مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2010) ــ المجلد (26) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 311-326

الكشف عن وجود منتجات معدلة وراثياً في الأسواق المحلية

نور الأسعد[1] و غسان حمادة الخياط[2] و أنس خنشور[1]
و عبد الله الطاهر[1] و أحمد عبد القادر[1]

الملخص

حُلّلت في هذا البحث بعض المحاصيل الزراعية والمواد العلفية والأغذية الموجودة في الأسواق المحلية لمعرفة مدى احتوائها على مواد معدلة وراثياً، وذلك باستخدام تقانات البيولوجيا الجزيئية المعتمدة على التفاعل السلسلي للبوليميراز (Polymerase Chain Reaction). جمعت عينات من: الذرة، فول الصويا، عباد الشمس، الشعير، البندورة والخيار. واستخلصت المادة الوراثية (DNA)، ثم أُجريت اختبارات للتأكد من النقاوة وعدم الخلط لعينات الـDNA المعزولة باستخدام بادئات خاصة بالمورثات المستهدفة، مثل اختبار الكشف عن مورث اللكتين في فول الصويا ومورث الـzein في الذرة. وكُشف عن وجود مواد معدلة وراثياً في بعض العينات باستخدام بادئات (primers) خاصة بالأجزاء الأكثر استخداماً في عمليات التعديل الوراثي مثل المحفز Cauliflower mosaic virus (P-35S) والمنهي Nopaline synthase (T-Nos) ومورث مقاومة المبيد العشبي غليفوسات 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ومورث مقاومة الحشرات حرشفية الأجنحة CRYIA(b) ومورث مقاومة الكاناميسين NPTII kanamycine ومورث مقاومة المبيد العشبي BAR ومورث الانتخاب GUS، وذلك بوجود البلازميدات (PGIIMH35-2PS) و(TOP10PGII35S CRYA(b) و TOP10 PGII35SCRYA(c) و(pBI-221) كشاهد إيجابي بالنسبة إلى العينات. أثبتت الدراسة وجود تعديل وراثي في كل من عينات الذرة وكسبة الصويا المستوردة وذلك من خلال وجود المحفز CaMV 35S Promoter والمنهي (NOS terminator)، وكذلك وجود مورث (EPSPS) في عينة كسبة فول الصويا المستوردة، في حين كانت الاختبارات سلبية في المحاصيل المحلية المختبرة.

الكلمات المفتاحية: منتجات معدلة وراثياً، أسواق محلية، بادئات خاصة بالمورثات.

[1] وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، قسم التقانات الحيوية، سورية.
[2] قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Detection of GMOs Existence in the Local Market

N. Alassad[(1)]; Gh. Khayat[(2)]; A.Khanshour[(1)]; A. Altaher[(1)]; and A. Abdul Kader[(1)]

ABSTRACT

In the current study, analysis for some field crops, feed and food products found in the local markets was conducted for GMOs detection using molecular biology techniques based on PCR. DNA was extracted from samples including: corn, soy bean, sun flower, barley, tomato and cucumber, followed by tests to ensure purity of DNA samples using specific primers, such as detection of Lactin and zein genes which are specific to soybean and maize respectively. GMO detection in the studied samples was conducted using specific primers for the most commonly used genes in genetic transformation such as 35 S promoter from Cauliflower mosaic virus, Nopaline synthase terminator (T-Nos), the gene which gives tolerance to glyphosate-herbicide, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), CRYIA(b) gene which confer resistance to insects, NPTII gene which confer resistance to kanamycine, BAR gene which gives tolerance to glyphosate-herbicide, and the selectable marker GUS gene, using the following plasmids as positive control: PGIIMH35S-g2ps1, pBI221, TOP10 PGII35S CRYA(b), TOP10 PGII35S CRYA(c). Tests revealed existence of GMOs in some imported products such as corn, soybean due to the presence of 35S promoter and NOS terminator, and EPSPS gene in soybean, while tests showed negative results in the local crops tested.

Key Words: Feed, Food products, GMOs, Local market, PCR.

[(1)] General Commission for scientific Agricultural Research (GCSAR), Douma, P.O.Box 113, Damascus, Syria.
[(2)] Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

المقـــدمـــة

بلغت المساحات المزروعة بالمحاصيل المعدلة وراثياً 125مليون هكتار في عام 2008 تزرع من قبل 13.3 مليون مزارع في 25 دولة. وشمل التعديل الوراثي العديد من المحاصيل أهمها فول الصويا الذي زرع على مساحة 65.8 مليون هكتار بما يعادل 52% من المساحة العالمية للمحاصيل المعدلة، يليه الذرة على مساحة 37.3 مليون هكتار بما يعادل 24% ثم القطن بنسبة 12.3%، ثم اللفت الزيتي (الكانولا) بنسبة 4.7%. تشمل أهم أغراض التعديل الوراثي مقاومة الحشرات وزيادة تحمل مبيدات الأعشاب، فضلاً عن تحسين الجودة و القيمة الغذائية وغير ذلك (James, 2009). يتم التعديل الوراثي عادة من خلال نقل المورث المانح للصفة المرغوب فيها، والذي يكون موجوداً ضمن تركيب البلازميد (construct) الذي يتألف عموماً من الأجزاء التالية التي تعمل مجتمعة على إعطاء الصفة المرغوب فيها:

- المحفز (Promoter) لعمل المورث، ويعدُّ المحفز المأخوذ من Cauliflower mosaic virus (P-35S) أكثر استخداماً لعملية التعديل الوراثي لأنه يعمل بشكل دائم وجيد مع معظم المورثات.
- المنهي أو (Terminator) الذي يوقف عملية نسخ المورث، ومن أشهرها (T-Nos) (Nopaline synthase) (Weijdeven 2003; Lubeck, 2003; Somma and Querci, 2001; Abdul Kader *et al*., 1999, 2003; Grandillo and Fulton, 2002).
- المورث المانح للصفة المرغوب فيها (المنطقة المشفرة): وقد استُخدم العديد من المورثات لمنح العديد من الصفات المرغوب فيها وأشهرها المورث المسؤول عن مقاومة الحشرات حرشفية الأجنحة في نبات الذرة CRYIA (b) gene و CRYIA (c) gene (Chowdhury *et al*., 2003)، أو مورث مقاومة المبيدات العشبية في نبات فول الصويا EPSPS gene (Vaïtilingom *et al*., 1999)
- المورثات التي تعمل كمؤشرات انتخابية للتمييز بين النباتات المعدلة وغير المعدلة خلال عملية التعديل مثل مورث مقاومة الكاناميسين kanamycine (nptII) والمورث المسؤول عن مقاومة المبيدات العشبية phosphinotricin acetyltransferase (bar gene) (Vaïtilingom *et al*., 1999).

توجد العديد من الطرائق المتبعة للكشف عن المواد المعدلة وراثياً والتي يمكن من خلالها الكشف عن وجود هذه المواد أو كشف هوية المادة المعدلة وراثياً وتحديدها وكميتها. وعموماً تقسم هذه الطرائق إلى نوعين أساسيين هما:

أولاً ــ طرائق تعتمد على كشف الـــDNA :

استخدمت تقنية التفاعل السلسلي للبوليميراز (Polymerase Chain Reaction, PCR) في مجالات متعددة للكشف عن وجود كميات قليلة من الـــDNA وبدرجة عالية من التخصص، وذلك في العديد من الأغذية المعدلة وراثياً كالبندورة وفول الصويا (Ming, 2002) والذرة (Lih *et al*., 2002) وغير ذلك من المحاصيل. وعموماً يمكن أن نميز بين نوعين مختلفين من الـــPCR خلال الكشف عن المواد المعدلة وراثياً، فمنها طرائق غير متخصصة تهدف إلى الكشف عن المقاطع الوراثية المستخدمة بشكل واسع في معظم عمليات التعديل مثل الـــP-35S وT-NOS، والطرائق الأخرى أكثر تخصصاً، تقوم بالكشف عن مورثات معينة تكون أحيانا خاصة بالنوع النباتي وتعطي الصفة المرغوب فيها (Ahmed,1999).

ثانياً ــ طرائق تعتمد على كشف البروتين:

حيث يتم الكشف عن البروتين الذي يشفره المورث بعد القيام بالتعديل الوراثي، وذلك باستخدام تقنية الأليزا التي تعتمد على استخدام أجسام مضادة تقوم بتعرّف على المستضد الهدف الذي يمثل هذا البروتين (Stave *et al*., 2000) Lipp *et al*., (2000).

ومازال الجدل مستمراً حول سلامة مثل هذه المواد، مما يحتّم على البلدان النامية الموازنة بين اهتماماتها التجارية ومسؤوليتها لتحسين كمية المنتجات الزراعية والغذائية ونوعيتها وتوفيرها للناس فضلاً عن التزامها بحفظ التنوع الحيوي وصيانته.

توافق بعض الدول على استيراد النباتات المعدلة وراثياً بصور مختلفة سواء كبذور للزراعة أو بشكل مصنع كالزيوت. وبعض الدول لا تسمح بدخول هذه المنتجات نهائياً، أو تكون ضمن نسب محددة، إذ إن هناك تشريعات وقرارات في العديد من البلدان تنص على ضرورة الكشف عن المواد المعدلة وراثياً وأن تكون النسبة المئوية للتعديل الوراثي أحد مكونات الملصق الغذائي. ففي السوق الأوروبية المشتركة مثلاً، يجب إعلام المستهلك إذا احتوت المادة الغذائية على مواد معدلة وراثياً بنسبة1% أو أكثر (Querci *et al*., 2000).

وعموماً، في سورية، هناك اهتمام ووعي شعبي كبير ومتزايد لحماية التنوع الحيوي وحفظه من الإدخال العشوائي غير المدروس وغير القانوني للمواد المعدلة وراثياً. لذلك، يعدُّ الإدخال المنظم والمدروس للمواد المعدلة وراثياً من الأولويات، ومن ثم فإن القانون الذي ينظم مثل هذا الإدخال والتداول لهذه المواد يعدُّ أمراً ملحاً بغية تنظيم التنوع الحيوي الوافر في سورية وحمايته، ناهيك عن الأسباب الاقتصادية والاجتماعية المترتبة على ذلك. كما أن هناك تشريعات وقوانين قيد الإعداد لتنظم وتحدد تداول وتجارة مثل هذه المواد، ولكي يتم تنفيذ ذلك، لا بد من امتلاك القدرة العلمية والفنية لتمييز مثل هذه الكائنات عن تلك العادية، وذلك عن طريق اكتساب الخبرة النظرية والعملية للطرائق والتقنيات التي تستخدم في الكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً.

الهدف من البحث

هدف هذا البحث إلى اختبار بعض المحاصيل والمنتجات الموجودة في الأسواق المحلية للكشف عن وجود تعديل وراثي فيها.

مواد البحث وطرائقه

مكان تنفيذ البحث: أجري البحث في الهيئة العامة للبحوث الزراعية، قسم التقانات الحيوية بدوما. خلال السنوات 2007-2008.

المواد

1- المادة المدروسة:

جمعت عينات من مصادر مختلفة شملت مواد مستوردة وأخرى محلية من مواد متنوعة، (الجدول 1):

1-مواد علفية (كسبة الصويا والذرة والشعير) التي تستخدم بشكل أساسي في خلطات علائق الحيوانات.

2-مواد غذائية طازجة تستهلك مباشرة (بندورة، خيار).

3-مواد أولية للتصنيع شملت بذور فول الصويا، بذور عباد الشمس، بذور ذرة البوشار التي ستخضع لعمليات تصنيعية مثل تصنيع الزيوت النباتية ومنتجاتها الثانوية العلفية (الكسبة).

الجدول (1) العينات المستخدمة ومصادرها.

الرقم	الرمز	اسم العينة وصنفها	المصدر
1	A1	كسبة فول الصويا / مستوردة	الأسواق المحلية
2	A2	فول الصويا Sb -44	قسم المحاصيل /GCSAR
3	M1	ذرة علفية مستوردة	الأسواق المحلية
4	M2	ذرة علفية محلية غوطة -1	الأسواق المحلية
5	M3	ذرة علفية مستوردة أمريكية	الأسواق المحلية
6	M5	ذرة مستوردة رقم الصنف 363	قسم المحاصيل /GCSAR
7	M6	ذرة مستوردة رقم الصنف 653	قسم المحاصيل /GCSAR
8	B1	شعير محلي فرات -7-	قسم المحاصيل /GCSAR
9	B2	شعير مستورد أوكرانيا	الأسواق المحلية
10	P1	ذرة بوشارية مستورد	الأسواق المحلية
11	T1	بندورة زراعة محمية Ikram F1	قسم الخضار /GCSAR
12	T2	بندورة زراعة محمية Menhir F1	قسم الخضار /GCSAR
13	T3	بندورة زراعة محمية super F1	قسم الخضار /GCSAR
14	T4	بندورة زراعة محمية Grandiose F1	قسم الخضار /GCSAR
15	T5	بندورة زراعة حقلية محلي-11910	الأصول الوراثية /GCSAR
16	C1	خيار زراعة محميةDelta	قسم الخضار /GCSAR
17	C2	خيار زراعة محميةMantis F	قسم الخضار /GCSAR
18	C3	خيار زراعة محمية Mystro F1	قسم الخضار /GCSAR
19	S1	دوار الشمس محلي	قسم المحاصيل /GCSAR
20	S2	دوار الشمس مستورد	قسم المحاصيل /GCSAR

2- البلاسميدات المستخدمة كشاهد إيجابي

استُخدمت بلازميدات مختلفة كشاهد إيجابي لوجود بعض المورثات خلال الكشف عنها، مواصفات البلازميدات موضحة بالجدول (2).

الجدول (2) أسماء البلازميدات المستخدمة كشاهد إيجابي ومواصفاتها

اسم البلازميد	بناء البلازميد (التركيب أو التوليفة الوراثية التي يحملها البلازميد)
PGIIMH35-2PS1	35 S Pro+ T-Nos+ bar gene+ g2PS1 gene
TOP10 PGII35S CRYA(b)	NPT II + bar gene + CRYA(b)
TOP10 PGII35S CRYA(c)	NPT II + bar gene + CRYA(c)
pBI-221	35 S Pro+ GUS gene+ T-Nos

الطرائـــق

1- استخلاص الـ DNA:

استُخلص الـ DNA من العينات المدروسة وفق طرائق مختلفة حسب نوع العينة المدروسة كالآتي:

1- استخلاص الـDNA من العينات البذرية (فول الصويا- كسبة فول الصويا- الذرة- الشعير- ذرة البوشار)، حيث طحنت العينات في مطحنة من نوع MM 301 لشركة Retsch (ألمانيا) بسرعة اهتزاز 30 هرتز مدة دقيقتين وعُزل الـ DNA باستخدام طريقة CTAB حسب (Querci and Mazzara, 2001).

2- استخلاص الـ DNA من العينات الورقية (بندورة-خيار-عباد الشمس): زرعت البذور النباتية وأخذت منها الأوراق الخضراء الفتية ثم طحنت في الآزوت السائل باستخدام المطحنة السابقة بسرعة اهتزاز 20 هرتزاً مدة دقيقة، ثم استُخلص الـ DNA وفق طريقة (Doyle and Doyle 1990) المعدلة، بحيث أخذ 0.5غ من كل عينة وأضيف إليها 1 مل من محلول الاستخلاص الساخن المكون من:

- 0.1 M TRIS-HCl (PH8.0)
- 20 mM EDTA
- 1.4 M NaCl
- 0.2% β-Mercaptoethanol (5 µl)
- CTAB 2%

حُضّنت العينات في حمام مائي على 65مْ مدة 45 دقيقة ثم أضيف الكلوروفورم/الكحول ايزواميل (1/24) وتركت للتحريك لمدة عشر دقائق، وبعد التثفيل على سرعة 3500 دورة بالدقيقة مدة 15 دقيقة تم أخذ الوسط العلوي وتم ترسيب الـDNA بمزيج من الإيزوبروبانول و10% اسيتات الصوديوم NaOAc على درجة

حرارة-20°م، وبعد الغسيل بالإيتانول 75% جففت العينات مدة نصف ساعة، ثم حلت بواسطة محلول TE buffer (10Mm Tris-HCL,1Mm EDTA) بحجم 50µl لكل عينة.

3- استخلاص الـDNA من البلاسميدات المستخدمة كشاهد إيجابي: استُخلصت البلاسميدات من البكتريا المعدلة وراثياً *Agrobacterium* t. EHA105 النامية على الوسط السائل LB مع إضافة 1µl من المضاد الحيوي كانامايسين بتركيز 50ملغ/ليتر وفق طريقة Alkaline lysis حسب (Sambrook and Russell, 2001).

2- قياس تركيز الـ DNA المستخلص ونوعيته:

قيس تركيز الـDNA (الدنا) في العينات باستخدام المطياف الضوئي (السبيكتروفوتوميتر)، كما حسبت النسبة المعبرة عن نقاوة الدنا المستخلص والتي تراوحت بين 1.5 و1.8 للعينات المدروسة؛ مما يدل على نوعية جيدة للـ DNA. وبناء على قيمة التراكيز جُفّفت عينات الـ DNA للحصول على تركيز نهائي موحد للعينات جميعها على أن يكون تركيز عينة الـDNA خلال إجراء تفاعل الـPCR 50 ng/ µl.

3- إجراء التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR:

كررت التفاعلات جميعها ثلاث مرات، وتم ذلك باستخدام جهاز التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR من نوع Mastercycler-Eppendorf بحجم تفاعل كلي 25µ l يحوي 100ng من الـDNA في وسط يحوي من المحلول الواقي1X، 2mM MgCl، 0.4Pmol, 0.32 mM dNTPs من كل بادئة، وبوجود 0.5 وحدة أنزيمية إذ إن دورات جهاز الـPCR خلال التفاعل كانت بداية لفك الالتحام بين سلسلتي الدنا على حرارة 94م° مدة 5 دقائق تتبع بـ 94م° مدة دقيقة، ثم حرارة الالتحام الملائمة لكل بادئ مدة دقيقة واحدة تتبع بحرارة 72م° مدة دقيقة وتكرر الخطوات الثلاث السابقة 35 دورة، ثم على حرارة 72م° مدة 5 دقائق لدورة واحدة وتحفظ في حرارة 4م° إلى حين الاستخدام.

وقد استُخدمتْ 9 بادئات متخصصة من شركة MWG-Biotech AG (ألمانيا) وذلك للتحري عن المورثات المستهدفة في كل من العينات المدروسة، والجدول (3) يبيّن هذه البادئات وخصائصها والمورثات التي تم التحري عنها.

4- الرحلان الكهربائي وتكوين الهلامات:

فُصلتْ نواتج التفاعل بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي، باستخدام هلامة من الأغاروز 2%، تحتوي على بروميد الإيثيديوم 0.5 ميكروغرام/ مل، ومحلول رحلان 1xTBE، وطُبّق جهد كهربائي مقداره 85 فولتاً مدة تتراوح بين 60-90 دقيقة، ثم تظهير هلامة الـDNA بتعريضها للأشعة فوق البنفسجية، وتصويرها باستخدام جهاز توثيق الهلامة .Gel doc من شركة LABORATECHNIK.

الجدول (3) البادئات المستخدمة في الدراسة

No.	البادئ	تسلسل قواعد النكليوتيدات	المورث أو المقطع المدروس	قطعة الـــDNA المكاثرة	درجة حرارة الإرتباط
1	GMO3 GMO4	GCCCTCTACTCCACCCCCATCC GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG	Lactin gene	118	63
2	ZEIN3 ZEIN4	AGTGCGACCCATATTCCAG GACATTGTGGCATCATCATTT	Zein gene	277	60
3	35S-1: 35S-2:	GCTCCTACAAATGCCATCA GATAGTGGGATTGTGCGTCA	35s promoter	195	53
4	NOS1F NOS1R	GAATCCTGTTGCCGGTCTT CCTAGTTTGCGCGCTATATTT	Nos terminator	176	54
5	Bar sense Bar antesense	GCAGGAACCGCAGGAGTGGA AGCCCGATGACAGCGACCAC	BAR GENE	264	63
6	NptII F Npt II R	CGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG GCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAG	nptII	245	59
7	Gus F Gus R	CTCTACACCACGCCGAACAC CCTTCTCTGCCGTTTCCAAAT	GUS GENE	922	60
8	11BT1 11BT2	CAGGCAAGGATTCTCCCACA CGACAGAAGTTCCAGATCCA	CRY A(b)	329	60
9	GMO5 GMO9	CCACTGACGTAAGGGATGACG CATGAAGGACCGGTGGGAGAT	EPSPS gene	447	60

النتائج والمناقشة

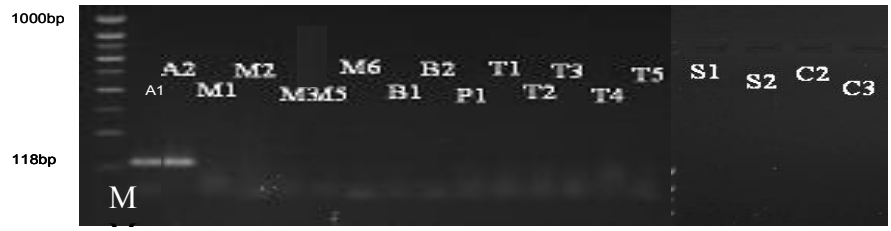
أولاً : التأكد من صلاحية الـــ DNA المستخلص لتفاعل PCR:

1- الكشف عن مورث الليكتين lectin gene في عينات فول الصويا:

يعدُّ المورث المشفر لليكتين lectin gene من المورثات النوعية المميزة لنبات فـــول الصويا، ويهدف الكشف عن هذا المورث باستخدام البادئات GMO3/GMO4 التأكد من صلاحية الـــ DNA المستخرج من فول الصويا لإجراء تفاعل الـــ PCR، كما يفيد فـــي التأكد من عدم حدوث تلوث لعينات الـــDNA المستخلصة من فول الصويا.

كانت النتيجة إيجابية فقط في عينات فول الصويا (A1, A2) مما يدل على صـــلاحية الدنا لإجراء الـــPCR المطلوب، وسلبية في بقية العينات الأخرى غير فول الصويا ممـــا يدل على عدم حدوث تلوث بين هذه العينات حسب ما توضحه نواتج تفاعـــل الـــــPCR المبينة في الشكل (1) التي تظهر وجود قطعة الـــDNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا المورث الموافق لـــ118bp وهذا مطابق لنتائج الدراسة التي أجراها (Meyer *et al*.,

1996) في الكشف عن هذا المورث في عينات من الذرة وفول الصويا حيث وجد نتيجة إيجابية في عينات الصويا فقط في حين كانت سلبية في عينات الذرة.



الشكل(1) الكشف عن وجود مورث lectin gene في عينات فول الصويا (A1,A2) وخلو بقية العينات الأخرى غير فول الصويا منها.
(M):Smart Ladder (Euro gentec,Belgium) (100bp)

2- الكشف عن مورث Zein gene في عينات الذرة المدروسة:

يعدُّ المورث Zein gene من المورثات النوعية المميزة لنبات الذرة، ويهدف الكشف عن هذا المورث باستخدام البادئات ZEIN3, ZEIN4 التأكد من صلاحية الـ DNA المستخرج من الذرة لإجراء تفاعل الـ PCR كما يفيد في التأكد من عدم حدوث تلوث في DNA العينات المستخلصة. كانت النتيجة إيجابية فقط في عينات الذرة العادية والبوشارية (M1,M2,M3,M5,M6,p1) مما يدل على صلاحية الدنا لإجراء الـPCR، المطلوب، وسلبية في بقية العينات وهذا مؤشر على عدم حدوث تلوث بين هذه العينات، حسب ما توضحه نواتج تفاعل الـPCR الموضحة في الشكل (2) التي تظهر وجود قطعة الـDNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا المورث الموافق لـ bp277، وهذا مطابق لنتائج الدراسة التي أجراها (Studer *et al*.,1997) في الكشف عن هذه المورث في عينات من الذرة وفول الصويا، حيث وجد نتيجة إيجابية في عينات الذرة فقط، في حين كانت سلبية في عينات فول الصويا.

الشكل(2) الكشف عن وجود مورث ZEIN gene في عينات الذرة المدروسة (M1,M2,M3,M5,M6,P1) وخلو بقية العينات منها.
(M):Smart Ladder(Euro genetic,Belgium) (100bp)

ثانياً: التحري عن المورثات المحتمل وجودها في العينات المدروسة:

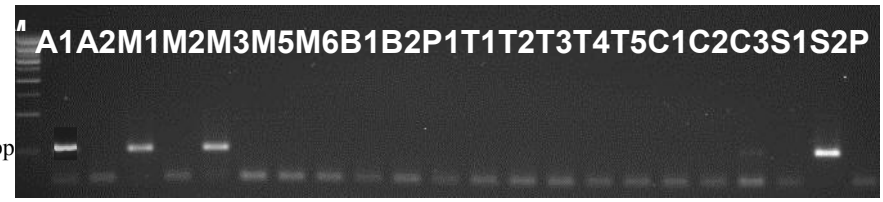
1- الكشف عن NOS Terminator:

يعدُّ هذا المنهي (بكتيري الأصل) مسؤولاً عن تنظيم عمليات نسخ المورث الهدف من خلال تحديد نهايتها (لأنه يحدد أين تنتهي الرسالة الوراثية) ويكثر استخدامه في عمليات التعديل الوراثي لمختلف النباتات، وتم اختيار البادئ NOS F/ NOS R للكشف عنه واستخدام البلازميد PGIIMH35-2PS كشاهد إيجابي لاحتوائه على المنهي المدروس.

أظهرت النتائج عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن المنهي NOS وجود ثلاث عينات تحتوي على هذا المنهي، وهي عينة كسبة فول الصويا المستوردة A1 وعينتا الذرة المستوردة M1, M3 وفي الشاهد الإيجابي البلازميد (P) مما يدل على وجود هذا المقطع في العينات السابقة، وغيابه في بقية العينات المدروسة مما يعني خلوها من هذا المنهي حسب ما توضحه نواتج تفاعل الـPCR الموضحة في الشكل (3).

ونظراً إلى أن مصدر هذه المنهي بكتيري فإن النتائج تؤكد النقل المقصود لهذا المقطع أي وجود تعديل وراثي في هذه العينات.

تتطابق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج Querci *et al.* 2000 في الكشف عن هذه المنهي في عينات الذرة وفول الصويا المدروسة حيث كانت قطعة الـDNA الناتجة في دراستنا عند الوزن الجزيئي نفسه في العينات التي درسها باستعمال البادئات السابقة نفسها.

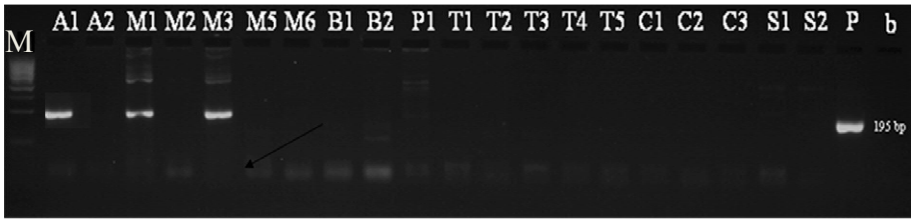


الشكل (3) الكشف عن وجود مقطع NOS Terminator في عينات الذرة المستوردة M1, M3 وكسبة الصويا المستوردة A1 وفي الشاهد الإيجابي البلازميد (P)، حيث: (B) الشاهد السلبي، (M): Ladder (100bp).

2- الكشف عن البروموتر35S :

يعدُّ هذا المحفز مسؤولاً عن تحفيز عملية نسخ المورث الهدف وتحديد متى تبدأ والكمية اللازم إنتاجها من الرسالة الوراثية (mRNA) كما يكثر استخدامه في عمليات التعديل الوراثي لمختلف النباتات، واستخدمت البادئات (35S1,35S2) في هذه الدراسة واستخدم البلازميد PGIIMH35-2PS كشاهد إيجابي لاحتوائه على المحفز المدروس،

حيث كانت النتيجة إيجابية فقط في الشاهد الايجابيP وفي عينتي الذرة المستوردة M3,M1 وعينة كسبة الصويا المستوردة A1 مما يدل على أن العينات الثلاث السابقة معدلة وتحتوي على المحفز، في حين كانت النتائج سلبية في بقية العينات الأخرى مما يدل على خلوها منه حسب ما توضحه نواتج تفاعل الـPCR الموضحة في الشكل (4) التي تظهر قطعة الـDNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا المحفز الموافق لـ195 bp في العينات المحورة فقط.



الشكل (4) الكشف عن المقطع (المحفز) 35S في عينات الذرة المستوردة M1, M3 وكسبة الصويا المستوردة A1 وفي الشاهد الإيجابي البلازميد (P)، حيث: (B) الشاهد السلبي، (M): Ladder (100bp) .

تتطابق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج Querci *et al.* 2000 في الكشف عن هذه المحفز في عينات الذرة وفول الصويا المدروسة حيث كانت قطعة الـDNA الناتجة في دراستنا عند الوزن الجزيئي نفسه في العينات التي درسها باستعمال البادئات السابقة نفسها.

3- الكشف عن مورث GUS gene:

يعدُّ هذا المورث مسؤولاً عن تشفير أنزيم بيتا غلوكورونيداز (B-Glucuronidase) الذي يستخدم كمورث مؤشر لتمييز النباتات المعدلة عن النباتات العادية خلال عملية التعديل الوراثي، ويفيدنا في معرفة كفاءة عملية التعديل الوراثي، واستخدمت البادئات gus F, gus R في هذه الدراسة واستخدم البلازميد pBI-221، كشاهد إيجابي لاحتوائه على المورث المدروس. وعند تحليل العينات المدروسة بهذه البادئات جميعها، كانت النتيجة إيجابية فقط في الشاهد الإيجابيP، وسلبية في بقية العينات مما يدل على أن هذا المورث لم يستخدم في عمليات التعديل الوراثي التي أنجزت على بعض العينات المدروسة، ومن ثم فإن العينات المحللة لم تعدل بمورث GUS.

4- الكشف عن المورث BAR gene:

يعدُّ هذا المورث مسؤولاً عن مقاومة المبيدات العشبية (- phosphinotricin) acetyltransferase وهو يستخدم في بعض الحالات كمورث مؤشر يستخدم لتمييز

النباتات المعدلة عن النباتات العادية خلال عملية التعديل الوراثي، واستخدمت البادئات BAR sense\ BAR Antisense في هذه الدراسة كما استخدم البلازميد PGIIMH35-2PS كشاهد إيجابي لاحتوائه على المورث المدروس، حيث كانت النتيجة إيجابية فقط في الشاهد الإيجابي P، في حين كانت سلبية في بقية العينات، مما يدل على خلوها منها حيث ظهرت قطعة الـDNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا المورث الموافق لـ bp264، وهذا مطابق لنتائج الدراسة التي أجراها (Vaïtilingom *et al*., 1999) في الكشف عن هذه المورث في عينات من الذرة وفول الصويا حيث كانت قطعة الـDNA الناتجة في دراسته عند الوزن الجزيئي نفسه.

5-الكشف عن المورث EPSPS:

يعدُّ هذا المورث مسؤولاً عن تشفير الأنزيم 5 - enolpyruvylshikimate – 3 - phosphate ومن ثم فإن هذا المورث يعطي للنبات صفة المقاومة لمادة glyphosate، وهي المادة الفعالة في المبيد العشبي glyphosate استخدمت البادئات GMO5,GMO9 في تحليل العينات وكانت النتيجة إيجابية فقط في عينة كسبة الصويا المستوردة (A1)، مما يعني أنها مصنعة من فول الصويا معدل وراثياً بمورث EPSPS، في حين لوحظ غياب هذا المورث في بقية العينات مما يدل على خلوها منه حسب ما توضحه نواتج تفاعل الـPCR الموضحة في الشكل (5) التي تظهر قطعة الـDNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا المورث الموافق لـ bp447 وهذا مطابق لنتائج الدراسة التي أجراها (Meyer and Jaccaud,1997) في الكشف عن هذا المورث في عينات من الذرة وفول الصويا حيث وجد أن قطعة الـ DNA الناتجة لديه كانت عند الوزن الجزيئي نفسه مما يدل على أن الذرة وفول الصويا لديه معدلان بمورث EPSPS.

الشكل (5) الكشف عن وجود المورث EPSPS في عينة كسبة فول الصويا المستوردة (A1) وخلو بقية العينات المدروسة منها حيث: (B) الشاهد السلبي، (M): Ladder (100bp).

6-الكشف عن المورث CRYIA(b):

يعدُّ هذا المورث مسؤولاً عن تشفير بروتين خاص تنتجه بكتريا *Bacillus thuringienses*، حيث يكون فعال ضد أنواع محددة من الحشرات حرشفية الأجنحة *Lepidoptera* واستخدمت البادئات 11BT1,11BT2 في تحليل جميع عينات

الـــDNA المدروسة، واســـتخدم البلازميـــد TOP10 PGII35S CRYA(b) كـــشاهد إيجابي لاحتوائه على المورث المدروس.

كانت النتيجة إيجابية فقط في الشاهد الإيجابي P حيث نجد قطعة الـــDNA ذات وزن bp329 في الشاهد الإيجابي، وسلبية في العينات المدروسة جميعها؛ مما يدل على خلـــو العينات المختبرة من هذا المورث، وهذا مطابق لنتائج الدراسة التي أجراها Weijdeven (2003) في الكشف عن هذه المورث في عينات من الذرة وفـــول الـــصويا وباســـتعمال البادئات السابقة نفسها، وقد أوضحت نتائجه قطعة الـــDNA عند الوزن الجزيئي السابق نفسه.

نستدل مما سبق على أن الذرة وفول الصويا الذي ثبت بتحليلهما مع 35S وNOS-T بأنهما معدّلان وراثياً فهما غير معدلين لصفة المقاومة للحشرات، وقـــد وجـــدنا أن فـــول الصويا معدل للمورث EPSPS.

7- الكشف عن المورث nptII:

يعدُّ هذا المورث مسؤولاً عن إعطاء صفة المقاومة للمضاد الحيوي كانامیسین الـــذي يستخدم كمورث مؤشر لتمييز النباتات المعدلة عن النباتات العادية خلال عملية التعـــديل الوراثي، واستخدمت البادئات nptIIR nptIIF في هذه الدراسة، كما استخدم البلازميـــد pBI-221، حيث كانت النتيجة إيجابية فقط في الشاهد الإيجابي، وسلبية في بقية العينات مما يدل على خلوها منه حسب ما توضحه نواتج تفاعل PCR التي تظهر تضخيماً عنـــد الحجم المتوقع لظهور هذه المورث الموافق لـــ bp254. يبين الجدول(4) ملخص نتائج اختبار العينات المدروسة بالنسبة إلى المورثات التي تم التحري عـــن وجودهـــا والتـــي تستخدم في التعديل الوراثي.

الجدول (4) ملخص نتائج اختبار العينات المدروسة بالنسبة إلى المورثات التي تم التحري عن وجودها والتي تستخدم في التعديل الوراثي.

رمز العينة	35S	NOS	GUS	BAR	EPSPS	NPTII	CRYIA(b)	CRYIA(c)
A1	+	+	-	-	+	-	-	-
M1	+	+	-	-	-	-	-	-
M3	+	+	-	-	-	-	-	-

في حين كانت النتيجة سلبية في العينات الأخرى المختبرة كلها.

(M2, M5,M6, B1,B2, P1, T1,T2,T3,T4,T5,C1,C2,C3,S1,S2)

بالنسبة إلى وجود المورثات التي تم التحري عنها.

الاستنتاجات

تستدعي التطورات الحالية في المواد المعدلة وراثياً إيجاد طرائق سريعة ودقيقة للكشف عن النباتات والبذور المعدلة وراثياً. فعلى الرغم من أن هناك طرائق تحليلية مختلفة وبمستويات عديدة للكشف عنها، إلا أن الـ PCR يعدُّ طريقة مسح عام عن الكائنات المعدلة وراثياً، وكذلك للكشف عن مورثات محددة.

استُخدام في هذه الدراسة أول مرة في سورية تقنية الـPCR بنجاح في الكشف عن المواَد المعدلة وراثياً من عينات جُمعت من الأسواق المحلية، وبينت النتائج وجود مواد معدلة وراثياً في عينات كسبة فول الصويا المستوردة A1 بالمحفز 35S والمنهي Nos والمورث EPSPS وفي عينتي الذرة المستوردة بالمحفز 35S والمنهي Nos، في حين كانت النتيجة سلبية في العينات الأخرى المختبرة كلّها. بالنسبة إلى وجود المورثات التي تم التحري عنها. مع العلم أنه تم التأكد من النتائج السابقة بطريقتين:

الأولى تعتمد على استخدام بلازميدات خاصة بكل مورث أو مقطع أعطت قطعة الـDNA عند الوزن الجزيئي نفسه الظاهر عند العينة المعدلة وراثياً، وذلك بعد إجراء تفاعل الـPCR. والثانية في حال عدم توفر البلازميد المحتوي على المورث المدروس، تقارن النتيجة الظاهرة بنتائج لدراسات سابقة استخدم فيها البادئ نفسه وظهر فيها الوزن الجزيئي نفسه لقطعة الـDNA المكاثرة بالـ PCR.

نستنتج من الدراسة الحالية بأن عملية مراقبة دخول النباتات المعدلة وراثياً إلى القطر يتطلب عملية تطوير علمي وتقني للبنى التحتية لتكون قادرة على كشف وجود النباتات المعدلة وراثياً وتحديد نسبتها في العينات المختبرة لمعرفة مقدار توافقها وانسجامها مع القوانين والأنظمة والتشريعات الموجودة في القطر التي تحكم وتنظم هذه العملية، ولهذا تعدُّ الدراسة الحالية لبنة أساسية لبناء القدرات في مجال الكشف عن المواد المعدلة وراثياً بغية تطبيق القوانين والتشريعات الناظمة ذات العلاقة ولاسيّما قانون الأمان الحيوي الذي هو قيد الدراسة من أجل حماية التنوع الحيوي في سورية ومراقبة المنتجات المستوردة، والتأكد من أنها غير معدلة وراثياً والحفاظ على صحة الإنسان والبيئة من الآثار المحتملة للكائنات المعدلة وراثياً.

كلمة شكر

يشكر الباحثون مؤسسة الكسندر فون هامبولد الألمانية لتقديمها أجهزة عديدة استخدمت فى هذه الدراسة أهمها: جهاز توثيق الجل وغيرها.

Acknowledgement

Authors express their thanks to Alexander von Humboldt Foundation, Germany for providing GCSAR many equipments as donation mainlyPhoto doc Documentation,, Mini-centrifuge and others which were used in this research

REFERENCES

1. **Abdul Kader, A. M., Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., Bauer, W. B. and Beer, S. V. (1999). Evaluation of the *hrpN* gene for increasing resistance to fire blight in transgenic apple. Acta Horticulturae No. 489: 247-250.**
2. **Abdul Kader, A. M., Kiesecker, H., Teeri, T. and Jacobsen, H. J. (2003). *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh) cv. Golden delicious using the g2ps1 gene from gerbera hybrida (Asteraceae) for improved fungal resistance. 7th International Congress of Plant Molecular Biology. Barcelona.**
3. **Ahmed, F. E. (1999). Safety standards for food contamination .In Environmental Contamination in Food(Moffat, C. F. and Whittle, K. J., eds), Ch.13 pp. 500-570, Sheffield Academic Press.**
4. **Chowdhury, E. H., H. Kuribara, A. Hino, P. Sultana, O. Mikami, N. Shimada, K. S. Guruge, M. Saito and Y. Nakajima. (2003). Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn. Journal of Animal Science. 81:2546-2551.**
5. **Doyle, J. J., and J. L. Doyle. (1990). isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.**
6. **Grandillo, S. and Fulton, T. M. (2002). Approaches to gene mapping. Pp. 101-136. In: Gilmartin, P.M. and Bowler, C. (eds.). Molecular Plant Biology. Vol. 2. Oxford University Press.**
7. **James, C. (2009). Global status of commercialized biotech /GM crops 2008. ISAAA Breifs No. 39.**
8. **Lih, Ch.; Chen, Y.; Chih-Shih, D. Y. (2002). Study on the detection method of six varieties of genetically modified maize and processed food. *Jornal of Food and Drug Analysis* 10, 25-33.**
9. **Lipp, M., Anklam, E., and Stave, J. W. (2000). Validation of an immunoassay for detection and quantification of genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: Interlaboratory Study. J AOAC Int. 83, 919-927.**
10. **Lubeck, M. (2003). Detection of genetically modified plants- methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products. http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm23-28 June 2003**
11. **Meyer, R., Chardonnens, F., Hübner, P. and Lüthy, J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in processed meat products. Lebensm. Unters. Forsch. 203, 339-344.**
12. **Meyer, R. and Jaccaud, E. (1997). Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant Soybeans. Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX conference, Interlaken, Switzerland, Event NO. 2201, 23-28.**
13. **Ming, Pan T. (2002). Current status and detectin of genetically modified organisms. *Jornal of Food and Drug Analysis* 10, 229-241.**

14. **Querci, M., Jermini, M. And Van den Eede, G. (eds.) (2000). Training Course on "The analysis of Food samples for the presence of genetically modified organisms". User Manual. European Commission Joint Research Centre.**
15. **Querci, M., and Mazzara, M. (2001). The analysis of food samples for the presence of Genetically Modified Organisms. In: querci et al. eds. see above.**
16. **Sambrook, J. and Russell, W. D. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, third edition, volume 1, preparation of plasmid DNA by Alkaline lysis with SDS: Minipreparation, 1.32-1.34.**
17. **Stave, J. W., Magin, K., Schimmel, H., Lawruk, T. S., Wehling, P., and Bridges, A. (2000). AACC collaborative study of a protein method for detection of genetically modified corn. Cereal Foods World 45, 497-501.**
18. **Studer, E,. Dahinden, I., luthy, J. and Hubner, p. (1997). Nachweis des genetisch veranderten "Maximizer-Mais mittels der ploymerasekettenreaktion (PCR). Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygien 88, 515-524.**
19. **Somma, M. and Querci, M. (2001). The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. In: Querci et al. see above. Southern, E. M. (1975). J.Mol. Biol. 98, 503-517.**
20. **Vaitilingom, M., Pijnenburg H., Gendre F., Brignon P. (1999), "Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReady™ soybean in some representative foods". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 47, , pp. 5261-5266.**
21. **Weijdeven, Van de, F. (2003). Methods of determining GMOs in feeds and feed ingredients http://www.afma.co.za/AFMA-Template/sept-method.htm.**

Received	**2009/02/26**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2009/07/27**	**قبول البحث للنشر**