each sample was around 0.5 kg	24	32	12	16	118	179	گچساران Ghachsaran	
	40	32	20	16	102	65	کهگیلویه Kohgyloyeh	
	4	16	2	8	10	15	دنا Dena	
	18	30	9	15	64	244	بویراحمد Boyrehahmad	

طول ستون ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر استفاده شد. قطر پوسته: ۰/۰۲۵ mm، دمای اوایله ستون: ۱۵۰ درجه سانتی گراد با توقف ۵ دقیقه و بعد با رمپ ۳ درجه دردقیقه به ۲۸۰ درجه سانتی گراد با زمان توقف ۱۰ دقیقه انتخاب شد. از انژکتور Splitless، دمای انژکتور: ۲۰۰ درجه سانتی گراد، آشکارساز NPD با دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد استفاده شد. از گاز حامل هیدروژن/هوا، میزان جریان ۳ میلی لیتر/دقیقه با زمان بازدارندگی $Rt=15.6$ استفاده شد.

برای آنالیز اندوسولفان از دستگاه Shimadzu, Japan Model: GC-2010 و ستون CPSIL 24CB با دمای ستون ۲۵۰ درجه سانتی گراد، قطر پوسته ۰,۵ mm، دمای اوایله ستون ۱۵۰ درجه سانتی گراد با توقف ۵ دقیقه و بعد با رمپ ۳ درجه در دقیقه به ۲۵۰ درجه سانتی گراد با زمان توقف ۱۰ دقیقه استفاده شد. از انژکتور Splitless، دمای انژکتور: ۲۵۰ درجه سانتی گراد، آشکارساز ECD با دمای ۲۸۰ درجه سانتی گراد و زمان بازدارندگی $Rt=21.5$ استفاده شد. از گاز حامل نیتروژن/هوا با جریان ۳۰ میلی لیتر/دقیقه و در صورت استفاده از ستون HP با طول ۳۰ متر از گاز حامل N2 استفاده شد.

داده شد و داخل دستگاه دکانتور ریخته شد. سپس یکصد و پنجاه میلی لیتر سولفات سدیم ۲ درصد به این نمونه اضافه شد. چهار میلی لیتر دی کلرومتان به محلول فوق اضافه کرده و بشدت تکان داده شد. دی کلرومتان را داخل ظرف دیگری جمع آوری کرده و باز دیگر ۲۰ ml دی کلرومتان اضافه شد. دوباره پس از تکان دادن، فاز حامل دی کلرومتان به قبلی اضافه شد. برای بار سوم این عمل با ۲۰ ml دی کلرومتان دیگر تکرار شد. کل محتويات ظرف حامل دی کلرومتان را از قیف بوخرن (حاوی سولفات سدیم) عبور داده، نمونه را خشک کرده و بوسیله دستگاه تقطیر در خلا، تقطیر شد و تا زمان آنالیز در فریزر نگهداری شد. لازم به ذکر است که در صورت وجود ناخالصی و مواد اضافی در نمونه‌ها، باید محلول حاوی دی کلرومتان را از ستون فلور زیل عبور داد و محلول را تصفیه کرد.

تعیین میزان باقیمانده سموم بوسیله دستگاه آنالیز کنندۀ: برای این کار از دستگاه گاز کروماتوگراف با دتکتورهای ECD¹ و NPD² استفاده شد.

برای آنالیز دیازینون از دستگاه: Shimadzu, Japan Model: GC-2010 با ستون: Cpb-5 و دمای ستون: ۲۸۰ درجه سانتی گراد و

1- Electron Capture Detector
2- Nitrogen Phosphor Detector

جدول ۲- متوسط مقدار باقیمانده سموم اندوسولفان و دیازینون در خیارسیز و گوجه‌فرنگی در چهار شهرستان و استان کهگیلویه و بویراحمد

Table 2- Averages of Endosulfan and Diazinon residue in cucumber and tomato at the four countries as well as the province

		متوسط مقدار باقیمانده سم دیازینون (mg/kg)		متوسط مقدار باقیمانده سم اندوسولفان (mg/kg)		نام شهرستان Name of country	
				Averages of Endosulfan residue (mg/kg)			
گوجه‌فرنگی Tomato	خیار سبز Cucumber	گوجه‌فرنگی Tomato		خیار سبز Cucumber			
		ایزومر β isomer	α isomer	ایزومر β isomer	α isomer		
0.504	0.462	0.284	0.325	0.443	0.352	گچساران Ghachsaran	
0.195	0.205	0.216	0.130	0.271	0.167	کهگیلویه Kohgyloreh	
0.392	0.669	0.435	0.447	0.349	0.295	بویراحمد Boyreahmad	
0.534	0.088	0.102	0.131	0.297	0.207	دنا Dena	
0.406	0.355	0.259	0.258	0.341	0.255	استان Province	

نتایج و بحث

مقدار باقیمانده سموم اندوسولفان و دیازینون در مناطق مختلف

استان کهگیلویه و بویراحمد

نتایج حاصله از این پژوهش، شامل متotropic مقدار باقیمانده سموم در هر منطقه، تاریخ سپاپاشی، تاریخ نمونه برداری، مقدار سم مصرفی، تعداد دفعات سپاپاشی و متotropic زمان سپاپاشی تا برداشت محصول، به تفکیک مناطق مورد بازدید ثبت شد. بر اساس این نتایج، در مناطق تنگاری، کوشک، تنگ تامرادی و سپیدار از توابع شهرستان بویراحمد و خیرآباد از توابع شهرستان گچساران، مقدار باقیمانده سم اندوسولفان در گوجه‌فرنگی بیشتر از حد مجاز جهانی بود. همچنین مقدار باقیمانده سم اندوسولفان در خیار سبز در مناطق تنگاری و دمکره از توابع شهرستان بویراحمد، دهوه، ده خلیفه و شامبرآکان از توابع شهرستان گچساران، دلی رج از توابع شهرستان دنا بیشتر از حد مجاز جهانی تشخیص داده شد. مقدار باقیمانده سم دیازینون در گوجه‌فرنگی

حد تشخیص و حد کمی کردن (LOD)

and quantification (LOQ): تعیین LOQ و LOD با دستگاه

GC/ECD برای اندازه گیری اندوسولفان به ترتیب $0.03 \mu\text{g/g}$ و $0.09 \mu\text{g/g}$ پی پی ام (قسمت در میلیون) و برای دستگاه GC/NPD و اندازه گیری دیازینون نیز این شاخص‌ها و با همین خصوصیات استفاده شد.

در صد بازیافت و روش محاسبه: برای سنجش میزان بازدهی روش کار، مقدار $15 \mu\text{g}$ ، $35 \mu\text{g}$ و $75 \mu\text{g}$ میکروگرم از محلول $100 \mu\text{l}$ میلی گرم بر کیلوگرم استاندارد دیازینون و اندوسولفان به منظور تهیه ی غلظت های $0.025 \mu\text{g/g}$ ، $0.05 \mu\text{g/g}$ و $0.1 \mu\text{g/g}$ به $15 \mu\text{g}$ نمونه سپاپاشی نشده (شاهد) اضافه گردید و کلیه مراحل استخراج مطابق با نمونه های قبلی انجام و تعیین شد.

غلظت های اندوسولفان و ایزومرهای آن: غلظت اندوسولفان در جداول بر اساس ایزومرهای آن به تفکیک تعیین و مجموع آن به عنوان اندوسولفان کل ارایه شد.

جدول ۳- متوسط مقدار باقیمانده سوموم اندوسولفان و دیازینون در خیارسیز و گوجه‌فرنگی در بازار یاسوج، دهدشت و گچساران

Table 3- Averages of Endosulfan and Diazinon residue in cucumber and tomato at the markets of Yasouj, Dehdasht and Ghachsaran.

متوسط مقدار باقیمانده سم دیازینون (mg/kg)		متوسط مقدار باقیمانده سم اندوسولفان (mg/kg)				نام منطقه Name of region	
Averages of Diazinon residue (mg/kg)		Averages of Endosulfan residue (mg/kg)					
گوجه فرنگی Tomato	خیار سبز Cucumber	Tomato		Cucumber			
		β isomer	α isomer	β isomer	α isomer		
0.030	0.121	0.006	Undetectable	Undetectable	Undetectable	بازار یاسوج Yasouj market	
0.211	0.201	0.011	Undetectable	0.016	0.008	بازار دهدشت Dehdasht market	
Undetectable	0.092	Undetectable	Undetectable	0.031	0.021	بازار گچساران Ghachsaran market	

گوجه‌فرنگی بر اساس استانداردهای جهانی ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم محصول است. بر اساس این نتایج متوسط باقیمانده سم دیازینون در خیار سبز در کل استان حدود ۳/۵ برابر بیشتر از حد مجاز جهانی و مقدار آن ۷۳۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن محصول بود (جدول ۲).

حاجی رزاق و همکاران در سال ۱۳۸۰ مقدار آلودگی رودخانه‌های کارون و دز به سوموم شیمیایی اورگانوفسفره را که در کشاورزی استفاده می‌شود، بررسی کردند. در این بررسی مقدار باقیمانده ۱۵ سم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که مقدار باقیمانده سوموم در فصل بهار و تابستان بیشتر از سایر فصول سال و در مواردی نیز بالاتر از حد مجاز بوده است. نتایج از نظر درصد فراوانی سوموم آزمایش شده نشان داد که سم دیازینون نسبت به سایر سوموم آزمایش شده از فراوانی بیشتر برخوردار بوده است. آن‌ها علت این نتیجه‌گیری را مصرف زیاد سم دیازینون به عنوان یک حشره‌کش عمومی ذکر کردند. همچنین حاجی آبادی و همکاران در سال ۱۳۷۹ وضعیت آلودگی رودخانه بابلرود به سوموم کشاورزی را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در این رودخانه باقیمانده چهار سم اورگانوفسفره را

در مناطق امامزاده‌جعفر، ده ناصر و خیرآباد از توابع شهرستان گچساران به ترتیب ۰/۵۱۶، ۰/۶۲۱ و ۱/۲۱۶ (mg/kg) و بهرامیگی از توابع شهرستان دنا ۰/۵۳۴ (mg/kg) بود که این مقادیر بیشتر از حد مجاز جهانی است. در سایر مناطق استان، مقدار باقیمانده سوموم اندوسولفان و دیازینون روی محصولات خیار سبز و گوجه‌فرنگی کمتر از حد مجاز تشخیص داده شد. بیشترین مقدار باقیمانده سم در استان، مربوط به سم دیازینون در محصول خیار سبز بوده است. مقدار مجاز باقیمانده این سم در خیار سبز بر اساس استانداردهای بین‌المللی ۰/۱ میلی‌گرم در هر کیلوگرم محصول است، در صورتیکه متوسط مقدار باقیمانده این سم در شهرستان گچساران ۰/۴۶۲، در شهرستان بویراحمد ۰/۶۶۹ و در شهرستان کهگیلویه ۰/۲۰۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم محصول بود. در شهرستان دنا متوسط مقدار باقیمانده سم دیازینون کمتر از استاندارد جهانی و مقدار آن ۰/۰۸۷۵ تشخیص داده شد. متوسط مقدار باقیمانده سم دیازینون در گوجه‌فرنگی متغیر بود، به نحوی که در شهرستان‌های گچساران و دنا این مقدار بترتیب ۰/۵۰۴ و ۰/۵۳۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم گوجه‌فرنگی تشخیص داده شد. حد مجاز باقیمانده این سم در

متوسط مقدار مصرف این سم در استان برای خیار سبز ۵ و برای گوجه‌فرنگی ۴ لیتر در هکتار بود. بر اساس دستور عمل شرکت سازنده سم دیازینون، حداقل فاصله زمانی بین آخرین سم‌پاشی تا برداشت محصول (دوره کارنس) ۱۰ روز اعلام شده است (FAO and WHO, 2008; Codex Alimentarius, 2003). روز پس از سم‌پاشی، محصول خیار سبز خود را برداشت و روانه بازار مصرف می‌کرده‌اند. در مورد گوجه‌فرنگی این فاصله زمانی ۱۲ روز بود. همچنین حداقل فاصله زمانی بین آخرین سم‌پاشی تا برداشت محصول برای ۱۵ روز اعلام شده، در صورتی که متوسط زمان آخرین سم‌پاشی تا برداشت محصول برای خیار سبز ۴ روز و برای گوجه‌فرنگی ۱۰ روز بود. از طرف دیگر، متأسفانه قبل از اینکه دوره کارنس برای سم‌پاشی اول به اتمام برسد، معمولاً سم‌پاشی‌های نوبت دوم و سوم نیز در مورد هر دو سم اندوسولفان و دیازینون توسط کشاورزان این استان انجام گرفته و این موضوع باعث می‌شود در تمام مدت برداشت محصول، مقداری باقیمانده سم در محصولاتی که روانه بازار می‌شوند وجود داشته باشد. در خصوص تعداد دفعات سم‌پاشی نیز ملاک و معیار خاصی در استان وجود نداشته و معمولاً به محض مشاهده چند آفت، سم‌پاشی توسط کشاورزان صورت گرفته است.

کشت متداول خیار و گوجه‌فرنگی در استان کهگیلویه و بویراحمد با مصرف بی‌رویه سموم خطرناک شیمیایی همراه شده است. کشاورزان در این استان و بر اساس مصاحبه با پژوهشگران در بسیاری از سایر استان‌ها) از سومومی که هرگز برای تولید این محصولات توصیه نشده است استفاده می‌کنند و در این راه حتی مقدار مصرفی این سموم برای محصولات مشابه را هم نادیده گرفته و تا دو و حتی سه برابر مقادیر توصیه شده برای سایر محصولات در گوجه‌فرنگی و خیار استفاده می‌کنند. عدم رعایت میزان مصرف سموم و عدم رعایت حداقل فاصله زمانی بین آخرین سم‌پاشی تا برداشت محصول (دوره کارنس) موجب افزایش باقیمانده سموم به دو تا ۵ برابر میزان مجاز استاندارد جهانی شده است. در سایر نقاط کشور نیز نتایج مشابهی به دست آمده است. تجزیه میزان سم در نمونه‌های خربزه مربوط به

شناسایی و تعیین کردند. این سموم به ترتیب اهمیت عبارت بودند از دیازینون، اتیون، فینتراتیون و پاراتیون متبل. آن‌ها گزارش کردند که در بعضی موارد مقادیر بدست آمده بیش از حد مجاز جهانی در آب‌ها بوده است. اکثر حشره‌کش‌ها در تابستان غلظت بیشتری در مقایسه با بقیه فصول داشته و دیازینون به دلیل فور مزارع برنج در منطقه و به علت مصرف گسترده‌ای که در مزارع دارد، در تمام فصول و در تمام ایستگاه‌های پژوهشی مشاهده شده است (Hajibabadi et al, 2000).

مقدار باقیمانده سموم اندوسولفان و دیازینون در فروشگاه‌های عرضه محصولات کشاورزی

مقدار باقیمانده سم دیازینون روی خیار سبز در بازار یاسوج و دهدشت بیشتر از حد مجاز و مقدار باقیمانده سم اندوسولفان در خیار سبز و گوجه‌فرنگی در بازار یاسوج، دهدشت و گچساران کمتر از حد مجاز تشخیص داده شد (جدول ۳). پژوهش‌های پالیکه نشان داد که ۶۰ درصد کشاورزان نپال برای مدت ۵ سال به طور متناوب و بدون آیش گذاشتن زمین‌های زراعی، از آفت‌کش‌ها در فاصله‌های زمانی بسیار کم حتی کمتر از دو هفته قبل از برداشت محصول، استفاده کرده‌اند. او مصرف سم اندوسولفان در نپال را بسیار رایج ذکر کرده، در حالی که این سم برای موجودات آبزی بخصوص ماهی بسیار سمی است

(Palikhe, 2002).

مقدار و نحوه مصرف سموم اندوسولفان و دیازینون روی خیار سبز و گوجه‌فرنگی و چگونگی برداشت محصول بعد از سم‌پاشی

با وجود اینکه استفاده از اندوسولفان در محصولات خیار سبز و گوجه‌فرنگی توصیه نشده است، بنابراین کشاورزان استان کهگیلویه و بویراحمد ضمن استفاده از سم مذکور، بطور متوسط به مقدار ۴/۲۵ سی.سی در لیتر جهت سم‌پاشی خیار سبز و گوجه‌فرنگی استفاده کرده‌اند و این در حالی است که حداقل مقدار مجاز مصرف این سم در محصولات توصیه شده، ۲/۵ سی.سی در لیتر است. حد مجاز مصرف سم دیازینون برای کنترل مگس خربزه در جالیز ۱/۵ لیتر در هکتار است، در صورتی که

معایب تکیه بر روش‌های سنتی تولید غذا در ایران است که موجب افزایش هزینه تولید و عدم امکان رقابت با محصولات وارداتی نیز می‌شود. بنا بر این ضعف آموزش و ترویج کشاورزی و فناوری هراسی مدیران میانی به ویژه در وزارت جهاد کشاورزی که موجب محرومیت کشور از فناوری سرنوشت ساز مهندسی زنگی و استفاده از محصولات تاریخته شده است، دو عامل اصلی وضعیت فعلی ارزیابی می‌شود، وضعیتی که مدیران معتقد به وجود اثرهای سو احتمالی محصولات تاریخته بر سلامت انسان باید پاسخگوی آن باشند. معلوم نیست چرا این قبیل مسئولان در وزارت بهداشت و وزارت جهاد کشاورزی نگران ادامه مصرف سموم شیمیایی، باقیمانده مصرف سموم و اثر سو اثبات شده آن بر سلامت انسان، دام و محیط زیست نیستند.

منابع

1. Adeli N, Ghareyazie B. 2012. Comparison of Environmental, Human and Animal Safety Aspects Between the Traditional Agrochemical-Based Insect Control and the Use of Insect Resistant Biotech Crops. Gnetic Engineering and Biosafety Journal, Vol. 1, No. 2.
2. Agricultural statistics letter of Iran. 2009. Vol. 2. Online available at: <http://www.maj.ir> (In Farsi).
3. Baumann R, DonseiffenJ W, Van-den-Hooven W, Hogendoom EA, Anson JTA, Kleter F, DeKok A, Quirijns JK, vanderSchee HA, Trooy WA, Tuinstra LGMTh, Verusoal W, VanZoonen p. 1996. Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs. 6th Edition. 213 p.
4. Carson R. 1962. Silent Spring, 40th anniversary edition. Houghton Mifflin, Boston.
5. Ciba G. 1989. Gas Chromatographic Determination of Unpolar Pesticides. REM 119.01
6. Codex Alimentarius. 2003. Pesticide Residues in Food and Animal Feed. 310 p.
7. Codex Stan CAC/GL 40/1993. Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis
8. Dikshit AK, Handa SK, Awasthi MD, Verma S. 1980. Note on the dissipation of endosulfan in or on tomato fruits, *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 50: 4, 367-369.
9. FAO and WHO. 2008. Codex Alimentarius Commission. Available in: http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp
10. Frank R, Braun He. Pitblado R. 1991. Residues of nine insecticides and two fungicides in raw and processed tomatoes, *Journal of Food Protection*, 54: 1, 41-46.
11. Hajiabadi YL, Habibi J, Hajirazzagh N, Tajbakhsh M, Vaylian M. 2000. Determination of residue of Diazinon in Onion. Final project report. Iranian plant protection institute. 10 pp. (In Farsi).
12. Palikhe BR. 2002. Challenges and options of pesticide use. In: the context of Nepal. *Landschaftsökologie und umweltforschung*, 38: 130-141.
13. Rezvani Moghadam P, Ghorbani R, Koocheki A, Alimoradi L, Azizi G, Siyamargooyi A. 2009. Evaluation of Pesticide Residue in Agricultural Products: A Case Study on Diazinon Residue Rate in Tomato (*Solanum lycopersicum*), Cucumber (*Cucumis Sativus*) and Melon (*Cucumis melo*). *Environmental Sciences* 6: 3, 63-72. (In Farsi).
14. Van Emden HF, Peakall, DB. 1996. Beyond Silent Spring. Springer. 344 pp.
15. Verma S. 1979. Differential dissipation rate of endosulfan on tomato crop (*Lycopersicon esculentum* Mill), *Journal of Entomological Research*, 3: 1, 119 – 121.

تریت جام و شیروان، نشان داد که باقیمانده سم دیازینون در خربزه تریت جام ۴/۹۸ برابر حد مجاز و در خربزه شیروان ۴/۱۱ برابر حد مجاز بود. باقیمانده دیازینون در خیار به جز در خیار مشهد، بیش از حد مجاز بود. میزان این سم، در خیار دزفول ۶/۱ برابر، در خیار رفسنجان ۴/۴ برابر، در خیار جیرفت ۴/۲ برابر، در خیار کرمان ۲/۱ برابر و در خیار شیروان ۱/۸ برابر حد مجاز بود، اما میزان سم در گوجه فرنگی و خیار کشت شده در مشهد کمتر از حد مجاز تعیین شد (Rezvani Moghadam et al, 2009).

اگرچه مصرف بهینه سموم و کاهش مقدار باقیمانده سموم و کاهش آثار مخرب زیست محیطی آن با استفاده از روش‌های پیشرفته آموزش و ترویج کشاورزی امکان دارد، اما همین نیاز به آموزش و ترویج برای کاهش اثرهای زیان‌بار سموم شیمیایی از

بورسی چندشکلی اگزون دو ژن BoLA-DRB3 در جمعیت گاو میش

استان خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP

سمیه رحیم‌نهال^{*}، جمال فیاضی^۲، خلیل میرزاده^۳، محمد تقی بیگی‌نصیری^۳،
هدایت ا. روشنفر^۴

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
۲، ۳ و ۴- به ترتیب استادیار، دانشیار و استاد دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه
کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۰۴/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۴)

چکیده

واژه‌های کلیدی

پلی‌مورفیسم
ژن MHC
PBR
گاو میش

جایگاه ژنی مجموعه سازگاری بافتی (MHC) کد کننده آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های سطح لوکوسیت‌ها است که در واکنش‌های دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی نقش دارند. در گاو این جایگاه ژنی به نام بولا معروف است که در سه دسته ژنی به نام‌های کلاس I، کلاس II و کلاس III بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۳ گاو ترتیب یافته‌اند، هر یک از این کلاس‌های ژنی دارای مجموعه جایگاه‌های ژنی متعدد و مختلف است و هر جایگاه می‌تواند تا بیش از ۵۵ ها آلل را شامل شود. هدف از این پژوهش، بررسی چندشکلی اگزون ۲ جایگاه ژنی BoLA-DRB3 در جمعیت گاو میش استان خوزستان است. در این پژوهش از روش پی.سی.آر. دو مرحله‌ای (Heminested-PCR) برای تکثیر این اگزون استفاده شد. خوتنگیری از ۸۰ رأس گاو میش از شهرستان‌های استان صورت گرفت. واکنش دو مرحله‌ای زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی از اگزون ۲ ژن MHC با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن انجام شد. قطعه تکثیر شده به وسیله آنزیم‌های برشی *HaeIII* و *RsaI* مورد تیمار قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنزیم برشی *HaeIII*, نه الگوی برشی را در این جایگاه ژنی نشان داد که الگوی‌های برشی b و a به ترتیب با فراوانی ۳۴/۳۷ و ۲۳/۲۵ درصد بیشترین فراوانی آللی را به خود اختصاص دادند و ۱۷ ترکیب ژنتیکی شناسایی شد. آنزیم برشی *RsaI* تعداد ده الگوی برشی را نشان داد که الگوی‌های برشی g و b به ترتیب با فراوانی ۳۰ و ۲۰ درصد بیشترین فراوانی آللی را به خود اختصاص دادند با استفاده از این آنزیم نیز ۱۷ ترکیب ژنتیک شناسایی شد. آزمون کای مربع نشان داد که جمعیت مورد بررسی، در حالت تعادل هاردی-وینبرگ قرار دارد. در پژوهش حاضر سطح بسیار بالایی از پلی‌مورفیسم در جمعیت گاو میش استان خوزستان مشاهده شد.

مقدمه

داده شده با آنزیم برشی *HaeIII* بر تولید شیر، چربی و درصد پروتئین شیر بررسی شد که این ژنتیپ نقش مهمی بر این صفات نداشت (از لحاظ آماری بی معنی). نتایج بدست آمده از این پژوهش، BoLA-DRB3 را به یک عنوان نشانگر کاندید برای SCC و گاوهاش شیری مستعد و مقاوم در برابر ورم پستان معرفی می‌کند (Wojdak-Maksymiec et al., 2007). همچنین ارتباط بین بعضی از آللهای و بالا بودن تعداد سلولهای سوماتیک و نیز حساس بودن بعضی از دامهای حاوی آللهای خاص به ورم پستان گزارش شده است (Dietz et al., 1997). بسیاری از پژوهش‌ها نشان می‌دهند که پلی‌مورفیسم مولکولهای کلاس دو ژن *Bola* بطور ویژه مسئول پاسخ ایمنی هستند و نقش ویژه‌ای در مقاومت به اختلال در خودایمنی مزمن به عنوان رماتیسم مفاصل، دیابت وابسته به انسولین (Schukken et al., 2003)، بیماری‌های عفونی مثل پوسته پوسته شدن‌های سل مانند و مalaria (Sharif et al., 1998) و ملانوم و تومورهای بدخیم دارند (Behl et al., 2007).

بطور کلی ارتباط ژن MHC با صفاتی نظیر مقاومت در برابر بیماری‌ها به ویژه بیماری ورم‌پستان و سرطان خون، سلولهای سوماتیک و میزان تولید و درصد چربی شیر در پژوهش‌های اخیر صورت گرفته است و سطوح بالای پلی‌مورفیسم در این ژن گزارش شده است. هدف ما از این پژوهش بررسی سطح پلی‌مورفیسم ناحیه اگزون ۲ جایگاه ژنی BoLA-DRB3 در جمعیت گاویش استان خوزستان بود که با توجه به سایر نتایج بدست آمده از بررسی سطح بالای پلی‌مورفیسم در این جایگاه ژنی توسط بیشتر پژوهشگران در دامهای مختلف، انتظار می‌رود که با سطح بسیار بالایی از پلی‌مورفیسم در این جمعیت رویرو شویم.

تمایز در عملکرد میان افراد نژادها، لاین‌ها، جمیعت‌ها و سویه‌ها به لحاظ ژنتیک مورد نظر متخصصین اصلاح نژاد است. پلی‌مورفیک بودن و توارث پذیر بودن این تغییرها در سطح مولکول دی‌ان‌ای به کمک روش‌های جدید شناسایی و منجر به معرفی نشانگرهای ژنتیک جدیدی گشته که مرتبط با صفات تولیدی و ایمنی است. بنابراین کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) یا آنتی‌ژن لوکوسیت گاوی (BoLA) به علت ارتباط آن با ایمنی دام، مورد توجه قرار گرفته است (Pashmi et al., 2004).

نقش اولیه جایگاه ژنی مجموعه سازگاری بافتی (MHC) کد کننده آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های سطح لوکوسیت‌ها است که در واکنش‌های دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی دخالت دارند. در واقع ژن‌های MHC مولکولهای MHC را رمزدهی کرده و این مولکول‌ها از نظر توانایی اتصال به پیتیدهای آنتی‌ژن با هم تفاوت دارند.

در گاو MHC را مجموعه آنتی‌ژن‌های لنفوцитی گاو می‌نامند و آنرا بصورت BoLA نشان می‌دهند، در BoLA لوکوس‌های کلاس I، کلاس II و کلاس III را شناسایی کرده‌اند که بر بازوی کوتاه Mohammadabadi and Sulimova., 2004; Lewin et al., 1999; Andersson and Davies., 1994. که بطور وسیعی به عنوان نشانگر در مقابل با بیماری‌های مختلف و صفات ایمونولوژیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (Maillard et al., 2003). آللهای BoLA-DRB3 در بیشتر صفات مربوط به ایمنی، تعداد سلولهای سوماتیک و وقوع ورم پستان موثر هستند. ارتباط بین BoLA و بعضی از بیماری‌ها در گزارش شده است (Dietz et al., 1997). در گزارشی دیگر همچنین نشان داده شد که الگویی از ژن BoLA-DRB3 با مقاومت دام به ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس آئروس ارتباط دارد (Dietz et al., 1997). در یک پژوهش دیگر پژوهشگران، به بررسی همبستگی بین پلی‌مورفیسم ژن DRB3 و سلولهای سوماتیک شیر، تولید شیر روزانه، چربی شیر و درصد پروتئین شیر در گاوها نژاد جزی برداختنند. از لحاظ آماری بین عوامل مورد تجزیه (فصل، مرحله شیردهی و گاو) همبستگی مهمی دیده شد. در این پژوهش همچنین اثر ژنتیپ DRB3 بر ش

مواد و روش‌ها

مقابل بیماری‌ها از یک سو و فعالیت‌های هموستازی و مراقبتی سیستم اینمنی از سوی دیگر، در آن مورد بررسی قرار می‌گیرد. مجموعه سازگاری بافتی (MHC) شامل دو زیر‌گروه از مولکول‌های فعال اینمنولوژیک به نام کلاس I و کلاس II است. آنتی‌ژن‌های MHC کلاس I بر روی همه سلول‌های هسته‌دار بدن ظاهر می‌شوند در حالی که آنتی‌ژن‌های کلاس II تنها بر روی برخی از سلول‌ها از جمله ماکروفازها، سلول‌های دندان‌بیتیک، سلول‌های مشتق از بورس (B) و سلول‌های فعال شده مشتق از تیموس پدیدار می‌شوند. همه این سلول‌ها با سیستم اینمنی در ارتباط هستند. مولکول‌های CD4 و CD8 بر سطح زیر‌گروه‌های مختلفی از سلول‌های T بروز می‌کنند و همراه با پذیرنده آنتی‌ژنی، در شناسایی آنتی‌ژن شرکت می‌کنند، به عبارتی دیگر مولکول‌های CD4 و CD8 «پذیرنده‌های کمکی» سلول T به شمار می‌آینند. مولکول CD4 به طور انتخابی به مولکول MHC کلاس II و مولکول‌های CD8 به مولکول MHC کلاس I متصل می‌شوند. به همین دلیل است که سلول‌های CD4⁺ T فقط پیتیدهای عرضه شده توسط مولکول‌های MHC کلاس II را شناسایی می‌کنند، در حالی که سلول‌های CD8⁺ T قادر به شناسایی پیتیدهای عرضه شده در کنار مولکول‌های MHC کلاس I هستند. بیشتر سلول‌های CD4⁺ T نقش یاوری (کمکی) و سلول‌های CD8⁺ T نقش سلول‌کشی (سایتولیتیک) دارند (Piertney and Oliver., 2006). هدف ما از این پژوهش بررسی جایگاه ژنی BoLA-DRB3 در جمعیت گاویش بومی استان خوزستان بود. بر اساس آغازگرهای مورد استفاده قطعه ۲۸۴ جفت بازی از اگزون ۲ ژن MHC با استفاده از روش Heminested-PCR تکثیر شد (تصویر ۱). پس از هضم توسط آنزیم برشی *HaeIII* تعداد ۹ الگوی برشی در جایگاه ژنی BoLA-DRB3 (تصویر ۲ و ۳) و پس از هضم توسط آنزیم برشی *RsaI* تعداد ۱۰ الگوی برشی در این جایگاه ژنی در این پژوهش شناسایی شد (جدول ۱). نتایج این پژوهش نشان داد که اگزون ۲ این جایگاه ژنی در گاویش‌های بومی استان خوزستان به شدت پلی‌مورفیک است. بعد از هضم آنزیمی فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و شناسایی آلل‌های مربوط به ژن مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار ARLEQUIN Ver 3.01 و دستگاه UV DOC ترکیب‌های ژنتوتیپی کل جمعیت مورد بررسی

در این آزمایش از ۸۰ رأس گاویش شهرستان‌های شادگان، دزفول، سوسنگرد، شوشتر و اهواز خونگیری صورت گرفت. خونگیری از ورید وداج گردن به میزان ۳ تا ۵ سی‌سی در لوله‌های خلا دار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انجام گرفت. استخراج دی‌إن‌ای از خون کامل با استفاده از کیت DAtom DNAPrep 100 برای تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی اگزون ۲ از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دو مرحله‌ای (Heminested-PCR) طبق روش ون‌ایچ و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد.

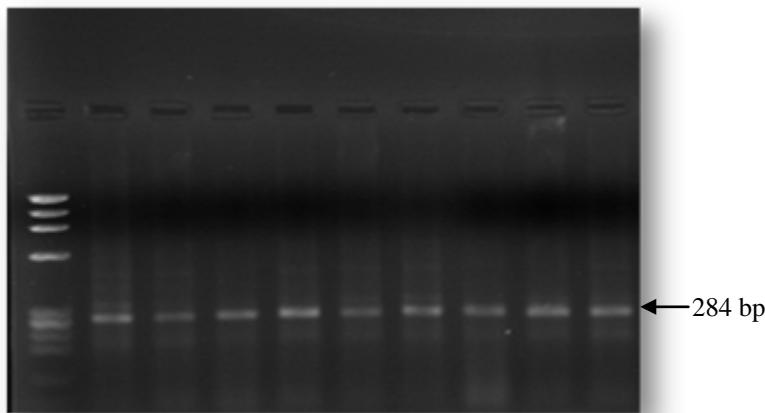
در مرحله اول واکنش از آغازگرهای HLO30 (5'-ATCCTCTCTGCAGCACTTCC-3') HLO31 (5'-TTTAAATTGCGCTCACCTGCCGCT-3')

در مرحله دوم واکنش از آغازگرهای HLO30 (5'-ATCCTCTCTGCAGCACTTCC-3') HLO32 (5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3')

استفاده شد. همانطور که انتظار می‌رفت قطعه ۲۸۴ جفت بازی از ژن BoLA-DRB3 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دو مرحله‌ای تکثیر شد. جهت تایید اندازه قطعه حاصله از سایز مارکر IX استفاده و نمونه‌ها بر روی ژل آکارز ۱/۲ درصد بررسی شدند. بعد از تکثیر قطعه ژن مورد نظر جهت بررسی پلی‌مورفیسم این ژن از روش هضم آنزیمی با آنزیم‌های معرفی شده در مقالات استفاده شد. هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های برشی *HaeIII* و *RsaI* در حجم ۳۰ میکرولیتر با ترکیب: ۱۵ میکرولیتر محصول پی.سی.آر، دو میکرولیتر بافر ۱۰ x ا میکرولیتر آنزیم ۱۰ یونیت / میکرولیتر از هر آنزیم بصورت جداگانه) صورت گرفت. پس از اتمام مراحل هضم برای دیدن قطعات از ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی با نیترات نقره استفاده شد. آنزیم *HaeIII* یک توالی ۴ نوکلئوتیدی GGCC را در محل اتصال C و G می‌شکند و آنزیم برشی *RsaI* یک توالی ۴ نوکلئوتیدی GTAC در محل اتصال T و A می‌شکند.

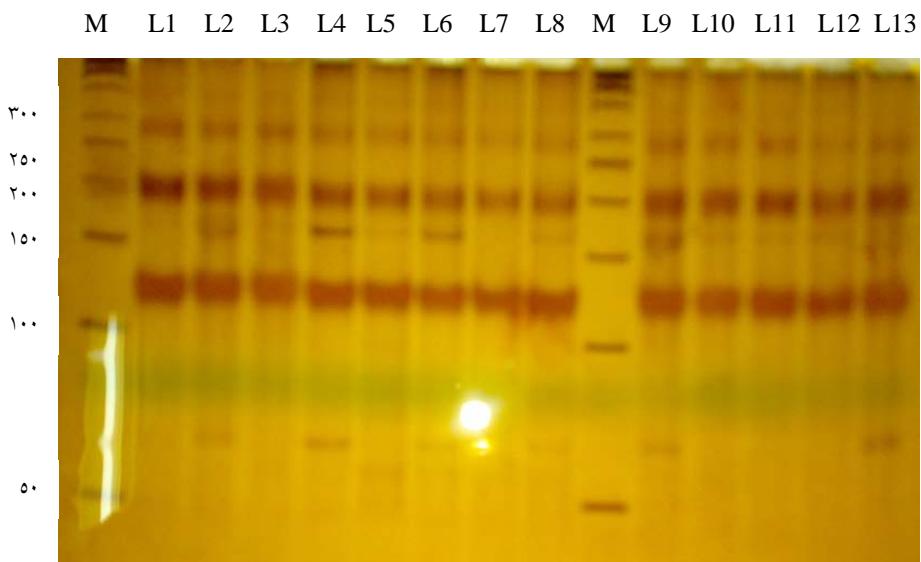
نتایج و بحث

ایمنی‌شناسی یا اینمنولوژی علمی است که دفاع و مقاومت در



شکل ۱- محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دو مرحله‌ای (قطعه ۲۸۴ جفت بازی) نه نمونه بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد M: سایز مارکر ۱X.

Figure 1- polymerase chain reaction products (284 bp fragment) on agarose gel 1/2% M: size marker 1X.

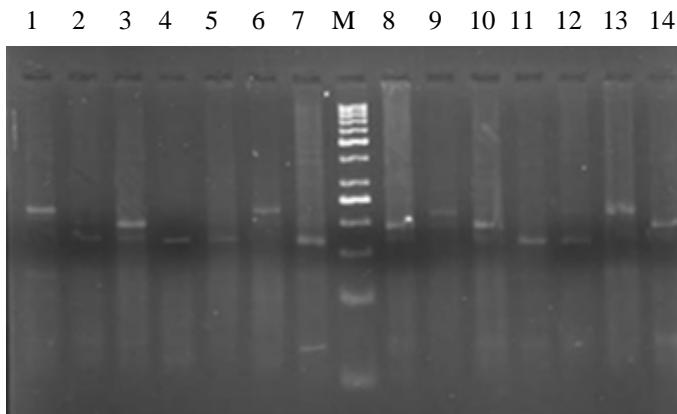


شکل ۲- محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دو مرحله‌ای (قطعه ۲۸۴ جفت بازی) ۱۳ نمونه هضم شده با استفاده از آنزیم برشی *Hae*III بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد (M: سایز مارکر 50bp).

Figure 2- polymerase chain reaction products (284 bp fragment) was digested with *Hae*III restriction enzyme on polyacrylamide gel 8% (M: size marker 50 bp).

رأس) بیشتر از درصد حیوانات هتروزیگوت (۴۳/۷۵ درصد یا ۳۵ رأس) است. این نتایج با نتایج احمد و عثمان (۲۰۰۶) که به بررسی پلی‌مورفیسم ژن BoLA-DRB3 بر روی گاویش‌های مصری با استفاده از آنزیم برشی *Hae*III پرداختند و در پژوهش‌های خود درصد حیوانات هموزیگوت (۹۰ درصد) را بیشتر از حیوانات هتروزیگوت (۱۰ درصد) گزارش کردند مطابقت داشت (Ahmed and Othman., 2006) و همچنین با

شناسایی شدند. همچنین درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی با استفاده از نرم‌افزار ARLEQUIN Ver 3.01 محاسبه شد. برای تعیین میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی در این جمعیت از روش جائو و تامپسون (۱۹۹۲) و ویگیتون و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. در این پژوهش با استفاده از آنزیم برشی *Hae*III تعداد ۱۷ ترکیب ژنتیک با فراوانی متفاوت شناسایی شدند که نتایج نشان می‌دهند درصد حیوانات هموزیگوت ۴۵/۵۶ (۲۵%)



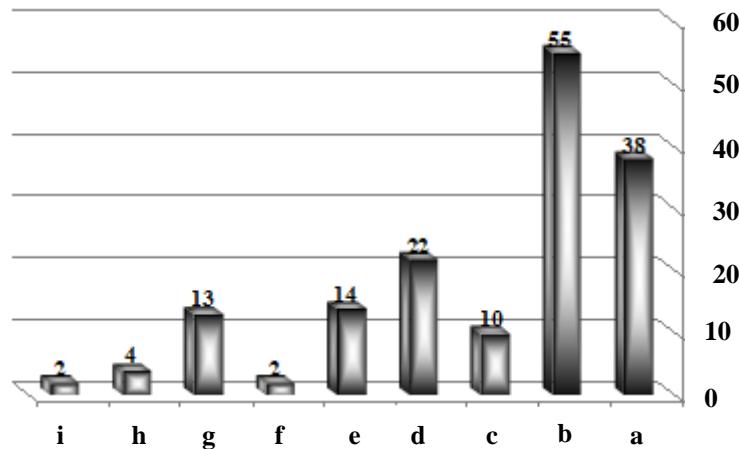
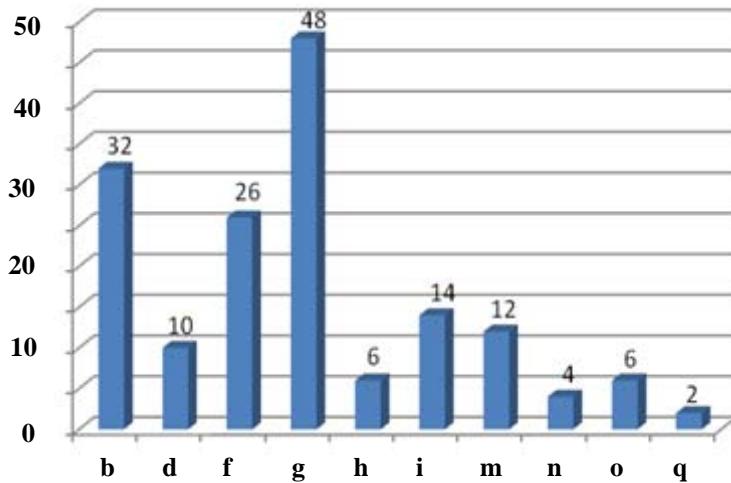
شکل ۳- محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دو مرحله‌ای (قطعه ۲۸۴ جفت بازی) هضم شده ۱۴ نمونه گاوی مش با استفاده از آنزیم برشی *HaeIII* بر روی ژل آگارز متافر ۲/۵ درصد (M: سایز مارکر 50 bp)

Figure 3- polymerase chain reaction products (284 bp fragment) was digested with *HaeIII* restriction enzyme on metafer agarose gel 2/5% (M: size marker 50 bp).

پایین بودن خطر وقوع جفت ماندگی و پایین بودن خطر وقوع کیست تخمدانی و ورم پستان موثر هستند (Lewin, 1996; Sharif et al., 1998). در یک پژوهش پژوهشگران پلی‌مورفیسم ژن MHC را در گاوها نژاد گیر که بخوبی با شرایط آب و هوایی گرم برزیل آدپته شده‌اند را با بیماری ورم پستان مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که آنتی‌ژن لغوفویتی گاوی (BoLA) ژن MHC با مقاومت در برابر بیماری ورم پستان همبستگی دارد (Mota et al., 2002). در یک بررسی تنوع ژنتیک ژن BoLA-DRB3 را در ۱۲۰ حیوان از نژاد گاو یاروسلاول روسی را مورد بررسی قرار دادند. آنها در نتایج خود فراوانی حیواناتی که ناقل آل‌های مقاومت به سرطان خون بودند برابر ۳۵ درصد و حیواناتی که هر دو آل‌شان از آل‌های ایجاد کننده مقاومت (هموزیگوت) بود را برابر ۱۱/۶ درصد گزارش کردند. بنابراین، این پژوهشگران دریافتند که این نژاد ارزش بالای در گرینش و کارهای عملی دارد، چرا که آل‌های با ارزشی از ژن BoLA-DRB3 را حمل می‌کند که ایجاد کننده مقاومت به سرطان خون هستند (Mohammadabadi and Sulimova., 2004).

حیوانات بومی به عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک کشور محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیک جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی جهت طرح‌های اصلاح نژادی و حفظ ذخایر ژنتیک باشد. در سال‌های

استفاده از آنزیم برشی *RsaI* تعداد ۱۷ ترکیب ژنتیک (ژنوتیپ) شناسایی شد که درصد ژنوتیپ‌های هتروزیگوت (۶۲/۵ درصد) بیشتر از ژنوتیپ‌های هموزیگوت (۳۷/۵ درصد) است. به منظور بررسی تعادل هارדי-وینبرگ در جمعیت مورد بررسی از آزمون کای مربع استفاده شد. نتایج این پژوهش با نتایج محمدآبادی و افیموونا (۱۳۸۳) که با استفاده از آنزیم‌های برشی *HaeIII* و *RsaI* به بررسی پلی‌مورفیسم این جایگاه ژنی بر روی نژاد گاو Mohammadabadi یاروسلاول روسی پرداختند مطابقت داشت (and Sulimova., 2004). نتایج آزمون کای مربع نشان می‌دهد که جمعیت مورد بررسی در حالت تعادل هارדי-وینبرگ قرار دارد (در سطح ۹۵ درصد) و هیچ گونه انتخابی در رابطه با ژن *MHC* در این جمعیت انجام نشده است. در جدول ۱ توزیع فراوانی آل‌ها در جمعیت مورد بررسی بر اساس درصد نشان داده شده است. نتایج این پژوهش همچنین نشان داد که الگوهای برشی a و b (در نتایج حاصل از آنزیم برشی *HaeIII*) نسبت به سایر قطعات هضم شده با این آنزیم بیشترین فراوانی را در جمعیت دارا هستند و در نتایج حاصل از آنزیم دیگر (*RsaI*) الگوهای g و b بیشترین فراوانی را دارا بودند. با توجه به پژوهش‌های انجام شده در این زمینه و معرفی هر کدام از آل‌های این جایگاه ژنی، ما در نتایج خود با سطح بالای پلی‌مورفیسم رو برو شدیم که بر اساس گزارش‌های سایر پژوهشگران این الگوهای برشی (a و b و d) در نتایج حاصل از آنزیم برشی *HaeIII* و b در آنزیم برشی *RsaI* در

نمودار ۱- تراکم آلل‌ها در کل جمعیت مورد بررسی با استفاده از آنزیم *HaeIII***Diagram 1-** Allele densities in the population with the *HaeIII* restriction enzyme.نمودار ۲- تراکم آلل‌ها در کل جمعیت مورد مطالعه با استفاده از آنزیم *RsaI***Diagram 2-** Allele densities in the population with the *RsaI* restriction enzyme.

هستند جهت بررسی چندشکلی جایگاه ژنی BoLA-DRB3 استفاده کردیم این در صورتی است که این دام در شرایط کاملاً سنتی پرورش یافته و توانسته خود را در برابر انواع بیماری‌ها مقاوم کرده و با شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب خوزستان وفق دهد. از آنجایی که ما در این پژوهش با چندشکلی بسیار بالای این جایگاه ژنی مواجه شدیم پس بر این موضوع تاکید می‌شود که این حیوانات یک منبع ژنتیک بسیار مهم محسوب می‌شوند که تحت اثر هیچ‌گونه انتخاب و یا عوامل بر هم زننده تعادل قرار نگرفته‌اند. در نتیجه می‌توان جایگاه ژنی

اخیر، شناخت از MHC حیوانات اهلی افزایش چشمگیری داشته است. با اینکه پژوهش‌های بسیاری در جهت تعیین لوکوس‌های MHC به انجام رسیده است، هنوز کارهای انجام نشده بسیاری وجود دارد. آنچه که در حرفه دامپزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است، اهمیت بالقوه پیوستگی مولکول‌های MHC با بیماری‌ها است. در دامپزشکی بمنظور حذف استعداد حیوان در برابر ابتلاء به برخی از بیماری‌ها، نزدیگیری انتخابی واقعاً امکان‌پذیر است. ما در این بررسی از یک جمعیت ۸۰ رأسی گاویش که نماینده جامعه گاویش‌های بومی استان خوزستان

جدول ۱- توزیع فراوانی آلل‌ها در جمعیت مورد مطالعه (بر اساس درصد).

Table 1- Allele frequency in the population (by percentage).

<i>RsaI</i>	b	d	f	g	h	i	m	n	o	q
فراوانی آللی	20	6/25	16/25	30	3/75	8/75	7/5	2/5	3/75	1/25
<i>HaeIII</i>	a	b	c	d	e	f	g	h	i	
فراوانی آللی	23/75	34/37	6/25	13/75	8/75	1/25	8/13	2/5	1/25	

بردن ایمنی و مقاومت دام‌های وارداتی پرتویید و حساس به بیماری‌ها در نظر گرفت.

BoLA-DRB3 را در این جمعیت گاویش به عنوان یک شاخص انتخاب و یک نشانگر ژنتیک معرفی کرد و از آن در جهت بالا

منابع

1. Ahmed S, Othman E. 2006. The Characterization of HaeIII Patterns in the Second Exon of the Buffalo MHC Class II DRB Gen. Biotechnology 5 (4) 514-516.
2. Andersson L, Davies CL, 1994. The major Histocompatibility complex. In: Goddeeris BM, Morrison WI., Cell-Mdiated Immunity in Ruminants. London: CRC Press, pp: 37-62.
3. Behl JD, Verma N K, Behl R, Mkesh M. 2007. Characterization of Genetic Polymorphism of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Locus in Kankrej Cattle (*Bos indicus*). J. Dairy Science, 90: 2997-3001.
4. De S, Singh RK, Butchaiah G. 2002. MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). Animal Genetics. 33:215-219.
5. Dietz AB, and et al. 1997. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. J. Dairy Sci. 80:400-405.
6. Dietz AB, and et al. 1997. Bovine Lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 40:406-412.
7. Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48, 361-372.
8. Khosravi M. 2006. Investigation of allelic frequency of exon 2 BoLA-DRB3 locus among populations of Holstein. 5th Iranian Biotechnology Congress. Iran, Tehran. (In Farsi with English abstract).
9. Lewin HA. 1996. Genetic organization, Polymorphism. And function of the bovine major histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species. CRC Press, Boca Raton. FL.
10. Lewin HA, Russell GC, Glass EJ. 1999. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. Immunol. Rev., 167: 145-158.
11. Lunden A, Andersson-Eklund L, Andersson L. 1993. Lack of association between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and production traits., Journal of Dairy Science., 76:843-852.
12. Maillard JC, Berthie D, Chantal I, Thevenon S, Sidibe I, Stachurski F, Elsen JM. 2003. Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. Gen. Sel. Evol., 35: 193-200.
13. Mohammadabadi MR, Sulimova GE. 2004. Diversity of BoLA-DRB3 alleles in Russian Yaroslavl cattle (*Bos taurus*) by PCR-RFLP. The First Congress on Animal and Aquatic Sciences. Iran, Tehran. (In Farsi with English abstract).
14. Mota AF, Gabriel JE, Martinez ML, Coutinho LL. 2002. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). Blackwell Science Ltd, European Journal of Immunogenetics 29, 223-227.
15. Pashmi M, Salehi AR, Ghorashi SA, Mollasalehi MR, Javanmard A, Ghanbari S, Salehi Tabar R. 2004. BoLA-DRB3 Polymorphism by PCR-RFLP in Iranian Holstein Cattle. The First Congress on Animal & Aquatic Sciences. Iran, Tehran. (In Farsi with English abstract).
16. Piertney SB and Oliver MK. 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. Heredity 96:7-21.
17. Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Veterinary Research., 34:579-596
18. Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC M, Leslie KE. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. Anim. Genet., 29: 185-193.
19. Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC M, Leslie KE. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with production

- traits in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.* 30:157-160.
20. Van Eijk MJT, Stewart-Haynes JA, Lewin HA. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 genes distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.*, 23: 363-367.
21. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. 2005. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 76:887-883.
22. Wojdak-Maksymiec K, Kmiec I, Kowalewska-Luczak I, Warliniski M. 2007. DRB3 Gen Polymorphism and Somatic Cell Count in Milk of Jersey Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 6 (8): 1006-1011.

Molecular analysis of physiological stage of leaf senescence

Saeid Navabpour

Assistant Professor of Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources , Gorgan, Iran, Email: s.navabpour@gau.ac.ir

ABSTRACT

Senescence is a final developmental stage of leaf, which is very important as genetic and physiological aspects. Many genes are activated at this stage and most of them show remarkable transcript. The function of senescence is to control regulatory physiological changes. This include cessation of photosynthesis, chloroplast degradation, chlorophyll loss and protein breakdown. Senescence can be initiated by a wide variety of different internal and external factors, as well as being an essential part of plant development; senescence in leaves is also induced prematurely by a number of different environmental stresses. Since plants cannot escape from adverse environmental conditions senescence is one mechanism that plants have evolved to cope with such problems. Interestingly, senescence could be induced in plants even after harvest. This phenomenon is observed in such vegetables like broccoli, lettuce and cabbage. Many different senescence-enhanced genes have been isolated, characterized and cloned. Expression analysis of these genes showed a broad range of expression some time before phenotypic changes to last stage of senescence. So it seems that many signaling pathways should be involved in this process.

Key Words

Gene Expression, Leaf Senescence, Post Harvest Senescence, Programmed Cell Death (PCD)

Study of overexpression of the *BnFUL* gene in transgenic oilseed rape

Samira Kahak¹, Ali Mohammad Shakib^{*2}, Jalal Saba¹, Siamak Asadi², Mana AhmadRaji²

1- Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.

2- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Alborz, Iran.

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

ABSTRACT

Oilseed rape is one of the important oil plants that its cultivation has been expanded in Iran in recent years. Seed shattering before and during harvesting is a problem of cultivation of this plant can causes up to 50% yield decrease depending on the environmental conditions. Production of seed shatter tolerant plants can increase the yield. Different genetic and environmental factors can affect this trait. The *FUL* gene is one of the genetic factors in that its over expression could prevent siliques opening and seed shattering. Rapeseed transgenic plants of three cultivars containing the *BnFUL* gene were produced and molecular studies were carried out on T₂ generations transgenic plants using PCR, Southern blotting and real time PCR. PCR showed that the *BnFUL* transgene has been inserted in the transgenic plants in addition to the internal gene. The copy number of transgene in transgenic and control plants were analyzed by Southern blotting which confirmed presence of at least one intact copy of the transgene in transgenic plants. Real time PCR showed that *BnFUL* gene expression in transgenic plants in comparison with control plants has been increased. Differences between the expression of transgenic plants in different lines could be because of position effect and copy number.

Key Words

Oilseed Rape, Transgenic Plant, *BnFUL* Expression, Copy Number

Direct organogenesis and transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) using citrus tristeza virus (CTV) coat protein coding gene

Banafsheh Fattah¹, Mohammad Mahdi Sohani^{*1}, Abdollah Hatamzadeh¹, Alireza Afsharifar², Behrooz Goleyn³, Mohammad Hossein Rezadoost¹, Mohammad Reza Mirzaei¹, Amir Hossein Zamani¹

1- Faculty of Agricultural sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Faculty of Agricultural Sciences, University of Shiraz, Iran.

3- Faculty of Agricultural Sciences, Citrus Research Institute-Ramsar. Iran.

* Corresponding Author, Email: msohani@guilan.ac.ir

ABSTRACT

In this study transgenic plants of sour orange (*C. aurantium*) that is an important citrus rootstock were produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. Epicotyl and hypocotyl segments-derived explants were co-cultured with *Agrobacterium* strain EHA105 carrying pFGC5941 plasmid containing CTV coat protein (p25) gene. One of the main objects of present research was to improve the direct *in vitro* organogenesis efficiency in *C. aurantium*. Therefore different combination of BAP (0, 1, 2 mg/L) and NAA (0, 0.25, 0.5 mg/L) were used in selective medium to culture transformed explants. The highest regeneration (57%) was obtained from explant treated with 2 mg/L BAP and 0.25 mg/L NAA. Effects of wounding and vacuum infiltration on transformation efficiency were evaluated either. The best transformation efficiency (11.25%) was obtained from explants that were vacuum infiltrated during transformation and subsequently were cultured in medium containing 2 mg/L BAP and 0.25 mg/L NAA. PCR analysis using two different genes were performed to confirm transformation. Micro grafting of transformed shoots were carried out on non-transgenic, *in-vitro* grown seedlings.

Key Words

Agrobacterium tumefaciens, Direct Organogenesis, Epicotyl, Growth Regulators, Wounding

Transfer of human interferon γ -oleosin genes to safflower (*Carthamus tinctorius* L.)

Athar Yaghtin, Mokhtar Jalali Javaran*, Ghasem Karimzadeh

Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

* Corresponding Author, Email: Jalali.mokhtar@gmail.com

ABSTRACT

The use of plants as a source of medicine is traced back to long time ago. Modern biotechnology provides the possibility of production of valuable protein such as pharmaceutical protein in plant. In this study human Interferon gamma-oleosine genes under the control of Napin promoter were transferred to *Carthamus tinctorius* L. (safflower) by *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Cotyledonal explants from safflower plant (*Carthamus tinctorius* L.) Padideh cultivar were used for transformation. The transformed plants were screened on MS medium containing 0.09 mg L⁻¹ NAA, and 1 mg L⁻¹ TDZ containing 40 mg L⁻¹ kanamycin. Presence of transgenes was confirmed using polymerase chain reaction (PCR). Characterization of the transgenic plants is going on.

Key Words

Agrobacterium, Carthamus tinctorius L., Human Interferon Gamma-Oleosin Genes, Molecular Farming, Transformation

Monitoring the Occurrence of Genetically Modified Maize at a Grain Receiving Port in Iran

Leila Sarmadi¹, Abbas Alemzadeh^{1*} and Behzad Ghareyazie²

1- Crop Production and Plant Breeding Department, School of Agriculture, Shiraz University, Iran.

2- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Alborz, Iran.

* Corresponding Author, Email: alelmzadeh@shirazu.ac.ir

ABSTRACT

This study was carried out to detect the presence of genetically modified maize in imported into Iran using molecular approaches. Five samples of imported maize from Argentina in the second half of 2010 were obtained from Bandar Imam Khomeini custom. Using specific primers for *CaMV 35S* promoter and *nos* terminator, PCR was performed. In this study *Invertase* gene of maize was used as internal control. The results showed that maize samples imported from Argentina were genetically modified and they have regulatory regions of *CaMV 35S* and *nos* in their genome. The shipment was not labeled and there was no indication in the accompanying documents that the shipment "may contain living modified organisms".

Key Words

Biosafety, Cartagena Biosafety Protocol, Maize, Transgenic Plants, Imports

Pesticides residues (Endosulfan and Diazinon) in cucumber and tomato fields of Kohgiloyeh and Boyerahmad Province

Abbas Salahi Ardakani^{1*}, Mohsen Morovvati² and Mehrnaz Entesari³

1- Agricultural and Natural Resources Research Center of Kogyloyeh and Boyreahmad Province.

2-Pest and Disease Research Institute of Iran.

3- Middle East Bioreserchers Company, Tehran, Iran.

* Corresponding Author, Email: salah_i_abbas@yahoo.com

ABSTRACT

Insistence on opposing transgenic plants and genetic engeneering by some individuals and/or organizations, has resulted high levels of application of dangerous chemical pesticides in Iran. Samples of cucumber and tomato fruits were collected from various fields of Kohgiloyeh and Boyerahmad province and the residue of Endosulfan and Diazinon were determined in them. The highest amount of residue was of Diazinon in cucumber. The average residues of Diazinon in cucumber were 0.462, 0.669, and 0.205 mg/kg in Gachsaran, Boyerahmad and Kohgiloyeh respectively. However the internationally accepted maximum residue level of Diazinon in cucumber is 0.1 mg/kg. The residues of Diazinon in tomato were 0.504 and 0.534 mg/kg in Gachsaran and Dena respectively which are higher than the international levels. According to this research, the average residue of Diazinon in cucumber in the whole province was 0.355 to 3.5 times more than the maximum residue level. The residue of Endosulfan in tomato fields of Boyerahmad regions like Tangari, Keveshk, Tang Tamoradi and Sepidar. It was also higher than the international limits in Khairabad region at Gachsaran country. The residue of Endosulfan on cucumber was higher than the international levels in Tangari and Dornkore regions of Boyerahmad country and also Dehre, Dehkhaliye and Shain brakan regions of Gachsaran, Delirech region of Dena country and in Zarghamabad of Kohgiloye country. The results showed not only the presence of high levels of Diazinon and Endosulfan residues in tomato and cucumber, but also showed that the period between pesticide use and marketing was also very short. It also shows that number of spraying, recommended dose and the interval between the spraying, were not taken into consideration. Continued restrictions on the application of transgenic plants is therefore considered as acceptance of the continued application of Endosulfan and Diazinon and their presence in food basket in Iran.

Key Words

Cucumber, Diazinon, Endosulfan, Pesticide Residue, Tomato, Transgenic

Investigation of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) by PCR-based RFLP in buffalo population of Khuzestan province

**Somayeh Rahimnahal, Jamal Fayazi, Khalil Mirzadeh, Mohammad Taghi Beigi Nassiri,
Hedayat Allah Roshanfekr**

Department of Animal Science Ramin (Khuzestan Agriculture and Natural Resources University Ramin, Mollasani, Khuzestan Iran).

* Corresponding Author, Email: S.Rahimnahal@yahoo.com

ABSTRACT

MHC locus codes antigens and leukocyte surface proteins which have roles on immune reactions and identification of foreign proteins. In cattle this locus is known as Bulla and is composed of three classes of genes: CLASS I, CLASS II and CLASS III and is located on short arm chromosome 23. Each of these classes of genes has complex and various genes and each gene may have dozens of alleles. The objective of this study was to study the variation of exon 2 of locus BoLA-DRB3 in buffalo population in Khuzestan province. In this study, the Heminested-PCR method was used to amplifying this exon. In order to determinate the level of polymorphism, blood sample were collected from 80 buffalos in Shadegan, Ahwaz, Dashte azadegan, Dezful and Shoshtar cities. DNA extraction and exon 2 of the MHC gene was amplified by specific set of primers for this gene to produce a 284 bp fragment. The amplified fragments were digested with *Hae*III and *Rsa*I restriction endonuclease. Digested products were separated and were stained by vertical electrophoresis on 8% Polyacrylamide gel. After digestion with *Hae*III and *Rsa*I nine and ten alleles (restriction digestion pattern) were obtained at this locus respectively. Alleles a and b with 34.37 and 23.75 percent were the most frequent alleles when digested with *Hae*III and alleles a and b with 20 and 30 percent frequency were the frequent alleles when digested with *Rsa*I. We identified 17 genotypes using each of the restriction enzymes in this population.

Key Words

Polymorphism, MHC, Buffalo, PBR

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol.1, No.2, Issue 1, Fall 2012 and Winter 2013

Copyright and publisher

BIOSAFETY SOCIETY OF IRAN

Managing Director: B. Ghareyazie

ghareyazie@yahoo.com

Editor-In-Chief: M. Omidi

momidi@ut.ac.ir

Secretary of the Editorial Board: S. Kahak

gebs.j.bs@gmail.com

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

P.O.Box.14155-6343

Tel:(+98)2144580375