التحري عن محصول الذُرة *Zea mays* المحورة وراثياً في الاسواق العراقية

Screening of genetically modified Corn *Zea mays* in Iraqi market

غيث لطفي عارف بلال كامل سليمان* زهرة محمود الخفاجي**

وحدة النهرين للدنا العدلي / جامعة النهرين
*كلية العلوم / جامعة النهرين
**معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد

Ghaith Lotfi Aarif Bilal Kamil Sulaiman* Zahra M. Alkhafaji**
Al-Nahrain Forensic DNA Training Unit/ Al-Nahrain University
* College of Science / Al-Nahrain University
**Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate/ Baghdad University

المستخلص

يتم التحري عن المحاصيل الزراعية المحورة وراثيا بالبحث عن بعض الواسمات التي تكون في العادة مستخدمة اثناء عمليات التحوير ، تم في هذه الدراسة التحري عن محصول الذرة الصفراء المحورة وراثيا بأستخدام تقنية تفاعل كوثرة سلسة الدنا (PCR) للكشف عن وجود كل من الممهد P35s و الفاصل nos terminator . جمعت 72 عينة بذور من محصول الذرة الداخل الى السوق العراقية من مصادر مختلفة شملت محاصيل مستوردة واخرى محلية مستخدمة لأغراض الزراعة او لإنتاج الاعلاف الحيوانية . استخلص الحامض النووي DNA بطريقتين وتمت مقارنة كفاءة الاستخلاص في كل منهما ، تم قياس نقاوة و تركيز الحامض النووي للعينات المستخلصة حيث تراوحت نسبة النقاوة بين 1.4- 1.8 للعينات المدروسة ، بينما تراوحت قيم التراكيز (500-2400) نانوغرام/ مايكروليتر، تم التأكد من نقاوة وخصوصية الـــ DNA المستخلص بأستخدام بادئات خاصة بالجين المسؤول عن إنتاج بروتين زئين Zein وهو احد بروتينات الخزن الخاصة في نبات الذرة وكانت جميع العينات موجبة لهذا الاختبار ، مما يؤكد صلاحية DNA المستخلص لإجراء تفاعل PCR ، بينت نتائج التحري عن التواليات المسؤولة عن تنظيم عملية التعبير الجيني وهي الممهد P35s والتوالي المسؤول عن انهاء التعبير الجيني الفاصل nos terminator ، ان 10 عينات (13.9 %) من مجموع 72 عينة شملتها الدراسة هي محورة وراثيا وأعطت نتيجة موجبة لتفاعل PCR بأستخدام البادئات المتخصصة لكل من P35s و T-nos في لوقت نفسه ، كما أشارت النتائج إلى أن ما نسبته 19.14% من العينات المدروسة والمستوردة لحساب الجهات الحكومية هي محورة وراثيا حيث أعطت 9 عينات من أصل 47 عينة تم جمعها من المؤسسات حكومية ، نتيجة موجبة عند استخدام البادئات المتخصصة لكل من الممهد P35s و الفاصل T-nos ، لغرض اختصار الوقت والجهد والكلفة استخدمت تقنية Multiplex PCR بنجاح في التحري عن موقعين مختلفين في ظروف تفاعل PCR نفسها بأستخدام زوجين متخصصين من البادئات في الوقت نفسه هما اما Zein و P35s أو Zein و T-nos.

Abstract:

Detection of the genetically modified crops could be done by screening certain markers usually used in modification. In this study polymerase chain reaction (PCR) technology was used to investigate the presence of the promoter P35s and nos terminator in the genetically modified corn *Zea mays*. 72 samples of the maize crop collected from inside Iraqi market from various sources, including imported crops and other local strains used for agriculture or for the production of animal feed. DNA extracted from the corn seeds by two methods, the efficiency of extraction was compared between the two procedures, the purity of DNA samples extracted ranged between 1.4 -1.8 of the samples studied, while the ranged values for concentrations ranged from (500-2400) ng /µl, specificity of the DNA extracted was confirmed using *Zea mays* specific gene responsible for production of Zein protein, a storage protein. Results shows that all the samples

were positive for this gene, results of the investigation of sequence responsible for regulating gene expression for promoter P35s and T-nos terminator, should that 10 samples 13.9% of the total 72 samples studied are genetically modified and gave positive results for the amplification of PCR using primers specialized for each of the P35s and T-nos. The results indicated that (9 out of 47) represent 19.14% of the samples studied imported for the government institutions were genetically modified. Multiplex PCR technique used for the detection of two types of the targets at the same reaction to reduce the time and efforts. Multiplex PCR successfully applied for two combinations of either zein and P35s or zein and nos.

المقدمة

يطلق على المحاصيل التي تم التلاعب بها وتغيير مادتها الوراثية بالمحاصيل المحورة وراثياً Genetically Modified Crops او المحاصيل المهندسة وراثياً Genetically Engineered Crops ، ويطلق عليها ايضاً Biotech Crops او Transgenic Cropsجميع هذه المصطلحات تدل على أن هذه المحاصيل تم تغيرها عن الطرز البرية على المستوى الجزيئي[1،2] .

ان استخدام تقنيات التحوير الوراثي مقتصرة على بلدان محددة ولمحاصيل معينة وان لكل بلد تحفظاته الخاصة حول التقنية الحيوية الزراعية سواء على مستوى زراعة المحصول او استهلاك المنتجات الغذائية التي تحوي مكوناتها محاصل محورة وراثياً والإشارة الى نسبة التحوير مع مكونات المنتج [3] ، و اهم المحاصيل المحورة وراثياً المعتمدة عالميا هي فول الصويا والذرة والرز والطماطة ، أرتفعت مساحة الاراضي المزروعة بهذه المحاصـــيل عالميا من 170 مليون دونم سنة 1996الى 1.02مليار دونم سنة 2006 [4] وبلغت المساحة المزروعة 1.66 مليار دونم سنة 2008 و1.80 مليار دونم سنة 2009 ، وارتفع عدد البلدان التي تسمح بزراعة المحاصيل المحورة وراثياً من 25 بلد سنة 2009[5] الى 29 بلد سنة 2010 [6] بلغت المساحة المزروعة بمحصول الذرة المحور وراثياً GM corn 22.5 مليون دونم سنة 2006 [7] ، 373 مليون دونم سنة 2008 [4] و417 مليون دونم سنة 2009 [5] ، يعد محصول الذرة المحور وراثيا ثاني محصول رئيس مزروع في العالم بعد فول الصويا المحور وراثيا الذي يحتل المرتبة الاولى عالمياً [6] .

ان الهدف الاساسي من التحوير الوراثي للمحاصيل هو زيادة الانتاج بشتى الوسائل لحل مشكلة المجاعة وسد النقص الحاصل بالغذاء وتقليل الفجوة ما بين الزيادة السكانية والانتاج ، فضلاً عن الاهتمام بصورة أساسية بتحسين القيمة الغذائية للمحاصيل [8] .

ادت الزيادة الحاصلة في استخدام المحاصيل المحورة وراثياً كغذاء للإنسان أو كأعلاف حيوانية الى اهتمام الباحثين في المجال الزراعي والطبي وعلوم الغذاء والحكومات بدراسة التأثيرات الناجمة عن استهلاكها بسبب وجود قلق حول استهلاك هذه المحاصيل على مدى طويل وما يمكن ان تسببه من تأثيرات على صحة الانسان والحيوان [9] .

لقد تم تقييد دخول المحاصيل او المنتجات الحاوية على محاصيل محور وراثياً في مكوناتها الى الدول بقانون يضبط هذه العملية حيث توجد دول تسمح بتداول هذه المنتجات بشكل محدود ودول أخرى مثل الاتحاد الاوربي لا تسمح بدخولها ألا اذا تمت الاشارة الى وجودها ضمن مكونات المنتج وضمن نسب محددة [3] ، وفي العراق تمنع التشريعات النافذة من دخول الاغذية المحورة وراثياً وموادها الاولية وطلب شهادة صحية للمواد الغذائية المستوردة للقطاع الحكومي والمختلط والخاص وموادها الاولية والمواد العلفية تبين خلوها من وجود التحوير الجيني او كائنات محورة وراثياً (قرار الهيئة الاستشارية للأغذية والمرقم 128 في 7 /9 /2002 م) .

هدفت الدراسة الحالية الى الكشف عن الذرة المحورة وراثيا الداخلة الى السوق العراقية دون الاشارة الى كونها محورة وراثيا وكذلك الى وضع اساس طريقة جزيئية معتمدة على DNA في الاستدلال على وجود التحوير الوراثي وتوفير الاليات المتقدمة التي يحتاجها الجهاز الرقابي في تطبيق التشريعات الصادرة بهذا الخصوص .

المواد وطرائق العمل

بلغت العينات المجموعة 72 عينة من بذور الذرة جمعت بصورة عشوائية وحسب الطرق المعتمدة [10] من مناطق ومصادر مختلفة من العراق وكما مبين في جدول(1) .

ان 66.25 % من العينات تم جمعها من المؤسسات الحكومية ،33.75% من القطاع الخاص ، 17.5 % منها تم استيرادها لإنتاج الاعلاف الحيوانية ، 32.5%عينات مصادق عليها مستخدمة للزراعة وحوالي 50% مستخدمة لمختلف الاغراض منها لأغراض الدراسة ومنها للاستهلاك والزراعة .

جدول (1) : مصادر جمع العينات المستخدمة في الدراسة الحالية

الجهة	بغداد	الانبار	التأميم	السليمانية	اربيل	عدد العينات
القطاع الحكومي	47	-	-	-	-	47
القطاع الخاص	9	5	7	2	2	25
المجموع	56	5	7	2	2	72

تحضير البذور لعملية استخلاص الحامض النووي

تم طحن 100 غرام من بذور كل عينة بأستخدام جهاز طحن اعتيادي مع مراعاة التنظيف المستمر بين عينة وأخرى ، حفظ مسحوق بذور الذرة جافاً في 4 مْلحين الاستخلاص .

استخلاص الحامض النووي DNA:

تم أستخدام عدتين لاستخلاص الحامض النووي الكلي . الاولى عدة متخصصة لاستخلاص الحامض النووي الكلي من المحاصيل المحورة وراثيا أو منتجاتها بأستخدام High Pure GMO Sample Preparation Kit (شركة Roche) . والثانية كانت باستخدام عدة مصنعة من (شركة Promega) وهي Wizard® Genomic DNA Purification Kit ، تم الاستخلاص وفق ارشادات الشركة المرفقة مع العدة المستخدمة .

قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي

تم قياس تركيز DNA ونقاوته وذلك بقياس الكثافة الضوئية (Optical Density (O.D. ، اذ يتم قياس التركيز بعد تخفيف العينة 100 مرة بالماء المقطر الخالي من الايونات Deionized Water وقراءة مقدار امتصاصية العينة المخففة بجهاز المطياف الضوئي عند الطولين الموجيين(260، 280) نانومتر وحسب الطريقة المعتمدة من قبل [11] .

الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز Agarose Gel Electrophoresis

أجري الترحيل الكهربائي للكشف عن وجود الـــ DNA بعد الاستخلاص و بعد اجراء تفاعل PCR بأستخدام تراكيز مختلفة من هلام الاكروز حسب الغرض من الترحيل حيث يحضر الاكروز بتركيز0.8 % للكشف عن الـــ DNA الكلي أو 2.5 % للكشف عن ناتج تفاعل PCR [11] .

الظروف المثلى لكوثرة الحامض النووي

اختيار البادئات المتخصصة ومقارنتها مع قواعد البيانات العالمية

اختيرت البادئات وفق المعايير الخاصة في الكشف عن التحوير الوراثي [12] وحسب جدول (2) .

حيث تم التأكد من صحة توالي البادئات المختارة بالمقارنة مع قواعد البيانات العامة الموجودة على شبكة موقع المركز الوطني لمعلومات التقنيات الاحيائية National Center for Biotechnology Information ، ثم اجريت عملية المطابقة والاصطفاف للبادئات بأستخدام برنامج BLASTN .

تحضير البادئات

اضيف الماء المقطر الخالي من الايونات الى الانبوبة الحاوية على البادئات التي تكون بشكل مجفف Lyophilized للحصول على محلول خزين بتركيز 100 بيكومول/مايكرولتر ، ثم تم اجراء التخفيف النهائي الذي يدخل في التفاعل 10 بيكومول /مايكرولتر .

جدول (2) : توالي القواعد النيتروجينية للبادئات المستخدمة

البادئ	التوالي	موقع الهدف	حجم الحزمة زوج قاعدي	المرجع
Zein 03	5’-AGT GCG ACC CAT ATT CCA G-3’	Gene *zein*	277	[14]
Zein 04	5’-GAC ATT GTG GCA TCA TCA TTT-3’			
P35S 1-5	’5’-ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T-3	CaMV p35S promoter	101	
P35S 2-3	5’-CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T-3			
nos-F	5’-GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG-3’	NOS terminator	118	[16]
nos-R	5’-GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC-3’			

تفاعل كوثرة توالي سلسة الحامض النووي Polymer chain reaction (PCR)

اجري تفاعل PCR للتحري عن محصول الذرة المحورة وراثيا بأستخدام تقنية PCR و تفاعل PCR المتعدد Multiplex PCRحيث اجري تحضير خليط التفاعل بحجم النهائي 25 مايكرولتر بإضافة 12.5 مايكروليتر من المزيج الرئيس للتفاعل بقوة X2 والذي يحتوي على انزيم الكوثرة Taq. Polymerase بتركيز نهائي 0.3 وحدة للتفاعل وكلوريد المغنيسيوم بتركيز نهائي قدره 1.5 مليمولر والقواعد النيتروجينية 200ملیمولر . اضيفت البادئات الى التفاعل بتركيز نهائي 0.2 مايكرومولر من البادئ Zein و T-nos وتركيز 0.1 مايكروليتر من البادئ P35s وأخيرا يضاف الحامض النووي المستخلص بتركيز نهائي قدره 400 نانوغرام ثم يكمل الحجم الى 25 مايكرولتر بإضافة الماء المقطر المعقم الخالي من الايونات .

تم تحضير مكونات تفاعل Multiplex PCR بنفس الطريقة السابقة عدا انه تمت اضافة البادئات Zein و T-nos في الوقت نفسه في التجربة الاولى و البادئ Zein مع البادئ P35s في التجربة الثانية وبتركيز 0.2 مايكرومولر لكل من البادئ Zein و T-nos في التجربة الاولى و 0.2 للبادئ Zein و 0.1 مايكرومولر للبادئ P35s للكشف عن اكثر من هدف في تفاعل PCR واحد .

برنامج تفاعل PCR

استخدمت في التجارب الاولية الظروف التي اشار اليها [14] ، بعد ذلك تم تحديد الظروف المثلى لكل بادئ بتغير درجة حرارة الالتحام وكذلك الوقت. وتم تحديد درجة حرارة الالتحام Annealing Temperature التي تساوي- 5 درجات من قيمة Tm المحسوبة [13] . يبين جداول 3 (أ، ب ، ج) الظروف الاولية لبرامج التفاعل PCR [14] لكل البادئات المستخدمة في الدراسة الحالية .

جدول (3-أ): ظروف تفاعل PCR للبادئ Zein 03,Zein 04

المرحلة	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
مرحلة مسخ DNA الابتدائية	95مْ	4دقائق و 30 ثانية	دورة واحدة
مسخ DNA	96 مْ	دقيقة و45 ثانية	
الالتحام	60 مْ	2 دقيقة	
الاستطالة	72 مْ	دقيقة و 45 ثانية	
	عدد الدورات = 40 دورة		
مرحلة الاستطالة النهائية	72 مْ	4دقائق و 50 ثانية	دورة واحدة

جدول (3 -ب): ظروف تفاعل PCR للبادئ P35s F,P35s R

المرحلة	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
مرحلة مسخ DNA الابتدائية	95مْ	10 دقائق	دورة واحدة
مسخ DNA	95 مْ	دقيقة واحدة	
الالتحام	55 مْ	2 دقيقة	
الاستطالة	72 مْ	2 دقيقة	
	عدد الدورات = 45 دورة		
مرحلة الاستطالة النهائية	72 م^0	7 دقائق	دورة واحدة

جدول (3-ج) : ظروف تفاعل PCR للبادئ T-nos F, T-nos R

المرحلة	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
مرحلة مسخ DNA الابتدائية	95مْ	10دقائق	دورة واحدة
مسخ DNA	95 مْ	25 ثانية	
الالتحام	62 مْ	30 ثانية	
الاستطالة	72 مْ	45 ثانية	
	عدد الدورات = 50 دورة		
مرحلة الاستطالة النهائية	72 مْ	7 دقائق	دورة واحدة

تفاعل PCR المتعدد Multiplex PCR

تم تهيئة الظروف المناسبة لأجراء التفاعل المتعدد Multiplex PCR عن طريق تحديد درجة الالتحام المثلى ووقت كل مرحلة من مراحل التفاعل لارتباط البادئات مع مكملتها على قطع الجينات المراد الكشف عنها باستخدام جهاز Master Cycler Gradient PCR (شركة Eppendorf) ، وأستخدم برنامج تفاعل PCRالمتعدد للبادئات المنتخبة لهذه الدراسة بعد تحديد الظروف المثلى لكل مرحلة من مراحل التفاعل المبين في جدول(4) :

جدول (4): البرنامج تفاعل PCR المتعدد Multiplex PCR

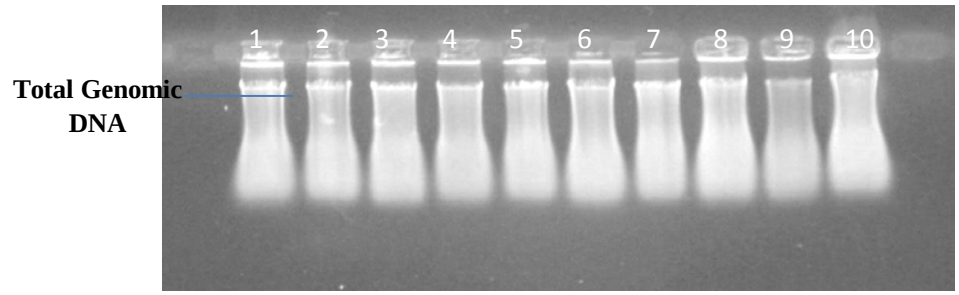
المرحلة	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
مرحلة مسخ DNA الابتدائية	95م°	10 دقائق	دورة واحدة
مسخ DNA	95 م°	30 ثانية	
الالتحام	57 م°	35 ثانية	
الاستطالة	72 م°	40 ثانية	
عدد الدورات = 45 دورة			
مرحلة الاستطالة النهائية	72 م°	7 دقائق	دورة واحدة

النتائج

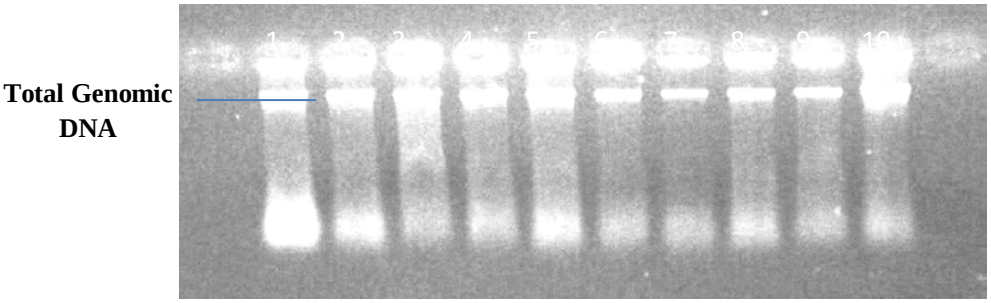
استخلاص الحامض النووي الكلي Total Genomic DNA Extraction

اظهرت التجارب الخاصة باستخلاص الحامض النووي الى نجاح عملية استخلاص الدنا من بذور نبات الذرة حيث تراوحت نسبة النقاوة من 1.5 -1.8 وكان التركيز من 700-2400 نانوغرام/مايكرولتر شكل (1) عند استخدام العدة High Pure GMO Sample Preparation Kit ، وعند استخدام العدة المصنعة من شركة Promga نوع Genomic DNA Purification Kit Wizard® ، تتراوح نسبة النقاوة ما بين 1.4-1.6 وتركيز DNA 500-700نانوغرام/مايكرولتر .

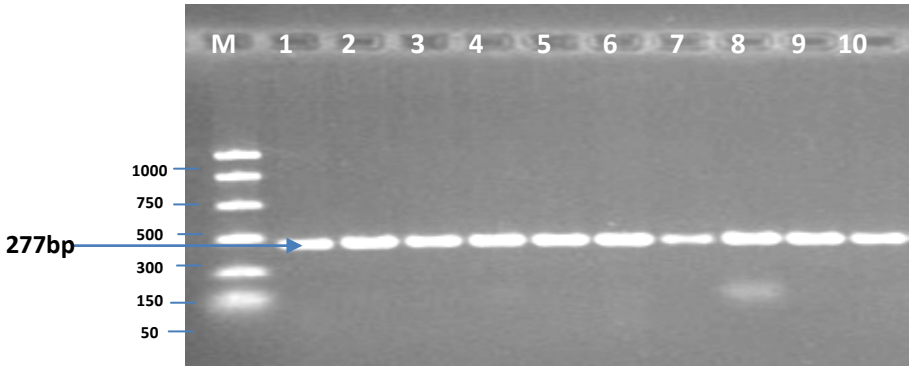
الشكلين (1 ,2) يوضح حزم DNA الكلي لعشر عينات تم اختبارها لمقارنة طريقتين للأستخلاص ، اجري تفاعل PCR للعينات المستخلصة بكلتا العدتين حيث أعطت نتيجة موجبة للبادئ المتخصص بالكشف عن جين *zein* الذي يشفر لتكوين بروتين الزئين Zein ، ويمكن ملاحظة نتيجة تفاعلPCR كما هو مبين بالشكلين(3-أ،3-ب)



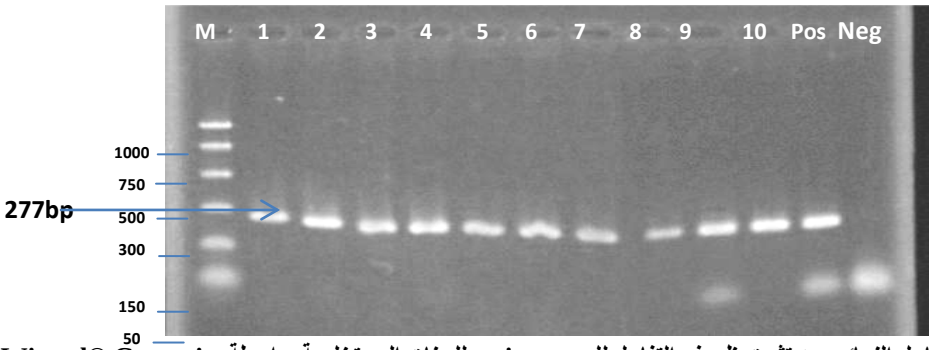
شكل(1): أستخلاص العينات من1-10 بأستخدام عدة مخصص في الكشف عن التحوير الوراثي High Pure GMO Sample Preparation Kit (شركة Roche)



شكل(2): أستخلاص العينات من1-10 بأستخدام عدة استخلاص الدنا من مصادر مختلفة Wizard® Genomic DNA Purification Kit (شركة Promega)



شكل(3-أ):التفاعل النهائي بعد تثبيت ظروف التفاعل لـ *zein* gene للعينات المستخلصة بواسطة High Pure GMO Sample Preparation Kit ، تمثل المسارات من 1الى 10 عينات محصول الذرة المستخدمة في هذه الدراسة ، المسار M:يمثل الدليل الحجمي Bench top PCR marker ، تركيز هلام الاكروز 2.5 % ، وقت الترحيل 2 ساعة .

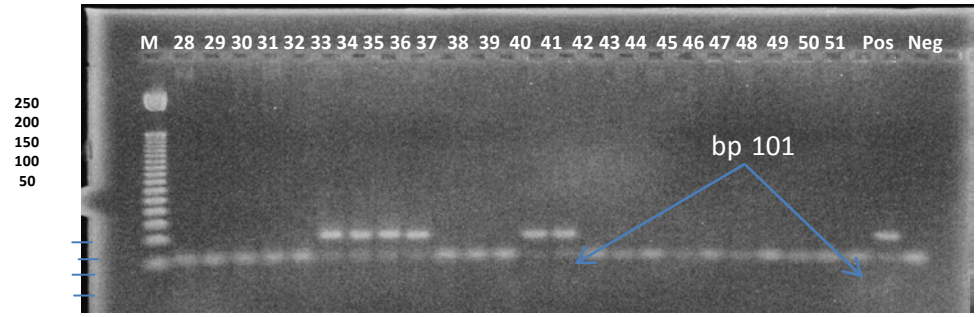


شكل (3- ب): التفاعل النهائي بعد تثبيت ظروف التفاعل لـ *zein* gene للعينات المستخلصة بواسطة Wizard® Genomic DNA Purification Kit ، حيث تمثل المسارات من 1الى 10 عينات محصول الذرة المستخدمة في هذه الدراسة ، ويمثل المسار M : الدليل الحجمي Bench top PCR marker والمسار Pos :DNA قياسي يحتوي على الجين *zein* من شركة Sacace ، ويمثل المسار Neg : خليط تفاعل بدون اضافة DNA ، تركيز هلام الترحيل الاكروز2.5 % ، وقت الترحيل 2 ساعة .

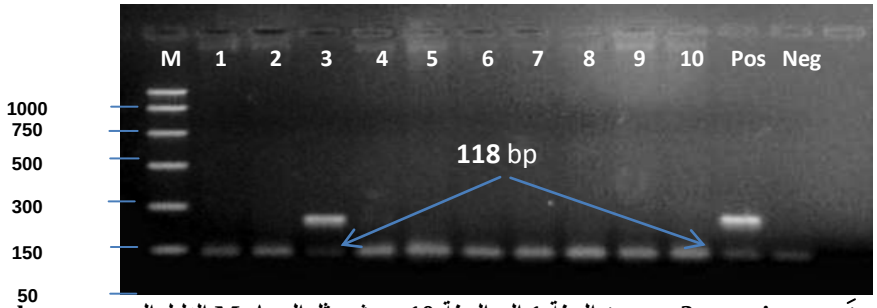
ان استخدام High Pure GMO Sample Preparation Kit في استخلاص DNA أعطى نتائج متميزة من حيث النقاوة وتركيز الدنا المستخلص وهذا يوافق Vogelstein و Gillespie اللذان اشارا الى امكانية استرداد DNA المرتبط مع الياف الصوف الزجاجي بكفاءة عالية ونوعية جيدة والتي تمثل الالية التي تعتمد بها العدة [15] اضافة الى كونها طريقة سريعة و يمكن أجراء تفاعل PCR مباشرة بعد أسترداد DNA وفك ارتباطه مع الياف الصوف الزجاجي Glass fiber fleece .

التحري عن التحوير الوراثي في محصول الذرة الصفراء

خضعت جميع العينات المدروسة للكشف عن وجود الممهد P35s و الفاصل T-nos terminator ، باستخدام بادئ متخصص للممهد P35s المعزول من العاثي تبقع القرنابيط CaMV virus [14] وبادئ T-nos المتخصص للكشف عن الفاصل nos terminator المعزول من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* [16] جدول (2) ، وهي احدى اشهر الواسمات الدالة على التحوير الوراثي في محصول الذرة [14] حيث ان جميع انواع الذرة المحورة وراثيا تكون حاوية على الاقل نسخة واحدة من الممهد P35s وT-nos يستثنى من ذلك نبات الذرة المحورة وراثيا نوع GA21 أذ يحوي هذا النوع من التحوير على نسختين من nos [12] بينما تحتوي جميع انواع الذرة المحورة وراثيا اما على الممهد P35s أو الفاصل T-nos أو كليهما كما في الذرة نوع MON810 الاوسع انتشارا على المستوى العالمي [17] . حيث تم الكشف عن وجود كل من الممهد P35s والفاصل nos3 بأستخدام تقنية الـPCR بالحجم المتوقع لناتج التفاعل بأستخدام البادئ P35s 101 زوج قاعدي شكل (4) اما البادئ T-nos فان ناتج التفاعل المتوقع 118 زوج قاعدي حيث ظهرت في بعض العينات وعددها 10 شكل (5) .



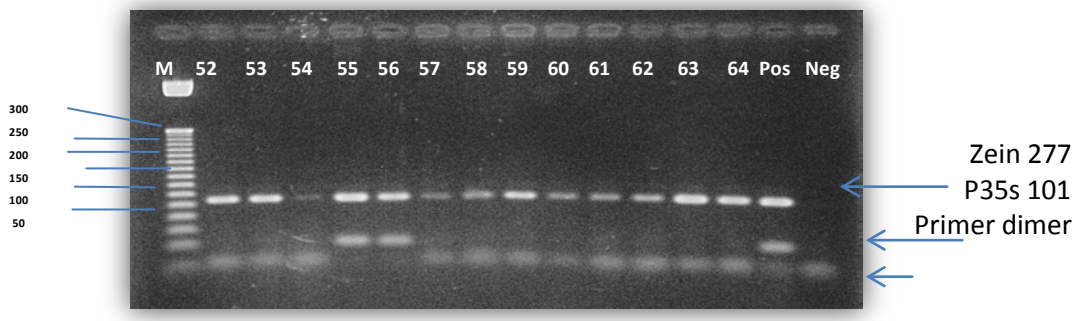
شكل (4) : الكشف عن الممهد P 35s للعينات من العينة 28الى العينة 51 ، حيث يمثل المسار M الدليل الحجمي 50 bp DNA step ladder والمسار Pos يمثل DNA قياسي من سلالة محورة وراثيا بأستخدام P35s (شركة Sacace) ، يمثل المسار Neg خليط التفاعل بدون اضافة DNA ، تركيز هلام الاكروز 2.5 % ، وقت الترحيل 2 ساعة.



شكل(5) :الكشف عنَ nos 3 terminator من العينة 1 الى العينة 10 ،حيث يمثل المسار M الدليل الحجمي Bench top PCR marker والمسار Pos يمثل DNA قياسي من سلالة محورة وراثيا (شركة Sacace) ، يمثل المسار Neg خليط التفاعل بدون اضافة DNA ، تركيز هلام الاكروز 2.5 % ،وقت الترحيل 2 ساعة.

تقنية PCR بأستخدام بادئات متعددة Multiplex (PCR)

يعد استخدام تقنية Multiplex PCR في الكشف عن الكائنات المحورة وراثياGMOs من التقنيات المعمول بها على نطاق واسع في مجال الكشف عن التحوير الوراثي او مجالات الطب السريري والبحث العلمي [18] تمتاز الطريقة بكونها سريعة في الكشف عن اكثر من وقع هدف على الحامض النووي في تفاعل واحد في الوقت نفسه حيث يستخدم فيها زوجان او اكثر من البادئات المتخصصة كل واحد منها للتحري عن هدف معين ، لذا يتعين تحديد الظروف الملائمة لكل بادئ من تركيز محلول التفاعل PCR ، درجة حرارة ، عدد الدورات ، تركيز $MgCl_2$ وتركيز القواعد النيتروجينية داخل محلول التفاعل ، تم اجراء تجارب مختلفة لتحديد درجة حرارة التحام البادئات مع قطعة DNA المستهدفة ، يجب ان لا تقل درجة حرارة التحام البادئات في تفاعل Multiplex عن 55 درجة مئوية [19] . تم اجراء عدة تجارب للحصول على درجة حرارة التحام مناسبة تتلائم مع جميع البادئات المستخدمة في هذا البحث حيث وجد ان درجة حرارة57م هي افضل درجة التحام للبادئات وكما مبين في شكل (6) .



شكل(6): يمثل نتائج تفاعل Multiplex PCR ، للكشف عنZein و P35s في الوقت نفسه ، المسارM يمثل الدليل الحجمي 50 bp DNA step ladder اما المسارات بالأرقام 52-64 تمثل ارقام العينات التي تم استخدامها بالتجربة والمسار Pos يمثل DNA قياسي من سلالة محورة وراثيا بأستخدام P35s (شركة Sacace) ، يمثل المسار Neg خليط التفاعل بدون اضافة DNA تم ترحيل العينات على هلام الاكروز بتركيز 2.5 % ، وقت الترحيل 2 ساعة بأستخدام 5فولت / سنتميتر ، اعطت العينات 55 و56 نتيجة موجبة للكشف بظهور حزمتين معاً (277 زوج قاعدي للبادئ zein و 101 زوج قاعدي للبادئ P35s) .

المناقشة

اجريت عدة تجارب للتأكد من نقاوة الحامض النووي المستخلص وعدم وجود مواد مثبطة لتفاعل PCR بأستخدام بادئات خاصة للجين المستهدف عن طريق الكشف عن جين *zein* الذي لا يوجد الا في نبات الذرة حيث بينت النتائج ان جميع العينات التي تم اختبارها اعطت نتيجة موجبة لهذا الاختبار بمختلف طرق أستخلاص الحامض النووي DNA ، وهذا يؤكد على صلاحية DNA المستخلص لإجراء تفاعل PCR ، كما أظهرت نتائج الفحوص على مستوى الجزيئي بأستخدام تقنية PCR ان 13.9 % من مجموع العينات هي محورة وراثيا .

تم انتخاب 12عينة مجهزة للشركة العامة للبيطرة / مختبر الصحة العامة وسلامة الغذاء بأوقات مختلفة والتي تمثل تقريبا 46% من مجموع العينات المزودة من قبل الشركة اعلاه لضمان عدم تكرار النتائج ، وجد 75%منها هي محورة وراثيا و هذه النسبة تمثل19.14% من عينات المؤسسات الحكومية المنتخبة .

اظهرت الدراسة الحالية ان 3.7% من عينات القطاع الخاص وجد فيها تحوير وراثي ، ان وجود عينات محورة وراثيا متوقع بالرغم من وجود قرار الهيئة الاستشارية للأغذية الا ان ذلك لم يمنع استيراد المحاصيل المحورة وراثيا الى العراق ، اذ لا تتوفر الفحوص المتعلقة بالكشف عن التحوير الوراثي وخاصة في القطاع الحكومي ، وبغياب الرقابة على المواد المستوردة لن يكون بالإمكان تطبيق القانون الذي يمنع من دخول هذه المحاصيل .

وجد في الدراسة الحالية ان 90% من العينات المحورة وراثيا هي ذرة مستوردة للأغراض العلفية مما يشير الى عدم استخدامها في الزراعة في العراق لحد الان ، وهذا يرجع الى الإجراءات المتبعة من وزارة الزراعة و وزارة التجارة بعدم استلام الحبوب المزروعة في العراق ألا اذا كانت بذورها مجهزة من المنافذ الحكومية ومصادق عليها من الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور .

تم في هذه الدراسة تطوير استخدام تقنية Multiplex PCR في الكشف عن نوعين من الجينات في تفاعل PCR واحد بأستخدام بادئين متخصصين في التفاعل نفسه حيث كانت نتائج هذا الاختبار مطابقة للنتائج بأستخدام تفاعل PCR لكل منهما على حده .

يمكن الاستنتاج من خلال نتائج هذه الدراسة عدم توفر الإمكانيات والقدرات الخاصة لمراقبة دخول النباتات المعدلة وراثيا الى البلد رغم وجود القيود والقوانين التي تمنع دخولها لذا من الضروري تطوير الاجراءات العلمية والتقنية للبنى التحتية في مؤسسات الرقابة الحكومية لتكون كفيلة بالكشف عن تلك النباتات ومعرفة مدى توافقها مع قوانين حماية المستهلك وخلوها من الانعكاسات السلبية على الصحة العامة وانسجامها مع القوانين والانظمة والتشريعات المتبعة في العراق التي تحكم وتنظم هذه العملية .

الاستنتاجات

يستنتج من نتائج الدراسة الحالية ان كفاءة الطريقة المستخدمة في الكشف عن التحوير الوراثي بأستخدام زوجي البادئات P35s ، T-nos بشكل منفرد وامكانية تطوير طريقة الكشف لتشمل الكشف عن التحوير الوراثي بأستخدام تقنية Multiplex PCR مما يوفر قدرة على الكشف عن كفاءة عملية استخلاص DNA بالإضافة الى الكشف عن التحوير الوراثي في تفاعل PCR واحد والحصول على نتيجة الفحص بوقت زمني اقل ، كما بينت النتائج دخول محصول الذرة الصفراء المحور وراثيا الى العراق كإحدى مكونات العلائق العلفية وعدم تمكن الاجهزة الرقابية من الكشف عن المحاصيل المحورة وراثيا او منتجاتها الداخلة للعراق .

المصادر

1. James, C. 2005. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2005. ISAAA Briefs No. 34-2005.
2. Viljoen, C, B. Dajee, and G.M. Botha. 2006. Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labeling. Afri. J. Biotech. 5: 73-82.
3. Gruere, G. and S. Rao. 2007. A Review of International Labeling Policies of Genetically Modified Food to Evaluate India's Proposed Rule. AgBioForum. 10: 51-64.
4. James, C. 2008. Global status of commercialized biotech/GM crops. 2008 ISAAA Briefs No. 39-2008.
5. James, C. 2009. Global status of commercialized biotech/GM crops. 2009 ISAAA Briefs No. 41-2009.

6. James, C. 2010. Global status of commercialized biotech/GM crops. 2010 ISAAA Briefs No. 42-2010.

7. James, C. 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops. 2006 ISAAA Briefs No. 35-2006.

8. بدر، صالح محسن .2002 . المحاصيل المعدلة وراثيا بين الرفض والقبول . تشريعات الامان الحيوي وحماية المستهلك . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي العدد 2 : 27-45 . العراق .

9. Adugna, A. and T. Mesfin. 2008. Detection and quantification of genetically engineered crops. J.of SAT Agric. Research. 6:1-10.

10. Paoletti, C. 2003. Sampling for GMO Analysis: The European Perspective.In: "Testing of Genetically Modified Organisms in Foods". F. Ahmed (Ed). Food Products Press, An imprint of The Haworth Press, Inc., NY

11. Maniatis, T, E. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.

12. Ahmed, F. 2003. DNA-Based Methods for GMO Detection: Historical Developments and Future Prospects.In:"Testing of Genetically Modified Organisms in Foods" F. Ahmed(Ed). Food Products Press, An imprint of the Haworth Press, Inc., NY.221-253.USA.

13. Innis, M, D., Gelfand, J, Sninsky and T.White. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA

14. Tung Nguyen, C, R. Son, A. Raha, O. Lai and V. Clemente. 2008. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using molecular techniques in food and feed samples from malaysia and vietnam. International Food Research J. 15: 155-166.

15. Vogelstein, B. and D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 76: 615 - 619.

16. Lipp, M, A. Bluth, F. Eyquem, L. Kruse, H. Schimmel, G. Eede and E. Anklam. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. European Food Research and Technology. 212: 497-504.

17. Querci, M. and M. Mazzara. 2006. Characteristics of Roundup Ready® Soybean MON810 Maize, and Bt-176 Maize.In: "Training Course On The Analysis Of Food Samples For The Presence of Genetically modified Organisms ". M. Querci, M.Jermini and G.V. Eede (Eds.). User Manual European Commission Joint Research Centre.

18. De Lacerda, C, R. Herrera, C. Gonzalez and M. Valdes. 2009. Multiplex-PCR detection of accompanying GMO transgenic sequences. Int. J.of Eng. and Tech. 1: 258-278.

19. Henegariu, O, S. Heerema, G.Vance. and P.Vogt. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. BioTechniques. 23:504-511.