**مجله ایمنی زیستی**
**دوره ۸، شماره ۲، زمستان ۱۳۹٤**

# بررسی وجود ارقام تراریخته در دانه‌های کلزای کشت شده در ایران و ارزیابی اسیدهای چرب آن

**زهرا پیراوی ونک[۱] – فهیم‌دخت مختاری[۲*] – فرزانه انصاری[۳]**
**۱–دانشیار، ۲– مربی پژوهشی، ۳– استادیار پژوهشگاه استاندارد– پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، تهران، ایران**

**mfahimdokht@gmail.com**

## چکیده

روغن کلزا، به دلیل وجود اسیدهای چرب امگا ۳، از کیفیت تغذیه‌ای بالایی برخوردار است. با تولید ارقام جدید و کاهش مواد مضر، چندی است که کشت آن در کشور مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به این‌که درصد بالایی از ارقام کلزا در سطح جهان تراریخته است، در این تحقیق، ۷ نمونه دانه‌ی روغنی کلزا جمع‌آوری شده از واحدهای روغن‌کشی، از نظر احتمال تراریخته بودن با استفاده از سه توالی محتمل در ژن‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفتند و پروفایل اسیدهای چرب این نمونه‌ها بررسی شد. استخراج DNA با روش CTAB انجام و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از PCR با توالی هدف tRNA کلروپلاست گیاهی تایید شد. وجود کلزای تراریخته با روش غربالگری بوسیله سه توالی هدف معمول در ارقام تراریخته کلزا، ترمیناتورnos، پروموتر CaMV35S و مارکر ژن *nptII*، ردیابی شد. نتایج نشان داد که توالی‌های nos ترمیناتور و CaMV 35S در هیچ‌یک از نمونه‌ها وجود نداشته، در حالی‌که در PCR با پرایمر مربوط به توالی هدف *nptII* در چهار نمونه، باند 215bp مربوط به توالی هدف مشاهده شد. همچنین تفاوت مشاهده شده در آنالیز میزان اسیدهای چرب در نمونه‌ها، صرف‌نظر از تراریخته بودن یا نبودن آن‌ها، می‌تواند تنها ناشی از تفاوت در خصوصیات ارقام مختلف کلزا باشد.

**کلمات کلیدی**: کلزا، کانولا، تراریخته، اسید چرب، PCR

## مقدمه

کلزا یا Rapeseed با نام علمی *Brassica napus*، از تیره شب‌بو یا چلیپائیان، یک گونه آمفی‌دیپلوئید حاصل از تلاقی طبیعی فرم‌هایی از گونه کلم (*Brassica olearacea*)، با شلغم (*Brassica campestris*)، گیاهی است علفی با دوره رشد یک‌ساله که به دو تیپ بهاره و پاییزه تقسیم می‌شود. علاوه بر گونه *B. napus* که کلزا به‌معنی اخص است، دانه گونه‌های شلغم روغنی (*B. campestris*)، خردل هندی (*B. juncea*)، خردل سیاه (*B. nigra*) و خردل حبشی (*B. carinata*) در بازارهای جهانی تحت نام کلزا شناخته می‌شوند. دانه کلزا (کانولا) دارای ٤۰ تا ٤۸ درصد روغن در دانه و ۳۸ تا ٤۵ درصد پروتئین در کنجاله بوده و میزان رطوبت آن حدود ۵ درصد است (۵ و ۲۳). نسبت اسیدلینولئیک به اسیدلینولنیک در روغن کلزا تقریبا ۱:۲ میباشد که برای مصرف انسان مناسب است (۱۸).

کلزا پس از سویا و پالم مقام سوم را در تامین روغن نباتی جهان به خود اختصاص داده است و در حدود ۱٤/۷ درصد کل تولید روغن نباتی جهان را تامین می‌کند. این گیاه در برابر خشکی و سرما مقاوم بوده و به دلیل سازگاری، دامنه کشت وسیعی دارد (۵).

دانه‌های شلغم روغنی (Rapeseed) بر حسب میزان اسید اروسیک به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند. دانه‌های دارای مقادیر بالای اسید اروسیک (High erucic acid Rapeseed: HEAR) که مصرف خوراکی ندارند و گروه اصلاح شده با اسید اروسیک پایین (Low erucic acid Rapeseed: LEAR) که برای استخراج روغن خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند که کلزا نامیده می‌شوند. گلوکوزینولات ماده‌ای است که در دانه‌های کلزا وجود داشته و باعث طعم تند و بوی گزنده شده و فیبر باعث اُفت کیفیت کنجاله می‌شود. در ارقام جدید اصلاح شده کلزا، میزان گلوکوزینولات و مقدار فیبر نیز کاهش یافته است. ترتیب تکامل اصلاح در این گیاه روغنی به عنوان ارقام صفر (۰) با میزان اسید اروسیک کاهش یافته به‌حد کم، دو صفر (۰۰) با میزان اسید اروسیک و گلوکوزینولات کاهش یافته و سه صفر (۰۰۰) که در آن‌ها هر سه ماده نامطلوب اسید اروسیک، گلوکوزینولات و فیبر در کمترین مقدار خود هستند و میزان اسید چرب اشباع آن حدود ۷ تا ۹٪، اسید چرب امگا ۹ حدود ٦۰٪، اسید چرب امگا ٦ حدود ۲۰٪ و میزان اسید چرب امگا ۳ در آن حدود ۷ تا ۱۰٪ است (۵، ۱۸ و ۲۳). کلزای اصلاح شده، یکی از سلامت‌ترین روغن‌های خوراکی موجود در بازار است که با وجود ٦۰ درصد اولئیک اسید (C18:1)، ۲۰ درصد لینولئیک اسید (C18:2) و ۱۰ درصد آلفا-لینولئیک اسید (C18:3) و با نسبت ایده‌آل (۲:۱) امگا-٦ به امگا-۳ منبع خوبی از آلفا- لینولئیک اسید است (۱٤).

ترکیب اسیدهای چرب در روغن دانه کلزا (با اسید اروسیک پایین مطابق با استاندارد بین‌المللی کدکس) در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۸).

**جدول ۱**- ترکیب اسیدهای چرب در روغن دانه کلزا (با اسید اروسیک پایین)

| نوع روغن | C16:0 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 | C20:1 | C22:1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **کلزا** | ۲/۷-۵ | ۰/۸-۳ | ۵۱-۷۰ | ۱۵-۳۰ | ۵-۱٤ | ۰/۱-٤/۳ | ۰-۲ |

کلزای تراریخته از سال ۱۹۹٦، در کانادا زیر کشت رفت و در سال ۲۰۱٤، سطح زیر کشت کلزای تراریخته در کانادا به ۸ میلیون هکتار رسید، که معادل تقریبا ۹۵٪ محصول کلزا در این کشور است. ارقام مختلفی از کلزای تراریخته به منظور استفاده در غذا و خوراک دام تولید و تجاری شده است که همگی آن‌ها دارای صفت مقاومت به علف‌کش هستند (۱۵، ۲۳ و ۲۵). در حال حاضر ٤۸ رخداد کلزای تراریخته در بانک اطلاعاتی BCH ثبت شده که ۲۹ رخداد دارای حداقل صفت مقاومت به علف‌کش، ۳ رخداد صفت مقاومت به بیماری‌ها و آفات بوده و بقیه صفاتی مثل تغییرات فیزیولوژیک و افزایش کیفیت و بازدهی دارند (۱۵)

از زمان ورود کلزا، سابقه کشت و سطح زیر کشت آن در ایران اطلاعی در دسترس نیست. طی سال‌های اخیر به عنوان یک گیاه مناسب روغنی برای کشت در

کشور مورد توجه قرار گرفته است، ضمن اینکه حجم گسترده‌ای از واردات را بخود اختصاص داده است. با توجه به این‌که کلزای کشت شده در اکثر مناطق جهان تراریخته است، احتمال ورود ارقام تراریخته چه به منظور کشت و کار و چه برای استخراج روغن بسیار محتمل است. در ایران در دو دهه گذشته آزمایش‌های به نژادی و به زراعی متعدد و متنوعی بر روی گیاه کلزا صورت گرفته و منجر به معرفی چهار رقم کلزای اصلاح شده با نام‌های زرگل، طلایه، استقلال و ساری گل شده است (۵).

علاوه بر این، مطالعات متعددی نیز برای تولید ارقام تراریخته کلزا دارای صفات مقاومت به آفات و کاهش اسید اروسیک در ایران انجام شده، که منجر به ثبت یک رقم کلزای تراریخته واجد صفت تحمل به علف‌کش گلایفوسیت شده است، که هنوز رهاسازی نشده است (۸). برخی از این مطالعات شامل موارد زیر می‌باشد:

تراریختی گیاه کلزا با ساختار ترکیبی حاوی ژن جهش یافته EPSPS و ترادف نشانه کلروپلاستی به منظور افزایش تحمل به علف‌کش گلایفوسیت (۱۰)، انتقال ژن cry1Ab به کلزا به منظور مقاومت به آفات پروانه‌ای (۹) تراریزش کلزا با استفاده از ژن‌های Fld به منظور افزایش تحمل به شوری (۱۲) و جداسازی و تهیه ساختار Antisense ژن fae و انتقال آن به گیاه کلزا (*B. napus*) با هدف جلوگیری از سنتز اسید اروسیک به‌وسیله خاموش نمودن ژن Fatty Acid Elongase تولیدکننده آنزیم کتواسیل کوآ-سنتاز که آنزیم کلیدی در بیوسنتز اسید اروسیک می‌باشد و تبدیل اسید چرب C18 به C20 و C22 را عهده‌دار است، انجام شده است (۷).

همچنین مطالعه دیگری با هدف استفاده از گیاه کلزا به‌عنوان بیان کننده اینترفرون گاما در دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است (٦).

تشخیص محصولات تراریخته (GMO)، از طریق روش‌هایی برپایه DNA، RNA، پروتئین و حتی متابولیت‌ها انجام می‌شود. روش‌های متعددی برای غربالگری محصولات تراریخته با هدف افزایش قابلیت اعتماد و حساسیت مولکولی ابداع شده است. محصولات تراریخته را می‌توان به‌وسیله ردیابی قطعه‌ای از DNA نوترکیب (مانند ژن، نواحی پیشبر یا خاتمه دهنده) یا به‌وسیله خود پروتئین تغییر یافته تولید شده توسط DNA نوترکیب ردیابی و شناسایی نمود. روش‌های مبتنی بر DNA شامل PCR کیفی و کمّی، روش‌های هیبریدیزاسیون، میکرواری و بیوسنسورها هستند. درحال حاضر، روش PCR برای تشخیص و ردیابی و روش‌های PCR هم‌زمان (Real time PCR) برای تعیین مقدار ارگانیسم‌های تراریخته، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای نقاط مختلف ژن نوترکیب، به عنوان معمول‌ترین و سازگارترین روش‌های صحه‌گذاری شده‌ای که در همه آزمایشگاه‌ها قابل انجام است، استفاده می‌شود (۱۵، ۱۷ و ۲۲).

روش‌های هیبریدیزاسیون DNA شامل ایموبیلیزاسیون پروب بر روی سطوح جامد و سپس هیبریدایزاسیون با DNA هدف هستند. دقت این روش‌ها اساسا متغیر بوده و به نوع سطح، شرایط لیبل کردن پروب و تغییراتی مثل استفاده از اسیدهای نوکلئیک پپتیدی (PNA) بستگی دارد. بیوسنسورها در حال حاضر از پیشرفته‌ترین تکنیک‌های ردیابی و با حساسیت بالا محسوب می‌شوند، که می‌توان گفت در غربالگری‌ها و

شناسایی‌های معمول مورد نیاز نیستند (۲۲).

راهبرد کلی برای غربالگری تراریخته‌ها، بر ردیابی توالی‌های هدف استوار است. توالی‌های هدف، عموما عوامل ژنتیکی هستند که در اکثر گیاهان تراریخته وجود دارند. این توالی‌ها عمدتا شامل پیشبر 35S ویروس موزاییک گل کلم و یک ناحیه خاتمه دهنده نوپالین سنتاز (NOS) گرفته شده از *آگروباکتریوم تومفاسیانس* هستند، که در اغلب گیاهانی که مهندسی ژنتیک شده‌اند، وجود دارند (۲۹). بنابراین، گرچه یک PCR ساده برای تشخیص35S/NOS ممکن است برای ردیابی همه محصولات تراریخته کافی نباشد، ولی با استفاده از آن می‌توان درصد بالایی از محصولات تراریخته را ردیابی نمود. به منظور بالا بردن احتمال ردیابی، می‌توان از سایر توالی‌هایی که در گیاهان مهندسی ژنتیک شده بکار می‌رود، نیز استفاده کرد. یکی از این موارد، توالی‌های مربوط به ژن‌های مارکر، مثل ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک است (۲٤).

در این مطالعه، وجود توالی‌های پیش‌بر، خاتمه دهنده و مارکر که در استاندارد ملی ایران ۹٦۱۷ توصیه شده است و براساس داده‌های موجود در بانک اطلاعاتی معتبر BCH در ارقام کلزای تراریخته وجود دارند، با استفاده از روش PCR شرح داده شده در استاندارد ملی ایران ۹٦۱۷ بررسی شد (۱).

در این راستا با توجه به نگرانی‌های موجود، مبنی بر این که ژن نوترکیب می‌تواند بر نوع و ترکیب لیپیدهای دانه‌های روغنی تاثیرگذار باشد، پروفایل اسیدهای چرب روغن‌های حاصل از این نمونه‌ها نیز با استفاده از GC بررسی شد (۳ و ٤).

**مواد و روش‌ها**

روش‌های استخراج DNA، مطابق با استاندارد ملی ایران ۱۰۷٦۳ و روش‌ها و مواد مورد استفاده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مطابق با استاندارد ملی ایران ۹٦۱۷ بودند (۳). تعیین پروفایل اسیدهای چرب با استفاده از GC و براساس استانداردهای ۱- ۱۳۱۲٦ و ۲- ۱۳۱۲٦ انجام شد (۳ و ٤).

**نمونه‌ها**

هفت واریته دانه روغنی کلزا مورد استفاده در صنایع روغن غذایی، شامل ساریگل، لیکورد، هایولا ٤۰۱، هایولا ٥، RGS، زرفام و هیبرید هایولا ٦۰، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع در هاون، تا پودر شدن خرد شدند که برای استخراج مورد استفاده قرار گرفت.

**استخراج DNA**

از روش CTAB براساس استاندارد ملی ایران ۱۰۷٦۳ استفاده شد. براساس مطالعات انجام شده، بهترین روش استخراج DNA از گیاهان زراعی و دانه‌های روغنی، روش CTAB است (۲۱). نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع در هاون تا پودر شدن خرد شدند، سپس از هر نمونه دو قسمت ۲٥۰ میکرولیتری برای انجام مراحل استخراج برداشته شد و به آن ٥/۱ میلی‌لیتر بافر استخراج، ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K، ۱۰ میکرولیتر آلفا آمیلاز و ۱۰ میکرولیتر RNase اضافه شد و پس از گرمخانه‌گذاری به مدت یک شب در بن ماری ٦٥°C و حذف پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها با کلروفرم و رسوب DNA با بافر حاوی CTAB و حل کردن رسوب DNA در محلول کلرید سدیم و حذف نمک‌ها و آلاینده‌ها طی مراحل متعدد شستشو با

کلروفرم، DNA با ایزوپروپانل رسوب داده و با الکل شسته شده و در بافر TE حل شد (۲).

میزان DNA موجود در بافر، با روش اسپکتروسکوپی، بوسیله دستگاه نانودراپ، در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. به منظور تعیین کیفیت DNA استخراج شده، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد (۲). به منظور بررسی قابلیت DNA برای PCR های بعدی، از PCR با پرایمر یک قطعه ۵۰۰ تا ٦۰۰ جفت بازی که در ژن tRNA کلروپلاست وجود دارد، استفاده شد. ردیابی قطعه‌ای با اندازه ۵۰۰ جفت باز نشان‌دهنده این است که محلول DNA نمونه، دارای DNA قابل تکثیری با منشا گیاهی بوده است (۱).

## غربالگری

ردیابی GMOها بوسیله روش غربالگری و انجام PCR با استفاده از پرایمرهای توصیه شده در استاندارد ملی ایران ۹٦۱۷ انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده شامل: پیش‌برCaMV 35S، NOS ترمیناتور و نشانگر ژن نئومایسین فسفوترانسفراز (npt II) بودند. توالی پرایمرهای مورد استفاده طبق جدول ۲ بود (۱).

**جدول ۲**- آغازگرهای مورد استفاده در PCR

| قطعه حاصل | توالی | آغازگر |
|---|---|---|
| برای پیشبر CaMV 35S | 5′-gCTCCTACAAATgCCATCA-3′ | 35s-1 |
| ۱۹۵ جفت باز | 5′-gATAgTgggATTgTgCgTCA-3′ | 35s-2 |
| برای خاتمه‌دهنده NOS | 5′-gCATgACgTTATTTATgAgATggg-3′ | HA-nos118f |
| ۱۱۸ جفت باز | 5′-gACACCgCgCgCgATAATTTATCC-3′ | HA-nos118r |
| برایnpt II | 5′-CTCACCTTgCTCCTgCCg -3′ | APH2 short |
| ۲۱۵ جفت باز | 5′-CgCCTTgAgCCTggCgAACAg -3′ | APH2 reverse |

ردیابی قطعاتی با اندازه ۱۹۵ جفت باز، نشان‌دهنده این است که محلول DNA نمونه، دارای DNA قابل تکثیری بوده است که منشا آن پیشبر CaMV است (۱).

ردیابی قطعاتی با اندازه ۱۱۸ جفت باز نشان‌دهنده این است که محلول DNA نمونه، دارای DNA قابل تکثیری بوده است که منشا آن خاتمه‌دهنده NOS بوده است (۱).

ردیابی قطعاتی با اندازه ۲۱۵ جفت باز نشان‌دهنده این است که محلول DNA نمونه، دارای DNA قابل تکثیری بوده است که منشا آن npt II بوده است (۱).

**کنترل‌های مثبت و منفی:**

برای کنترل مثبت از مواد مرجع تایید شده (CRM) تهیه شده از انستیتو مواد مرجع (IRRM گیل بلژیک) استفاده شد.

کنترل‌های مثبت مورد استفاده در این مطالعه، IRMM-410c حاوی ۱۰ g/Kg سویای تراریخته GTS 40-3-2، برای تایید توالی‌های حاصل از پیشبر CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS و همچنین IRMM-416c حاوی ۸/۹ g/Kg ذرت تراریخته MON 863 برای ردیابی

توالی مربوط به ژن nptII بود (۱).

برای تایید کیفیت DNA استخراجی در PCR از پرایمر tRNA کلروپلاست استفاده شد (۱).

### آزمون ترکیب اسیدهای چرب

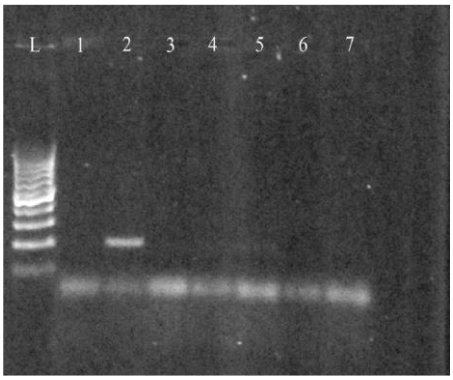
دو گرم از دانه‌های روغنی کلزا را خرد کرده، مقدار ٤-٥ سی‌سی هگزان نرمال به نمونه هموژن شده افزوده و به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد، تا چربی دانه‌ها استخراج شود. سپس هگزان به لوله دیگری منتقل شد و مقدار ۲ سی‌سی پتاس متانولی ۲ مولار به آن اضافه و به مدت یک دقیقه هم زده شد. از فاز رویی، به‌عنوان آزمونه و برای تزریق به دستگاه GC استفاده شد. ستون مورد استفاده، موئینه از جنس سیلیکا یا شیشه بود. برای آماده‌سازی متیل استرهای اسید چرب و شناسایی ترکیب اسیدهای چرب روغن کلزا، از استانداردهای ملی شماره ۲-۱۳۱۲٦ و ٤-۱۳۱۲٦ استفاده شد (۳ و ٤).

سپس یک میکرولیتر از فاز بالا (هگزان) به دستگاه گاز کروماتوگراف تزریق شد. آنالیز گاز کروماتوگرافی متیل استرهای اسید چرب، توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل یانگلین ٦٥٠٠ انجام شد. از ستون مویین Varian-CP Sil 88 با مشخصات طول ٦٠ متر، قطر ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. در نهایت نمونه‌ها در شرایط دمای ستون ۱۷۵ درجه سلسیوس، دمای انژکتور ۲۸۰ درجه سلسیوس، دمای دتکتور ۳۰۰ درجه سلسیوس و گاز حامل هیدروژن تجزیه شدند (۳ و ٤).

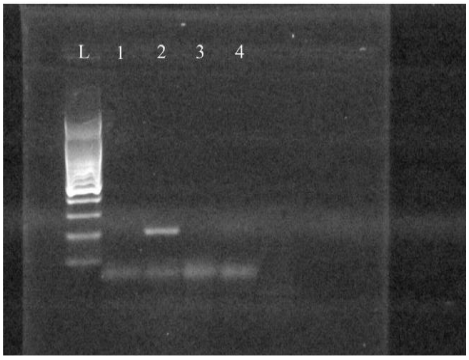
## نتایج

### ۱- نتایج حاصل از PCR با پرایمرهای غربالگری مورد استفاده:

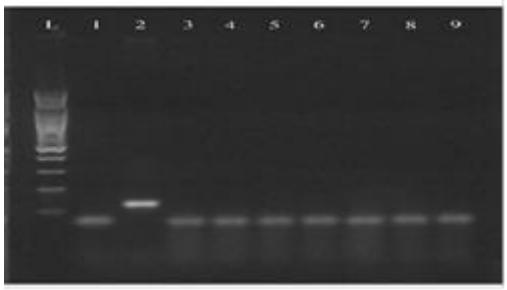
نتایج حاصل از PCR با پرایمرهای شرح داده شده در جدول ۲ در شکل‌های ۱ تا ٤ و جدول ۳ نشان داده شده است.



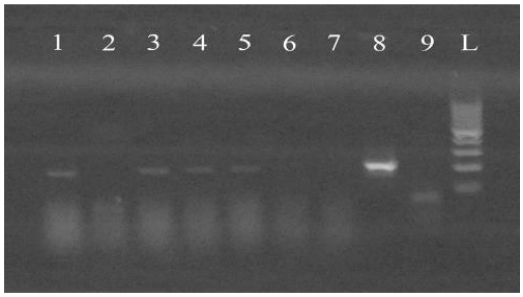

**شکل ۱**- باندهای حاصل از PCR پنج نمونه کلزا با پرایمر پیشبر CaMV 35S. به ترتیب از چپ: L= مارکر bp ۱۰۰، ۱= کنترل منفی (باکتری E.coli)، ۲= کنترل مثبت (ERM 410)، ۳= نمونه کلزا ساریگل، ۴= نمونه کلزا لیکورد، ۵= نمونه کلزا هایولا ۴۰۱، ۶= نمونه کلزا هایولا ۵۰، ۷= نمونه کلزا RGS




**شکل ۲**- باندهای حاصل از PCR دو نمونه کلزا با پرایمر پیشبر CaMV 35S. به ترتیب از چپ: L= مارکر bp ۱۰۰، ۱= کنترل منفی (باکتری E.coli)، ۲= کنترل مثبت (ERM 410)، ۳= نمونه کلزا زرفام، ۴= نمونه کلزا هیبرید هایولا ۶۰




**شکل ۳**- باندهای حاصل از PCR نمونه‌های کلزا با پرایمر خاتمه‌دهنده NO. به ترتیب از چپ: L= مارکر bp ۱۰۰، ۱= کنترل منفی (باکتری E.coli)، ۲= کنترل مثبت (ERM 410)، ۳= نمونه کلزا ساریگل، ۴= نمونه کلزا لیکورد، ۵= نمونه کلزا هایولا ۴۰۱، ۶= نمونه کلزا هایولا ۵۰، ۷= نمونه کلزا RGS، ۸= نمونه کلزا زرفام، ۹= نمونه کلزا هیبرید هایولا ۶۰




**شکل ۴**- باندهای حاصل از PCR نمونه‌های کلزا با پرایمر npt II:. به ترتیب از چپ: ۱= نمونه کلزا ساریگل، ۲= نمونه کلزا لیکورد، ۳= نمونه کلزا هایولا ۴۰۱، ۴= نمونه کلزا هایولا ۵۰، ۵= نمونه کلزا RGS، ۶= نمونه کلزا زرفام، ۷= نمونه کلزا هیبرید هایولا ۶۰، ۸= کنترل مثبت ( ERM 416) ، ۹= کنترل منفی (باکتری E.coli)، L= مارکر bp ۱۰۰.

**جدول ۳**- نتایج حاصل از ردیابی توالی‌های مربوط به کلروپلاست و غربالگری ژن‌های تراریخته

| توالی هدف | ارقام کلزای مورد آزمون | | | | | | | ماده مرجع | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ساریگل | لیکورد | هایولا ٤٠١ | هایولا ٥٠ | RGS | زرفام | هایولا ٦٠ | 410c[1] | 416c[2] |
| **CaMV 35s** | − | − | − | − | − | − | − | + | + |
| **Nos terminator** | − | − | − | − | − | − | − | + | − |
| **npt II** | + | − | + | + | + | − | − | − | + |

[1]ERM-BF410c: Roundup Ready™ Soya bean (GTS 40-3-2), Certified value mass fraction (10 g/kg)
[2]ERM-BF416c: MON 863 maize, Certified value mass fraction (9.8 g/kg)

**بر اساس نتایج جدول ۳:**

-توالی مربوط به پروموتر CaMV در کنترل‌های مثبت، یعنی ماده مرجع ٤١٠ (سویای رانداپ GTS 40-3-2) با قابلیت ردیابی ۱۰ g/Kg و ماده مرجع ٤١٦ (ذرت MON 863) با قابلیت ردیابی ۹/۸ g/Kg مشاهده شد، ولی در هیچ‌یک از نمونه‌ها مشاهده نشد.

-توالی مربوط به ترمیناتور NOS در کنترل‌های مثبت، یعنی ماده مرجع ٤١٠ (سویای رانداپ GTS 40-3-2) با قابلیت ردیابی ۱۰ g/Kg مشاهده شد، ولی در هیچ‌یک از نمونه‌ها مشاهده نشد.

-توالی مربوط به ژن نئومایسین فسفوترانسفراز موجود در ماده مرجع ٤١٦ (ذرت MON 863) با قابلیت ردیابی ۹/۸ g/Kg مشاهده شد. همچنین این توالی هدف در نمونه‌های ساریگل، هایولا ٤٠١، هایولا ٥٠ و RGS نیز مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده تراریخته بودن این ارقام باشد.

**۲- نتایج حاصل از بررسی پروفایل اسیدهای چرب**

نتایج حاصل از میزان اسیدهای چرب با استفاده از کروماتوگرافی گازی در جدول ٤ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، تنها رقم RGS دارای اسید لوریک (C12:0)، اما به میزان بسیار کم ۰/۰۳٪ می‌باشد. اسید میریستیک (C14:0) در هایولا ٦٠ و زرفام دارای بیشترین مقدار بود، در حالی‌که در نمونه هایولا RGS به میزان بسیار کم مشاهده شد و در هایولا ٥٠ وجود نداشت. هایولا ٦٠ دارای بیشترین مقدار اسید پالمیتیک (C16:0) بود.

اسید مارگاریک (C17:0) تنها در سه نمونه RGS، زرفام و هایولا ٤٠١ مشاهده شد. دو نمونه RGS و هایولا ٤٠١ براساس نتایج ذکر شده، تراریخته هستند. در حالی‌که نشانه‌ای مبنی بر تراریخته بودن نمونه زرفام وجود نداشت. بنابراین ارتباط وجود این اسید چرب با تراریختی باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. در بین اسیدهای چرب بلند زنجیر، به ترتیب مقدار، پالمتیک، استئاریک و آراشیدیک در تمام نمونه‌ها موجود بودند.

بر اساس نتایج بدست آمده، بیشترین مقدار اسید چرب غیراشباع به اسید اولئیک اختصاص یافته و بعد از آن اسید لینولئیک و اسید لینولنیک قرار می‌گیرند. همچنین با توجه به اثرات مضر اسید اروسیک

(C22:1)، مقدار آن در نمونه‌های کلزا کمتر از ۲ درصد بوده که با استاندارد بین‌المللی کدکس مربوط به روغن‌های گیاهی مطابقت دارد (۱۸). نتایج حاصل از بررسی نشان داد که نوع و میزان اسیدهای چرب تماما در محدوده استاندارد کدکس بین الملل قرار دارد و این شاخص در ارزیابی تراریختگی دانه کلزا نمی‌تواند استفاده شود (۱۸).

**جدول ۴**- میزان اسیدهای چرب در نمونه‌های مورد بررسی براساس درصد

| اسید چرب | ساریگل* | لیکورد | هایولا ٤٠١ * | هایولا ٥٠ * | RGS* | زرفام | هایولا ٦٠ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C12:0 | n.d[1] | n.d | n.d | n.d | ٠/٠±٠٣/٠٠٥ | n.d | n.d |
| C14:0 | ٠/٠±٠٦/٠٠٦ | ٠/٠±٢٧/٠٦ | ٠/٠±١/٠٧ | n.d | ٠/٠±٠٢/٠٠٦ | ٠/٠±٣/٠١ | ٠/٠±٣/٠٠٥ |
| C14:1 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| C16:0 | ٤/٠±٠٤/٠٣ | ٣/٠±٩٤/٠٦ | ٣/٠±٠٨/٠٤ | ٣/٠±٧٦/٠٣ | ٣/٠±٩٣/٠٣ | ٤/٠±٤٣/٠٦ | ٦/٠±٧٤/٠٣ |
| C16:1t | n.d | n.d | ٠/٠±٠٦/٠٠٥ | n.d | n.d | n.d | ٠/٠٣ |
| C16:1 | ٠/٠±١٦/٠٢ | ٠/٠±٠٦/٠٠٥ | ٠/٠±٠٦/٠٠٥ | ٠/٠±١٢/٠٢ | ٠/٠±١٨/٠٠٦ | ٠/٠±١٦/٠١ | ٠/٠٤ |
| C17:0 | n.d | n.d | ٠/٠±٠٦/٠٠٥ | n.d | ٠/٠±٥٨/٠٢ | ٠/٠٣ | n.d |
| C18:0 | ١/٠±٩٧/٠٠٦ | ١/٠±٩٩/٠٢ | ١/٩٣ | ١/٠±٦٥/٠٥ | ٢/٠±٢٦/٠١ | ٢/٠±١١/٠٢ | ٢/٠±٠٠/٠٠٦ |
| C18:1 | ٦٢/٠±٥٥/٠٣ | ٦٦/٠±٩٧/٠٦ | ٦٦/٠±٤٧/٠٦ | ٦٥/٠±٣٣/٠٤ | ٦٦/٠±٠١/٠٢ | ٦٣/٠±٧٢/٠٣ | ٦٥/٠±٧٠/٠١ |
| C18:2 | ١٨/٠±٠٨/٠٧ | ١٧/٠±٥٥/٠٤ | ١٧/٠±٩٢/٢٤ | ١٩/٠±٥٣/٠٦ | ١٧/٠±٠٤/٠٢ | ١٨/٠±٨٤/٠٥ | ١٦/٠±٠٣/٠٦ |
| C18:3 | ١١/٠±٩٨/٠٣ | ٨/٠±٣٦/٠٥ | ٩/٠±٣٢/٠٣ | ٩/٠±٠٦/٠٦ | ٩/٠±٠٤/٠٢ | ٩/٠±٧٠/٠٢ | ٧/٠±٠٢/٠٤ |
| C20:0 | ٠/٠±٦٦/٠٢ | ٠/٠±٤٢/٠٣ | ٠/٠±٢٣/٣٠ | ٠/٠±٥٣/٠٣ | ٠/٠±٦٤/٠٢ | ٠/٠±٤٩/٠١ | ٠/٠±١٥/٠٣ |
| C20:1 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | ٠/٠±٧٤/٠٢ |
| C22:0 | ٠/٠±٠٩/٠١ | ٠/٠±٠٩/٠٠٦ | n.d | n.d | ٠/٠±٠٢/٠٠٦ | n.d | ٠/٠±١٢/٠٣ |
| C22:1 | ٠/٠±٤٠/٠٥ | ٠/٠±٣٨/٠٤ | ٠/٠±٢٥/٠٠١ | n.d | ٠/٠±٢٤/٠١ | ٠/٠±٢٢/٠١ | ٠/٠±١٤/٠٣ |

**بحث**

با توجه به این‌که ترکیب اسیدهای چرب دانه‌های روغنی کلزا، بطور کامل در محدوده استاندارد بین‌المللی کدکس قرار داشتند، نمی‌توان تفاوت در ترکیب اسیدهای چرب را به تراریختگی دانه‌ها نسبت داد و این تفاوت می‌تواند ناشی از واریته، شرایط آب و هوایی و منطقه کشت باشد.

در جستجو در بانک‌های اطلاعاتی، ۲۹ رخ‌داد کلزای تراریخته دارای صفت مقاومت به علف‌کش و ۳ رخ‌داد هیبرید دارای دو خصوصیت تراریختگی، که یکی از آن‌ها صفت مقاومت به علف‌کش بود و ۱۹ رخ‌داد دارای صفات مختلف شامل، تغییر در خصوصیات فیزیولوژیک، بازدهی محصول یا تغییرات متابولیکی و کیفی، مانند تغییر در اسیدهای چرب و دو رخ‌داد کلزا نیز با اسید اولئیک بالا، که برای مصارف دارویی و پزشکی طراحی شده، مشاهده می‌شود. اکثر این ارقام در کشورهای مختلف شامل ایالات متحده امریکا، کانادا، مکزیک، استرالیا، اتحادیه اروپا، اتریش، بلژیک، ژاپن، چین و جمهوری کره مجوز مصرف خوراک انسان، استفاده برای خوراک دام، استفاده در صنایع، رهاسازی در محیط و ترانزیت داشتند. همچنین در جستجو در همین بانک، در

حداقل ۲۹ رخداد تراریخته دارای یک صفت یا هیبریدی از دو یا چند صفت، ژن نئومایسین فسفوترانسفراز وجود دارد (۱۵ و ۲۳). توالی مربوط به این ژن در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته و در ٤ نمونه ردیابی شد. با توجه به این‌که تنها ارقام تراریخته‌ی دارای مجوز می‌توانند جابجا شوند، احتمالا نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه نیز یکی از ارقام مذکور بوده، یا حاصل تلاقی با آن‌ها است.

در نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات اسید چرب ۵ رقم کلزا نیز مشخص شد که پروفایل اسیدهای چرب در محدوده استاندارد کدکس قرار دارد (۱۹). در مطالعات انجام شده نشان داده شده که تنوع زیادی در محتوای اسیدهای چرب ارقام مختلف کلزا وجود دارد که می‌تواند نتیجه تنوع در ارقام مختلف کلزا و هیبریدهای آن‌ها باشد (۲۷ و ۱۰).

البته در مطالعه‌ای که با هدف بررسی کیفیت واریته‌های تراریخته و غیرتراریخته کانولا در سال‌های ۱۹۹٦ تا ۲۰۰۱ در کانادا انجام شده است، بیان اظهار شده که گرچه تفاوتی در محتوای روغن ارقام مختلف تراریخته و غیرتراریخته گزارش نشده است، ولی داده‌های مربوط به زمان برداشت دانه‌های کلزا، نشان داده که محتوای روغن ارقام تراریخته در حد بسیار کم، بالاتر از ارقام غیرتراریخته است. تفاوت در میزان اسید اروسیک یا اسیدهای چرب اشباع معنی‌دار نبوده ولی اسیدهای چرب غیراشباع در ارقام تراریخته با تفاوت جزئی، بیشتر از ارقام غیرتراریخته است. علت این تفاوت می‌تواند نتیجه خصوصیت مقاومت به علف‌کش باشد که موجب می‌شود کلزای تراریخته در مزرعه پتانسیل عملکردی بهتری داشته باشد (۱۹).

در مطالعه‌ای که به منظور بررسی وضعیت روغن‌های گیاهی حاصل از گیاهان تراریخته انجام شده، بیان شده که هیچ تفاوت بیوشیمیایی یا بیولوژیک بین اسیدهای چرب روغن‌های گیاهی حاصل از گیاهان تراریخته و غیرتراریخته وجود ندارد (۲۹).

این مطالعه نشان داد که تراریختگی در ارقام مختلف کلزا حتی در بین دانه‌هایی که در کشور کشت می‌شوند، وجود دارد. ولی در مورد ارقامی که در این مطالعه بررسی شد، تراریختگی اثری بر پروفایل اسیدهای چرب روغن‌های حاصل از کلزا نداشته است. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای اجرای دستورالعمل‌های اجرایی وزارت‌خانه‌ها و سازمان‌های ذی‌صلاح، مانند ضابطه برچسب گذاری محصولات غذایی تراریخته وزارت بهداشت، علاوه بر بررسی ارقام وارداتی، ارقام داخلی نیز که ممکن است در نتیجه ادغام ناخواسته با رخدادهای تراریخته، دارای ژن‌های نوترکیب شده‌اند، در دستور کار بررسی قرار گیرند. برای تکمیل این مطالعه، پیشنهاد می‌شود، در ادامه چنین بررسی‌های در مورد وجود ارقام تراریخته، نوع رخداد نیز با توجه به اطلاعات موجود تا حد امکان تعیین شود.

## منابع مورد استفاده References


۱. **استاندارد ملی ایران ۹۶۱۷- ۱۳۸۶-** مواد غذایی- روش‌های ردیابی ارگانیسم‌های تغییر ژنتیکی یافته و محصولات حاصل از آنها – روش‌های کیفی مبتنی بر اسید نوکلئیک

۲. **استاندارد ملی ایران ۱۰۷۶۳—۱۳۸۷-** مواد غذایی – روش‌های ردیابی ارگانیسم‌های تغییر ژنتیکی یافته و فراورده‌های حاصل از آنها- استخراج اسید نوکلئیک

۳. **استاندارد ملی ایران ۲-۱۳۱۲۶: ۱۳۹٤-** روغن‌ها و چربی‌های گیاهی و حیوانی -کروماتوگرافی گازی متیل استرهای اسیدهای چرب- قسمت ۲- تهیه متیل استرهای اسیدهای چرب

٤. **استاندارد ملی ایران ٤-۱۳۱۲٦: ۱۳۹۵-** روغن‌ها و چربی‌های گیاهی و حیوانی کروماتوگرافی گازی متیل استرهای اسید چرب – قسمت ٤- اندازه‌گیری با کروماتوگرافی گازی موئینه

۵. **اردکانی م، فرشادفر ع و ناصریان خیابانی ب، (۱۳۸۳)،** بررسی امکان تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت میکروسپور در گیاه کلزا، پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات

٦. **باقری خ، جلالی جواران م، مهبودی ف، معینی ا و زبرجدی ع، (۱۳۸۹)،** طراحی و تهیه سازه حاوی ژن اینترفرون گاما و بیان آن در بذر گیاه کلزا، مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۳ (۲): ۱٦۰-۱۵۱

۷. **زبرجدی ع، جلالی جواران م، سلمانیان ع، کریم‌زاده ق، معینی ا و موسوی ا، (۱۳۸۵)،** جداسازی و تهیه ساختار Antisense ژن fae و انتقال آن به گیاه کلزا (*Brassica napus*)، مجله علوم کشاورزی ایران، ۱-۳۷(۲) (ویژه زراعت، اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی زراعی): ۲۵۷-۲۷۱.

۸. **سلمانیان ع، موسوی ا (۱۳۸۵)،** گیاه تراریخت کلزا واجد صفت تحمل به علف‌کش گلایفوسیت، شماره ثبت: ۳۵۰٦۱

۹. **شیخ حسن م، رهنما ح، کاظمی تبار س ک، رحیمیان ح (۱۳۸۸)،** انتقال ژن cry1Ab به کلزا به منظور مقاومت به آفات پروانه‌ای، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، ساری.

۱۰. **قوامی م، سلمانیان ع و موسوی ا (۱۳۸۸)،** تراریختی گیاه کلزا با ساختار ترکیبی حاوی ژن جهش یافته EPSPS و ترادف نشانه کلروپلاستی به منظور افزایش تحمل به علف‌کش گلیفوسیت، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده زیست شناسی، تبریز.

۱۱. **کهریزی د، سلمانیان ع، موسوی ا، معینی ا و کریم‌زاده ق (۱۳۸۷)،** تغییر اسید آمینه آلانین 183 به تروئونین در آنزیم -5انول پیرویل شیکیمات - 3 - فسفات سنتاز به منظور ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت در گیاه تراریخت کلزا (*Brassica napus L.*)، مجله زراعت و باغبانی (۷۹): ۱۵۱- ۱۵۹

۱۲. **نیاپور ن، باقی‌زاده ا و پورسیدی ش (۱۳۹۰)**، تراریزش کلزا با استفاده از ژنهای Fld به منظور افزایش تحمل به شوری، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، دانشکده کشاورزی، کرمان.

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

14. **Barthet, Veronique. "Canola". The Canadian Encyclopedia, 22 March (2015).** Historica Canada. https://www.thecanadianencyclopedia.ca/en/article/canola. Accessed 21 December 2018

15. **Biosafety Clearing House, (2016),**http://bch.cbd.int/database/

16. **Bocianowski J, Mikołajczyk K, Bartkowiak-Broda I, (2012).** Determination of fatty acid composition in seed oil of rapeseed (Brassica napus L.) by mutated alleles of the FAD3 desaturase genes, Journal of Applied Genetics, 53(1): 27- 30.

17. **Chaouchi M, Chupeau G, Berard A E, Mckhann H, Romaniuk M, Giancola S, Laval V, Bertheau Y, and Brunel D,(2008).** A High-Throughput Multiplex Method Adapted for GMO Detection, J. Agric. Food Chem. 56: 11596–11606.

18. **Fao-who-codexalimentarius (2015).** CODEX STAN 210, Standard for Named Vegetable Oils

19. **Daun J K, (2004).** Quality of genetically modified (GM) and conventional varieties of canola (spring oilseed rape) grown in western Canada, 1996–2001, The Journal of Agricultural Science, 142 (03): **273-280**

20. **EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), (2013).** Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-NL-2010-87) for the placing on the market of genetically modified herbicide tolerant oilseed rape GT73 for food containing or consisting of, and food produced from or containing ingredients produced from, oilseed rape GT73 (with the exception of refined oil and food additives) under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto, EFSA Journal;11(2):3079.

21. **Elsanhoty R M, Ramadan M F, Jany K D,(2010).** DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study, Food Chemistry, 126(4):1883–1889.

22. **Fraiture M A, Herman P, Taverniers I, De Loose M, Deforce D, and Roosens N H, (2015).** Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions, BioMed Research International, 2015: 1-22, http://dx.doi.org/10.1155/2015/392872.

23. GMO Database, Genetically Modified Food and Feed: Authorization in the EU, Rapeseed, http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/

24. **Gurel F., Arican E., Gozukirmizi N., Ari S. (2011).** Recent molecular tools for detecting transgenic events in genetically modified (GM) crop products. Scientific Research and *Essays.* 6: 5091-5099

25. **James C (2014),** EXECUTIVE SUMMARY, brief 49, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, 1- 32.

26. **James D, Schmidt A M, Wall E, Green M, Masri S, (2003).** Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis, J. Agric. Food Chem., 51(20): 5829-5834.

27. **Kostik V, Memeti S and Bauer B (2013).** Fatty acid composition of edible oils and fats. Journal of Hygienic Engineering and Design, 4: 112-116.

28. **Meyer R, (1999).** Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food, Food Control 10: 391.

29. **Murphy D J, (2012).** The status of industrial vegetable oils from genetically modified plants, a

background document for an expert meeting organised by the European Chemicals Agency.

30. **Randhawa G, Singh M and Sood P, (2016).** Review Article, DNA-based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain, CURRENT SCIENCE, 110(6). 1000-1009.

31. **Shahidi F. (2005).** Edible Oil and Fat Production: Chemistry, Properties, and Health Effects in Bailey's industrial oil and fat products. Sixth Edition, (2), A John Wiley and Sons, Inc., Publication.

# Detection of GM colza in samples cultivated in Iran and evaluation of their fatty acid profiles

**Zahra Piravi Vanak[1], Fahimdokht Mokhtari[2*] Farzaneh Ansari[3]**

1- Associate Professor, 2- Research assistant, 3- assistant professor of Standard Research Institute, Faculty of Food industry and Agriculture, Karaj, Iran

**mfahimdokht@yahoo.com**

**Abstract**

Oils extracted from colza have high nutrition quality. Cultivation of modified species with low level of undesired components, have been developed recently in Iran. Rapeseed species modified by genetic engineering have been cultivated all around the world. In current study, recombinant genes have been detected in seven species of colza which are used in oil industries. Moreover, fatty acid profiles of oils extracted from these seeds have been analyzed. DNA extracted by CTAB method, and quality of the extracted DNAs were assessed by PCRs with chloroplast tRNA primer. Presence of transgenic colza were assessed with three gene sequences of CaMv 35s promoter, NOS terminator and *nptII* marker. The results showed that NOS terminator and CaMv 35s promoter sequences found in none of samples, while the 215 bp electrophoretic band due to PCR product of *nptII* sequence has seen in four seeds out of seven samples. Analysis of fatty acid profiles showed that GM modification has no effect on lipid content of samples.

**Keywords:** Colza, Canola, fatty acid, GMO, PCR