ردیابی و شناسایی افتراقی گوجه‌فرنگی تراریخته *Solanum Lycopersicum* با تکنیک *Multiplex PCR* در شهر تهران

عطیه عزیزی[a]، انوشه شریفان[b]، مژگان امتیازجو[c]*

[a] *دانشجوی کارشناسی ارشد گروه و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[b] *دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[c] *دانشیار دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۶/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۱۰
DOI: 10.30495/JFTN.2021.19177 https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1400.19.1.6.3

چکیده

مقدمه: صنعت غذا در همه جای دنیا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گوجه فرنگی و سایر فرآورده‌های آن نیز یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در صنایع غذایی می‌باشند. گیاهان و بذرهای تراریخته یکی از دستاوردهای مهم بیوتکنولوژی نوین در زمینه کشاورزی هستند که در سال‌های اخیر بخشی از بازارهای غذایی دنیا را تسخیر نموده اند. لذا شناسایی و بررسی تراریخته بودن یا نبودن محصولات کشاورزی مصرفی بدلیل اینکه هنوز نظرات موافق و مخالف متعددی برای استفاده از این محصولات در دنیا وجود دارد، امری ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۱۰ نوع گوجه فرنگی به همراه کاسبرگ به روش نمونه گیری تصادفی ساده از بازار شهر تهران جمع آوری شد و مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA انجام و به منظور تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده مقایسه هر نمونه با غلظت استاندارد DNA فاژ لامبدا بریده شده، با آنزیم‌های برشی EcoRI، HindIII انجام شد. از آغازگرهای P35S F/R، NOS-1/NOS-3، RBCL-F/RBCL-R و NPTII-F/NPTII-R استفاده شد و قطعات نوکلئوتیدی به‌ترتیب ۱۹۵bp و ۱۸۰bp تکثیر شدند.

یافته ها: قطعات نوکلئوتیدی تکثیر شده شباهت ۱۰۰٪ توالی نوکلئوتیدی را با نمونه‌های موجود در بانک ژنی تایید کردند که محصولات مورد بررسی به لحاظ ژنتیکی دست ورزی شده‌اند. همچنین به منظور شناسایی گوجه فرنگی‌های تراریخته، از جفت آغازگر PG F/R اختصاصی برای تکثیر آنتی سنس ژن پلی گالاکتوروناز، به کار رفت. تمام نمونه هایی که باند مربوط به پروموتور P35S یا خاتمه دهنده NOS یا هر دو را داشتند، باند ۳۸۴bp مربوط به قسمتی از آنتی سنس ژن PG را تکثیر نمودند و شباهت ۱۰۰٪ توالی ثبت شده ژن مذبور در بانک ژن محرز شد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که گوجه فرنگی تراریخته در بازار ایران وجود دارد. اما به دلیل عدم برچسب گذاری بـه صـورت گسترده، مصرف کنندگان از ماهیت تغییر یافته آن‌ها اطلاع ندارند.

واژه‌های کلیدی: *شناسایی تراریخته، گوجه فرنگی، PCR*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: m_emtyazjoo@iau-tnb.ac.ir

مقدمه

سرعت رشد جمعیت، کمبود منابع غذایی و خطرات زیست محیطی موجب ایجاد مشکلات بسیاری در سطح دنیا شده است. جمعیت در جهان با سرعت زیادی رو به افزایش است و با بیش بینی‌های صورت گرفته تا سال ۲۰۲۵ جمعیت جهان به ۸/۵ میلیارد نفر خواهد رسید (Ashraf and Akram, 2009). سه چهارم مردم دنیا دچار سوء تغذیه می‌باشند که با بهبود کشاورزی می‌توان از روند فقر و سوء تغذیه جلوگیری شود (Norouzi *et al*., 2016). بسیاری از سیاست گذاران و دانشگاهیانی که به امنیت غذایی علاقمند هستند نگران آن هستند که نسل آینده با یک بحران غذایی رو به رو شود (Foley, 2011; Godfray *et al*., 2010). نرخ رشد تولید محصولات کشاورزی با روند ۱/۸ درصدی در حال افزایش است. با توجه به پیش‌بینی جمعیت در سال ۲۰۵۰، رشد ۵۰ درصدی تولید غذا ضرورت پیدا کرده و نیازمند تولید واریته‌های پرمحصول و پایدار است (Nourozi, 2003). امروزه از طریق مهندسی ژنتیک می‌توان کمیت و کیفیت منابع غذایی را افزایش داد (Ashraf and Akram, 2009).

در سال ۱۹۹۴ اولین تغییر یافته ژنتیکی تجاری سازی شده، گوجه فرنگی *Flavr Savr* معرفی شد (Fraiture *et al*., 2015). گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* یکی از محصولات مهم اقتصادی می‌باشد (FAO, 2012). گوجه فرنگی دومین محصول مهم مورد استفاده در سطح جهان می‌باشد که اکثرا به صورت تازه خوری مصرف می‌شود (Rizwan *et al*., 2011; Burton *et al*., 2012). طبق آمار سازمان خواروبار کشاورزی جهانی (FAO)، ایران یکی از عمده ترین تولید کنندگان گوجه فرنگی در جهان محسوب می‌شود. در سال ۲۰۱۲ در میان تولید کنندگان جهان مقام هفتم را به خود اختصاص داد (FAO, 2012). سطح زیرکشت این محصول در سال زراعی ۹۵-۹۴، ۱۹۸-۱۳۹ هزار هکتار بوده است (Nazarenko *et al*., 2002). از این محصول اغلب بصورت‌های مختلفی نظیر آب گوجه فرنگی، رب گوجه فرنگی، سس، کچاپ و غیره استفاده می‌شود (Burton *et al*., 2012; Rizwan *et al*., 2011).

طی دو دهه اخیر، تولید محصولات تراریخته ژنتیکی به کمک مهندسی ژنتیک افزایش یافته است. سطح زیر کشت این محصولات با روند تصاعدی افزایش داشته است. به طوری که از سال ۱۹۹۶ با ۱/۷ میلیون هکتار تا سال ۲۰۱۶ با ۱۸۵/۱ میلیون هکتار، تاکنون تقریبا به ۲ میلیارد هکتار رسیده است (ISAAA, 2016). ۱۰ کشور صنعتی و ۱۹ کشور در حال توسعه در جهان گیاهان تراریخته را تولید می‌کنند (ISAAA, 2012).

موجودات تغییر یافته ژنتیکی (GMO)، از انتقال یک یا چند ژن از یک یا چند ارگانیسم به موجود پذیرنده مانند گیاهان بوجود می‌آیند که این انتقال ژن به روش طبیعی یا روش‌های به نژادی کلاسیک امکان‌پذیر نمی‌باشد (Demyttenaere, 2018). هدف ایجاد مزایایی مانند افزایش عمر مفید، عملکرد بهتر، بهبود کیفیت، مقاومت در برابر آفات، حرارت، سرما، خشک سالی و انواع تنش‌های زیست محیطی است (Rani and Usha, 2013).

مطالعات متعددی در زمینه بررسی دیدگاه کارشناسان کشاورزی در این راستا انجام شده است. بعنوان مثال مطالعه ای در خصوص محصولات تراریخته در جنوب غرب ایران انجام شد که نشان می‌دهد پاسخگویان نسبت به مزایای زیست محیطی و خطرات محصولات تراریخته آشنایی داشتند. و همچنین اغلب معتقد بودند که محصولات تراریخته می‌تواند منجر به بهبود امنیت غذایی و توسعه روستایی شود (Ghanian *et al*., 2016). مطالعه‌ای دیگر در کشورمالزی در میان ذی‌نفعان محصولات تراریخته انجام شد و به این نتیجه رسیدند که تبیین دیدگاه‌ها در مورد محصولات تراریخته فرآیندی بسیار پیچیده است که نیازمند بررسی‌های متعدد می‌باشد (Amin *et al*., 2014). همچنین مطالعه‌ای با هدف تبیین نگرش اعضای هیات علمی کشور ترکیه در مورد محصولات تراریخته انجام شد. این مطالعات نشان داد که اغلب اعضای هیات علمی مخالف مصرف محصولات تراریخته بودند و آن را مخرب محیط زیست توصیف کرده‌اند (Kaya *et al*., 2013). پژوهش‌های انجام شده در سایر کشورها نیز نگرانی عامه مردم نسبت به مخاطرات محصولات غذایی تراریخته را نشان می‌دهد. به عنوان مثال نگرانی اصلی مردم ترکیه درمورد پیامدهای سرطان زا بودن این محصولات قابل ملاحظه می‌باشد (Tas *et al*., 2015).

یکی از مهم‌ترین مزایای موادغذایی تراریخته مقابله با گرسنگی در جهان است. از دیگر اثرات مثبت محصولات

تراریخته کاهش آسیب‌های اکولوژیکی از طریق کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها و جلوگیری از فرسایش خاک و افزایش بهره وری است (Canstable *et al*., 2007).

از مشکلات محصولات تراریخته در بخش کشاورزی می‌توان به احتمال ایجاد علف‌های هرز مقاوم به علفکش و همچنین تهدید تغییر تنوع پوشش گیاهی، حذف بسیاری از موجودات مفید طبیعت از جمله حشرات پارازیت آفات، عدم امکان استفاده از بذر کشت سال قبل و وابستگی کشاورزان به شرکت‌های چند ملیتی تولیدکننده این بذرهای تراریخته ژنتیکی اشاره نمود (Hashemi and shojae Al-sadati, 2012).

نگرانی‌های مصرف کنندگان محصولات تراریخته از کشوری به کشور دیگر متفاوت است. در جامعه کشاورزی استرالیا، اصلاح ژنتیکی کاملا غیرضروری به نظر می رسد. در حالی که در آمریکای شمالی به‌عنوان عامل افزایش تولید تلقی می‌شود. در فنلاند، طرفداری از زیست فناوری بسیار شایع است و درک خطر مربوط به اصلاح ژنتیکی پایین است. ولی در آلمان در چرخه های صنعتی مربوط به تولید مواد دارویی، طرفداری زیادی از زیست‌فناوری صورت می‌گیرد اما در کشاورزی که سنت‌ها حکومت می‌کند طرفداری از تولید غذاهای GM بسیار پایین است (Jia, 2003; Park, 2005).

در خاورمیانه، کشور ترکیه به جمع کشورهایی که برچسب‌گذاری محصولات غذایی اجباری است، پیوسته است (Arun *et al*., 2013). با توجه به وجود محصولات تراریخته در سطح بازارهای مصرف کشور، هنوز اقدام جدی برای برچسب گذاری و تفکیک این محصولات صورت نگرفته است. روش PCR از طرف اتحادیه اروپا بعنوان یک روش حساس، دقیق و ساده برای تعیین و شناسایی محصولات تراریخته مورد تایید می‌باشد که بعنوان روش استاندارد طلائی به طور گسترده برای تشخیص حضور موجودات تراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tengel *et* Wen-Tao *et al*., 2006 ; Meyer,1999; *al*., 2001).

برای شناسایی محصولات تراریخته روش‌های مختلفی وجود دارد. محصولات GMO را می‌توان بر اساس نوع روش شناسایی در سطوح مختلف نظیر RNA، DNA، پروتئین، متابولیت‌ها یا فنوتیپ حاصل از ژن انتقال یافته مورد بررسی قرار داد. بنابراین روش مورد استفاده باید محصولات متفاوت GMO شامل انواع غذا و محصولات کشاورزی را به صورت کمی، با حداکثر حساسیت و اطمینان و تکرارپذیری و با خطای حداقل شناسایی کند (Sonmezalp, 2004). شناسایی DNAهای ترانسژنیک جدید اضافه شده یا پروتئین جدید بیان شده، با دو روش مبتنی بر PCR و روش‌های مبتنی بر ELISA امکان‌پذیر می‌باشد (Nazarenko *et al*., 2002; Kay and Van den Eede, 2001). در حال حاضر، روش PCR یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای شناسایی محصولات تراریخته می‌باشد (Marmiroli *et al*., 2008; Lübeck, 2002b). در ۳۷٪ محصولات تراریخته وجود خاتمه دهنده NOS تایید شده است (Bruderer *et al*., 2003). در پژوهشی که در سال ۲۰۰۸ در کشور کانادا برای شناسایی کلزاهای تراریخته مجاز و غیرمجاز انجام شد. از دو پروموتور 35S و خاتمه دهنده NOS استفاده شد (Demeke and Ratnayaka, 2008). همچنین در سال ۲۰۱۲ پژوهشی جهت شناسایی پنبه‌های تراریخته به روش PCR انجام شد که از آغازگرهایی که برای تکثیر پروموتور 35S و خاتمه دهنده NOS و ژن Cry1AC وجود دارند، استفاده شد (Vidhya *et al*., 2012).

کشور ما نیز از این قاعده جدا نیست و نیاز جدی به کنترل و بررسی منابع غذایی و همچنین تربیت متخصصین در این حوزه احساس می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی حضور گوجه‌های تراریخته در بازار مصرف شهر تهران از روش مرسوم PCR است.

مواد و روش ها

- جمع آوری و آماده سازی نمونه‌ها

جهت انجام این تحقیق ۱۰ نوع گوجه فرنگی به همراه کاسبرگ از بازار تجریش، شهروند فرمانیه، تره بار شرق و غرب شهر تهران به روش نمونه‌گیری تصادفی ساده تهیه شد. به منظور استخراج DNA، کاسبرگ‌ها از نمونه‌ها جدا شد و بصورت جداگانه خشک و توسط هاون چینی پودر گردید. سپس برای هر نمونه آزمایشی، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر همگن در یک ویال ۲ میلی لیتری ریخته و بعد از کد گذاری در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

- استخراج DNA تعیین کمیت و کیفیت آن

برای استخراج DNA روش Jobes و همکاران (Jobes *et al*., 1995) مورد استفاده قرار گرفت. بعد از استخراج DNA به منظور تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده مقایسه هر نمونه با غلظت استاندارد DNA فاژ لامبدا بریده شده، با آنزیم‌های برشی EcoRI، HindIII انجام شد. سپس با بررسی میزان کشیدگی DNA و آلودگی‌های باقی مانده پلی ساکاریدی در چاهک، کیفیت DNA ارزیابی شد. سپس با مقایسه ضخامت باندهای DNA استخراج شده با تراکم باندهای DNA نشانگر اندازه III، غلظت DNA نمونه‌ها تخمین زده شد. در نهایت میزان غلظت نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر استریل تا حدود ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم شد (Fooladgar *et al*., 2019).

- تکثیر DNA با روش PCR

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این آزمایش، از چهار جفت آغازگر استفاده شد(جدول ۱). این آغازگرها با آب استریل دوبار تقطیر به غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر رقیق شدند. آنزیم Taq DNA polymerase و بافرهای مربوطه از شرکت Fermantase و مخلوط نوکلئوتیدها(dNTPs) از شرکت سیناژن تهیه شد. در اکثر روش‌های تجزیه و تحلیل محصولات تراریخته بر مبنای PCR، از یک ژن مرجع داخلی به عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده و کارآیی واکنش PCR و افزایش اطمینان استفاده می‌شود که به طور طبیعی در تمامی نمونه‌های گیاهی مورد بررسی وجود دارد (Jinxia *et al*., 2011).

در این پژوهش از جفت آغازگر RBCL-F/RBCL-R (جدول ۱) به عنوان کنترل مثبت که برای تشخیص ژن زیر واحد بزرگ آنزیم ریبولوز بیس فسفات کربوکسیلاز-اکسیژناز (RBCL) که در تمام نمونه‌های گیاهی مشترک است، استفاده می‌شود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندروف مدل Master Cycler Gradient انجام شد. این واکنش شامل ۶۰ نانوگرم DNA، بافر PCR، ۱/۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۵ پیکومول از هر یک از آغازگرها و یک واحد آنزیم Taq DNA پلی مراز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر و با برنامه دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال (۵۶ درجه سلسیوس) و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و نهایتا یک چرخه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برنامه ریزی شد (Fooladgar *et al*., 2019).

- الکتروفورز ژل آگارز

برای مشاهده باندهای تکثیر شده قطعات در واکنش PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شده و در چاهک ژل آگارز ۱/۲ درصد بافر TBE تخلیه شد. نشانگر اندازه ۱۰۰bp و ۵۰ نیز برای تخمین اندازه باندهای تکثیر شده در یک چاهک کنار نمونه‌ها تخلیه شد. ژل در میدان الکتریکی با شدت ۹v/cm به مدت یک ساعت الکتروفورز شد سپس وسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و در دستگاه Viber Lourmat Gel Document تحت اشعه فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار گرفت و عکس برداری انجام شد (Fooladgar *et al*., 2019).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده

Table 1- Specifications of primers used

Row	The name of theinitiator pair	Initiator Sequence	Initiator Sequence	Initiator Sequence
1	RBCL-F RBCL-R	5`-AATCTTCTACTGGTACATGGAC-3` 5`-TCATCATCTTTGGTAAAATCAAG-3`	433	Tan *et al*., 2003
2	P35S-F P35S-R	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3` 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	195	Lipp *et al*., 1999
3	NOS-1 NOS-3	5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTG-3' 5'-TTATCCTAGTTTGCGCGCTA-3'	180	Lipp e*t al*., 1999
4	NPTII-F NPTII-R	5'-CTCACCTTGCTCCTGCCGAGA-3' 5'-CGCCTTGAGCCTGGCGAACAG-3'	215	Matsuoka *et al*., 2002
5	PG-F PG-R	5`-GGATCCTTAGAAGCATCTAGT-3` 5`-CGTTGGTGCATCCCTGCATGG-3`	384	Gaudron *et al*., 2009

یافته‌ها

پس از استخراج DNA، واکنش PCR ابتدا با جفت آغازگر ژن کنترلی RBCL F/R انجام شد. که در ۱۰۰٪ نمونه‌های مورد بررسی یک باند ۴۳۳ جفت بازی مربوط به ژن RBCL تکثیر شد (شکل ۱) و مشخص شد که DNA استخراج شده کمیت و کیفیت مناسبی برای واکنش PCR را دارا می‌باشد. همچنین در ۱۰۰٪ نمونه‌ها یک باند ۳۸۴ جفت بازی مربوط به ژن PG تکثیر شد (شکل ۱). اما براساس استفاده از سیستم غربالگری عمومی، ردیابی توالی خاتمه دهنده NOS و ژن مارکر NPTII که در اکثر محصولات تراریخته وجود دارد، انجام شد (Kuiper, 1999; Sonmezalp, 2004; Lübeck, 2002; Ahmed, 2002). پس از انجام واکنش PCR با جفت آغازگرهای NOS-1/NOS-3 روی ۱۰ نمونه گوجه فرنگی، تنها ۱ مورد یا بعبارتی ۱۰٪ نمونه‌ها باند ۱۸۰bp مربوط به قسمتی از خاتمه دهنده NOS را تکثیر کرد (شکل ۱). توالی پروموتور P35S که امکان تکثیر باند ۱۹۵bp را دارد در بین ۱۰ نمونه گوجه فرنگی تنها در ۱ مورد یا بعبارتی ۱۰٪ نمونه‌ها تکثیر شد (شکل ۱). در این پژوهش بعد از واکنش PCR از بین ۱۰ گونه گوجه فرنگی تنها ۱ نمونه یا بعبارتی ۱۰٪ نمونه‌ها باند ۲۱۵bp از توالی ژن NPTII را تکثیر کرد (شکل ۱).

بحث

پس از بررسی نمونه‌ها با استفاده از روش غربالگری عمومی و تشخیص تراریخته بودن آنها، اقدامات لازم برای شناسایی نوع ژن‌ها انجام شد. همچنین در این پژوهش برای شناسایی گیاه گوجه فرنگی تراریخته از جفت آغازگرPG-F/PG-R که قابلیت تکثیر آنتی سنس ژن پلی گالاکتوروناز را دارد (Hemmer, 1997) استفاده شد که اغلب روی تاخیر در رسیدگی تمرکز دارد (Zhai *et al*., 2004). در این پژوهش ۱۰۰٪ نمونه‌ها یک قطعه DNA ۳۸۴ جفت بازی مربوط به قسمتی از آنتی سنس ژن گالاکتوروناز را تکثیر نمودند (شکل ۱). پس می‌توان نتیجه گرفت که در تولید گوجه فرنگی‌های تراریخته، صفت تاخیر در رسیدگی از طریق هدف گیری ژن پلی گالاکتوروناز به کمک روش آنتی سنس مورد توجه بوده است. به همین دلیل تشخیص این ژن در غربالگری عمومی گوجه فرنگی‌های تراریخته از اهمیت بسیاری برخوردار است (Bruderer *et al*., 2003). همچنین ۱۰۰٪ نمونه‌ها یک قطعه DNA ۴۳۳ جفت بازی مربوط به ژن RBCL را تکثیر کردند. در حال حاضر ژن RBCL به عنوان ژن کنترلی در گیاهان تراریخته نظیر پاپایا، برنج، توت فرنگی و گوجه فرنگی استفاده می‌شود(Liu *et al*., 2006). در ۱۰٪ نمونه‌ها ژن NOS تکثیر گردید که پس از الکتروفورز

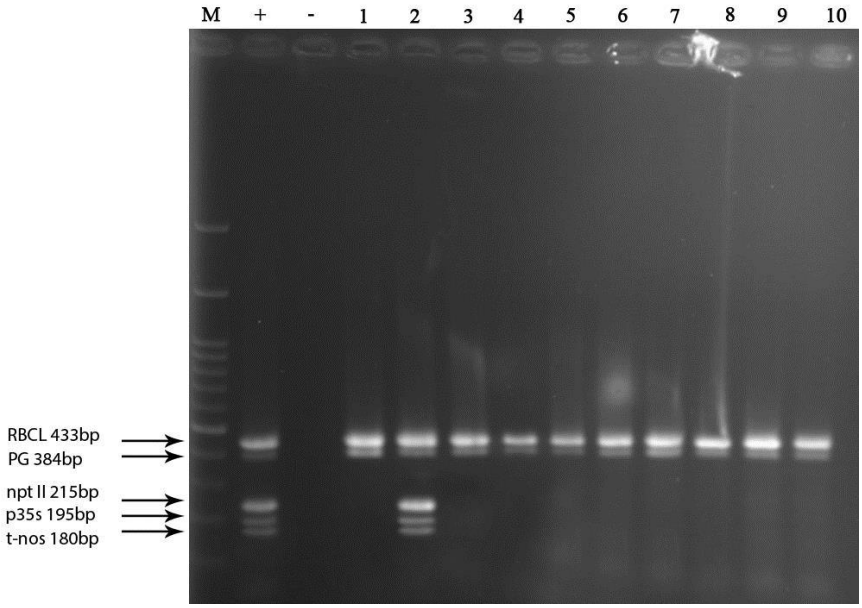

Figure 1- Screening results of 10 tomato samples with primer pairs of RBCL ،NOS ،P35S ،NptII ،PG

شکل ۱- نتایج حاصل از غربالگری ۱۰ نمونه گوجه فرنگی با جفت آغازگرهای RBCL، NOS، P35S، NptII، PG

روی ژل آگارز قابل مشاهده بود. این خاتمه دهنده که در ۳۷٪ محصولات تراریخته تایید شده وجود دارد (Bruderer *et al*., 2003)، از ژن نوپالین سینتاژ از باکتری اگروباکتریوم مشتق شده است که در محصولات تراریخته برای خاتمه رونویسی ژن‌های ادغام شده، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lin *et al*., 2000). ۱۰٪ نمونه‌ها ژن P35S را تکثیر کردند. پرکاربردترین پروموتور استفاده شده برای کنترل بیان ژن‌ها در ناقل‌های گیاهی که مربوط به موزاییک گل کلم می‌باشد، P35S است (Lin *et al*., 2000). ۱۰٪ نمونه‌ها ژن NPTII را تکثیر کردند. که بیش از ۵۶٪ محصولات تراریخته دارای یک کپی از این پروموتور هستند (Bruderer *et al*., 2003). یکی دیگر از پرکاربردترین نشانگرهای قابل گزینش ژن NPTII می‌باشد که در برابر آنتی بیوتیک کانامایسین مقاومت ایجاد می‌کند (Sonmezalp, 2004).

نتیجه‌گیری

پس از انجام واکنش PCR با آغازگرها و تکثیر قطعات ژنی و بررسی کمیت و کیفیت باندهای تکثیر شده روی ژل آگارز نتایج همردیف‌سازی توالی هر یک از قطعات ژنی مورد بررسی با توالی‌های موجود در بانک ژن شباهت صد درصدی توالی‌ها تایید شد. بدین صورت که ۱۰۰٪ ژن‌های RBCL وPG تکثیر شده در نمونه‌های مورد مطالعه با توالی‌های موجود در بانک ژنی شباهت داشتند. همچنین در ۱۰٪ نمونه‌های مورد مطالعه که ژن های NPTII، P35S و NOS را تکثیر کردند نیز شباهت ۱۰۰٪ با توالی‌های موجود در بانک ژنی داشتند.از آنجا که پیاده سازی قوانین برچسب‌گذاری تا به حال در ایران به طور گسترده عملی نشده است، نوع عامل تراریختی و مقدار آن مشخص نیست (Holst-Jensen *et al*., 2012). همچنین براساس نتایج آزمایش‌های انجام شده، می توان نتیجه گرفت که در بازار شهر تهران گوجه های تراریخته وجود دارد. لذا پیشنهاد می‌شود در صورت تولید و یا واردات محصولات تراریخته، به وسیله برچسب گذاری، حق انتخاب بین محصول تراریخته و غیرتراریخته را به مصرف کننده داد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان کمال تشکر و قدردانی خود را از کمک‌های بی شائبه مدیریت محترم آزمایشگاه پاسارگاد؛ جناب آقای دکتر امینی جهت در اختیار گذاشتن امکانات لازم برای انجام آزمایش ابراز می‌نمایند.

منابع

Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. TRENDS in Biotechnology, 20(5), 215-223.

Amin, L., Azad, M. A. K., Gausmian, M. H. & Zulkifli, F. (2014). Determinants of public attitudes to genetically modified salmon. PloS one, 9(1), e86174.

Arun, Ö. Ö., Yılmaz, F. & Muratoğlu, K. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. Food Control, 32(2), 525-531.

Ashraf, M. & Akram, N.A. (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. Biotechnology advances, 27(6), 744-752. [In Persian]

Briefs, I. S. A. A. (2016). Global status of commercialized biotech/GM crops 2016.

Bruderer, S., Leitner, K. E. & Lindenmeyer, J. (2003). Genetically Modified (GM) crops: molecular and regulatory details. Basel, Švica, BATS, Centre for biosafety and sustainability (http://www. bats. ch/gmo-watch/).

Burton-Freeman, B., Talbot, J., Park, E., Krishnankutty, S. & Edirisinghe, I. (2012). Protective activity of processed tomato products on postprandial oxidation and inflammation: a clinical trial in healthy weight men and women. Molecular Nutrition & Food Research, 56(4), 622-631.

Constable, A., Jonas, D., Cockburn, A., Davi, A., Edwards, G., Hepburn, P., Herouet-Guicheney, C., Knowles, M., Moseley, B., Oberdörfer, R. and Samuels, F. (2007). History of safe use as applied to the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(12), 2513-2525.

Demeke, T. & Ratnayaka, I. (2008). Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and real-time event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event. Food Control, 19(9), 893-897.

Demyttenaere, J. C. (2018). Natural or Synthetic? The Legal Framework in the EU for the Production of Natural Flavouring

Ingredients. In Biotechnology of Natural Products, Springer, Cham 281-305.

Faostat, F. A. O. (2012). Disponível em:< http://faostat. fao. org>. Acesso em, 14.

Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C. & Balzer, C. (2011). Solutions for a cultivated planet. Nature, 478(7369), 337-342.

Fooladgar, F., Talebi, M. & Bahar, M. (2019). Detection and identification of genetically-modified tomatoes using PCR technique and sequencing. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture-Isfahan University of Technology, 9(4), 71-80. [In Persian]

Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D. & Roosens, N. H. (2015). Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. BioMed research international, 2015, 1-22.

Gaudron, T., Peters, C., Boland, E., Steinmetz, A. & Moris, G. (2009). Development of a quadruplex-real-time-PCR for screening food for genetically modified organisms. European Food Research and Technology, 229(2), 295-305.

Ghanian, M., Ghoochani, O. M., Kitterlin, M., Jahangiry, S., Zarafshani, K., Van Passel, S. & Azadi, H. (2016). Attitudes of agricultural experts toward genetically modified crops: A case study in Southwest Iran. Science and engineering ethics, 22(2), 509-524. [In Persian]

Godfray, H. C. J., Beddington, J.R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M. & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. science, 327(5967), 812-818.

Hashemi, M. & Shojae Al-sadati, S. A. (2012). Genetically Modified food: opportunities and challenges. Iranian Journal of Food science and Technology, 7(24).89-102. [In Persian]

Hemmer, W. (1997). Foods derived from genetically modified organisms and detection methods, 1-3.

Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., Morisset, D., Pecoraro, S., Pla, M., Van den Bulcke, M. & Wulff, D. (2012). Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. Biotechnology Advances, 30(6), 1318-1335.

ISAAA (2012). International Service for the Acquistion of Agri-biotech Applications. ISAAA Briefs 42. Global statuse of commercialized Biotech/GM Crops: 2012: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.

Jia, H. (2003). GM Labeling in china beset by problems. Nature Biotechnology 21(8), 835-836.

Jinxia, A., Qingzhang, L., Xuejun, G., Yanbo, Y., Lu, L. & Minghui, Z. (2011). A multiplex nested PCR assay for the simultaneous detection of genetically modified soybean, maize and rice in highly processed products. Food Control, 22(10), 1617-1623.

Jobes, D. V., Hurley, D. L. & Thien, L. B. (1995). Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. Taxon, 44(3), 379-386.

Kay, S. & Van den Eede, G. (2001). The limits of GMO detection. Nature Biotechnology, 19(5), 405-405.

Kaya, I. H., Poyrazoglu, E. S., Artik, N. & Konar, N. (2013). Academicans' Perceptions and Attitudes toward GM-Organisms and–Foods. International Journal of Biological, Ecological and Environmental Sciences IJBEES, 2(2), 20-24.

Kuiper, H. A. (1999). Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. Food Control, 10, 339-349.

Lin, H. Y., CHIUEH, L. C. & SHIH, D. Y. C. (2000). Detection of genetically modified soybeans and maize by the polymerase chain reaction method. Journal of Food and Drug Analysis, 8(3).

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. & Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. Journal of AOAC International, 82(4), 923-928.

Liu, J. Y., Deng, X., Kang, L. & Chen, D. M. (2006). Detection of transgenic papaya by SYBR-Green real time PCR. Journal of HUNAN Agriculture University, 32(4), 371-374.

Lübeck, M. (2002). Detection of genetically modified plants: Methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products. Danish Forest and Nature Agency.

Marmiroli, N., Maestri, E., Gulli, 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(3), 369.

Matsuoka, T., Kuribara, H., Takubo, K., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M. & Hino, A. (2002). Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (Zea mays). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(7), 2100-2109.

Meyer, R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food control, 10(6), 391-399.

Nazarenko, I., Lowe, B., Darfler, M., Ikonomi, P., Schuster, D. & Rashtchian, A. (2002). Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. Nucleic acids Research, 30(9), e37-e37.

Nourozi, P. (2003). Biotechnology perspectives and issues in sustainable development. The first food and sustainable development conference. [In Persian]

Norouzi, P., Mahmoudi, S. & Jafari, R. (2016). Priorities of Transformation for Field and Horticultire Crops in Iran Biotechnology committee of the ministry of Agriculture Jihad. Mashhad University Jihad Publications. 78 pages Ministry of Agriculture Jihad, 2016. From (www.pr.maj.ir). [In Persian]

Park, S. H. (2005). Current status of regulation on GM food in Korea. Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 46(1), 4-J7.

Rani, S. J. & Usha, R. (2013). Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. journal of pharmacy research, 6(8), 879-883.

Rizwan, M., Rodriguez-Blanco, I., Harbottle, A., Birch-Machin, M.A., Watson, R.E.B. & Rhodes, L.E. (2011). Tomato paste rich in lycopene protects against cutaneous photodamage in humans in vivo: a randomized controlled trial. British Journal of Dermatology, 164(1), 154-162.

Sonmezalp, C. Z. (2004). Detection of genetically modified insect resistant tomato via polymerase chain reaction (Doctoral dissertation, Doctoral dissertation, Middle East Technical University).

Tan, W., J. Dong, H. L. Deng, H. Z. Wu & Xu, B. L. (2003). Protocol of the qualitative polymerase chain reaction for detection of genetically modified plant components in food, industry standard of entry exit inspection and quarantine of the People's Republic of China. SN/T 1202, China: Industry Standard.

Tas, M., Balci, M., Yüksel, A. & Yesilçubuk, N. S. (2015). Consumer awareness, perception and attitudes towards genetically modified foods in Turkey. British Food Journal.

Tengel, C., Schüßler, P., Setzke, E., Balles, J. & Sprenger-Haussels, M. (2001). PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. BioTechniques, 31(2), 426-429.

Vidhya, S. S., Gowda, P.H., Yogendra, K.N., Ningaraju, T. M. & Salome, T. (2012). Detection of genetically modified cotton seeds using PCR and real-time PCR.

Wen-Tao, X., Kun-Lun, H., Ai-Ke, D. & Yun-Bo, L. (2006). PCR for the detection of the anti-herbicide genes in genetically modified organisms. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 3(1), 53-57.

Zhai, W. X., Chen, C. Y., Zhu, X. F., Chen, X. W., Zhang, D. H., Li, X. B. & Zhu, L. H. (2004). Analysis of tDNA-Xa21 loci and bacterial blight resistance effects of the transgene Xa21 in transgenic rice. Theoretical and Applied Genetics, 109, 534–542.

Differential Detection and Identification of Transgenic Tomato *Solanum Lycopersicum* by Multiplex PCR Technique in Tehran

A. Azizi [a], A. Sharifan [b], M. Emtiazjoo [c] *

[a] M. Sc. of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Associate Professor of Faculty of Life Sciences, North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 31 August 2020 Accepted: 30 December 2020

Abstract

Introduction: Food industry has an important value all over the would. Tomatoes and it's other products are one of the important agricultural products in food industry. Transgenic plants and seeds are one of the important achievements of modern biotechnology in field of agriculture that have captured a part of food marketing in recent years. Therefore, identify and examine whether transgenic agricultural products are transgenic or not, it is necessary because there are still many opinions for and against the use of these products in the world.

Materials and Methods: In this study, 10 types of tomatoes along with sepals were collected by simple sampling method from Tajrish bazaar, Shahrvand-e farmaniyeh, vegetable market East and West of Tehran and were examined. At first, P35S F/R, NOS-1/NOS-3, RBCLF/R and NPTⅡ F/R primers were used. Nucleotide fragments were amplified respectively at 195bp and 180bp.

Results: Amplified nucleotide fragments confirmed 100% similarity of the nucleotide sequence to the samples in the gene bank that the studied products were genetically engineered. Also, in order to identify transgenic tomatoes, aspecific PG F/R primer pair was used to amplify the antigens of polygalacturonase gene. All specimens that had P35S promoter band or NOS terminator, or both, amplified the 384bp band associated with part of the PG gene antisense, and found a 100% similarity in the gene sequence registered in the gene bank.

Conclusion: The results of this investigation showed that transgenic tomatoes exist in Iran's market without consumer awareness.

Keywords: *PCR, Tomato, Transgenic Identification.*

* Corresponding Author: m_emtyazjoo@iau-tnb.ac.ir