نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۱، شماره ۲، زمستان ۱۳۹۲- ص: ۳۸-۲۹

Saffron Agronomy & Technology
Vol. 1, No. 2. 2014, P. 29-38

شناسایی برخی تقلبات زعفران (*Crocus sativus* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی ITS

نسرین مشتاقی[1*]، الهام حمیدی[2]، عبدالرضا باقری[1]، احمد شریفی[3] و عباس همتی کاخکی[4]

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰٤/۲۲
تاریخ دریافت: ۹۲/۰٦/۲۱

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) یکی از گران‌ترین ادویه‌های دارویی جهان است که تولید محدود و قیمت بالای آن باعث شده تا در این گیاه تقلبات زیادی صورت بگیرد، این تقلبات بیشتر شامل افزودن مواد گیاهی و شیمیایی مشابه زعفران می‌باشد. برای تعیین این تقلبات روش‌های مختلفی گسترش یافته است که بیشتر آنها براساس مشخصات مورفولوژیکی، آناتومی و آزمون‌های شیمیایی است. این مطالعه نشان دهنده ی یک روش نوین برای تعیین تقلبات زعفران بر اساس روش های مولکولی وابسته به واکنش زنجیره ای پلیمراز می باشد که در آن از نشان‌گر مولکولی ITS-2 (Internaltranscrribed spacer -2) استفاده شده است. در این بررسی از یک آغازگر عمومی بر مبنای ناحیه ۵/۸ S rDNA و آغازگرهای اختصاصی برگشتی بر مبنای ناحیه ITS-2 در گونه‌های مختلف تقلبات گیاهی و غیر گیاهی نظیر کلاله انار، ذرت، گلرنگ، زردچوبه، فلفل قرمز خرد شده و همچنین گوشت گاو و شتر برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید. بعد از انجام واکنش، نوار مربوط به توالی ITS-2 در چندین نمونه گیاهی شامل ذرت، گلرنگ، انار، فلفل قرمز و زردچوبه و همچنین گوشت گاو و شتر به‌عنوان تقلبات رایج زعفران، تکثیر شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از تمامی آغازگرها در قالب واکنش PCR چندگانه سبب تکثیر تمامی نوارهای مربوط به انواع تقلبات می‌شود. اگرچه اکثر نوارها در ژل آگارز ۲ درصد مشاهده شدند و لکن استفاده از ژل پلی آکریل آمید۲۰ درصد منجر به تفکیک بهتر نوارها بر روی ژل گردید. این روش کارایی لازم برای تشخیص تقلبات زعفران در سطح یک درصد وزنی از مخلوط تقلبات را دارا می باشد.

واژه‌های کلیدی: زعفران، تقلبات، واکنش زنجیره ای پلیمراز ، توالی ITS 2

۱، ۲، ۳ و ٤- به‌ترتیب استادیار دانشکده کشاورزی و استاد پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، هیات علمی گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی مشهد و هیات علمی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، پارک علم و فناوری خراسان رضوی.
(*- نویسنده مسئول: Email: Moshtaghi@um.ac.ir)

مقدمه

زعفران(*Crocus sativus* L.) مرغوب‌ترین و گرانترین ادویه جهان است کـه تولیـد محـدود و قیمـت بـالای آن سبب شده تا در این گیاه تقلبات زیادی صورت بگیرد. تقلباتی که در زعفران به‌کار می‌رود شامل افزودن مـواد گیـاهی مشابه نظیر گل انار، ذرت، گلرنگ، زردچوبه، ریشه گندم و همچنین ترکیبات ارگانیک مانند عسل و روغن و ترکیبـات غیر ارگانیک نظیربرات، سولفات و کلریدکربنات است که شناسایی آنها مشکل می‌باشد (Jouhn et al., 2010).

برای تعیین تقلبـات زعفـران روش‌هـای مختلفـی گـسترش یافتـه اسـت کـه بیـشتر آنهـا براسـاس مشخـصات مورفولوژیکی، آناتومیکی و آزمون‌های شیمیایی است. این روش‌ها برای تجزیه تعداد زیاد نمونه‌هـا مناسـب نیـستند و ارزیابی‌های ساختاری برای تعیین تقلبات نیز نیازمند نیروهای متخصص اسـت (Ma et al., 2006). همچنـین منـابع گیاهی تغییر پذیر هستند و پیچیدگی شیمیایی دارند. نشان‌گرهای مبتنـی بـر DNA قابلیـت بـالایی بـرای شناسـایی گونه‌ها داشته و تغییر پذیری آنها نسبت به روش‌های شیمیایی و فیزیکی بسیار پایین اسـت. بنـابراین اسـتفاده از آنهـا برای شناسایی تقلبات گیاهی می‌تواند مفید باشد (Kaplana et al., 2004 ؛Marinieleo et al., 2002). تعداد زیادی از نشان‌گرهای مولکـولی ماننـد PCR-RFLP،AP-PCR، ARMs، SCAR و RAPD اخیـراً بـرای تاییـد خلـوص گیاهان دارویی استفاده شده اند (Dnyaneshwar et al., 2001 Chu et al., 2001 ، Dhanya Choo et al., 2006 and Sasikumar, 2010 ; Javanmardi et). اگرچه این روش‌ها برای شناسایی تاکسونومی و تـشخیص داروهـای گیاهی خام از جایگزین‌های آن و مواد تقلبی آن سودمند هستند ولی کاربرد آنها بـه خـاطر شـرایط مختلـف آزمـایش محدود شده است. به‌عنوان نمونه برای RAPD تکرار پذیری به شدت تحت تاثیر کیفیت و غلظت DNA الگو، نسبت DNA الگو به آغازگر، تغییرات جزئی ترکیبات واکنش و پارامترهای چرخه‌ها است. در PCR-RFLP طول محصولات PCR استفاده از آن را محدود می‌کند چون تعداد مکان‌های برشی در توالی بین دو آغازگر محدود است (Sun et al., 2010). با این حال روش‌های مولکولی در تشخیص نمونه‌ها از مزایایی نظیر تشخیص در مقادیر بسیار اندک، کـاهش در مدت زمان تشخیص تقلب، تشخیص گونه، زیر گونه و حتی پایین‌تر و دقت در شناسایی نمونه برخوردار مـی‌باشـند. توالی ITS در DNA ریبوزومی توالی تغییر پذیری است که برای مطالعـات فیلـوژنتیکی در بـسیاری از خـانواده‌هـای قارچ‌ها و یوکاریوت‌ها مناسب است. شایستگی مارکر ITS بـرای مطالعـات فیلوژنیـک بـه خـاطر وراثـت دو والـدی، فراگیری، آسانی، یکسانی داخل گونه‌ای، تغییر پذیری بین گونه‌ای وتعداد کپی زیاد مـی‌باشـد (Feng et al., 2002). در مطالعـه‌ای (Sun et al., 2010)، بـرای شناسـایی هیبریـدهای سـه گونـه ارکیـده *Paphiopedilum* L. *armeniacum*، *P. micranthum* و *P. delenatii* از هم با اسـتفاده از یـک ناحیـه کـاملا محافظـت شـده در rDNA ITS این سه گونه یک آغازگر عمومی طراحی کردند که در همه گونه‌ها یک نوار ۶۹۰ جفـت بـازی را تکثیـر نمود. این قطعه DNA از تمام این سه گونه استخراج و توالی یابی شد. توالی‌های شناسایی شده با همدیگر مقایسه و با توجه به مناطق اختصاصی برای هرگونه آغازگر اختصاصی طراحی گردید. علاوه بر این برای بهبـود کـاربرد نـشان-گرهای SCAR سه آغازگر اختصاصی ITS به‌طور همزمان در PCR چندگانه استفاده شدند و نتـایج تأییـد کـرد کـه ترکیب این نشان‌گرها باعث شناسایی هر گونه و هیبریدهای حاصل از گونه‌های بسیار نزدیـک مـی‌شـود. ایـن نتـایج نشان می‌دهد که استفاده از نشان‌گر مولکولی ITS می‌تواند برای تعیین تقلبات به‌کار رفته در صنعت زعفران سـودمند باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و استخراج DNA

چهار رقم از بذور ذرت به نام‌های SC400،SC260،SC704 و کنسول از مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان رضوی واقع در طرق تهیه شد. چهار رقم انار با نام‌های رباب پوست قرمز، سفید ربی ترش، ملس یزدی و مخمل پوست قرمز از محل گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری شد. چهار رقم گلرنگ به نام‌های محلی اصفهان (۱۱۸)، محلی مرند (۱۲۶)، S-541 (۱۳۸)، Bacumq2 (۳۰) از نقاط مختلف جمع‌آوری گردید و نمونه‌های گوشت تازه و نمونه‌های خشک شامل کلاله زعفران، کلاله گلرنگ، کلاله انار، کلاله ذرت، فلفل قرمز و زردچوبه از مراکز مختلف خریداری شدند. نمونه‌های تازه جهت ذخیره در فریزر۸۰ – در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی-لیتری نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB تغییر یافته (SaghaiMaroof et al., 1984) برای تمام نمونه‌های خشک و تازه انجام شد و تعیین کیفیت نمونه‌های استخراجی DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰٫۸ درصد صورت گرفت.

طراحی آغازگر وانجام واکنش زنجیره ای پلیمراز

در این مرحله هر یک از گیاهان و نمونه های گوشتی مورد نظر با آغازگرهای اختصاصی خود به تنهایی در یک واکنش جداگانه PCR شدند. برای طراحی آغازگرهای PCR از منطقه توالی 5.8 SrRNA و ITS2 برای تمام نمونه های گیاهی استفاده شد. علاوه بر این در این بررسی از یک آغازگر رفت برای تمام نمونه‌های گیاهی و یک آغازگر برگشت اختصاصی برای هر یک از نمونه‌های گیاهی استفاده شد. برای تهیه توالی ها از پایگاه داده‌های توالی NCBI و برای طراحی آغازگرها از نرم افزار Premier Primer (Ver6) استفاده شد (جدول ۱) . جهت تکثیر از یک آغازگر رفت عمومی به همراه آغازگرهای اختصاصی برگشتی و ترکیب DNA تمام نمونه های گیاهی در یک واکنش PCR چندگانه با کمک PCR Master Mix آماده شرکت تاکارا طبق دستورالعمل آن استفاده شد. بدین ترتیب به هر واکنش تنها آغازگرهای مورد نیاز (یک میکرولیتر از محلول ذخیره ۱۰ میکرومولار) ، آب و DNA (۵۰ نانوگرم) اضافه شد. ضمن بررسی دمای و اسرشته سازی آنها ، دمای واسرشته سازی واحد ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای شش گیاه ذرت، انار، گلرنگ، زعفران، فلفل قرمز و زردچوبه و دو نمونه گوشت گاو و شتر مورد توافق قرار گرفت. بعد از انجام واکنش PCR برای مشاهده نوار های مورد نظر از الکتروفورز افقی با آگارز یک درصد استفاده شد که به میزان ۶ میکرولیتر از DNA مورد نظر در داخل چاهک‌ها بارگذاری گردید. پس از یک ساعت از ژل عکس برداری (با دستگاه Gel Doc) به عمل آمد.

از آن‌جایی‌که رشته‌های گوشت گاو و شتر هم به عنوان تقلبات غیر گیاهی ممکن است به زعفران اضافه شوند لذا در ادامه آزمایش از رشته های گوشت گاو و شتر برای استخراج DNA استفاده شد تا در مخلوط PCR چندگانه از DNA گوشت و آغازگرهای آن نیز استفاده شود. آغازگرهای طراحی شده برای گوشت گاو و شتر از ناحیه مربوط به ژن سیتوکروم b طراحی گردید که منجر به تکثیر یک قطعه 214 جفت بازی در واکنش PCR می‌شود. توالی آغازگرهای طراحی شده به‌صورت زیر می باشد:

Forward: 5'- GCCTAAAAGCAGCCATCAA-3'

Reverse: 5'- TGCACTCCTGTGTTGGGTTA-3'

برنامه چرخه حرارتی PCR شامل ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و ۳۵ چرخه بعدی شامل ۹۸ درجه به دت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه در نظر گرفته شد.

جدول ۱- یک آغازگر رفت عمومی و آغازگر های برگشتی اختصاصی مورد استفاده برای هر نمونه گیاهی

Table 1- General forward primer and specific reverse primers for each plant sample

sample	Primer	Primer sequence	Product size (bp)
Pomegranate	reverse	ACACGGGAGGCCAACTTC	260
Saffron	reverse	TGAGGTCTGATTCCGAGGAC	402
Corn	reverse	GGGCCAGACACCATGTCC	212
Safflower	reverse	GTCCTTTACAACCACCACTA	298
Capsicum slices	reverse	CGAAGGGGGTCCTGGAGTC	368
Turmeric	reverse	AACAAAGCATGGGGCATAAG	184
All samples	Forward ITS2	ACTCTCGGCAACGGATATC	--

انجام PCR چند گانه

با توجه به این‌که آغازگر رفت برای تمامی گونه‌ها یکسان بود و تنها آغازگر برگشتی مختص هر گونه بود لذا در یک واکنش PCR چندگانه تمام آغازگرها به همراه مخلوطی از تمام DNA ها اضافه گردید و واکنش PCR به‌صورت همزمان در یک واکنش انجام گرفت.

استفاده از ژل پلی آکریل آمید برای تفکیک بهتر تمامی باندها بر روی ژل

با توجه به آن‌که تفکیک باندها به خوبی بر روی ژل آگارز صورت نگرفت در ادامه کار از ژل پلی آکریل آمید برای جداسازی باندها استفاده شد تا تفکیک بهتری بر روی باندها صورت پذیرد. به دلیل کوچک بودن قطعات حاصل از PCR و برای تفکیک بهتر، از ژل پلی‌آکریلامید ۲۰٪ استفاده شد. الکترفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت در مدت زمان ۱۲ ساعت در بافر TBE انجام ورنگ آمیزی شد. برای مشاهده نوارها، از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده گردید.

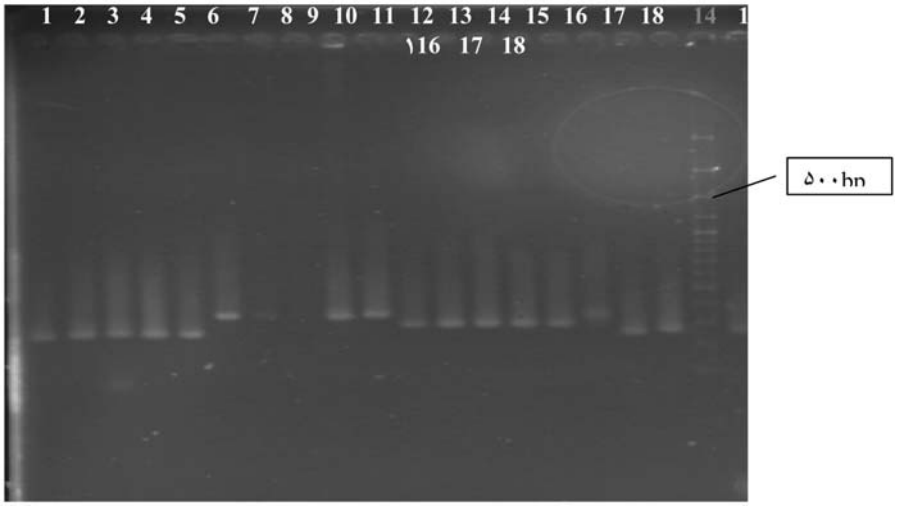
تهیه مخلوط های متفاوتی از تقلبات رایج با زعفران و انجام واکنش PCR چندگانه

در انتهای بررسی برای تأیید کارایی روش از نمونه های مخلوط برای انجام PCR استفاده شد. بدین منظور مقادیر یک درصد، پنج درصد و همچنین ده درصد از انواع ناخالصی‌ها شامل رشته های گوشت و سایر تقلبات بررسی شده در این آزمایش با زعفران مخلوط شده و سپس استخراج DNA از نمونه‌های مخلوط با استفاده از کیت استخراج

DNA شرکت دنا زیست صورت گرفت. سپس از این DNA مخلوط برای انجام واکنش PCR با مخلوطی از آغـازگر رفتی و برگشتی از تمام گونه‌ها استفاده شد تا کارایی این روش برای مقادیر کم مخلوط از تمام نمونه‌ها مشخص شود.

نتایج و بحث

در این مطالعه با استفاده از توالی ریبوزومی ITS-2 آغازگرهایی طراحی شدند که ناحیه 5.8S rDNA و ITS-2 را در هفت گونه ی انار، گلرنگ، ذرت، فلفل قرمزو زردچوبه تکثیر کنند.آغازگر رفت طراحی شده از مناطق مشابه در هـر هفت گونه (منطقه ۵٫۸S) و برای تمامی گونه‌ها یکسان بود و آغازگر برگشتی از مناطق مخـتص هـر گونـه (براسـاس ITS-2) تهیه شد. بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توالی ITS -2 در هر هفت گونـه تکثیـر شـد و یـک بانـد منحصر به فرد برای هر کدام از گونه ها با استفاده از توالی آغازگرهای ITS -2 تکثیر شد و باندهای حاصله بـین ۱۸۰ تا ۴۰۲ جفت باز طول داشتند. در ادامه تصاویری از انجام واکنش PCR برای تمام نمونه‌های DNA استخراجی آورده شده است. نتایج حاکی از آن است که آغازگرهای طراحی شده برای ناحیه ITS به خوبی توانسته باند مورد نظـر را بـه صورت اختصاصی تکثیر نماید (شکل ۱). علاوه بر این تکثیر یک باند یکسان در تمامی گونه‌های مورد استفاده حـاکی از یکسانی داخل گونه‌ای ناحیه ITS می‌باشد که هدف تشخیصی این تحقیق را نیز تأیید می کند.

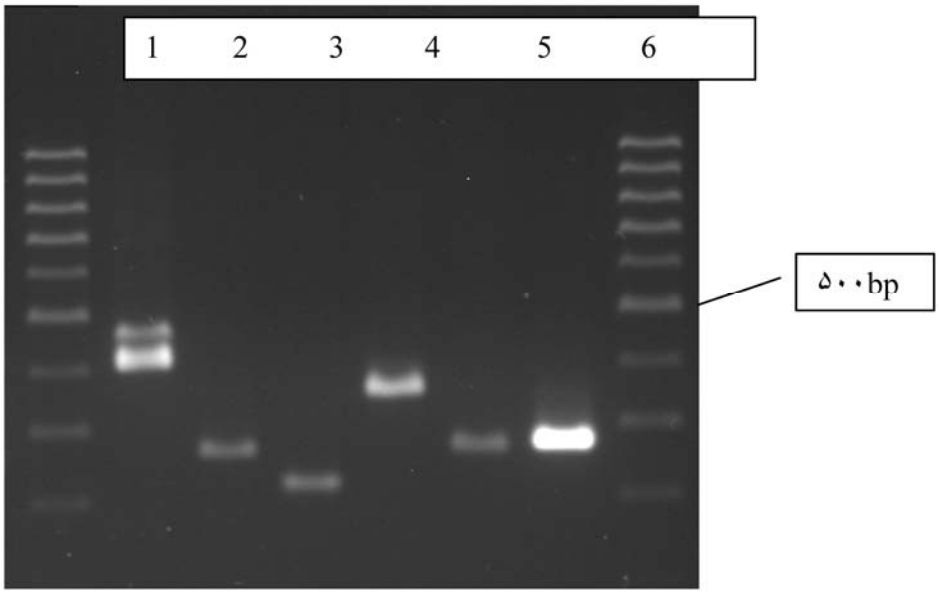


شکل ۱- نتایج PCR با هر یک از نمونه‌ها (۱، ۲، ۳، ٤ و ٥) نمونه‌های تازه برگی ذرت رقم‌های (٢٦٠ ، ٤٠٠، ٧٠٤، کنسول و کلاله ذرت) ، (٦، ٧، ٨، ٩ و ١٠) انار رقم‌های (رباب پوست قرمز، سفید ربی ترش، ملس یزدی، مخمل پوست قرمز و کلاله انار)، (١١، ١٢، ١٣، ١٤ و ١٥) گلرنگ رقم‌های (محلی اصفهان (١١٨)، محلی مرند (١٢٦) ،S-541(١٣٨)، Bacumq2 (٣٠) و کلاله گلرنگ) و نمونه‌ها ی خشک زعفران (١٦)، فلفل قرمز (١٧) و زردچوبه (١٨).

Fig. 1- PCR analysis , (1,2,3,4,5) fresh leaf samples of corn cultivars (260, 400, 704, Consule, corn stigmas), (6,7,8,9,10) four different samples of pomegranate and its stigmas, (11,12,13,14,15) four different cultivars of safflower and its stigmas, (16) saffron stigma, (17) red capsicum and (18) turmeric .

در شکل ۲ تصویری از نتایج PCR مربوط به تکثیر هر یک از نمونه‌ها (مخلوط DNA تمام ارقام یک گونـه) بـا

استفاده از مجموعه ای از آغازگرها آورده شده است که این مجموعه نیز قادر به تکثیر تمامی نمونه ها در یک واکنش PCR بودند.



شکل ۲- واکنش PCR با هر یک از آغازگرها بر روی هر یک از نمونه ها ، چاهک ۱: مارکر اندازه، ۲: زعفران،۳: گوشت، ٤: زردچوبه، ٥:گلرنگ، ٦: ذرت، ۷: انار

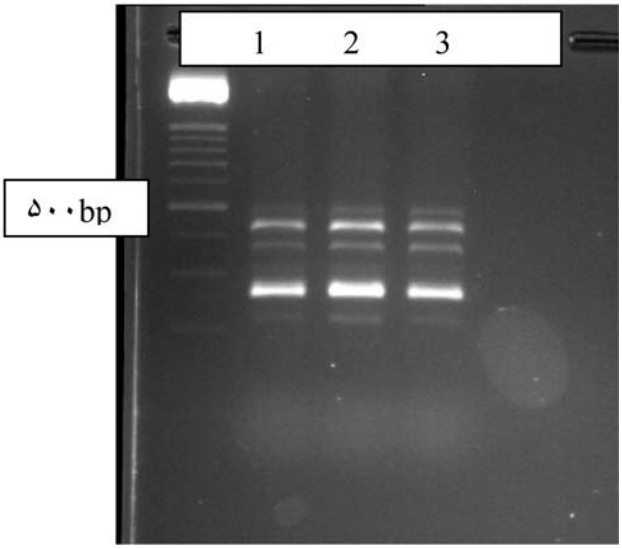
Fig. 2- PCR with each primer on samples: (1) size marker, (2) saffron, (3) meat, (4) turmeric, (5) safflower, (6) corn, (7) pomegranate.

واکنش PCR چندگانه

با توجه به این‌که استفاده از آغازگرهای جدید برای مشاهده انفرادی برخی باندها مناسب تر تشخیص داده شد، لذا از آغازگرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCR در نمونه‌های مخلوط یک درصد ، پنج درصد و ده درصد از انواع تقلبات استفاده شد و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری گردید (شکل ۳). همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود آغازگرهای جدید برای تمامی تقلبات قادر به تکثیر باند اختصاصی بوده و بر روی ژل آگارز دو درصد حداقل ۵ باند قابل رؤیت است. قابلیت این روش به حدی بالا است که قادر به تشخیص مقادیر در حد یک درصد از انواع تقلبات نیز می‌باشد.

تفکیک باندها بر روی ژل پلی آکریل آمید

در شکل ۴ تفکیک باندها بر روی ژل پلی آکریل آمید نشان داده شده است. تصویر نشان می‌دهد که ژل پلی-آکریل آمید قادر است به خوبی باندهای مربوطه را بر روی ژل از یکدیگر تفکیک نماید. اما از آنجایی‌که معمولاً استفاده از ژل پلی‌آکریل آمید معمولاً با مشکلاتی مواجه است لذا توصیه می‌شود که از ژل‌های آماده برای همین منظور استفاده شود.



شکل۳- واکنش PCR چندگانه با استفاده از مخلوط آغازگرها بر روی ژل آگارز ۲ درصد (۱: مارکر اندازه، ۲، ۳ و ٤- به ترتیب مخلوط یک درصد، پنج درصد و ده درصد از تقلبات).

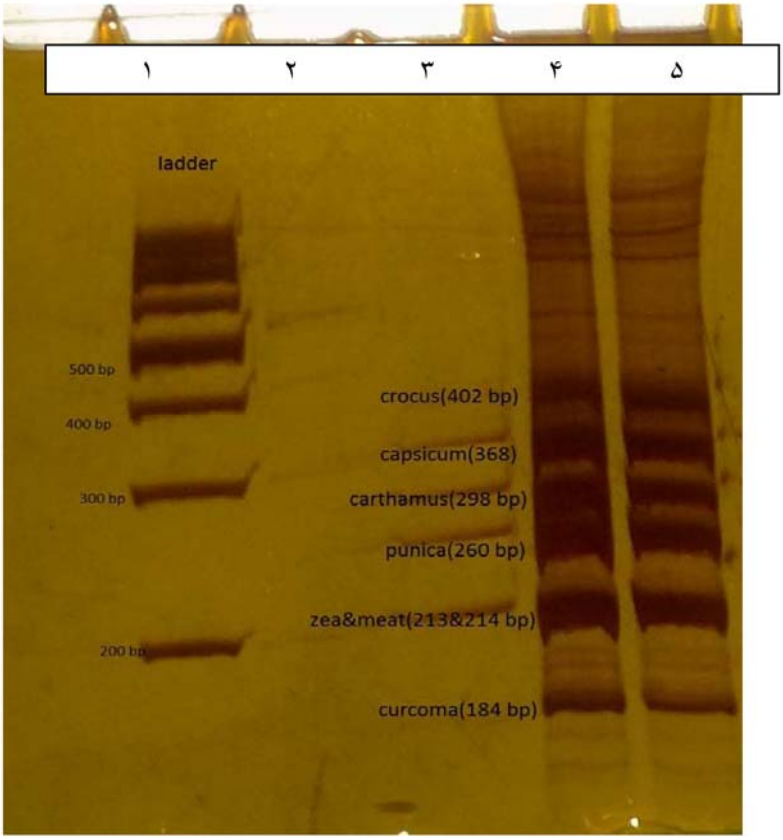
Fig. 3- PCR reaction by mixed primers loaded on 2% agarose gel (1, size marker, 2, 3, 4, different mixes (1%, 5% and 10%) of fraudulents.

در تصویر ۴ مشاهده می‌شود که زعفران با تکثیر یک نوار ۴۰۲ جفت بازی در بالاترین قسمت تشکیل یک نوار را داده است و فلفل (۳۶۸ جفت باز)، گلرنگ (۲۹۸ جفت باز)، انار (۲۶۰ جفت باز)، ذرت (۲۱۳ جفت باز)، گوشت (۲۱۴ جفت باز) و زردچوبه (۱۸۴ جفت باز) در اندازه‌های بعدی تشکیل باند داده‌اند. بنابراین نتایج نشان دهنده پراکندگی مناسب بین این گونه‌ها می‌باشد و با استفاده از مارکر ITS-2 می‌توان زعفران را از گونه‌هایی که ممکن است به‌عنوان تقلب مخلوط با آن استفاده شوند شناسایی کرد.

برای کنترل کیفیت محصولات و کشف تقلبات و رسیدگی به جرایم، تشخیص گونه‌ها امری ضروری است. برای تشخیص گونه‌ها و حتی واریته‌ها به‌صورت خام و فرآوری شده روش‌هایی ثبت شده است که در محصولات گیاهی، غذاهای دریایی و منسوجات به‌کار می‌رود (Ma et al., 2006). استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی و کشف تقلبات کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده است. این روش‌ها از دقیق‌ترین روش‌ها برای شناسایی مواد و نمونه‌های گیاهی، جانوری و میکروبی می‌باشند، زیرا از DNA برای تجزیه و تحلیل استفاده می‌کنند. این روش‌ها قابل اعتماد بوده و دارای کاربردهای بالقوه‌ای در تشخیص تقلبات مواد غذایی هستند. ظهور روش‌های مبتنی بر DNA سهم مهمی را در حفاظت نام‌های تجاری با کیفیت بالا و محافظت از حقوق مصرف کننده دارد.

مطالعات متعددی نشان داده که توالی ITS در DNA ریبوزومی توالی تغییرپذیری است که برای مطالعات فیلوژنتیکی در بسیاری از خانواده‌های قارچ‌ها و یوکاریوت‌ها مناسب است زیرا وراثت دو والدی، فراگیری، آسانی، یکسانی داخل گونه‌ای، تغییر پذیری بین گونه‌ای و تعداد کپی زیاد باعث برتبری آن شده است (Feng at al., 2009).

به‌عنوان مثال (Ngan et al., 1999)، برای شناسایی ۶ گونه *Panax* از هم و دو گونه *Mirabilis jalapa* و *Phytolacca acinosa Roxb* که گونه‌های تقلبی و سمی آنها هستند، از آنزیم‌های برشی در ناحیه ITS -1 استفاده کرد که ۱۰ درصد از آلودگی *P. gensing* از *P. quinquefolius* مشخص شد و همچنین از گونه‌های سمی آن مجزا شد. نتایج این تحقیق نیز تأیید نمود که کاربرد نشان‌گر ITS می‌تواند در شناسایی تقلبات معروف گیاهان دارویی نظیر زعفران سودمند باشد.



شکل ٤- واکنش PCR نمونه‌های مخلوط بر روی ژل پلی آکریل آمید ۲۰ درصد. چاهک ۱ ، مارکر اندازه ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۲، کنترل منفی و چاهک ٤ و ٥ نمونه‌های مخلوط یک درصد و پنج درصد از تقلبات.

Fig. 4- PCR reaction by mixed primers loaded on 20% polyacrylamide gel (1, size marker, 2, negative control, 4 and 5: different mix (1%, 5%) of fraudulents.

منابع

1. Choo, B.K., Moon, B.C., Yunui, J., Kim, B.B., Choi, G., Yoon, T. and Kim, H.K. 2009. Development of SCAR Markers for the Discrimination of Three Species of Medicinal Plants, *Angelica decursiva* (*Peucedanum decursivum*), *Peucedanum praeruptorum* and *Anthricus sylvestris*, Based on the Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence and

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Biological & Pharmaceutical Bulletin 32(1): 24-30.

2. Chu, K., Li, C., and Ho, H., 2001. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in crustacea. Biotechnology 3: 355–361.

3. Dhanya, K., and Sasikumar, B. 2010. Molecular marker based adulteration detection in traded food and agricultural commodities of plant origin with special reference to spices. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 1: 454-489.

4. Dnyaneshwar, W., Preeti, C., Kalpana, J. and Bhushan, P. 2006. Development and Application of RAPD-SCAR Marker for Identification of *Phyllanthus emblica* LINN. Biological & Pharmaceutical Bulletin 29: 2313-2316.

5. Feng, T., Liu, S., and He, X., 2009. Molecular authentication of the traditional chinese medicinal plant *Angelica sinensis* based on internal transcribed spacer of nrDNA.. Electronic Journal of Biotechnology 13: issue 1-fulltext-13.

6. Javanmardi, N., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Sharifi, A., and Hemati Kakhki, A. 2012. Identification of Safflower as a fraud in commercial Saffron using RAPD/SCAR, Journal of Cell and Molecular Research 3: 31-37.

7. John, P., Melny, K., Sunan, W., Massimo, F., and Marcone, B. 2010. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Research International 43: 1981–1989.

8. Kalpana, J., Preeti, C., Dnyaneshwar, W., and Patwardhan, B. 2004. Molecular markers in herbal drug technology. Current Science 87: 2-25.

9. Ma, X., Zhu, D., Li, S., Dong, T., and Tsim, K. 2006. Authentic identification of stigma Croci (stigma of *Crocus sativus* L.) from its adulterants by molecular genetic analysis. Planta Med 2: 183-186.

10. Mariniello, L., Sommella, M., Sorrentino, A., Forlani, M., and Porta, R. 2002. Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. Biotechnology Letters 24: 749–755.

11. Ngan, F., Shaw, P., But, P., and Wang, J. 1999. Molecular authentication of Panax species. Phytochamistry 5: 787-91.

12. Saghai Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen R.A., and Allard, R.W. 1984. Ribosomal spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Academic Science USA. 81: 8014-8019.

13. Sun, Y., Liaoa, Y., Hunga, Y., Changa, J., and Sungb, J. 2010. Development of ITS sequence based SCAR markers for discrimination of *Paphiopedilum armeniacum, Paphiopedilum micranthum, Paphiopedilum delenatii* and their hybrids. Scientia Horticulturae 127: 405–410.

Molecular detection of some plant and non-plant frauds in commercial saffron using ITS marker

N. Moshtaghi[1]*, E. Hamidi[2], A. Bagheri[1], A. Sharifi[3] and A. Hemati Kakhki[4]

Submitted: 13-06-2013
Accepted: 12-08-2013

Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is the most valuable food additive in the world which little production and high price of it caused some adulterations such as plant and chemical material similar to saffron. There are several methods for detecting these fraudulent based on morphological and chemical tests but they are not effective in some cases. In this research a novel molecular method based on ITS-2 marker is introduced. A common forward primer based on 5.8s rDNA for all plant frauds such as safflower, corn stigmas, pomegranate, turmeric and capsicum slices was designed then specific reverse primers based on ITS-2 for any frauds have been designed for polymerase chain reaction. Related ITS-2 bands were amplified in any adulterations in saffron. Specific primer for camel and cow meet fibers was designed based on cytochrome b gene and could amplified the related bands. Multiplex PCR with all of these primers could amplify all of the bands related to any adulterations. Furthermore, using 20% polyacrylamide gel lead to good segregation of bands. This method can be used successfully for detection of low percentage (1%) of fraudulent in saffron. So this marker can be used efficiently for detection of these frauds in commercial saffron.

Key words: Fraud Saffron, ITS marker, Polymerase chain reaction

1, 2, 3 and 4- Assistant professor, Faculty of Agriculture, Professor, Biotechnology Research Center, Ferdowsi University, Mashhad, Iran. Msc Student of Agricultural Biotechnology, Ferdowsi University, Mashhad, Iran. Iranian Academic Culture for Education, Culture and Research-Branch, Mashhad, Iran respectively.
(*- Corresponding author Email: Moshtaghi@um.ac.ir)