فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۱ ص.۳۴-۲۱

مقاله پژوهشی

تشخیص سویای تراریخته از طریق ژن‌های *Camv 35S Promotor* و *Lectin* در نمونه‌های غذای کودک

مهسا کاوسی *، **فاطمه سلمانی زکریا**

گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): mkavoosi@iauet.ac.ir

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۱

چکیده

امروزه به دلیل افزایش روزافزون جمعیت، سطح زیر کشت محصولات تغییر یافته ژنتیکی (GMO) در تمامی کشورها افزایش یافته است. در ایران سیستمی برای برچسب گذاری بر روی محصولات تراریخته وجود ندارد. غذای کودک که یکی از مهم‌ترین ارکان رشد و تضمین کننده سلامت کودک است، از این قاعده مستثنی نیست. از این رو، در این پژوهش سعی شد که به کمک بررسی ژن کنترل داخلی Lectin و ژن شاخص تراریختگی Camv 35S Promoter، محصولات تراریخته با روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) شناسایی شوند. برای این منظور ۲۵ نمونه سویا از مغازه‌ها و ۲۵ نمونه غذای کودک از داروخانه‌های شهر تهران و یک غذای کودک خارجی با برچسب تراریختگی خریداری شد. DNA نمونه‌ها با کیت استخراج با برند TLABاستخراج شد. پس از بررسی غلظت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ، نمونه‌ها به وسیله روش PCR مورد غربالگری قرار گرفتند. نتایج بررسی نمونه‌های سویا نشان داد که، ۹۲% از نمونه‌ها دارای ژن داخلی Lectin و ۶۳% دارای ژن Camv 35S Promoter بودند. از ۲۵ نمونه غذای کودک ۹۳% ژن داخلی Lectin و ۵۲% ژن شاخص تراریختگی Camv 35S Promoter را داشتند. وجود ژن Camv 35S Promoter بیانگر تراریخته بودن محصول است. می‌توان نتیجه گرفت که در نمونه‌های سویا میزان تراریختگی به صورت قابل توجهی زیاد است و در غذای کودک میزان تراریختگی در نمونه‌های ایرانی بیشتر از نمونه خارجی می‌باشد. در حالی که هیچ‌یک از نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق برچسب تراریختگی نداشتند.

کلیدواژه‌ها: تراریخته، برچسب گذاری، غذای کودک، ژن *Lectin*، ژن *Camv 35S Promoter*.

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی (WHO) اصطلاح GMO یا موجودات تراریخته را زمانی به کار می‌برد که ماده‌ی ژنتیکی، به نحوی تغییر یابد که به طور طبیعی وجود ندارد [۱]. گیاه تراریخته دارای مجموعه‌ای از ویتامین‌ها و مواد معدنی است که در گونه طبیعی گیاه وجود ندارد. در گیاهان تراریخته به جای سموم از ژن‌ها

استفاده می‌شود و این باعث افزایش سلامتی این گیاهان می‌گردد [۲]. با توجه به این که آزادی در انتخاب غذا، حق طبیعی انسان‌ها می‌باشد، هر شخصی باید بتواند با توجه به سلیقه، افکار و اعتقادات خود، غذای مورد نیازش را انتخاب کند. بنابراین اطلاعات کامل در مورد هر محصول باید روی آن ثبت شده باشد و هر فرد بتواند با توجه به ویژگی‌های درج شده، آن را وارد سبد غذایی خود کند. در اتحادیه اروپا، آستانه برچسب زدن به مواد غذایی دارای GMOs با مجوز تولید، ۰/۹% تعیین شده است. بنابراین کنترل دقیق وجود و مقدار مواد تراریخته، بسیار مهم است. ژن‌های انتخاب‌گر یک ابزار مهم در تولید گیاهان تراریخته هستند و می‌توانند در مراحل شناسایی، استخراج و انتقال ژن استفاده شوند. تاکنون ۵۰ نوع از ژن‌های انتخاب‌گر، شناخته شده است. ژن‌های انتخاب‌گر، نقش کلیدی در توسعه‌ی روش‌های تراریخته نمودن موجودات بر عهده دارند [۳]. دستورالعمل اجرایی حداقل ضوابط برچسب گذاری فرآورده‌های غذایی و آشامیدنی در شهریور ۱۳۹۳ در وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی مورد بازنگری و تصویب قرار گرفته است. بزرگ‌ترین ایراد موجود در این دستورالعمل که به نقص قانون بر می‌گردد، این است که برچسب گذاری فقط برای موجودات زنده تراریخته در نظر گرفته شده است. این در حالی است که قسمت اعظم مواد غذایی به شکل فرآوری شده و غیر زنده هستند و عدم برچسب گذاری این نوع از محصولات نقص قانون و دستورالعمل را نشان می‌دهد. اگرچه در این ضابطه به موضوع برچسب گذاری و بسته‌بندی محصولات تراریخته پرداخته شده است، اما کامل و واضح نیست و بیشتر از آن که اجرایی باشد، حالت توصیفی دارد. به نظر می‌رسد بررسی بیشتر در مورد آن به پس از تأیید تراریخته بودن محصولات توسط مراجع ذی‌صلاح و تدوین ضوابط محصولات تراریخته در کشور موکول شده و به دلیل تأخیری که در تصویب آیین‌نامه اجرایی وجود داشته، این بحث نیز مسکوت مانده است و پروتکل‌های مربوط به نحوه کنترل و نظارت بر اجرای مقررات تاکنون اجرا نشده است [۴].

سویا پرچم‌دار محصولات تراریخته است و با اشغال ۴۷% از اراضی زیر کشت محصولات تراریخته هم چنان رتبه اول را در بین گیاهان زراعی حاصل از زیست فناوری به خود اختصاص داده است [۵،۶]. ۹۸% از دانه سویای آمریکا برای خوراك دام مورد استفاده قرار می‌گیرد و دو درصد باقیمانده بیشتر به محصولات سویا با میزان پروتئین‌های بالا تبدیل می‌شوند که در انواع غذاها مانند سس سالاد، سوپ، آنالوگ گوشت، پودر نوشیدنی، پنیر، خامه غیر لبنی، دسر یخزده، غذای کودك، نان، غلات صبحانه، پاستا و غذاهای حیوان خانگی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۷]. پروتئین سویای پردازش شده به طور عمده به سه شکل در غذاهای مختلف حضور دارد: آرد سویا، پروتئین سویای جدا شده و پروتئین سویای غنی شده [۸]. حدود ۹۰% از سویای کشت شده در ایالات متحده تراریخته است [۹]. سویای تراریخته فراوان‌ترین محصول زراعی تراریخته است [۱۰].

سوء تغذیه در کشورهای در حال توسعه شیوع زیادی دارد و عامل بسیار مهم و حیاتی در دوران جنینی، نوزادی و همچنین سنین زیر پنج سال تلقی می‌شود. از آنجا که سرعت زیاد رشد در دوره شیرخوارگی با تغییرات مشخص در عملکرد و ترکیب ارگان‌ها همراه است، نقص در تأمین مواد غذایی کافی در این دوره می‌تواند علاوه بر اختلال رشد، اثرات مخربی بر نمو داشته باشد. بنابراین تغذیه کافی کودک ارتباط مهمی با سلامتی کامل وی در تمام طول زندگی دارد [۱۱]. از میان مواد غذایی، شیر مادر تا پایان شش ماهگی به تنهایی برای رشد طبیعی شیرخوار کافی است اما بعد از آن نیازهای غذایی شیرخوار فقط با شیر مادر برآورده نشده و لازم است غذاهای نیمه جامد نیز برای کودک شروع گردد [۱۲]. لکتین‌ها پروتئین‌هایی حاوی کربوهیدرات هستند که نقش‌های بی‌شماری در پدیده‌های شناخت بیولوژیکی شامل سلول‌ها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها دارند [۱۳]. لکتین‌ها در بسیاری از غذاها یافت می‌شوند. برای کاهش محتوای لکتین بعضی از مواد غذایی مانند لوبیا و غلات باید پخته یا تخمیر شوند. برخی لکتین‌ها مفید هستند مانند CLEC11A که رشد استخوان را تقویت می‌کنند، در حالی که برخی دیگر ممکن است سموم قدرتمندی مانند ریچین باشند [۱۴] .

Camv 35S Promotor ویروس موزاییک گل کلم، دارای ۳۴۳ جفت باز، منطقه معرفی CAAT و جعبه TATA مانند است. این پروموتور برای انتقال ژن استفاده می‌شود و در کلیه محصولات GMO وجود دارد. وجود *Camv 35S Promotor* در محصولات GMO را می‌توان با استفاده از روش PCR بررسی کرد. برای تجزیه و تحلیل GMO از PCR معمولی، RT-PCR، سیمپلکس و

Multiplex PCR استفاده شده است [۱،۱۵]. اغلب روش‌های تشخیص GMO در سطح DNA متمرکز هستند. روش‌های مبتنی بر DNA بیشتر شامل هیبریدیزاسیون مولکولی، PCR و ریز تراشه هستند. در بین روش‌های مختلفی که DNA را هدف ارزیابی قرار می‌دهند، PCR به دلیل سرعت بالا، قیمت نسبتاً پایین و دسترسی مناسب بیشتر مورد استفاده است [۱۶]. هدف از این پژوهش، بررسی میزان تراریخته بودن غذای کودک در ایران است تا با انجام واکنش PCR ژن‌های *Lectin* به عنوان ژن کنترل داخلی و ژن *Camv 35S Promoter* به عنوان ژن گزینشگر در محصولاتی که فاقد برچسب تراریختگی بودند، بررسی شوند.

مواد و روش‌ها

۲۵ نمونه‌ی سویای فاقد برچسب ایمنی زیستی گیاهان تراریخته، خریداری شدند. ۸ نمونه سویا از بخش‌های مختلف تهران، ۴ نمونه سویا از مشهد، ۳ نمونه سویا به صورت آجیلی، ۵ نمونه سویا از کرج و ۵ نمونه سویا از کرمانشاه از مغازه‌های سطح تهران و مناطق مختلف جمع‌آوری شد. ۲۵ نمونه غذای کودک به ترتیب به نام‌های (A-W) که حاوی سویا بوده و فاقد برچسب ایمنی زیستی محصولات تراریخته بودند از داروخانه‌های سطح تهران جمع‌آوری شد.

استخراج DNA از نمونه‌های سویا

ابتدا نمونه‌های سویا با هاون کوبیده شدند تا کاملاً له شوند. سپس با دستگاه مخلوط‌کن برقی کاملاً آسیاب شدند. برای استخراج DNA از کیت TLAB استفاده شد. ۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول A که قبلاً آماده شده بود، به میکروتیوپ حاوی نمونه اضافه و ورتکس شد. میکروتیوپ‌های حاوی نمونه به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در طول این مدت نمونه‌ها سه بار ورتکس شدند. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول B به میکروتیوپ حاوی نمونه اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. میکروتیوپ حاوی نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ میکروفیوژ شد. با دقت ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و به درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر دیگر ریخته شد. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول C به میکروتیوپ حاوی نمونه اضافه و میکروتیوپ ۱۵ بار سر و ته شد. میکروتیوپ حاوی نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس میکروتیوپ به مدت ۱۰ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ میکروفیوژ شد. محلول رویی خالی شد. ۷۰۰ میکرولیتر از اتانول مطلق به میکروتیوپ حاوی نمونه اضافه و ۱۰ بار میکروتیوپ سر و ته شد و به مدت ۵ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ میکروفیوژ شد. محلول رویی خالی شد. مجددا ۷۰۰ میکرولیتر از اتانل اضافه و مراحل قبل تکرار شد. سپس زمان داده شد تا درون میکروتیوپ حاوی نمونه خشک شود.

استخراج DNA از غذای کودک

برای استخراج نمونه‌ها از کیت TLAB استفاده شد. ۰/۲ گرم از غذای کودک با ترازو وزن و درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. ۵۰۰ تا ۷۰۰ میکرولیتر از آب مقطر دیونیزه و استریل دو بار تقطیر به میکروتیوپ حاوی نمونه اضافه و ورتکس شد. میکروتیوپ حاوی نمونه به مدت پنج دقیقه با rpm ۱۰۰۰۰ میکروفیوژ شد. ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و به میکروتیوپ جدید منتقل شد. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول A را به میکروتیوپ حاوی نمونه اضافه و ورتکس شد. سپس همانند روش استخراج DNA از نمونه‌های سویا عمل شد.

آنالیز DNA استخراج شده

تمامی نمونه‌های استخراج شده به وسیله دستگاه نانودراپ در دو طول موج ۲۳۰/۲۶۰ و ۲۶۰/۲۸۰ مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج به دست آمده ثبت شد. برای این که اطمینان بیشتری از کیفیت DNA حاصل شود، به صورت تصادفی شش نمونه از DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱% بررسی شد. بعد از این که از کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده اطمینان حاصل شد، مراحل آماده‌سازی واکنش PCR انجام گرفت.

مراحل آماده‌سازی ژن‌های Lectin و Camv 35S Promoter

به ازای هر نمونه مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر از 2X PCR Master mix و ۸/۵ میکرولیتر DDW به میکروتیوپ اضافه و به طور مختصر ورتکس شد. سپس به مدت ۳۰ ثانیه با rpm ۱۰۰۰ میکروفیوژ گردید. مقدار ۲۴ میکرولیتر از مستر میکس تهیه شده به ۰/۵ ml

اضافه شد. ۱ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده و همچنین ۱ میکرولیترکنترل مثبت و ۲ میکرولیتر کنترل منفی (آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه و استریل) به میکروتیوپ‌های ml ۰/۵ که حاوی مستر میکس است اضافه گردید. به این ترتیب نمونه‌ها برای واکنش PCR آماده شدند و با برنامه دمایی- زمانی مربوط به خود در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند.

جهت مشاهده باندهای حاصل از تکثیر قطعات در واکنش PCR ظرف قالب ژل به تانک الکتروفورز انتقال داده شد و ml ۹۰۰ از بافر TBE 1X به درون تانک الکتروفورز اضافه شد. مقدار پنج میکرولیتر از محصول PCR در چاهک ژل آگارز ۱/۵% تخلیه گردید. همچنین سایز مارکر bp ۱۰۰ جهت تخمین اندازه باندهای تکثیر شده در یک چاهک کنار نمونه‌ها تخلیه گردید. ژل به مدت ۲۵ دقیقه در میدان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. سپس در دستگاه Gel Document تحت اشعه ماوراء بنفش با طول موج ۳۵۱ نانومتر عکس‌برداری شد.

نتایج

بررسي كميت و كيفيت DNA استخراج شده به وسيله نانو دراپ

كميت و خلوص DNA استخراجی از نمونه‌های سویا و غذای کودک به وسیله روش اسپکتروفوتومتری توسط دستگاه نانودراپ در دو طول موج ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۳۰/۲۶۰ بررسی شد. در صورتی که طول موج ۲۶۰/۲۸۰ کمتر از ۱/۸ باشد نشان دهنده آلودگی با پروتئین است. مقادیر کمتر از ۱/۵ باید مجدد استخراج شوند. اگر طول موج ۲۳۰/۲۶۰ کمتر از ۱ باشد نشان دهنده آلودگی با فنول، اتانول و ایزوپروپانول است و باید مجدد استخراج شوند. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز به صورت تصادفی شش نمونه بر روی ژل آگارز ۱% لود شد و صحت و کیفیت DNA استخراج شده بررسی شد. وجود باندهای واضح و یا به اصطلاح Sharp بیانگر کیفیت مطلوب نمونه‌های استخراج شده بود.

غربالگری نمونه‌ها

واکنش PCR جهت اثبات حضور ژن داخلی *Lectin* انجام شد. نتایج به دست آمده روی ژل آگارز ۱/۵% در عکس ۱ مشخص است. چاهک شماره‌ی ۶ کنترل مثبت است. چون مواد لود شده در این چاهک غلیظ هستند، انتظار می‌رفت که باند تشکیل شود. اگر در چاهک شماره ۵ باند تشکیل نمی‌شد، عدم موفقیت در خالص‌سازی DNA را نشان می‌داد و نیاز بود که نمونه مجدداً تخلیص شود. در چاهک شماره‌ی۵ مواد کنترل منفی لود شده بود و انتظار می‌رفت که باندی تشکیل نشود. عدم تشکیل باند در این چاهک نشان می‌دهدکه تخلیص DNA و PCR بدون آلودگی انجام شده است.

سپس جهت بررسی حضور ژن *Camv 35S Promotor* به منظور شناسایی و غربالگری محصولات تراریخته آزمون PCR صورت گرفت و نتایج به دست آمده روی ژل آگارز ۱%/۵ بررسی شد (عکس ۲). در چاهک شماره ۱ نبود باند به علت نداشتن ژن تراریخته *Camv 35S Promotor* در نمونه است. چاهک شماره ۴ کنترل منفی است. در کنترل منفی به جای استفاده از DNA الگو از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شده است و ژن تراریخته وجود ندارد. بنابراین، انتظار می‌رفت که باند وجود نداشته باشد. نبود باند در کنترل منفی حاکی از آن است که آلودگی در نمونه مشاهده نشده است.

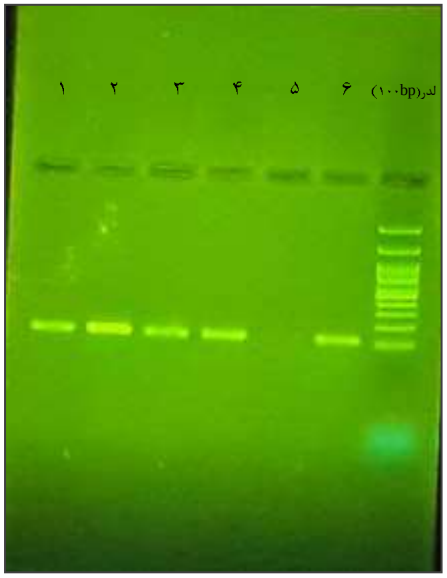
نتایج به دست‌آمده از واکنش PCR برای ژن *Lectin*

دیاگرام ۱، نتایج به دست آمده از PCR نمونه‌های سویا و محصولات حاوی آن برای ژن *Lectin* است. از ۲۵ نمونه، ۲۳ نمونه دارای این ژن بودند. یعنی ۹۲% نمونه‌ها مثبت بود و ۸% از نمونه‌ها ژن *Lectin* را نداشتند. در دیاگرام ۲، نتایج مربوط به PCR نمونه‌های غذای کودک برای ژن *Lectin* آورده شده است. از ۲۵ نمونه، ۲۰ نمونه دارای ژن تراریخته بودند. یعنی ۸۲% از نمونه‌ها مثبت بودند و ۱۸% از نمونه‌ها ژن *Lectin* را نداشتند. در حالی که انتظار می‌رفت که به دلیل کنترل داخلی بودن ژن لکتین، در همه نمونه‌ها وجود داشته باشد. این اتفاق ممکن است به دلیل موتاسیون‌های نقطه‌ای ایجاد شده در ژن مورد نظر صورت گرفته باشد. دیاگرام ۳، نتایج مربوط به مقایسه نمونه‌های غذای کودک و سویا برای ژن *Lectin* است که از ۲۵ نمونه، ۲۳ نمونه یعنی ۹۲% از نمونه‌ها دارای ژن و مثبت بودند. در حالی که در نمونه‌های غذای کودک از ۲۵ نمونه، ۲۰ نمونه دارای این ژن بودند یعنی ۸۲% از نمونه‌ها مثبت بود.

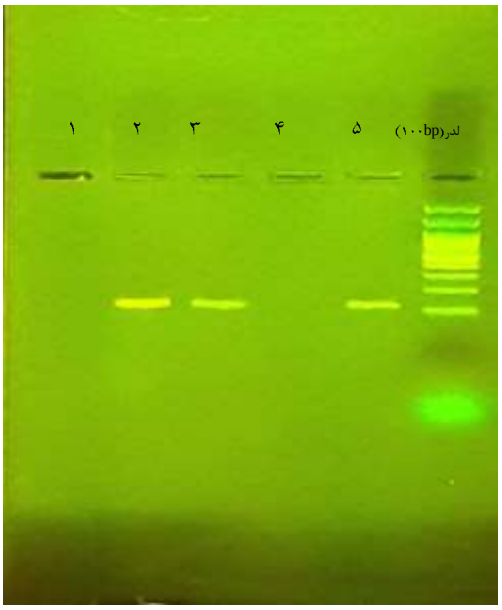
نتایج به دست‌آمده از واکنش PCR برای ژن *Camv 35S Promotor*

در دیاگرام ۴ نتایج مربوط به PCR نمونه‌های سویا برای ژن *Camv 35S Promotor* را می‌توان مشاهده کرد. از ۲۵ نمونه، ۱۵ نمونه یعنی ۶۳% از نمونه‌ها دارای ژن تراریخته بودند. ۳۷% از نمونه‌ها تراریخته نبودند و ژن *Camv 35S Promotor* را نداشتند.

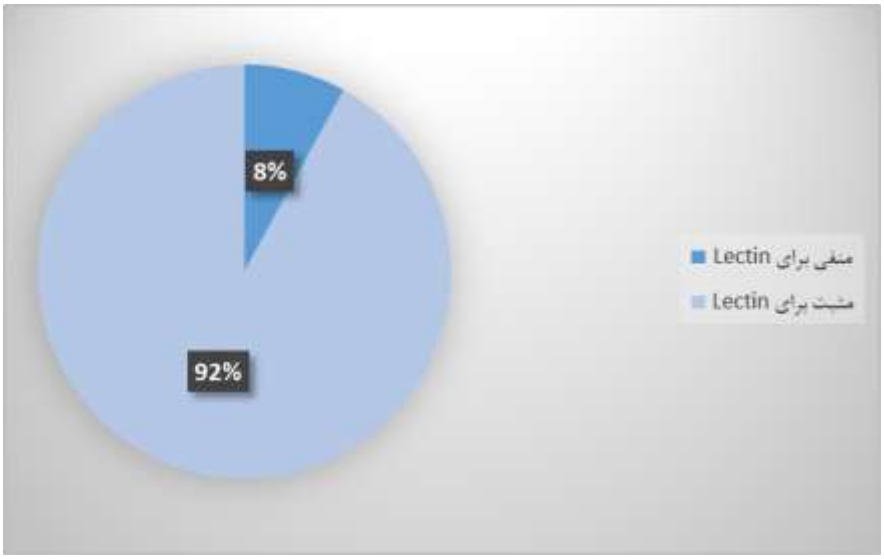
در دیاگرام ۵، نتایج مربوط به PCR نمونه‌های غذای کودک برای ژن *Camv 35S Promotor* نشان داده شده است. از ۲۵ نمونه، ۱۳ نمونه یعنی ۵۲% از نمونه‌ها مثبت و دارای ژن تراریخته بودند. ۴۸% از نمونه‌ها فاقد ژن *Camv 35S Promotor* بوده و تراریخته نبودند.



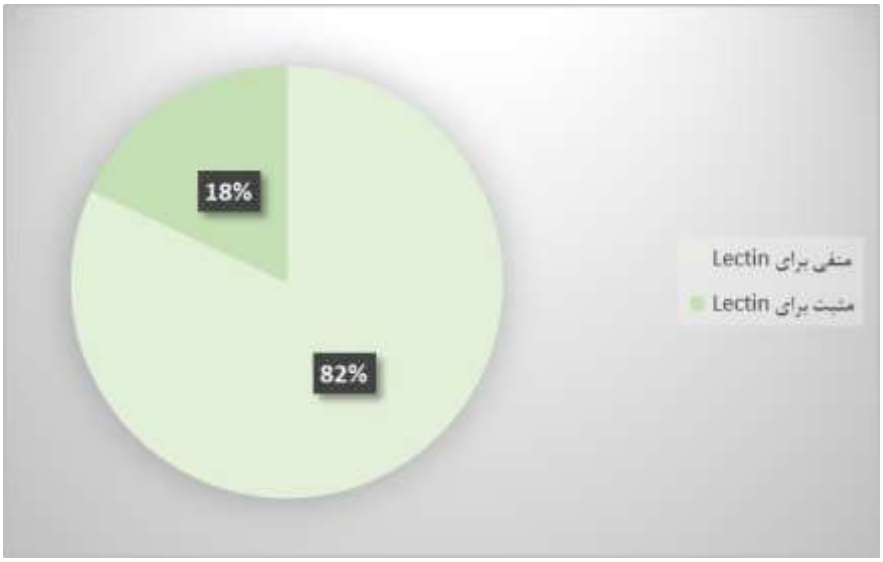
عکس ۱- نتایج مربوط به PCR ژن کنترل داخلی *Lectin* بر روی ژل آگارز ۱/۵%. چاهک‌های شماره ۱ و ۲ و ۳ و ۴ نمونه‌ها. نمونه ۵ کنترل منفی. نمونه ۶ کنترل مثبت. شماره ۷ سایز مارکر ۱۰۰ bp



عکس ۲- محصول PCR ژن شاخص تراریختگی *Camv 35S Promotor* بر روی ژل آگارز ۱/۵% نمونه یک منفی. شماره ۲ و ۳ مثبت. نمونه ٤ کنترل منفی. نمونه ٥ کنترل مثبت. شماره ٦ سایز مارکر ۱۰۰ bp

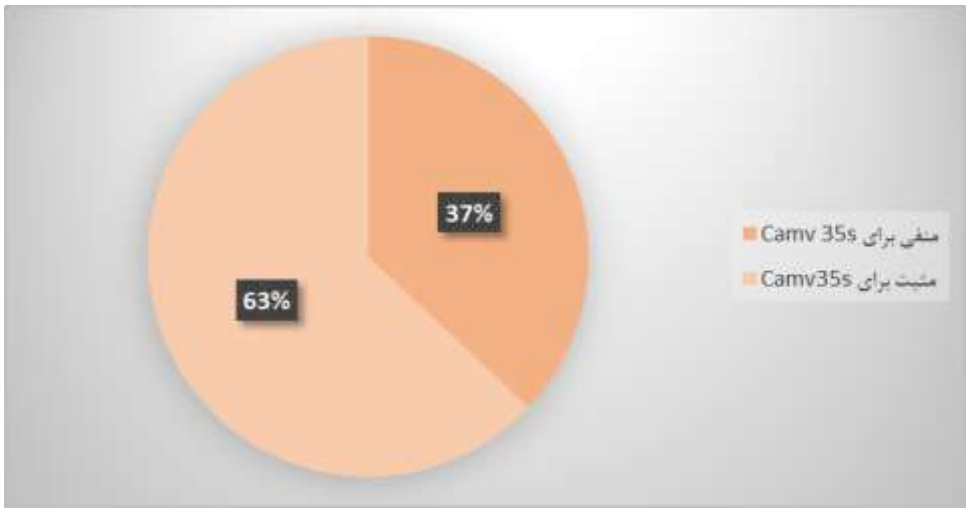


دیاگرام ۱- نمودار نتایج مربوط به PCR نمونه‌های سویا و محصولات حاوی آن برای ژن *Lectin*

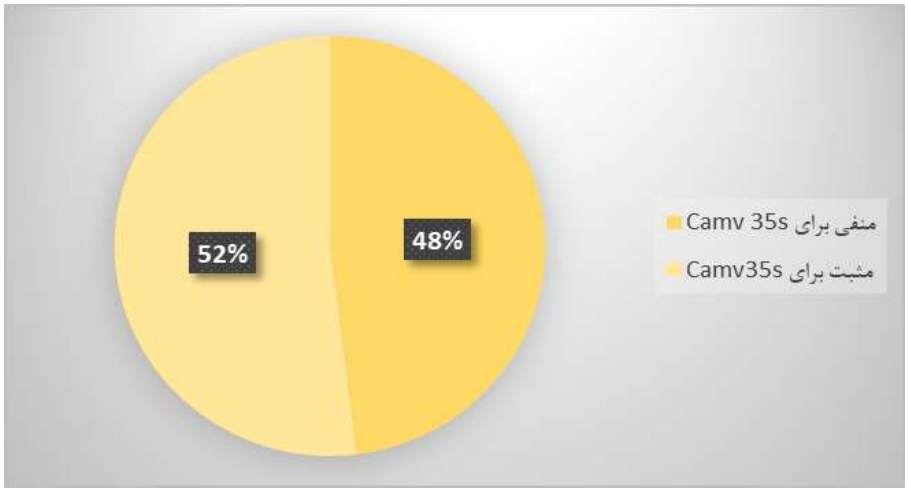


دیاگرام ۲- نمودار نتایج مربوط به PCR نمونه‌های غذای کودک برای ژن *Lectin*

دیاگرام ۳- نمودار مقایسه حضور ژن *Lectin* در غذای کودک و سویا



دیاگرام ۴- نمودار نتایج مربوط به PCR نمونه‌های سویا برای ژن *Camv 35S Promotor*



دیاگرام ۵- نتایج مربوط به PCR نمونه‌های غذای کودک برای ژن *Camv 35S Promotor*

دیاگرام ۶ مربوط به مقایسه نمونه‌های غذای کودک و سویا از نظر وجود ژن *Camv 35S Promotor* است. از ۲۵ نمونه سویا، ۱۵ نمونه یعنی ۶۳% دارای ژن تراریختگی *Camv 35S Promotor* بودند و فقط ۳۷% از نمونه‌ها فاقد ژن مربوطه بودند. در حالی که در نمونه‌های غذای کودک ۵۲% دارای ژن تراریختگی بودند و ۴۸% از نمونه‌ها فاقد این ژن بودند.

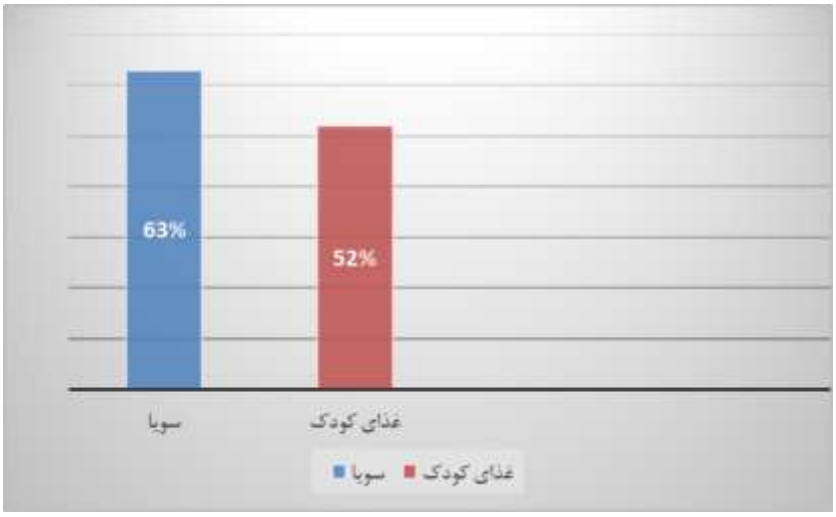
مقایسه تراریختگی سویا در محصولات ایرانی در برخی از شهرها

از ۲۵ نمونه سویا استفاده شده در این تحقیق ۶ نمونه سویا از بخش‌های مختلف سطح تهران، ۴ نمونه سویا از مشهد، ۳ نمونه سویا به صورت آجیلی، ۲ نمونه سویا به‌صورت فله‌ای از تهران، ۵ نمونه سویا از کرج و ۵ نمونه از کرمانشاه می‌باشد. دیاگرام ۷ میزان تراریختگی در نمونه‌های سویا در بخش‌های مختلف را نشان می‌دهد.

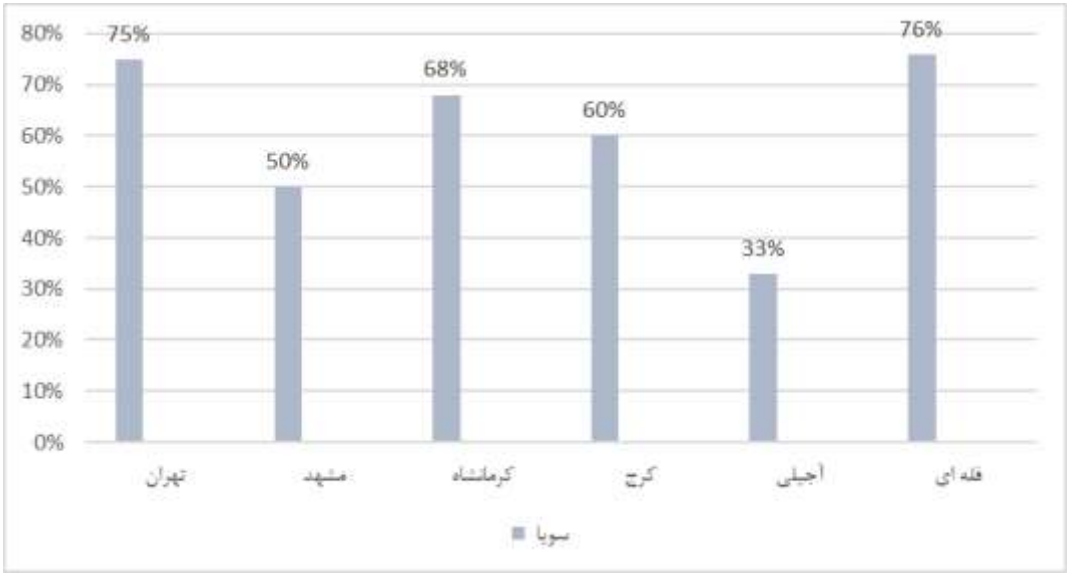
نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که محلول‌پاشی با انواع جاسمونات‌ها، سبب کاهش میزان کلروفیل و وزن خشک برگ در هر دو رقم توت‌فرنگی گردید به‌گونه‌ای‌که با افزایش غلظت این هورمون، کاهش بیشتری یافتند و بیشترین تعداد میوه در رقم سلوا با محلول‌پاشی ۲ میلی مولار جاسمونیک اسید به‌دست آمد ولی بر وزن میوه، اثر معنی‌داری نداشت. در این آزمایش، محلول‌پاشی جاسمونات‌ها بر برخی صفات کیفی توت‌فرنگی اثر معنی‌داری

داشتند به‌گونه‌ای‌که سبب کاهش میزان اسیدیته کل و افزایش آنتوسیانین گردید و بدین طریق با افزایش غلظت جاسمونات‌ها، خواص کیفی در هر دو رقم توت‌فرنگی افزایش یافت و در مجموع رقم سلوا واکنش بیشتری به محلول‌پاشی جاسمونات‌ها نشان داد به‌گونه‌ای‌که رقم سلوا، بیشترین میزان آنتوسیانین را با بالاترین غلظت جاسمونیک اسید (۲ میلی مولار) تولید کرد. همچنین نتایج حاکی از آن بود که رقم سلوا با تولید مواد جامد محلول (TSS) و نسبت TSS/TA معنی‌دار بیشتر و میزان TA کمتر نسبت به رقم پاروس، از لحاظ کیفی مطلوبتر می‌باشد.



دیاگرام ۶- نمودار مقایسه حضور ژن *Camv 35S Promotor* در غذای کودک و سویا



دیاگرام ۷- نمودار مقایسه حضور ژن تراریختگی *Camv 35S Promotor* در سویا ایرانی در بخش‌های مختلف

آنالیز آماری

بررسی رابطه معنی‌دار بین وجود یا عدم وجود *Camv 35S Promotor* در سویا و غذای کودکان

با توجه به جدول زیر ۴۰/۰ درصد از موارد سویا دارای *Camv 35S Promotor* منفی و ۶۰/۰ درصد دارای *Camv 35S Promotor* مثبت هستند و برای غذای کودکان ۴۸/۰ درصد

Camv 35S Promotor مثبت و ۵۲/۰ درصد دارای *Camv 35S Promotor* منفی هستند.

مقدار آماره کااسکور برابر با ۰/۳۲۵ و سطح معنی داری آن ۰/۵۶۹ که بیشتر از ۰/۰۵ است. بنابراین با اطمینان ۰/۹۵ فرض صفر آماری مبنی بر عدم وجود رابطه میان *Camv 35S Promotor* مثبت و منفی با سویا و غذای کودکان تایید می شود. بنابراین رابطه میان غذای کودکان و سویا با *Camv 35S Promotor* مثبت و منفی وجود ندارد و در غذای کودکان نسبت به سویا *Camv 35S Promotor* مثبت و منفی یکسان است.

بررسی رابطه معنی¬دار بین وجود یا عدم وجود *Lectin* در سویا و غذای کودکان

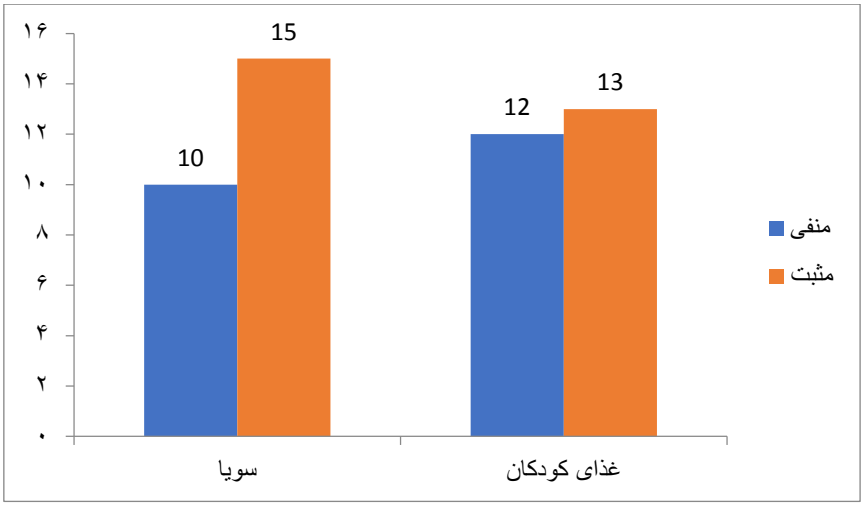
با توجه به جدول زیر ۸ درصد از موارد سویا دارای *Lectin* منفی و ۹۲/۰ درصد دارای *Lectin* مثبت هستند و برای غذای کودکان ۸۰ درصد *Lectin* مثبت و ۲۰/۰ درصد دارای *Lectin* منفی هستند.

جدول ۱- آمار توصیفی سویا و غذای کودکان بر اساس *Camv 35S Promotor* مثبت و منفی

	سویا	غذای کودکان	کل
منفی	10	12	22
	40.0%	48.0%	44.0%
مثبت	15	13	28
	60.0%	52.0%	56.0%
کل	25	25	50
	100.0%	100.0%	100.0%

جدول۲- آزمون کااسکور برای مقایسه *Camv 35S Promotor* مثبت و منفی برای سویا و غذای کودکان

	مقدار	درجه آزادی	سطح معنی داری
کااسکور پیرسون	0.325	1	0.569
تصحیح پیوستگی	0.081	1	0.776
نسبت درستنمایی	0.325	1	0.569
خط به خط	0.318	1	0.573
حجم نمونه	50		



دیاگرام ۸- نمودار میله ای سویا و غذای کودکان بر اساس *Camv 35S Promotor* مثبت و منفی

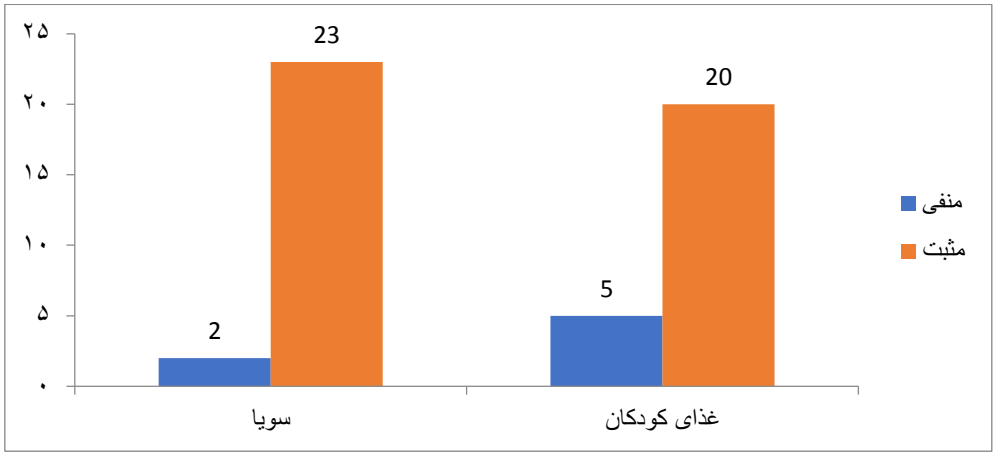
مقدار آماره کااسکور برابر با ۱/۴۹۵ و سطح معنی داری آن ۰/۲۲۱ که بیشتر از ۰/۰۵ است. بنابراین با اطمینان ۰/۹۵ فرض صفر آماری مبنی بر عدم وجود رابطه میان *Lectin* مثبت و منفی با سویا و غذای کودکان تایید می شود. بنابراین رابطه میان غذای کودکان و سویا با *Lectin* مثبت و منفی وجود ندارد و در غذای کودکان نسبت به سویا مثبت و منفی یکسان است.

جدول۲- آمار توصیفی سویا و غذای کودکان بر اساس *Lectin* مثبت و منفی

	سویا	غذای کودکان	کل
منفی	2	5	7
	8.0%	20.0%	14.0%
مثبت	23	20	43
	92.0%	80.0%	86.0%
کل	25	25	50
	100.0%	100.0%	100.0%

جدول ۳- آزمون کااسکور برای مقایسه *Lectin* مثبت و منفی برای سویا و غذای کودکان

	مقدار	درجه ازادی	سطح معنی داری
کااسکور پیرسون	1.495	1	0.221
تصحیح پیوستگی	0.664	1	0.415
نسبت درستنمایی	1.538	1	0.215
خط به خط	1.465	1	0.226
حجم نمونه	50		



دیاگرام ۹- نمودار میله ای سویا و غذای کودکان بر اساس *Lectin* مثبت و منفی

VAR00002 * VAR00001 Crosstabulation

			VAR00001		Total
			Soybean	Baby Food	
VAR00002	Negative	Count	10	12	22
		% within VAR00001	40.0%	48.0%	44.0%
	Positive	Count	15	13	28
		% within VAR00001	60.0%	52.0%	56.0%
Total		Count	25	25	50
		% within VAR00001	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.325[a]	1	.569		
Continuity Correction[b]	.081	1	.776		
Likelihood Ratio	.325	1	.569		
Fisher's Exact Test				.776	.388
Linear-by-Linear Association	.318	1	.573		
N of Valid Cases	50				
a. 0 cells (0.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 11.00.					
b. Computed only for a 2x2 table					

VAR00002 * VAR00001 Crosstabulation					
			VAR00001		Total
			Soybean	Baby Food	
VAR00002	Negative	Count	2	5	7
		% within VAR00001	8.0%	20.0%	14.0%
	Positive	Count	23	20	43
		% within VAR00001	92.0%	80.0%	86.0%
Total		Count	25	25	50
		% within VAR00001	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.495[a]	1	.221		
Continuity Correction[b]	.664	1	.415		
Likelihood Ratio	1.538	1	.215		
Fisher's Exact Test				.417	.209
Linear-by-Linear Association	1.465	1	.226		
N of Valid Cases	50				
a. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.50.					
b. Computed only for a 2x2 table					

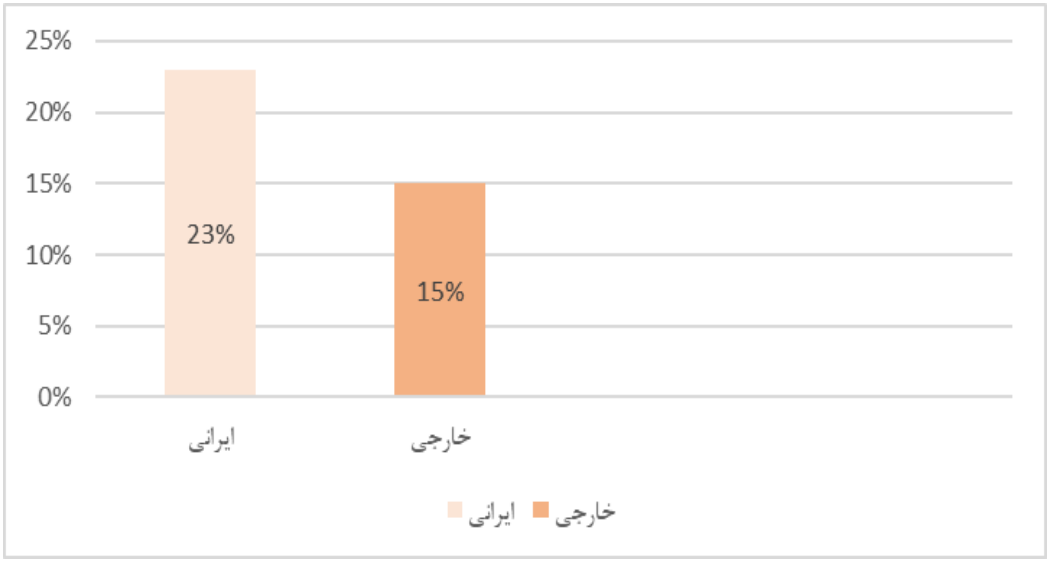
مقایسه تراریختگي غذای کودک در محصولات ایراني و خارجي

از ۲۵ نمونه غذای کودک استفاده شده در این تحقیق ۱۸ نمونه خارجی و ۷ نمونه ایرانی است. دیاگرام ۸ میزان تراریختگی در نمونه‌های غذای کودک خارجی و ایرانی را نشان می‌دهد.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که از ۲۵ نمونه سویا، ژن *Lectin* در ۲۳ نمونه یعنی ۹۲% از نمونه‌ها حضور دارد. از ۲۵ نمونه غذای کودک، در ۵ نمونه یعنی ۱۸% از نظر حضور ژن *Lectin* مثبت بود. به این معنی که در ۵ نمونه از سویا برای تهیه غذای کودک استفاده شده است. از ۲۵ نمونه سویا، ۱۵ نمونه یعنی ۶۳ % از نظر حضور شاخص تراریختگی *Camv 35S Promotor* مثبت بودند و جزء محصولات تراریخته طبقه‌بندی می‌شوند. همچنین از ۲۵ نمونه غذای کودک، تعداد ۱۳ نمونه یعنی ۵۲ % از نظر حضور ژن مثبت بودند و دارای تراریختگی می‌باشند. بررسی‌های انجام شده در مورد تراریختگی غذای کودک نشان داد که ۱۵% از نمونه‌های خارجی و ۲۳% از نمونه‌های ایرانی غذای کودک تراریخته بودند.

بحث

در سال ۲۰۱۷ آسیکیو اوغلی و همکاران در مطالعات خود به بررسی ژن گروه تحرک بالا (*HMG*) به عنوان ژن کنترل داخلی و ژن‌های *Camv 35S Promotor* و *tNOS* به عنوان ژن شاخص تراریختگی بر روی مواد غذایی حاوی ذرت که در ترکیه جمع‌آوری شده بود، پرداختند. نتیجه به دست آمده حاکی از این بود که از ۱۱ نمونه مورد بررسی همگی از نظر ژن کنترل داخلی *HMG* مثبت و از نظر ژن‌های *Camv 35S Promotor* و *tNOS* منفی بودند. به عبارتی هیچ اثری از تراریختگی در محصولات مورد مطالعه وجود



دیاگرام ۱۰- مقایسه حضور ژن *Camv 35S Promotor* در غذای کودک ایرانی و خارجی

نداشت [۱۷]. در تحقیق حاضر، ژن‌های *Camv 35S Promotor* و *Lectin* در غذای کودک و سویا بررسی شد. در ۲۵ نمونه سویا ژن کنترل داخلی *Lectin* در ۲۳ نمونه یعنی ۹۲% مثبت بود و ژن *Camv 35S Promotor* از ۲۵ نمونه، در ۱۵ نمونه یعنی ٦۳ % مثبت بود که نشان دهنده تراریخته بودن محصولات است.

الیوریا و همکاران در سال ۲۰۱٦ ارقام زراعی متداول و تراریخته ذرت را که به طور گسترده در برزیل کاشته شده بود مورد بررسی قرار دادند. با هدف قرار دادن ژن داخلی *HMG* ، نتایج مثبتی از همه نمونه‌های DNA حاصل شد. هفت نمونه یعنی ۵۳/۸% به عنوان دانه خشک متعارف و شش نمونه ٤٦/۲% به عنوان دانه خشک تراریخته طبقه‌بندی شدند. سه نمونه ۱۱/۱% از نمونه‌ها، گونه‌های متعارف ذرت شناخته شد و ۲٤ نمونه (۸۸/۹%) ذرت تراریخته بودند. این نتایج نشان دهنده‌ی مصرف بالای ذرت تراریخته در محصولات فراوری شده در جنوب برزیل می‌باشد [۱۸]. در تحقیق حاضر نتایج بررسی بر روی نمونه‌های سویا با ژن کنترل داخلی *Lectin* نشان داد که از ۲۵ نمونه، ۲۳ نمونه یعنی ۹۲% دارای ژن کنترل داخلی *Lectin* هستند.

ویدال و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مورد فقدان اطلاعات ایمنی و اثرات غذاهای اصلاح شده ژنتیکی که نگرانی عمده در سراسر جهان است مقاله‌ای را ارائه دادند. برای این کار آن‌ها تفاوت‌های پروتئومیک بین دو نوع محصول ذرت را بررسی کردند. محصولاتی که دارای ژن‌های تغییر یافته *MON810* و *Cry1Ab* باشند در برابر حشرات مقاوم هستند. برای این کار از تکنیک 2-D DIGEاستفاده شد که ۹۹ جهش نقطه‌ای متفاوت بیان شده را روی ژل 2-D DIGE نشان داد و نمونه‌ها با استفاده از طیف سنجی جرمی (nESI-QTOF MS/MS) شناسایی شدند. با وجود اختلافی که بین نمونه‌ها دیده شد هیچ پروتئین سمی یا آلرژیک در محصولات تراریخته پیدا نشد. تحقیق در مورد عملکرد کیفی در محصولات مختلف ضرورت مهمی برای مصرف صنعتی مصرف‌کنندگان است [۱۹] در تحقیق حاضر بررسی به کمک DNA و با انتخاب دو ژن شاخص تراریختگی *Lectin* و *Camv 35S Promotor* انجام شد. هدف این تحقیق تنها شناسایی محصولات تراریخته بدون برچسب بود.

در سال ۲۰۰٦، سیرادزکی و همکاران برای بررسی ارگانیسم‌های اصلاح شده ژنتیکی در خوراک دام، از روش‌های کمی و کیفی از جمله روش‌های PCR و Real Time PCR استفاده کردند. آن‌ها نمونه‌هایی را که در آن ژن مرجع، *Camv 35S Promotor*، *NOS* و یا هر گونه ترانس ژن یافت شد، را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها از این بررسی نتیجه گرفتند که از کل مقدار خوراک مصرف شده، تنها ۸% از محصولات ذرت تراریخته هستند [۲۰]. همانند این تحقیق از روش PCR برای تعیین ارگانیسم‌های اصلاح شده ژنتیکی سویا صورت گرفت. از ۲۵ نمونه سویا، ۱۵ نمونه یعنی ٦۳% دارای ژن شاخص تراریختگی *Camv 35S Promotor* بودند.

نتیجه‌گیری

از بین ۲۵ نمونه سویا ۲۳ نمونه (۹۲%) از نظر حضور ژن داخلی *Lectin* و ۱۵ نمونه (۶۳%) دارای ژن *Camv 35S Promoter*مثبت بودند. از ۲۵ نمونه غذای کودک ۲۰ نمونه (۸۳%) از نظر حضور ژن داخلی *Lectin* و ۱۳ نمونه (۵۲%) از نظر ژن شاخص تراریختگی *Camv 35S Promoter* مثبت بودند. در بین محصولاتی که حاوی ژن تراریختگی *Camv 35S Promoter*بودند، هیچ‌یک دارای برچسب تراریختگی نبودند. به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده این است که میزان تراریختگی سویا و غذاهای کودک مورد بررسی در بازار مصرف ایران بسیار زیاد است. لازم به ذکر است که جهت نظارت و کنترل ایمنی و سلامت محصولات کشاورزی نیاز به آموزش و فرهنگ‌سازی، ایجاد مقررات، تجهیز شدن به فنّاوری تشخیص GMOها و در نهایت اجرای قانون برچسب گذاری، امری لازم و ضروری است. امید است با انجام تدابیر لازم، شاهد اجرای هر چه سریع‌تر این قانون در کشور عزیزمان باشیم.

منابع

[1] Holst-Jensen A, Bertheau Y, De Loose M, Grohmann L, Hamels S, Hougs L, et al. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived. Biotechnol Adv. 2012; 30(6):1318-35.

[2] Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, et al. Golden rice: Introducing the β-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. The Journal of nutrition 2002; 132(3): 506-510.

[3] Wilkinson MJ, Ford C, Maxted N, Ford-lloyd B, Kell S, Iriondo JM, et al. Estimating the potential for ecological harm from gene flow to crop wild relatives. Collection of Biosafety Reviews 2007; 3:42-63.

[4] Salehi-Jozani Gh and Soleymani E. Reviewing the status of laws and regulations in the field of transgenic products and biosafety of the country. Deputy of Infrastructure Research and Production Affairs. 2018 Subject code: 250.

[5] *Cantelmo NF, Von Pinho EV, Von Pinho RG, Von Pinho IV, Nascimento MS. Detection of Transgenic Events in Maize Using Immunochromatographic Strip Test and Conventional PCR. Ciência e Agrotecnologia 2007; 37 (5). 404-409.*

[6] Ovesna J, Kucera L, Hodek J, Demnerova K. Reliability of PCR based Screening for Identification and Quantification of GMOs. Czech Journal of Food Sciences 2010; 28: 133-138.

[7] FAO. 2011. Social protection for the poor and vulnerable. Available at http://faolex.fao.org/docs/pdf/cam152936.pdf

[8] Zhang L, Cao Y, Liu X, Wu G, Wu Y, Lu C. In-depth analysis of the endogenous reference genes used in the quantitative PCR detection systems for rice. European Food Research Technology 2012; 234: 981–993.

[9] Elsanhoty RM, Al-Turki AI, Ramadan MF. Prevalence of Genetically Modified Rice, Maize, and Soy in Saudi Food Products. Appl Bioche Biotechnol 2013; 171(4): 883–899.

[10] Ghareyazie B. Nutritional and hygienic aspects of foods derived from transgenic crops. 9th Iranian Nutrition Congress. 2006 4-7 Sep. Tabriz University

[11] Sheikholeslam R, Abdollahi Z, Haghighi FN. Managing nutritional programs in developing countries. Eastern Mediterranean Health journal 2004; 10(6): 737-746.

[12] Hockenberry M, Wilson D. 2014. Wong' s Nursing care of infant and children. ST Louis: Mosby co, USA.

[13] Brudner M, Karpel M, Lear C, Chen L, Yantosca L, Michael S, et al. Lectin-Dependent Enhancement of Ebola Virus Infection via Soluble and Transmembrane C-type Lectin Receptors. PLoS ONE 2013; 8(4): e60838.

[14] Chan CKF, Ransom RC, Longaker MT. Lectins bring benefits to bones. Elife 2016; 13(5): e22926.

[15] Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain, Food Chem. Toxicol 2004; 42 (7):1157–1180.

[16] Tripathi, L. Techniques for detecting genetically modified crops and products. African Journal of Biotechnology 2005; 4(13): 1472-1479.

[17] Asicioglu M, Yalçınkaya B, Akgoz M. Measurement of genetically modified (GM) genes in different corn products. Journal of chemical metrology 2017; 11(2): 55-60.

[18] Oliveira CAM, Kommers CM, Lehmann FKM, Fonseca ASK, Ikuta N, Lunge VR. Detection of genetically modified maize in processed products, dry grains, and corn ears intended for fresh consumption in South Brazil. Genetics and Molecular Research 2016; 15 (4): gmr15048818.

[19] Vidal N, Barbosa H, Jacob S, Arruda M. Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (Zea mays) flours commercialized in Brazil, focusing on

proteomic analyses. Food Chemistry 2015; 180: 288-294.
[20] Sieradzki Z, Walczak M, Krzysztof K. Occurrence of genetically modified maize and soybean in animal feeding stuffs. Bulletin Veterinary Institute Pulawy 2006; 50(4): 567-570.

Detection of GMO soybean by *Camv 35S Promoter* and *Lectin* genes in baby food and soybean samples

Kavousi M.*, Salmani Zakaria F.

Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* (Corresponding author): mkavoosi@iauet.ac.ir

Received: December 2021 Accepted: June.2022

Abstract

In most countries today, the area under cultivation of transgenic crops has increased due to the increasing population. In Iran, there is no system for labeling transgenic products. Although baby food is one of the most important needs for growth and health of the baby, it is no exception. Therefore, in this study, we try to identify the transgenic products by polymerase chain reaction (PCR) by examining the internal control gene *Lectin* and *Camv 35S Promoter* gene transcriptome. For this purpose, 25 soybean samples were collected from shops and Twenty-five samples of baby food were collected from pharmacies in Tehran. Samples were extracted with TLAB brand tissue extraction kit. After analyzing the concentration and quality of DNA extracted by the nanodrop machine, the samples were screened by PCR. 25 soybean samples were analyzed for 23 of the total samples (%92) for the presence of *Lectin* internal gene and 15 samples from all samples (%63) had *Camv 35S Promoter* gene. Of the 25 samples of baby food, 20 (%83) were positive for the presence of the inner gene, *Lectin* positive, and 13 (%52) were positive for the *Camv 35S Promoter* gene transformation index. None of the products containing the *Camv 35S Promoter gene*, indicating that the product was transgenic, were not labeled. It can be concluded that the rate of transgenicity in the samples tested is significantly higher. In baby foods, the transgenicity rate of the *Camv 35S Promoter* gene was higher in Iranian samples than in foreign samples. In soybean samples, the *Camv 35S Promoter* gene was present in Iranian products, while none of the samples tested had transgenic label.

Keywords: Transgenic**,** Labeling**,** Baby food**,** *Lectin* gene, *Camv 35S Promoter* gene.