

Comparative transcriptome analysis of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) with oilseed crops to identify genes involved in seed oil quantity and quality

Soheil Nahranbad¹, Ghasemali Garoosi² , Seyed Mehdi Alavi³, Mohammad Amin Baghery⁴

1. M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

2. Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Imam Khomeini International University (IKIU), Qazvin, Iran.

3. Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

4. Researcher, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Correspondence:

Ghasemali Garoosi

Email: agaroosi90@yahoo.com
garoosi@eng.ikiu.ac.ir

Received: 13, May 2024

Accepted: 15, Feb. 2025

How to cite:

Nahranbad, S., Garoosi, Gh., Alavi, S. M., & Baghery, M.A. (2025). Comparative transcriptome analysis of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) with oilseed crops to identify genes involved in seed oil quantity and quality. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 1-17. (DOI: [10.30473/cb.2025.71265.1968](https://doi.org/10.30473/cb.2025.71265.1968))

ABSTRACT

This study aimed to identify genes involved in seed growth and development using RNA-Seq and comparative transcriptomics. For this purpose, the transcriptome data of oilseed plants safflower, camelina, and soybean were extracted from relevant databases. After checking the quality of the data, they were edited, cleaned, and reassembled using the reference genome. Annotation of genes involved in seed fatty acid biosynthesis by identifying Arabidopsis homologs and then analyzing differentially expressed genes (DEGs) was performed. Genes with differential expression during seed development stages were identified, and in this way genes with significant expression and involved in seed fatty acid metabolism and synthesis pathways were extracted. Finally, the relationship between genes was drawn by protein-protein interaction network, and based on this, FAD2, FATB, and ACX4 genes were found to be effective in the lipid biosynthesis pathway during filling and maturation stages. In these plants in the glycerophospholipid metabolism pathway, NPC3, PDAT1, and LPAT1 genes showed significant differential expression during the start of seed growth and seed filling stages. The results showed that SDP1 and LPAT5 genes have an increased expression in the maturation stage compared to seed formation. In the fatty acid elongation pathway, KCS5 and C86A1 genes, in the fatty acid degradation pathway AIM1 gene, and in the fatty acid biosynthesis pathway FABH gene showed significant expression in the seed filling and maturation stages. Based on the protein-protein interaction network and gene relationships, it is likely that FAD2, FATB, and PDAT1 genes play a key role in seed development and oil biosynthesis.

KEYWORDS

Bioinformatics, comparative transcriptome, fatty acids, Oilseeds, safflower.



«مقاله پژوهشی»

بررسی ترنسکرپتوم مقایسه‌ای گلرنگ با دانه‌های روغنی به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در کمیت و کیفیت روغن دانه

سهیل نهران‌باد^۱، قاسمعلی گروسی^۲ , سیدمهدی علوی^۳، محمد امین باقری^۴

چکیده

در این مطالعه که برپایه فناوری RNA-Seq و ترنسکرپتومیکس مقایسه‌ای بنا شده، به تجزیه و تحلیل و شناسایی ژن‌های دخیل در رشد و نمو دانه پرداخته شده است. بدین منظور داده‌های ترنسکرپتوم دانه گیاهان روغنی گلرنگ (رقم گل‌دشت)، کم‌لینا و سویا از پایگاه داده‌های مربوطه استخراج شد. پس از بررسی کیفیت، ویرایش، پاکسازی و سرهم‌بندی مجدد آن‌ها با استفاده از ژنوم مرجع انجام شد. حاشیه‌نویسی ژن‌های درگیر در بیوستز اسید چرب دانه توسط شناسایی هومولوگ‌های آرآیدوپسیس و سپس آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها (DEG) انجام شد. ژن‌هایی که دارای تفاوت بیان در مراحل نمو دانه بودند شناسایی و بدین ترتیب ژن‌های واجد بیان معنی‌دار و دخیل در مسیرهای متابولیسم و سنتز اسید چرب دانه استخراج شدند. در نهایت ارتباط بین ژن‌ها توسط شبکه پروتئین-پروتئین ترسیم و بر این اساس، ژن‌های FAD2، FATB و ACX4 در مسیر بیوستز لیپیدها در مرحله پرشدن و بلوغ موثر شناخته شدند. در این گیاهان در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید نیز ژن‌های NPC3، PDAT1 و LPAT1 بین مرحله شروع رشد دانه تا پر شدن دارای تفاوت بیان معنی‌داری بودند. نتایج نشان داد که ژن‌های SDP1 و LPAT5 در مرحله بلوغ نسبت به تشکیل دانه افزایش بیان دارند. در مسیر تولید اسید چرب، ژن‌های KCS5 و C86A1 در مسیر تجزیه اسید چرب ژن AIM1 و در مسیر بیوستز اسید چرب ژن FABH دارای افزایش بیان در مراحل پرشدن و بلوغ دانه بیان معنی‌داری را نشان دادند. بر اساس شبکه پروتئین-پروتئین و روابط بین ژن‌ها احتمال می‌رود ژن‌های FAD2، FATB و PDAT1 نقش کلیدی در نمو دانه و بیوستز روغن دانه داشته باشند.

واژه‌های کلیدی

اسیدهای چرب، بیوانفورماتیک، ترنسکرپتوم مقایسه‌ای، دانه‌های روغنی، گلرنگ.

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران.
۲. استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران.
۳. دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
۴. پژوهشگر، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

نویسنده مسئول:

قاسمعلی گروسی

رایانامه: agaroosi90@yahoo.com

garoosi@eng.ikiu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۷

استناد به این مقاله:

نهران باد، سهیل؛ گروسی، قاسمعلی؛ علوی، سیدمهدی و باقری، محمدامین (۱۴۰۴). بررسی ترنسکرپتوم مقایسه‌ای گلرنگ با دانه‌های روغنی به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در کمیت و کیفیت روغن دانه، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۱-۱۷.

(DOI: [10.30473/cb.2025.71265.1968](https://doi.org/10.30473/cb.2025.71265.1968))

مقدمه

روغن به عنوان یکی از منابع اصلی تامین انرژی نقش ارزنده‌ای در تغذیه انسان دارد و پس از مواد نشاسته‌ای در زمره مهم‌ترین کالاهای ضروری محسوب می‌شود. از سوی دیگر دانه‌های روغنی پس از غلات، دومین ذخیره غذایی جهان را تشکیل می‌دهند. تولید جهانی روغن از دانه‌های روغنی در سال ۲۰۲۲ حدود ۶۴۰ میلیون تن و با ارزش ۳۴۸ میلیارد دلار بوده است. پیش‌بینی می‌شود که مصرف روغن نباتی تا سال ۲۰۴۰ دو برابر شود. با توجه به افزایش جمعیت و افزایش مصرف سرانه روغن، افزایش سطح زیر کشت دانه‌های روغنی و افزایش عملکرد آنها برای کاهش وابستگی به کشورهای دیگر ضروری است. بنابراین افزایش عملکرد روغن بذر در واحد سطح کشت اهمیت فراوانی در صنایع تولید روغن برای مصارف غذایی و غیرغذایی پیدا کرده است (Oecd, 2022). در بین دانه‌های روغنی گلرنگ به دلیل دارا بودن مقادیر بالای اسید لینولئیک یا اسید اولئیک و پایداری بالا در برابر حرارت برجسته است. گلرنگ قدیمی‌ترین محصول زراعی است که بیش از ۴۰۰۰ سال با تولید روغن باکیفیت و غنی از اسیدهای چرب غیراشباع، دارای خواص دارویی بوده که می‌تواند بسیاری از بیماری‌های مزمن را درمان کند. این گیاه یک محصول دانه روغنی مقاوم به خشکی است که تحت شرایط دیم نیز در سراسر جهان قابل کشت است. در حال حاضر به صورت تجاری در ۶۰ کشور جهان کشت می‌شود (Singh & Nimkar, 2016). از سوی دیگر، کشت گلرنگ از زمان‌های بسیار قدیم در شرایط اقلیمی متنوع با داشتن تیپ‌های بهاره و پاییزه سازگار با شرایط آب و هوای کشور آینده نویدبخشی را برای توسعه کشت این دانه روغنی رقم زده است (Omidi et al., 2011). پروفایل اسیدهای چرب روغن گلرنگ حاکی از وجود ۱۴ نوع اسید چرب در مقادیر مختلف می‌باشد (Andhale & Md, 2018). بر اساس آخرین پژوهش‌های انجام شده درصد ترکیب اسیدهای چرب روغن دانه گلرنگ اسید لینولئیک ۶۱ درصد و اسید اولئیک ۲۳٫۷ درصد می‌باشد (Yesilyurt et al., 2020). در حال حاضر مطالعات در مورد ویژگی‌های بیولوژیکی این گیاه در طول ذخیره‌سازی روغن بذر به ویژه

تغییرات در قابلیت متابولیک و ساختار سلولی محدود می‌باشد. لذا چنین دانشی برای بهبود و کنترل طول عمر بذر گلرنگ و حفظ بانک‌های ژنی مورد نیاز است (Zhou et al., 2022). پژوهشگران با استفاده از آنالیز ترنسکریپتوم مقایسه‌ای توانستند برای افزایش محتوای روغن دانه گیاه کمپلینا پروفایل‌های متابولیتی مسیر سنتز تری آسید گلیسرول و پروفایل رونویسی ژن‌هایی که در طول روند نمو بذر به صورت بالقوه باعث سنتز و تحرک واکنش‌های شیمیایی شبکه اپی‌ژنی می‌شود را شناسایی کرده و مقدار عملکرد دانه و روغن آن را افزایش دهند (Abdullah et al., 2018). Geng و همکاران (۲۰۱۸) با مقایسه آنالیز ترنسکریپتوم گیاه کلزا توسط فناوری RNA-Seq، مکانیسم‌های تنظیم‌کننده وزن بذر را تشخیص داده همچنین ژن‌های کاندید مربوط به مسیرهای متابولیکی نمو بذر و تجزیه و تحلیل این مسیرها را در پایگاه داده KEGG مورد مطالعه قرار دادند و پروتئین‌های دخیل در تنظیم کمیت روغن دانه را شناسایی کردند (Geng et al., 2018). Chen و همکاران (۲۰۲۴) با آنالیز ترنسکریپتوم مقایسه‌ای در گیاه سویا با سایر دانه‌های روغنی موفق به شناسایی ژن تنظیم‌کننده عامل ازدیاد سنتز روغن سویا (سینامیل الکل دهیدروژناز ۹) در مرحله گلیکولیز/ گلوکونئوژن شدند (Chen et al., 2024).

با وجود این که تحقیقات گسترده‌ای برای به‌نژادی کلاسیک و مولکولی دانه‌های روغنی به منظور افزایش میزان روغن در مناطق مختلف جهان صورت گرفته است اما، همچنان فقدان اطلاعات لازم ژنتیکی در مورد این گیاهان خصوصا گلرنگ احساس می‌شود. بنابراین در راستای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها و شناسایی سیستماتیک ژن‌های دخیل و پاسخگو در افزایش کمیت و کیفیت روغن گلرنگ، این پژوهش به صورت متاآنالیز طراحی گردید تا از طریق بررسی In Silico ترنسکریپتوم نمو بذر از مرحله شروع رشد، پرشدن و بلوغ در دانه روغنی گلرنگ و مقایسه پروفایل بیانی آن با ترنسکریپتوم دیگر دانه‌های روغنی نظیر کمپلینا و سویا بتوان نسبت به شناسایی و گزارش اطلاعات تازه‌تری از ژن‌های عملکردی و تنظیمی مرتبط با بهبود کمی و کیفی در روغن دانه این گیاه دست یافت.

مواد و روش‌ها

مراحل رشد گیاه و توالی‌یابی به روش RNA-Seq

ابتدا بذر گلرنگ (رقم گل‌دشت) از مرکز تحقیقات دانه‌های روغنی تهیه و در گلخانه پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تحت شرایط اپتیمم با دمای شبانه روز ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰٪ کشت گردید. پس از طی مراحل رشدی و گلدهی گیاهان، نمونه‌برداری همزمان با شروع دانه بستن از دانه‌ها در دو تکرار بیولوژیک و در سه دوره رشد ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روزه (دوره رشد دانه، پرشدن و بلوغ) انجام شد. RNA کل نمونه‌ها توسط دستورالعمل کیت RNX Plus استخراج گردیده و برای تعیین توالی به شرکت BGI ارسال شد. غنی‌سازی و قطعه‌قطعه‌سازی mRNA، سنتز کتابخانه cDNA، ترمیم انتهای رشته‌ها و اتصال آداپتورها توسط شرکت BGI (موسسه ژن پکن، شتزن، چین) انجام شده و همه کتابخانه‌ها با استفاده از پلتفرم BGISEQ-500 توالی‌یابی شدند (PE 100bp).

دریافت و بارگیری داده‌های InSilico

داده‌های ترنسکریپتوم گیاهان کمینا و سویا از مراحل شروع رشد دانه، پرشدن و بلوغ انتخاب شده از پایگاه داده NCBI به ترتیب با شناسه‌های PRJNA313565 و PRJNA192234 که نتایج حاصل از دستگاه‌های توالی‌یابی خوانش‌های خام می‌باشند در قالب فایل Fastq ذخیره شدند.

پردازش داده‌ها

تصحیح و ویرایش توالی‌ها توسط برنامه Trimmomatic v0.39 با پارامترهای LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:15, MINLEN:50 و میانگین Phred Score معادل ۳۰ انجام شد (Bolger et al., 2014).

همردیفی خوانش‌ها

برای همردیفی خوانش‌های خام گلرنگ با توجه به اینکه برای این گیاه ژنوم مرجع در دسترس نبود از روش سرهم‌بندی از نو و همچنین برای مابقی گیاهان مانند کمینا،

سویا از ژنوم مرجع استفاده گردید. خوانش‌های با کیفیت به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Trinity v2.9.1 به روش سرهم‌بندی از نو با هم ادغام شده و در نهایت رونوشت‌های مرجع برای گلرنگ به دست آمد (Grabherr et al., 2011). برای گیاهان کمینا و سویا از ژنوم مرجع موجود در پایگاه داده NCBI به ترتیب تحت شناسه‌های GCF_000004515 و GCF_000633955 استفاده گردید. در نهایت کلیه داده‌ها در برنامه HISAT2 ایندکس شده و خوانش‌های هر گیاه با مرجع متناظرشان تطبیق داده شدند.

کمیت‌سنجی (Quantification) خوانش‌های همردیف شده

کمیت‌سنجی خوانش‌های همردیف شده برای نمونه‌های هر گیاه با استفاده از برنامه RSEM انجام شد (Li & Dewey, 2011). ماتریس بیانی ژن‌ها بر اساس ماتریس رونوشت‌ها با استفاده از بسته tximport محاسبه گردید (Soneson et al., 2015). سپس نرمال‌سازی داده‌ها به روش TMM با استفاده از بسته edgeR تحت پلتفرم R انجام شد.

تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها (DEG)

ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEG) در مراحل پرشدن و بلوغ دانه نسبت به شروع رشد دانه برای نمونه‌های هر گیاه توسط بسته edgeR تحت پلتفرم R محاسبه گردید (Liu et al., 2015). سپس DEG‌های به دست آمده با مقدار p-value تنظیم شده (FDR) ≤ 0.05 و $\log_2FC \geq 2$ به عنوان ژن‌های دارای بیان متفاوت معنی‌دار تعیین گردید.

حاشیه‌نویسی ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEG)

به منظور یافتن DEG‌های فعال در مسیر بیوسنتز لیپیدها در گلرنگ حاشیه‌نویسی داده‌ها با استفاده از پایگاه داده KEGG انجام گرفت. برای توالی‌های از نو سرهم‌بندی شده به دلیل در دسترس نبودن حاشیه‌نویسی KEGG از هومولوگ‌های متناظر در آراییدوپسیس استفاده شد. بدین

روش ترانسکریپتوم مرجعی متشکل از ۳۱۴۳۸۱ رونوشت (ایزوفرم) و ۲۲۰۸۷۴ ژن تهیه گردید.

پس از تطبیق خوانش‌های هر نمونه با مرجع تهیه شده آنالیز بیان متفاوت انجام گردید. نتایج به دست آمده از آنالیز بیان نمونه‌های دانه طی مرحله پرشدن دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه گلرنگ نشان داد که ژن‌های MDHM1 با بیان نسبی ۷/۷۰، ژن FAD2 با بیان نسبی ۷/۵۹ و ژن AL2B4 با بیان نسبی ۶/۳۷ دارای بیشترین افزایش بیان هستند. از سوی دیگر در شرایط مشابه ژن‌های SFR2 با بیان نسبی ۲/۴۸- و SQD2 با بیان نسبی ۲/۵۳- از بیشترین کاهش بیان برخوردار بودند (جدول ۲).

اما در مرحله بلوغ دانه نسبت به شروع رشد دانه ژن‌های MDHM1 با بیان نسبی ۵/۸۱ و FAD2-1 با بیان نسبی ۵/۲۲ و AL2B7 با بیان نسبی ۵/۰۶، به ترتیب با بیشترین افزایش بیان و ژن‌های FAD2-2 با بیان نسبی ۸/۶۷- و ژن AL2B4 با بیان نسبی ۹/۳۹- به ترتیب بیشترین کاهش بیان را از خود در گلرنگ نشان دادند (جدول ۳). شکل الگوی بیانی ژن‌ها در (شکل ۱) ترسیم شده است.

منظور ژن‌های سرهم‌بندی شده گلرنگ با استفاده از برنامه Blastx با توالی پروتئینی آرایی‌دوپسیس تطبیق داده شدند. از مجموعه ژن‌های به دست آمده ژن‌های فعال در مسیر بیوسنتز لیپید که حداقل در گلرنگ و یکی از گیاهان مورد مطالعه، DEG بودند به عنوان متاژن فعال در بیوسنتز لیپیدها در نظر گرفته شدند. در آخر از متاژن‌های شناسایی شده برای ترسیم شبکه میانکنشی پروتئین-پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING و نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد (Szkarczyk et al., 2016).

نتایج و بحث

شناسایی و جداسازی ژن‌های بیانی معنی‌دار

شناسایی ۵ ژن با تفاوت بیانی در گلرنگ

مشخصات عمومی داده‌های خام بدست آمده از توالی یابی نمونه‌های گلرنگ در جدول ۱ آورده شده است. پس از پیش پردازش و حذف داده‌های با کیفیت پایین سرهم بندی از نو بر روی خوانش‌های خام انجام گرفت. با این

جدول ۱. خلاصه نتایج توالی یابی RNA (RNA-Seq) از نمونه‌های گلرنگ

Table 1. Summary of RNA sequencing (RNA-Seq) results from safflower samples

نام فایل	نوع فایل	سیستم کدکننده	تعداد کل توالی‌ها	توالی‌های با کیفیت پایین	طول توالی (bp)
Saff.10.fq1.gz	Conventional base calls	Sanger/BGI 1.9	۳۵۱۵۵۷۲۲	.	۴۸
Saff.10.fq2.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۶۲۵۴۹۰۳	.	۴۶
Saff.20.fq1.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۵۹۹۷۷۱۲	.	۴۶
Saff.20.fq2.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۶۱۳۳۳۹۱	.	۴۶
Saff.30.fq1.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۵۹۸۱۱۰۷	.	۴۷
Saff.30.fq2.gz	-	Sanger/BGI 1.9	۳۵۹۵۱۲۲۱	.	۴۸

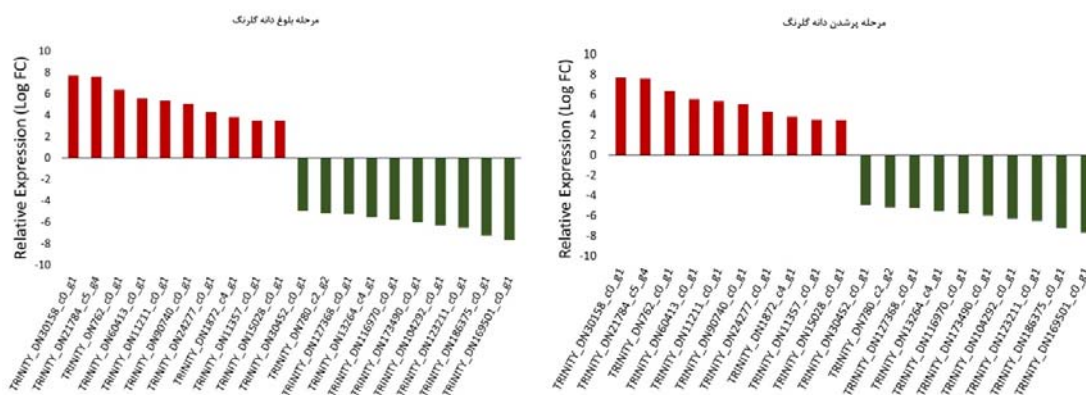
جدول ۲. پنج ژن با بالاترین افزایش و کاهش بیان در مرحله پرشدن دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه گلرنگ

Table 2. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed filling stage compared to the initiation stage of seed development in the safflower plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
گلرنگ	MDHM1	TRINITY_DN30158_c0_g1	-	۷/۷۰	پرشدن
	FAD2	TRINITY_DN21784_c5_g4	-	۷/۵۹	پرشدن
	AL2B4	TRINITY_DN762_c0_g1	-	۶/۳۷	پرشدن
	SFR2	TRINITY_DN2101_c0_g1	-	۲/۴۸-	پرشدن
	SQD2	TRINITY_DN32838_c1_g1	-	۲/۵۳-	پرشدن

جدول ۳. پنج ژن با بالاترین افزایش و کاهش بیان در مرحله بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه گلرنگ**Table 3.** The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed maturation stage compared to the initiation stage of seed development in the safflower plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
گلرنگ	MDHM1	TRINITY_DN45428_c0_g1	-	۵/۸۱	بلوغ
	FAD2-1	TRINITY_DN61173_c0_g1	-	۵/۲۲	بلوغ
	AL2B7	TRINITY_DN14177_c6_g1	-	۵/۰۶	بلوغ
	FAD2-2	TRINITY_DN25756_c0_g1	-	-۸/۶۷	بلوغ
	AL2B4	TRINITY_DN64432_c0_g2	-	-۹/۳۹	بلوغ

**شکل ۱.** الگوی بیانی ۱۰ ژن دارای بالاترین و پایین‌ترین تفاوت بیان در مرحله پرشدن و بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه گلرنگ**Figure 1.** The expression pattern of the top 10 genes with the highest up- and down-regulation at the seed maturation and filling stage compared to the initiation stage of seed development in the safflower plant**شناسایی ۱۰ ژن با تفاوت بیانی در سویا**

با توجه به نتایج آنالیز بیان در نمونه‌های دانه سویا ژن‌های C86A1، KCS10-1 و KCS19 با بیان نسبی ۱۲/۲۸، ۱۱/۸۱ و ۷/۷۵ به ترتیب با بیشترین افزایش بیان و ژن‌های BCCP2 و LACS1-2 با بیان نسبی ۲/۱۱- و ۲/۱۸- به ترتیب با بیشترین کاهش بیان در مسیر پرشدن دانه نسبت به شروع رشد دانه را از خود نشان دادند (جدول ۶).

نتایجی که از آنالیز بیان ژن‌ها در نمونه‌های دانه سویا طی مرحله بلوغ نسبت به مرحله شروع رشد دانه مشاهده شد نشان داد که ژن‌های C86A1 با بیان نسبی ۱۰/۱۰، KCS10-1 با بیان نسبی ۹/۵۰ و KCS19 با بیان نسبی ۶/۹۲ بیشترین افزایش بیان و ژن‌های ADHX با بیان نسبی ۳/۵۸- و ژن FAD2 با بیان نسبی ۷/۹۴- به ترتیب بیشترین کاهش بیان را دارند (جدول ۷).

شناسایی ۵ ژن با تفاوت بیانی در کمینا

نتایج آنالیز بیان نمونه‌های دانه کمینا در مرحله پرشدن دانه نسبت به شروع رشد دانه نشان داد که ژن‌های DPEP1 با بیان نسبی ۵/۰۳، F7A7 با بیان نسبی ۴/۹۱، NOL با بیان نسبی ۳/۳۲ به ترتیب با بیشترین افزایش بیان و ژن‌های LPP و FAC17 به ترتیب با بیان نسبی ۱/۳۳- و ۱/۳۴- با بیشترین کاهش بیان شناسایی شدند (جدول ۴).

از سوی دیگر نتایج آنالیز ژن‌های F7A7-1 با بیان نسبی ۷/۴۳ و ژن F7A7-2 با بیان نسبی ۷/۱۰، KCS1 با بیان نسبی ۴/۷۱ به ترتیب بیشترین افزایش بیان در مسیر بلوغ دانه نسبت به شروع رشد دانه و ژن‌های FATA و LPAT5 با بیان نسبی ۱/۱۴- بیشترین کاهش بیان را در مسیر بلوغ دانه نسبت به شروع رشد دانه در کمینا از خود نشان دادند (جدول ۵).

جدول ۴. پنج ژن با بالاترین افزایش و کاهش بیان در مرحله پرشدن دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه کم‌لینا

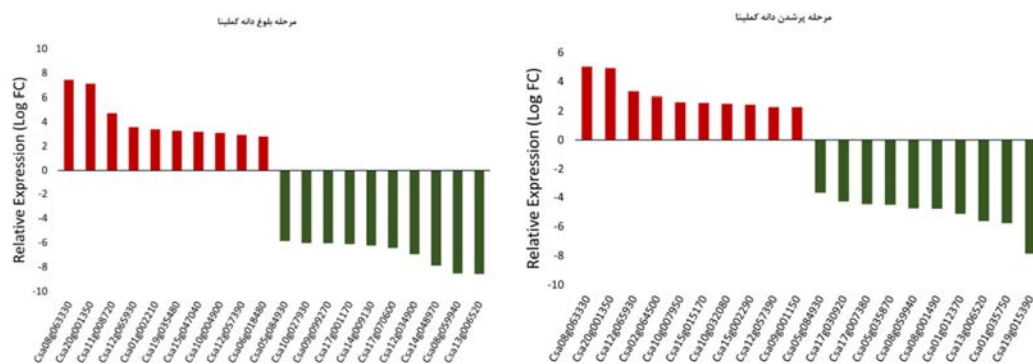
Table 4. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed filling stage compared to the initiation stage of seed development in the camelina plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
کم‌لینا	DPEP1	104709017	XP_010423981	۵/۰۳	پرشدن
	F7A7	104768291	XP_010490521	۴/۹۱	پرشدن
	NOL	104732452	XP_010450301	۳/۳۲	پرشدن
	LPP	104740194	XP_010459030	-۱/۳۳	پرشدن
	FAC17	104704077	XP_010418506	-۱/۳۴	پرشدن

جدول ۵. پنج ژن با بالاترین افزایش و کاهش بیان در مرحله بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه کم‌لینا

Table 5. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed maturation stage compared to the initiation stage of seed development in the camelina plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
کم‌لینا	F7A7-1	104709017	XP_010423981	۷/۴۳	بلوغ
	F7A7-2	104768291	XP_010490521	۷/۱۰	بلوغ
	KCS1	104721377	XP_010437646	۴/۷۱	بلوغ
	FATA	104732428	XP_010450273	-۱/۱۴	بلوغ
	LPAT5	104765750	XP_010487812	-۱/۱۴	بلوغ



شکل ۲. الگوی بیانی ۱۰ ژن با بالاترین و پایین‌ترین تفاوت بیان در مرحله پرشدن و بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه کم‌لینا

Figure ۲. The expression pattern of the top ۱۰ genes with the highest up- and down-regulation at the seed-maturation and filling stage compared to the initiation stage of seed development in the camelina plant

جدول ۶. پنج ژن با بیشترین افزایش و کاهش بیان در مرحله پرشدن دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه سویا

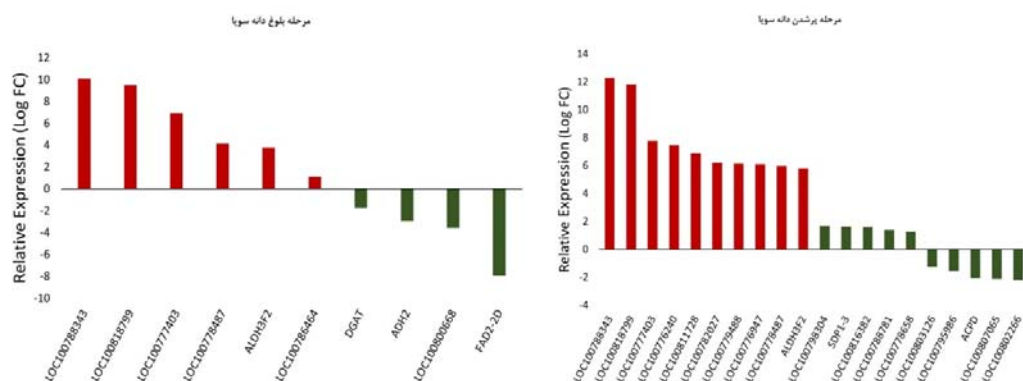
Table 6. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed filling stage compared to the initiation stage of seed development in the soybean plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
سویا	C86A1	100788343	XP_003544876	۱۲/۲۸	پرشدن
	KCS10-1	100818799	XP_003526086	۱۱/۸۱	پرشدن
	KCS19	100777403	XP_003536780	۷/۷۵	پرشدن
	BCCP2	100807065	XP_003543944	-۲/۱۱	پرشدن
	LACS1-2	100802266	XP_003542188	-۲/۱۸	پرشدن

جدول ۷. پنج ژن با بیشترین افزایش و کاهش بیان در مرحله بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه سویا

Table 7. The top 5 genes with the highest up- and down-regulation at the seed maturation stage compared to the initiation stage of seed development in the soybean plant

نام گیاه	نام ژن	شناسه ژن	شناسه پروتئین	بیان نسبی	مرحله تشکیل دانه
سویا	C86A1	100788343	XP_003544876	۱۰/۱۰	بلوغ
	KCS10-1	100818799	XP_003526086	۹/۵۰	بلوغ
	KCS19	100777403	XP_003536780	۶/۹۲	بلوغ
	ADHX	100800668	XP_003544738	-۳/۵۸	بلوغ
	FAD2	100780912	XP_014617578	-۷/۹۴	بلوغ



شکل ۳. الگوی بیانی ۱۰ ژن با بالاترین و پایین‌ترین تفاوت بیان در مرحله پرشدن و بلوغ دانه نسبت به مرحله شروع رشد دانه در گیاه سویا

Figure 3. The expression pattern of the top 10 genes with the highest up- and down-regulation at the seed-maturation and filling stage compared to the initiation stage of seed development in the soybean plant

شوری را افزایش می‌دهد (Dar *et al.*, 2017). یافته‌های Du و همکاران نشان داد که این ژن عامل اصلی تعیین‌کننده سطح اسیدهای چرب غیر اشباع ضروری (PUFAs) در روغن دانه بوده و نقش مهمی در بیوسنتز اسیدهای چرب دارد (Du *et al.*, 2018). در پژوهش گان و همکاران مشخص گردید ژن‌های FAD و FATB دارای یک الگوی بیان بسیار مشابه در مسیر بیوسنتز اسید چرب می‌باشند (Gan *et al.*, 2018). Yuan و همکاران در مطالعه‌ای بر روی بادام زمینی ۳ جهش Hotspot در هومولوگ‌های ژن FAD2 را شناسایی کرده و sgRNA های هدف را در یک پلاسמיד بیانی CRISPR/Cas9 کلون کردند. آن‌ها گزارش دادند این گیاهان دارای جهش G448A در FAD2 دارای محتوای

شناسایی، تفسیر و طبقه‌بندی عملکردی ژن‌های بیانی افتراقی در دانه

در پژوهش حاضر به منظور شناسایی ژن‌های بیانی افتراقی ترنسکریپتوم بذر گیاهان مورد مطالعه گلرنگ (رقم گلدشت)، گیاه کم‌لینا و گیاه سویا بصورت جداگانه از مرحله شروع رشد دانه تا مرحله بلوغ مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد ژن FAD2 (اسید چرب غیر اشباع) دارای افزایش بیان معنی‌داری در مسیر متابولیسم اسید چرب می‌باشد. این ژن مسئول کاتالیز اسید اولئیک به اسید لینولئیک می‌باشد. فعالیت FAD2 منجر به افزایش محتوای اسیدهای چرب دی‌نوئیک می‌شود. از این رو مقاومت در برابر سرما و تنش

۱ Oleic Acid

۲ Linoleic Acid

۳ Polyunsaturated fatty acids

را نشان داد. ژن‌های KCS5 و KCS1 در مراحل پر شدن و بلوغ دانه دارای افزایش بیان در مسیر تولیدسازی اسید چرب بودند و اما ژن KCS1 در ۲ گیاه دیگر کم‌لینا و سوپا نیز مشترک بوده و فعال نیز می‌باشد. به نظر می‌رسد ژن PDAT1 در هر دو مرحله پرشدن و بلوغ دانه دارای بیشترین فعالیت در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید بوده است (جدول ۸).

ژن‌های درگیر در مسیرهای رشد دانه

در این مطالعه نقش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز و متابولیسم دانه مسیر متابولیسم گلیسرولیپید و بیوسنتز اسید چرب (شکل ۸) گیاه گلرنگ آنالیز شده است. بر این اساس مشخص گردید که ژن ADHX با شناسه (1.1.1.2) فعال در بیوسنتز گلیسرول و گلیسرآلدئید و ژن‌های GPAT1 با شناسه (3.1.3.106) و LPP2 با شناسه (3.1.3.4) در مسیر سنتز گلیسرول ۳-فسفات و دی‌آسیل گلیسرول افزایش بیان معنی‌داری داشته‌اند. در ژن ALDH2 با شناسه (1.2.1.3) نیز که در پایین‌دست ژن‌های مذکور و در مسیرهای سنتز گلیسرات و فسفولیپید واقع شده افزایش بیان معنی‌داری مشاهده گردید. از سوی دیگر ژن کدکننده آنزیم PDAT با شناسه (2.3.1.158) مسئول سنتز تری‌آسیل‌گلیسرول از ۲-دی‌آسیل گلیسرول که در بالادست مسیر گلیکولیز و متابولیسم گلیسروفسفولیپید واقع شده، دارای بیشترین افزایش بیان می‌باشد (شکل ۴).

نتایج نشان داد که در مسیرهای گلیسرول، گلیسرول ۳-فسفات، آسیل‌گلیسرول ۳-فسفات، ژن‌های LPAT3 با شناسه (2.3.1.51) و GPAT4 با شناسه (2.3.1.15) کاهش بیان معنی‌داری دارند. همچنین ژن‌های AGAL2 با شناسه (3.2.1.22) و DGD1 با شناسه (2.4.1.241) ۲-دی‌آسیل ۳-گلیسرول از ۲-دی‌آسیل ۳-بتاگلیسرول در بالادست ژن‌هایی که در مسیر اصلی متابولیسم گلیسرولیپید، شامل دی‌فسفو دی‌گلیسرات و آسیل‌فسفات واقع شده‌اند کاهش بیان معنی‌داری نشان دادند. در این میان ژن کدکننده آنزیم SQD2 که در بالادست ژن‌های مسیر سنتز گلیکولیز و گلیسروفسفولیپید فعالیت دارد با بیشترین کاهش بیان شناسایی شد (شکل ۴).

اولئیک اسید بالایی بودند. بنابراین مشخص گردید جهش‌های القا شده در FAD2B برای توسعه لاین‌های دارای اولئیک اسید بالا مفید می‌باشد (Yuan et al., 2019). در مطالعه حاضر افزایش بیان و فعالیت این ژن در هر دو مرحله رشدی پرشدن و بلوغ دانه مشاهده شد. ژن FATB که در ژن‌های بیانی افتراقی نمونه‌های مورد مطالعه شناسایی شد دارای فعالیت تیواسترازهای پروتئین حامل آسیل-آسیل گیاهی (ACP) بوده و نقش کلیدی در تامین اسیدهای چرب اشباع لازم برای رشد گیاه و نمو بذر دارد (Bonaventure et al., 2003). در تحقیقی دورمن و همکاران متوجه شدند این ژن به تولید و تجمع بالای اسید پالمیتات در دانه کمک کرده و احتمال می‌رود در سنتز اسیدهای چرب با زنجیره بلند نقش داشته باشد. همچنین، این ژن نقش اساسی در خاتمه زنجیره در طول سنتز اسیدهای چرب جدید داشته و فعالیت هیدرولیتیکی در شرایط آزمایشگاهی برای پروتئین‌های حامل آسیل-آسیل با زنجیره بلند از خود نشان می‌دهد (Dörmann et al., 2000).

شناسایی ژن‌های کاندید مشترک با بیان بالا در

مسیر بیوسنتز لیپید گیاهان مورد مطالعه

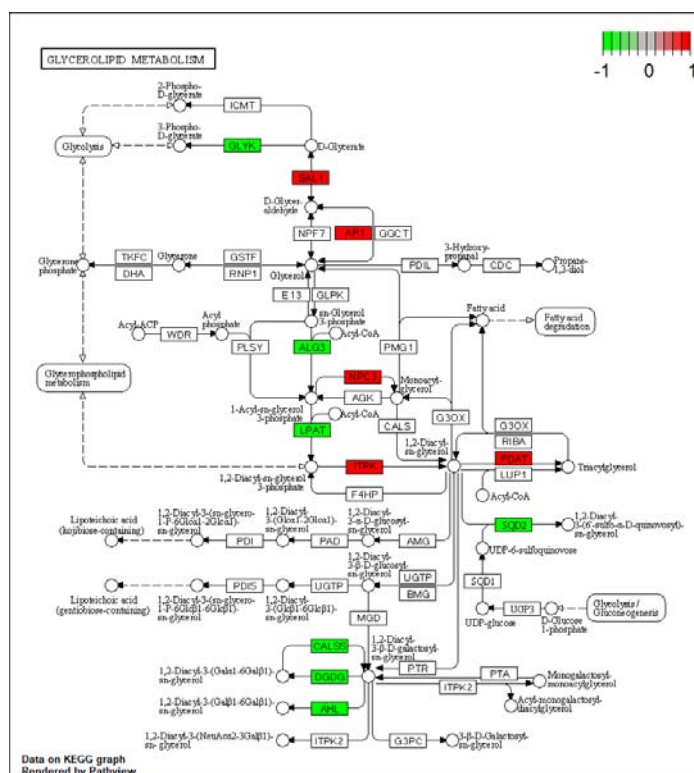
ژن‌های مشترک بیان بالا که در مسیر بیوسنتز لیپیدها در گیاه گلرنگ فعال می‌باشند

مسیر بیوسنتز لیپیدها در دانه‌های روغنی دارای ۵ مرحله مهم و اصلی در تولید اسید چرب که شامل مسیرهای متابولیسم اسید چرب، متابولیسم گلیسرولیپید، تولیدسازی اسید چرب، تجزیه و بیوسنتز اسید چرب می‌باشد. بررسی الگوهای بیانی نشان می‌دهد که ژن‌های FAD2 و FATB در مسیر متابولیسم اسید چرب در مرحله پر شدن و همچنین بلوغ دانه در هر گیاه گلرنگ، کم‌لینا و سوپا دارای بیان بالا می‌باشند. همچنین ژن NPC3 در مرحله پر شدن و بلوغ دانه دارای بیان معنی‌دار طی مسیر متابولیسم گلیسرولیپید فعال می‌باشد. FABH در مرحله پر شدن دانه دارای بیان بالا طی مسیر متابولیسم گلیسرولیپید می‌باشد. AIM1 در مرحله پر شدن دانه با بیان بالا در مسیر متابولیسم اسید چرب مشاهده شد. ژن ACOX در هر دو مرحله پر شدن و بلوغ دانه بیان بالایی

جدول ۸. اسامی ژن‌های مشترک کاندید با بیان معنی‌دار در مسیر بیوسنتز لیپیدها

Table 8. The name of candidate genes with significant expression in the lipid biosynthesis pathway

نام ژن	شناسه ژن	پرسیدن	بلوغ	گلرنگ	تفاوت بیان معنی‌دار (DEG)	مسیر
FAD2	TRINITY_DN21784_c5_g4	✓	✓	✓	✓	بیوسنتز
FATB	TRINITY_DN24277_c0_g1	✓	✓	✓	✓	متابولیسم
ACX4	TRINITY_DN11211_c0_g1	✓	✓	✓	✓	اسید چرب
NPC3	TRINITY_DN27243_c0_g1	✓	✓	✓	✓	متابولیسم
PDAT1	TRINITY_DN11357_c0_g1	✓	✓	✓	✓	متابولیسم
LPAT1	TRINITY_DN85846_c0_g1	✓	✓	✓	✓	گلیسرولیپید
SDP1	TRINITY_DN10972_c0_g2	✓	✓	✓	✓	گلیسرولیپید
LPAT5	TRINITY_DN3348_c0_g1	✓	✓	✓	✓	گلیسرولیپید
KCS5	TRINITY_DN90740_c0_g1	✓	✓	✓	✓	طویل سازی
KCS1	TRINITY_DN919_c0_g1	✓	✓	✓	✓	طویل سازی
KCS1	TRINITY_DN12002_c0_g2	✓	✓	✓	✓	طویل سازی
C86A1	TRINITY_DN16624_c0_g1	✓	✓	✓	✓	اسید چرب
C86A1	TRINITY_DN919_c0_g1	✓	✓	✓	✓	اسید چرب
AIM1	TRINITY_DN1512_c0_g2	✓	✓	✓	✓	تجزیه اسید
C86A1	TRINITY_DN16624_c0_g1	✓	✓	✓	✓	تجزیه اسید
FABH	TRINITY_DN1512_c0_g2	✓	✓	✓	✓	بیوسنتز
		✓	✓	✓	✓	اسید چرب



شکل ۴. ژن‌های درگیر در مسیرهای رشد دانه گلرنگ با تفاوت بیان معنی‌دار (ژن‌ها با p-value های کمتر از ۰/۰۵). رنگ قرمز:

بیشترین افزایش بیان و سبز: بیشترین کاهش بیان در مسیرهای سنتز دانه

Figure 4. Genes involved in safflower seed development pathways with significant differential expression (genes with p-values less than 0.05). Red: the highest up-regulation and Green: the highest down-regulation in seed development pathways

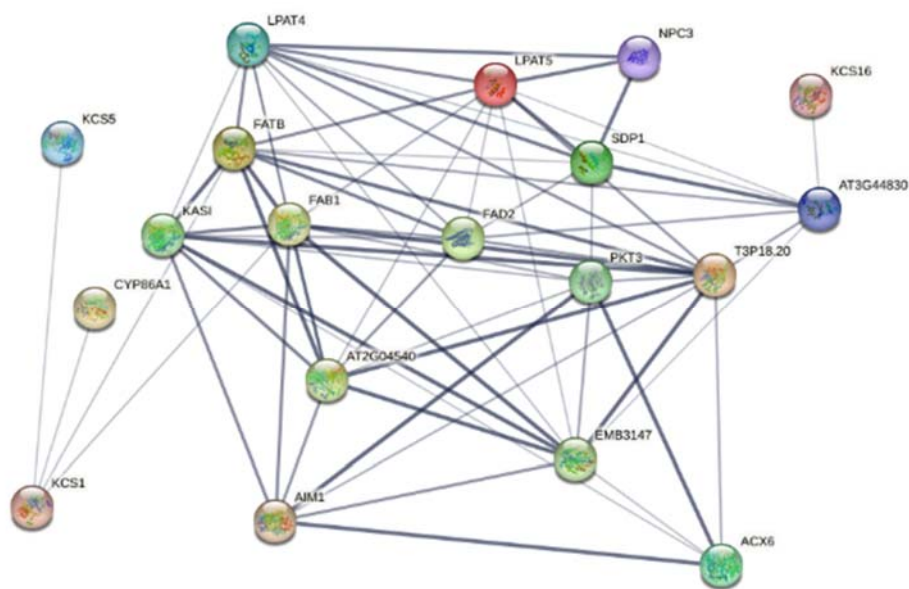
بتا‌اکسیداسیون اسید چرب در طول رشد اولیه و پس از جوانه‌زنی در گونه‌های دانه‌های روغنی را مشاهده کردند. کارکرد این ژن برای استیلاسیون هیستون هسته‌ای و دی‌متیلاسیون DNA در برخی مکان‌های ژنومی مورد نیاز شناخته شده است (Wang et al., 2019).

ژن NPC3 در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید فعالیت داشته و در دوره شروع رشد و بلوغ دانه دارای تفاوت بیان معنی‌داری در گیاهان مورد مطالعه بود. از سوی دیگر این ژن دارای فعالیت خاص فسفاتاز نسبت به اسید لیزوفسفاتیدیک (LPA) بوده و احتمال می‌رود در انتقال سیگنال و ذخیره‌سازی سنتز لیپید نقش داشته باشد. در مطالعه‌ی Ngo و همکاران در رابطه با گیاه آرابیدوپسیس مشخص گردید که این ژن فسفاتیدیل کولین (PC) را برای تولید فسفوکولین و دی‌آسیل گلیسرول DAG کاتالیز می‌کند (Ngo et al., 2018). همچنین ممکن است در سیگنال‌دهی با واسطه براسینوئید در توسعه دانه و ریشه نقش داشته باشد. بالایی از این ژن در طول گرسنگی گیاه و فقدان فسفات و همچنین تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است (Wimalasekera et al., 2010).

ترسیم شبکه میانکنشی پروتئین-پروتئین ژن‌های شناسایی شده به نرم‌افزار

در آنالیز پژوهش حاضر شبکه میانکنش ژن‌های کاندید در بیوسنتز اسید چرب دانه با استفاده از مجموعه اطلاعات پایگاه‌های داده UniProt, IMEx, BioGrid, BAR پس از فیلترکردن داده‌های مربوط به گیاهانی غیر از آرابیدوپسیس تالینا شبکه بدست آمده در پایگاه داده STRING آنالیز شد. سپس در شبکه میانکنشی پروتئین-پروتئین ژن‌های کاندید و ژن‌های با بیان معنی‌دار در نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳٫۹ شکل‌سازی شد. تعداد ژن‌های مرتبط بیانی بصورت گره‌های شبکه‌ای در نرم‌افزار مشاهده می‌شود و رنگ هر یک از گره‌ها به پروتئین مورد نظر اشاره دارد.

ژن ACX4 در مسیر متابولیسم اسید چرب دارای فعالیت معنی‌داری (بیان بالا) می‌باشد. این ژن در بتا‌اکسیداسیون پراکسی‌زومی اسیدهای چرب در ذخیره‌سازی بذر فعال می‌باشد (Adham et al., 2005). در مرحله پرشدن دانه و به خصوص مرحله بلوغ دانه گیاه گلرنگ بیان معنی‌داری مشاهده شد. وانگ و همکاران با مطالعه‌ی ژن مورد نظر فعالیت کاتالیزی در اولین مرحله



شکل ۵. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن‌های کاندید در بیوسنتز اسید چرب دانه

Figure 5. Protein-protein interaction network of candidate genes involved in fatty acid biosynthesis of seed

هیدرولیز تری گلیسرول بوده تا اسیدهای چرب و گلیسرول را آزاد کند.

ژن KCS5 در تولیدسازی اسید چرب دارای بیان بالا بوده و در مراحل غنی‌سازی و بلوغ دانه فعالیت بالایی دارد. این ژن در برخی دانه‌های روغنی مانند سویا در هر دو مسیر دکربونیل‌اسیون و سنتز آسید نقش دارد که عمدتاً با اسیدهای چرب اشباع، به ویژه 16:0, 16:1, 18:0, 20:0 فعال است و واسطه سنتز VLCFA از ۲۰ تا ۲۶ کربن می‌باشد. این ژن در بیوسنتز سوپرین و موم کوتیکولی نقش داشته و فعالیت آن در گلرنگ نیز مانند دیگر گیاهان دانه روغنی می‌باشد (Todd et al., 1999).

ژن C86A1 که در مسیر تولیدسازی اسید چرب فعالیت داشته در هر دو مرحله شروع رشد و بلوغ دانه بیان معنی‌داری (بیشترین بیان) دارد و در اکثر گیاهان مورد مطالعه دارای بیان معنی‌داری می‌باشد (Rupasinghe et al., 2007). در مطالعات انجام شده این ژن در هیدروکسیلاسیون اسیدهای چرب مختلف و کاتالیز آنها فعالیت مستقیم و موثری دارد. بدینگونه که روی اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع با طول زنجیره C12 تا C18 عمل می‌کند.

ژن PAS2 در تولیدسازی اسید چرب فعال بوده و دارای بیان معنی‌دار (با بیشترین کاهش بیان) می‌باشد. این ژن سومین واکنش از چهار واکنش چرخه افزایش طول اسیدهای چرب زنجیره بلند را کاتالیز می‌کند. در شبکه آندوپلاسمی باعث افزوده شدن دو کربن به زنجیره اسیدهای چرب با زنجیره بلند VLCFA در هر چرخه می‌شود. ژن PAS2 در هر چرخه ازدیاد طول اسید چرب، ۳-هیدروکسی سیل-CoA را به ترانس-۲،۳-انیول-CoA کاتالیز می‌کند. بنابراین در تولید VLCFA با طول‌های زنجیره مختلف که در فرایندهای بیولوژیکی متعدد به عنوان پیش‌ساز لیپیدهای غشایی و واسطه‌های لیپیدی درگیر هستند شرکت می‌کند (Yang et al., 2018). همچنین در کنترل هورمونی تقسیم و تمایز سلولی نقش دارد (Bach et al., 2011).

ژن AIM1 که مطالعات بسیار کمی درباره عملکرد این ژن در گیاهان دانه روغنی وجود دارد، در پژوهش

ژن PDAT به عنوان محصول نهایی در سنتز تری‌آسید گلیسرول (تری‌گلیسرید) می‌باشد که به نظر می‌رسد PDAT در مسیر شروع رشد دانه بیشترین فعالیت را دارد. ژن فسفولیپید دی‌آسید گلیسرول که باعث تجمع اسید چرب هیدروکسی و TAG در دانه شده و دارای چندین هومولوگ می‌باشد با ژن DAG1 همپوشانی داشته و ذخیره اسید چرب را تا ۲۵ درصد افزایش می‌دهد (Kim et al., 2011)، که برای سنتز تری گلیسرول و رشد طبیعی دانه‌ها و گرده‌ها ضروری است (Li et al., 2010).

در پژوهش خوزه ماریا و همکاران ژن LPAT2 باعث افزایش سنتز اسید چرب گشته و یکی از مهم‌ترین ژن‌ها در مسیر و چرخه بیوسنتز TGA می‌باشد (Rupasinghe et al., 2007) و لایزوفسفاتیدیک اسید را به فسفاتیدیک اسید تبدیل کرده و همزمان با تجمع تری گلیسرول در دانه بیان می‌شود (Arroyo-Caro et al., 2013). همچنین این ژن باعث افزایش میزان روغن و دوره رشد جنین در آراییدوپسیس و گیاه کرچک می‌شود (Arroyo-Caro et al., 2013). در مطالعات حاضر این ژن بیان معنی‌داری را در مراحل رشد دانه به خصوص در گیاهان کم‌لینا و سویا نشان داد.

ژن SDP1 ژن تنظیمی بوده و باعث ازدیاد اسیدهای چرب در بذر گشته و نقشی اساسی در چرخه زندگی بسیاری از گیاهان ایفا می‌کند اما همواره مکانیسم مولکولی این ژن ناشناخته است. این ژن تری‌آسید گلیسرول‌ها و دی‌آسید گلیسرول‌ها را هیدرولیز می‌کند (Eastmond, 2006). نتایج تحقیقات Fan و همکاران نشان می‌دهد که لیپین‌های آراییدوپسیس همراه با SDP1، به‌طور هم‌افزایی در هدایت FA^۴ (اسید چرب) به سمت اکسیداسیون بتا پراکسی‌زومال از طریق واسطه‌های TAG عمل می‌کنند و در نتیجه هموستاز لیپید غشایی را در برگ‌ها حفظ می‌کنند (Fan et al., 2014). در پژوهش حاضر ژن SDP1 در مسیر متابولیسم گلیسرولیپید شناسایی شد و بیان آن در مرحله پرشدن دانه مشخص گردید. احتمال دارد این ژن در گلرنگ عامل

مطالعه حاضر بر روی شبکه ژنی و رابطه بین ژنی احتمال می‌رود این ژن‌ها در گلرنگ نیز در بالا رفتن سطح اسیدهای چرب غیراشباع نقش کلیدی داشته باشد. از طرفی دیگر ژن SDP1 یک ایزوآنزیم در پایین دست ژن FATB بوده و ژنی کلیدی در بیوسنتز تری آسید گلیسرول TAG می‌باشد (Brown *et al.*, 2012). براساس پژوهش Jingyu Xu و همکاران (Xu *et al.*, 2012)، رابطه ژن‌های PDAT و LPAT که هر دو در مراحل شروع رشد، پرشدن و همچنین بلوغ دانه اثر مستقیم داشته و باعث افزایش تری گلیسرول در دانه می‌شوند، به عنوان سوبسترای مشترک برای کاتالیز TAG در دانه فعالیت دارند و طبق آنالیز بیانی این دو ژن احتمال می‌رود در گلرنگ نیز فعالیت مشابهی را داشته باشند. در پژوهشی که توسط مرکز بیولوژی مولکولی دانشگاه نوادا انجام شده است نتایجی در مورد روابط بین ژن‌های KCS و C86A1 منتشر شده که نشان می‌دهد هر دو ژن در یک شبکه ژنی مشترک در سیگانالینگ و بیوسنتز اسید چرب در اثر تنش به خشکی گیاه دارای فعالیت بالقوه و کلیدی می‌باشند (Cochetel *et al.*, 2020). چن و همکاران با مطالعه ژن‌های فعال با بیشترین بیان مؤثر در سنتز اسید چرب و همچنین فاکتورهای رونویسی دخیل در مسیرهای متابولیسم اسید چرب گیاه کلزا، رابطه ژن‌های FABH و KAS و همچنین ژن پایین دست این گروه مانند AIM1 که در بیوسنتز لیپید دانه و همچنین سنتز اسید اولئیک نقش تنظیمی و کلیدی دارد را شناسایی کرده و مورد نقشه‌برداری قرار دادند (Chen *et al.*, 2015). به دلیل ارتباط شبکه‌ای این ژن‌ها در گیاه کلزا و فعالیت در مسیر بیوسنتز اسید چرب گلرنگ احتمال ارتباط این ژن‌ها در گلرنگ نیز بسیار زیاد است.

در نتایج حاصل از آنالیز شبکه ژنی و روابط بین ژن‌ها Abdullah و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی متاترنسکرپتوم ژن‌های دخیل در سنتز و ذخیره اسیدهای چرب گیاه کمینا، با افزایش بیان ژن‌های کدکننده لیپید مانند پیروات، لیپازها و فسفولیپازها افزایش بیان ژن DGAT که در پایین دست مسیر بیانی قرار دارد و همچنین با بیان آنزیم آسید ترانسفراز افزایش بیان ژن‌های LPAT و SDP نیز که در تولید سازی اسید چرب و ذخیره سازی دانه‌های در حال رشد ضروری

حاضر دارای فعالیت در هر دو مرحله رشد دانه دارای بیان معنی‌داری بود. این ژن در بتاکسیداسیون اسیدهای چرب پراکسیزومال نقش داشته و فعالیت enoyl-CoA هیدراتاز در زنجیره کوتاه (C4-C6) و فعالیت ۳-hydroxyacyl-CoA دهیدروژناز در زنجیره‌های کربنی (C6-C16) دارد (Podkovyrov & Larson, 1996). در تحقیق Delkar و همکاران این ژن در مسیر پراکسیزومی بتاکسیداسیون بیوسنتز اسید بنزوئیک (BA) نقش داشته و برای تجمع گلوکوزینولات‌های بنزوئیک (BGs) و استرهای کولین هیدروکسی بنزوئیک در دانه‌ها که متابولیت‌های ثانویه حاوی BA هستند نقش کلیدی دارد. همچنین وجود این ژن برای سنتز اسید سالیسیلیک (SA) دانه‌ها ضروری است (Delker *et al.*, 2007).

ژن FABH که در نمونه‌های حاضر مورد مطالعه شناسایی شد در متابولیسم گلیسرولیپید فعالیت داشته و در مراحل رشد دانه شامل پرشدن و بلوغ بیان معنی‌داری دارد. پیشتر این ژن در گیاهان دانه روغنی مانند سویا و کلزا شناسایی شده بود که اسیدهای چرب را با افزودن دو کربن از مالونیل-ACP به یک گیرنده آسیدی کاتالیز می‌کند، دارای هر دو فعالیت استواسیتیل-ACP سنتاز و استیل ترانس اسیلاز بوده و آنزیم‌های بیوسنتزی اسیدهای چرب را کد می‌کند (Verwoert *et al.*, 1995).

شبکه ژنی

پس از یافتن ژن‌های کلیدی درگیر در مسیرهای بیوسنتز اسید چرب برای تعیین روابط موجود بین آنها شبکه‌ای بر پایه روابط پروتئین-پروتئین ژن‌های شناسایی شده از طریق پایگاه داده STRING بدست آمد و برهمکنش شبکه ژنی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape شکل‌سازی گردیده (شکل ۵) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ژن‌های FAD2 در بالای دست ژن SDP1 و همچنین ژن FATB به عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز اسید چرب و در طول زنجیره‌های کربنی دسچورازها (اسیدهای چرب غیراشباع) نقش اساسی دارند. به گفته هانگ و همکاران (Huang *et al.*, 2016) سطح بالای بیانی در این ژن‌ها با بالا رفتن سنتز اسید لینولئیک به کلیدی بودن این ژن‌ها دلالت دارد و در

نتیجه‌گیری

به طور کلی در این تحقیق با استفاده از فناوری ترنسکریپتومیکس مقایسه‌ای به تجزیه و تحلیل و شناسایی ژن‌های موثر در مسیر رشد و نمو دانه گلرنگ پرداخته شده است. نتایج به دست آمده از این پژوهش با رویکرد متاترنسکریپتومی اطلاعات ارزشمندی از فرایند سنتز و ذخیره روغن دانه گلرنگ ارائه داده است. بر این اساس، ژن‌های FAD2 و FATB در مراحل پرشدن و بلوغ دانه با بیان معنی‌دار و ژن PDAT1 در مسیر متابولیسم گلیسرولپید، ژن AIM1 در مسیر تجزیه اسید چرب و همچنین بر پایه شبکه پروتئین-پروتئین و روابط بین ژن‌ها ژن PDAT1 به عنوان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز روغن دانه شناسایی شدند. بنابراین با بررسی و شناسایی روابط تنظیم‌کننده‌ها و روابط تنظیمی ژن‌های شناسایی شده به عنوان بیومارکر در مسیر تولید و ارقام مهندسی شده با استفاده از فرایبان ژن‌های گزارش شده می‌تواند در برنامه‌های پژوهشی آینده در جهت بهبود تولید و کمیت و کیفیت روغن دانه مورد استفاده قرار گیرد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

می‌باشند به ترتیب شناسایی شده‌اند. (Abdullah *et al.*, 2018). علاوه بر این بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسیر سنتز آسیل ترانسفراز ۴ (GPAT4) و لیزوفسفاتیدیل آسیل ترانسفراز ۴ (LPAT4) و ژن‌های کدکننده فسفولیپیدهای موضعی غشایی، فسفاتیدیک اسید فسفاتاز (PAP2) و فسفولیپاز غیر اختصاصی (NPC) برای تامین دی‌آسیل گلیسرول‌ها (DAGs) همزمان با بیان DGAT بالا می‌رود (Sharma *et al.*, 2008). لذا از آنجا که بسیاری از ژن‌هایی که در مسیر بیانی معنی‌دار شناسایی شدند، احتمال می‌رود ژن‌های کاندید NPC، SDP و LPAT در مطالعه حاضر نیز در مسیر پرشدن، حمل و نقل و به‌خصوص بلوغ و ذخیره سازی لیپیدها نقش کلیدی داشته باشند. طبق پژوهش و تحقیق Khan و همکاران روی بتااکسیداسیون اسیدهای چرب در آرابیدوپسیس، نقش ژن ACX4 و هومولوگ‌های آن در پراکسی‌زوم‌ها که اکسیداسیون اولیه اسیدهای چرب در این ناحیه صورت می‌گیرد و هر ژن ACX روی طول زنجیره خاصی فعالیت دارد و با افزایش بیان این ژن فعالیت بتااکسیداسیون بتا نیز افزایش می‌یابد (Khan *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر نیز دیده شد که ژن ACX6 با ژن AIM1 فعالیت مشابهی داشته و هر دو ژن در مراحل پرشدن و بلوغ دانه فعال می‌باشند. لذا احتمال می‌رود این دو ژن با یکدیگر همپوشانی داشته باشند که منجر به بتااکسیداسیون اسید چرب دانه گلرنگ شود.

References

- Abdullah, H. M., Chhikara, S., Akbari, P., Schnell, D. J., Pareek, A., & Dhankher, O. P. (2018). Comparative transcriptome and metabolome analysis suggests bottlenecks that limit seed and oil yields in transgenic *Camelina sativa* expressing diacylglycerol acyltransferase 1 and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnol Biofuels*, 11, 335. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1326-2>
- Adham, A. R., Zolman, B. K., Millius, A., & Bartel, B. (2005). Mutations in Arabidopsis acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation. *Plant J*, 41(6), 859-874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02343.x>
- Andhale, R., & Md, S. (2018). Fatty acid profile and quality assessment of safflower (*Carthamus tinctorius*) oil. 7(2).
- Arroyo-Caro, J. M., Chileh, T., Kazachkov, M., Zou, J., Alonso, D. L., & García-Maroto, F. (2013). The multigene family of lysophosphatidate acyltransferase (LPAT)-related enzymes in *Ricinus communis*: cloning and molecular characterization of two LPAT genes that are expressed in castor seeds. *Plant Sci*, 199-200, 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.09.015>
- Bach, L., Gissot, L., Marion, J., Tellier, F., Moreau, P., Satiat-Jeunemaitre, B., Palauqui, J. C., Napier, J. A., & Faure, J. D. (2011). Very-long-chain fatty acids are required for cell plate formation during cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci*, 124(Pt 19), 3223-3234. <https://doi.org/10.1242/jcs.074575>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

- Bonaventure, G., Salas, J. J., Pollard, M. R., & Ohlrogge, J. B. (2003). Disruption of the FATB gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell*, 15(4), 1020-1033. <https://doi.org/10.1105/tpc.008946>
- Brown, A. P., Kroon, J. T., Swarbreck, D., Febrer, M., Larson, T. R., Graham, I. A., Caccamo, M., & Slabas, A. R. (2012). Tissue-specific whole transcriptome sequencing in castor, directed at understanding triacylglycerol lipid biosynthetic pathways. *PLoS One*, 7(2), e31010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030100>
- Chen, J., Hu, Y., Zhao, T., Huang, C., Chen, J., He, L., Dai, F., Chen, S., Wang, L., Jin, S., & Zhang, T. (2024). Comparative transcriptomic analysis provides insights into the genetic networks regulating oil differential production in oil crops. *BMC Biology*, 22(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01909-x>
- Chen, J., Tan, R. K., Guo, X. J., Fu, Z. L., Wang, Z., Zhang, Z. Y., & Tan, X. L. (2015). Transcriptome Analysis Comparison of Lipid Biosynthesis in the Leaves and Developing Seeds of Brassica napus. *PLoS One*, 10(5), e0126250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126250>
- Cochetel, N., Ghan, R., Toups, H. S., Degu, A., Tillett, R. L., Schlauch, K. A., & Cramer, G. R. (2020). Drought tolerance of the grapevine, Vitis champinii cv. Ramsey, is associated with higher photosynthesis and greater transcriptomic responsiveness of abscisic acid biosynthesis and signaling. *BMC Plant Biol*, 20(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2012-7>
- Dar, A. A., Choudhury, A. R., Kancharla, P. K., & Arumugam, N. (2017). The FAD2 Gene in Plants: Occurrence, Regulation, and Role. *Front Plant Sci*, 8, 1789. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01789>
- Delker, C., Zolman, B. K., Miersch, O., & Wasternack, C. (2007). Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana requires peroxisomal beta-oxidation enzymes--additional proof by properties of pex6 and aim1. *Phytochemistry*, 68(12), 1642-1650. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.024>
- Dörmann, P., Voelker, T. A., & Ohlrogge, J. B. (2000). Accumulation of palmitate in Arabidopsis mediated by the acyl-acyl carrier protein thioesterase FATB1. *Plant Physiol*, 123, 644-652. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.637>
- Du, C., Chen, Y., Wang, K., Yang, Z., Zhao, C., Jia, Q., Taylor, D. C., & Zhang, M. (2018). Strong co-suppression impedes an increase in polyunsaturated fatty acids in seeds overexpressing FAD2. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 985-994. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery378>
- Eastmond, P. J. (2006). SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell*, 18(3), 665-675. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040543>
- Fan, J., Yan, C., Roston, R., Shanklin, J., & Xu, C. (2014). Arabidopsis lipins, PDAT1 acyltransferase, and SDPI triacylglycerol lipase synergistically direct fatty acids toward β -oxidation, thereby maintaining membrane lipid homeostasis. *Plant Cell*, 26(10), 4119-4134. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130377>
- Gan, Y., Song, Y., Chen, Y., Liu, H., Yang, D., Xu, Q., & Zheng, Z. (2018). Transcriptome analysis reveals a composite molecular map linked to unique seed oil profile of Neocinnamomum caudatum (Nees) Merr. *BMC Plant Biol*, 18(1), 303. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1525-9>
- Geng, X., Dong, N., Wang, Y., Li, G., Wang, L., Guo, X., Li, J., Wen, Z., & Wei, W. (2018). RNA-seq transcriptome analysis of the immature seeds of two Brassica napus lines with extremely different thousand-seed weight to identify the candidate genes related to seed weight. *PLoS One*, 13(1), e0191297.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, 29(7), 644-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Huang, J., Zhang, T., Zhang, Q., Chen, M., Wang, Z., Zheng, B., Xia, G., Yang, X., Huang, C., & Huang, Y. (2016). The mechanism of high contents of oil and oleic acid revealed by transcriptomic and lipidomic analysis during embryogenesis in Carya cathayensis Sarg. *BMC genomics*, 17, 113. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2434-7>
- Khan, B. R., Adham, A. R., & Zolman, B. K. (2012). Peroxisomal Acyl-CoA oxidase 4 activity differs between Arabidopsis accessions. *Plant Mol Biol*, 78(1-2), 45-58. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9843-4>

- Kim, H. U., Lee, K. R., Go, Y. S., Jung, J. H., Suh, M. C., & Kim, J. B. (2011). Endoplasmic reticulum-located PDAT1-2 from castor bean enhances hydroxy fatty acid accumulation in transgenic plants. *Plant Cell Physiol*, 52(6), 983-993. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr051>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12, 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, R., Yu, K., & Hildebrand, D. F. (2010). DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids*, 45(2), 145-157. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3385-4>
- Liu, R., Holik, A. Z., Su, S., Jansz, N., Chen, K., Leong, H. S., Blewitt, M. E., Asselin-Labat, M. L., Smyth, G. K., & Ritchie, M. E. (2015). Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. *Nucleic Acids Res*, 43(15), e97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv412>
- Ngo, A. H., Lin, Y. C., Liu, Y. C., Gutbrod, K., Peisker, H., Dörmann, P., & Nakamura, Y. (2018). A pair of nonspecific phospholipases C, NPC2 and NPC6, are involved in gametophyte development and glycerolipid metabolism in Arabidopsis. *New Phytol*, 219(1), 163-175. <https://doi.org/10.1111/nph.15147>
- Oecd, F. (2022). OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031 .
- Podkovyrov, S. M., & Larson, T. J. (1996). Identification of promoter and stringent regulation of transcription of the fabH, fabD and fabG genes encoding fatty acid biosynthetic enzymes of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, 24(9), 1747-1752. <https://doi.org/10.1093/nar/24.9.1747>
- Omidi, A. H., Shahsavari, M. R., Elhani, a., Jahanbin, A. (2011). Selection of New Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Genotypes for Different Climatic Conditions Using some Stability Parameters. *Seed and Plant*, 27(3), 278-303. <https://doi.org/10.22092/spij.2017.111065>
- Rupasinghe, S. G., Duan, H., & Schuler, M. A. (2007). Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in Arabidopsis thaliana. *Proteins*, 68(1), 279-293. <https://doi.org/10.1002/prot.21335>
- Sharma, N., Anderson, M., Kumar, A., Zhang, Y., Giblin, E.M., Abrams, S.R., Zaharia, L.I., Taylor, D.C., & Fobert, P.R. (2008). Transgenic increases in seed oil content are associated with the differential expression of novel Brassica-specific transcripts. *BMC genomics*, 9, 619. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-619>
- Singh, V., & Nimbkar, N. (2016). Chapter 7- Safflower. In S. K. Gupta (Ed.), *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production* (pp. 149-167). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801309-0.00007-0>
- Soneson, C., Love, M. I., & Robinson, M. D. (2015). Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res*, 4, 1521. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7563.2>
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D362-D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
- Todd, J., Post-Beittenmiller, D., & Jaworski, J. G. (1999). KCS1 encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 17(2), 119-130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1999.00352.x>
- Verwoert, II, van der Linden, K. H., Walsh, M. C., Nijkamp, H. J., & Stuitje, A. R. (1995). Modification of Brassica napus seed oil by expression of the Escherichia coli fabH gene, encoding 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *Plant Mol Biol*, 27(5), 875-886. <https://doi.org/10.1007/bf00037016>
- Wang, L., Wang, C., Liu, X., Cheng, J., Li, S., Zhu, J. K., & Gong, Z. (2019). Peroxisomal β -oxidation regulates histone acetylation and DNA methylation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(21), 10576-10585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904143116>
- Wimalasekera, R., Pejchar, P., Holk, A., Martinec, J., & Scherer, G. F. (2010). Plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipases C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant*, 3(3), 610-625. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq005>
- Xu, J., Carlsson, A. S., Francis, T., Zhang, M., Hoffman, T., Giblin, M. E., & Taylor, D. C. (2012). Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on re-acylation of LPC by LPCAT2. *BMC Plant Biol*, 12, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-4>
- Yang, T., Yu, Q., Xu, W., Li, D.-z., Chen, F., & Liu, A. (2018). Transcriptome analysis reveals crucial genes involved in the biosynthesis of nervonic acid in woody Malania oleifera oilseeds. *BMC Plant Biology*, 18(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1463-6>

- Yesilyurt, M. K., Cesur, C., Aslan, V., & Yilbasi, Z. (2020). The production of biodiesel from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil as a potential feedstock and its usage in compression ignition engine: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109574>
- Yuan, M., Zhu, J., Gong, L., He, L., Lee, C., Han, S., Chen, C., & He, G. (2019). Mutagenesis of FAD2 genes in peanut with CRISPR/Cas9 based gene editing. *BMC Biotechnology*, 19(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0516-8>
- Zhou, L., Lu, L., Chen, C., Zhou, T., Wu, Q., Wen, F., Chen, J., Pritchard, H. W., Peng, C., & Pei, J. (2022). Comparative changes in sugars and lipids show evidence of a critical node for regeneration in safflower seeds during aging. *Frontiers in Plant Science*, 13.

Setting up the DNA Ladder Production Line in order to Use in Electrophoresis

Amin Sahandi Khalifeh-Kandy¹, Maghsoud Pazhouhandeh² 

1. M.Sc., Department of Biotechnology, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

Current Address: Biology Teacher, Azadegan High School, Maragheh

2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

Correspondence:

Maghsoud Pazhouhandeh

Email: pazhouhandeh@gmail.com

Received: 25, Nov. 2024

Accepted: 17, Feb. 2025

How to cite:

Sahandi Khalifeh-Kandy, A., & Pazhouhandeh, M. (2025). Setting up the DNA ladder Production line in order to use in electrophoresis. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 19-27.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72897.1991](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72897.1991))

ABSTRACT

DNA markers are the solution of DNA fragments of different lengths. These markers are used to evaluate the results of the polymerase chain reactions (PCR) and the enzymatic digestion reactions, to confirm the vectors containing the desired DNA fragment, to study the genetic variation by molecular markers in different organisms and in other methods used in molecular genetics, biotechnology and in medical diagnostic applications. DNA ladder is an essential tool in agarose or polyacrylamide gel electrophoresis and its price is high due to the high production cost. By comparing the movement of known fragments of a ladder on the electrophoresis gel, the size (base pair) of unknown fragments obtained in a test can be estimated. In this study a new method for producing a high-consumption and low-production-cost DNA size marker was presented. The PCR technique was performed on a plant gene to obtain the desired fragments with different sizes of 100 bp. The interested fragments were cloned separately into pKS plasmid using an enzymatic digestion site at both ends. The recombinant plasmids were amplified in bacteria. Finally, by a simple enzymatic digestion with a common enzyme (*Bam*HI) on plasmids extracted from bacteria, all the necessary fragments were obtained to produce the expected DNA size marker. In this applicable research, the production line of a DNA marker was set up. This produced ladder with a range of 100 to 3000 bp fragments has a wide use in medical research and diagnosis. With its industrial production, the market will be supplied at a much lower cost.

KEYWORDS

Cloning, DNA Ladder, Electrophoresis, PCR.



«مقاله پژوهشی»

راه اندازی خط تولید مارکر اندازه DNA برای استفاده در الکتروفورز

امین سهندی خلیفه کندی^۱، مقصود پژوهنده^۲

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
آدرس جدید: دبیر زیست شناسی، دبیرستان نمونه آزادگان، مراغه
۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

نویسنده مسئول:

مقصود پژوهنده

رایانامه: pazhouhandeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۹

استناد به این مقاله:

سهندی خلیفه کندی، امین و پژوهنده، مقصود (۱۴۰۴). راه اندازی خط تولید مارکر اندازه DNA برای استفاده در الکتروفورز، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۲۷-۱۹.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72897.1991](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72897.1991))

چکیده

مارکرهای DNA محلول‌هایی از قطعات DNA با طول‌های مختلف هستند. این مارکرها برای بررسی نتایج واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز، واکنش‌های برش آنزیمی، بررسی وکتورهای حاوی قطعه DNA مورد نظر، بررسی تنوع ژنتیکی در مارکرهای مولکولی موجودات مختلف و سایر روش‌های مورد استفاده در ژنتیک مولکولی، بیوتکنولوژی و تشخیص طبی کاربرد دارند. مارکر اندازه DNA یک ابزار ضروری در انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز و پلی‌آکریل‌آمید می‌باشد که به سبب بالا بودن هزینه تولید، قیمت بالایی دارد. با مقایسه میزان حرکت قطعات شناخته شده مارکر بر روی ژل در الکتروفورز می‌توان اندازه قطعات مجهول حاصل از آزمایش را بر حسب جفت باز تخمین زد. در این پژوهش شیوه‌ای جدید برای تولید یک مارکر اندازه DNA با قابلیت مصرف بالا و هزینه تولید پایین‌تر ارائه گردید. ابتدا جهت دست‌یابی به قطعات با اندازه‌های مورد نظر با تفاوت ۱۰۰ جفت باز از PCR روی یک ژن گیاهی استفاده شد. قطعات مورد نظر بطور جداگانه به کمک سایت برشی یک آنزیم در پلاسمید pKS همسانه‌سازی گردید. پلاسمیدهای نو ترکیب با انتقال به باکتری تکثیر یافتند. در نهایت از طریق برش آنزیمی با تنها یک آنزیم رایج (BamHI) روی مخلوط پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌ها، تمام قطعات مورد نیاز برای تولید مارکر اندازه DNA مورد انتظار بدست آمدند. در این پژوهش کاربردی مقدمات و خط تولید یک مارکر DNA راه اندازی شد. مارکر تولیدی با طیفی از قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز می‌تواند قابلیت استفاده وسیعی در تحقیقات مولکولی و تشخیص طبی داشته باشد. با تولید صنعتی آن نیاز بازار کشور از لحاظ تامین این ماده وارداتی با هزینه‌ای بسیار پایین‌تر برطرف می‌شود.

واژه‌های کلیدی

الکتروفورز، مارکر DNA، همسانه‌سازی، PCR.

مقدمه

با پیشرفت تکنیک های ژنتیک مولکولی و دستکاری ژنتیکی، مارکرهای اندازه DNA استاندارد مورد نیاز می باشد تا از طریق مقایسه میزان حرکت قطعات شناخته شده آن بر روی ژل در تکنیک الکتروفورز بتوان اندازه قطعات مجهول حاصل از آزمایشات مختلف را بر حسب جفت باز تخمین زد. مارکرهای DNA همچنین در بررسی اولیه قطعات حاصل از برش آنزیمی، بررسی نتایج واکنش های زنجیره ای پلیمرز، بررسی وکتورهای حاوی قطعه DNA موردنظر و در سایر روش های مولکولی کار با DNA مورد استفاده قرار می گیرند (Saidijam et al., 2011). مارکرهای DNA محلول هایی از قطعات DNA با طول های متفاوت هستند (Lan et al., 2012). در واقع DNA مارکرها از ابزارهای ضروری در فرایند الکتروفورز بر روی ژل آگارز و پلی آکریل آمید می باشند (Ye et al., 2012). همچنین از DNA مارکرها به منظور تعیین وزن مولکولی قطعات مورد مطالعه و بررسی کمی قطعات DNA هدف استفاده می شود (Zhang et al., 2012). بطور معمول DNA مارکرها از طریق برش آنزیمی DNA های طبیعی بطور مثال، DNA ژنومی فاژ لامبدا یا سوسک *Tenibrio molitor* تهیه می شوند. همچنین DNA مارکرها از طریق برش وکتورهای مصنوعی ایجاد می شوند. از روش های دیگر در تهیه DNA مارکرها استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز و ساخت قطعات کوچک DNA به صورت شیمیایی است (Ye et al., 2012).

پیشینه پژوهش

ساده ترین راه تهیه DNA مارکر استفاده از الگوی برش آنزیمی انواع فاژها یا پلاسمیدهایی است که نقشه محل برش آنها توسط آنزیم های اندونوکلاز محدود الاثر مشخص می باشد. قطعات حاصل از این روش به نوع آنزیم های اندونوکلاز، ترکیب بازی ژنوم و شرایط برش آنزیمی بستگی دارد. انواع مختلفی از فاژها و پلاسمیدها در این راستا به کار گرفته شده اند (Cooney, 1994; Chen et al., 2009; Wang et al., 2010). این روش

با وجود سادگی دارای کاستی هایی از قبیل فقدان الگویی منظم برای افزایش طول قطعات، متغیر بودن غلظت هر قطعه به خاطر تفاوت در وزن مولکولی نسبی آنها و نیز اتفاقی بودن محل های برش آنزیمی است و در نتیجه استفاده از آنها را با مشکل همراه می سازد. بنابراین برای افزایش دقت در تعیین اندازه و سادگی استفاده، وجود باندهای فراوان با محدوده اندازه هایی منطقی و پرکاربرد که به صورت منظم و مساوی افزایش می یابند بسیار سودمند خواهد بود (Saidijam et al., 2011). در روش واکنش زنجیره ای پلیمرز قطعات تولید شده قابل طراحی در اندازه های مطلوب می باشند. اما مشکل اصلی این روش پیچیدگی و هزینه بر بودن آن به واسطه استفاده از چندین مجموعه آغازگر است که هر یک به نوبه خود نیازمند برنامه دهی منحصر به فرد PCR به ماشین بوده و از طرفی هزینه ساخت تعداد زیادی آغازگر به لحاظ اقتصادی برای هر بار تولید مارکر مقرون به صرفه نمی باشد (Wang et al., 2010). در روش دیگری با به کارگیری تکنیک های کلونینگ، PCR و برش جزئی توسط آنزیم های اندونوکلاز قطعات DNA ۱۰۰ جفت بازی حاوی یک سایت برشی در دو انتها را از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز سنتز و بعد از برش با آنزیم برشی آنها را طی فرایند خود اتصالی به یکدیگر متصل و ساختاری تکراری از این قطعات را تولید کردند. ساختارهای تکراری حاصل را با استفاده از آنزیم اندونوکلاز مناسب به صورت جزئی برش داده و DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی را تهیه نمودند (Lan et al., 2012). در روشی دیگر به منظور تهیه DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی از تکنیک PCR چندگانه (Multiplex) استفاده شد. در این روش، قطعات DNA ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده براساس ناحیه ۶۶۳۱ تا ۷۶۳۰ DNA فاژ لامبدا تکثیر یافتند. قطعات DNA هدف با استفاده از تلفیق Touchdown PCR و Hot start PCR تکثیر، سپس بوسیله فنل کلروفرم خالص سازی و بعد از رسوب توسط اتانول در نهایت بطور کامل مخلوط شدند. در این روش، تمام قطعات DNA بطور موفقیت آمیز در یک واکنش PCR سنتز و تمام باندهای حاصل از این قطعات

روش شناسی پژوهش

به منظور سنتز و حصول قطعات با اندازه های مختلف جهت استفاده در مارکر ابتدا با PCR، آغازگرهای مناسب با الگو قراردادن ژن CLF گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا و از طریق نرم افزار A plasmid Editor (ApE) طراحی شدند. ژن CLF یک ژن در مسیر اپی ژنتیک گلدهی در این گیاه هست که در آزمایشگاه به تازگی همسانه سازی و توالی یابی شده بود و در دسترس بود و دلیل اصلی استفاده از این ژن بزرگ بودن آن بود که امکان تکثیر تا ۲۷۰۰ جفت باز را برای ما فراهم می ساخت. در طراحی آغازگرها یک آغازگر مستقیم برای ابتدای ژن و ۱۵ آغازگر معکوس به ترتیب به نواحی ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۲۷۰۰ جفت بازی با فاصله از ابتدای این ژن طراحی گردید (جدول ۱). به منظور همسانه سازی قطعات فوق در ابتدای آغازگرها سایت برشی آنزیم BamHI یعنی GGATCC قرارداده شد. توالی آغازگرهای طراحی شده به منظور سنتز به شرکت تکاپوزیست فرستاده شدند.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Primer	Sequence
F	aaGGATCCATGGCGTCAGAAGCTTCGCC
R1	aaGGATCCTGATACTTCCTTAGAAGCTG
R2	aaGGATCCGAGTAATAGCAAACAATTC
R3	aaGGATCCCGCTTTTCATACCTGGCGA
R4	aaGGATCCAGGACGTAAGGAAATTTTGA
R5	aaGGATCCTTCGACCCACTACAGACTGG
R6	aaGGATCCTCCAAAAAATCTCTTTTTC
R7	aaGGATCCTTCACTAGTACTTCTAGACA
R8	aaGGATCCCTCCTTCCATATCTTTGTG
R9	aaGGATCCGGTTTCTCAGCCGAAAAAT
R10	aaGGATCCAATGGTGCCATATCCCGGAA
R12	aaGGATCCGCGATGATGAAACTTTATC
R15	aaGGATCCTCATTTGACTGGCAACAGG
R20	aaGGATCCAAGGACATTCTTCCACAA
R25	aaGGATCCAGGTTTCAGGAGAATGGTTGG
R27	aaGGATCCCTAAGCAAGCTTCTTGGGTC

قطعات مورد نظر از طریق واکنش زنجیره ای پلی مراز و با آغازگرهای اختصاصی (آغازگر مستقیم برای تمام قطعات یکسان و آغازگرهای معکوس اختصاصی می باشند) در حجم ۵۰ میکرولیتر (۱۰ میلی مولار، آغازگر میکرولیتر، مخلوط dNTPها ۱۰ میلی مولار، آغازگر

بطور واضح روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید (Wang *et al.*, 2010). در پژوهشی دیگر با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز قطعات ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ جفت بازی را از روی ژنوم فاژ لامبدا سنتز و همچنین با ساخت وکتورهای مصنوعی و سپس برش آنها با آنزیم های برشی اندونوکلاز نیز موفق به تولید قطعات بزرگ تر (۵۰۰۰، ۶۰۰۰، ۸۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ جفت بازی) شدند. در نهایت محصول حاصل از برش آنزیمی را بعد از خالص سازی با محصول PCR مخلوط و DNA مارکر با وزن مولکولی بالا را تولید کردند (Zhang *et al.*, 2012). یک پژوهش دیگر از تکنیک PCR چندگانه (Multiplex) روی فاژ لامبدا برای تهیه مارکر با تعدادی قطعات مختلف استفاده کرد (Gopalakrishnan *et al.*, 2010). در آزمایشگاه دیگری قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی را با PCR از روی DNA پلاسمید pUC تکثیر و به عنوان مارکر مورد استفاده قرار دادند (Abbasian *et al.*, 2015). در یک تحقیق دیگری با استفاده از PCR قطعات مختلف ایجاد و در دو پلاسمید قرار دادند که قابل تکثیر در باکتری بوده و با استفاده از دو آنزیم برشی روی این پلاسمیدها قطعات با اندازه های مختلف را برای مارکر الکتروفورز تهیه کردند (Henrici *et al.*, 2017). در یک آزمایش دیگری با الگو قرار دادن DNA باکتری باسیلوس به روش تنها PCR تعداد ۱۰ قطعه تکثیر و یک مارکر الکتروفورز تولید کردند (Sekhavi *et al.*, 2015). همچنین از DNA سوسک آرد (*Tenebrio molitor*) نیز برای ساخت مارکر الکتروفورز با استفاده از PCR و کلونینگ استفاده شده است (Barvish *et al.*, 2007).

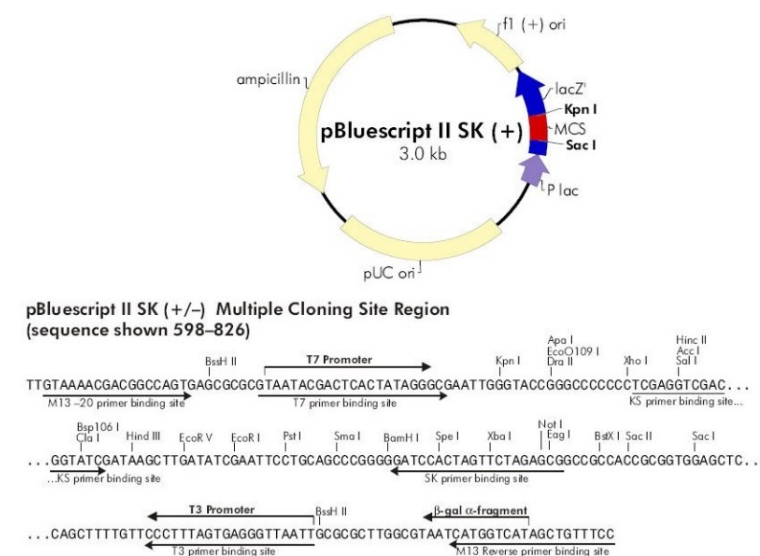
با توجه به کاربرد فراوان مارکرهای DNA در زمینه های مختلف بیولوژی مولکولی و قیمت بالای این مارکرها به سبب بالا بودن هزینه تولید، این مارکرها همواره جزء ابزارهای مولکولی با ارزش و پرمصرف در آزمایشگاه های بیولوژی مولکولی می باشند. در این پژوهش سعی شد خط تولید صنعتی یکی از مارکرهای اندازه DNA با قابلیت مصرف بالا و با صرف هزینه پایین تر با کاربرد روش های تلفیقی راه اندازی گردد.

pKS+900bp pKS+800bp pKS+700
pKS+1500bp pKS+1200bp pKS+1000
pKS+2700bp و pKS+2500bp pKS+2000

تشکیل شوند. واکنش لیگاسیون در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم پلاسمید برش یافته، به نسبت ۱ (پلاسمید) به ۳ (قطعه) از محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر X10 لیگاسیون، ۱ واحد آنزیم DNA Ligase T4 و اضافه کردن آب مقطر دیونیزه تا حجم ۲۰ میکرولیتر) انجام شد. سپس فرایند خالص سازی روی محصول لیگاسیون انجام و محصول نهایی لیگاسیون با الکتروپوراسیون به باکتری *E. coli* سویه Top10 انتقال یافت. باکتری های ترانسفورم شده در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شدند. بعد از رشد کلنی های باکتری در محیط فوق به منظور تایید کلنی های حاوی پلاسمید نو ترکیب از واکنش زنجیره ای پلی مرز استفاده شد. به منظور استخراج DNA پلاسمیدی از کلنی های مثبت ابتدا کشت مایع آنها در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین صورت گرفت. سپس پلاسمیدهای آنها به روش mini prep استخراج گردید و برای تایید پلاسمیدهای نو ترکیب واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی هر قطعه انجام گرفت و با مشاهده قطعه مورد نظر روی ژل آگارز در الکتروفورز، پلاسمیدهای استخراج شده تایید گردید. در مرحله بعد جهت تایید نهایی پلاسمیدهای استخراج شده پلاسمیدهای حاصل طی فرایند برش آنزیمی با آنزیم *Bam*HI تیمار و محصول آن از طریق الکتروفورز تایید شد. با تایید و شناسایی دقیق کلنی های باکتری حاوی پلاسمیدهای نو ترکیب از کلنی های مثبت محلول ذخیره گلیسرول به منظور نگهداری طولانی مدت تهیه و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

برای تولید مارکر DNA کشت مایع مخلوط همه باکتری های مورد نظر انجام و پس از استخراج پلاسمید از آنها روی پلاسمیدهای استخراج شده توسط آنزیم برشی *Bam*HI برش صورت گرفت. در نهایت با رقیق سازی محصول در بافر بارگذاری مارکر DNA، مارکر مورد نظر فرموله شده و مورد استفاده قرار گرفت.

مستقیم ۱۰ میکرو مولار، آغازگر معکوس ۱۰ میکرو مولار، DNA الگو یک میکروگرم بر میکرولیتر، هر کدام یک میکرولیتر و آنزیم *Mag Taq DNA polymerase* (سینا ژن تبریز) با غلظت ۵ واحد بر میکرولیتر و آب مقطر دیونیزه تا ۵۰ میکرولیتر به تیوب ها اضافه شد و شرایط دمایی شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه، تکثیر در طول ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی به مدت ۲۵ ثانیه در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد، اتصال آغازگرها به DNA الگو به مدت ۳۵ ثانیه در ۵۲ درجه سانتی گراد و بسط آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای سنتز قطعات ۱۰۰۰ و کوچکتر از ۱۰۰۰ جفت باز و همچنین با شرایط دمایی فوق و بسط یک دقیقه و ۱۵ ثانیه برای سنتز قطعات بزرگتر از ۱۰۰۰ جفت باز استفاده گردید. به منظور تایید قطعات حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز محصول واکنش PCR قطعات ۵۰۰ و کوچکتر از ۵۰۰ جفت باز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و قطعات بزرگتر از ۵۰۰ جفت باز بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و بعد از تایید آنها از طریق سانتریفیوژ با استفاده از فنل کلروفرم خالص سازی شدند. جهت همسانه سازی قطعات، ابتدا طی واکنش برش آنزیمی قطعات خالص شده و پلاسمید pKS یا pBlueScript II (شکل ۱) که دارای یک عدد سایت برشی *Bam*HI و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین می باشد توسط آنزیم *Bam*HI خریداری شده از شرکت Fermentas طبق دستورالعمل توصیه شده (۰/۵ میکروگرم DNA، ۴ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم، ۱ میکرولیتر (۱۰ واحد) آنزیم و بقیه آب مقطر دیونیزه) برش یافتند. قطعات و پلاسمید برش یافته روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین (LMP) بارگذاری شد و بعد از تایید برش یافتن قطعات و پلاسمید مورد نظر جداسازی و خالص سازی شدند. به منظور همسانه سازی، طی فرایند لیگاسیون قطعات برش یافته بطور مستقل و جداگانه هر کدام به داخل پلاسمید برش یافته انتقال یافت تا پلاسمیدهای نو ترکیب (pKS+100bp pKS+200bp pKS+300bp
pKS+400 pKS+500bp pKS+600bp)



شکل ۱. تصویر نقشه پلاسمید pKS یا pBluescript II مورد استفاده در این تحقیق
Figure 1. The Map of pBluescript II plasmid used in this study.

منظمی برای افزایش طول قطعات و متغیر بودن غلظت هر قطعه به خاطر تفاوت در وزن مولکولی نسبی آنها و نبود قطعات DNA در اندازه و طول‌های مناسب و مورد نیاز از بازار پسندی بسیار پایینی بر خوردار است (Wang *et al.*, 2010). روش دیگر تهیه DNA مارکر استفاده از PCR برای ساخت قطعات مورد نیاز برای تهیه آن است (Ye *et al.*, 2012)، این روش و حتی استفاده از Multiplex PCR با وجود قابلیت طراحی قطعات در اندازه‌های مطلوب، به سبب هزینه بر بودن به واسطه استفاده از چندین مجموعه آغازگر، نیاز به استفاده از دستگاه ترموسایکلر و برنامه‌دهی منحصر به فرد برای ساخت هریک از قطعات در نتیجه پیچیدگی بالای این روش لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد (Wang *et al.*, 2010). ساخت قطعات کوچک DNA با اندازه‌های مشخص به صورت کاملاً شیمیایی نیز روش دیگر برای تهیه DNA مارکرها می‌باشد که این روش نیز با توجه به هزینه بالای سنتز مصنوعی تمام قطعات از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. با توجه به هزینه بر بودن، پیچیده بودن و یا نداشتن الگوی منظمی در افزایش طول قطعات DNA مارکرها تولیدی به روش‌های فوق، در پژوهش حاضر تولید قطعات مختلف DNA به منظور

با توجه به متفاوت بودن غلظت هر یک از باندها، روی ژل آگارز و هزینه بر بودن خالص‌سازی هر یک از باندها از روی ژل به طور جداگانه و اندازه‌گیری غلظت دقیق باندها، به منظور تعیین غلظت باندهای موجود در مارکر DNA تولیدی از نرم‌افزار Image J و با استفاده از مقایسه باندهای DNA Ladder شرکت Fermentas با DNA مارکر تولیدی استفاده و غلظت هر یک از باندها تعیین شد. در ضمن به منظور سهولت تشخیص باندهای مربوط به مارکر DNA تولید شده سه مورد از باندهای مربوط به قطعات ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی با افزایش غلظت این باندها به صوت شارپ و تپیک در آمدند.

یافته‌های پژوهش

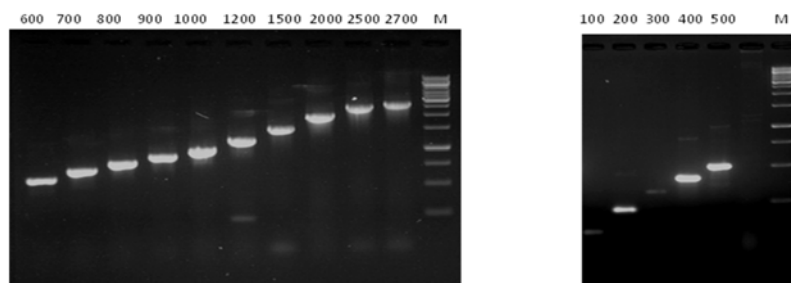
باتوجه به کاربرد وسیع مارکرها در اندازه DNA آزمایشگاه‌های علوم زیستی همواره بین شرکت‌های سازنده ابزارهای مولکولی به منظور تهیه مارکرها با صرف هزینه کمتر رقابت وجود دارد. تکنیک‌های مختلفی برای تولید تجاری انواع این مارکرها مولکولی وجود دارد، از جمله برش آنزیمی DNAهای طبیعی مثل DNA ژنومی فائز لامبدا و سوسک *Tenibrio molitor* (Ye *et al.*, 2012) این روش با وجود سادگی با توجه به فقدان الگوی

در یک تحقیق مشابه با استفاده از PCR روی DNA فاژ لامبدا قطعات ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی را تکثیر و با فلر کلروفورم خالص سازی و مارکر الکتروفورز ساختند (Wang *et al.*, 2011). در این تحقیق و همچنین تحقیقات مشابه (Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010;) (Gopalakrishnan *et al.*, 2010) DNA لامبدا به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت که یک مورد معمول در دسترس همه آزمایشگاه‌ها نیست. در حالیکه در بیشتر آزمایشگاه‌های گیاهی، آراییدوپسیس به عنوان گیاه مدل به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد و در تحقیق حاضر از یکی از ژنهای این گیاه استفاده شده است. در صورت بروز آلودگی به DNA الگو، مشکلی برای سایر تحقیقات بوجود نمی‌آورد اما فاژ لامبدا می‌تواند برای باکتریهای میزبان خود در آزمایشگاه مشکل ساز باشد. میزبان فاژ لامبدا باکتری اشرشیاکولی هست که در تمام آزمایشگاه‌ها به وفور برای کلونینگ‌ها استفاده می‌شود. از طرف دیگر، در صورت ورود و آلودگی مارکر الکتروفورز ساخته شده از لامبدا با باکتری، امکان تجزیه آن بخاطر وجود DNA لامبدا که دشمن باکتریها به شمار می‌رود وجود دارد. بنابراین در آزمایشگاه‌های مختلف مولکولی یک الگوی جایگزین و سالم برای سایر تحقیقات و همچنین قابل دسترس، ساخت مارکر و استفاده از آن را ساده می‌کند. در تحقیقات صورت گرفته (از جمله Wang *et al.*, 2011) مارکر ساخته شده فقط ۱۰ باند تا ۱۰۰۰ جفت باز را شامل می‌شود و بوسیله آن نمی‌توان باندهای DNA بزرگتر را روی ژل بررسی و تعیین اندازه کرد در صورتیکه با استفاده از مارکر تولیدشده در تحقیق حاضر قطعات و باندها از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز قابل بررسی و تعیین اندازه هستند.

تهیه مارکر DNA با صرف هزینه پایین و داشتن الگوی منظم افزایش طول قطعات DNA اساس کار قرار گرفت. به منظور تولید این قطعات آغازگرهای مناسب که در ابتدای آنها سایت برشی *Bam*HI جهت همسانه سازی قطعات قرار گرفته بود طراحی و سنتز قطعات مورد نیاز توسط واکنش PCR انجام گرفت (شکل ۲).

قطعات سنتز شده و پلاسمید pKS که حاوی سایت برشی *Bam*HI می‌باشد توسط آنزیم برشی *Bam*HI برش یافته و بعد از لیگاسیون به باکتری *E. coli* انتقال یافت. کلنی‌های حاوی پلاسمید انتخاب شده و وجود قطعه مورد نظر در آنها با PCR و برش آنزیمی تایید گردید. شماره کلنی‌ها مستقلاً حفظ شد و کشت توام آنها صورت گرفت. پس از استخراج پلاسمید بروش ماکسی پرپ و برش آنزیمی آنها با *Bam*HI مارکر DNA مورد نظر تولید شد. بهینه سازی‌هایی در مرحله کشت باکتری و مراحل بعدی صورت پذیرفت تا باندها با غلظت مشابه تولید گردند.

برای تایید قطعات DNA تولید شده در این تحقیق قطعات مورد نظر با قطعات موجود در مارکر DNA شرکت Fermentas (SM0311) مقایسه و مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳). در ادامه پژوهش با استفاده از نرم افزار Image J غلظت هر یک از باندها در مارکر DNA تولید شده با مقایسه میزان شارپ بودن باندهای مربوط به DNA مارکر شرکت Fermentase استفاده شده در این تحقیق و غلظت باندهای آنها تعیین شد (شکل ۳). همچنین با افزایش غلظت باندهای مربوط به قطعات ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی سه باند شارپ و تیبیک در مارکر DNA تولیدی تعبیه شد.



شکل ۲. تصویر الکتروفورز محصول PCR مربوط به سنتز قطعات ۱۰۰ تا ۲۷۰۰ جفت بازی

Figure 2. Electrophoresis profile of PCR Products for synthesis of 100-2700 bp fragments

پلاسمید با امکان کلونینگ T/A وارد شدند و چون پرایمرهای مورد استفاده دارای سایت برشی *EcoRI* بود بنابراین قابلیت تولید مارکر با یک برش آنزیمی فراهم شد (Mostaan *et al.*, 2015). تفاوت این تحقیق با تحقیق حاضر در روش کلونینگ، نوع پلاسمید و نوع آنزیم برشی و تنوع قطعات تولید شده می باشد. در سالهای اخیر با استفاده از نانو مولکولهای کربن و اعمال زمانهای متفاوت سونیفیکاسیون یک شاخص اندازه برای تعیین اندازه سایر مولکولها ساخته شده است و مارکر نانومولکول کربن نامگذاری شده است (Borzooeian *et al.*, 2018).

نتیجه گیری و پیشنهادها

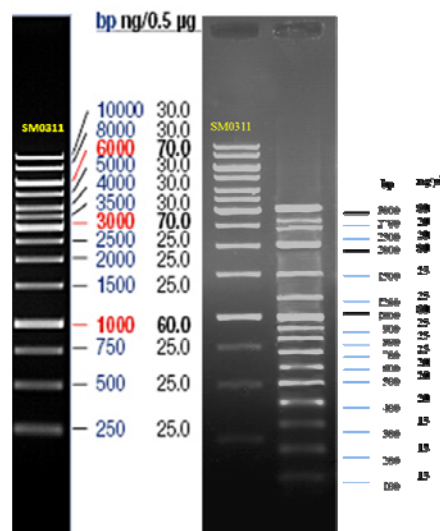
در نهایت خط تولید مارکر اندازه DNA با قطعات ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی با صرف هزینه پایین از طریق تلفیق تکنیک PCR و برش آنزیمی با موفقیت راه اندازی شد. با توجه به اینکه اغلب مطالعات به اندازه های زیر ۳۰۰۰ جهت مقایسه قطعات خود نیاز دارند این مارکر تولیدی با طیفی از قطعات ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز (با فاصله ۱۰۰ جفت باز در این دامنه) و قطعات ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ جفت بازی قابلیت استفاده وسیعی در تحقیقات ژنتیکی و مولکولی انسانی و جانوری و گیاهی و تشخیصی می تواند داشته باشد. با تولید صنعتی این محصول دانش بنیان نیاز بازار کشور به این ماده وارداتی، با هزینه ای بسیار پایین تر برطرف خواهد شد. در ادامه کار با افزودن قطعات بزرگتر از ۳۰۰۰ جفت باز مارکر اندازه با طیف وسیع تری نیز تولید خواهد شد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بابت تامین هزینه های این تحقیق در قالب طرح پژوهشی ۲۱۸/د/۱۷۱۱۵، تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.



شکل ۳. سمت راست مخلوط قطعات DNA حاصل از برش آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شده از کلنی های مثبت، سمت چپ DNA Ladder SM0311 شرکت فرمنتاس.
Figure 3. Right: Mix of DNA fragments resulted from enzymatic digestion of recombinant plasmids extracted from positive colonies. Left: DNA Ladder SM0311 (Fermentas)

در تحقیق دیگری که قطعات ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی را با PCR از روی DNA پلاسمید pUC تکثیر و به عنوان مارکر معرفی کردند (Abbasian *et al.*, 2015) برای هر بار تولید مارکر مجبورند تمام قطعات را PCR کنند و هزینه آنزیم پلیمرز برای انجام PCR باعث افزایش هزینه تولید مارکر می شود در صورتیکه در تحقیق حاضر تنها یک بار و فقط یک آنزیم برشی سهل الوصول و رایج برای تولید همه قطعات بطور همزمان استفاده می شود. نقطه قوت تحقیق حاضر نسبت به پژوهش مشابه (Henrici *et al.*, 2017) که در آن نیز پلاسمید برای تولید مارکر ساخته شده بود، این است که ما فقط با یک آنزیم رایج *BamHI* قطعات مختلف را تولید می کنیم اما آنها با استفاده از دو آنزیم برشی *PstI* و *EcoRV* قطعات را ایجاد می کردند و استفاده از هر کدام از آنزیمهای برشی روی پلاسمیدها باعث ایجاد مارکرهای مختلف ۱۰۰ باز برای بررسی قطعات کوچک و یک کیلو باز برای بررسی قطعات بزرگ می شد. در یک تحقیق مشابه دیگری قطعات با طولهای مختلف با PCR تکثیر یافته و در یک

References

- Abbasian, M., Seyedi, H. A., Boroujeni, Z. K., & Mofid, M. R. (2015). Easy method for production of a home-made DNA ladder in every laboratory. *Advanced Biomedical Research*, 4:70. doi: 10.4103/2277-9175.153894.
- Barvish, Z., Davis, C., & Gitelman, I. (2007). A wide-range, low-cost 150 bp ladder for sizing DNA fragments between 150 and 4500 bp. *Electrophoresis*, 28(6), 900-2. Doi: 10.1002/elps.200600438.
- Borzooeian, Z., Taslim, M.E., Rezvani, S., & Borzooeian, G. (2018). A high precision length-based carbon nanotube ladder. *Royal Society of Chemistry (RSC) Advances*, 8(63), 36049-36055. doi: 10.1039/c8ra05482g.
- Chen, Z., Wu, J., Li, X., Ye, C., & Wenxing, H. (2009). Novel strategies to construct complex synthetic vectors to produce DNA molecular weight standards. *Molecular Biotechnology*, 42(1), 128-133. doi: 10.1007/s12033-009-9145-0.
- Cooney, C.A. (1994). Techniques and high resolution DNA size markers for pulsed field gel electrophoresis. *Molecular Biotechnology*, 2, 119-27. Doi: 10.1007/BF02824804.
- Gopalakrishnan, R., Joseph, S., & Sellappa, S. (2010). Constructing a DNA ladder Range for Lambda Phage by multiplex PCR. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(4):210-2.
- Henrici, R. C., Pecan, T. J., Johnston, J. L., & Tan, S. (2017). The pPSU Plasmids for Generating DNA Molecular Weight Markers. *Scientific Reports*, 7(1), 2438. doi: 10.1038/s41598-017-02693-1.
- Lan, V.T., Loan, P.T., Duong, P.A., Thanhle, T., Ha, N.T., & Thuan, T.B. (2012). Straightforward procedure for laboratory production of DNA ladder. *Journal of Nucleic Acids*, Article ID 254630, doi: 10.1155/2012/254630.
- Mostaan, S., Ajorloo, M., Khanahmad, H., Cohan, R.A., Tehrani, Z.R., Rezaei, M., Fazeli, F., Behdani, M., Zare, S.K., Karimi, Z., Mozhgani, S.H., & Moukhah, R. (2015). A novel combined method for cost-benefit production of DNA ladders. *Advanced Biomedical Research*, 4, 15. doi: 10.4103/2277-9175.148298.
- Saidijam, M., Khanahmad Shahreza, H., Rikhtegaran Tehrani, Z., Karimizare, S., Shabab, N., & Behdani, M. (2011). Designing and constructing an 100 bp DNA Ladder by combining PCR and enzyme digestion methods. *Tehran University Medical Journal*, 69(2), 75-82.
- Sekhavi, M., Tadayon, K., Ghaderi, R., Banihashemi, R., Jabbari, A.R., Shokri, G., & Karimnasab, N. (2015). "In-house" production of DNA size marker from a vaccinal *Bacillus anthracis* strain. *Iranian Journal of Microbiology*, 7(1), 45-9.
- Wang, T.Y., Guo, L., & Zhang, J.H. (2010). Preparation of DNA ladder based on multiplex PCR technique. *Journal of Nucleic Acids*, Article ID 421803, doi: 10.4061/2010/421803.
- Wang, T.Y., Wang, L., & Wang, F. (2011). Methodology: simplified preparation of a DNA ladder using PCR. *Genetics and Molecular Research*, 10(3):1631-5. doi: 10.4238/vol10-3gmr1177.
- Ye, C.H., Gu, J., Chen, S., Deng, A., Zhong, Y., & Li, D. (2012). Unit cloning and amplification as novel and universal strategies for complex vector construction and small DNA fragment preparation. *Electrophoresis*, 31, 2929-2935. doi: 10.1002/elps.201000222.
- Zhang, J.H., Yang, R., Wang, T.Y., Dong, W.H., Wang, F., & Wang, L. (2012). A simple and practical method that prepares high molecular weight DNA ladders. *Molecular Medicine Reports*, 6, 1211-1213. doi: 10.3892/mmr.2012.1061.

Primary field evaluation of transgene in some cotton (*Gossypium hirsutum*) transgenic lines against Lepidoptera pests

Sayyed-Elyass Mortazavi¹, Morteza ArabSalmani²

1. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Extension and Education (AREEO), Karaj, PO Box: 31535-1897, Iran.

2. Assistant Professor, Tehran Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Extension and Education (AREEO), Qoddousi Boulevard, Varamin, Tehran, Iran.

Correspondence:
Sayyed-Elyass Mortazavi
Email: mortazavi@abrii.ac.ir

Received: 22, Oct. 2024
Accepted: 21, Jan. 2025

How to cite:

Mortazavi, S.E., & ArabSalmani, M. (2025). Primary field evaluation of transgene in some cotton (*Gossypium hirsutum*) transgenic lines against Lepidoptera pests. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 29-41. (DOI: [10.30473/cb.2025.72568.1986](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72568.1986))

ABSTRACT

In order to evaluate characteristics related to Lepidoptera pest resistance in some transgenic cotton lines, different transgenic events from Cocker100 variety harbouring *cryIAb* gene were tested in a field experiment. The other plant materials were consisted from two backcrossed lines resulted from MON531 event and CIM-448 line, and a Chinese commercial transgenic cotton cultivar harbouring *cryIAc* gene named 11F1 as positive control, and Khordad and Varamin cultivars as the non-transgenic negative control were used in the experiment. A randomized complete block design with three replications was adopted as the statistical model. Infestation of the field during growing season was taken place in six stages to ensure that the field was infected uniformly by the pest. The characters related to the pest resistance trait were recorded during growing season. The results showed that non-transgenic cultivars comprising Varamin and Khordad experienced 24.7 and 23 percent respectively, the maximum boll contamination, while transgenic lines showed a contamination range from relatively susceptible (%19) to relative resistance (%2.5). Also, Maximum damage index of the pest were exhibited in the Varamin and Khordad cultivars with %6.4 and %5.9 respectively, while the index for transgenic lines varied from %5 to %0.6. In general, the transgenic A and B lines showed acceptable bollworm resistance characters. More investigations are needed to confirm other agronomic and fiber quality to be considered in commercialization of the lines.

KEYWORDS

Field Evaluation, Transgenic Cotton, Resistance, Bollworm, Contamination, Damage Index.



«مقاله پژوهشی»

بررسی مقدماتی عملکرد تراژن در ایجاد مقاومت مزرعای نسبت به آفات بالپولکدار در لاین‌های تراریخته پنبه (*Gossypium hirsutum*)

سیدالیاس مرتضوی^۱، مرتضی عرب‌سلمانی^۲

چکیده

نظر به اینکه پس از تولید محصول تراریخته در آزمایشگاه، انجام آزمایش‌های میدانی به منظور اطمینان از بروز ژن در شرایط واقعی مزرعای ضروری است، پنج لاین پنبه تراریخته حاوی ژن *cryIAb*، به همراه سه لاین تراریخته حاوی ژن *cryIAC* و دو رقم تجاری و غیرتراریخته خرداد و ورامین به عنوان شاهد در یک آزمایش مزرعای محصور در یک فصل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار کاشته شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این آزمایش، پس از آلوده‌سازی مزرعه با لارو کرم غوزه، میزان آلودگی لاین‌های مورد بررسی در برابر آفت کرم غوزه در قالب تعداد غوزه در بوته، تعداد آلودگی غوزه در بوته، تعداد آلودگی برچه در بوته، و خسارت به غوزه در بوته مورد شمارش قرار گرفت و داده‌ها به صورت درصد بیان شدند. همچنین شاخص خسارت آفت نیز مورد محاسبه قرار گرفت. نتایج آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SAS نشان داد که لاین‌های غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۲۴/۷ و ۲۳ درصد بیشترین آلودگی غوزه را داشته‌اند ولی میزان آلودگی در لاین‌های تراریخته متفاوت بود و از نسبتاً حساس (۱۹ درصد) تا نسبتاً مقاوم (۲/۵ درصد) تغییر می‌کرد. همچنین بیشترین شاخص خسارت آفت با ۶/۴ و ۵/۹ درصد به ترتیب برای لاین‌های غیرتراریخته ورامین و خرداد بود ولی این شاخص در لاین‌های تراریخته مورد مطالعه از ۵ درصد تا ۰/۶ درصد تغییر می‌کرد. در مجموع نتایج این بررسی مقدماتی نشان داد که دو لاین تراریخته A و B حاوی تراژن *cryIAC* دارای کمترین میزان آلودگی و خسارت هستند. در ادامه بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تری بر روی این لاین‌ها لازم است تا مقاومت به آفات بالپولکدار و سایر خصوصیات کمی و کیفی آنها مورد شناسایی و تأیید قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

آلودگی، ارزیابی مزرعای، پنبه تراریخته، شاخص خسارت، کرم غوزه، مقاومت.

۱. استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، صندوق پستی ۳۱۵۳۵-۱۸۹۷.
۲. استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ورامین، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

سید الیاس مرتضوی

رایانامه: mortazavi@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۲

استناد به این مقاله:

مرتضوی، سید الیاس و عرب‌سلمانی، مرتضی (۱۴۰۴). بررسی مقدماتی عملکرد تراژن در ایجاد مقاومت مزرعای نسبت به آفات بالپولکدار در لاین‌های تراریخته پنبه (*Gossypium hirsutum*)، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۲۹-۴۱. (DOI: [10.30473/cb.2025.72568.1986](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72568.1986))

مقدمه

پس از تولید یک لاین ژن انتقال یافته در آزمایشگاه و اثبات بروز ژن در مراحل آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، لازم است تا بروز آن تراژن در محیط واقعی مزرعه‌ای نیز مورد آزمایش قرار داده شود. هدف از چنین آزمایشی آن است که از بین لاین‌های آزمایشگاهی، رویداد^۱ یا لاینی انتخاب شود تا میزان بروز کافی برای ایجاد صفت مورد نظر در مزرعه را داشته باشد. به طور کلی پس از انتقال هر تراژن و از جمله ژن‌های پروتئین کریستالی به یک میزبان جدید نظیر یک محصول زراعی، به دلایل مختلفی از جمله متغیر بودن میزان بروز ژن در رویدادهای تراریزشی مختلف، و نیز تغییراتی که ممکن است پس از ترجمه در هر پروتئینی رخ دهد، یا رشد گیاه در شرایط طبیعی خارج از آزمایشگاه که به ویژه باعث اثرپذیری بروز ژن از تغییرات دما و تنش‌های مختلف محیطی می‌شود، و در نهایت، احتمال خاموشی ژن، این ضرورت را به وجود می‌آورد که اثر مورد انتظار از آن تراژن در شرایط واقعی مزرعه‌ای نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. این آزمایش‌ها در سطح و اندازه‌های مختلف و با اهداف مختلفی انجام می‌شوند (Slot *et al.*, 2018; Ribichich *et al.* 2020).

آزمایش‌های مزرعه‌ای لاین‌های تراریخته را از دیدگاه‌های مختلفی می‌توان مورد بررسی قرار داد. به عنوان مثال، از نظر مساحت مورد استفاده برای انجام آزمایش، انواع آزمایش‌های در سطح محدود (کوچک مقیاس)، در سطح متوسط و همچنین بزرگ-مقیاس را می‌توان مورد اشاره قرار داد.

در آزمایش‌های سطح کوچک که معمولاً برای غربالگری اولیه‌ی تعداد قابل توجهی از لاین‌ها یا رویدادهای تراریزشی مورد استفاده قرار می‌گیرد، با استفاده از یک مدل آماری ساده به ارزیابی لاین‌های تراریخته پرداخته می‌شود. از آنجا که در این نوع آزمایش‌ها که معمولاً بلافاصله پس از آزمایش‌های گلخانه‌ای و با مواد آزمایشی حاصل از همان آزمایش‌ها اجرا می‌شوند، مقدار بذر اندکی وجود دارد، امکان اجرای آزمایش‌های بزرگ مقیاس و یا آزمایشی با تکرار زیاد وجود

ندارد. از این رو، این مقدار اندک بذر حاصل از آزمایش‌های گلخانه‌ای (یا دیگر مواد ژنتیکی رویشی که به عنوان بذر مورد استفاده قرار دارند) فقط کفاف یک آزمایش در مقیاس کوچک را می‌دهد. لازم به توضیح است که در این مرحله، نیازی هم به اجرای یک آزمایش متوسط یا بزرگ نیست؛ زیرا هدف از انجام آزمایش میدانی در این مرحله، ارزیابی و غربال اولیه لاین‌های تراریخته است (Walker *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2022).

آزمایش‌های سطح محدود بسته به صفت تراریخته و نوع گیاه تفاوت دارند. به هر حال این آزمایش‌ها در خصوص لاین‌های تراریخته‌ی مقاوم به آفات می‌توانند به اشکال مختلفی به اجرا در آیند. یکی از رایج‌ترین انواع این آزمایش‌های میدانی کوچک-مقیاس، استفاده از قفس یا توری است (Nickell *et al.*, 1990; Connolly *et al.*, 2024). در این روش، یک کرت کوچک در هر تکرار کشت می‌شود و یا اینکه قسمتی از یک کرت بزرگتر با توری کاملاً محصور می‌گردد. در این شرایط، حشرات آفت مورد نظر در زیر توری یا درون قفس قرار داده می‌شود و در نهایت، صفات متناسب با اثر آن آفت بر روی لاین تراریخته مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. رهاسازی آفت در درون قفس یا زیر توری‌ها به منظور اطمینان از اثر آفت بر روی گیاه، رهاسازی یکنواخت آفت برای هر کرت، جلوگیری از اثر سایر آفات بر روی مواد آزمایشی و اندازه‌گیری دقیق صفات مرتبط با رشد و توسعه آفت در هر کرت انجام می‌شود. علاوه بر این، در صورتی که زمینه ژنتیکی لاین‌های مورد آزمایش متفاوت باشد، این احتمال وجود دارد که آفت مورد نظر، لاین یا لاین‌های خاصی را برای تغذیه ترجیح داده و در نتیجه‌ی تغذیه بیشتر آفات از آن لاین، ارزیابی میزان مقاومت نسبت به آن آفت تحت تأثیر قرار گیرد (Walker *et al.*, 2000; Connolly *et al.*, 2024).

با این وجود، ارزیابی اثر آفات بر روی لاین‌های تراریخته در قفس یا توری، اثرات نامطلوبی نیز دارد. به عنوان مثال، سایه‌اندازی توری بر روی گیاهان به طور مستقیم رشد گیاه و فیزیولوژی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این شرایط، گاهی فقط قسمتی از یک کرت محصور شده و برای ارزیابی صفات مرتبط با رشد و

۱. رویداد یا رخداد، خطوط سلولی حاصل از تراریزش است که طبق

تعریف دارای محل ادخال منحصر به فرد در ژنوم است.

Yazdanpanah *et al.*, 2009; Rostamkhani *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2012; Modirroosta *et al.*, 2013). از آنجا که آنالیزهای مولکولی و زیست‌سنجی‌های انجام‌شده بر روی این لاین‌ها در آزمایشگاه و گلخانه نشان‌دهنده وجود مقاومت در این لاین‌ها بوده است، ارزیابی دقیق این لاین‌ها و انتخاب مقاوم‌ترین لاین برای آزادسازی اجتناب‌ناپذیر خواهد بود. از این رو، هدف این آزمایش، ارزیابی اثر تراژن در ایجاد صفت مورد نظر در شرایط واقعی مزرعه‌ای تعیین شده است.

روش‌شناسی پژوهش

آزمایش بررسی مقدماتی عملکرد تراژن به منظور ارزیابی وضعیت مقاومت ارقام مورد مطالعه نسبت به شاهد در برابر آفات بالپولکدار پنبه به ویژه کرم غوزه و برای نخستین بار در ایران انجام شد. مکان انجام این آزمایش، یک قطعه زمین کشاورزی واقع در روستای سلمان‌آباد ورامین و فاصله‌ی اندک از مزارع کشاورزان بود. در انتخاب این منطقه رعایت موارد ایمنی زیستی شامل محصورسازی گیاهان تراریخته رعایت شده است؛ زیرا مزارع پنبه کشاورزان و نیز مزارع تکثیر بذر موسسه تحقیقات پنبه کشور در منطقه ورامین، ده‌ها کیلومتر با این مزرعه فاصله داشت و از این رو، به واسطه محصورسازی بیولوژیک، انتقال دانه‌گرده و گرده‌افشانی ناخواسته (انتقال افقی ژن) عملاً امکان‌پذیر نبود (Siddiqui *et al.*, 2022).

مواد گیاهی مورد استفاده در این پروژه شامل هشت لاین تراریخته پنبه به همراه دو رقم غیرتراریخته بود. از بین این لاین‌های تراریخته، یک رقم هیبرید تجاری تراریخته خارجی با منشاء کشور چین به نام رقم 11F1 محصول شرکت بایوسنتری ترانسژن (BioCentury Transgene Co., Ltd.) با کد لاین C و به عنوان رقم شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت. این رقم تراریخته نیز دارای ژن *cryIAC* برای ایجاد مقاومت نسبت به آفات بالپولکدار به ویژه، کرم غوزه پنبه بود.

از بین سایر لاین‌های مورد استفاده، دو لاین تراریخته دارای ژن *cryIAC* (موسوم به لاین A و لاین B) بودند که از طریق تلاقی لاین کوکر ۳۱۲ تراریخته حاوی رویداد

فیزیولوژی از گیاهان کشت‌شده در قسمت غیرمحصول کرت استفاده می‌شود؛ هرچند که این امر از دقت ارزیابی‌ها می‌کاهد (Connolly *et al.*, 2024).

در روش دیگری از آزمایش‌های سطح محدود، برای اطمینان از آلوده‌شدن کافی لاین‌های مورد مطالعه، در مناطق آلوده به آن آفات اقدام به اجرای آزمایش می‌کنند. این روش به ویژه در مورد آفاتی مثل کرم غوزه پنبه کاربرد دارد که پلی‌فاژ بوده و از گیاهان مختلفی تغذیه می‌کنند. از آنجا که استانداردهای محصورسازی گیاهان تراریخته محدودیت‌هایی برای انتخاب محل آزمایش به وجود می‌آورد، پلی‌فاژ بودن آفت این امکان را به وجود می‌آورد که لاین‌های تراریخته یک محصول را در کنار مزارعی ایجاد کرد که امکان گرده‌افشانی را از بین ببرد، ضمن اینکه آفت کافی برای ارزیابی لاین تراریخته در اختیار قرار می‌دهد. به عنوان مثال ارزیابی لاین‌های تراریخته پنبه در کنار مزارع ذرت یا گوجه‌فرنگی انجام می‌شود که میزبان‌های دیگری برای کرم غوزه به شمار می‌روند (Govindan *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2022).

پیشینه پژوهش

پژوهش‌های تولید پنبه تراریخته مقاوم به آفات بالپولکدار در کشور از سال ۱۳۷۹ آغاز شده است و تاکنون ادامه یافته است. در این پژوهش‌ها با استفاده از ژن پروتئین کریستالی گرفته‌شده از یک باکتری خاکزی (*cryIAb* و *cryIAC*) اقدام به انتقال ژن به یک رقم پنبه دارای قابلیت تراریزش موسوم به رقم کوکر شده است. این ژن‌ها تحت کنترل یک پیش‌بر دائمی بسیار معروف به نام پیش‌بر CaMV35S و با روش انتقال ژن به کمک *آگروباکتریوم* به ریزنمونه‌های پنبه رقم کوکر منتقل شدند و رویدادهای تراریزشی که از این روش به دست آمدند، با استفاده از انواع آنالیزهای مولکولی که اثبات‌کننده وجود، بیان ژن و ایجاد مقاومت نسبت به آفات بالپولکدار بودند، مورد بررسی‌های دقیق قرار گرفتند. همچنین تجزیه و تحلیل‌ها و بررسی‌های زیادی در خصوص عدم وجود هر گونه آثار زیانبار (احتمالی) برای سلامت انسان، دام و محیط زیست بر روی این گیاهان تراریخته در نسل‌های مختلف انجام شده است (Tohidfar *et al.*, 2008;).

cryIAb/Ac به صورت آغازگر فـوروارـد 5'CGGTGTAGTTTCCAATCAGCCTAG3' و آغازگر برگشتی 5'ACACTCCCATCGACATCTCCTTGT3' در این واکنش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. چرخه‌های دمایی مورد استفاده در این واکنش شامل ۳۰۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان ذوب شدن اولیه DNA الگو، ۴۰ چرخه دمایی با ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای اتصال آغازگر و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود که در نهایت ۴۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد نیز برای تکثیر نهایی به آن افزوده شد. حجم واکنش‌ها، ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شده بود و در آن از ۲ میکرولیتر بافر PCR (سیناکلون، شماره کاتالوگ MM2101)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq (سیناکلون، شماره کاتالوگ 1601)، ۱ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی‌مولار سیناکلون، شماره کاتالوگ MM2091)، ۴ میکرولیتر از دو آغازگر یادشده (۱۰ پیکومولار)، ۱ میکرولیتر از مجموعه نوکلئوتیدهای مورد نیاز (۱۰ میلی‌مولار، سیناکلون، شماره کاتالوگ 7604C) و ۱ میکرولیتر DNA الگو (۳۰ میلی‌مولار) و در نهایت ۱۰/۳ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد.

پس از رشد گیاهان و به گل رفتن آنها، به منظور اطمینان از آلوده شدن کافی مزرعه با آفات بالپولکدار رایج در منطقه شامل کرم غوزه (*Helicoverpa armigera* Hübner) و کرم خاردار (*Earias insulana* Boisduval)، نسبت به جمع‌آوری تخم و لارو (غوزه آلوده) از مزارع آلوده در منطقه ورامین و گرمسار اقدام شد. بدین منظور با حضور در مزارع کشاورزان در مناطق یادشده، سرشاخه‌های آلوده حاوی تخم و لارو آفات بالپولکدار در سنین مختلف جمع‌آوری شده و ۷ بار در طول ۴۲ روز در مزرعه آزمایشی توزیع گردید. این میزان آلودگی که به منظور اطمینان از حضور آفات یادشده بر روی تمامی بوته‌های موجود در هر کرت انجام شد، به صورت فوق‌العاده یعنی بسیار بیشتر از آلودگی طبیعی که در منطقه روی می‌دهد، در نظر گرفته شد. علاوه بر این، به منظور جلوگیری از شکار شدن پروانه‌های مادر توسط پرندگان، اقدامات لازم برای دور کردن پرندگان از منطقه

MON531 و یک لاین پنبه غیرتراریخته به نام CIM-448 به همراه ۴ تلاقی برگشتی با همان لاین CIM-448 و در نهایت، خودگشتی و انتخاب تعدادی لاین‌های هموزیگوت بر مبنای آزمون نتاج به دست آمده بودند. این دو لاین تقریباً ایزوژن بودند هر چند که در بعضی از صفات با یکدیگر فرق داشتند. پنج لاین تراریخته دیگر به نام لاین‌های I, G, E, D و J لاین‌های تراریخته دارای ژن cryIAb از رقم کوکر ۱۰۰ بودند (Tohidfar et al., 2008; Yazdanpanah et al., 2009; Rostamchani et al., 2011; Azimi et al., 2012; Modirroosta et al., 2013). این لاین‌های تراریخته، رخدادهای مستقلی بودند که آنالیزهای مولکولی انجام‌شده، نشان‌دهنده وجود تراژن در آنها و بروز تراژن در شرایط گلخانه‌ای بود. دو رقم غیرتراریخته خرداد و ورامین نیز به عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفتند. این دو رقم در منطقه مورد آزمایش، بیشترین محبوبیت و سطح زیرکشت را در بین کشاورزان دارا هستند.

آزمایش بررسی مقدماتی مقاومت به آفات بالپولکدار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر لاین پنبه تراریخته در این آزمایش در کرتی به طول سه متر و در دو خط به صورت جوی و پشته و به فواصل ۲۰ سانتی‌متری بر روی پشته کاشته شد. فواصل بین ردیف‌های کاشت نیز به مقدار ۱۲۰ سانتی‌متر و فاصله بین کرت‌ها، ۲ متر در نظر گرفته شد.

مراقبت‌های زراعی شامل آبیاری، کوددهی و وجین علف‌های هرز مطابق معمول منطقه و طبق نیاز انجام شد به طوری که فواصل آبیاری در ابتدای فصل به صورت هر هفته و در بقیه فصل رشد هر دو هفته یکبار انجام می‌شد. کوددهی با استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژنه و فسفره هر کدام به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار صورت گرفت. در تمام طول فصل، عملیات وجین و مبارزه با علف‌های هرز به صورت دستی انجام می‌شد.

از آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نشان دادن حضور تراژن در لاین‌های مورد بررسی استفاده شد. برای این منظور، ابتدا استخراج DNA از نمونه برگ گیاهان هر لاین با استفاده از روش C-Tab (Paterson et al., 1993) انجام شد. آغازگرهای اختصاصی ژن‌های

جمع‌آوری شده از این آزمایش به صورت شمارشی بوده و به صورت درصد بیان می‌شدند، برای تحقق مفروضات تجزیه واریانس از تبدیل داده‌های جذری برای آن داده‌ها استفاده شد. مقایسه‌های میانگین با استفاده از روش LSD (Yazdi Samadi *et al.*, 1998) و در سطح احتمالی انجام شد که در تجزیه واریانس معنی‌دار اعلام شد.

یافته‌های پژوهش

شکل ۲ نمونه‌ای از نتایج آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرارز برای لاین‌های مورد استفاده در این آزمایش را خلاصه کرده است. این شکل نشان می‌دهد که هشت لاین از مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش، حاوی تراژن بوده و دو رقم خرداد و ورامین که به عنوان شاهد در این آزمایش به کار گرفته شده‌اند، فاقد تراژن می‌باشند. این نتایج اطمینان به وجود می‌آورد که این مواد ژنتیکی دارای خصوصیات مورد ادعا هستند.

جدول ۱ نتایج تجزیه واریانس برای داده‌های تبدیل شده صفات تعداد غوزه، درصد غوزه‌های آلوده، درصد برچه‌های آلوده و درصد خسارت به غوزه در لاین‌های مورد آزمایش را خلاصه‌سازی کرده است. ابتدا اینکه به خاطر معنی‌دار نبودن اثر تکرار (بلوک) در نتایج اولیه تجزیه واریانس، اثر آن با اثر خطای آزمایشی اختلاط داده شد (Yazdi Samadi *et al.*, 1998) تا دقت مقایسه‌ها افزایش یابد. سپس همانگونه که از جدول ۱ مشاهده می‌شود، تمامی صفات مورد مطالعه در این آزمایش، بسیار معنی‌دار (در سطح $\alpha=0/01$) اعلام شده‌اند.

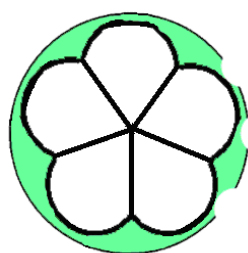
آزمایش نظیر نصب مترسک و نخ‌کشی در مزرعه صورت گرفت. همچنین به منظور جذب پروانه مادر در بین کرت‌های آزمایشی نسبت به کاشت گیاه ذرت اقدام شد (Fang *et al.*, 2021; Siddiqui *et al.*, 2022).

در پایان فصل و پس از رسیدگی پنبه، ۵ بوته از هر کرت قطع شد. سپس، صفات مرتبط با مقاومت به کرم غوزه شامل تعداد غوزه، تعداد غوزه آلوده (یعنی غوزه‌هایی که به صورت کامل یا تقریباً کامل توسط آفات خورده شده بود)، تعداد برچه آلوده (یعنی غوزه‌هایی که به صورت کامل خورده نشده بلکه یک یا دو برچه آن مورد حمله آفت قرار گرفته است)، تعداد غوزه آسیب‌دیده (یعنی غوزه‌هایی که تنها خسارت جزئی دیده و لارو آفت موفق به نفوذ به داخل آن نشده و تنها ظاهر آن خسارت دیده است) به روش Cooke و همکاران (۲۰۰۶) مورد شمارش قرار گرفت (شکل ۱).

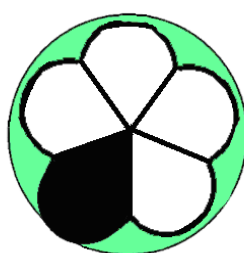
همچنین شاخص آلودگی به وسیله رابطه (۱) با استفاده از داده‌های بدست‌آمده مورد محاسبه قرار گرفت (Cooke *et al.*, 2006).

$$D_i = \frac{\sum [(x_i \cdot f_i) / \sum f_i] \cdot (100/n)}{[(x_1 \cdot 0) + (x_2 \cdot 1) + \dots + (x_6 \cdot 5)] / \sum f_i} \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این فرمول، D_i شاخص آلودگی، x_i تعداد برچه آلوده در یک غوزه که می‌تواند از صفر تا ۵ برچه را به خود بگیرد، f_i تعداد غوزه‌های دارای x_i برچه آلوده و n تعداد برچه در هر غوزه هستند که معمولاً ۵ برچه در یک غوزه وجود دارد. داده‌های به دست‌آمده به صورت فوق با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (SAS Institute, 1993) و مدل آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آنجا که داده‌های



Damaged Boll



Conaminated Locule



Contaminated Boll

شکل ۱. دسته‌بندی انواع خسارت کرم غوزه (*Helicoverpa armigera*).

Figure 1. Types of damages caused by Lepidoptera pests on the cotton boll.

جدول ۱. جدول تجزیه واریانس برای داده‌های تبدیل شده تعداد غوزه، درصد آلودگی غوزه‌ها، برچه‌ها و آسیب وارد به غوزه‌های آزمایش مقدماتی بررسی مقاومت لاین‌های پنبه نسبت به آفات بالپولکدار.

Table 1. Analysis of Variance for transformed data resulted from preliminary experiment on resistance ability of some transgenic cotton lines.

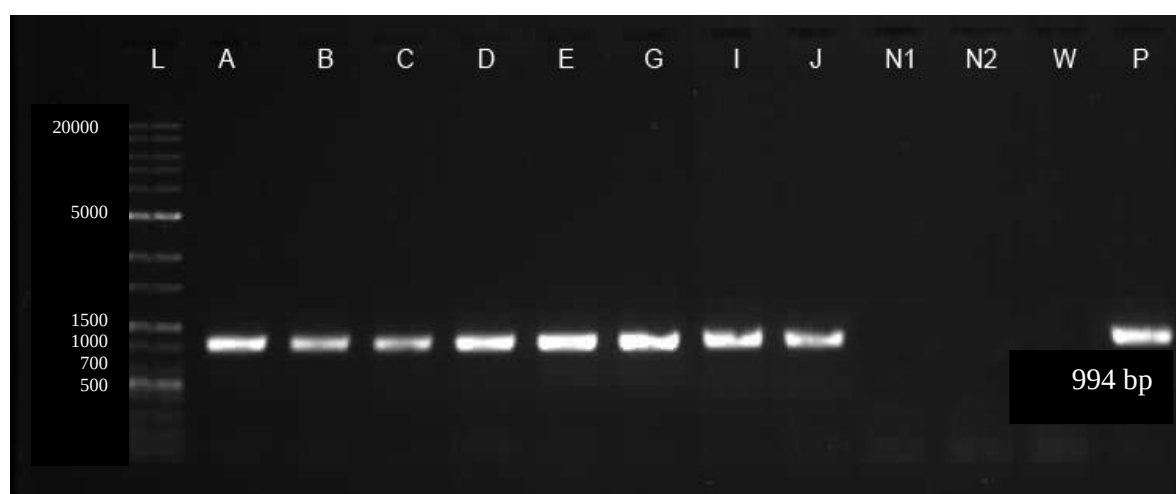
R ² (%)	ضریب تغییرات Coefficient of Variation (%)	میانگین مربعات خطا Error Mean Squares	میانگین مربعات Mean Squares	صفت Traits
36	19	1.53	14.44**	تعداد غوزه (Boll per Plant)
57	24	0.0073	0.1623**	درصد آلودگی غوزه ((Boll Contamination (%))
62	26	0.0020	0.0586**	درصد آلودگی برچه ((Locule Contamination (%))
34	31	0.0028	0.0247**	درصد غوزه آسیب‌دیده ((Boll Damage (%))
56	25	0.1924	4.0640**	شاخص خسارت ((Damage Index (%))

* Degree of freedom of the traits and the experimental errors are 9 and 150, respectively.

** means very significant ($\alpha=0.01$).

*, درجه آزادی صفات و خطای آزمایشی به ترتیب ۹ و ۱۵۰ است.

**, به معنی بسیار معنی‌دار است ($\alpha=0.01$).



شکل ۲. نتایج آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای لاین‌های مورد استفاده در مطالعه از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *cryIAb* و *cryIAC*. در این شکل، L، نشانگر وزنی 1Kb⁺، A-J، لاین‌های تراریخته مورد مطالعه، N1 و N2، لاین‌های غیرتراریخته به ترتیب خرداد و ورامین، W، آب (شاهد منفی) و P، پلاسمید (شاهد مثبت) هستند. این شکل تأیید می‌کند که لاین‌های تراریخته مورد استفاده در این مطالعه، همگی مطابق انتظار باند مورد نظر را نشان می‌دهند.

Figure 2. The results of PCR analysis for the lines using *cryIAb/cryIAC* specific primers. The figure confirms that all transgenic lines showed specific band of the transgenes.

بیشتر تحت کنترل ژنتیکی است (Ashokkumar & Ravikesavan, 2011; Fang et al., 2021). علاوه بر قابلیت ژنتیکی، عوامل مهمی چون مراقبت‌های زراعی در کنار تیپ رشد گیاه و تراکم مورد استفاده در آزمایش نیز بر میزان رشد گیاه و در نتیجه بر تعداد غوزه تولیدی موثر است (Bednarz et al., 2005). به عبارت دیگر، در تراکم پایین کشت، یک بوته فضای بیشتری برای توسعه داشته و در نتیجه با تولید شاخه‌های زیادی بیشتر، غوزه بیشتری نیز تولید خواهد کرد.

با همه این احوال در این مطالعه، قابلیت تولید غوزه به عنوان یک صفت اصلاحی مد نظر نبوده است، و تنها

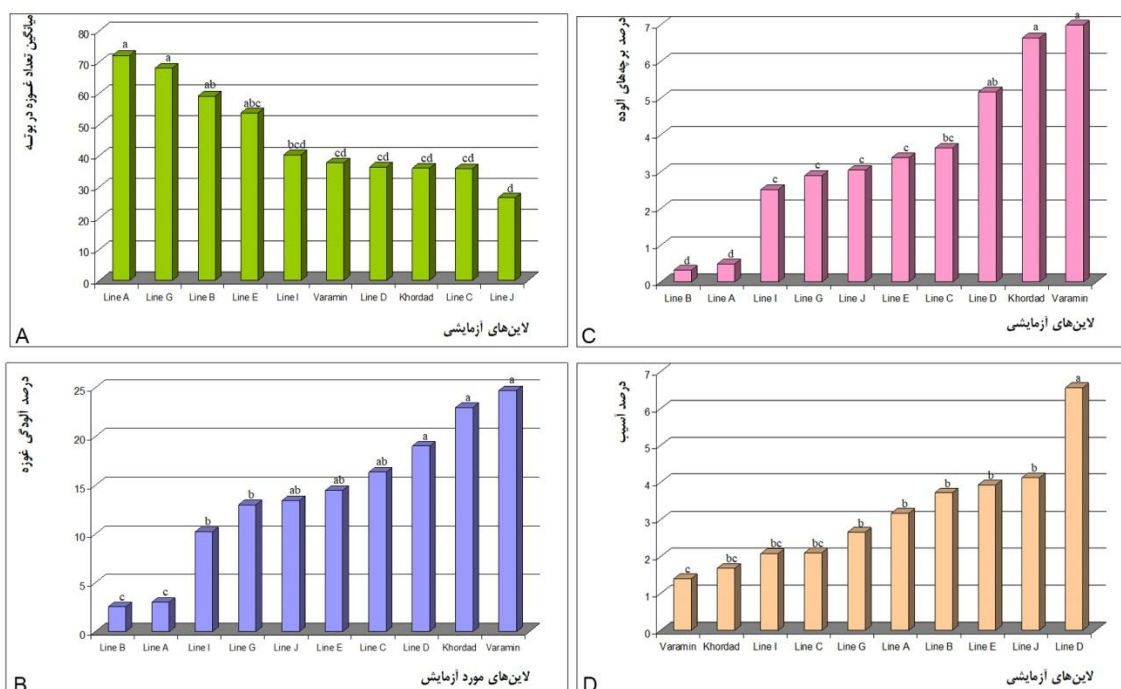
شکل ۳. مقایسه میانگین برای صفت تعداد غوزه در لاین‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد که تفاوت در تعداد غوزه در بین ارقام مورد مطالعه بسیار زیاد بوده است؛ به طوری که لاین‌های تراریخته A و G با ۷۲ و ۶۸ غوزه در بوته، بیشترین تعداد، و لاین تراریخته J با ۲۶/۴۵ غوزه در بوته، کمترین تعداد غوزه در بوته را داشته‌اند. لاین‌های غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۳۷/۶۷ و ۳۶ غوزه، دارای غوزه‌های نسبتاً کمتری بودند.

صفت تعداد غوزه در بوته یک صفت بسیار مهم اصلاحی در پنبه است به طوری که قابلیت تولید غوزه

بوته‌ها نمود می‌یابد.

با این توضیح و به دلیل تفاوت موجود در تعداد غوزه در بوته در بین لاین‌های مورد مطالعه، سایر صفات مرتبط با رشد و گسترش آفت بر روی ارقام بر اساس تعداد غوزه موجود بر روی هر بوته مورد تصحیح قرار گرفته و به صورت درصد بیان شدند و در ادامه، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

به عنوان یک صفت زمینه‌ای برای توسعه آفات بالپولکدار در نظر گرفته شده است. آفات بالپولکدار پنبه در مراحل لاروی خود ابتدا برگ و سپس گل تا غوزه را مورد حمله قرار می‌دهند (Darvish Modjeni, 2012). اگر آفات مورد اشاره در مراحل تشکیل گل و ابتدای مراحل تشکیل غوزه به گیاه حمله کنند، این امر به ریزش گل‌ها و نیز غوزه‌های بسیار جوان منتهی می‌شود که این وضعیت در کاهش تعداد غوزه بر روی



شکل ۳. A. مقایسه میانگین صفت تعداد غوزه در لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$. این شکل نشان می‌دهد که صفت تعداد غوزه در لاین‌های مورد مطالعه تفاوت بسیار زیادی دارند. **B.** مقایسه میانگین درصد آلودگی غوزه در لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$ که نشان‌دهنده آن است که ارقام غیرتراریخته ورامین و خرداد به همراه لاین تراریخته D بیشترین درصد آلودگی و لاین‌های تراریخته A و B کمترین درصد آلودگی را داشته‌اند. **C.** مقایسه میانگین درصد برچه‌های آلوده در لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$ که نشان می‌دهد که ارقام غیرتراریخته خرداد و ورامین بیشترین درصد آلودگی و لاین‌های تراریخته A و B کمترین درصد آلودگی را داشته‌اند. **D.** مقایسه میانگین درصد آسیب در لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$ که این شکل نیز نشان می‌دهد که ارقام غیرتراریخته خرداد و ورامین کمترین درصد آسیب و لاین تراریخته D بیشترین درصد آسیب را داشته‌اند.

Figure 3. A. Means comparison for boll per plant trait in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure shows that boll per plant varied between genotypes which may be reflected from resistance or susceptibility of genotypes to Lepidoptera pests. B. Means comparison for boll contamination in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure illustrates that non-transgenic lines along with transgenic line D experienced maximum contamination while two transgenic lines A and B had the least boll contamination. C. Means comparison for locule damage in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure illustrates that non-transgenic lines along with transgenic line D experienced maximum damages while two transgenic lines A and B had the least locule damage. D. Means comparison for boll injuries in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure illustrates that non-transgenic lines experienced minimum injuries while transgenic line D had the maximum boll injuries.

تفکیک این دو وضعیت و کمی سازی صفت ریزش گل بر اثر هجوم آفت در شرایط مزرعه ای بسیار مشکل است. در نتیجه با اینکه صفت درصد غوزه آلوده یا تعداد غوزه آلوده که به دنبال تغذیه لاروها از غوزه های بزرگ تر و کمی سازی آن به وجود می آید، به تنهایی معیار بسیار خوبی از مقاومت یا حساسیت یک رقم نسبت به آن آفات نیست، ولی با این حال، با مقاومت لاین ها نسبت به این آفات ارتباط داشته و در کنار صفات دیگر، تصویر مناسبی از مقاومت لاین ها را به دست می دهد (Siddiqui et al., 2022).

مقایسه میانگین درصد برچه های آلوده شده در لاین های مورد مطالعه در شکل C.۳ خلاصه شده است. این شکل نشان می دهد که الگوی مرتب شدن لاین ها بر اساس صفت درصد برچه های آلوده به الگوی مرتب شدن آنها با صفت درصد غوزه های آلوده شباهت تام دارد. بر این اساس، ارقام غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۷ و ۶/۷ درصد برچه آلوده دارای بیشترین نرخ آلودگی بوده و لاین های تراریخته B و A به ترتیب با ۰/۳۲ و ۰/۴۹ درصد، دارای کمترین نرخ آلودگی بودند. سایر لاین ها شامل I, G, J, E, C و D به ترتیب با ۲/۸، ۳/۴، ۳/۶ و ۵/۲ درصد در بین این دو مقدار کرانه ای قرار گرفتند.

هر غوزه پنبه به صورت معمول دارای ۴ یا ۵ برچه است. محتوای این برچه ها یعنی بذره های نارس و نرم و نیز الیاف نارس مورد تغذیه لارو آفات بالپولکدار قرار می گیرد. این برچه ها به وسیله دیواره ای از یکدیگر جدا می شوند (شکل ۱). در صورتی که لارو بتواند به داخل غوزه نفوذ کند، در شرایط معمول از طریق سوراخ کردن دیواره برچه ها و ورود به آنها، کل غوزه را آلوده می کند. با این وجود، در برخی شرایط لارو نمی تواند کل یک غوزه را مورد تغذیه قرار دهد و تنها موفق به آلوده سازی تعداد کمی از برچه های غوزه خواهد شد. یکی از دلایل چنین امری، وجود مقاومت در غوزه ها در برابر آفت است. اگر لاروی که به غوزه حمله می کند در سنین بالاتری از مراحل نمو خود قرار داشته باشد، نسبت به اثرات سمی پروتئین کریستالی مقاومت بیشتری از خود نشان می دهد. معنای این امر آن است که لاروهای مذکور مدت بیشتری

مقایسه میانگین درصد آلودگی غوزه در لاین های مورد مطالعه در شکل B.۳ خلاصه شده است. این شکل نشان می دهد که ارقام غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۲۴/۷ و ۲۳ درصد و لاین تراریخته D با ۱۹ درصد بیشترین درصد آلودگی، و لاین های تراریخته B و A به ترتیب با ۲/۵ و ۳ درصد کمترین آلودگی را در شرایط آزمایش نشان داده اند. سایر لاین های مورد مطالعه در این آزمایش در بین این مقادیر کرانه ای قرار داشتند به طوری که درصد آلودگی لاین های تراریخته I, G, J, E, C و D به ترتیب برابر ۱۰/۲، ۱۳، ۱۳/۴، ۱۴/۵ و ۱۶/۳ بود. نکته مهم در این میان، وضعیت رقم تراریخته موسوم به لاین C بود که آلودگی غوزه آن برابر ۱۴/۵ درصد گزارش شد. این مقدار آلودگی اگرچه در این آزمایش یک اختلاف ده درصدی با ارقام غیرتراریخته و اختلاف ۱۲ درصدی با بهترین لاین تراریخته این آزمایش نشان داد ولی به عنوان یک لاین تراریخته در کشور چین مورد رهاسازی قرار گرفته است.

صفت درصد و یا تعداد غوزه آلوده معیار اصلی اندازه گیری مقاومت ارقام در برابر آفات بالپولکدار و سایر آفات غوزه پنبه است (Fang et al., 2021; Siddiqui et al., 2022). با این وجود، توجه به الگوی رشد و تولید مثل آفت از اهمیت به سزایی در این میان برخوردار است. پروانه مادر آفات بالپولکدار، محل اتصال رگبرگ اصلی به برگ در برگ های جوان و بسیار جوان را به عنوان محل تخم گذاری انتخاب می کند. پس از تفریخ، لارو سن ۱ ضمن تغذیه از این برگ های جوان، راه غوزه های تازه تشکیل شده و حتی گل های گیاه را در پیش می گیرد و پس رسیدن به مقصد، وارد غوزه ها شده و به تغذیه از محتوای غوزه ها می پردازد. در صورتی که غوزه، بسیار جوان باشد، این غوزه به سرعت از گیاه جدا می شود. نتیجه این وضعیت، انباشته شدن تعداد زیادی گل و غوزه جوان در زیر بوته های گیاه پنبه خواهد بود. با اینکه این وضعیت در نگاه اول می تواند به عنوان معیاری از مقاومت یا حساسیت به آفت تلقی شود، ولی با توجه به اینکه عوامل دیگری مثل مراقبت های زراعی و کمبود رطوبت نیز به ریزش گل ها و غوزه های جوان منتهی می شوند، امکان

دوام آورده و به تغذیه خود ادامه می‌دهند. هرچه مقدار مقاومت لاین پنبه در برابر آفت بیشتر باشد، لاروها با سرعت بیشتری از بین می‌روند و در نتیجه، برچه‌های کمتری خسارت می‌بینند (Fang et al., 2021; Siddiqui et al., 2022). از این رو، جنبه دیگر مقاومت در برابر آفت با صفت تعداد یا درصد برچه‌های آلوده سنجیده می‌شود.

مقایسه میانگین درصد آسیب به غوزه در لاین‌های مورد مطالعه در شکل ۳.D. خلاصه شده است. این شکل نشان می‌دهد که الگوی آسیب در این لاین‌ها کاملاً متفاوت با الگوی آلودگی غوزه است؛ لاین‌های غیرتراریخته در این شکل کمترین آسیب را نشان می‌دهند، در حالی درصد آسیب به لاین‌های تراریخته بیشتر است. ابتدا باید توضیح داد که آسیب وارده به غوزه‌ها به صورت وجود نقاطی تعریف می‌شود که در اثر تغذیه آفت از پوست غوزه‌ها به وجود آمده است. در واقع در این شرایط، آن آفت موفق به نفوذ به داخل برچه‌ها و آلودگی آن نمی‌شود. مهم‌ترین عامل این وضعیت، مرگ و میر لاروها در اثر وجود پروتئین کریستالی در بافت‌های مورد تغذیه در لاین‌های تراریخته است. به عبارت دیگر در لاین‌های تراریخته، لارو آفت در همان مراحل ابتدایی تغذیه از پوست غوزه در اثر وجود پروتئین کریستالی در آن از بین می‌رود و فرصت نفوذ به داخل غوزه و آلوده کردن برچه و غوزه را پیدا نمی‌کند. در عوض در لاین‌های غیرتراریخته به خاطر عدم وجود پروتئین کریستالی، مانعی برای ادامه تغذیه آفت و نفوذ به داخل غوزه برای آلوده کردن برچه‌ها و کل غوزه و گذار از مرحله آسیب به خسارت وجود ندارد. از این رو انتظار می‌رود که در ارقام غیرتراریخته شاهد کمترین میزان آسیب و بیشترین میزان خسارت به برچه و غوزه باشیم.

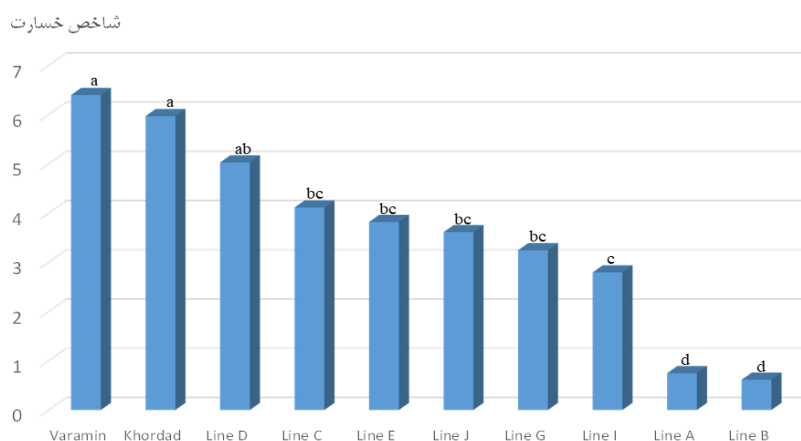
نتایج به دست آمده از این مطالعه تأییدکننده همین وضعیت است. شکل ۳.D. نشان می‌دهد که ارقام غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۱/۴ و ۱/۸ درصد آسیب به غوزه دارای کمترین میزان آسیب بودند. این در حالی است که لاین تراریخته D با ۶/۶ درصد بیشترین میزان آسیب را تجربه کرد. سایر لاین‌های تراریخته در این آزمایش

اختلاف اندکی از نظر این صفت از خود نشان دادند و میزان آسیب آنها بین این دو مقدار کرانه‌ای قرار داشت.

نتایج مقایسه میانگین برای صفت شاخص خسارت به عنوان معیاری مناسب و بسیار خوب برای مقایسه میزان مقاومت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در برابر خسارت آفات بالپولکدار در شکل ۴ خلاصه شده است. همانگونه که شکل ۴ نشان می‌دهد، لاین‌های غیرتراریخته ورامین و خرداد با ۶/۴ و ۵/۹ درصد، بیشترین خسارت را از آفات بالپولکدار به خود دیده‌اند. لاین تراریخته D با ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با لاین‌های غیرتراریخته نداشت ولی با لاین تراریخته C نیز اختلاف معنی‌داری نشان نداد. این لاین تجاری تراریخته با ۴/۱ درصد خسارت با لاین‌های تراریخته E، J و G به ترتیب با ۳/۸، ۳/۶ و ۳/۲ درصد در یک گروه قرار گرفت. لاین I با ۲/۸ درصد در یک گروه مجزا قرار گرفت ولی اختلاف معنی‌داری با گروه قبل نشان نداد.

نتایج بررسی‌ها نشان داد که دو لاین تراریخته A و B به ترتیب با ۰/۷ و ۰/۶ درصد خسارت، کمترین خسارت را به خود دیده و به اتفاق در یک گروه قرار گرفتند که اختلاف معنی‌دار قابل توجهی با سایر لاین‌ها از خود نشان دادند.

نتایج این مطالعه که برای نخستین بار در ایران انجام می‌شود، نشان داد که لاین‌های تراریخته مختلف مورد آزمایش در این پروژه سطوح متفاوتی از مقاومت در برابر آفات بالپولکدار را از خود نشان می‌دهند. این نتیجه با سایر نتایجی که مطالعات مختلف گرفته شده است، کاملاً مطابقت دارد. از آنجا که تراژن مورد نظر در لاین‌های تراریخته مستقلاً که از فرایند مهندسی ژنتیک به دست می‌آیند، در نقاط متفاوتی از ژنوم (کروموزوم‌ها) وارد می‌شود، و از آنجا که ساختار کروموزوم‌ها به گونه‌ای است که هم دارای نواحی یوکروماتینی و فعال از نظر بروز ژنی و هم دارای نواحی غیرفعال هتروکروماتینی هستند، ورود تراژن به هر یک از این قسمت‌ها می‌تواند بروز آن ژن را تحت تأثیر قرار دهد که این وضعیت به اثر مکانی معروف است. اختلاف در میزان و نحوه بروز ژن به اختلاف در تولید پروتئین محافظت‌کننده مورد نظر و در نهایت به اختلاف در سطح مقاومت می‌انجامد (Kohli et al., 2010; Siddiqui et al., 2022).



شکل ۴. مقایسه میانگین شاخص خسارت لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$. این شکل نشان می‌دهد که دو لاین تراریخته A و B کمترین خسارت را از اثر آفات بالپولکدار به خود دیده‌اند.

Figure 4. Means comparison for damage index in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure illustrates that non-transgenic lines along with transgenic line D experienced maximum damage index while two transgenic lines A and B had the least index.

وجود دارد که میزان کل پروتئین کریستالی موجود در آنها افزایش یافته و خسارت آفت در لاین تولیدشده به زیر آستانه اقتصادی برسد. بدین ترتیب امکان ایجاد نسلی از آفت که نسبت به این پروتئین کریستالی مقاومت کسب کند نیز به شدت کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که لاین‌های تراریخته A و B پتانسیل عملکرد خوب و مقاومت مناسب در برابر آفات بالپولکدار دارند. همچنین این دو لاین با توجه به برخی از خصوصیات مرتبط با تیپ و ریخت‌شناسی گیاه (که در این مقاله مورد بحث قرار نگرفت) این توانایی را دارند که وارد آزمون‌های گسترده‌تر بررسی مقاومت و خصوصیات زراعی شوند. لذا در نهایت پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری بر روی توانایی‌های تبدیل این دو لاین به ارقام جدید پنبه انجام شود و در صورت اثبات قابلیت‌ها، وارد آزمایش‌های مربوط به ثبت رقم شده و پس از اخذ مجوز آزادسازی از مرجع ذی‌صلاح قانونی در مسیر معرفی به عنوان ارقام جدید پنبه قرار داده شوند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو لاین تراریخته A و B دارای مقاومت بسیار خوبی نسبت به آفات بالپولکدار هستند. همچنین با وجود اینکه لاین‌های تراریخته I, G, J و E بین ۱۰ تا ۱۵ درصد خسارت در برابر آفات بالپولکدار به خود دیدند، باز هم میزان خسارت آنها از یک لاین تراریخته تجاری از کشور چین کمتر بود. این نتیجه در نگاه اول بدین معناست که در صورت مناسب بودن سایر صفات زراعی و کیفی در این لاین‌ها می‌توان آنها را به سمت انجام مطالعات بعدی به منظور تولید و آزادسازی رقم سوق داد. با این وجود، این واقعیت که برخی از آفات بالپولکدار می‌توانند از این لاین‌های تراریخته تغذیه کنند و خسارت به بار آورند، این خطر را به وجود می‌آورد که با گزینش آفات نسبتاً مقاوم و تلاقی آنها با یکدیگر، در نسل بعد و نسل‌های بعد از آن نتایج از آفات به وجود آید که نسبت به پروتئین کریستالی مقاومت به دست آورده و لاین‌های تراریخته مذکور به مرور مقاومت خود را در برابر آفات بالپولکدار از دست بدهند. با این حال، از آنجا که این لاین‌ها هر یک حاوی رویداد تراریزشی متفاوتی بوده و تراژن مذکور در محل متفاوتی از ژنوم قرار دارد (Tohidfar et al., 2008)، یک راه دیگر برای بهره‌گیری از توانایی موجود در این لاین‌های تراریخته، دورگ‌گیری آنها و تجمع تراژن در یک لاین است. بدین ترتیب، این امکان

References

- Ashokkumar, K., & Ravikesavan, R. (2011). Morphological diversity and *per se* performance in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural Science*, 3(2), 107-113.
- Azimi, S., Ashouri, A., Tohidfar, M., & Talaei Hasanlouei, R. (2012). Effect of Iranian Bt cotton on *Encarsia formosa*, parasitoid of *Bemisia tabaci*. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. Available online at www.irjabs.com ISSN 2251-838X/ Vol, 3 (11), 2248-2251 Science Explorer Publications.
- Bednarz, C.W., Don Shurley, W., Anthony, W.S., & Nichols, R.L. (2005). Yield, quality, and profitability of cotton produced at varying plant densities. *Agron. J.*, 97, 235-240.
- Connolly, J.B., Burt A., Christophides, G., Diabate, A., Habtewold, T., Hancock, P.A., James, A.A., Kayondo, J.K., Lwetoijer, D.W., Manjurano, A., McKemey, A.R., Santos, M.R., Windbichler, N., & Randazzo, F. (2024) Considerations for first field trials of low-threshold gene drive for malaria vector control. *Malar. J.* 23, 156. <https://doi.org/10.1186/s12936-024-04952-9>.
- Cooke, B.M., Gareth Jones, D., & Kaye, B. (2006). *The Epidemiology of Plant Diseases*. Springer, pp. 61.
- Darvish Modjeni, T. (2012). *Cotton Pests and their Managements*, Nowrouzi Press, 74 p.
- Fang, Z.X., Zhang, L., Shen, W.J., Liu, L.P., & Liu, B. (2021) Evaluation of the effect of transgenic Bt cotton on snails *Bradybaena* (Acusta) *ravida* and *Bradybaena similaris* (Ferussac). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223, 112557, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112557>.
- Govindan, K., Gunasekaran, K., & Kuttalam, S. (2012). Evaluation of Indian transgenic Bt cotton and non Bt cotton against *Spodoptera Litera* Fab. (Nuctuidae, Lepidoptera) fourth and fifth instar larvae. *Jbiopest*, 5(2), 171-177.
- Kohli, A., Miro, B., & Twyman, R.M. (2010). Transgene Integration, Expression and Stability in Plants, Strategies for Improvements. In, *Transgenic Crop Plants*, Vol 1, Principles and Development, Edited by, Cole C., Michler CH, Abbott AG, Hall TC. Springer, pp 201-238.
- Modirroosta, B., Tohidfar, M., Saba, J., & Moradi, F. (2013). The substantive equivalence of transgenic (Bt and Chi) and non-transgenic cotton based on metabolite profiles. *Funct Integr Genomics*, 14(1), 237-44. <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0355-y>.
- Nickell, C.D., Noel, G.R., Thomas, D.J., & Waller, R. (1990). Registration of Jack soybean. *Crop Sci.*, No. 30, 1365.
- Paterson, A.H., Brubaker, C.L., & Wendel, J.F. (1993). A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*. 11(2), 122-127.
- Ribichich, K.F., Chiozza, M., Ávalos-Britez, S., Cabello, J.V., Arce, A.L., Watson, G., Arias, C., Portapila, M., Trucco, F., Otegui, M.E., & Chan, R.L. (2020) Successful field performance in warm and dry environments of soybean expressing the sunflower transcription factor HB4, *Journal of Experimental Botany*, 71(10), 3142–3156. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa064>.
- Rostamchani, M., Haghazary, A., & Tohidfar M. (2011). Rapid and identification of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants by loop-mediated isothermal amplification. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47(4), 140–148 <https://doi.org/10.17221/7/2011-CJGPB>.
- SAS Institute. (1993). *SAS/STAT User's Guide*, Version 6. Fourth Edition. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- Siddiqui, H.A., Asad, S., Naqvi, R.Z., Asif, M., Liu, C., Liu, X., Farooq, M., Abro, S., Rizwan, M., Arshad, M., Sarwar, M., Amin, I., Mukhtar, Z., & Mansoor, S. (2022) Development and evaluation of triple gene transgenic cotton lines expressing three genes (Cry1Ac-Cry2Ab-EPSPS) for lepidopteran insect pests and herbicide tolerance. *Sci Rep.* 12(1), 18422. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22209-w>.
- Slot, M.M., van de Wiel, C.C.M., Kleter, G.A., Visser R. G. F., & Kok E. J. (2018) The assessment of field trials in GMO research around the world and their possible integration in field trials for variety registration. *Transgenic Res.* 27, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0076-z>.
- Tohidfar, M., Ghareyazie, B., Mousavi, M., & Yazdani, S. (2008). *Agrobacterium* mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic cry1Ab gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6, 164-173.
- Walker, D.R., All, J.N., McPherson, R.M., Boerma, H.R., & Parrott, W.A. (2000). Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, Soybean Looper, Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera, Noctuidae), and Lesser Cornstalk Borer (Lepidoptera, Pyralidae). *BIOLOGICAL AND MICROBIAL CONTROL*, No. 93(3), 613-622.

- Wang, S., Liu, J., Dong, Y., Li, Y., Huang, Y., Ren, M., Yang, M., & Wang, J. (2022) Dynamic monitoring of the impact of insect-resistant transgenic poplar field stands on arthropod communities, *Forest Ecology and Management*, 505, 119921, <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119921>
- Yazdanpanah, F., Tohidfar, M., Ashari, M., Ghareyazi, B., & Mosavi, M. (2009). Enhanced insect resistance to bollworm (*Helicoverpa armigera*) in cotton containing a synthetic cry1Ab gene. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 72-77.
- Yazdi Samadi, B., Rezaei, A., & Valyzadeh, M. (1998). Statistical Design in Agricultural Research. Tehran University Publications. No. 2346. ISBN 964-03-3882-6.

Identification, functional prediction, and verification of Key lncRNAs involved in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization under nitrogen deficiency stress

Aminollah Chalavi¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi² , Seyed Sajad Sohrabi³, Aboozar Soorni⁴

1. Ph. D. Candidate, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2. Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

4. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Correspondence:
Farhad Nazarian-Firouzabadi
Email: nazarian.f@lu.ac.ir

Received: 16, Oct. 2024
Accepted: 29, Jan. 2025

How to cite:

Chalavi, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Sohrabi, S.S., & Soorni, A. (2025). Identification, functional prediction, and verification of Key lncRNAs involved in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization under nitrogen deficiency stress. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 43-56.
(DOI: [10.30473/cb.2025.72513.1985](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72513.1985))

ABSTRACT

Nitrogen (N) is one of the most important nutrients needed for the growth and development of potato (*Solanum tuberosum* L.). In the course of evolution, long non-coding RNA molecules (lncRNAs) have played a role in causing significant changes in plant's responses to abiotic stresses. Given the limited information available on the mechanisms of action and the role of such important regulatory elements during potato tuber developmental stages, this study was conducted to identify and investigate the expression and function of lncRNAs, as well as their target genes, in response to nitrogen treatment. The results of the present study revealed that a total of 211 differentially expressed lncRNA molecules were detected under nitrogen treatment. Of these, four intergenic lncRNA sequences were differentially expressed under nitrogen treatment, and their target genes were associated with ion homeostasis, signal transduction, and protein degradation. The metabolic pathways most frequently associated with the target genes involved the biosynthesis of secondary metabolites, fatty acid metabolism, and fatty acid degradation. This study identified lncRNAs in potatoes under nitrogen treatment for the first time, marking a significant step towards understanding the function of lncRNA in plant's responses to nitrogen. Identifying the location and function of these lncRNAs, along with the activity of differentially expressed genes, will provide valuable insights into the mechanisms underlying the plant's response to nitrogen.

KEY WORDS

Stress-related genes, non-coding RNA, Gene expression.



«مقاله پژوهشی»

شناسایی، پیش‌بینی عملکرد و اعتبارسنجی LncRNAs کلیدی در گیر در غده‌زایی سیب‌زمینی تحت تنش کمبود ازت

امین‌اله چلوی^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۲ , سید سجاد سهرابی^۳، ابودر سورنی^۴

چکیده

نیترژن (N) یکی از مهمترین مواد غذایی برای رشد و نمو سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) است. در جریان تکامل، تغییرات ژنتیکی حیاتی به‌وسیله مولکول‌های RNAهای بلند غیرکدکننده (Long non coding RNAs: LncRNAs) در پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی به‌وجود آمده است. با توجه به اینکه اطلاعات اندکی از مکانیسم عمل و نقش این عناصر مهم تنظیمی در مرحله نمو غده سیب‌زمینی در دسترس است؛ پژوهش حاضر با هدف شناسایی، بررسی بیان و کارکرد LncRNAها و همچنین ژن‌های هدف آن‌ها در پاسخ به تیمار ازت انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در مجموع تعداد ۲۱۱ مولکول LncRNA با بیان متفاوت تحت تیمار ازت شناسایی شدند. از این تعداد ۴ توالی LncRNA بین‌ژنی تحت تیمار ازت بیان متفاوت داشتند که ژن‌های هدف آن‌ها با رونوشت ژن‌های مرتبط با هموستازی یونی، انتقال پیام و تخریب پروتئین همولوژی داشتند. مسیرهای متابولیکی با بیشترین فراوانی ژن‌های هدف شامل بیوستز متابولیت‌های ثانویه، متابولیسم اسیدهای چرب و تخریب اسیدهای چرب بودند. این مطالعه برای اولین بار توالی LncRNA را در سیب‌زمینی تحت تیمار ازت شناسایی نمود و به نظر می‌رسد گامی مفید در شناخت عملکرد LncRNA در چگونگی پاسخ گیاهان به تیمار ازت باشد. مکان‌یابی و عملکرد این LncRNA و فعالیت ژن‌هایی با بیان افتراقی، سبب درک بهتر مکانیسم‌های پاسخ به تیمار ازت می‌شود.

واژه‌های کلیدی

ژن‌های مرتبط با تنش، RNA غیرکدکننده، بیان ژن.

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد ایران.
۲. استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد ایران.
۳. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد ایران.
۴. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

نویسنده مسئول:

فرهاد نظریان فیروزآبادی

رایانامه: nazarian.f@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

استناد به این مقاله:

چلوی، امین‌اله؛ نظریان فیروزآبادی، فرهاد؛ سهرابی، سید سجاد و سورنی، ابودر (۱۴۰۴). شناسایی، پیش‌بینی عملکرد و اعتبارسنجی LncRNAs کلیدی در گیر در غده‌زایی سیب‌زمینی تحت تنش کمبود ازت، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۵۶-۴۳.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72513.1985](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72513.1985))

مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) سومین محصول غذایی مهم جهان به شمار می رود. سیب زمینی معمولاً دارای یک سیستم ریشه‌ای کم عمق و ظریف است، به همین دلیل در جریان رشد و نمو، کمبود عناصر ضروری از جمله ازت و همچنین آب، منجر به افت عملکرد محصول آن خواهد داشت (Birch et al., 2012). نیتروژن یا ازت (N) به عنوان یک عنصر درشت مغذی در مزارعی با مواد آلی محدود، تأثیر مثبتی بر زیست توده، عملکرد و کیفیت غده سیب زمینی دارد (Westermann, 2005)؛ با این حال، مصرف بیش از حد ازت می تواند دو اثر نامطلوب شامل کاهش کیفیت غده ها (Long et al., 2004) و شسته شدن نیترات در سیستم های تأمین آب و انتشار اکسید نیتروژن را به همراه داشته باشد (Zebarth & Rosen, 2007)؛ بنابراین، اهداف طولانی مدت در تولید سیب زمینی شامل افزایش کارایی استفاده از نیتروژن و همچنین توسعه سیستم های مدیریت پایدار نیتروژن برای بهینه سازی مکمل های نیتروژن است تا مقدار مورد نیاز برای حفظ رشد گیاه و دستیابی به عملکرد تأمین گردد (Birch et al., 2012; Westermann, 2005).

تجزیه و تحلیل مولکولی و بررسی روند تغییرات پروفایل بیانی اندام ها و بافت های مختلف ارقام سیب زمینی در شرایط تنش های غیرزیستی مختلف از جمله تنش کمبود ازت منجر به شناسایی برخی از عوامل و مکانیسم های مختلف ژنتیکی دخیل در پاسخ به این شرایط نامطلوب شده است (Gong et al., 2015). تاکنون، چندین مکان ژنی کنترل کننده صفات کمی ادر محصولات مختلف زراعی در ارتباط با کارایی مصرف نیتروژن گزارش شده است (Hawkesford & Griffiths, 2019). پیشرفت ها در رویکردهای ژنومیک عملکردی، منجر به شناسایی چندین ژن تنظیم کننده و ژن های کنترل کننده کارایی مصرف N در گیاهان زراعی شده است (Curci et al., 2017). با این حال، هنوز

مکانیسم های مولکولی چگونگی جذب نیتروژن در گیاهان مشخص نیستند (Simons et al., 2014).

نتایج برخی مطالعات نشان می دهند که مولکول های RNA طویل غیر کدکننده از مهمترین عناصر تنظیم کننده بیان ژن ها هستند که در تنظیم طیف وسیعی از فرآیندهای زیستی از جمله مکانیسم رونویسی، تنظیم پردازش mRNA، مقابله با انواع تنش های زیستی و غیرزیستی، گلدهی، نرغیمی و همچنین تغییرات اپی ژنتیک دخالت دارند. این گروه از مولکول های تنظیم کننده در طیف وسیعی از موجودات زنده از جمله گیاهان و حیوانات شناسایی شده اند (Jha et al., 2020). مطالعات نشان می دهند که طول مولکول های RNA طویل غیر کدکننده به بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید می رسد (Waseem et al., 2020). فناوری های توالی یابی نسل جدید این امکان را فراهم آورده اند تا گروه های مهمی از مولکول های RNA طویل غیر کدکننده در موجودات مختلف از جمله خانواده های مختلف گیاهی شناسایی شوند. با این حال، تعداد مولکول های RNA طویل غیر کدکننده که در گونه های مختلف گیاهی از جمله *Brassica rapa*، *Solanum tuberosum*، *Arabidopsis thaliana*، *Populus trichocarpa*، *Setaria italica*، *Zea mays*، *Oryza sativa* و *Solanum lycopersicum* شناسایی شده متفاوت است (Sanchita Trivedi et al., 2020). هر چند شناسایی و تفسیر عملکرد این گروه از عناصر تنظیمی در آغاز راه خود قرار دارد، با این حال بر اساس مکان ژنی، این گروه از توالی های غیر کدکننده را می توان در سه گروه بین ژنی، اینترونی و آنتی سنس دسته بندی نمود (Ma et al., 2013). بر اساس مطالعات مشخص شده است که مولکول های RNA طویل غیر کدکننده که از نواحی بین ژنی منشأ می گیرند دارای بیان خاص بافتی با پیرایش ضعیف می باشند که از نظر ساختاری پلی آدنیله هستند و عملکرد تنظیمی ترانس دارند. با توجه به اهمیت نیتروژن به عنوان یک ماده مغذی ضروری برای رشد و نمو گیاهان و نقش آن در سنتز اسیدهای آمینه، ATP در

داده‌های خام دریافت شده شامل دو نمونه‌برداری به فاصله ۱۵ روز از اوایل غده‌زایی (۴۸ نمونه) بود. در ابتدا داده‌های خام با استفاده از ابزار FastQC کیفیت‌سنجی و سپس با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic v0.30 (Bolger et al., 2014) خوانش‌های با کیفیت پایین و توالی‌های آداپتور حذف شدند (Bolger et al., 2014). پس از پردازش داده‌های خام، خوانش‌های تمیز شده از هر کتابخانه با ژنوم مرجع سبب‌زمینی با استفاده از ابزار HISAT2 نقشه‌یابی شدند. برای استخراج رونوشت‌های مستندسازی نشده، از ابزار StringTie v2.0.6 (Pertea et al., 2015) استفاده شد، سپس از StringTie merge برای ترکیب، سرهم‌گذاری و ایجاد مجموعه‌ای منحصر به فرد از رونوشت‌ها استفاده شد. برای طبقه‌بندی رونوشت‌ها در گروه‌های مختلف، فایل خروجی StringTie با فایل مستندسازی ژنوم مرجع (GTF) با استفاده از نرم‌افزار gffcompare مقایسه شد. در نهایت، از نرم‌افزار BEDTools v2.29.2 (Quinlan & Hall, 2010) برای استخراج توالی‌ها از ژنوم مرجع سبب‌زمینی استفاده شد.

برای شناسایی lncRNAهای بالقوه، ابتدا رونوشت‌های مستندسازی نشده با در نظر گرفتن حد‌آستانه تعداد رونوشت در میلیون کمتر از ۱ و طول توالی کمتر از ۲۰۰ نوکلئوتید، حذف شدند. در گام بعد، از ابزار FEELnc v2.0 (Wucher et al., 2017) با کاربرد مدل m “shuffle” برای استنتاج lncRNAهای بالقوه از رونوشت‌های مستندسازی نشده استفاده شد. در گام سوم، پتانسیل کدگذاری lncRNAهای پیش‌بینی شده با استفاده از نرم‌افزار محاسبه کننده پتانسیل کدگذاری مورد ارزیابی قرار گرفت (Kang et al., 2017). در گام بعد از ابزار tRNAscan-SE v2.0 و Barrnap v0.9 برای فیلتر کردن tRNAها و rRNAها استفاده شد (Lowe & Chan, 2016). در گام پنجم، توالی رونوشت‌های باقی‌مانده برای افزایش اختصاصی بودن و دقت پیش‌بینی و رتبه‌بندی با استفاده از ابزار CREMA مورد ارزیابی قرار

گیاخان مکانیسم مولکولی سنتز و عملکرد آن در برخی از گیاخان مورد توجه محققین قرار گرفته است (Hawkesford & Griffiths, 2019). تاکنون چندین مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده درگیر در پاسخ به کمبود نیتروژن در گیاخان مختلف مانند برنج، ذرت و صنوبر شناسایی شده‌اند (Chen et al., 2016; Lv et al., 2016; Shin et al., 2018). برای نمونه، شین و همکاران (Shin et al., 2018) در برنج مکانیسم عملکرد مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده cis-NATAMT 1.1 و 1.2 را بررسی و نشان دادند که برهم‌کنش ژن AMT1 و مولکول RNA طویل غیرکدکننده متناظر با آن در در هموستازی N مؤثر می‌باشد (Shin et al., 2018). مطالعه بر روی مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده در ژنوم آرابی‌دوپسیس نیز تحت انواع مختلف شرایط کمبود مواد مغذی نقش trans-acting siRNA3 را به‌عنوان یک مولکول RNA طویل غیرکدکننده مهم برجسته کرده است (Fukuda et al., 2019). با توجه به این‌که تنش‌های غیرزیستی منجر به تغییر در بیان ژن‌ها و عوامل تنظیمی متعددی در بافت‌ها و دوره‌های نموی مختلف می‌شوند؛ از این‌رو، انتظار می‌رود که با تحلیل مجموع رونوشت‌ها، بتوان ژن‌ها و عوامل تنظیمی از جمله مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده درگیر در پاسخ به تنش‌ها از جمله تنش کمبود ازت را شناسایی نمود؛ بنابراین، هدف از پژوهش حاضر شناسایی و بررسی بیان مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده پاسخگو به تنش کمبود نیتروژن و شناسایی ژن‌های هدف آن‌ها در جریان غده‌زایی سبب‌زمینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی LncRNAs

در گام نخست، کتابخانه داده‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکرپتوم سبب‌زمینی تحت تیمار کمبود ازت و شاهد از پایگاه داده NCBI دانلود شدند (Gálvez et al., 2016).

دارای بیان افتراقی و مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده که بیان افتراقی نشان دادند به‌عنوان ورودی به LncTar معرفی شدند و با استفاده از پارامترهای پیش‌فرض ژن‌های هدف ترانس‌شناسایی شدند.

شناسایی ژن‌ها و LncRNAs با بیان افتراقی
برای تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن‌های هدف و همچنین LncRNAها از نرم‌افزار DESeq2 (Love et al., 2014) با در نظر گرفتن حدود آستانه $FDR < 0.05$ ، $|\log_2(FC)| \geq 2$ و $CPM \geq 1$ استفاده شد.

کشت و اعمال تیمار

آزمایش گلخانه‌ای در ۱۹ اسفند ۱۴۰۱ در گلدان‌های ۸ لیتری انجام شد. مقدار ۷۰۰ گرم شن برای زهکشی و ۶ کیلوگرم خاک در هر گلدان ریخته شد. نتیجه آزمون خاک کشت گلدانی نشان داد که $pH = 7/6$ ، درصد کربن آلی ۱/۰۹، وزن مخصوص ظاهری ۱/۵۹، بافت خاک رسی، درصد نیتروژن ۰/۱۱۲، فسفر ۱۱/۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و پتاسیم ۴۰۳ پی‌پی‌ام بود. تیمارهای مورد نظر شامل دو میزان کود نیتروژن (۰ و ۰/۳ گرم نیتروژن در گلدان) بود که در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. کود N در هنگام کاشت به‌عنوان نترات آمونیوم (۰-۰-۴۶) با حجم کامل خاک گلدان مخلوط شد. همچنین در تمام گلدان‌ها مقدار ۰/۳ گرم P_2O_5 چهل و شش درصد و K_2O پنجاه و پنج درصد به‌صورت مخلوط با خاک گلدان در هنگام کاشت استفاده شد. سپس یک عدد سیب‌زمینی ۵۰ گرمی بذری وارسته‌شپودی در هر گلدان کاشته شد. گیاهان در گلدان تحت شرایط گلخانه (۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۶/۸ ساعت روز/تاریکی) رشد کردند. نمونه‌برداری در اوایل مرحله غده‌زایی انجام شد. در هر نمونه‌برداری، برگچه آپیکال آخرین برگ کاملاً منبسط شده (معمولاً چهارمین برگ از بالای گیاه) در هر گلدان نمونه‌برداری شد و بلافاصله در ازت مایع منجمد و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (شکل ۱).

گرفتند (Simopoulos et al., 2018). جستجو با استفاده از ابزار BLAST علیه پایگاه‌های داده پروتئینی UniProt، Pfam و Rfam انجام شد. در نهایت از ابزار PlancPro (Negri et al., 2019) برای بررسی و ارزیابی مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده شناسایی شده استفاده شد. برای ارزیابی حفاظت‌شدگی توالی‌های شناسایی شده و معتبرتر کردن این مجموعه، مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده شناسایی شده در این مطالعه با مجموعه LncRNAهای گیاهی موجود در پایگاه GreeNC (Paytuví Gallart et al., 2016)، CANTATAdb v2.0 (Szcześniak et al., 2019) و LncRNAdb v2.0 (Quek et al., 2015) و PLncDB v2.0 (Jin et al., 2021) بلاست شدند.

پیش‌بینی، مستندسازی عملکردی و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌های هدف

در این مطالعه، کار مستندسازی عملکردی ژن‌های واقع در ۱۰۰ Kbp بالادست و پایین دست مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده شناسایی شده، به‌عنوان ژن‌های هدف بالقوه‌ای که با فعالیت عناصر سیس تنظیم می‌شوند از طریق تجزیه و تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن^۱ و مسیرهای متابولیکی^۲ با استفاده از String Analysis انجام شد (Szkłarczyk et al., 2023). در پایگاه <https://spudb.uga.edu> از نظر عملکردی و بیولوژیکی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape v3.10 شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین ترسیم و با استفاده از افزونه cyto-hubba ژن‌های هاب مشخص شدند. علاوه بر این برای شناسایی ژن‌های هدف ترانس برهم‌کنش بین مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده با بیان افتراقی^۳ و ژن‌های دارای بیان افتراقی^۴ با استفاده از ابزار LncTa بررسی شد (Li et al., 2015). برای این منظور، ژن‌های

^۱ Gene ontology: GO

^۲ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: KEGG

^۳ Differential expression long non-coding RNA: DE-lncRNA

^۴ Differential expression gene: DEG

بررسی تغییرات بیان نسبی LncRNA های

شناسایی شده با استفاده از qRT-PCR

به منظور بررسی و تأیید روند تغییرات بیان LncRNA های شناسایی شده، سطح بیان برخی از مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده از طریق واکنش qRT-PCR در نمونه کنترل و تحت تنش کمبود ازت سنجش شد. بدین منظور، RNA کل با استفاده از کیت استخراج ستونی DENAzist RNA طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده استخراج شد. پس از بررسی و تأیید کیفیت و کمیت RNA استخراجی از طریق نانودراپ و ژل-الکتروفورز، cDNA با استفاده از مقادیر برابر از

نمونه‌ها، با استفاده از کیت Sinnaclon Reverse (First Strand cDNA Synthesis Kit) شرکت سیناکلون طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده سنتز شد. در نهایت واکنش qRT-PCR با استفاده از cDNA سنتز شده به عنوان الگو، آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و مسترمیکس سایبرگرین (Sina SYBR Blue No) (ROX) شرکت سیناکلون در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی با استفاده از دستگاه Q gene Real-time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش از ژن خانه‌دار *elf1-α* جهت نرمال‌سازی داده‌های بیانی با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta C_t}$ استفاده شد.



شکل ۱. تأثیر کمبود نیتروژن بر رشد سیب‌زمینی. گلدان سمت چپ: کمبود نیتروژن و گلدان سمت راست: تیمار شده با ۰/۳ گرم نیترا ت آمونیوم

Figure 1. Effect of nitrogen deficiency on potato growth. Left pot: nitrogen deficiency and right pot: treated with 0.3 grams of ammonium nitrate

جدول ۱. ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش qRT-PCR

Table 1. Characteristics of primers used for qRT-PCR reaction

Sequence name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon length (bp)
StlncRNA-161_F	TCTATCTCCATCACTTGTTGTATG	60	147
StlncRNA-161_R	CAATAACGCAAGCAATTAGGTAC	59	
StlncRNA-162_F	TGCAGAATTGCAAATTAGAGATCAG	61	152
StlncRNA-162_R	TCTTCTATGAGTTGGTTCAGGTATT	61	
StlncRNA-63_F	ATCTTTCCATCCATACTAACCATC	60	169
StlncRNA-63_R	5'ATCCAACAGCCACCTTCTC3'	57	
StlncRNA-75_F	AGAGAAATACACGCACTAAGAGAC	62	161
StlncRNA-75_R	CATCTACAAACACGGCTACAATC	61	
<i>elf1-α</i> _F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	57	160
<i>elf1-α</i> _R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	61	

نتایج

شناسایی توالی‌های lncRNA در پروفایل بیانی

سیب‌زمینی

در مجموع، پس از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA seq سیب‌زمینی تعداد ۱۰۳۶ رونوشت به‌عنوان lncRNA شناسایی شد. از این تعداد، ۲۱۱ رونوشت به‌عنوان مولکول‌های RNA طولی غیرکدکننده دارای بیان افتراقی شناسایی شدند (جدول ۲). چهار رونوشت با بیان متفاوت در نمونه‌برداری اول و ۳ رونوشت

با بیان متفاوت از نمونه‌برداری دوم به‌عنوان مولکول‌های RNA طولی غیرکدکننده دارای بیان افتراقی بین‌ژنی شناسایی شدند که ۳ رونوشت StlncRNA-161، StlncRNA-162 و StlncRNA-75 در بین دو مرحله نمونه برداری مشترک بودند. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بیان نسبی این ۳ رونوشت تحت تیمار ازت در هر دو مرحله نمونه‌برداری افزایش یافت. این در حالی بود که بیان نسبی StlncRNA-63 در نمونه برداری اول کاهش و در نمونه برداری دوم تغییر نکرد (جدول ۳).

جدول ۲. نام و موقعیت کروموزومی lncRNAهای شناسایی شده در سیب‌زمینی تحت تنش کمبود نیتروژن

Table 2. Names and chromosomal location of LncRNAs identified in potato under nitrogen deficiency stress

Putative l name	Chromosome position	Contractual name	Chromosome position
StlncRNA-1	chr01:13964104-13965507	StlncRNA-107	chr01:8739041-8740307
StlncRNA-2	chr01:21526475-21527732	StlncRNA-108	chr01:9460818-9461380
StlncRNA-3	chr01:21529207-21529784	StlncRNA-109	chr02:18101953-18103716
StlncRNA-4	chr01:28166081-28167741	StlncRNA-110	chr02:18871211-18872102
StlncRNA-5	chr01:31297785-31299166	StlncRNA-111	chr02:20097382-20100259
StlncRNA-6	chr01:33643651-33646864	StlncRNA-112	chr02:22969938-22971875
StlncRNA-7	chr01:3570218-3572360	StlncRNA-113	chr02:26915902-26917304
StlncRNA-8	chr01:47521639-47523742	StlncRNA-114	chr02:30674462-30677192
StlncRNA-9	chr01:5358910-5359451	StlncRNA-115	chr02:32005455-32006057
StlncRNA-10	chr01:53751745-53752326	StlncRNA-116	chr02:33801300-33801528
StlncRNA-11	chr01:53752893-53753533	StlncRNA-117	chr02:38967466-38971167
StlncRNA-12	chr01:53755049-53755418	StlncRNA-118	chr02:40315273-40316759
StlncRNA-13	chr01:53755958-53760263	StlncRNA-119	chr02:43564117-43567893
StlncRNA-14	chr01:55307727-55310110	StlncRNA-120	chr02:44806346-44807191
StlncRNA-15	chr01:58532012-58534171	StlncRNA-121	chr02:7842505-7843670
StlncRNA-16	chr01:62396333-62398604	StlncRNA-122	chr02:8710395-8711023
StlncRNA-17	chr01:63911906-63912970	StlncRNA-123	chr03:18700345-18703311
StlncRNA-18	chr01:63918281-63919077	StlncRNA-124	chr03:25511542-25512020
StlncRNA-19	chr01:64740091-64742193	StlncRNA-125	chr03:25900482-25901285
StlncRNA-20	chr01:67182608-67183722	StlncRNA-126	chr03:32560521-32562636
StlncRNA-21	chr01:68671900-68673843	StlncRNA-127	chr03:32566699-32569085
StlncRNA-22	chr01:69080239-69082111	StlncRNA-128	chr03:34762900-34764275
StlncRNA-23	chr01:7299440-7301832	StlncRNA-129	chr03:38429897-38431958
StlncRNA-24	chr01:86079170-86080540	StlncRNA-130	chr03:40882970-40884362
StlncRNA-25	chr03:43727240-43729380	StlncRNA-131	chr03:41312872-41313468
StlncRNA-26	chr03:51020807-51022072	StlncRNA-132	chr05:525800-528977
StlncRNA-27	chr03:59724948-59727739	StlncRNA-133	chr05:8546915-8548721
StlncRNA-28	chr03:60035981-60037739	StlncRNA-134	chr05:8824775-8825047
StlncRNA-29	chr04:1715669-1717289	StlncRNA-135	chr06:17204994-17205315
StlncRNA-30	chr04:1733518-1735026	StlncRNA-136	chr06:22318413-22319692
StlncRNA-31	chr04:18208376-18208861	StlncRNA-137	chr06:23181005-23182484
StlncRNA-32	chr04:20747321-20749150	StlncRNA-138	chr06:23183372-23183833
StlncRNA-33	chr04:22388940-22392095	StlncRNA-139	chr06:3090836-3092214
StlncRNA-34	chr04:29127288-29129514	StlncRNA-140	chr06:39437920-39439403
StlncRNA-35	chr04:38316029-38316493	StlncRNA-141	chr06:43007658-43009141
StlncRNA-36	chr04:46125856-46127432	StlncRNA-142	chr06:46519267-46520734
StlncRNA-37	chr04:51640111-51640680	StlncRNA-143	chr06:48412873-48413235
StlncRNA-38	chr04:5340445-5343265	StlncRNA-144	chr06:49779585-49781818
StlncRNA-39	chr04:5436490-5436984	StlncRNA-145	chr06:55989928-55992728
StlncRNA-40	chr04:58307895-58310072	StlncRNA-146	chr06:58439197-58439562
StlncRNA-41	chr04:597630-601541	StlncRNA-147	chr06:8004796-8005678
StlncRNA-42	chr04:59939297-59941596	StlncRNA-148	chr07:15616831-15618483
StlncRNA-43	chr04:606282-606730	StlncRNA-149	chr07:18960877-18964687
StlncRNA-44	chr04:65867011-65868126	StlncRNA-150	chr07:21089784-21093308
StlncRNA-45	chr04:65875795-65876606	StlncRNA-151	chr07:31094448-31099259
StlncRNA-46	chr04:9328117-9329863	StlncRNA-152	chr07:31431329-31435104

ادامه جدول ۲. نام و موقعیت کروموزومی LncRNAهای شناسایی شده در سیب‌زمینی تحت تنش کمبود نیتروژن

Continued table 2. Names and chromosomal location of LncRNAs identified in potato under nitrogen deficiency stress

Putative l name	Chromosome position	Contractual name	Chromosome position
StlncRNA-47	chr04:9443270-9443605	StlncRNA-153	chr07:33464371-33464950
StlncRNA-48	chr05:40640284-40642343	StlncRNA-154	chr07:35229006-35230701
StlncRNA-49	chr05:47627768-47629887	StlncRNA-155	chr07:35233805-35234214
StlncRNA-50	chr09:11471221-11473097	StlncRNA-156	chr07:35473390-35473742
StlncRNA-51	chr09:14904636-14906659	StlncRNA-157	chr07:36677705-3668106
StlncRNA-52	chr09:18590690-18590915	StlncRNA-158	chr07:3668726-3669574
StlncRNA-53	chr09:24989203-24993001	StlncRNA-159	chr07:43200038-43206413
StlncRNA-54	chr09:25082311-25083427	StlncRNA-160	chr07:44427965-44428860
StlncRNA-55	chr09:35689139-35689498	StlncRNA-161	chr07:48191773-48192231
StlncRNA-56	chr09:38933484-38934678	StlncRNA-162	chr07:48192552-48193268
StlncRNA-57	chr09:40195971-40199700	StlncRNA-163	chr07:5158368-5160315
StlncRNA-58	chr09:40903708-40904315	StlncRNA-164	chr07:7309460-7309761
StlncRNA-59	chr09:4372957-4373713	StlncRNA-165	chr07:8767606-8770053
StlncRNA-60	chr09:45568098-45569418	StlncRNA-166	chr08:31727651-31731251
StlncRNA-61	chr09:52994949-52997094	StlncRNA-167	chr08:32024536-32028707
StlncRNA-62	chr09:56426509-56427939	StlncRNA-168	chr08:32030687-32030940
StlncRNA-63	chr09:58631381-58632701	StlncRNA-169	chr08:32626040-32627389
StlncRNA-64	chr09:63758136-63759902	StlncRNA-170	chr08:33460989-33463874
StlncRNA-65	chr09:7741610-7742294	StlncRNA-171	chr08:33497510-33497969
StlncRNA-66	chr09:9865021-9867573	StlncRNA-172	chr08:46194421-46196996
StlncRNA-67	chr10:25255783-25257221	StlncRNA-173	chr08:47953634-47956275
StlncRNA-68	chr10:2856208-2858759	StlncRNA-174	chr08:59188180-59189737
StlncRNA-69	chr10:3356200-3357967	StlncRNA-175	chr08:6215718-6217682
StlncRNA-70	chr10:38064936-38066354	StlncRNA-176	chr08:6736456-6737120
StlncRNA-71	chr10:39029637-39031385	StlncRNA-177	chr08:6742754-6745540
StlncRNA-72	chr10:39710699-39713542	StlncRNA-178	chr08:6757529-6758260
StlncRNA-73	chr10:41570148-41572059	StlncRNA-179	chr08:6758838-6759192
StlncRNA-74	chr10:42603962-42605703	StlncRNA-180	chr09:11047553-11048337
StlncRNA-75	chr10:43339868-43340625	StlncRNA-181	chr09:1139297-1140265
StlncRNA-76	chr10:44107459-44110265	StlncRNA-182	chr12:26077197-26080957
StlncRNA-77	chr10:45895315-45897777	StlncRNA-183	chr12:3011161-3011651
StlncRNA-78	chr10:49419803-49420130	StlncRNA-184	chr12:37518131-37520198
StlncRNA-79	chr10:50689839-50690914	StlncRNA-185	chr12:3975685-3978083
StlncRNA-80	chr10:50696484-50697019	StlncRNA-186	chr12:39906490-39907743
StlncRNA-81	chr10:52409789-52411593	StlncRNA-187	chr12:51210904-51212354
StlncRNA-82	chr10:52927694-52929208	StlncRNA-188	chr12:52011304-52011850
StlncRNA-83	chr10:59498505-59500016	StlncRNA-189	chr12:54058803-54061580
StlncRNA-84	chr10:5956402-5959050	StlncRNA-190	chr12:57383390-57385962
StlncRNA-85	chr10:7665652-7667355	StlncRNA-191	chr12:58579911-58581307
StlncRNA-86	chr11:15027306-15029335	StlncRNA-192	chr12:58583204-58583819
StlncRNA-87	chr11:18914259-18916463	StlncRNA-193	chr12:6096949-6101002
StlncRNA-88	chr11:21749461-21751129	StlncRNA-194	chr12:9511877-9514063
StlncRNA-89	chr11:28764242-28764938	StlncRNA-195	chr01:2265164-2267013
StlncRNA-90	chr11:33635647-33641461	StlncRNA-196	chr01:28590893-28591495
StlncRNA-91	chr11:35782768-35783347	StlncRNA-197	chr01:37487326-37490236
StlncRNA-92	chr11:38795650-38796150	StlncRNA-198	chr01:76969151-76972730
StlncRNA-93	chr11:41752200-41753075	StlncRNA-199	chr04:16859631-16860381
StlncRNA-94	chr11:46464639-46469217	StlncRNA-200	chr04:47746824-47747304
StlncRNA-95	chr11:46474113-46476801	StlncRNA-201	chr04:7731586-7732128
StlncRNA-96	chr11:8694111-8695917	StlncRNA-202	chr05:2910245-2912011
StlncRNA-97	chr11:924189-925642	StlncRNA-203	chr06:49063329-49066002
StlncRNA-98	chr12:15623126-15624983	StlncRNA-204	chr07:17615864-17616536
StlncRNA-99	chr12:16316837-16319806	StlncRNA-205	chr07:25657895-25658245
StlncRNA-100	chr09:1268028-1268817	StlncRNA-206	chr07:27564929-27565557
StlncRNA-101	chr09:61123545-61125295	StlncRNA-207	chr07:46817620-46819511
StlncRNA-102	chr10:56210491-56210988	StlncRNA-208	chr07:54860143-54860557
StlncRNA-103	chr11:37600035-37601983	StlncRNA-209	chr07:9561849-9562274
StlncRNA-104	chr11:46531263-46531660	StlncRNA-210	chr08:6208797-6209187
StlncRNA-105	chr12:11354258-11354722	StlncRNA-211	chr08:7315153-7317735
StlncRNA-106	chr12:9404039-9405109		

داد که پروتئین‌های هدف در در سه حوزه فرایندهای زیستی^۱، عملکرد مولکولی^۲ و جایگاه سلولی^۳ و همچنین مسیرهای متابولیکی دخالت داشتند (شکل ۳). همان‌طور که در شکل ۳ آمده است در حوزه جایگاه سلولی، "آنا‌تومیک سلولی" با ۸۵ پروتئین هدف دارای بیشترین فراوانی بود، به دنبال آن، "فرآیندهای اسیدهای چرب" با ۱۵ پروتئین، "بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه" با ۱۰ پروتئین، "تخریب و متابولیسم اسیدهای چرب"، هر یک با ۳ پروتئین در مرتبه بعدی قرار داشتند.

اعتبارسنجی بیان LncRNA های شناسایی شده
به منظور بررسی تغییرات بیان و همچنین اعتبارسنجی بیان توالی مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده شناسایی شده، چهار توالی مولکول RNA طویل غیرکدکننده منتخب در این مطالعه با استفاده از واکنش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مقایسه بیان نسبی این چهار توالی در دو حالت RNA-Seq و qRT-PCR نشان داد که بیان توالی‌های شناسایی شده در روش RNA-seq و qRT-PCR، همبستگی مثبت و معنی‌داری ($r = 0.95$, $P < 0.01$) بین دو حالت سنجش وجود داشت (شکل ۴).

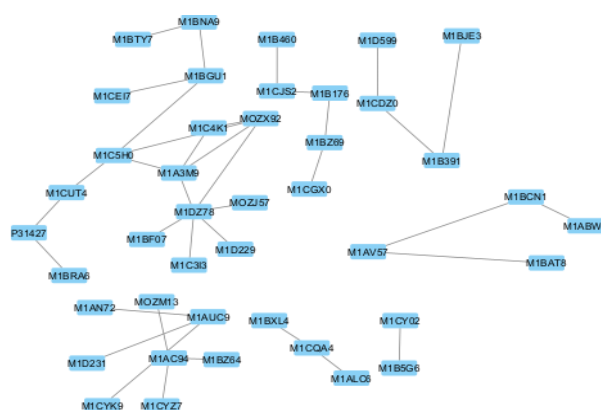
شبکه پروتئین‌های هدف LncRNAs

برای بررسی شبکه برهم‌کنشی پروتئین‌های هدف مولکول‌های RNA طویل غیرکدکننده با بیان افتراقی از پایگاه داده Strings استفاده شد. نتایج نشان داد که پروتئین‌های بالادست و پایین دست DE-lncRNAs، یک شبکه تنظیمی رونویسی پیچیده را تشکیل می‌دهند (شکل ۲). در کل تعداد ۹۳ پروتئین هدف شناسایی شد که از آن بین ۴۳ پروتئین در تشکیل شبکه دخالت داشتند (شکل ۲). پس از بررسی‌های تکمیلی، پنج پروتئین هاب شناسایی شد که براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده Spud DB پروتئین‌های M0ZX92 و m1a3m9 از خانواده ایزومرازها (دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که برای کاتالیز کردن مرحله اولیه در هر چرخه اکسیداسیون اسید چرب β در میتوکندری سلول‌ها عمل می‌کنند) در این بین قرار داشتند. پروتئین M1C4K1 یک پروتئین حاوی دمین اتصال (NAD) نیکوتین آمیدآدنین دی‌نوکلئوتید و (NADP) نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات است. همچنین پروتئین M1DZ78 یک پروتئین ریبوزومی است که در فرایند انتقال سلولی نقش دارد.

مستندسازی عملکردی و شناسایی مسیرهای

متابولیک پروتئین‌های هدف

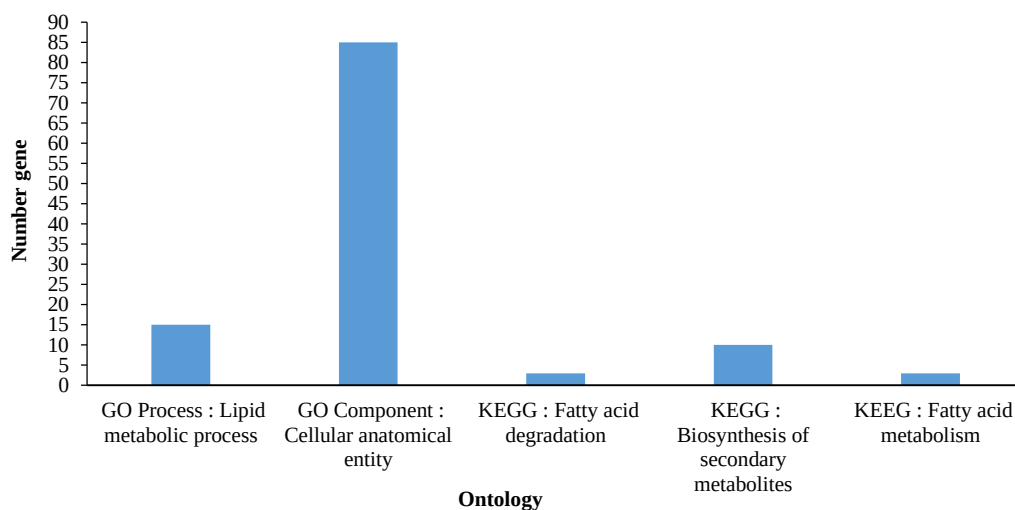
نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌های هدف نشان



شکل ۲. شبکه برهمکنش ژن‌های هدف تنظیم‌شده توسط RNAهای طویل غیرکدکننده شناسایی شده در ترنسکرپتوم سیب‌زمینی تحت تنش کمبود نیتروژن

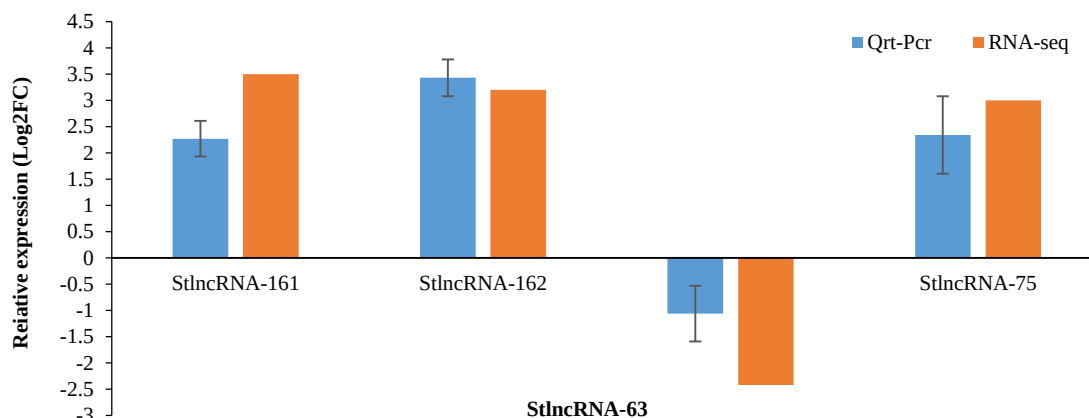
Figure 2. Interaction network of target genes regulated by long non-coding RNAs identified in potato transcriptome under nitrogen deficiency stress

1. Biological process: BP
2. Molecular function: MF
3. Cellular component: CC



شکل ۳. آنالیز عملکردی ژن‌های هدف DE-lncRNA شناسایی شده در ترنسکریپتوم سیب‌زمینی تحت تیمار تنش کمبود نیتروژن

Figure 3. Functional analysis of target genes of DE-lncRNA identified in potato transcriptome under nitrogen deficiency stress treatment



شکل ۴. اعتبارسنجی داده‌های بیان lncRNAهای منتخب دخیل در تنش کمبود نیتروژن با روش RNA-seq با استفاده از qRT-PCR مقادیر بیان نسبی برای سه تکرار زیستی ارائه شده است. میله‌ها نشان‌دهنده مقادیر انحراف معیار هستند.

Figure 4. Validation of expression data of selected lncRNAs involved in nitrogen deficiency stress by RNA-seq method using qRT-PCR. Relative expression values for three biological replicates are presented. The bars represent the standard deviation values

مولکول‌های RNA طولیل غیرکدکننده دارای بیان افتراقی شناسایی شدند. (جدول ۵). بررسی‌های تکمیلی نشان داد که دو LncRNA (StlncRNA-161 و StlncRNA-162) و سه پروتئین هدف احتمالی آن‌ها در اثر تیمار ازت افزایش بیان نشان می‌دهند و LncRNA دیگر (StlncRNA-63) در اثر تیمار ازت، بیان کمی داشت و پروتئین هدف احتمالی آن افزایش بیان نشان داد.

برهم‌کنش DE-lncRNA و ژن‌های هدف

شناسایی شده با استفاده از LncTar

مولکول‌های lncRNA می‌توانند مستقیماً با رونوشت‌های mRNA مکمل خود با جفت شدن بازها تعامل کنند (Hirose *et al.*, 2014). برای بررسی اینکه آیا ژن‌های هدفی با بیان افتراقی (DEGs) توسط LncRNAهای مربوطه به‌صورت ترانس تنظیم می‌شوند یا خیر؟ در مطالعه حاضر با استفاده از الگوریتم موجود در پایگاه LncTar

جدول ۵. ارزیابی برهمکنش بین DE-lncRNA و DEGs با استفاده از LncTar

Table 5. Evaluation of interaction between DE-lncRNA and DEGs using LncTar

Sequence name	Target protein	Activity
StlncRNA-162	Solt.DM.07G008820.1	Involved in phosphate deficiency, phosphate transport and homeostasis
StlncRNA-161	Soltu.DM.10G017580.1	Involved in the ubiquitination of proteins involved in the cell cycle
StlncRNA-161	Soltu.DM.08G011960.1	responsible for the isomerization of 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone (also called chalcone)
StlncRNA-63	Soltu.DM.01G051440.1	Involved in the binding of the phosphate group to other amino acids such as serine and threonine, the phosphorylation of proteins for signal transduction in the cell cycle.

بحث

(Sotub05g028860) که در دوره گلدهی سیبزمینی دخالت دارد، احتمالاً در کنترل غده‌زایی نیز نقش داشته باشد. این ژن در گیاهان با اعمال تیمار ازت بیان نمی‌شود که این موضوع خود نشان می‌دهد که افزایش ازت کافی می‌تواند بلوغ را به تأخیر بیندازد (Navarro *et al.*, 2011). پروتئین Sotub05g012720 در شروع گره‌زایی دخالت دارد که شبیه به عامل رونویسی آراییدوپسیس NIN-like (Sotub01g049920) و Nodulin است. به نظر می‌رسد که پروتئین Sotub05g012720 یک عامل رونویسی پاسخ‌گو به نیترا ت باشد (Konishi & Yanagisawa, 2013) این در حالی است که پروتئین Sotub01g049920 در تشکیل گره در حبوبات و در انتقال اسید آمینه در گیاهان غیر لگوم شرکت می‌کند. تاکنون مطالعاتی در خصوص شناسایی lncRNAs مکانیسم‌های مولکولی تنظیمی پیچیده آن‌ها در گیاه سیبزمینی انجام نگرفته است. در این مطالعه، چهار توالی lncRNA شناسایی شد که به‌طور متفاوت تحت تنش کمبود ازت در مرحله اوایل غده‌زایی سیبزمینی بیان شدند. به‌عنوان مثال، میزان بیان StlncRNA-162 در شرایط تیمار ازت نسبت به کنترل افزایش یافت. پروتئین هدف احتمالی این lncRNA، پروتئینی به شماره دسترسی Soltu.DM.10G017580.1 است که تحلیل عملکردی آن نشان داد که در یوبی کوتینه کردن پروتئین‌های دخیل در چرخه سلولی درگیر است. در مقابل، بیان StlncRNA-63 تحت تیمار ازت نسبت به کنترل کاهش یافت. پروتئین هدف احتمالی این مولکول، پروتئین Soltu.DM.01G051440.1 است که نقش فسفریله نمودن اسیدهای آمینه‌ای مانند سرین و ترونین را دارد. فسفوریلاسیون پروتئین‌ها برای انتقال پیام در چرخه

تأثیر نیتروژن بر رشد و عملکرد سیبزمینی موضوع مطالعات متعددی بوده است. برای مثال، مطالعاتی بر روی اثرات فوتوتیپی کمبود N صورت گرفته است (Zebarth *et al.*, 2004; *al.*, 2002). همچنین برخی مطالعات، اثرات N را بر بیان زیر مجموعه کوچکی از ژن‌ها نشان داده‌اند (Li *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011; Zebarth *et al.*, 2011). با این حال، فناوری RNA-seq روش جدیدی را برای مقایسه کل رونوشت گیاه سیبزمینی تحت تیمار N ارائه می‌دهد. آزمایش گالوز و همکاران یکی از اولین آزمایش‌هایی است که از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA برای یافتن عناصر تنظیمی ژنتیکی و ژن‌های هدف با بیان متفاوت آن‌ها تحت تیمار N استفاده کرده است. نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش عملکرد غده، همراه با جذب بیشتر نیتروژن و زیست‌توده خشک و همچنین محتوای کلروفیل برگ بود (Gálvez *et al.*, 2016).

مطالعه شلپ و همکاران نشان داد که آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های پاسخ‌گو به N به حمل و نقل غشایی مرتبط می‌شوند. این ژن‌ها در انتقال سولفات، نیترا ت، اسیدهای آمینه و پپتیدها نقش دارند که با بیان افتراقی مشاهده شده در ژن‌های متابولیسم اسید آمینه و سولفات مطابقت دارد. همچنین کاهش میزان بیان یک انتقال دهنده کاتیونی و افزایش بیان یک تنظیم‌کننده حمل و نقل کاتیونی نشان می‌دهد که حرکت پروتون ممکن است در پاسخ به میزان N دخیل باشد. انتقال کاتیون می‌تواند بر فعالیت آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز موثر باشد که توسط pH و Ca^{2+} -calmodulin کنترل می‌شود (Shelp *et al.*, 1999). ژن کدکننده پروتئین T

سلولی ضروری است. در کل lncRNAs ممکن است ژن‌ها را از طریق تعاملات متقابل سیس و ترانس تنظیم کنند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مولکول‌های lncRNA شناسایی شده می‌توانند مستقیماً با رونوشت‌های mRNA مکمل خود با جفت شدن فیزیکی تعامل کنند و هم از طریق عناصر داربست و توالی راهنما که با پروتئین و DNA واکنش دهند و از این روش‌ها بیان ژن‌ها را تحت تیمار ازت تنظیم کنند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی GO ژن‌های هدف DE-lncRNA نشان داد که ژن‌ها هدف در حوزه‌های عملکردی مرتبط با پاسخ به تنش غنی شده‌اند. یافته‌های پژوهش حاضر دیدگاه فعلی را در مورد lncRNAs به عنوان تنظیم‌کننده‌های عمومی در سیب‌زمینی تحت تنش ازت تغییر می‌دهند.

نتیجه‌گیری کلی

تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq ترنسکریپتوم سیب‌زمینی تحت تیمار ازت، منجر به شناسایی ۱۰۳۶ lncRNA شد که تعداد ۲۱۱ عدد از آن‌ها بیان افتراقی

داشتند. بررسی هستی‌شناسی ژن‌های هدف این lncRNA‌ها نشان داد که ژن‌های مربوطه در یوبی کوئیتیناسیون پروتئین‌های درگیر در چرخه سلولی و فرآیند انتقال گروه‌های فسفات به اسیدهای آمینه‌هایی مانند سرین و ترئونین نقش دارند. علاوه بر این نقش احتمالی آن‌ها در مسیرهای متابولیکی، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، متابولیسم اسیدهای چرب، تخریب اسیدهای چرب نیز مشخص شد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بیان lncRNA‌ها در پاسخ به تیمار ازت در سیب‌زمینی القا می‌شود و از این مسیر با ایفای نقش تنظیمی خود سبب افزایش یا کاهش بیان ژن‌های هدفشان می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر می‌تواند گامی مهم در جهت درک بهتر نقش lncRNA‌ها و عملکرد آن‌ها در توسعه و اصلاح ارقام متحمل به کمبود ازت در سیب‌زمینی و شاید سایر گیاهان زراعی باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Birch, P. R., Bryan, G., Fenton, B., Gilroy, E. M., Hein, I., Jones, J. T., Prashar, A., Taylor, M. A., Torrance, L., & Toth, L. K. (2012). Crops that feed the world 8: potato: are the trends of increased global production sustainable? *Food Security*, 4, 477-508.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Chen, M., Wang, C., Bao, H., Chen, H., & Wang, Y. (2016). Genome-wide identification and characterization of novel lncRNAs in *Populus* under nitrogen deficiency. *Molecular Genetics and Genomics*, 291, 1663-1680.
- Curci, P. L., Aiese Cigliano, R., Zuluaga, D. L., Janni, M., Sanseverino, W., & Sonnante, G. (2017). Transcriptomic response of durum wheat to nitrogen starvation. *Scientific Reports*, 7(1), 1176.
- Fukuda, M., Nishida, S., Kakei, Y., Shimada, Y., & Fujiwara, T. (2019). Genome-wide analysis of long intergenic noncoding RNAs responding to low-nutrient conditions in *Arabidopsis thaliana*: possible involvement of trans-acting siRNA3 in response to low nitrogen. *Plant and Cell Physiology*, 60(9), 1961-1973.
- Gálvez, J. H., Tai, H. H., Lagüe, M., Zebarth, B. J., & Strömvik, M. V. (2016). The nitrogen responsive transcriptome in potato (*Solanum tuberosum* L.) reveals significant gene regulatory motifs. *Scientific Reports*, 6(1), 26090.
- Gong, L., Zhang, H., Gan, X., Zhang, L., Chen, Y., Nie, F., Shi, L., Li, M., Guo, Z., Zhang, G., & Song, Y. (2015). Transcriptome profiling of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant under drought stress and water-stimulus conditions. *PLoS One*, 10(5), e0128041.
- Hawkesford, M. J., & Griffiths, S. (2019). Exploiting genetic variation in nitrogen use efficiency for cereal crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 49, 35-42.
- Hirose, T., Mishima, Y., & Tomari, Y. (2014). Elements and machinery of non-coding RNA s: toward their taxonomy. *EMBO Reports*, 15(5), 489-507.
- Jha, U. C., Nayyar, H., Jha, R., Khurshid, M., Zhou, M., Mantri, N., & Siddique, K. H. (2020). Long non-coding RNAs: emerging players regulating plant abiotic stress response and adaptation. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-20.

- Jin, J., Lu, P., Xu, Y., Li, Z., Yu, S., Liu, J., Wang, H., Chua, N. H., & Cao, P. (2021). PLncDB V2. 0: a comprehensive encyclopedia of plant long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1489-D1495.
- Kang, Y. J., Yang, D.-C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y. Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W12-W16.
- Konishi, M., & Yanagisawa, S. (2013). Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nature Communications*, 4(1), 1617.
- Li, J., Ma, W., Zeng, P., Wang, J., Geng, B., Yang, J., & Cui, Q. (2015). LncTar: a tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. *Briefings in Bioinformatics*, 16(5), 806-812.
- Li, X. Q., Sveshnikov, D., Zebarth, B. J., Tai, H., De Koeyer, D., Millard, P., Haroon, M., & Singh, M. (2010). Detection of nitrogen sufficiency in potato plants using gene expression markers. *American Journal of Potato Research*, 87, 50-59.
- Long, C. M., Snapp, S. S., Douches, D. S., & Chase, R. W. (2004). Tuber yield, storability, and quality of Michigan cultivars in response to nitrogen management and seedpiece spacing. *American Journal of Potato Research*, 81, 347-357.
- Lowe, T. M., & Chan, P. P. (2016). tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W54-W57.
- Luo, S., Tai, H., Zebarth, B., Li, X. Q., Millard, P., De Koeyer, D., & Xiong, X. (2011). Sample collection protocol effects on quantification of gene expression in potato leaf tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 369-378.
- Lv, Y., Liang, Z., Ge, M., Qi, W., Zhang, T., Lin, F., Peng, Z., & Zhao, H. (2016). Genome-wide identification and functional prediction of nitrogen-responsive intergenic and intronic long non-coding RNAs in maize (*Zea mays* L.). *BMC Genomics*, 17(1), 1-15.
- Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 10(6), 924-933.
- Navarro, C., Abellenda, J. A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C. A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., & Prat, S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*, 478(7367), 119-122.
- Negri, T. d. C., Alves, W. A. L., Bugatti, P. H., Saito, P. T. M., Domingues, D. S., & Paschoal, A. R. (2019). Pattern recognition analysis on long noncoding RNAs: a tool for prediction in plants. *Briefings in Bioinformatics*, 20(2), 682-689.
- Paytuví Gallart, A., Hermoso Pulido, A., Anzar Martínez de Lagrán, I., Sanseverino, W., & Aiese Cigliano, R. (2016). GREENC: a Wiki-based database of plant lncRNAs. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1161-D1166.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290-295.
- Quek, X. C., Thomson, D. W., Maag, J. L., Bartonicek, N., Signal, B., Clark, M. B., Gloss, B. S., & Dinger, M. E. (2015). lncRNAdb v2. 0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D168-D173.
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841-842.
- Sanchita Trivedi, P.K., & Asif, M.H. (2020). Updates on plant long non-coding RNAs (lncRNAs): the regulatory components. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140, 259-269.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., & McLean, M. D. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science*, 4(11), 446-452.
- Shin, S. Y., Jeong, J. S., Lim, J. Y., Kim, T., Park, J. H., Kim, J. K., & Shin, C. (2018). Transcriptomic analyses of rice (*Oryza sativa*) genes and non-coding RNAs under nitrogen starvation using multiple omics technologies. *BMC Genomics*, 19, 1-20.
- Simons, M., Saha, R., Guillard, L., Clément, G., Armengaud, P., Cañas, R., Maranas, C. D., Lea, P. J., & Hirel, B. (2014). Nitrogen-use efficiency in maize (*Zea mays* L.): from 'omics' studies to metabolic modelling. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5657-5671.
- Simopoulos, C. M., Weretilnyk, E. A., & Golding, G. B. (2018). Prediction of plant lncRNA by ensemble machine learning classifiers. *BMC Genomics*, 19, 1-11.
- Szczęśniak, M.W., Bryzghalov, O., Ciombarowska-Basheer, J., & Makalowska, I. (2019). CANTATAdb 2.0: expanding the collection of plant long noncoding RNAs. *Plant Long Non-Coding RNAs: Methods and Protocols*, 415-429.
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. V. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646.

- Waseem, M., Liu, Y., & Xia, R. (2020). Long non-coding RNAs, the dark matter: an emerging regulatory component in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 86.
- Westermann, D.T. (2005). Nutritional requirements of potatoes. *American journal of Potato Research*, 82, 301-307.
- Wu, H., Yang, L., & Chen, L. L. (2017). The diversity of long noncoding RNAs and their generation. *Trends in Genetics*, 33(8), 540-552.
- Wucher, V., Legeai, F., Hédan, B., Rizk, G., Lagoutte, L., Leeb, T., Jagannathan, V., Cadieu, E., David, A., Lohi, H., Cirera, S., Fredholm, M., Botherel, N., Peegwater, P. A. J., Béguet, C. L., Fieten, H., Johnson, J., Alföldi, J., André, C., Lindblad-Toh, K., Hitte, C., & Derrien, T. (2017). FEELnc: a tool for long non-coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Research*, 45(8), e57-e57.
- Zebarth, B., Rees, H., Tremblay, N., Fournier, P., & Leblon, B. (2002). *Mapping spatial variation in potato nitrogen status using the N Sensor*. Paper presented at the XXVI International Horticultural Congress: Toward Ecologically Sound Fertilization Strategies for Field Vegetable Production. *ISHS Acta Horticulturae*, 627.
- Zebarth, B., & Rosen, C. (2007). Research perspective on nitrogen BMP development for potato. *American Journal of Potato Research*, 84, 3-18.
- Zebarth, B., Tai, G., Tam, R. D., De Jong, H., & Milburn, P. (2004). Nitrogen use efficiency characteristics of commercial potato cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(2), 589-598.
- Zebarth, B. J., Tai, H., Luo, S., Millard, P., De Koeijer, D., Li, X.-Q., & Xiong, X. (2011). Differential gene expression as an indicator of nitrogen sufficiency in field-grown potato plants. *Plant and Soil*, 345, 387-400.

The effect of 24-epibrassinolide on chlorophyll parameters, physiological and biochemical traits of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under salt stress

Zeinab Chaghakaboodi¹ , Seyed Hassan Mousavi², Mohammadreza Imani², Faranak Ranjbar³

1. Assistant Professor, Department of Plant Production Engineering and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

2. Associate Professor, Greenhouse and Controlled Environments Research Institute, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran.

Correspondence:

Zeinab Chaghakaboodi

Email: z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

Received: 1, Apr. 2025

Accepted: 9, Jun. 2025

How to cite:

Chaghakaboodi, Z., Mousavi, S. H., Imani, M., & Ranjbar, F. (2025). The effect of 24-epibrassinolide on chlorophyll parameters, physiological and biochemical traits of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under salt stress. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 57 -68. (DOI: [10.30473/cb.2025.74198.2006](https://doi.org/10.30473/cb.2025.74198.2006))

ABSTRACT

Salinity stress negatively affects plant growth and productivity by causing ion toxicity, osmotic stress, and hormonal imbalances. With the expansion of greenhouse-based vegetable production, identifying genotypes tolerant to abiotic stresses such as salinity is essential for sustainable agriculture. This study assessed the salinity tolerance of three promising lettuce lines (20, 7, and 4), the local cultivar ‘Setareh,’ and two foreign cultivars, ‘Lolarosa’ and ‘Mignonette,’ under controlled greenhouse conditions. A factorial experiment was conducted in a completely randomized design with four replications at Razi University, Kermanshah, during the 2023–2024 growing season. Plants were exposed to increasing salinity levels (0, 10/5, 20/10, and 30/15 mM NaCl/CaCl₂) starting from the 3rd–4th leaf stage. Physiological and biochemical traits evaluated included chlorophyll fluorescence (Fv/Fm, Y(PSII)), leaf greenness, total soluble sugars, phenols, and flavonoids. Results showed a significant reduction in photosynthetic efficiency (Fv/Fm and Y(PSII)) with increasing salinity, reflecting a decline in growth. However, salinity stress also triggered a notable increase in osmoprotectants (soluble sugars) and secondary metabolites (phenols and flavonoids), indicating an antioxidant defense response. These findings reveal genotype-specific differences in salinity tolerance and offer useful insights for selecting lettuce cultivars better suited to saline environments.

KEYWORDS

SPAD, Total soluble sugar content, Flavonoid content, (*Lactuca sativa* L.).



«مقاله پژوهشی»

اثر ۲۴-اپی براسینولید بر پارامترهای کلروفیل سبزینه، صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) تحت تنش شوری

زینب چقاابودی^۱، سیدحسن موسوی^۲، محمدرضا ایمانی^۲، فرانک رنجبر^۳

چکیده

تنش شوری بر رشد و بهره‌وری گیاهان تأثیر می‌گذارد و باعث سمیت یونی، اختلال در جذب آب و تغییرات در تعادل هورمونی می‌شود. با توجه به انتقال تولید سبزیجات و میوه‌ها به گلخانه‌ها، انتخاب و ارزیابی ژنوتیپ‌های کاهو با صفاتی مانند تحمل به گرما، شوری و خشکی برای دستیابی به اهداف تولید ضروری است. لذا در این پروژه جهت شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری از ژنوتیپ‌های شماره ۲۰ و ۷ و ۴، همراه با رقم داخلی ستاره و ارقام خارجی لولاروزا و میگنونت آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه در سال زراعی ۱۴۰۳-۱۴۰۲ انجام شد. در این بررسی، گلدان‌ها با سطوح شوری مورد نظر (شاهد (آب شیر)، غلظت (۱۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم به ۵ میلی مولار کلرید کلسیم، ۲۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم به ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم و ۳۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم به ۱۵ میلی مولار نمک کلرید کلسیم) آبیاری شدند. اعمال تیمارهای شوری، بعد از مرحله سه تا چهار برگی به‌طور همزمان انجام شد. صفات مختلف شامل کلروفیل فلوروسانس، محتوای سبزیگی برگ، محتوای قند محلول کل، محتوای فنل کل و محتوای فلاونوئید کل اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که با افزایش سطوح شوری پارامترهای فلوروسانس کلروفیل مانند Fv/Fm (حداکثر کارایی فتوسیستم دو) و PI (شاخص فتوستتزی) کاهش یافت که نشان‌دهنده کاهش کارایی فتوستتزی ژنوتیپ‌های گیاه کاهو است. که این امر می‌تواند منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاه شود. همچنین، افزایش سطوح تنش شوری باعث افزایش سطوح ترکیبات فیتوشیمیایی مانند محتوای قند محلول کل، فنل کل و محتوای فلاونوئید شد.

واژه‌های کلیدی

محتوای سبزیگی برگ، محتوای قند کل، محتوای فلاونوئید کل، کاهو.

۱. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۲. دانشیار، پژوهشکده گلخانه و محیط‌های کنترل‌شده، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

نویسنده مسئول:

زینب چقاابودی

رایانامه: z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۹

استناد به این مقاله:

چقاابودی، زینب؛ موسوی، سید حسن؛ ایمانی، محمدرضا و رنجبر، فرانک (۱۴۰۴). اثر ۲۴-اپی براسینولید بر پارامترهای کلروفیل سبزینه، صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) تحت تنش شوری، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۶۸-۵۷.
(DOI: [10.30473/cb.2025.74198.2006](https://doi.org/10.30473/cb.2025.74198.2006))

مقدمه

کاهو با نام علمی *Lactuca sativa* L. یک گیاه برگ‌ری یک‌ساله، خود گشن، دیپلوئید ($2n=2x=18$)، محصول فصل خنک، از تیره کلاپرک‌ها یا Asteraceae، از زیر تیره شیکوریده *Chicorideae* و از دولپه‌ای‌ها بوده که عمدتاً در مناطق معتدله به‌خاطر برگ‌های خوراکی مورد کشت و کار قرار می‌گیرد (Funk et al., 2005; Lebeda, 2007). این گیاه با داشتن حدود ۱/۳ میلیون هکتار سطح زیر کشت در جهان یکی از سبزی‌های مهم به‌شمار می‌رود (FAO, 2024). مرکز اصلی و مبدأ اولیه کاهو در نواحی مدیترانه و جنوب غرب آسیا است (Lindquist, 1960, DeVeris, 1997). منشأ آن از کاهوی وحشی *L. serriola* است (DeVries, 1997). Lebeda, 2004) این جنس دارای بیش از ۱۰۰ گونه و از نظر مورفولوژی دارای شش تیپ است. تیپ‌های مختلف کاهو (Iceberg, Crisphead, Romaine, Butterhead, Leaf cutting, Asparagus, Stem, Oilseed) می‌باشند (Boukema et al., 2007) مطابق آمارهای منتشره از سوی FAO در سال ۲۰۲۴ سطح زیر کشت کاهو بالغ بر یک میلیون و دویست‌هزار هکتار و حجم تولید این محصول بیش از ۲۸ میلیون تن اعلام شده‌است. تولید تیپ‌های مختلف کاهو طی دو دهه اخیر در دنیا از رشد ۱۱۸ درصدی برخوردار بوده است. به‌نحوی که این محصول از نظر افزایش سطح زیر کشت پس از ذرت، برنج، سیب زمینی و گوجه فرنگی در رتبه پنجم جهانی قرار گرفته است. در کشور ما نیز بر اساس آمار منتشره از سوی وزارت جهاد کشاورزی روند افزایش سطح

زیر کشت این محصول طی سه سال اخیر بسیار چشمگیر بوده است، به‌گونه‌ای که سطح زیر کشت شش هزار هکتاری سال ۱۳۸۸ به ۱۵ هزار هکتار در سال ۱۴۰۱ افزایش یافته‌است (جدول ۱ و ۲). از نظر دامنه تحمل به شوری این گیاه جزء گیاهان حساس و نیمه حساس به شوری گزارش شده است، و آب با هدایت الکتریکی دو دسی زیمنس بر متر را تحمل می‌کند. اگر چه گونه وحشی آن هدایت الکتریکی تا هشت دسی زیمنس بر متر را تحمل می‌کند. گیاهان در طول رشد با تنش‌های زیستی و غیر زیستی متعددی مواجه می‌شوند که تنش شوری یکی از مهم‌ترین آن‌هاست (Kumar and Saddhe, 2018) و موجب کاهش عملکرد، اختلال در جذب آب، ایجاد سمیت یونی، بر هم زدن تعادل هورمونی و القای تنش اکسیداتیو می‌شود (Ahanger et al., 2013; Ashraf and Foolad, 2017). با افزایش اراضی شور و نیاز فزاینده به تولید غذا، توسعه گیاهان متحمل به شوری ضروری است. اگرچه استفاده از بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات رویکرد مؤثری است، اما پرهزینه و زمان‌بر بوده و برای همه گیاهان قابل اجرا نیست (Kataria and Verma, 2018). یکی از استراتژی‌های مقرون‌به‌صرفه، استفاده از تیمارهای پیش از کشت (شیمیایی، بیولوژیکی یا فیزیکی) است که می‌توانند پاسخ گیاه را به تنش‌های غیر زیستی بهبود بخشند. از جمله این تیمارها، استفاده از براسینواستروئیدها است که با تنظیم رشد، تقسیم سلولی و تعامل با هورمون‌های دیگر، نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به تنش شوری دارند (Hassanuzzaman et al., 2013).

جدول ۱. سطح کاشت و تولید کاهو در ایران (فائو، ۲۰۲۴)

سال	۱۳۹۶	۱۳۹۷	۱۳۹۸	۱۳۹۹	۱۴۰۰	۱۴۰۱
سطح (هزار هکتار)	14961	14877	14142	14663	14569	14457
تولید (هزار تن)	445	446	424	438	436	433
عملکرد (کیلوگرم در هکتار)	29741	29935	29993	29888	29940	29950

جدول ۲. سطح کاشت و تولید کاهو در جهان (فائو، ۲۰۲۴)

سال	2018	2019	2020	2021	2022	2023
سطح (میلیون هکتار)	1.23	1.24	1.23	1.26	1.27	1.26
تولید (میلیون تن)	27.3	27.2	27.2	28.4	28.2	28.1
عملکرد (کیلوگرم در هکتار)	21927	22064	22342	22414	22204	22265

براسینواستروئیدها تنها گروه شناخته شده از هورمون های استروئیدی در گیاهان هستند که در غلظت های بسیار پایین نیز فعال اند (Krishna, 2003; Kagal et al., 2008; Jager et al., 2007) و به طور گسترده در گونه های گیاهی حضور دارند. این هورمون ها با افزایش تحمل به تنش های غیر زیستی و بهبود رشد گیاه، نقش کلیدی در مسیرهای پیام رسانی هورمونی ایفا می کنند. آن ها با هورمون هایی نظیر آبسازیک اسید، اکسین، سیتوکینین، اتیلن، جیبرلین، جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید تعامل دارند. به ویژه، براسینواستروئیدها و آبسازیک اسید از طریق نیتریک اکسید به بسته شدن روزنه ها و افزایش مقاومت به خشکی کمک می کنند. در حالی که براسینواستروئیدها موجب تحریک بیوسنتز آبسازیک اسید می شوند، این دو هورمون در تنظیم برخی ژن ها هم افزایی دارند و در عین حال، آبسازیک اسید می تواند به صورت منفی مسیر پیام رسانی براسینواستروئید را تعدیل کند (Planas et al., 2019).

در آزمایشی که به منظور بررسی اثر تنش شوری در گیاه کاهو انجام شد، از سطوح مختلف نمک کلرید سدیم (صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی مول در لیتر) استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که تنش شوری باعث کاهش عملکرد و کاهش محتوای آب نسبی برگ شد. شوری باعث تغییرات کلروفیل فلوروسنت در فتوسیستم دو شد (برس و همکاران، ۲۰۲۲). همچنین در مطالعه ای که به منظور بررسی اثر براسینواستروئید در کاهش تنش شوری در کاهو انجام شد، از سطوح مختلف هورمون براسینواستروئید (صفر، ۱، ۲ و ۳ میکرومولار) و سطوح مختلف شوری (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم) استفاده شد. نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش محتوای مواد معدنی کاهو شد. استفاده از هورمون باعث افزایش وزن تازه ساقه، وزن خشک ساقه، وزن تازه ریشه و وزن خشک ریشه و همچنین قطر ساقه شد. تنش شوری باعث افزایش نشت الکترولیت برگ ها بود در حالی که استفاده از هورمون باعث کاهش نشت الکترولیت در برگ ها شد. بهترین نتیجه در سطح هورمونی سه میکرومولار به دست آمد (اکینچی و همکاران، ۲۰۱۲). در تحقیقی که توسط

سردار و همکاران (۲۰۲۳) به منظور کاهش اثرات تنش شوری در کاهو با استفاده از اکسید نیتريت انجام شد نتایج نشان داد که استفاده از اسپری پاشی این ماده بر روی کاهو باعث افزایش اسید اسکوربیک، محتوای فنل و آنزیم های آنتی اکسیدانتي شده است. نتایج نشان می دهد که کاربرد اکسید نیتريت روی کاهو به کاهش اثرات تنش نمک کمک می کند. در پژوهشی که توسط احمد و همکاران (۲۰۱۹) به منظور بررسی اثر تنش شوری بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کاهو در بنگلادش انجام شد نتایج نشان داد که صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی با افزایش سطح تنش شوری کاهش یافتند. صفات بیوشیمیایی مانند پرولین و پروتئين افزایش و محتوای فنول کل کاهش یافتند. در تحقیقی که توسط باباوسمیل و همکاران، ۲۰۲۲ برای کاهش اثرات تنش شوری در گیاه کاهو با استفاده از اسید سالیسیلیک، عصاره مخمر و ژئولیت انجام شد نتایج نشان داد که تنش شوری رشد و کلروفیل کل گیاهان کاهو را به طور قابل توجهی کاهش داد و محتوای پرولین و قند آنها را افزایش داد. کاربرد ژئولیت باعث بهبود رشد کاهو در غلظت های صفر و ۵۰ میلی مولار نمک شد، اما در بالاترین سطح شوری تنها تعداد برگ ها ۱۵ درصد بهبود یافت. در تنش شوری ملایم، استفاده از اسید سالیسیلیک به طور قابل توجهی طول ریشه، ارتفاع گیاه، محتوای کلروفیل و پرولین را افزایش داده است. در مطالعه ای که به منظور بررسی تحمل به شوری ده ژنوتیپ کاهو انجام شد از نمک کلرید سدیم و نمک کلرید کلسیم برای ایجاد تنش شوری استفاده شد. برای تیمار شاهد غلظت صفر از هر دو نمک در نظر گرفته شد و در طول آزمایش به تدریج غلظت نمک ها افزایش یافت. تیمارهای مورد استفاده شامل غلظت ده میلی مولار نمک کلرید سدیم و پنج میلی مولار نمک کلرید کلسیم بود. بعد از انتقال نشاء به گلدان ها، در هفته دوم غلظت ۲۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم و ۱۰ میلی مولار نمک کلرید کلسیم و در آغاز هفته سوم و چهارم غلظت ۳۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم و ۱۵ میلی مولار نمک کلرید کلسیم بود. در بین ژنوتیپ های مورد مطالعه سطح برگ و وزن تر نسبت به شاهد کاهش

کاهو به تنش شوری انجام شده و می‌تواند مبنایی برای تحقیقات آینده باشد. در این پژوهش، به‌منظور القای تنش شوری، از محلول‌های شور استفاده شد و آزمایش به‌صورت گلدانی در شرایط کنترل‌شده گلخانه‌ای اجرا گردید تا تأثیر مستقیم تنش شوری بر شاخص‌های مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه به‌دقت ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی این تحقیق از پژوهشکده گلخانه و محیط‌های کنترل‌شده، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج تهیه شد که شامل، ژنوتیپ‌های شماره ۲۰ و ۷ و ۴، همراه با رقم داخلی ستاره و ارقام خارجی لولاروزا و میگنونت که در بررسی‌های قبلی برای کشت در گلخانه مناسب تشخیص داده شدند، برای ارزیابی تحمل به شوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. در جدول شماره سه نام و تیپ ژنوتیپ‌های مورد بررسی آورده شده‌است.

جدول ۳. نام، تیپ و منشأ ژنوتیپ‌های مورد بررسی

نام	داخلی / خارجی	تیپ	منشأ
رقم ستاره	داخلی	رومن	ایران
لاین امید بخش شماره هفت	داخلی	رومن	ایران
رقم میگنونت	خارجی	آیسبرگ	فرانسه
لاین امید بخش شماره بیست	داخلی	رومن	ایران
لاین امید بخش شماره چهار	داخلی	رومن	ایران
رقم لولاروزا	خارجی	برگی	ایتالیا

نمک

نمک‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل نمک کلرید سدیم (NaCl) از شرکت مرک آلمان با وزن مولکولی $58/44 \text{ g/mol}$ و نمک کلرید کلسیم (CaCl_2) از شرکت مرک آلمان با وزن مولکولی $110/99 \text{ g/mol}$ بودند.

هورمون

هورمون مورد استفاده ۲۴-اپی براسینولید با وزن مولکولی $480/68 \text{ g/mol}$ تهیه شده از شرکت سیگما آمریکا بود.

یافت. تنش شوری شاخص کلروفیل را در بین ژنوتیپ‌ها افزایش داد (Adhikari et al., 2019). در آزمایشی به منظور بررسی تحمل به شوری شش رقم انتخابی کاهو پس از انتقال نشاء به گلدان‌ها در مرحله پنج تا هشت برگی، به فاصله هر سه روز یکبار به‌مدت شش هفته تیمارهای شوری شامل آبیاری با غلظت‌های مختلف محلول کلرید سدیم (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار) انجام شد. نتایج نشان داد با افزایش سطح تنش ارتفاع بوته کاهش یافت. وزن تر نیز کاهش یافت. اما محتوای کلروفیل افزایش یافت (Pavli et al., 2021).

Fv/Fm به‌عنوان یک شاخص کلیدی برای ارزیابی سلامت فتوسیستم II و توانایی فتوسنتزی گیاه در شرایط مختلف استفاده می‌شود. این نسبت نشان‌دهنده حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II در شرایط تاریکی است و در گیاهان سالم معمولاً حدود $0/83$ است. وقتی گیاه تحت تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی، دمای بالا یا کمبود مواد مغذی قرار می‌گیرد، Fv/Fm کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده آسیب فتوسیستم II و کاهش کارایی فتوسنتزی است. این کاهش معمولاً به‌دلیل افزایش استرس اکسیداتیو، اختلال در زنجیره انتقال الکترون و کاهش ظرفیت ترمیم پروتئین D1 در مرکز واکنش PSII اتفاق می‌افتد (Krause and Weis, 1991). مطالعات همچنین نشان دهنده پتانسیل استفاده از اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل به‌عنوان یک ابزار غیر مخرب برای غربالگری و توسعه ارقام با تحمل بیشتر به شوری و عملکرد فتوسنتزی بهبود یافته تأکید دارد (Tsai et al., 2019). با توجه به اهمیت اقتصادی کاهو و افزایش توجه جوامع به تغذیه سالم، تولید ارقام متنوع این گیاه در سال‌های اخیر رشد چشم‌گیری داشته است. کاهو به‌دلیل دارا بودن تیپ‌های مختلف گیاه‌شناسی، با استقبال گسترده‌ای مواجه شده‌است. شناسایی ژنوتیپ‌های مناسب و سازگار با انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی، از اولویت‌های مهم در برنامه‌های به‌نژادی این محصول محسوب می‌شود. تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این تحقیق تحت شرایط تنش شوری انجام نشده است. بنابراین، این پژوهش به‌عنوان اولین مطالعه مقدماتی در زمینه واکنش ژنوتیپ‌های منتخب

روش انجام آزمایش

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه در سال زراعی ۱۴۰۳-۱۴۰۲ انجام شد. فاکتور اول شامل ژنوتیپ‌های انتخاب شده کاهو، فاکتور دوم شامل سطوح مختلف هورمون ۲۴-اپی براسینولید (صفر، ۴ و ۸ میکرومولار) و فاکتور سوم شامل سطوح مختلف شوری (شاهد، غلظت ۵ mM NaCl/10 mM CaCl₂، غلظت ۱۰ mM NaCl/10 mM CaCl₂ و غلظت ۱۵ mM NaCl/30 mM CaCl₂) بود. ابتدا نشاهای ژنوتیپ‌های مورد بررسی تحت شرایط گلخانه‌ای تهیه و سپس برای کشت به گلدان در گلخانه منتقل شدند. بستر کشت گلدانی از خاک سبک پرلیت، کوکو پیت و پیت ماس به نسبت مساوی بود. از گلدان‌های با قطر ۲۰ و طول ۲۵ سانتی‌متر استفاده شد. نحوه‌ی اعمال تیمار هورمونی ۲۴-اپی براسینولید بدین صورت بود که هورمون در سطوح مورد نظر (صفر، ۴ و ۸ میکرومولار) آماده گردید و زمانی که گیاهچه‌های کاهو در مرحله ۳ تا ۴ برگی بودند به صورت اسپری در صبح و عصر روی برگ‌ها اسپری گردید (دو نوبت در روز یعنی صبح و عصر) به مدت دو روز تیمار هورمونی اعمال گردید. برابر بررسی‌ها، کاهو گیاهی حساس تا نیمه حساس به شوری بوده و آستانه تحمل به شوری آن ۹/۰ دسی زیمنس بر متر می‌باشد. البته حساسیت به شوری این گیاه در ارقام مختلف متفاوت است، لذا در این بررسی، گلدان‌ها با سطوح شوری مورد نظر برای تیمار شاهد غلظت صفر از هر دو نمک در نظر گرفته شد و در طول آزمایش به تدریج غلظت نمک‌ها افزایش یافت. تیمارهای مورد استفاده شامل غلظت ۱۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم و ۵ میلی مولار نمک کلرید کلسیم بود. بعد از انتقال نشاء به گلدان‌ها، در هفته دوم غلظت ۲۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم و ۱۰ میلی مولار نمک کلرید کلسیم و در آغاز هفته سوم و چهارم غلظت ۳۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم و ۱۵ میلی مولار نمک کلرید کلسیم بود، آبیاری شدند (مطابق روش Adhikari et al., 2019). اعمال تیمارهای شوری، بعد از مرحله ۳ تا ۴ برگی به طور همزمان انجام گردید. در

طول این مدت ارزیابی‌های لازم شامل اندازه گیری صفات فیزیولوژیك شامل محتوای سبزینه برگ (SPAD: Minolta)، محتوای كلروفیل فلوروسنت توسط دستگاه PEA Plus: Hansatech انجام شد. در پایان آزمایش اندازه گیری صفات بیوشیمیایی (محتوای قند محلول كل (طبق روش Shlegl, 1986)، محتوای فنول كل (طبق روش Pandjaitan et al., 2005) و محتوای فلاونوئید كل (طبق روش Chang et al., 2002) انجام گرفت. جهت تغذیه از محلول غذایی استاندارد حاوی نسبت معینی از عناصر ماکرو و میکرو استفاده گردید. جهت مدیریت بهتر تنش از گلدان‌های یکسان استفاده گردید. برای تعیین زمان آبیاری از روش وزنی استفاده شد به این صورت که با وزن کردن روزانه گلدان‌های شاهد (بدون تنش) مقدار رطوبت خاک گلدان به دست آمد، هنگامی که رطوبت حجمی خاک به حد تخلیه مجاز رسید اقدام به آبیاری بعدی گردید و رطوبت گلدان دوباره به حد ظرفیت زراعی ارتقا داده شد (مطابق روش ذرتی پور و همکاران، ۱۳۹۸).

آنالیز آماری

تجزیه واریانس صفات با استفاده از روش آماری DOI و نرم افزار R و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از اکسل و تجزیه و تحلیل خوشه سلسله مراتبی همراه با تجسم نقشه حرارتی با استفاده از ابزار وب ClustVis استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های کاهو (جدول ۴) نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها، سطوح مختلف هورمون ۲۴-اپی براسینولید، سطوح مختلف شوری، اثر متقابل دوگانه ژنوتیپ و سطوح مختلف هورمون، ژنوتیپ و سطوح مختلف شوری و سطوح مختلف هورمون و سطوح مختلف شوری و همچنین اثر متقابل سه گانه ژنوتیپ و هورمون و شوری برای همه صفات به غیر از شاخص فتوسنتز در سطح احتمال یک درصد بسیار

ناشی از شوری نقش دارند (Boughalleb et al., 2020). این تغییرات نشان دهنده تأثیر منفی شوری بر کارایی فتوسنتزی و کیفیت فیتوشیمیایی کاهو است. بنابراین، استفاده از ارقام متحمل به شوری می‌تواند به بهبود عملکرد و کیفیت کاهو در شرایط شور کمک کند.

نتایج ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه در بین ژنوتیپ‌های پیشرفته کاهو (شکل ۱) نشان داد که بین صفات حداکثر کارایی عملکرد کوانتومی فتوسیستم II و شاخص فتوسنتز، همبستگی مثبت و بسیار معناداری مشاهده گردید. این نتیجه می‌تواند نشان دهنده تأثیر مستقیم و مثبت عملکرد فتوسیستم II بر شاخص فتوسنتز باشد، به طوری که افزایش کارایی فتوسیستم II باعث بهبود عملکرد فتوسنتز در ژنوتیپ‌های مختلف کاهو می‌شود. این امر به‌ویژه در فرآیندهای تولید انرژی فتوسنتزی و رشد گیاه اهمیت دارد. علاوه بر این، بین صفت محتوای سبزینگی برگ و شاخص فتوسنتز نیز همبستگی مثبت و بسیار معناداری مشاهده گردید. این یافته به این معنی است که ژنوتیپ‌هایی که دارای محتوای سبزینگی بالاتر هستند، معمولاً عملکرد فتوسنتز بهتری نیز دارند (Takai et al., 2010; Uddling et al., 2007; Sim et al., 2015).

معنی‌دار شدند. اثر متقابل سه گانه برای شاخص فتوسنتز در سطح احتمال پنج درصد معنادار شد. تنش شوری تأثیرات قابل توجهی بر پارامترهای فلوروسانس کلروفیل، صفات فیتوشیمیایی و فیزیولوژیک ژنوتیپ‌های کاهو داشت. نتایج نشان داد که با افزایش سطوح شوری پارامترهای فلوروسانس کلروفیل مانند Fv/Fm (حداکثر کارایی فتوسیستم دو) و PI (شاخص فتوسنتز) کاهش یافت که نشان دهنده کاهش کارایی فتوسنتزی ژنوتیپ‌های گیاه کاهو است. که این امر می‌تواند منجر به کاهش رشد و عملکرد گیاه شود (Kalaji et al., 2011; Ghassemi-Golezani et al., 2020). همچنین، افزایش سطوح تنش شوری باعث افزایش سطوح ترکیبات فیتوشیمیایی مانند محتوای قند محلول کل، فنل کل و محتوای فلاونوئید شد. این افزایش در ترکیبات فیتوشیمیایی نشان دهنده واکنش دفاعی گیاه به تنش شوری است. این ترکیبات نقش‌های مهمی در مکانیزم‌های سازگاری گیاه دارند. قندهای محلول ممکن است به عنوان اسمولیت‌های سازگار عمل کنند و به حفظ تعادل آبی گیاه کمک کنند. ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی در کاهش استرس اکسیداتیو

جدول ۴. آنالیز واریانس صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های کاهو تحت تنش شوری
Table 4. Analysis of variance for the traits studied in lettuce genotypes under salt stress

میانگین مربعات Mean of Square							منابع تغییرات S.O.V
فلاونوئید کل Total Flavonoid	فنل کل Total Phenol	محتوای قند کل Total Soluble Sugar	شاخص فتوسنتز PI	حداکثر کارایی عملکرد کوانتومی فتوسیستم II FV/FM	محتوای سبزینگی برگ SPAD	درجه آزادی df	
38.446**	0.381**	4386.540**	90.171**	0.16**	816.999**	5	ژنوتیپ Genotype
0.927**	0.057**	3501.677**	889.964**	0.733**	951.315**	3	هورمون Hormone
0.207**	0.007**	450.865**	3178.569**	0.863**	1503.115**	3	سطوح مختلف شوری Salt stress
0.187**	0.018**	552.800**	22.054**	0.006**	33.708**	10	ژنوتیپ × هورمون Genotype × Hormone
0.064**	0.005**	226.509**	49.394**	0.006**	36.378**	15	ژنوتیپ × سطوح شوری Genotype × Salt
0.187**	0.012**	558.907**	515.760**	0.153**	92.110**	6	هورمون × سطوح شوری Hormone × Salt
0.043**	0.002**	71.481**	14.973*	0.004**	14.956**	30	ژنوتیپ × هورمون × شوری Genotype × Hormone × Salt
0.009	0.001	4.974	9.453	0.001	5.168	216	اشتباه Error
						288	کل Total

*, ** Significant at the 5% and 1% levels, respectively.

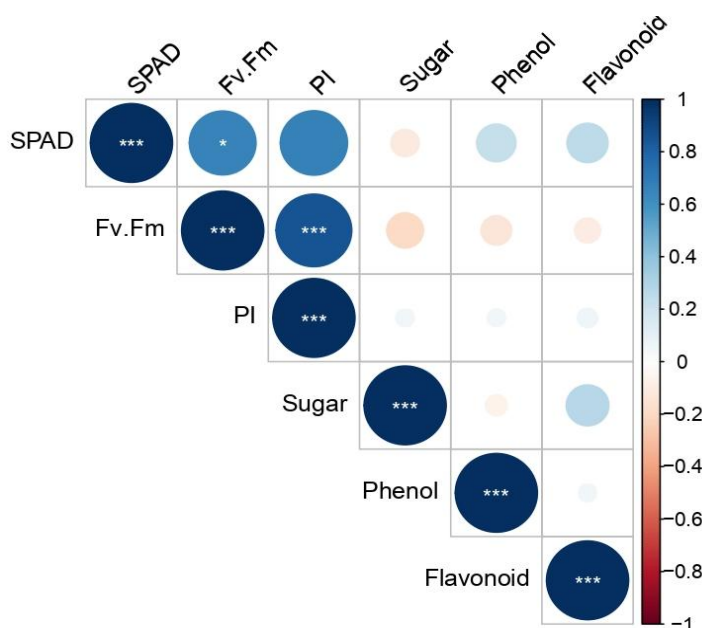
*, ** به ترتیب معنی‌دار در سطح پنج درصد و یک درصد.

مورد بررسی قرار گیرد. در مجموع این نتایج می‌توانند به ما کمک کنند تا درک بهتری از روابط پیچیده بین صفات فتوسنتزی، محتوای ترکیبات فنولیک و سایر ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاهان کاهو پیدا کنیم. همچنین، این همبستگی‌ها می‌توانند در برنامه‌های اصلاح نباتات و بهبود ژنوتیپ‌های کاهو برای بهینه‌سازی عملکرد فتوسنتزی و کیفیت محصول مفید واقع شوند.

نتایج آنالیز خوشه‌ای همراه با نقشه حرارتی ژنوتیپ‌های کاهو بر اساس صفات اندازه‌گیری شده (شکل ۲) انجام شد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات اندازه‌گیری شده در دو گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل صفات محتوای سبزیگی برگ، شاخص فتوسنتز و حداکثر کارایی عملکرد کوانتومی فتوسیستم II بودند و گروه دوم نیز شامل صفات محتوای قند محلول کل، محتوای فنل کل و محتوای فلاونوئید کل بودند.

در مطالعات مربوط به ژنوتیپ‌های کاهو، چنین تحلیل‌هایی با موفقیت ژنوتیپ‌ها را بر اساس صفاتی مانند محتوای سبزیگی برگ، شاخص فتوسنتز، حداکثر کارایی عملکرد کوانتومی فتوسیستم II، محتوای قند محلول کل، محتوای فنل کل و محتوای فلاونوئید کل دسته‌بندی کرده‌اند.

به عبارت دیگر، برگ‌هایی با مقدار بالاتر از كلروفیل قادر به جذب بیشتر نور و تولید انرژی فتوسنتزی هستند که می‌تواند در فرآیندهای رشد و تولید محصول گیاه مؤثر باشد. نتایج ضرایب همبستگی همچنین نشان‌دهنده همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری بین صفت محتوای سبزیگی برگ و صفات محتوای فنل کل و فلاونوئید کل بود. این همبستگی مثبت می‌تواند نشان‌دهنده ارتباط بین فرآیندهای فتوسنتزی و ترکیبات فنولیک گیاه باشد. ترکیبات فنولیک مانند فلاونوئیدها نقش‌های مهمی در حفاظت گیاه از استرس‌های زیستی و غیر زیستی مانند شوری ایفا می‌کنند و ممکن است با افزایش سبزیگی برگ به‌ویژه در شرایط استرس‌زای شوری مرتبط باشند (Marhaenanto *et al.*, 2025; Netto *et al.*, 2005). در نهایت، بین صفات محتوای قند محلول کل و محتوای کل فلاونوئید نیز همبستگی منفی و بسیار معناداری مشاهده گردید. این همبستگی منفی ممکن است نشان‌دهنده این باشد که افزایش محتوای قند محلول در گیاه ممکن است با کاهش مقدار فلاونوئیدها مرتبط باشد (Guo *et al.*, 2020). این موضوع می‌تواند به‌ویژه در شرایطی که گیاه با محدودیت منابع غذایی روبه‌رو است، به‌عنوان یک مکانیسم سازگاری گیاه برای استفاده بهینه از منابع داخلی،



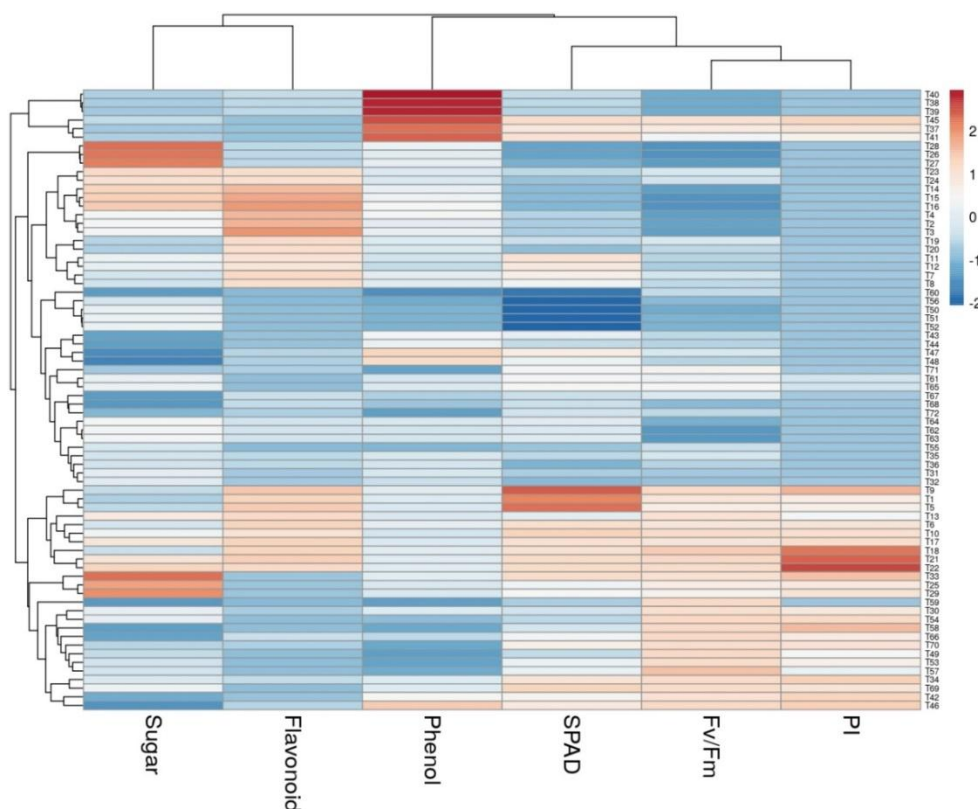
شکل ۱. همبستگی صفات فلوروسانس كلروفیل، بیوشیمیایی و فیزیولوژی در ژنوتیپ‌های کاهو تحت تنش شوری

Figure 1. Correlation of chlorophyll fluorescence, biochemical, and physiological traits in lettuce genotypes under salt stress

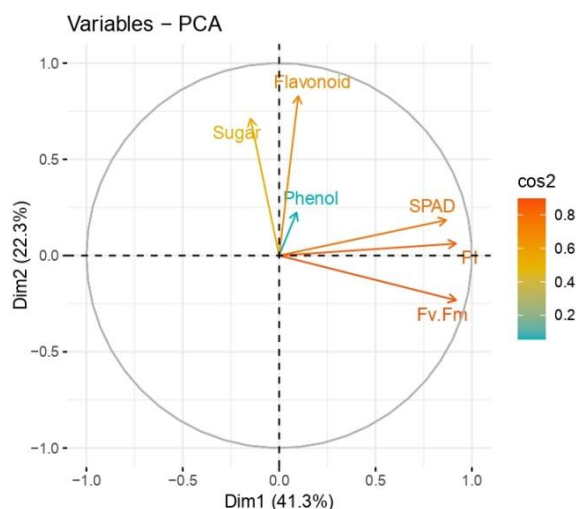
تیین می‌کنند؛ به‌طوری‌که مجموع این دو مؤلفه، ۶۳/۶ درصد از کل تنوع موجود را پوشش می‌دهد. در میان صفات بررسی‌شده، محتوای سبزی‌گی برگ، شاخص فتوسنتز و حداکثر کارایی عملکرد کوانتومی فتوسیستم II، بیشترین سهم را در تبیین این تنوع داشته‌اند (Mihaljević et al., 2020). این صفات به‌طور مستقیم با کارایی فتوسنتزی و پاسخ گیاه به شرایط تنش شوری در ارتباط‌اند. در مرتبه بعد، صفات بیوشیمیایی شامل محتوای فلاونوئید کل، قند محلول کل و فنل کل قرار گرفتند که نقش مهمی در سازوکارهای دفاعی گیاه در مواجهه با تنش شوری ایفا می‌کنند. به‌طور کلی، این نتایج نشان می‌دهد که ترکیبی از صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی می‌توانند به‌عنوان شاخص‌های مؤثر برای شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به شوری در کاهو مورد استفاده قرار گیرد و اطلاعات ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاحی فراهم سازند.

برای مثال، تحقیقات نشان داده‌اند که ژنوتیپ‌های کاهو می‌توانند در گروه‌هایی با پروفایل‌های مشخص از این صفات طبقه‌بندی شوند. یک گروه دارای مقادیر مثبت و بالا برای محتوای سبزی‌گی برگ، شاخص فتوسنتز و حداکثر کارایی عملکرد کوانتومی فتوسیستم II است که نشان‌دهنده فعالیت فتوسنتزی قوی و سلامت گیاه می‌باشد (Dai et al., 2024). در مقابل، گروه دیگر مقادیر پایین و منفی برای محتوای قند محلول کل، محتوای فنل کل و محتوای فلاونوئید کل دارد که نشان‌دهنده مسیرهای متابولیک متفاوت یا پاسخ‌های استرسی متفاوت می‌باشد. این رویکرد به شناسایی پروفایل‌های ژنوتیپی که تحت شرایط محیطی خاص (تنش شوری) مقاوم‌تر یا کارآمدتر باشند، کمک می‌کند و بینش‌های ارزشمندی برای استراتژی‌های پرورش و کشت فراهم می‌آورد.

نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی که در شکل ۳ ارائه شده، نشان می‌دهد که مؤلفه اول ۴۱/۳۰ درصد و مؤلفه دوم ۲۲/۳ درصد از تغییرات صفات مورد بررسی را



شکل ۲. آنالیز خوشه‌ای همراه با نقشه حرارتی ژنوتیپ‌های کاهو بر اساس صفات اندازه‌گیری شده تحت تنش شوری
Figure 2. Cluster analysis with a heat map of lettuce genotypes based on the measured traits under salt stress



شکل ۳. تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های پیشرفته کاهو

Figure 3. Principal Component Analysis based on the studied traits in advanced lettuce genotypes

فتوستنتزی بهتری برخوردارند. نتایج تحلیل خوشه‌ای همراه با نقشه حرارتی صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ های کاهو، این ژنوتیپ‌ها را به دو گروه متمایز تقسیم کرد. گروه اول شامل صفات مرتبط با محتوای سبزیگی برگ، شاخص فتوستنتز و حداکثر کارایی فتوسیستم II بود و گروه دوم صفات قند محلول کل، فنل کل و فلاونوئید کل را در بر می‌گرفت. چنین تحلیل‌هایی نشان دادند که می‌توان ژنوتیپ‌ها را با دقت خوبی بر اساس این صفات فیزیولوژیك و بیوشیمیایی طبقه‌بندی کرد. علاوه بر این، نتایج تجزیه به مؤلفه های اصلی نشان داد که دو مؤلفه اول در مجموع ۶۳/۶ درصد از تغییرات و تنوع موجود را تبیین می‌کنند. در این میان، محتوای سبزیگی برگ، شاخص فتوستنتز و حداکثر کارایی فتوسیستم II بیشترین سهم را در تبیین این تنوع داشتند. در مجموع، این یافته‌ها می‌توانند به شناسایی عوامل کلیدی مؤثر بر کارایی فتوستنتزی و پاسخ گیاه کاهو به تنش شوری کمک کنند و راهنمای مناسبی برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر فراهم آورد. همچنین به کاربردن هورمون ۲۴-اپی براسینولید در کاهش اثرات تنش شوری مؤثر واقع گردید. به این منظور پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی از غلظت های بالاتر نمک برای القای تنش شوری استفاده گردد.

نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در ژنوتیپ‌های کاهو نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و صفات اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری وجود دارد. با افزایش سطوح شوری، پارامترهای فلورسانس كلروفیل نظیر Fv/Fm (حداکثر کارایی فتوسیستم II) و PI (شاخص فتوستنتز) کاهش یافتند که این کاهش بیانگر افت کارایی فتوستنتزی ژنوتیپ های کاهو در شرایط تنش شوری است. همچنین، با افزایش شدت تنش شوری، میزان ترکیبات فیتوشیمیایی از جمله قند محلول کل، فنل کل و فلاونوئید کل افزایش یافت که نشان‌دهنده واکنش دفاعی گیاه در برابر شرایط تنش‌زا است. بررسی ضرایب همبستگی میان صفات در ژنوتیپ‌های پیشرفته کاهو حاکی از آن است که بین حداکثر کارایی عملکرد کوانتومی فتوسیستم II و شاخص فتوستنتز، همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری وجود دارد. این یافته نشان می‌دهد که عملکرد مؤثر فتوسیستم II می‌تواند نقش مستقیم و مثبتی در بهبود شاخص فتوستنتز ایفا کند، به‌طوری‌که با افزایش کارایی این فتوسیستم، عملکرد فتوستنتزی ژنوتیپ‌ها نیز بهبود می‌یابد؛ موضوعی که در فرآیند تولید انرژی و رشد گیاه اهمیت ویژه‌ای دارد. علاوه بر این، بین محتوای سبزیگی برگ و شاخص فتوستنتز نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد که نشان می‌دهد ژنوتیپ‌هایی با سبزیگی بیشتر، معمولاً از عملکرد

References

- Adhikari, N. D., Simko, I., & Mou, B. (2019). Phenomic and physiological analysis of salinity effects on lettuce. *Sensors*, 19(21), 4814.
- Ahmed, S., Ahmed, S., Roy, S. K., Woo, S. H., Sonawane, K. D., & Shohael, A. M. (2019). Effect of salinity on the morphological, physiological and biochemical properties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Bangladesh. *Open Agriculture*, 4(1), 361-373.
- Babaousmail, M., Nili, M. S., Brik, R., Saadouni, M., Yousif, S. K., Omer, R. M., & El-Taher, A. M. (2022). Improving the tolerance to salinity stress in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) using exogenous application of salicylic acid, yeast, and zeolite. *Life*, 12(10), 1538.
- Boughalleb, F., Abdellaoui, R., Mahmoudi, M., & Bakhshandeh, E. (2020). Changes in phenolic profile, soluble sugar, proline, and antioxidant enzyme activities of *Polygonum equisetiforme* in response to salinity. *Turkish Journal of Botany*, 44(1), 25-35.
- Boukema, I. W., Hazekamp, T.H., & Hintum, T.H.J.L. (2007). *The CGN Collection Reviews: The CGN Lettuce Collection*. Wageningen, Centre for Genetic Resource. 2-5.
- Breś, W., Kleiber, T., Markiewicz, B., Mieloszyk, E., & Mieloch, M. (2022). The effect of NaCl stress on the response of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agronomy*, 12(2), 244.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Anal.*, 10, 178-82.
- Costa, S. F., Martins, D., Agacka-Mołdoch, M., Czubacka, A., & de Sousa Araújo, S. (2018). Strategies to alleviate salinity stress in plants. *Salinity Responses and Tolerance in Plants, Volume 1: Targeting Sensory, Transport and Signaling Mechanisms*, 307-337.
- Dai, M., Tan, X., Ye, Z., Chen, X., Zhang, Y., Ruan, Y., & Kong, D. (2024). Analysis of lettuce transcriptome reveals the mechanism of different light/dark cycle in promoting the growth and quality. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1394434.
- DeVries, I. M. (1997). Origin and domestication of (*Lactuca sativa* L.). *Genet Resource and Crop Evolution*, 44, 165-174.
- Ekinci, M., Yildirim, E., Dursun, A., & Turan, M. (2012). Mitigation of salt stress in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Crispa) by seed and foliar 24-epibrassinolide treatments. *HortScience*, 47(5), 631-636.
- Food and Agriculture Organization of the United State, 2014.
- Ghassemi-Golezani, K., Hosseinzadeh-Mahootchi, A., & Farhangi-Abriz, S. (2020). Chlorophyll a fluorescence of safflower affected by salt stress and hormonal treatments. *SN Applied Sciences*, 2, 1-9.
- Guo, J., Zhou, X., Wang, T., Wang, G., & Cao, F. (2020). Regulation of flavonoid metabolism in ginkgo leaves in response to different day-night temperature combinations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, 133-140.
- Kalaji, H. M., Bosa, K., Kościelniak, J., & Żuk-Golaszewska, K. (2011). Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 64-72.
- Kataria, S., & Verma, S. K. (2018). Salinity Stress Responses and Adaptive Mechanisms in Major Glycophytic Crops: The Story So Far. in *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, vol. 1, pp. 1–39.
- Krause, A.G., & Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual review of plant biology*, 42(1), 313-349.
- Kumar, K., & Saddhe, A.A. (2018). Targeting aquaporins for conferring salinity tolerance in crops. *Salinity Responses and Tolerance in Plants, Volume 1: Targeting Sensory, Transport and Signaling Mechanisms*, 65-84.
- Lebeda, A., Ryder, E. J., Grube, R., Dolezalova, I., & Kristkova, E. (2007). Lettuce (*Asteraceae; Lactuca* spp). In: SINGH R.J. (ed.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*, Vol. 3, 377-472.
- Marhaenanto, B., Aningtyas, P. W., Putraa, B. T. W., Soedibyo, D. W., & Syahputra, W. N. H. (2025). Estimating Flavonoid and Nitrogen Status of Guava Leaves Using E-Nose and SPAD Meter. *Agricultural Research*, 1-14.
- Mihaljević, I., Lepeduš, H., Šimić, D., Vuletić, M. V., Tomaš, V., Vuković, D., & Zdunić, Z. (2020). Photochemical efficiency of photosystem II in two apple cultivars affected by elevated temperature and excess light in vivo. *South African journal of botany*, 130, 316-326.
- Netto, A. T., Campostrini, E., de Oliveira, J. G., & Bressan-Smith, R. E. (2005). Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia horticulturae*, 104(2), 199-209.
- Pandjaitan, N., Howard, L. R., Morelock, T., & Gil, M. I. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal Agric. Food Chem*, 53, 8618 - 23.

- Pavli, O.I., Kempapidis, K., Maggioros, L., Foti, C., Panagiotaki, E., & Khah E.M. (2021). Response of Lettuce Germplasm to Salt Stress at Different Developmental Stages. *Annals of Agricultural & Crop Sciences*, 6(5).
- Sardar, H., Khalid, Z., Ahsan, M., Naz, S., Nawaz, A., Ahmad, R., & Abou Fayssal, S. 2023. Enhancement of salinity stress tolerance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) via foliar application of nitric oxide. *Plants*, 12(5), 1115.
- Shlegl, H. G., 1986. Die verwertung orgngischer sauren durch chlorella lincht. *Plant Sciences*, 41, 47-51.
- Sim, C. C., Zaharah, A. R., Tan, M. S., & Goh, K. J. (2015). Rapid determination of leaf chlorophyll concentration, photosynthetic activity and NK concentration of *Elaies guineensis* via correlated SPAD-502 chlorophyll index.
- Takai, T., Kondo, M., Yano, M., & Yamamoto, T. (2010). A quantitative trait locus for chlorophyll content and its association with leaf photosynthesis in rice. *Rice*, 3, 172-180.
- Tsai, Y. C., Chen, K. C., Cheng, T. S., Lee, C., Lin, S. H., & Tung, C. W. (2019). Chlorophyll fluorescence analysis in diverse rice varieties reveals the positive correlation between the seedlings salt tolerance and photosynthetic efficiency. *BMC plant biology*, 19, 1-17.
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K., & Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis research*, 91.
- Zorati Pour, E., Soltani Mohammadi, A., & Alamzadeh Ansari, N. (2019). Evaluation of yield and water productivity of lettuce under drought and salinity stress in greenhouse conditions. *Iranian Journal of Irrigation & Drainage*, 13(2), 450-461. (in Persian)

Green synthesis of iron oxid nanoparticles using *Cressa cretica* leaf extract and investigating its antimicrobial efficacy

Azim Sarani¹, Leila Mehravaran² , Barat Ali Fakheri³, Maryam Allahdou⁴

1. M. Sc, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

3. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

Correspondence:

Leila Mehravaran

Email: lmehravaran@uoz.ac.ir

Received: 19, May 2024

Accepted: 28, Feb. 2025

How to cite:

Sarani, A., Mehravaran, L., Fakheri, B. A., & Allahdou, M. (2025). Green synthesis of iron oxid nanoparticles using *Cressa cretica* leaf extract and investigating its antimicrobial efficacy. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 69-83. (DOI: [10.30473/cb.2025.71377.1969](https://doi.org/10.30473/cb.2025.71377.1969))

ABSTRACT

In recent years, the use of plants for the synthesis of nanoparticles has gained significant attention due to its cost-effectiveness and environmental friendliness. For the green synthesis of iron oxide nanoparticles, the leaf extract of *Cressa cretica* L. was employed as a reducing agent. When iron sulfate was added to the leaf extract, iron oxide nanoparticles formed within minutes. The initial indication of nanoparticle synthesis was a color change in the solution from yellow to dark brown. The synthesized iron oxide nanoparticles were characterized using various analytical techniques, including UV-visible spectrophotometry, X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), and transmission electron microscopy (TEM). The UV-visible spectrophotometry spectrum exhibited a peak at 280 nm, indicating the transfer of oxygen electrons to the synthesized iron oxide nanoparticles. The XRD analysis revealed the crystalline structure of the nanoparticles, with 2θ values of 35.64 and 43.42, confirming their successful formation. TEM images showed that the synthesized nanoparticles were uniform and spherical, with an average size of 21 nm. The FT-IR spectrum identified functional groups derived from plant phytochemicals, which likely contributed to the formation and stabilization of the nanoparticles. The analysis also confirmed the presence of flavonoids and phenolic compounds in the *Cressa cretica* L. leaf extract. These compounds are believed to facilitate the reduction of metal ions and play a role in nanoparticle formation. Additionally, they act as natural capping agents, stabilizing the nanoparticles and preventing their aggregation. The synthesized iron oxide nanoparticles exhibited significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Escherichia coli*. At a concentration of 3000 $\mu\text{g/ml}$, inhibition zones of 7 mm and 14 mm were observed for *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes*, respectively. These findings suggest that the synthesized nanoparticles have potential applications in the development of antibacterial drugs and other biological applications.

KEYWORDS

Antibacterial activity, Antioxidant compounds, Biosynthesis, *Cressa cretica*, Physical properties.



«مقاله پژوهشی»

سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن از عصاره برگ گیاه علف مورچه (*Cressa cretica*) و بررسی خواص ضد میکروبی آن

عظیم سارانی^۱، لیلا مهرآوران^۲ , براتعلی فاخری^۳، مریم اله دو^۴

چکیده

استفاده از گیاهان برای سنتز نانوذره به دلیل هزینه کم و سازگاری آن با محیط زیست امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است. به منظور سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن، از عصاره گیاه علف مورچه (*Cressa cretica* L.) به عنوان عامل احیا کننده استفاده گردید. نانوذرات اکسید آهن در عرض چند دقیقه بعد از اضافه کردن سولفات آهن به عصاره گیاهی تشکیل شد. تغییر رنگ محلول از زرد به قهوه‌ای تیره اولین نشانه سنتز نانوذرات بود. نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با تکنیک‌های مختلفی مانند اسپکتروفتومتر مرئی بنفش، XRD، FT-IR، TEM تجزیه و تحلیل شدند. در بررسی UV-اسپکتروفتومتر، پیک روی شاخص ۲۸۰ نانومتر مشاهده شد که نشان‌دهنده انتقال الکترون اکسیژن به آهن سنتز شده از علف مورچه می‌باشد. طیف XRD ساختار کریستالی نانوذرات اکسید آهن سنتز شده را به تصویر کشید. بر اساس این نتایج، $35/64 = 2\theta$ و $43/42$ سنتز نانوذرات اکسید آهن را تایید کردند. تصاویر TEM ذرات کروی شکل یکنواخت نانوذرات سنتز شده را با میانگین اندازه ۲۱ نانومتر نشان داد. طیف FT-IR وجود گروه‌های عاملی از مواد شیمیایی گیاهی را نشان می‌دهد که احتمالاً در تشکیل و تثبیت نانوذرات نقش دارند. این نتایج حضور ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی را در عصاره برگ علف مورچه تایید می‌کنند. این ترکیبات می‌توانند مسئول کاهش یون فلز و تشکیل نانوذرات باشند. نانوذرات اکسید آهن سنتزی، مهار موثری در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز و *شریشیا کلی* نشان دادند به طوری که در غلظت $\mu\text{g/ml}$ ۳۰۰۰، ناحیه مهاری ۷ میلی‌متر برای باکتری *شریشیا کلی* و ۱۴ میلی‌متر برای استرپتوکوکوس پیوژنز مشاهده شد. این نتایج، نشان‌دهنده امکان سنتز نانوذرات آهن از عصاره برگ علف مورچه و کاربرد احتمالاً موثر نانوذرات سنتزی در تولید داروهای ضد باکتری و فرایندهای مختلف بیولوژیکی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

ترکیبات آنتی اکسیدانی، خواص فیزیکی، سنتز زیستی، علف مورچه، فعالیت ضد باکتریایی.

۱. کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.
۲. استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.
۳. استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.
۴. استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

نویسنده مسئول:

لیلا مهرآوران

ایمانامه: lmehravarani@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۰

استناد به این مقاله:

سارانی، عظیم؛ مهرآوران، لیلا؛ فاخری، براتعلی و اله دو، مریم (۱۴۰۴). سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن از عصاره برگ گیاه علف مورچه (*Cressa cretica*) و بررسی خواص ضد میکروبی آن، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۶۹-۸۳.

(DOI: [10.30473/cb.2025.71377.1969](https://doi.org/10.30473/cb.2025.71377.1969))

مقدمه

نانوذرات، ذراتی با ابعاد حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند به طوری که ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی آن‌ها متفاوت با منشأ اولیه‌شان می‌باشد (Mishra et al., 2005; Sellmyer, 2014). اندازه آن‌ها به عوامل مختلفی مانند دما، pH، نوع ماده احیا کننده و تثبیت کننده مورد استفاده بستگی دارد (Elgorban et al., 2016). روش‌های مختلفی برای سنتز نانوذرات وجود دارد با این حال روش سنتز سبز نانوذرات با استفاده از عصاره گیاهی روشی جدید، بسیار ساده و اقتصادی، بدون آسیب به محیط زیست می‌باشد (Fazlzadeh et al., 2017). روش‌های شیمیایی سنتز نانوذرات، معمولاً آسان ولی به دلیل مصرف مواد شیمیایی سمی، احتمال آلودگی و تشکیل محصولات جانبی خطرناک را دارد (Sayadi et al., 2020; Hussein et al., 2017; al., 2017). شکل و اندازه نانوذرات سبز سنتز شده، با نانوذرات سنتز شده توسط سایر موجودات متفاوت است. سنتز سبز نانوذرات نسبت به سنتز نانوذرات با استفاده از باکتری‌ها، جلبک‌ها، مخمرها و قارچ‌ها، قابل اعتمادتر، ایمن‌تر، ارزان‌تر و تجدید پذیرتر است (Chandran et al., 2006). نانوذرات سبز با ثبات تر و سرعت سنتزشان بیشتر است (Irvani, 2011). گیاهان به دلیل دارا بودن ترکیبات ثانویه‌ای مانند ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ... دارای خاصیت احیا کنندگی یا آنتی اکسیدانی هستند (Tavosi et al., 2018). این ترکیبات آنتی اکسیدانی، نقش اصلی را به عنوان عامل کاهش دهنده ایفا می‌کنند و بدین ترتیب به سنتز نانوذرات اکسید آهن سازگار با محیط زیست کمک می‌کنند (Kanagasubbulakshmi et al., 2017).

نانوذرات آهن صفر ظرفیتی خاصیت میکروب کشی قوی‌تری نسبت به نانوذرات سایر ترکیبات آهن از خود نشان می‌دهد (Boxall et al., 2007). نانوذرات آهن صفر ظرفیتی به دلیل مساحت سطحی بالا و واکنش پذیری زیاد در عرصه‌های مختلف مورد توجه بوده است (Barnes et al., 2010). برای کاهش عصاره‌های گیاهی می‌توان از پیش سازهای مناسب مانند سولفات آهن استفاده نمود (Senthil & Ramesh, 2012).

عصاره‌های گیاهی با خواص آنتی اکسیدانی می‌توانند نمک‌های فلزی را بازسازی کرده و نانوذرات تولید کنند. هنگامی که نمک‌های فلزی در معرض این ترکیبات قرار می‌گیرند، به یون‌های فلزی کاهش می‌یابند (Taheri et al., 2017).

علف مورچه با نام علمی *Cressa cretica* L. از خانواده *Convolvulaceae* گیاهی نمک دوست است (Jahangir & Nasernakhaei, 2021). این گیاه در شمال اروپا، آفریقا، آسیا (ترکیه، پاکستان، ایران و ...) پراکنده است. در ایران تقریباً در اکثر نقاط از جمله سیستان و بلوچستان رشد می‌کند (Ghassemi et al., 2012; Dehkordi et al., 2012). قسمت‌های مختلف گیاه علف مورچه در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آسم، یبوست، جذام، دیابت و ضعف عمومی کاربرد دارد. همچنین این گیاه به عنوان نیروبخش، اشتهاآور، خون‌ساز و ضد کرم استفاده می‌شود (Priyashree et al., 2010; Sunita et al., 2012). علف مورچه دارای ترکیبات شیمیایی بسیاری از جمله آلکالوئیدها، تانن‌ها، کربوهیدرات‌ها، گلیکوزیدها، استرول‌ها، پروتئین و مقدار زیادی نمک است (Fawzi et al., 2019). همچنین در اندام‌های هوایی این گیاه ترکیبات فلاونوئیدی مانند کوئرستین، روتین و استراگالین وجود دارد (Jahangir & Nasernakhaei, 2021). کوئرستین یک آنتی اکسیدان طبیعی با خواص ضد سرطانی است. آستراگالین یکی از مهم‌ترین فلاونوئیدها است که دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد حساسیت، ضد التهابی و ضد توموری است (Jahangir & Nasernakhaei, 2021).

پیشینه پژوهش

استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانوذرات به دلیل مزایای بالقوه آن‌ها نسبت به میکروارگانیزم‌ها، سهولت دسترسی، خطرات زیست‌محیطی کمتر و فرآیند دقیق نگهداری از کشت‌های سلولی آن‌ها حائز اهمیت است (Kalishwaralal et al., 2010). نانوذرات سنتزی، عوامل ضد باکتریایی در برابر تعداد بسیاری از باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند که به دلیل خواص

فیزیکوشیمیایی خاص و فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها است (Emrani et al., 2018). Fe_3O_4 کاربردهای زیست پزشکی زیادی دارند، از جمله استفاده از ذرات نانومغناطیسی در جذب باکتری، طراحی حسگر برای شناسایی عوامل مختلف بیولوژیکی و به عنوان ابزاری در پزشکی و نیز به عنوان حامل دارو جهت هدفمند را می‌توان مثال زد (Kumar et al., 2016; Sari & Yulizar, 2017). همچنین نانوذرات اکسید آهن سنتزی برای اهداف مختلفی از جمله حذف آلاینده‌ها از آب‌های زیرزمینی، حذف رنگ‌ها و فلزات سنگین از فاضلاب به کار برده شده است (Saod et al., 2024).

گزارش‌های فراوانی در زمینه سنتز زیستی نانوذرات و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها وجود دارد. برای سنتز نانوذرات از گیاهان مختلفی مانند نعنای (Tavosi et al., 2018)، جلبک دریایی (Mahdavi et al., 2013)، چای ترش (Wu et al., 2008) استفاده شده است. در پژوهشی از ۲۵ گیاه مختلف برای سنتز نانوذرات آهن استفاده شده است (Machado et al., 2013). در سایر گیاهان دارویی مانند زعفران (Taghva & Entezari, 2017)، زیره سبز (Salari et al., 2019) نیز امکان سنتز نانوذرات مختلف، بررسی و تایید شده است. گزارش شده است که عصاره برگ گیاه علف مورچه دارای اثرات ضد باکتریایی بر ضد باکتری‌های /شریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتلیس، باسیلوس پومیلوسو کلبسیا پنومونیه است به همین علت می‌توان از این گیاه در درمان بیماری‌های باکتریایی استفاده نمود (Thirunavukkarasu et al., 2000).

در تحقیقات قبلی روی گیاه علف مورچه، نانوذرات نقره، طلا و مس با استفاده از عصاره آبی برگ‌های این گیاه سنتز شده است. در تحقیقی، نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از عصاره علف مورچه دارای اشکال شش ضلعی، پنج ضلعی، کروی و میله‌ای با اندازه‌های بین ۱۵ تا ۲۲ نانومتر بودند. مطالعات FTIR نشان داد که گروه‌های هیدروکسیل، آمید و آمین برگ‌های علف مورچه مسئول تشکیل و تثبیت نانوذرات طلا می‌باشند. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات طلا در برابر پاتوژن‌های انسانی مهار

قابل توجهی را نشان داد. این تایید می‌کند که نانوذرات طلای ساخته شده به عنوان یک ابزار ضد باکتری عمل می‌کنند. نتایج این تحقیق نشان داد که سنتز بیولوژیکی نانوذرات طلا می‌تواند روشی سریع و جایگزین برای سنتز شیمیایی باشد (Balasubramanian et al., 2019). در پژوهشی از عصاره برگ گیاه علف مورچه برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد. سرعت جذب نانوذرات نقره در این مطالعه حداکثر در ۴۴۴/۵ نانومتر بود. بر اساس تصاویر SEM، نانوذرات نقره سنتز شده میله‌ای شکل بودند و فعالیت ضد باکتریایی مؤثری را در برابر پاتوژن‌ها نشان دادند (Balasubramanian et al., 2015). اندازه نانوذرات مس سنتز شده با استفاده از عصاره برگ علف مورچه در محدوده نانومتری قرار داشت. با توجه به نتایج FTIR، وجود پیوند Cu-O برای تشکیل نانوذرات اکسید مس ضروری است. نتایج آزمایش XRD نیز نشان دهنده وجود نانوذرات اکسیدی در مقیاس نانومتری است. از نظر مورفولوژیکی، نانوذرات سنتز شده دارای ساختارهای متفاوتی بودند، Kalaiaarasi & Yokeswari Nithya, (2019). در تحقیقی از عصاره برگ *Cynometra ramiflora* برای تولید نانوذرات اکسید آهن استفاده شد. نتایج نشان داد که در عرض چند دقیقه از افزودن سولفات آهن به عصاره برگ، نانوذرات اکسید آهن تشکیل می‌شود و بنابراین روش بسیار ساده و سریع است. تصاویر SEM از ذرات کریستالی گسسته و طیف EDS وجود آهن و اکسیژن را تایید کرد. نتایج XRD ساختار کریستالی نانوذرات اکسید آهن را نشان داد. طیف FT-IR حضور گروه‌های عاملی فیتوشیمیایی را نشان می‌دهد که احتمالاً در تشکیل و تثبیت نانوذرات نقش دارند (Groiss et al., 2017). نانوذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره *Lagenaria Siceraria* دارای اندازه‌های از ۳۰ میلی‌متر تا ۱۰۰ نانومتر بودند. نانوذرات سنتز شده دارای منطقه مهاری ۱۰ میلی‌متر برای /شریشیا کلی و ۸ میلی‌متر برای /استافیلوکوکوس اورئوس بود (Kanagasubbulakshmi & Kadirvelu, 2017). نانوذرات کریستالی حاصل از عصاره آبی برگ گیاه برگ بو (*Laurus nobilis* L.) دارای ساختار کروی تا شش ضلعی با متوسط اندازه

مقطر به آن اضافه شد و به مدت ۶ ساعت روی شیکر چرخشی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. در نهایت، عصاره آبی به دست آمده توسط کاغذ صافی واتمن، صاف و برای مراحل بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. برای سنتز نانوذرات اکسید آهن، محلول سولفات آهن ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (ساخت شرکت Merck، آلمان) ۰/۱ مولار به صورت قطره قطره به عصاره علف مورچه با نسبت حجمی ۳:۲ و در شرایط اختلاط با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه به کمک همزن مغناطیسی اضافه گردید. pH محلول در طی فرآیند سنتز برابر با ۶ بود. تشکیل نانوذرات آهن صفر ظرفیتی با ظهور رسوبات قهوه‌ای تیره در محیط مشخص گردید. پس از ۲۴ ساعت، رسوب با استفاده از سانتریفیوژ با دور rpm ۴۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه جدا و در آن با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک شد (Hoag et al., 2009).

ویژگی‌های نانوذرات اکسید آهن سنتز شده

طیف جذب نانوذرات با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-vis (SERIES8000CECIL) در محدوده طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. از آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای مشخص کردن اندازه و شکل نانوذرات آهن بیوسنتز شده استفاده شد (Jamzad & Kamari Bidkorpeh., 2020). بدین منظور، یک قطره از نمونه محلول نانوذرات آهن بر روی شبکه‌ای مسی با پوشش کربنی قرار گرفت. پس از خشک شدن نمونه با میکروسکوپ الکترونی عبوری عکس آن تهیه شد. تجزیه و تحلیل اندازه ذرات با استفاده از نرم افزار آنالیز Image J صورت گرفت. برای شناسایی گروه‌های عاملی سطحی روی نانوذرات طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، از قرص‌های پتاسیم بروماید استفاده شد. قرص‌های پتاسیم بروماید حاوی ۲ میلی گرم نمونه و ۸ میلی گرم پتاسیم بروماید برای اندازه‌گیری FTIR تهیه شد. تجزیه و تحلیل جذب IR از 4500 cm^{-1} تا 400 cm^{-1} در دمای اتاق انجام شد (Jamzad & Kamari Bidkorpeh, 2020).

۸/۰۳-۸/۹۹ نانومتر بودند. بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی این نانوذرات سنتزی، نشان دهنده تاثیر مثبت آن‌ها بر باکتری گرم مثبت لیستریا مونوسیژنز و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و *پنی سیلیوم اسپینولوزوم* بود (Jamzad & Kamari Bidkorpeh, 2020). در مطالعه‌ای از عصاره کاسه گل چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) جهت سنتز نانوذرات اکسید آهن استفاده شد. نانوذرات سنتزی، ساختار کریستالی عمدتاً کروی داشتند با پیک جذب بین ۲۹۰ تا ۳۰۰ نانومتر و اندازه متوسط ۶۱ نانومتر. حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات سنتزی در برابر باکتری‌های *E. coli*، *K. pneumoniae* و *P. aeruginosa* به ترتیب $6/25$ ، $12/5$ و 25 میکروگرم بر میلی لیتر بود. همچنین اثر بخشی نانوذرات سنتزی در ترکیب با آنتی بیوتیک‌ها به میزان قابل توجهی افزایش یافت. بر این اساس نانوذرات اکسید آهن سنتز شده کاربردهای امیدوار کننده‌ای به عنوان ترکیبات ضد باکتریایی و به عنوان افزودنی برای افزایش اثر بخشی آنتی بیوتیک‌ها دارند (Saod et al., 2024).

به دلیل اهمیت سنتز سبز نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی، در این تحقیق از عصاره برگ گیاه علف مورچه برای سنتز نانوذرات اکسید آهن استفاده شد. همچنین فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده در برابر سه پاتوژن به نام‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت)، *استرپتوکوکوس پیوژنز* (گرم مثبت) و *اشریشیا کلی* (گرم منفی) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌شناسی پژوهش

تهیه نمونه و عصاره گیری

این آزمایش در دانشگاه زابل انجام شد. به این منظور نمونه‌های تازه *Cressa cretica* L. از اطراف شهر زابل جمع‌آوری و پس از تایید گیاه توسط کارشناس گیاهشناسی دانشگاه شستشو داده شدند، سپس برگ‌های گیاه جدا و به مدت ۹ روز در سایه خشک شدند. عصاره گیری به روش پرکولاسیون با حلال آب مقطر (با نسبت ۱ به ۱۰ گیاه به حلال) انجام شد برای این منظور، مقدار ۱۰ گرم از برگ‌های آسیاب شده توزین و ۱۰۰ میلی لیتر آب

کریستالی نانوذرات سنتز شده از طریق کریستالوگرافی پراش اشعه ایکس (XRD) مورد ارزیابی قرار گرفت (Mourdikoudis et al., 2018).

اثرات ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده

در این مطالعه کلیه محیط‌های کشت میکروبی مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان بود، همچنین سویه باکتریایی استاندارد/استافیلوکوکوس/اورئوس (گرم مثبت)، استرپتوکوکوس پیوژنز (گرم مثبت) و اشریشیا کلی (گرم منفی) مورد استفاده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

جهت انجام آزمایش‌های ضد میکروبی به کشت تازه میکروب‌ها نیاز می‌باشد. منظور از کشت تازه، کشت ۲۴ ساعت قبل برای باکتری است. برای تهیه کشت تازه از کشت ذخیره (کشت خطی) استفاده گردید. جهت کشت، ابتدا لوپ را با حرارت کاملاً استریل کرده و بعد از سرد شدن، یک کلونی تک از کشت ذخیره برداشته و در محیط نوترینت برات سوسپانسیون گردید و سپس لوله‌ها در انکوباتور قرار داده شدند. از سوسپانسیون تهیه شده به داخل لوله‌ها حاوی محیط نوترینت برات آنقدر اضافه گردید تا کدورتی معادل محلول ۰/۵ مک فارلند حاصل گردد. این کدورت معادل 1×10^8 CFU/ml می‌باشد (Bauer et al., 1966).

آزمون انتشار دیسک

به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده به روش انتشار دیسک (Prakash et al., 2014)، سوسپانسیون میکروبی از یک کلنی باکتری بر اساس استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. باکتری‌ها به طور جداگانه روی محیط کشت مولر هیتون آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. ۷ دیسک حاوی غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن روی سطح هر صفحه قرار داده شد. با سمپلر ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه روی

دیسک ریخته شد. سپس پلیت‌ها در آون با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ناحیه مهار بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد و به عنوان فعالیت در برابر پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت (Bauer et al., 1966; Rios et al., 1988).

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC)

برای بررسی اثرات ضد میکروبی ماده مورد نظر از روش میکرودايلوشن برات برای تعیین MIC و MBC استفاده شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانوذرات آهن سنتز شده، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون (ساخت شرکت Merck، آلمان) به هر چاهک صفحه میکروتیتر اضافه شد. در چاه اول ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۳۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاه اول خارج و به چاه دوم اضافه شد، به همین ترتیب رقت‌های مضاعف در چاهک ادامه یافت. چاه‌های دیگر سپس ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی ($cfu=1.5.108$) در میلی‌لیتر، (نیم مک فارلند) به چاهک-ها اضافه شد. DMSO به چاهک کنترل منفی (بدون عصاره) اضافه شد، سپس پلیت میکروتیتر به مدت ۲۴ ساعت در آزمایشگاه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. حداقل غلظت بازدارنده به عنوان کمترین غلظت مورد نیاز برای توقف رشد باکتری در پایان ۲۲ ساعت انکوباسیون تعریف شد. برای تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC)، ۱۰ میکرولیتر از محتویات چاهک‌ها در پایان ۲۴ ساعت در گلخانه، کشت ثانویه بر روی محیط کشت نوترینت آگار (ساخت شرکت Merck، آلمان) و پلیت‌ها داده شد. برای بررسی رشد باکتری‌ها استفاده شد. آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گلخانه نگهداری شدند که کمترین غلظت عصاره که ۹۹/۹ درصد باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشنده یا MBC در نظر گرفته

1. MIC. Minimum Inhibitory Concentration

2. MBC. Minimum Bactericidal Concentration

Bidkorpheh, 2020; Karpagavinayagam & (Vedhi, 2019; Saod *et al.*, 2024) جذب مداوم در محدوده طول موج مرئی، یکی از ویژگی‌های مشخصه نانوذرات اکسید آهن سنتز شده می‌باشد (Hoag *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2014). مطالعات قبلی تایید می‌کنند پلی فنول‌های عصاره برگ، مسئول کاهش FeSO_4 برای تشکیل نانوذرات آهن هستند (Machado *et al.*, 2013).

زمانی که یک پرتو نور به نانوذرات فلزی می‌تابد، میدان نوسانی موج فرودی باعث می‌شود که الکترون‌های رزونانس فلز به طور جمعی نوسان کنند. این نوسان جمعی الکترون‌های رسانا، پلاسمون سطحی نامیده می‌شود. نانوذرات فلزی دارای جذب تشدید پلاسمون سطحی در محدوده طیف مرئی تا فرابنفش هستند و به‌طور خاص نور را با فرکانس‌های مختلف بسته به اندازه، شکل و مواد خود جذب و پراکنده می‌کنند. پلاسمون‌های سطحی در ذرات فلزی کوچک برانگیخته می‌شوند، اما تحریک مستقیم پلاسمون‌های سطحی روی سطح فلزی صاف امکان پذیر نیست (Tavosi *et al.*, 2018). سپس این نانوذرات تشکیل شده توسط یک سانتیفریوژ با سرعت بالا از محلول جدا و با آب مقطر دیونیزه شسته شدند تا مواد واکنش نداده حذف شوند و سپس در اجاق با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد خشک گردیدند (شکل ۱).

شد (Shahverdi *et al.*, 2007). تمام آزمایشات ضد میکروبی حداقل ۳ بار تکرار شد.

یافته‌های پژوهش

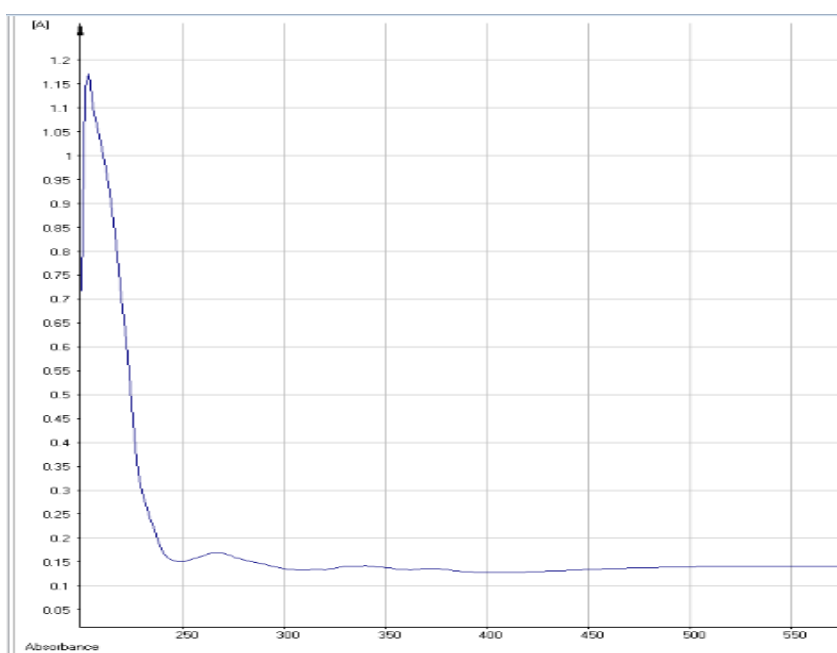
پس از اختلاط عصاره و نمک، تغییر رنگ فوری محلول از زرد به قهوه‌ای تیره، اولین نشانه قابل مشاهده از کاهش یون‌های آهن و تشکیل نانوذرات است (شکل ۱). این فرآیند کاهش امکان پذیر و به صورت خود به خودی است زیرا پتانسیل کاهش استاندارد پلی فنل‌های موجود در عصاره برگ بین 0.534 V و 0.540 V است (Cadenas & Packer, 1996) و پتانسیل کاهش استاندارد آهن 0.44 V است (Huang *et al.*, 2014). این تغییر رنگ که نشان دهنده تشکیل اکسید آهن است در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Prasad, 2016; Wang *et al.*, 2014).

در تجزیه و تحلیل نانوذرات آهن با طیف سنجی UV-Vis پیک جذب، در طول موج ۲۸۰ نانومتر مشاهده شد که بیانگر وجود نانوذرات آهن در محلول واکنش است (شکل ۲). بر اساس منابع معتبر، بیشینه پیک جذبی نانوذرات آهن، در طول موج‌های ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر می‌باشد که در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است (Kanagasubbulakshmi & Kadirvelu, 2017; Jagtap & Bapat, 2013; Jamzad & Kamari



شکل ۱. تغییر رنگ محلول از زرد به قهوه‌ای تیره و رسوب نانوذرات حاصل

Figure 1. The solution's color changed from yellow to dark brown and precipitation of the synthesized nanoparticles



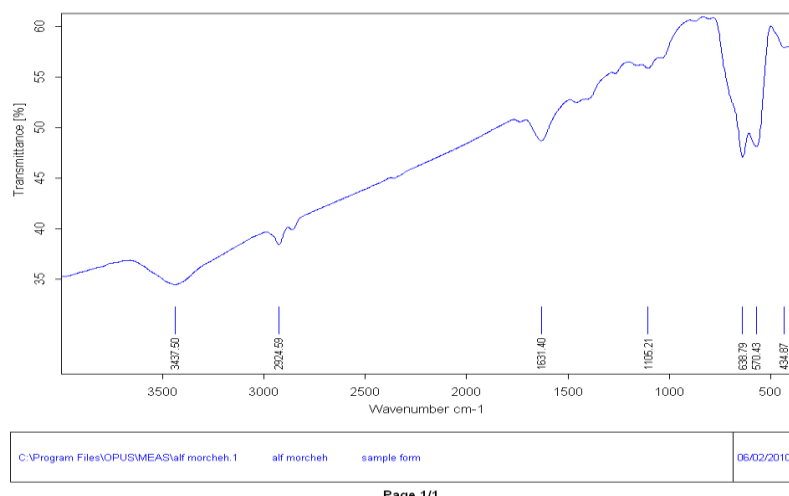
شکل ۲. طیف UV نانوذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره برگ علف مورچه

Figure 2. UV spectrum of iron oxide nanoparticles synthesized using *Cressa cretica* leaf extract

(Rehana et al., 2017; Nasrollahzadeh et al., 2015). همچنین بر اساس نتایج، وجود باند جذبی cm^{-1} ۵۷۰ و cm^{-1} ۶۳۸ نشان دهنده پیوند Fe-O در فاز هماتیت است و دلیلی بر تشکیل نانوذرات مغناطیسی آهن می باشد (شکل ۳). در مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است که نوارهای جذب کمتر از cm^{-1} ۸۰۰ با ارتعاش پیوندهای Fe-O مطابقت دارد (Venkateswarlu et al., 2019; Kumar et al., 2014; Rajendran et al., 2015; Jamzad & Kamari Bidkorpeh, 2020).

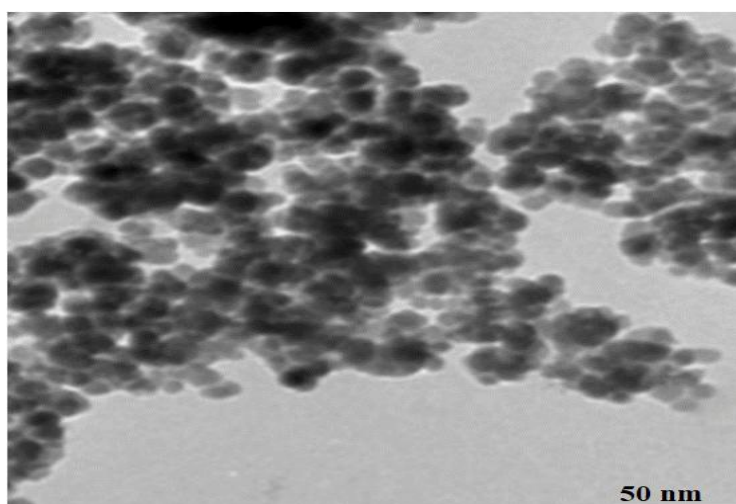
نتایج آنالیز با میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM
اندازه و شکل نانوذرات آهن سنتز شده از عصاره گیاهی علف مورچه، در شکل ۴ نشان داده شده است. بر اساس تصاویر به دست آمده، نانوذرات سنتز شده دارای مورفولوژی کروی و یکنواخت هستند و میانگین اندازه این ذرات حدود ۲۱ نانومتر می باشد این نتایج با یافته های سایر محققین همراستا می باشد (Weng et al., 2013; Huang et al., 2015; Groiss et al., 2017). توده ای نانوذرات احتمالا به دلیل وجود فیتوکمیکال های عصاره برگ است (Wang et al., 2014).

بررسی طیف سنجی تبدیل فوریه زیر قرمز FT-IR
به منظور شناسایی گروه های عاملی از ترکیب های شیمیایی عصاره علف مورچه که بر روی نانوذرات اتصال دارند طیف FT-IR از نانوذرات آهن مورد بررسی قرار گرفت. وجود باند جذبی (cm^{-1} ۳۴۳۷) نشان دهنده ارتعاشات کششی OH پلی فنول ها، باند جذبی (cm^{-1} ۲۹۲۴) را می توان به گروه هیدروکربن های آلیفاتیک C-H نسبت داد. باند جذبی (cm^{-1} ۱۶۳۱) مربوط به گروه های کششی C-O و گروه آمین های نوع دوم می باشند. همچنین باند جذبی (cm^{-1} ۱۱۰۵) را می توان به گروه خمشی N-O نیترو نسبت داد (Fan et al., 2018). نتایج به دست آمده حضور ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی را در عصاره ی برگ علف مورچه تایید می کنند. این ترکیبات می توانند مسئول کاهش یون فلز و تشکیل نانوذرات باشند (Nasrollahzadeh et al., 2015). همچنین حضور این ترکیبات در عصاره برگ علف مورچه به عنوان عامل پوششی جهت پایدار کردن نانوذرات و جلوگیری از تجمع آن ها را نشان می دهد. تحقیقات نشان داد که پلی فنول ها می توانند با برهمکنش الکترون های π ، بدون حضور لیگاندهای قوی به سطح نانوذرات فلز جذب شوند



شکل ۳. طیف FT-IR نانوذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره برگ علف مورچه

Figure 3. FT-IR spectrum of iron oxide nanoparticles synthesized using *Cressa cretica* extract



شکل ۴. تصویر TEM نانوذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره برگ علف مورچه

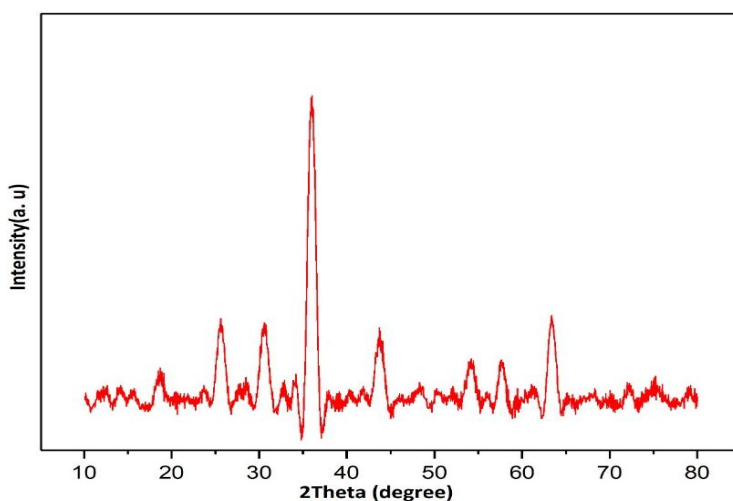
Figure 4. TEM image of iron oxide nanoparticles synthesized using *Cressa cretica* leaf extract

پیک‌های برجسته‌ای در محدوده‌های $30/24$ ، $35/64$ ، $43/42$ ، $53/52$ ، $57/26$ و $63/68$ به ترتیب مربوط به صفحات 200 ، 311 ، 400 ، 422 ، 511 و 440 نشان می‌دهد که بیانگر انطباق کامل این پیک‌ها با ساختار اکسید آهن می‌باشد (Kumar et al., 2016; Taufik & Saleh 2017). مطالعات نشان داده که پیک پراش اشعه ایکس در محدوده 2θ از $43-45$ درجه مربوط به آهن صفر ظرفیتی و پیک در محدوده $2\theta = 36$ درجه به علت وجود ترکیبات معدنی (مگنتیت (Fe_3O_4)) می‌باشد (Ebrahiminezhad et al.,).

نتایج آنالیز با استفاده از پراش پرتو ایکس (XRD) یک تکنیک مرسوم برای تعیین مورفولوژی و ساختار کریستالی نانوذرات است. این تکنیک برای تعیین ماهیت فلزی ذرات استفاده می‌شود. مواد مختلف به دلیل آرایش و ترتیب اتمی متفاوت دارای الگوهای پراش متفاوت و منحصر به فردی هستند. به منظور شناسایی و درک بهتر ساختارهای بلوری به‌دست‌آمده، الگوی XRD نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با استفاده از عصاره علف مورچه در شکل ۵ ارائه و تحلیل شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود

استرپتوکوکوس پیوژنز به میزان ۱۴ میلی‌متر، بر ضد استافیلوکوکوس/اورئوس به میزان ۱۰ میلی‌متر و بر ضد اشریشیا کلی به میزان ۷ میلی‌متر بود. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید آهن سنتز شده تایید کردند که نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاهی علف مورچه خاصیت ضد باکتریایی خوبی در برابر سویه‌های باکتری گرم مثبت و گرم منفی دارد. نانوذرات سنتزی به روش سبز از گیاه *N. sativa* نیز فعالیت ضد باکتریایی قوی در برابر سویه‌های باکتری‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس/اورئوس داشت (Abid et al., 2020; Al-Karagoly et al., 2022). تحقیقات فراوانی بر روی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن انجام شده است و مشخص شده است که آن‌ها سمیت کمی بر روی سلول‌های منفرد و به ویژه باکتری‌ها دارند، نتایج به دست آمده در مطالعه‌ای دیگر نشان داد که این نانوذرات در غلظت پایین اثرات کمتری بر منحنی رشد باکتری‌ها دارند اما در غلظت بالا فاز تأخیر رشد باکتری‌ها را به شدت افزایش می‌دهند، از طرفی در غلظت‌های بالا رشد باکتری در حضور این نانوذرات تقریباً متوقف می‌شود اما این نانوذرات اثرات کشنده قابل توجهی بر روی این باکتری ندارند. همچنین در دوزهای بالاتر، این نانوذرات باکتری‌های در حال تکثیر را می‌پوشانند و در نتیجه همه باکتری‌ها توسط نانوذرات پوشش داده می‌شوند (Kafayati et al., 2013).

(2018; Groiss et al., 2017). علاوه بر این وجود پیک در محدوده $2\theta = 25$ درجه مربوط به مواد ارگانیک شده از عصاره علف مورچه می‌باشد که به عنوان عامل پوشش‌دهنده و پایدار کننده شناخته می‌شود (Ebrahimi et al., 2016). نتایج خواص ضدباکتریایی نانوذرات اکسید آهن: بسیاری از محققان فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات آهن را تایید کرده‌اند (Feitz et al., 2005; Lee et al., 2008; Iconaru et al., 2012). در این مطالعه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید آهن سنتز شده بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا مانند سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس/اورئوس (گرم مثبت)، استرپتوکوکوس پیوژنز (گرم مثبت) و اشریشیا کلی (گرم منفی) با روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت (Prakash et al., 2014; Abo-zeid & Williams, 2020). بر اساس نتایج مشاهده شده، قطر هاله عدم رشد در هر سه باکتری با افزایش غلظت نانوذرات آهن افزایش یافت (جدول ۱). بر اساس این نتایج، باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس نسبت به باکتری اشریشیا کلی حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات اکسید آهن داشت (شکل ۶). که با نتایج (Mirhosseini & Firouzabadi, 2013; Torabi & Zarchi, 2017) مطابقت داشت. حداکثر فعالیت ضد باکتریایی در غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید آهن سنتز شده، بر ضد



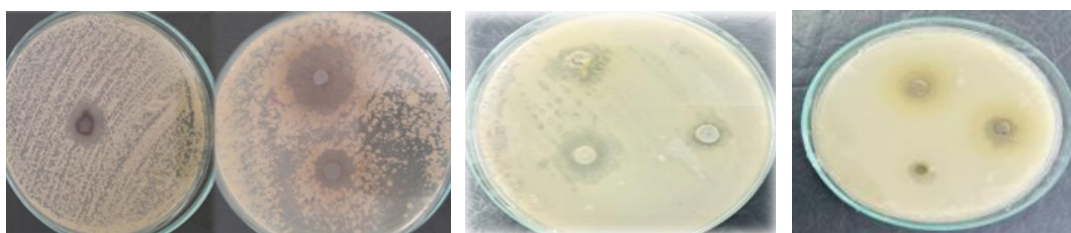
شکل ۵. طیف XRD نانوذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره برگ علف مورچه

Figure 5. XRD spectrum of iron oxide nanoparticles synthesized using *Cressa cretica* leaf extract

جدول ۱. قطر هاله مهارى نانو ذرات اكسيد آهن در رقت هاى مختلف (میلی متر)

Table 1. Diameter of the inhibition zone (mm) for iron oxide nanoparticles at various dilutions

سويه باكتري (Bacterial strain)	750 µg/ml	1500 µg/ml	3000 µg/ml
اشرشيا كلى (<i>Escherichia coli</i>)	2	5	7
استافيلوكوكوس اورئوس (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1	5	10
استرپتوكوكوس پيوژنز (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	7	10	14



شكل ۶. فعاليت آنتى باكتريال نانوذرات اكسيد آهن سنتز شده از عصاره برگ علف مورچه بر عليه اشرشياكلى (شكل راست)، استافيلوكوكوس اورئوس (شكل وسط)، استرپتوكوكوس پيوژنز (شكل سمت چپ)

Figure 6. Antibacterial activity of iron oxide nanoparticles synthesized from *Cressa cretica* leaf extract against bacterial strains *Escherichia coli* (right figure), *Staphylococcus aureus* (middle figure), *Streptococcus pyogenes* (left figure)

مربوط به تاثير اين نانوذرات بر باكتري /اشرشيا كلى ($MIC=187/5$) بود. همچنين بر اساس نتايج MBC ، بيشترين تاثير باكتري كشى مربوط به نانوذرات سنتز شده بر روى باكتري /استرپتوكوكوس پيوژنز ($MBC=150$) و پس از آن بر روى /استافيلوكوكوس اورئوس ($MBC=750$) بود.

نتيجه گيرى

در مجموع نتايج اين آزمايش قابليت سنتز نانوذرات آهن با استفاده از عصاره برگ گياه علف مورچه با داشتن شكل كروى و اندازه ذرات ۲۱ نانومتر را ثابت كرد. همچنين براساس نتايجى كه با دستگاه هاى UV-Vis، XRD، SEM و FT-IR به دست آمد، عصاره برگ گياه علف مورچه پتانسيل بالايى در توليد نانوذرات آهن با خلوص بالا داشتند. به علاوه خواص ضدباكتريايى نانوذرات آهن و عدم ايجاد مقاومت در برابر ميكروارگانيسمها، باعث شده است كه اين مواد جايگزين خوبى براى آنتى بيوتيكها به شمار روند. بارزترين ويژگى اين ذرات سميت دوگانه است بنابر اين در مقابل باكتري اثرات سمى از خود بروز مى دهند و در نقطه مقابل براى بدن زيست سازگارند. بر

تعيين حداقل غلظت بازدارى (MIC) و حداقل غلظت باكتري كشى (MBC)

نتايج مربوط به مقدار MIC و MBC بر روى باكتري هاى اشرشياكلى و استافيلوكوكوس اورئوس و استرپتوكوكوس پيوژنز در محيط كشت مايع در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. نتايج حداقل غلظت مهار كنندگى (MIC) و حداقل

غلظت كشنديگى (MBC) نانو ذرات اكسيد آهن

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of iron oxide nanoparticles

سويه باكتري (Bacterial strain)	MIC	MBC
اشرشياكلى (<i>Escherichia coli</i>)	750	1500
استافيلوكوكوس اورئوس (<i>Staphylococcus aureus</i>)	375	750
استرپتوكوكوس پيوژنز (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	187.5	375

بر اساس نتايج MIC و MBC ، نانوذرات اكسيد آهن سنتز شده، قابليت مهار رشد باكتري هاى مورد بررسى را داشتند. بر اساس نتايج MIC بيشترين تاثير مربوط به نانوذرات اكسيد آهن بر روى باكتري استرپتوكوكوس پيوژنز ($MIC=750$ mg/ml) و كمترين تاثير مهاركنندگى

روش سنتز نانوذرات ارجح تر از روش های فیزیکی و شیمیایی است. لذا نتایج این تحقیق می تواند برای ارتقا دانش در زمینه نانوتکنولوژی اثر بخش باشد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

این اساس علاوه بر مصارف دارویی گیاه علف مورچه از آن برای سنتز نانوذرات آهن و ایجاد خاصیت ضد باکتریایی می توان استفاده کرد. اگر چه بازده نانوذرات سنتز شده به روش سبز، در مقایسه با سایر روش های شیمیایی و فیزیکی کمتر است ولی به دلیل غیر سمی بودن نانوذرات سنتزی با استفاده از عصاره گیاهی، این

References

- Abid, M. A., Kadhim, D. A., & Aziz, W. J. (2022). Iron oxide nanoparticle synthesis using trigonella and tomato extracts and their antibacterial activity. *Materials Technology*, 37(8), 547-554.
- Abo-zeid, Y., & Williams, G. R. (2020). The potential anti-infective applications of metal oxide nanoparticles, A systematic review. *Wiley Interdisciplinary Reviews, Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(2), e1592.
- Al-Karagoly, H., Rhyaf, A., Naji, H., Albukhaty, S., AlMalki, F. A., Alyamani, A. A., Albaqami, J., & Aloufi, S. (2022). Green synthesis, characterization, cytotoxicity, and antimicrobial activity of iron oxide nanoparticles using *Nigella sativa* seed extract. *Green Processing and Synthesis*, 11(1), 254-265.
- Balasubramanian, S., Eyapaul, U., Bosco, A. J., & Kala, S. M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using *cressa cretica* leaf extract and its antibacterial efficacy. *International Journal of Advanced Chemical Science and Applications (IJACSA)*, 3(1), 65-71.
- Balasubramanian, S., Kala, S. M. J., Pushparaj, T. L., & Kumar, P. (2019). Biofabrication of gold nanoparticles using *Cressa cretica* leaf extract and evaluation of catalytic and antibacterial efficacy. *Nano Biomedicine and Engineering*, 11(1), 58-66.
- Barnes, R. J., Gast, C. J., Riba, O., Lehtovirta, L. E., Prosser, J. I., Dobson, P. J & Thompson, I. P. (2010). The Impact of zero-valent iron nanoparticles on a river water bacterial community. *Journal of Hazardous Materials*, 184 (1-3), 73-80.
- Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., & Truck M. (1966); Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- Boxall A. B. A., Tiede K., & Chaudhry Q. (2007). Engineered nanomaterials in soils and water, how do they behave and could they pose a risk to human health. *Nanomedicine*, 2(6), 919-27.
- Cadenas, E. & Packer, L. (1996). Handbook of antioxidants. Marcel Dekker Inc.
- Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A., & Sastry M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using aloe vera plant extract. *Biotechnology Progress*. 22(2), 577-83.
- Ebrahimi, N., Rasoul-Amini, S., Ebrahimezhad, A., Ghasemi, Y., Gholami, A., & Seradj, H. (2016). Comparative study on characteristics and cytotoxicity of bifunctional magnetic-silver nanostructures, synthesized using three different reducing agents. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*, 29(4), 326-334.
- Ebrahimezhad, A., Taghizadeh, S., Ghasemi, Y., & Berenjian, A. (2018). Green synthesized nanoclusters of ultra-small zero valent iron nanoparticles as a novel dye removing material. *Science of the Total Environment*, 621, 1527-1532.
- Elgorban AM., Al-rahmah A.N., Rushdy S., Hiraed A., Abdel-fattah Mostafa A., & Hassan A. (2016). Antimicrobial activity and green synthesis of silver nanoparticles using trichoderma virid. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(2), 299-304.
- Emrani, S., Zhiani, R., & Dafe Jafari, M. (2018). The biosynthesis of silver nanoparticles using plants of *Glycyrrhiza glabra* and *mentha piperata* and its antimicrobial effect on some bacterias that cause tooth decay. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 16 (10) ,953-968. (in Persian)
- Fan, D., Bao, C., Liu, X., Wu, D., Zhang, Y., Wang, H., Du, B., & Wei, Q. (2018). A novel label-free photoelectrochemical immunosensor based on NCQDs and Bi 2 S 3 co-sensitized hierarchical mesoporous SnO 2 microflowers for detection of NT-proBNP. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(46), 7634-7642.
- Fawzi, F., Mahdi M. F., & Abaas, I. S. (2019). Isolation of astragalin from *Cressa cretica* cultivated in Iraq. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(1), 185-90.

- Fazlzadeh, M., Tagizadeh, A., Entezari, A., & Khosravi, R. (2017). Green synthesis of ZnO nanoparticles and coating them on the activated carbon to investigate removal efficiency of hexavalent chromium. *Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 3, 7-19. (in Persian)
- Feitz, A. J., Joo, S. H., Guan, J., Sun, Q., Sedlak, D. L., & Waite, T. D. (2005). Oxidative transformation of contaminants using colloidal zero-valent iron. *Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects*, 265(1-3), 88-94.
- Ghassemi Dehkordi, N., Norouzi, M., & Safaei Aziz, A. (2012). Collection and Evaluation of the Traditional Applications of Some Plants of Jandagh. *Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine*, 3 (1), 105-112
- Groiss, S., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Vinayagam, R. (2017). Structural characterization, antibacterial and catalytic effect of iron oxide nanoparticles synthesised using the leaf extract of *Cynometra ramiflora*. *Journal of Molecular Structure*, 1128, 572-578.
- Hoag, G. E., Collins, J. B., Holcomb, J. L., Hoag, J. R., Nadagouda, M. N., & Varma, R. S. (2009). Degradation of bromothymol blue by 'greener' nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols. *Journal of Materials Chemistry*, 19(45), 8671-8677.
- Huang, L., Weng, X., Chen, Z., Megharaj, M., & Naidu, R. (2014). Green synthesis of iron nanoparticles by various tea extracts, comparative study of the reactivity. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130, 295-301.
- Huang, L., Luo, F., Chen, Z., Megharaj, M., & Naidu, R. (2015). Green synthesized conditions impacting on the reactivity of Fe NPs for the degradation of malachite green. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 154-159.
- Hussein M. A. M., Baños F. G. D., Grinholc M., Dena A. S. A., El-Sherbiny I. M., & Megahed M. (2020). Exploring the physicochemical and antimicrobial properties of gold-chitosan hybrid nanoparticles composed of varying chitosan amounts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1760-1769.
- Iconaru, S. L., Andronescu, E., Ciobanu, C. S., Prodan, A. M., Coustumer, P. L., & Predoi, D. (2012). Biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles doped dextran thin films produced by spin coating deposition solution. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 7(1).
- Iravani S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 10, 2638-2650.
- Jahangir M., & Nasernakhaei F. (2021). A review of medicinal properties of Alkali weed (*Cressa cretica* L.). *Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine*, 11 (4), 401-408. (in Persian)
- Jamzad, M., & Kamari Bidkorpeh, M. (2020). Green synthesis of iron oxide nanoparticles by the aqueous extract of *Laurus nobilis* L. leaves and evaluation of the antimicrobial activity. *Journal of nanostructure in Chemistry*, 10(3), 193-201.
- Kafayati, M. E., Raheb, J., Torabi Angazi, M., Alizadeh, Sh., & Bardania, H. (2013). The effect of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles on the growth of genetically manipulated bacterium, *pseudomonas aeruginosa* (PTSOX4). *Iranian Journal of Biotechnology*, 11(1), 41.
- Kalaiaresi, S., & Yokeswari Nithya, P. (2019). Synthesis, characterization and electrochemical behaviour of metal oxide nanoparticles from *Cressa Cretica* whole plant. *International Journal of Advanced Scientific Research and Management*, 4, 105-109.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R. K., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B., & Gurunathan, S. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 77(2), 257-262.
- Kanagasubbulakshmi, S., & Kadirvelu K. (2017). Green synthesis of Iron Oxide nanoparticles using *lagenaria siceraria* and evaluation of its antimicrobial activity. *Defence life science journal*, 2, 422-427.
- Karpagavinayagam, P., & Vedhi, C. (2019). Green synthesis of iron oxide nanoparticles using *Avicennia marina* flower extract. *Vacuum*, 160, 286-292.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2014). Biogenic synthesis of iron oxide nanoparticles for 2-arylbenzimidazole fabrication. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(4), 364-369.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., Galeas, S. and Guerrero, V. H. (2016). Phytosynthesis and photocatalytic activity of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles using the *Andean blackberry* leaf. *Materials Chemistry and Physics*, 179, 310-315.
- Lee, C., Kim, J. Y., Lee, W. I., Nelson, K. L., Yoon, J., & Sedlak, D. L. (2008). Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environmental science & technology*, 42(13), 4927-4933.

- Machado, S., Pinto, S.L., Grosso, J.P., Nouws, H.P.A., Albergaria, J.T., & Delerue-Matos, C. (2013). Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. *Science of the Total Environment*, 445, 1-8.
- Mahdavi, M., Namvar, F., Ahmad, M. B., & Mohamad, R. (2013). Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles using seaweed (*Sargassum muticum*) aqueous extract. *Molecules*, 18 (5), 5954-5964.
- Mirhosseini, M., & Firouzabadi, F. B. (2013). Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. *International Journal of Dairy Technology*, 66 (2), 291-295.
- Mishra V., Sharma R., Jasuja N. D., & Gupta D. K. (2014). A review on green synthesis of nanoparticles and evaluation of antimicrobial. *International Journal of Green and Herbal Chemistry*, 3(1), 081-094.
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. (2018). Characterization techniques for nanoparticles, comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871-12934.
- Nasrollahzadeh, M., Maham, M., Rostami-Vartooni, A., Bagherzadeh, M., & Sajadi, S. M. (2015). Barberry fruit extract assisted insitu green synthesis of Cu nanoparticles supported on a reduced graphene oxide- Fe_3O_4 nanocomposite as a magnetically separable and reusable catalyst for the O-arylation of phenols with aryl halides under ligand-free conditions. *RSC advances*, 5(79), 64769-64780.
- Prakash, N., Sivakami, S., Elamaran, M., & Ingarsal, N. (2014). Synthesis and Invitro bacterial screening of 2-amino- 4-(2-naphthyl)-6-aryl-6H-1, 3-thiazines. *International Journal of Advanced Chemical Science and Applications*, 1(2), 21-24.
- Prasad, A. S. (2016). Iron oxide nanoparticles synthesized by controlled bio-precipitation using leaf extract of Garlic Vine (*Mansoa alliacea*). *Materials Science in Semiconductor Processing*, 53, 79-83.
- Priyashree, S., Jha, S., & Pattanayak, S. P. (2010). A review on *Cressa cretica* Linn., A halophytic plant. *Pharmacognosy Reviews*. Jul; 4(8), 161-166.
- Rajendran, K., Karunakaran, V., Mahanty, B., & Sen, S. (2015). Biosynthesis of hematite nanoparticles and its cytotoxic effect on HepG2 cancer cells. *International journal of biological macromolecules*, 74, 376-381.
- Rehana, D., Mahendiran, D., Kumar, R. S., & Rahiman, A. K. (2017). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of copper oxide nanoparticles synthesized using medicinally important plant extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 1067-1077.
- Rios, J. L., Recio, M. C., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity, a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2-3), 127-149.
- Salari, N., Karimi Maleh, H., & Asadi, M. (2019). Biosynthesis of gold nanoparticles by extract of aerial organs of Cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)*, 32(3), 280-291. (in Persian)
- Saad, W. M., Al-Janaby, M. S., Gayadh, E. W., Ramizy, A., & Hamid, L. L. (2024). Biogenic synthesis of iron oxide nanoparticles using *Hibiscus sabdariffa* extract, Potential for antibiotic development and antibacterial activity against multidrug-resistant bacteria. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 8, 100397.
- Sari, I. P., & Yulizar, Y. (2017). Green synthesis of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles using Graptophyllum pictum leaf aqueous extract. 2nd International Conference on Mining, Material and Metallurgical Engineering. 2017, April. IOP Publishing. 191(1), 1-5.
- Sayadi, M. H., Siami, M., Esmailpour, M., & Hajiani, M. (2017). The efficiency of biosynthesis silica nanoparticles at removal of heavy metals Cr and Cu from aqueous solutions. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 24 (1), 36-49. (in Persian)
- Sellmyer. (2005). Advanced Magnetic Nanostructures. Springer.
- Senthil, M., & Ramesh, C. (2012). Biogenic synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles using tridax procumbens leaf extract and its antibacterial activity on pseudomonas aeruginosa. Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB), 7(4).
- Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H., & Nohi, A. A. (2007). Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria, a novel biological approach. *Process Biochemistry*, 42, 919-923.
- Sunita, P., Jha, S., Pattanayak, S. P., & Mishra, S.K. (2012). Antimicrobial activity of a halophytic plant *Cressa cretica* L. *Journal of Scientific Research*, 4(1), 203-212.
- Taghva, A., & Entezari, M. (2017). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of Saffron corm and evaluation of their antibacterial and mutagenesis activity. *Journal of Police Medicine*, 6(1), 57-66. (in Persian)

- Taheri, R., Poor Seyedi, Sh., & Lohrasbi nejhad, A. (2017). Green synthesis of Fe_3O_4 magnetic iron oxide nanoparticles using the leaf extract of *Melissa officinalis* L. Second National Conference on Nanostructures, Science and Nanotechnology, 25 February 2016. Islamic Azad University, Kashan branch. Kashan, Iran. (in Persian)
- Taufik, A., & Saleh, R. (2017). Organic dyes removal using magnetic Fe_3O_4 -nanographene platelets composite materials. *Physica B, Condensed Matter*, 526, 166-171.
- Tavosi, F., Ghafarzadegan, R., Mirshokraei, S., & Hajiaghaee, R. (2018). Green synthesis of iron nano particles using *Mentha longifolia* L. Extract. *Journal of Medicinal Plants*, 2(66), 135-44. (in Persian)
- Thirunavukkarasu, P., Ramanathan, T., Manigandan, V., Dinesh, P., Vasanthkumar, A., & Kathiresan, K. (2000). Antimicrobial effect of costal sand dune plant of *Cressa cretica*. *Diamond*, 9(4), 355-363.
- torabi zarchi, M., & Mirhosseini, M. (2017). Investigation of Combination Effect of Magnesium Oxide and Iron Oxide Nanoparticles on the Growth And Morphology of the Bacteria *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* in Juice. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 24(11), 924-937.
- Venkateswarlu, S., Kumar, B. N., Prathima, B., SubbaRao, Y., & Jyothi, N.V.V. (2019). A novel green synthesis of Fe_3O_4 magnetic nanorods using *Punica Granatum* rind extract and its application for removal of Pb (II) from aqueous environment. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(4), 588-596.
- Wang, T., Jin, X., Chen, Z., Megharaj, M., & Naidu, R. (2014). Green synthesis of Fe nanoparticles using eucalyptus leaf extracts for treatment of eutrophic wastewater. *Science of the total environment*, 466, 210-213.
- Weng, X., Huang, L., Chen, Z., Megharaj, M., & Naidu, R. (2013). Synthesis of iron-based nanoparticles by green tea extract and their degradation of malachite. *Industrial Crops and Products*, 51, 342-347.
- Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles, synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale research letters*, 3(11), 397-415.

Risk Assessment of Genetically Modified Products: Examining Micro and Macro Perspectives

Farideh Ghavipankeh¹, Behruz Zarei^{2*} , Jalal Rostamzadeh³, Javad Karimi⁴ 

1. Associate Professor, Department of Environment, Materials and Energy Research Institute, Tehran, Iran.

2. Associate Professor, Faculty of Entrepreneurship, University of Tehran, Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran.

4. Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Shiraz, Shiraz, Iran.

Correspondence:

Behruz Zarei, Javad Karimi

Email:

bzarei@ut.ac.ir

javadkarimi@shirazu.ac.ir

Received: 7/Nov/2024

Accepted: 5/Aug/2025

How to cite:

Ghavipankeh, F., Zarei, B., Rostamzadeh, J., & Karimi, J. (2025). Risk Assessment of Genetically Modified Products: Examining Micro and Macro Perspectives. *Crop Biotechnology*, 14(4), 83-98.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72719.1987](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72719.1987))

ABSTRACT

In recent years, the extensive use of genetically modified products derived from genetic engineering technology has raised significant concerns regarding their biosafety, particularly in relation to food, human health, and the environment. This article aims to highlight the necessity of establishing a comprehensive risk assessment system at the macro level for genetically modified products, clarify the mechanisms underlying their potential risks, introduce various risk assessment approaches, and examine the essential tools required for designing such a system using large-scale system design methodologies. Given the complexity of this design process—which must account for artifacts, individuals, tools, processes, organizations, and the broader environment—the research adopts a qualitative, design-based methodology. This study explores three critical stages: identifying potential risks, elucidating the mechanisms of risk emergence, and designing appropriate assessment methods for genetically modified products. Based on these analyses, an integrated risk assessment framework that incorporates both micro- and macro-level perspectives is proposed. Ultimately, the establishment of robust evaluation and regulatory systems for genetically modified products, along with periodic reviews to ensure continuous improvement, must be prioritized in parallel with advancements in the scientific production and commercialization of these products.

KEYWORDS

Risk Assessment, Biosafety, Health Policy-Making, Genetically Modified Products, Integrated Health System.



«مقاله مروری»

ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته: بررسی دیدگاه‌های خرد و کلان

فریده قوی‌پنجه^۱، بهروز زارعی^{۲*}، جلال رستم‌زاده^۳، جواد کریمی^۴

چکیده

در سال‌های اخیر، به‌خاطر مصارف بالای محصولات تراریخته‌ی حاصل از فناوری ژنتیکی، مسائل ایمنی زیستی آن‌ها به دلیل ارتباط با غذا و سلامت انسان و محیط زیست، مورد توجه جدی‌تر قرار گرفته است. هدف این مقاله بررسی ضرورت تدوین سیستم ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته در سطح کلان، تبیین فرآیند ایجاد مخاطرات محصولات تراریخته، معرفی رویکردهای مختلف برای ارزیابی مخاطرات این محصولات و بررسی ابزارهای لازم برای طراحی این سیستم با بهره‌گیری از روش‌های طراحی سیستم‌های بزرگ مقیاس است. به‌دلیل پیچیده بودن فعالیت طراحی که بایستی ملاحظات مربوط به مصنوعات، افراد، ابزارها، فرآیندها، سازمان‌ها، و محیطی که در آن واقع رخ می‌دهد، مورد توجه قرار گیرد، روش کار این تحقیق، کیفی و بر مبنای روش تحقیق مبتنی بر طراحی است. در این تحقیق، بررسی‌های لازم درخصوص سه مرحله شناسایی مخاطرات، تبیین سازوکارهای ایجاد مخاطرات و در نهایت طراحی و تبیین روش‌های ارزیابی محصولات تراریخته مورد بحث قرار گرفت و بر این اساس، رویکرد یکپارچه ارزیابی مخاطرات متشکل از سطوح خرد و کلان معرفی گردید. در نهایت ایجاد سیستم‌های ارزیابی و نظارتی محصولات تراریخته و بازنگری‌های دوره‌ای آن، به‌منظور بهبود مستمر، بایستی هم‌تراز با موضوعات علمی تولید و فروش این محصولات مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

ارزیابی مخاطرات، ایمنی زیستی، سیاست‌گذاری سلامت، محصولات تراریخته، نظام یکپارچه سلامت.

۱. دانشیار، گروه محیط زیست، پژوهشگاه مواد و انرژی، تهران، ایران.
۲. دانشیار، دانشکده کارآفرینی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. استادیار ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران.
۴. استادیار زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

نویسنده مسئول:

بهروز زارعی و جواد کریمی

رایانامه:

bzarei@ut.ac.ir
javadkarimi@shirazu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۴

استناد به این مقاله:

قوی‌پنجه، فریده؛ زارعی، بهروز، رستم‌زاده، جلال و کریمی، جواد (۱۴۰۴). ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته: بررسی دیدگاه‌های خرد و کلان، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۸۳-۹۸.
(DOI: [10.30473/cb.2025.72719.1987](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72719.1987))



مقدمه

محصولات تراریخته که اصطلاحاً (Genetic Modified Organism) نامیده می‌شوند به محصولاتی گفته می‌شود که DNA آن‌ها با روش‌های مهندسی ژنتیک تغییر یافته است. هدف از این تغییرات در مواردی، افزودن صفاتی به محصول است که به طور طبیعی در آن وجود ندارد. این صفات می‌تواند مقاومت به آفات خاص، بیماری‌ها، شرایط محیطی، ماندگاری بیشتر، مقاومت به مواد شیمیایی و بهبود ارزش تغذیه‌ای محصول باشد که از طریق وارد کردن ژن‌های مربوط به آن صفات به گیاه، حیوان یا ریزسازواره اعمال می‌شود. همچنین امکان تولید انبوه محصول با روش‌هایی نظیر دست‌ورزی ژنتیکی در مسیرهای بیوسنتزی از دیگر تغییرات اعمال شده است (Hemmer, 1997). چنانچه محصولات GM در یک محیط فیزیولوژیکی متفاوت از محیط فیزیولوژیکی اصلی و یا در مقادیر یا زمان‌های متفاوتی تولید شوند می‌توانند مخاطره‌آمیز باشند. حتی در استفاده کنترل‌شده از این محصولات، به‌منظور جلوگیری از آثار معکوس آن‌ها، بایستی ژن‌های حامل GMO که از انسان یا حیوان به محیط جدید منتقل می‌شوند، تحت نظر قرار گرفته تا از مخاطرات احتمالی جلوگیری شود (Bain & Dandachi, 2014).

از مهم‌ترین الزامات به کارگیری فناوری‌های نوین، پایش مخاطرات حاصل از آن‌هاست. مخاطره، یک حادثه ممکن یا شرایطی است که می‌تواند اثر منفی بر کارکرد تعریف شده یک سیستم داشته باشد. مدیریت مخاطرات عبارت است از شناسایی، ارزیابی و اولویت‌بندی مخاطرات و اتخاذ مجموعه اقداماتی برای کنترل آثار منفی احتمالی و استفاده حداکثری از فرصت‌های ایجاد شده با به‌کارگیری منطقی منابع در دسترس (Iso, 2009). ارزیابی مخاطرات به‌عنوان یکی از زیرسیستم‌های مدیریت مخاطرات عبارت است از فرآیند شناسایی و تحلیل مخاطرات بالقوه‌ای که می‌تواند بر افراد، دارایی‌ها، یا محیط تأثیر گذارد (Rausand, 2013). محصولات تراریخته به دلیل احتمال انتقال ژن‌ها، می‌توانند مخاطراتی را ایجاد نمایند. بر اساس مقررات سازمان‌های بین‌المللی نظیر FAO و WHO ارزیابی مخاطرات قبل از

رهاسازی محصولات تراریخته لازم و ضروری است. این مخاطرات در دو گروه مخاطرات بهداشتی مربوط به سلامت انسان، و مخاطرات زیست محیطی قابل دسته‌بندی است. شناسایی و ارزیابی هر دسته از این مخاطرات به دلیل تنوع و وسعت آن‌ها با چالش‌های زیادی همراه است. هنگامی که در حدود سه دهه پیش چارچوب نظارتی برای محصولات GMO توسعه یافت، رویکرد ارزیابی مخاطره مورد به مورد ایجاد شد، که امکان ارزیابی ساده پس از کسب تجربه کافی در مورد یک محصول یا ویژگی خاص را فراهم می‌کرد. اما این روش در عمل، چندان مفید واقع نشد و علی‌رغم جزئی‌تر شدن دستورالعمل‌ها و سختگیرانه‌تر شدن قوانین در سال‌های اخیر، به اقدامات اجرایی منجر نگردید (Eriksson, 2018; Eriksson et al., 2020). در مقررات (EU) شماره ۲۰۱۳/۵۰۳، انجام مطالعات ۹۰ روزه تغذیه اجباری با غذا/خوراک برای پرونده‌های GMO افزوده شد، اما ارزش علمی چنین مطالعاتی به دلیل عدم وجود فرضیات هدفمند، بسیار اندک است، همان‌طور که در تعداد قابل توجهی از مطالعات سمیت مزمن با غذا/خوراک تراریخته نشان داده شد (Steinberg et al., 2019). از این رو فرآیند ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته نیازمند اصلاح است.

در این مقاله، شناسایی و تحلیل مخاطرات محصولات تراریخته در دو سطح، تفکیک شده است. یکی در سطح خرد، که مبتنی بر رویکرد مقایسه‌ای و داده‌های بالینی بوده و از روی آن می‌توان سرنخ‌هایی پیدا کرد که چه محصولات ژنی می‌توانند بالقوه خطرناک باشند. این سطح از تحلیل با وجودی که برای متخصصین این حوزه بسیار ارزشمند است، اما برای سیاست‌گذاران و مدیران ارشد به‌تنهایی قابل استفاده نیست. توجه به سیستم‌های پیچیده‌ای نظیر اکوسیستم، سیستم‌های مدیریت بحران، سیستم‌های پولی-بازنکی، سیستم‌های دفاعی در سطح ملی و سیستم‌های مرتبط با انرژی که از روش‌های مدیریت مخاطرات برای تصمیمات استراتژیک خود استفاده کرده‌اند، به ما خاطر نشان می‌سازد که زاویه دید دومی به نام مدیریت

می‌باشد (The official newspaper of the Islamic Republic of Iran)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی: ملاک پذیرش و صدور مجوز ورود برای محصولات تراریخته، صرفاً بررسی تاریخچه مطالعات ارزیابی خطر و نتایج حاصل از آن‌ها در کشورهای اروپایی می‌باشد و این وزارتخانه، آزمایشات مستقل و معتبر ارزیابی خطر مبتنی بر آزمایشات بالینی، ایمونولوژی، متابولیسم، غدد و غیره در داخل کشور انجام نداده است. این وزارتخانه تنها با اتکا به مدارک اظهار شده واردکنندگان و فقط تأیید مصرف برخی محصولات تراریخته در اتحادیه اروپا، بدون راستی‌آزمایی مدارک اظهار شده توسط واردکنندگان و صرف نظر از انجام آزمایشات میان‌مدت و طولانی مدت ارزیابی مخاطرات احتمالی محصولات تراریخته در داخل کشور، اقدام به تأیید سلامت محصولات تراریخته نموده است.

سازمان حفاظت محیط زیست: سازمان حفاظت محیط زیست هیچ مستندی در تأیید ادعای این سازمان مبنی بر عدم تأثیر سوء گیاهان تراریخته و به طور اخص برنج تراریخته بر روی محیط زیست ارائه ننموده و معلوم نیست تأیید گیاهان تراریخته بر اساس کدام ارزیابی‌های خطر ارائه شده است؟ این سازمان در حیطه پایش، سنجش و ارزیابی خطرهای محیط زیستی محصولات تراریخته و مدیریت خطرات احتمالی آن‌ها، در کلیه مراحل تولید، رهاسازی، مصرف و پس از مصرف و تأثیرات درازمدت آن، هیچ آزمایش و راستی‌آزمایی مستقلی انجام نداده و با اعتماد محض به اظهارات و مدارک متقاضیان، از خود سلب مسئولیت نموده است. همچنین هیچ مستندی از جانب این سازمان در خصوص گزارش دوره‌های پایش‌های زیست محیطی بعد از رهاسازی برنج تراریخته، ارائه نشده است.

وزارت جهاد کشاورزی: در حال حاضر هیچ گونه رقم تراریخته‌ای به صورت رسمی در کشور معرفی و تولید نمی‌شود. با این حال در مواردی کشت میدانی محصولات (برنج و پنبه تراریخته) بدون رعایت استانداردهای بین‌المللی و الزامات ابلاغی وزارت جهاد کشاورزی، صورت گرفته است.

مخاطرات در سطح کلان وجود دارد و دارای متدلوژی‌های متفاوتی است. به عبارت دیگر، طراحی فرآیند ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته و انجام آن، تنها در سطح کلان میسر بوده که با ملاحظات اقتصادی، اجتماعی، فرهنگی و سیاسی کشور گره می‌خورد. این مقاله در صدد معرفی ابزار ارزیابی مخاطرات به‌عنوان یکی از حلقه‌های اصلی تشکیل‌دهنده نظام تصمیم‌گیری مربوط به این حوزه برای بخش خصوصی و دولتی می‌باشد. از آنجایی که این زمینه تخصصی در خارج از هسته علم بیوتکنولوژی قرار گرفته است، به اندازه کافی محتوای علمی در درون کشور در مورد آن تدوین نشده است و این ضعف، منجر به اتخاذ موضع‌گیری‌هایی توسط بازیگران در این زمینه گردیده است که معمولاً بر مبنای اصول علمی بنا نشده است.

سیاست‌های داخلی کشور

طبق قانون ملی ایمنی زیستی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی مسئول ارزیابی مخاطرات بهداشتی محصولات تراریخته، سازمان حفاظت محیط زیست مسئول ارزیابی مخاطرات زیست محیطی و وزارت جهاد کشاورزی مسئولیت حفاظت از ذخائر ژنتیکی و بانک ژن در محدوده کلیه امور مربوط به کشاورزی، باغبانی، جنگل، مرتع، بیابان، شیلات، دام، طیور و زنبورداری و خوراک دام و طیور و بیماری‌های مرتبط با این موارد را برعهده دارد (Abdollahi et al., 2011; Shooshtari et al., 2024). آخرین وضعیت از فعالیت نهادهای توسط کمیسیون اصل ۹۰ مجلس شورای اسلامی گردآوری و در تاریخ ۶ خرداد ماه ۱۴۰۰ در صحن مجلس ارائه گردید. این کمیسیون از سال ۱۳۹۳، با انجام مکاتبه و برگزاری جلسات متعدد به ویژه در سال ۱۳۹۹، اقدام به جمع‌آوری اظهارات دانشمندان، صاحب‌نظران، نمایندگان وزارتخانه‌ها و کمیسیون‌های مرتبط در مجلس شورای اسلامی نمود. نتیجه بررسی‌های کمیسیون در خصوص اقدامات ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته این نهادها، با توجه به تحقیقات انجام شده و اسناد و مدارک مکتوب واصله از نهادهای فوق‌الذکر به شرح ذیل

علمی ارزیابی مخاطرات نظیر تئوری حوادث نرمال، SSM (Soft System Methodology) و (System of Systems) SoS استفاده می‌کند.

مراحل کلاسیک ارزیابی مخاطرات

ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته نیازمند سه مرحله؛ شناسایی مخاطرات، تبیین سازوکارهای ایجاد مخاطرات و در نهایت طراحی و تبیین روش‌های ارزیابی آن‌هاست.

مرحله اول: شناسایی مخاطرات

در عمل، شناسایی محصولات تراریخته خطرناک دشوار است و به همین دلیل، قانون‌گذاران نتوانسته‌اند محصولات تراریخته را در دو دسته خطرناک و غیر خطرناک گروه‌بندی کنند. دستورالعمل‌های موسسه ملی بهداشت آمریکا (NIH: National Institutes of Health) که مبنای مقررات GMO در بسیاری از کشورهاست، محصول ژنتیکی خطرناک را تعریف نمی‌کند و تنها مشخص می‌نماید که منظور از خطرناک، پتانسیل ایجاد بیماری است. همچنین در کتاب آبی سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD: Organization for Economic Cooperation and Development) که مبنای روش‌های علمی ارزیابی مخاطرات GMO می‌باشد، مخاطرات GMO بر اساس پیش‌بینی‌های مبتنی بر خبره‌گی تعریف می‌شود، بر خلاف تعریف مخاطرات در سایر زمینه‌های علمی که معمولاً بر مبنای حوادث واقعی رخ داده است (Safety & Biotechnology, 1986). این کتاب همچنین تأکید می‌نماید که مخاطرات احتمالی استفاده از موجوداتی با DNA نو ترکیب مشابه سایر عوامل زیستی است و آن‌ها را به صورت زیر برشمرده است:

- ۱- مخاطرات عفونی، با احتمال ایجاد بیماری در انسان، حیوان و گیاهان پس از در معرض قرار گرفتن؛
- ۲- اثرات سمیت، آلرژیکی، یا دیگر اثرات بیولوژیکی بر موجودات، سلول‌ها، اجزاء آن‌ها، یا محصولات متابولیکی طبیعی؛

با توجه به موارد مطروحه، اصلاح قانون ایمنی زیستی با رویکرد رعایت اصل احتیاط‌آمیز و حفظ منافع ملی و حقوق مصرف‌کنندگان، از اولویت‌های مجلس شورای اسلامی برشمرده شده است.

روش کار

روش‌شناسی این تحقیق، کیفی بوده و بر مبنای روش تحقیق مبتنی بر طراحی (Design Research (DRM Methodology می‌باشد. در روش DRM، مرور ادبیات دانش فعلی مرتبط صورت می‌گیرد. در این تحقیق، بدنه دانش مرتبط در سطح آزمایشگاهی با بدنه دانش طراحی سطح سیستم‌های کلان مورد بررسی قرار گرفته است. این مرور در برگیرنده مبانی نظری تحقیق بوده، سطح تازگی مطلب را مشخص کرده، ارتباط تحقیق انجام شده با موضوع ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته را توضیح داده و در روشن کردن و پایش سوالات تحقیق و فرضیاتی که برای طراحی این سیستم مورد نیاز است، کمک می‌نماید. مرور پژوهش‌ها در این روش تحقیق در تعیین تمرکز تحقیق الهام بخش می‌باشد. همچنین در تعیین خلأهای دانش در این زمینه مفید واقع می‌گردد. این روش به دلیل آن‌که بر مبنای ترکیب موضوعات علمی و اجرایی است، روش مناسبی برای طراحی نظام مخاطرات محصولات تراریخته محسوب می‌شود.

نتایج

در این بخش، دانش موجود پیرامون مراحل ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته شامل روش‌های شناسایی مخاطرات، سازوکارهای ایجاد مخاطرات و روش‌های ارزیابی مخاطرات توضیح داده شده است. سپس روش‌های ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته در دو دسته؛ روش‌های کلاسیک و خرد نگر و روش‌های کلان‌نگر تفکیک و مورد بررسی قرار گرفته است. منظور از روش کلاسیک و خرد نگر بررسی موردی مخاطرات محصولات گوناگون توسط محققین و متخصصین در نقاط مختلف دنیاست. درحالی که روش کلان نگر از مطالعات موردی صرف نظر کرده و از ابزارها و روش‌های

باعث برهم‌زدن زیستگاه‌های جانوران و فلور طبیعی مزارع شود (Tsatsakis et al., 2017).

مرحله دوم: شناسایی سازوکارهای ایجاد مخاطرات
هر گونه فرآیند ارزیابی مخاطره نیازمند شناسایی سازوکارهای ایجاد مخاطره است. مخاطرات مرتبط با محصولات GM از طریق سازوکارهای مختلف در مراحل اولیه آزمایش، تولید و مصرف این محصولات ایجاد می‌شوند. هر چند، در بسیاری از محصولات GM که از طریق ناقل‌های ویروسی ایجاد می‌شوند، از ناقل‌های ایمن استفاده می‌شود. این ناقل‌ها به دو دسته؛ آدنو ویروسی و لنتی ویروس تقسیم می‌شوند. در مورد ناقل‌های آدنو ویروسی، فرآیند تکثیر ناقل با حذف یک تا تعدادی از ژن‌ها، معیوب می‌شود. بدین معنی که سیستم تولید مثل ناقل طوری طراحی می‌شود که تنها اجزای ناقل ویروسی (و نه ویروس کامل گونه وحشی آن)، تکثیر شود. به همین ترتیب، سیستم تولید مثل ناقل‌های لنتی ویروسی طوری ساخته شده که احتمال تولید مثل زیاد آن اندک است. از نقطه نظر ایمنی زیستی، یک اختلاف اساسی بین ناقل‌های ذکر شده وجود دارد. آلودگی تصادفی با آدنو ویروس‌های معیوب تنها منجر به بیان موقتی ترانس ژن‌های ناقل ویروسی در سلول می‌شود. به طوری که سلول‌های آلوده به ناقل سرانجام به وسیله سیستم ایمنی حذف می‌شوند، ولی در آلودگی تصادفی سلول به ناقل لنتی ویروس، ناقل ممکن است در ژنوم سلول آلوده ادغام شود که منجر به بیان دائمی ترانس ژن‌های ناقل ویروسی در سلول می‌شود (Bergmans et al., 2008).

خطر بالقوه محصول ژنتیکی، بستگی به عملکرد ژن منتقل شده در سلول دارد. این ژن ممکن است مشابه ژن‌هایی باشد که قبلاً در سلول وجود داشته یا ژن جهش یافته‌ای باشد که فیزیولوژی سلول را تحت تأثیر قرار دهد. اگر بیش از یک ژن منتقل شود، اوضاع پیچیده‌تر می‌گردد و ممکن است منجر به اثرات غیرمنتظره شود، خصوصاً اگر آلودگی زیاد باشد. با این حال در مورد ناقل‌های ویروسی که حامل تنها یک ژن جای‌گذاری شده نیز هستند، نتایج غیر منتظره‌ای مشاهده شده است. مثالی از این حالت

۳- اثرات سمیت، آلرژیکی، یا دیگر اثرات بیولوژیکی بر محصولات سنتز شده توسط موجودات؛

۴- اثرات بر روی کشاورزی و محیط زیست.

در دستورالعمل 2001/18/EC اتحادیه اروپا، در تبیین مفهوم اثر بالقوه خطرناک از عبارات زیر استفاده شده است (Fernandez Rios et al., 2018):

۱- اثراتی که ممکن است ایجاد بیماری کنند.

۲- پیشگیری یا درمان را ناکارآمد کنند.

۳- استقرار یا پخش در محیط زیست را افزایش دهند، به طوری که اثرات نامطلوب بر موجودات یا محیط طبیعی موجود بگذارند یا اثرات نامطلوب ناشی از انتقال ژن به سایر موجودات را تسهیل نماید.

دستورالعمل دیگری در خصوص ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته در سال ۲۰۰۴ تصویب و در سال‌های ۲۰۰۸، ۲۰۱۱، ۲۰۱۳ و ۲۰۱۸ با تغییرات اندک بازنگری گردید. این امر نشان می‌دهد که روند ارزیابی مخاطرات GMO در اتحادیه اروپا به طور چشم‌گیری ثابت است تا جایی که برای مواجهه با پیشرفت‌های فنی و علمی بسیار دشوار شده است (Casacuberta & Puigdomenech, 2018).

در سال‌های اخیر، ارزیابی اثرات محصولات تراریخته بر محیط زیست به عنوان یکی از اجزای اصلی توسعه این محصولات محسوب می‌شود. چرا که ورود GMOهای غیر بومی به اکوسیستم، بالقوه می‌تواند مخاطرات بلندمدت زیست محیطی ایجاد نماید که پیش‌بینی عواقب آن بسیار دشوار است. به طور کلی، مخاطرات زیست محیطی محصولات تراریخته را می‌توان به دو دسته؛ اثرات مستقیم و اثرات غیر مستقیم تقسیم کرد. اثرات مستقیم شامل جریان ژن، ایجاد ویژگی جدید در گونه‌های غیر هدف و حیات وحش، تهاجمی شدن، علف هرز شدن و نوترکیب شدن ژنتیکی DNA آزاد در محیط زیست می‌باشد. اثرات غیر مستقیم شامل اثرات مضر و جانبی بر خاک، آب، تنوع زیستی حیات وحش و کاهش کارایی سموم علف‌های هرز، حشرات، و آفات می‌باشد. میزان مخاطره بستگی به ماهیت تغییر در شیوه‌های کشاورزی دارد و می‌تواند

سیس در مراحل بعدی ارزیابی می‌شوند. بنابراین در فرآیند ارزیابی مخاطرات، ایمنی گیاهان تراریخته به صورت مطلق دنبال نمی‌شود، بلکه نسبت به محصولی که به صورت گسترده مصرف شده و ایمن تلقی می‌شود، مقایسه می‌شود (Martinez-Ribaya & Areal, 2020). از منظر گسترده‌تر، یک گیاه از نظر ژنتیکی اصلاح می‌شود تا تغییری ایجاد کند که در وضعیت فعلی آن وجود ندارد. با این حال، ممکن است در سیستم‌های بیولوژیکی پیچیده مانند گیاهان اثراتی که هدف اصلاح ژنتیکی نبوده، اتفاق بیفتد. این که تا چه حد می‌توان این اثرات ناخواسته را پیش‌بینی کرد، به شدت به میزان شناخت از صفت بیان شده بستگی دارد (Organisms, 2010).

ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته دارای مولفه‌های گوناگونی است. این مولفه‌ها عبارتند از بررسی والدین گیاه دهنده/تراریخته، فرآیند رهاسازی، مشخصات تولیدات ژنی و ارزیابی مخاطره گیاه/غذا. از مطالبی که در بخش قبل توضیح داده شد، می‌توان استنباط نمود که مخاطرات بالقوه محصولات تغییر ژن یافته بیشتر از روی حدس و گمان متخصصین امر و شواهد پراکنده است که البته برای شروع بحث خوب است ولی برای رسیدن به این که کدام محصول ژنی خطرناک است و کدام نیست، داده‌های تجربی منسجم مورد نیاز است. برای انجام این کار باید مجموعه وسیعی از داده‌های مرتبط با مقالات علمی مورد بررسی قرار گیرد. این منابع باید از سخت‌گیری کافی در پذیرش و چاپ برخوردار باشند. پایگاه داده (Online Mendelian OMIM: Inheritance in Man) که توسط دانشگاه جان هاپکینز تهیه شده مجموعه‌ای از اطلاعات مرتبط با محصولات ژنی انسانی و اختلالات آن‌ها را گردآوری کرده است. در این پایگاه می‌توان برای هر محصول ژنی و اختلالات مربوطه، نکات علمی، منابع، لینک به پایگاه مقالات MEDLINE و ارتباط آن با دیگر موضوعات مرتبط را مشاهده نمود. بایستی با داده‌کاوی و تحلیل این داده‌ها، مشخص شود که چه محصولات ژنی انسانی در اندازه و شکل غیر طبیعی، می‌توانند بالقوه مخاطره‌آمیز باشند. در جدول (۱) برخی نرم افزارها و پایگاه‌های ارزیابی محصولات تراریخته توضیح داده شده است.

ناقل Ectromelia حامل ژن IL-4 است که سبب ایجاد اثرات بسیار شدید در موش شد (Jackson *et al.*, 2001). در نتیجه این مشاهدات (Health and Safety Executive) HSE در کشور انگلستان در سال ۲۰۰۲ دستورالعمل‌هایی را برای ارزیابی مخاطرات ناقل‌های ویروسی GMO که می‌توانند پاسخ سیستم ایمنی سلول را تغییر دهند، منتشر کرد و خواستار توجه ویژه به مواردی شد که تغییر ژنتیکی می‌تواند سیستم دفاعی میزبان را تحت تأثیر قرار دهد (Bergmans *et al.*, 2008). محیط ژن که تعیین کننده سطح بیان آن است، از مواردی که مورد دیگر با توجه به شرایط آزمایش متفاوت است. در بسیاری از موارد ژن منتقل شده تحت تأثیر پرموتری است که در همه یا اکثر سلول‌ها و بافت‌ها فعال است، همانند پرموتر سیتومگالوویروس (CMV: Cytomegalovirus) که بسیار رایج و سطح بیان و محصول ژنی آن بالاست. این سطح بیان ممکن است بیشتر از سطح بیان ژن در شرایط معمول فیزیولوژیکی باشد و انحراف قابل ملاحظه‌ای از الگوی معمول داشته باشد (Bergmans *et al.*, 2008). این موضوع ممکن است به یک نوع سلول یا بافت محدود باشد. اگر الگوی بیان دارای اثرات معکوس باشد می‌تواند این اثرات با استفاده از پرموترهای شرطی کاهش یابد. محصول ژنی پس از ساخته شدن، ممکن است فوراً فعال نشود و برای فعال شدن به تغییرات بعدی همانند گلیکوزیلاسیون، استیلاسیون، فسفوریلاسیون، انتقال پروتئین از طریق اندوسیتوز یا اگزوسیتوز و فراوری پروتئولیتیک نیاز داشته باشد (Chamberlain & Shipston, 2015).

مرحله سوم: طراحی و تبیین روش‌های ارزیابی

رکن اصلی ارزیابی مخاطرات در اتحادیه اروپا، رویکرد مقایسه‌ای است که بر اساس آن، ایمنی یک محصول GM با مقایسه با یک محصول غیر GM که می‌تواند ایمن تلقی شود، تعیین می‌گردد. اگر بتوان ثابت کرد که این دو محصول دارای خصوصیات مشابهی هستند، محصول GM را می‌توان به همان اندازه محصول غیر GM، ایمن در نظر گرفت. اگر تغییراتی مشاهده شود، این تغییرات به عنوان شاخص‌هایی از اثرات بالقوه در نظر گرفته می‌شوند که

جدول ۱. نرم‌افزارها و پایگاه‌های داده برای ارزیابی محصولات تراریخته

Table 1. Software and databases for the assessment of genetically modified products

نام نرم‌افزار/پایگاه داده	توضیحات	هدف اصل
GMOD (Genetically Modified Organism Database)	یک پایگاه داده آنلاین که اطلاعاتی درباره انواع محصولات تراریخته و آزمایش‌های مرتبط با آن‌ها را جمع‌آوری می‌کند.	ارزیابی ویژگی‌ها و اطلاعات محصولات تراریخته در ارتباط با امنیت زیست‌محیطی و سلامت
پایگاه داده سموم	یک پایگاه داده که اطلاعات مربوط به سموم تولیدشده توسط موجودات تراریخته را شامل می‌شود.	ارزیابی خطرات بالقوه، به‌ویژه در رابطه با تولید سموم در محصولات تراریخته
PhytoPath	نرم‌افزاری برای ارزیابی و شبیه‌سازی خطرات مرتبط با گیاهان تراریخته و تأثیرات آن‌ها بر روی اکوسیستم‌های زیستی	شبیه‌سازی تأثیرات زیست‌محیطی محصولات تراریخته بر گیاهان و اکوسیستم‌ها
نرم‌افزار ارزیابی خطر سموم GMO	نرم‌افزاری برای ارزیابی خطرات ناشی از تولید سموم در محصولات تراریخته، با تأکید بر ایمنی زیست‌محیطی و سلامت انسان	ارزیابی ایمنی محصولات تراریخته و تأثیر سموم آن‌ها بر سلامت و محیط زیست
مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI)	یک پایگاه داده علمی معتبر که شامل اطلاعات ژنتیکی و بیولوژیکی مربوط به محصولات تراریخته است.	تحلیل ژنتیکی و ارزیابی توالی‌های ژنتیکی در محصولات تراریخته.
FAO/WHO Codex Alimentarius	استاندارد بین‌المللی برای ارزیابی ایمنی غذاهای تراریخته و تولید محصولات غذایی آن‌ها	ارزیابی ایمنی غذاهای تراریخته با استفاده از دستورالعمل‌های بین‌المللی
OECD (سازمان همکاری و توسعه اقتصادی)	مجموعه‌ای از دستورالعمل‌ها و منابع علمی برای ارزیابی مخاطرات GMO در سطح جهانی	ارزیابی خطرات زیست‌محیطی و بهداشتی استفاده از محصولات تراریخته بر اساس استانداردهای جهانی
Biosafety Clearing-House (BCH)	یک پایگاه داده آنلاین که توسط کنوانسیون تنوع زیستی (CBD) مدیریت می‌شود و اطلاعاتی درباره ارزیابی مخاطرات و ریسک‌های مرتبط با محصولات تراریخته فراهم می‌کند.	ارزیابی خطرات و ریسک‌های زیست‌محیطی و بهداشتی مرتبط با GMOها در کشورهای مختلف
ارزیابی ایمنی GMO	نرم‌افزار و پایگاه داده‌ای که ارزیابی خطرات بالقوه و موجود برای سلامت انسان و محیط زیست از محصولات تراریخته را تسهیل می‌کند.	ارزیابی ایمنی محصولات تراریخته در زمینه‌های مختلف از جمله سلامت و تأثیرات زیست‌محیطی

هنجاری مرتبط با مخاطرات تفکیک می‌کند، اما در عمل این پارادایم دارای محدودیت‌های شناخته‌شده‌ای است (Cheit, 1983):

- در محصولات GM ای که داده و دانش کافی وجود دارد اما بر سر روش‌های تفسیر داده اختلاف نظر هست، نمی‌توان سیاست‌گذاران را به سمت تصمیم‌گیری هدایت نمود.

- در محصولات GM ای که دانش کافی وجود ندارد و همچنین در مورد تحلیل داده‌ها اختلاف نظر جدی است، نمی‌توان مسئله را حل کرد، بلکه مسئله به چانه‌زنی سیاسی تنزل پیدا می‌کند.

بحث و جدل پیرامون سمی بودن محصولات GM به دلایلی نظیر عدم امکان ارزیابی مخاطرات آن به‌صورت علمی و سریع به دلیل کمبود داده، بحث‌برانگیز بودن زمینه‌های سیاسی و اقتصادی آن و پاسخ‌های احساسی ذینفعان این فناوری، به‌سادگی چشم‌پوشی شده است (Allen, 2010). بحث در مورد ایمنی سیستم‌های فناوریانه بزرگ، نظیر GMO، سطح پیچیدگی به‌ظاهر کمی داشته، در حالی که با یک قضیه دشوار مواجه هستیم (Perrow, 2007). پارادایم حاکم بر شیوه مرسوم مدیریت مخاطرات ضعیف است. با وجودی که این شیوه علمی است و به‌دقت ویژگی‌های واقعی را از رویه‌های

رفته، روش‌شناسی‌های متفاوتی خارج از حوزه بیوتکنولوژی مطرح شده و گروه‌های بزرگ‌تری از ذی‌نفعان مورد مطالعه قرار می‌گیرند. همچنین، روش‌های کیفی جایگزین روش‌های کمی، شده، تحلیل‌های راهبردی‌تری را در اختیار قرار می‌دهند. این روش‌ها در زمینه دیگر سیستم‌های پیچیده نظیر صنایع هسته‌ای و بهداشت عمومی سال‌ها است که مورد استفاده قرار می‌گیرند. در ادامه به سه روش شناخته‌شده در این زمینه اشاره می‌شود.

تئوری حوادث نرمال (NAT: Normal Accident Theory)

این روش توسط چالز پرو، به‌منظور تحلیل عوامل سازمانی و نهادی مؤثر بر حوادث صنعتی مطرح گردید (Perrow, 1999). وی از مفهوم پیچیدگی تعاملی (Interactive complexity) استفاده می‌کند که در زمینه محصولات تراریخته بدین معنا است که این سیستم‌ها دارای عناصر زیادی (شامل، انسانی، رویه‌های کاری، و اجزای متعدد شکل‌دهنده سیستم) هستند که اثر تعاملی شکست یک یا چند عنصر غیر قابل پیش‌بینی است. همچنین در این تئوری از مفهوم اتصال کامل (Tight coupling) نام می‌برد که در دنیای محصولات تراریخته، بدین معنا است که یک واقعه یا فرآیند بر وقایع و فرآیندهای دیگر اثر مستقیم و سریع ایجاد کند به‌گونه‌ای که در زمان ایجاد یک مشکل، کاری از انسان بر نیاید. تأکید شده است که در زمان رخ دادن هم‌زمان این دو در سیستم‌های با فناوری پیچیده، ممکن است اتفاقی رخ دهد که نمی‌توان آن را دیگر حادثه نامید، زیرا حادثه زمانی رخ می‌دهد که موضوعی غیرمنتظره، بدون دلیل مشخص، یا برحسب اتفاق رخ دهد. به عبارت دیگر، اگر بتوان آن اتفاق را به صورت یک توالی از اتفاقات درون سیستم تبیین نمود، نشانی از غیر قابل پیش‌بینی بودن نباشد، غیرمعمول نبوده، یا نشانی از یک علت نامعلوم در دسترس نباشد، باید آن را حادثه طبیعی نامید. یکی دیگر از پایه‌های این

برای روشن شدن موضوع، به سه منشأ عدم اطمینان در سموم ناشی از محصولات GM بر بدن انسان توجه نمایید (Kroll-Smith et al., 2000):

۱- مواجهات قبلی بدن: اگر پیشینه پزشکی افراد از نظر مواجهات با سموم موجود نباشد، بخش مهمی از این اطلاعات در اساس، غیر قابل دسترس می‌گردد.
۲- رابطه دوز-پاسخ: تعیین اعتبار منحنی‌های دوز-پاسخ در ارزیابی مخاطراتی مورد مناقشه زیادی است. تعیین آستانه مواجهات در بحث‌های ایمنی و سلامت، دشوار بوده و رفتارهای آن‌ها گاهی به صورت نمودارهای نمایی یا سهمی اعلام می‌گردد.

۳- آثار هم‌افزایی و عدم اطمینان‌های مربوط به علل شناختی و تشخیصی: این موضوع و مسئله که چگونه مواد تراریخته، جذب بدن انسان شده و چگونه عمل می‌نمایند، یک مسئله اختلاف برانگیز میان دانشمندان است.

این گونه عدم اطمینان‌ها در تعیین آثار سموم بر بدن انسان، منشأ اختلاف نظرها در مورد روش‌های تحلیل مخاطرات می‌گردد که از آن با عنوان جانب‌داری ابتکاری (heuristic biases) نام برده می‌شود (Slovic, 2010). عامل دیگر تشدیدکننده این اختلافات، ساختار اجتماعی و فرهنگی جوامع است (Bowker & Star, 2000). به علاوه، برخی دیگر از این اختلاف‌ها به تفسیر مدل‌های پیچیده ریاضی این حوزه برمی‌گردد که از لحاظ تحلیلی قوی بوده و خصوصاً در مواقعی که داده کافی وجود ندارد، راه گشا هستند، لیکن هر کدام بر مفروضاتی استوار هستند که ممکن است معتبر بودن نتایج را تحت تأثیر قرار داده و جانب‌دارانه شود.

روش‌های کلان‌نگر در طراحی نظام ارزیابی مخاطرات

در بررسی مخاطرات محصولات تراریخته در سطح کلان، داده‌های خرد در هم آمیخته و بلوک‌های بزرگ‌تری از داده‌ها را فراهم می‌کنند که به اقتضای تجمیع داده‌های بعضاً غیر هم‌سنخ، بخشی از دقت از بین

گردیده و تا زمانی که به طور قطعی ایمن نباشد، نباید مورد استفاده عموم قرار گیرد، زیرا ارزش مخاطرات آن را ندارد. مگر این که یک سیستم انعطاف‌پذیر برای مدیریت مخاطرات GMO طراحی گردد که به نظر می‌آید انجام چنین کاری ممکن بوده، هر چند، در عمل با دشواری‌های فراوانی مواجه خواهد بود. بدون تردید در انجام این امر، توجه به تعادل میان منافع و مضرات این فناوری از اهمیت زیادی برخوردار است. چنانچه قرار باشد منافع قابل توجهی وجود نداشته و جامعه با یک مخاطره حتی کم هم مواجه شود، قطعاً بهتر است از این فناوری استفاده نگردد. در چنین تحلیلی، مخاطره درک شده (Risk perception) توسط جامعه باید مورد توجه قرار گیرد، هر چند به کارگیری آن در عمل با چالش‌های زیادی همراه است.

روش سیستم‌های نرم (SSM)

این روش با تأکید بر شناسایی صحیح ماهیت و ساختار مسئله، درکی شفاف‌تر فراهم و برای بهبود وضعیت آشفته و موقعیت سیستم‌های اجتماعی-تکنولوژیکی بد ساختار ایجاد شده است. مسائل ساختاریافته می‌توانند با استفاده از معیارها، محدودیت‌ها و روابط و در قالب روش‌های سیستمی کلاسیک فرمول‌بندی شوند، درحالی‌که مسائل بدساختار در دنیای واقعی که با ابزار کلاسیک حل نمی‌شدند، منجر به خلق روش‌های ساختاردهی شدند. ویژگی‌های این مسائل عبارت‌اند از: دینفعان چندگانه، ابعاد چندگانه، منافع گنگ و (یا) متناقض، عوامل نامشهود و عدم قطعیت (Mingers, 2011).

مسئله مورد بررسی در این مقاله با توجه به جدول (۲)، بد ساختار تلقی می‌شود. بنابراین شناسایی ساختار مسئله، نقش‌آفرینان و جریان‌های اصلی اطلاعات مورد نیاز برای توسعه سیستم ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته در کشور ضروری است. در این جا می‌توان به کمک روش‌شناسی سیستم‌های نرم، ابعاد و ساختار مسئله مورد اجماع قرار گیرد.

تئوری به مفهوم غیر قابل پیش‌بینی بودن مسائل حاصل از خطای ارزیابی نهادهای ناظر فناوری محصولات تراریخته، به خاطر پیچیدگی تعاملی آن بر می‌گردد. یکی از نمونه‌های این حوادث، انتقال ناخواسته بیان سموم اندوتوکسین Bt در گرده گل ذرت است که توسط باد به گیاهان میزبان منتقل گردید. در هیچ کدام از دستورالعمل‌های ناظرین، چنین مخاطراتی برای موجودات دیگری که از این گیاهان استفاده می‌کنند، دیده نشده بود (Lang & Otto, 2010). یکی از دلایل وقوع مسائل غیر قابل پیش‌بینی، مربوط به خطاهای انسانی است که در این زنجیره مشغول فعالیت می‌باشند، خصوصاً وقتی که با خطاهای مکانیکی هم‌زمان می‌شود. در سیستم‌های پیچیده که ترکیبات مختلفی از عناصر وجود دارند، محتمل است که طراح، سیستم پیش‌بینی لازم برای برخی از این ترکیبات را مد نظر قرار ندهد و در هنگام مواجهه با آن ترکیبات، سیستم دچار اختلال گردد.

در نمونه پالایشگاه‌ها که اجزا اتصال کامل دارند، مسئله کوچکی در یکی از اجزا می‌تواند دیگر اجزا را درگیر و به ناگاه بخشی از پالایشگاه از کار بیفتد. با وجودی که این موارد شاید هیچ‌وقت دوباره تکرار نشود، اما گفته می‌شود که طراح، کلیه حالات ممکن را در نظر نگرفته است. چنین موردی در رابطه با محصولات GM و ارزیابی مخاطرات آن وجود دارد که تولید آن پیچیده، عرضه آن دشوار، دربرگیرنده عوامل انسانی، سازمانی و طبیعی است. برای نمونه یک نوع ذرت BT (Starlink™) که مجوز آن فقط مصرف توسط حیوانات بود، به دلایل پیش‌بینی نشده‌ای، به طور اشتباهی با ذرتی که توسط انسان مصرف می‌شود مخلوط شده بود، بعداً این ذرت در مواد غذایی کشورهای دیگر نیز مشاهده گردید (Demeke et al., 2006). در برخی موارد این محصولات در بازار سیاه معامله می‌شوند. به دلایل فوق، چالز پرو، در برداشت اول، معتقد است که فناوری GMO به دلیل داشتن این ویژگی‌ها باید رها

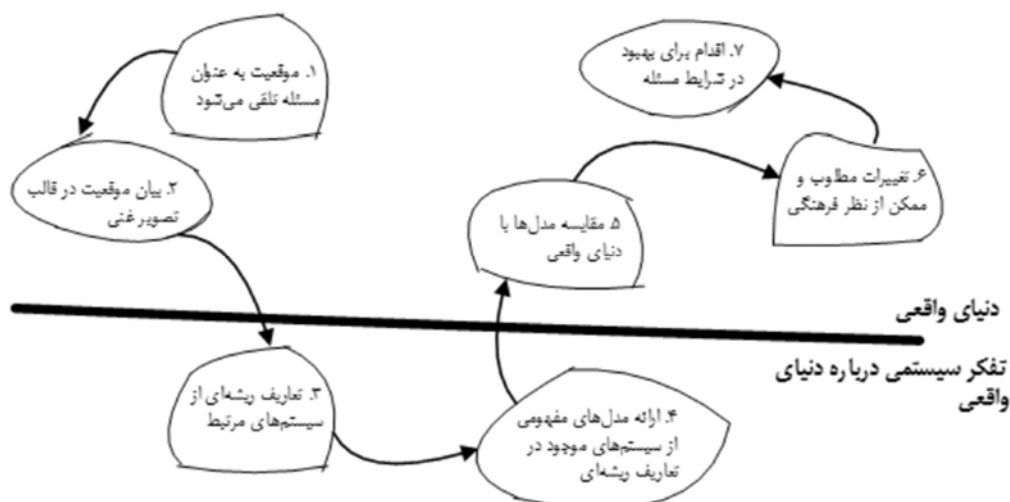
روش شناسی سیستم‌های نرم می‌توان استفاده نمود. در این راستا تصویر غنی (Rich Picture) وضع موجود، تحلیل کاتوو (CATWOE)، به شرح جدول ۳ و تعریف ریشه‌ای (Root definition) با توافق و تأیید مالک مسئله و از طریق برگزاری جلسات متعدد با ذی‌نفعان آن -بعضاً با دیدگاه‌ها و منافع متعارض- باید حاصل شود که این نشان می‌دهد سیستم با لحاظ نمودن شرایط دنیای واقعی چگونه باید باشد.

برای طراحی چنین سیستمی برای ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته بر اساس روش شناسی SSM لازم است مراحل هفت‌گانه آن به شرح شکل (۱) طی گردد. به دلیل وجود پیچیدگی‌های پویای مسئله (ماهیت چندعاملی، تأثیر هم‌زمان عوامل و تأخیر زمان مواجهه تا بروز بیماری) و نیز پیچیدگی‌های رفتاری آن (وجود ذی‌نفعان و نقش‌آفرینان متعدد)، برای طراحی و استقرار سیستم ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته از

جدول ۲. ماهیت مسئله‌زا بودن سیستم ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته

Table 2. The problematic nature of the genetically modified products risk assessment system

ویژگی‌های مسائل بد ساختار	وضعیت مورد مطالعه
ذی‌نفعان چندگانه	ذی‌نفعان بسیاری در این مسئله وجود دارند: معاونت غذا و دارو، کشاورزان تولیدکننده محصولات تراریخته، واردکنندگان، وزارت جهاد کشاورزی، پژوهشگاه‌های مرتبط با ژنتیک و بیوتکنولوژی، مصرف‌کنندگان نهایی محصولات تراریخته، معاونت علمی فناوری ریاست جمهوری.
ابعاد چندگانه	سیستم ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته از چند زیرسیستم بزرگ تشکیل می‌شود: ثبت و تحلیل آزمایش‌های میدانی بر روی محصولات تراریخته، ثبت اطلاعات واردات و تولید محصولات تراریخته، ثبت مواجهات، ثبت محصولات تراریخته در زنجیره غذای انسان و حیوان و ثبت بیماری‌های مرتبط با محصولات تراریخته، تحلیل میزان و شیوه تأثیر این محصولات، طراحی مداخلات سیاست‌گذاران که هر یک دارای پیچیدگی‌های فنی زیادی است.
عدم قطعیت	داده‌های موردنیاز سیستم مراقبت در سیستم‌های اطلاعاتی مختلف در سازمان‌ها و واحدهای سازمانی متفاوتی پراکنده است.
	وجود تأخیر حداقل طولانی‌مدت میان مواجهات و بروز بیماری.
	نرخ بالای گردش محصولات تراریخته در جامعه.
	دوز-پاسخ متفاوت با توجه به مسائل فرهنگی و طبیعی.



شکل ۱. مدل هفت مرحله‌ای SSM (Checkland & Scholes, 1999)

Figure 1. The Seven-Stage Model of SSM (Checkland & Scholes, 1999)

جدول ۳. عناصر تحلیل کاتوو و تعریف آن‌ها

Table 3. Elements of CATWOE analysis and their definitions

عناصر	تعریف
مشتریان (C)	افرادی که به‌طور مستقیم از خروجی‌های سیستم نفع برده و یا متضرر می‌شوند
نقش‌آفرینان (A)	افرادی که فعالیت‌های سیستم را انجام می‌دهند
فرآیند تبدیل (T)	فرآیندی که خروجی‌های سیستم را به‌صورت ورودی‌های تغییر یافته ایجاد می‌کند
جهان‌بینی (W)	چیزی که فعالیت‌های سیستم را معنا می‌بخشد
مالک (O)	فردی (یا سیستمی) که توانایی ایجاد یا توقف فرآیند تبدیل را داشته باشد
محدودیت (E)	محیط سیستم، به‌ویژه فرض‌ها و محدودیت‌هایی که بر آن تحمیل می‌شوند

از این روش در زمینه‌هایی نظیر ارزیابی سیستم ایمنی و بهداشت شغلی و مهندسی مجدد بخش بهداشت استفاده شده است (Augustsson et al., 2019).

روش SOS

این روش به‌طور خاص برای معماری سیستم‌هایی است که اجزای آن خود سیستم‌های پیچیده دیگری هستند و از اطلاعات ترکیبی، استنتاجی و تجربی برای طراحی سیستم‌های پیچیده استفاده می‌شود. از مهم‌ترین ویژگی‌های آن ارائه قوانینی برای حذف گزینه‌های خارج از کنترل، پشتیبانی از یک‌پارچگی اهداف سیستم، پیشگیری در برابر دام‌های معمول طراحی سیستم‌ها بزرگ، و بازیابی دروس آموخته شده است (Rechtin, 1991). از SOS می‌توان به‌عنوان ابزاری برای سازمان‌دهی فرآیند توسعه سیستم‌های بزرگ‌مقیاس و طراحی سیستم برای مسائل خیلی پیچیده که از ویژگی‌های سیستم‌های بزرگ مقیاس است، استفاده کرد. چنان‌چه اکثریتی از پنج ویژگی استقلال مدیریتی، استقلال عملیاتی، توزیع جغرافیایی، رفتار/ویژگی نوظهور و توسعه تکاملی وجود داشته باشد می‌توانیم آن را SOS بنامیم (Firesmith, 2010). از آنجایی که مخاطرات محصولات تراربخته در سیستمی به وقوع می‌پیوندد که دارای این ویژگی‌ها بوده و نیز متأثر از زیرسیستم‌های متنوعی است، لذا از نظریه SOS برای طراحی سیستم ارزیابی مخاطرات محصولات تراربخته می‌توان استفاده نمود. این روش شناسی، دارای ابزارهای کاربردی است که مهم‌ترین آن استخراج روش‌های ابتکاری است.

اساساً مفهوم روش‌های ابتکاری توسط برنده جایزه نوبل اقتصاد هربرت سایمون در سال ۱۹۷۸ برای "فرآیند تصمیم‌گیری در سازمان‌های اقتصادی" معرفی شد و کاربردهای آن را به دیگر رشته‌ها نظیر روان‌شناسی، اقتصاد، مهندسی، کامپیوتر و معماری سیستم، بسط داد. روش‌های ابتکاری قوانین ساده، کارآمد و رمزی هستند که در فرآیندهای تکاملی فرا گرفته شده و از آن‌ها برای حل مسئله، پیشنهاد شده است، نوعاً وقتی که با مسائل پیچیده یا اطلاعات ناقص مواجه می‌شوند. رچتین معتقد است چارچوب روش ابتکاری، روشی برای تعریف مسئله است که از لحاظ مفهومی در میانه‌برداری است که در یک سو لیست طولانی و درهم و برهم از چیزهایی که ممکن است مهم باشند قرار گرفته و در سوی دیگر بردار، یک مدل ساختاریافته از مسائل وجود دارد. در روش ابتکاری به اندازه کافی جا برای فرمول‌های جزئی‌تر وجود دارد ولی در عین حال یک ساختار کلی هم وجود دارد که خودش می‌تواند یک چارچوب برای پیشبرد مباحث باشد. از طرف دیگر تنوع در روش‌های ابتکاری ممکن است باعث ظهور یک راه حل قابل قبول برای حل مسئله شود (Rechtin, 1991).

مایر (۳۰) معتقد است که روش‌های ابتکاری به‌عنوان چکیده تجربه، رهنمودهای غیر تحلیلی برای حل مسائل بد ساختار قابل اعتمادند. افراد پس از کمی تعمق، در می‌یابند که روش‌های ابتکاری چه نقش مهمی در فعالیت‌هایشان من جمله توسعه و طراحی ایفا می‌کنند. هرچند که اعتقاد بر این است که همه افراد از روش‌های ابتکاری استفاده می‌کنند، اما مشخص نیست که آیا

نگریستن به محصولات GM از منظر مخاطرات ایمنی زیستی و فرضیه نفوذ، نگاه‌ها را به سمت برخوردهایی نظیر توقف تولید مواد غذایی GMO مرتبط با انسان در داخل و ممنوعیت واردات آن‌ها جلب می‌کند. درحالی که قرار دادن آن‌ها در چارچوب امنیت غذایی، غذای سالم، محیط‌زیست پاک و تولید ملی، اتخاذ رویکرد بسیار احتیاط‌آمیزی نظیر تولید داخلی و حتی واردات این محصولات را طلب می‌کند. مشاهده فناوری‌های پیشرفته دیگر که با سیستم‌های پیچیده مواجه هستند و با روش‌های ارزیابی مخاطرات سر و کار دارند، منجر به رویکرد ارزیابی مخاطرات در سطح کلان گردیده است. در رویکرد کلان، ارزیابی مخاطرات به‌صورت مطالعات بین‌رشته‌ای دیده شده، از تجارب سایر فناوری‌های پیشرفته در مدیریت عدم اطمینان‌ها و نیز مدیریت سیستم‌های پیچیده استفاده می‌گردد. از مرور مطالعات انجام‌شده برای ارزیابی مخاطرات این محصولات، تجزیه و تحلیل اسناد مرجع و استفاده عملی از این ابزارها می‌توان به نتایج مهمی در مطالعات موردی اشاره نمود، اما کشورهای توسعه‌یافته برای تصویب و جای‌گذاری این محصولات در سبد محصولات خانوار در طولانی مدت شرایط را مهیا نمی‌دانند.

در این ارتباط، قوانین مربوط به محصولات GM در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته به دلیل هزینه‌های بالای تولید داده‌های جهانی مورد نیاز و اخذ تأییدیه‌های تجاری، به‌عنوان محدودیتی برای نوآوری در کشاورزی، به‌ویژه توسط توسعه‌دهندگان این محصولات مورد انتقاد قرار گرفته است. سازمان ایمنی غذایی اروپا (European Food Safety Authority) EFSA برای انجام ارزیابی‌های علمی با چالش ایجاد ظرفیت متخصصان ارزیابی مخاطرات محصولات GM مواجه است. این افراد از یک طرف، نیاز به آموزش داشته و از طرف دیگر بایستی فرصت کافی برای کسب تجربه در اختیار داشته باشند (Fernandez Rios et al., 2018). فقدان فرآیندهای رسمی بومی برای آموزش به‌روزرسانی ارزیابان مخاطرات بر اساس معیارهای علمی در حال تکامل، کمبود منابع دقیق، تحولات زیاد در برخی موارد، کمبود متخصصین باتجربه می‌تواند چالش ورود این

ابتکارات به کار رفته توسط آن‌ها را دیگران نیز می‌توانند به کار گیرند.

بحث

آثار منفی در رابطه با استفاده از محصولات GM در اجتماع و بر روی موجودات زنده بحث برانگیز بوده و شکست‌های این فناوری در رسیدن به وعده‌های اولیه می‌تواند فاجعه بار باشد. ارزیابی مخاطرات GMO در سطح خرد، فاقد اطلاعات دقیق و کافی برای تصمیم‌گیری سیاست‌گذاران بوده و آن را به‌صورت یک جعبه سیاه درآورده است.

نهادهای حاکمیتی نظیر وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی با زمینه فکری غذای سالم، وزارت جهاد با علاقه‌مندی به امنیت غذایی، سازمان محیط زیست با توجه به مأموریت رسیدگی به محیط زیست پاک و سازمان پدافند غیرعامل نیز به دلیل تخصصی بودن موضوع و تفرق آرای این زمینه و نداشتن ابزارهای مناسب برای تصمیم‌گیری در این حوزه، نتوانسته‌اند سیاست‌های روشن و قابل اتکایی را در این زمینه برای کشور تبیین نمایند (Moazami, Tavakol, & Safiri, 2019). این درحالی است که همگان اذعان دارند که به دلیل اجتماعی-فنی بودن موضوع محصولات تراریخته، لازم است که تصمیم‌گیری در این زمینه با رویکرد نظام-مندی انجام گردد به‌گونه‌ای که جنبه‌های فناورانه، اجتماعی، اقتصادی و سیاسی آن در یک تحلیل جامع انجام‌شده تا پیامدهای قابل توجه تصمیم‌گیری‌های آن به یک‌باره بخش‌های مختلف کشور را درگیر ننماید و تمامی شبکه کنش‌گران محصولات تراریخته باید نقش خود را به‌گونه‌ای مناسب ایفا کنند تا ثبات جامعه باقی بماند. این رویکرد در حال حاضر خارج از شیوه معمول کاری دستگاه‌های حاکمیتی این حوزه است زیرا آن‌ها به‌طور سنتی به انجام وظایف بخشی خود سرگرم می‌باشند. همچنین به گفته مک کنزی و بارنز نظریات دانشمندان در علایق حرفه‌ای، منافع اجتماعی و مادی آن‌ها ریشه دارد، بنابراین لازم است سازوکار متفاوتی برای این مهم طراحی و اجرا گردد (MacKenzie, 1978).

محصولات به اجتماع را دو چندان نماید. قابلیت ردگیری محصولات GM در زنجیره تولید غذا، فراهم ساختن مقررات لازم برای جمع‌آوری داده و ارائه گزارش‌ها ارزیابی مخاطرات به جامعه، احتیاط در شرایط کمبود داده برای مدیریت مخاطرات، بازنگری قوانین ناظر بر محصولات GM و فراهم ساختن ساختارهای اجرایی برای مدیریت مخاطرات (GMO Risk Governance) برای طراحی و پیاده‌سازی مداخلات در جهت کاهش مخاطرات این محصولات از دیگر ملاحظات گذر امن از این فناوری است. در کشورهای در حال توسعه که ظرفیت‌های کافی محلی جهت نظارت بر اقدامات ایمنی زیستی ندارند، مصرف این محصولات برای اجتماع پرمخاطره‌تر است. با این حال، تنها راه ادامه کار، تشکیل نهادهای تخصصی در دولت یا بخش خصوصی است (Bartsch, 2014).

بحث‌های فراگیر در سطح منطقه‌ای و بین‌المللی برای ایجاد اجماع در مورد معیارهای علمی، ابزارهای مفهومی و استانداردهای مشترک برای ارزیابی مخاطرات و مقررات مبتنی بر شواهد بسیار مهم است. به عبارتی دیگر، تصمیم‌گیری در خصوص محصولات GM، نیازمند تشکیل و مدیریت شبکه ذی‌نفعان است. مطالعات نشان می‌دهد که مردم، اطلاع کمی در مورد محصولات تراریخته دارند. لذا نهادهای اطلاع‌رسانی باید بیشتر مردم را مطلع نمایند (Lucht, 2015). از نقطه‌نظر مدل‌های رقابت‌پذیری ملی، متوقع کردن مردم نسبت به کالاها و محصولات، توان رقابتی کشور را بالا خواهد برد.

نتیجه‌گیری

توجه به روند واقعی توسعه فناوری‌های پیشرفته در ایران نشان می‌دهد که فعالیت‌های ناقصی در خصوص توسعه این فناوری‌ها انجام شده که منجر به تولیدات بی‌کیفیت و بی‌انگیزه شدن سیاست‌گذاران و مردم شده و در بلند مدت، آن‌ها را به سوی سایر محصولات باکیفیتی که در یک نظام صحیح توسعه پیدا کرده، خواهد کشاند. سیستم‌های ارزیابی و نظارتی شفاف و کارآمد، با معیارها و رویه‌های مشخص برای پردازش برنامه‌های توسعه محصولات جدید، می‌تواند تصمیمات مبتنی بر علم را

به‌موقع و قابل پیش‌بینی امکان‌پذیر سازد. در این مقاله یکی از ارکان نظام جامع توسعه فناوری زیستی شامل ارزیابی مخاطرات توضیح داده شد. این نظام در لایه بالاتر خود با نظام مدیریت مخاطرات و در لایه زیرین خود با اطلاعات بالینی مخاطرات در ارتباط بوده و هدف آن تبیین کمی و کیفی مخاطرات درگیر در فرآیند توسعه فناوری زیستی می‌باشد. با وجودی که همواره مدیریت مخاطرات به عنوان یک جزء ضروری این فناوری مورد توجه قرار گرفته است، لیکن تدوین ابزارهای نظام‌مند و رویه‌های لازم برای جمع‌آوری داده و فراهم کردن شواهد برای پایداری آن ضروری است. این ابزارها باید بر اساس روش‌شناسی خاص خود طراحی شده و متناظر آن‌ها، سامانه‌های جمع‌آوری و تحلیل داده و پشتیبانی تصمیم برای سیاست‌گذاران فراهم گردد. وجود این گونه سامانه‌ها به جامعه علمی و اجتماع اطمینان بیشتری در خصوص مدیریت‌پذیری وقایع و پیامدهای این فناوری را منتقل می‌کند. در این راستا، درک محدودیت‌های روش‌های کلاسیک ارزیابی مخاطرات محصولات تراریخته از یک سو و از سوی دیگر، شناخت و توان به‌کارگیری دانش سیستم‌های پیچیده برای تدوین راهبرد ارزیابی مخاطرات ضروری است. عدم اطمینان ناشی از عوامل مختلفی نظیر اثر هم‌افزایی سموم در محیط زیست و آثار جانبی داروها حل این مسئله را دو چندان دشوار نموده است. این عدم اطمینان فقط دانشمندان را نمی‌آزارد، بلکه جامعه و سیاست‌گذاران نیز به حل آن نیاز دارند. انتظار از دانشمندان زیست فناوری برای یافتن راه‌حل این موضوع، بیش از اندازه است و نیاز به همکاری علوم دیگر نظیر علوم مدیریت که با چنین سطوحی از مخاطرات در سیستم‌های پیچیده مواجه هستند و نیز سیاست‌مداران که از آن برای تصمیم‌گیری‌ها استفاده می‌کنند، احساس می‌شود. همچنین باید دشواری‌های استقرار این سیستم‌ها برای جامعه تشریح گردد، تا انتظارات خیال‌پردازانه‌ای از نتایج این علم به وجود نیاید. این کار بایستی توسط نهادهای ناظر انجام شود تا درک جامعه از عدم اطمینان‌ها ارتقاء یابد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

- Abdollahi, M., Ghavamabadi, M. H. R., & Shafee, M. S. (2011). A Critical Introduction to Iran Biosafety Law. *US-China Law Review*, 8, 401.
- Allen, M. (2010). Embracing an uncertain future. In: Nature Publishing Group UK London.
- Augustsson, H., Churrua, K., & Braithwaite, J. (2019). Re-energising the way we manage change in healthcare: the case for soft systems methodology and its application to evidence-based practice. *BMC Health Services Research*, 19(1), 666. doi:10.1186/s12913-019-4508-0. <https://doi.org/10.1186/s12913-019-4508-0>
- Bain, C., & Dandachi, T. (2014). Governing GMOs: The (counter) movement for mandatory and voluntary non-GMO labels. *Sustainability*, 6(12), 9456-9476. <https://doi.org/10.3390/su6129456>
- Bartsch, D. (2014). GMO regulatory challenges and science: a European perspective. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 9, 51-58. <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0885-9>
- Bergmans, H., Logie, C., Van Maanen, K., Hermesen, H., Meredyth, M., & Van Der Vlugt, C. (2008). Identification of potentially hazardous human gene products in GMO risk assessment. *Environmental Biosafety Research*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1051/embr.2008001>
- Bowker, G. C., & Star, S. L. (2000). *Sorting things out: Classification and its consequences*: MIT press.
- Casacuberta, J. M., & Puigdomenech, P. (2018). Proportionate and scientifically sound risk assessment of gene edited plants. *EMBO reports*, 19(10), e46907. <https://doi.org/10.15252/embr.201846907>
- Chamberlain, L. H., & Shipston, M. J. (2015). The physiology of protein S-acylation. *Physiological reviews*, 95(2), 341-376. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2014>
- Checkland, P., & Scholes, J. (1999). *Soft systems methodology in action*: John Wiley & Sons.
- Cheit, R. E. (1983). Risk and Culture: An Essay on the Selection of Technical and Environmental Dangers. In: JSTOR.
- Demeke, T., Perry, D., & Scowcroft, W. R. (2006). Adventitious presence of GMOs: scientific overview for Canadian grains. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(1), 1-23. <https://doi.org/10.4141/P05-114>
- Eriksson, D. (2018). Recovering the original intentions of risk assessment and management of genetically modified organisms in the European Union. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 52. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00052>
- Eriksson, D., Custers, R., Björnberg, K. E., Hansson, S. O., Purnhagen, K., Qaim, M., Tosun, J. (2020). Options to reform the European Union legislation on GMOs: risk governance. *Trends in biotechnology*, 38(4), 349-351. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.002>
- Fernandez Rios, D., Rubinstein, C., & Vicien, C. (2018). Capacities for the risk assessment of GMOs: challenges to build sustainable systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 40. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00040>
- Firesmith, D. G. (2010). *Profiling systems using the defining characteristics of systems of systems (SoS)*: Carnegie Mellon University, Software Engineering Institute.
- Hemmer, W. (1997). *Foods derived from genetically modified organisms and detection methods*: Agency BATS Basel. <https://doi.org/10.1184/R1/6582545.v1>
- Iso, I. (2009). Risk management-Principles and guidelines. *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*.
- Jackson, R. J., Ramsay, A. J., Christensen, C. D., Beaton, S., Hall, D. F., & Ramshaw, I. A. (2001). Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *Journal of virology*, 75(3), 1205-1210. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.3.1205-1210.2001>
- Kroll-Smith, J. S., Brown, P. M., & Gunter, V. J. (2000). *Illness and the environment: A reader in contested medicine*: NYU Press.
- Lang, A., & Otto, M. (2010). A synthesis of laboratory and field studies on the effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize on non target Lepidoptera. *Entomologia experimentalis et applicata*, 135(2), 121-134. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00981.x>
- Lucht, J. M. (2015). Public acceptance of plant biotechnology and GM crops. *Viruses*, 7(8), 4254-4281. <https://doi.org/10.3390/v7082819>
- MacKenzie, D. (1978). Statistical theory and social interests: a case-study. *Social studies of science*, 8(1), 35-83.
- Martinez-Ribaya, B., & Areal, F. J. (2020). Is there an opportunity for product differentiation between GM and non-GM soya-based products in Argentina? *Food Control*, 109, 106895. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106895>

- Mingers, J. (2011). Soft OR comes of age—but not everywhere! *Omega*, 39(6), 729-741. <https://doi.org/10.1016/j.omega.2011.01.005>
- Moazami, M., Tavakol, M., & Safiri, K. (2019). Social construction of genetically modified products in Iran: A qualitative study. *Interdisciplinary Studies in the Humanities*, 11(4), 33-67. <https://doi.org/10.22035/isih.2020.3650.3831>
- Organisms, E. P. o. G. M. (2010). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 8(11), 1879. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2150>
- Perrow, C. (1999). *Normal accidents: Living with high risk technologies*. Princeton university press. <https://doi.org/10.2307/j.ctt7srgf>
- Perrow, C. (2007). The next catastrophe: reducing our vulnerabilities to natural. *Industrial, and Terrorist Disasters*, 87(4), 1-377. <https://www.jstor.org/stable/j.ctt7t4c1>
- Rausand, M. (2013). *Risk assessment: theory, methods, and applications* (Vol. 115): John Wiley & Sons.
- Rechtin, E. (1991). Systems architecting: Creating and building complex systems. <https://doi.org/10.1002/inst.20014349>
- Organisation for Economic Co-operation and Development. Ad Hoc Group on Safety and Regulations in Biotechnology (1986). *Recombinant DNA Safety Considerations: Safety Considerations for Industrial, Agricultural, and Environmental Applications of Organisms Derived by Recombinant DNA Techniques*.
- Shooshtari, A., Hajatpour, Z., Ghaffari, M. R., Seraji, F., & Loni, F. (2024). Awareness of GMOs in terms of the Iran biosafety act: A case study of Tehran city. *Heliyon*, 2;10(3):e25487. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25487>
- Slovic, P. (2010). The feeling of risk. *New perspectives on risk perception*.
- Steinberg, P., Van der Voet, H., Goedhart, P. W., Kleter, G., Kok, E. J., Pla, M., & Babincová, J. (2019). Lack of adverse effects in subchronic and chronic toxicity/carcinogenicity studies on the glyphosate-resistant genetically modified maize NK603 in Wistar Han RCC rats. *Archives of toxicology*, 93(4), 1095-1139. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02400-1>
- The official newspaper of the Islamic Republic of Iran, number 22192, session 98. (1400) (In Persian).
- Tsatsakis, A. M., Nawaz, M. A., Tutelyan, V. A., Golokhvast, K. S., Kalantzi, O.-I., Chung, D. H., & Yang, S. H. (2017). Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 108-121. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.033>