

ردیابی ارقام تراریخته ذرت در نمونه‌های وارداتی خوراک دام

ساره داورزنی^۱، فهیم‌دخت مختاری^{۱*}، فرنوش عطار^۱ و فائزه شیرخان^۲

۱- پژوهشگاه استاندارد، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، مرکز تحقیقات علوم تغذیه و صنایع غذایی تهران

mfahimdokht@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۳۰

صفحه ۵۷-۷۶

چکیده

محصولات تراریخته با استفاده از زیست‌فناوری مدرن جهت ایجاد یا افزایش یک صفت مطلوب مانند افزایش راندمان یا مقاومت در برابر عوامل نامساعد تولید می‌شوند. در سال‌های اخیر، نزدیک به ۲۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی در سراسر جهان زیر کشت ذرت تراریخته است، بنابراین، احتمال وجود ارقام تراریخته در میان ذرت‌های وارداتی به ایران وجود دارد. این مطالعه، با هدف بررسی تراریختگی ذرت‌های مورد مصرف در خوراک دام وارداتی انجام شد. بیست و پنج نمونه تهیه شده از گمرک براساس استاندارد ملی ایران ۹۶۱۷-۱ از نظر وجود توالی‌های موجود در رخدادهای تراریخته غربال‌گری شدند. استخراج دی.ان.ا براساس استاندارد ملی ایران ۱۰۷۶۳ با روش CTAB انجام و کیفیت و کمیت دی.ان.ای استخراجی با استفاده از الکتروفورز و اسپکتروسکوپی و قابلیت تکثیر آن با روش PCR با توالی ژن داخلی اینورتن‌از ذرت بررسی شد. غربال‌گری نمونه‌ها طبق استاندارد ملی ایران ۹۶۱۷ با روش PCR با آغازگرهای اختصاصی پیشبر CaMV35S، پایانبر NOS و ژن nptII بررسی شد. در سه نمونه از ۲۵ نمونه، باند ۱۹۵ bp مربوط به CaMV 35S و در سه نمونه، باند ۱۱۸ bp مربوط به NOS پایانبر مشاهده شد. در هیچیک از نمونه‌ها باند مربوط به ژن شناساگر nptII مشاهده نشد. برای اعلام نتیجه قطعی باید آزمون‌های تأییدی انجام شود.

واژه‌های کلیدی: تراریخته، ذرت، خوراک دام، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

مقدمه

ذرت قدیمی‌ترین محصول زراعی است که در سطح وسیعی کشت می‌شود و بعد از گندم و برنج، به عنوان سومین محصول زراعی کاشته شده در جهان است. در ایران، ذرت به عنوان منبع اصلی تأمین انرژی در تغذیه طیور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، به همین دلیل توسعه سطح زیر کشت و افزایش تولید این محصول از اولویت برخوردار است. طی سال‌های اخیر، اجرای طرح‌های افزایش تولید ذرت در ایران، با موفقیت‌های چشمگیری همراه بوده است، به طوری که در ایران، در سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۷ تولید ذرت خوشه‌ای به ۶۰۸۹۹۲۷ تن و تولید ذرت دانه به ۶۹۳۵۱۰ تن و مجموع سطح زیرکشت این محصولات نیز به ۲۵۶۵۰۰ هکتار رسیده است (۱).

با توجه به اینکه ذرت از جمله گیاهان آب‌بر محسوب می‌شود، و با توجه به بحران کمبود آب در ایران، از یک طرف امکان توسعه کشت چنین گیاهانی در مقیاس وسیع در مملکت وجود ندارد و از دیگر سو به لحاظ اقتصادی مقرون به

صرفه نیست. بنا بر اعلام انجمن صنایع خوراک دام، طیور و آبزیان، مصرف سالانه خوراک دام در ایران نزدیک به ۲۰ میلیون تن و نیاز کشور در سال به ذرت دامی بیش از هفت میلیون تن بوده و سهم این نهاده در واردات حدود ۹۰ درصد است. در واقع ذرت دامی، یک کالای استراتژیک و تعیین‌کننده در صنعت دامداری کشور محسوب می‌شود (۲). مهمترین کشورهای صادرکننده ذرت در جهان، آمریکا، چین، برزیل، هند، آرژانتین و اوکراین هستند، که در مجموع بیش از ۹۰٪ کل صادرات جهانی این محصول را در اختیار دارند (۱۵).

براساس گزارش ارائه شده توسط سرویس بین‌المللی دستیابی و استفاده از بیوتکنولوژی کشاورزی (ISAAA) ۲۶ کشور شامل پنج کشور توسعه یافته و ۲۱ کشور در حال توسعه، در سال ۲۰۱۸ مجموعاً ۷/۱۹۱ میلیون هکتار را زیر کشت محصولات تراریخته بردند که نسبت به سال گذشته ۹/۱ میلیون هکتار افزایش داشته است. بنابر همین گزارش، در پایان سال ۲۰۱۸ میلادی، ۹۱٪ از کل سطح زیر

کشت محصولات تراریخته در پنج کشور ایالات متحده آمریکا، برزیل، آرژانتین، کانادا و هند قرار دارد (۱۶).

بر اساس گزارش سرویس بین‌المللی دستیابی و استفاده از بیوتکنولوژی کشاورزی (ISAAA)، در سال ۲۰۱۷، سطح زیر کشت ذرت تراریخته در مجموع ۵۹/۷ میلیون هکتار بوده است، که ۳۲ درصد از کل سطح زیر کشت ذرت را در جهان تشکیل می‌دهد. آمریکا، آرژانتین، اتحادیه اروپا، کانادا، برزیل، پاراگوئه، پاکستان، کلمبیا و پرتغال از بزرگترین تولید کنندگان ذرت تراریخته هستند (۳).

با در نظر گرفتن مواردی مثل ارزیابی ایمنی محصولات تراریخته و همچنین رعایت حقوق واردکنندگان طبق الزامات پروتکل‌های جهانی، مانند پروتکل کارتاژنا، تعداد کشورهایی که برچسب‌زنی بر روی محصولات تراریخته را اجباری نموده‌اند، رو به افزایش است. در ایران نیز، طبق ضوابط وزارت بهداشت، از سال ۱۳۹۷ برچسب‌زنی همراه با درج لوگو بر روی کلیه مواد غذایی که ممکنست حاوی اجزای تراریخته باشند، الزامی شده است

(۴). واردات محصولات تراریخته کشاورزی نیز علاوه بر رعایت مقررات و ضوابط جاری و اخذ سایر مجوزهای ثبت سفارش و جهاد کشاورزی، باید با مجوز سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش وزارت جهاد کشاورزی انجام گیرد (۵).

برای بررسی و شناسایی ارقام تراریخته در محصولات غذایی، روش‌های متعددی وجود دارند، از جمله روش‌های تشخیص بر اساس پروتئین، مانند الیزا و نوارهای جریان‌یابی جانبی و روش‌های برپایه اسید نوکلئیک، شامل روش‌های کیفی و کمی است. استفاده از روش‌های دیگر نظیر روش‌های مبتنی بر بلاتینگ، ریزآرایه‌ها، و انگشت‌نگاری ژنومی هنوز در شناسایی ارگانیزم‌های تراریخته گسترش نیافته و با وجود حساسیت برخی از آنها، کارایی آنها به دلایلی مانند نیازمندی به تجهیزات پیشرفته و هزینه بالا مورد بحث است. در حال حاضر، بهترین روش برای شناسایی ژن‌های نوترکیب، روش PCR است که به‌وسیله آن می‌توان نواحی مختلفی را که نشان‌دهنده وجود ژن نوترکیب در محصول است، شناسایی کرد. به‌دلیل اینکه

توالی‌هایی مثل برخی پیشبرها، پایانبرها و نشانگر ژن‌ها، فقط در ارگانسیم‌های تراریخته وجود دارند، با ردیابی این توالی‌ها می‌توان با حساسیت نسبتاً بالایی غربال‌گری انجام داد. در جستجویی که در این بررسی، در یکی از بانک‌های اطلاعاتی معتبر انجام شد، مشاهده شد که از بین ۲۰۷ ذرت تراریخته ثبت شده در مرکز اطلاعات BCH، بیش از ۱۴۰ رخداد ذرت تراریخته حاوی پیشبر P35S و ۱۶۰ رخداد ذرت حاوی ژن پایانبر نوپالین سنتاز و ۱۴ رخداد ذرت حاوی ژن نوامایسین ترانسفراز II هستند. بنابراین، ردیابی حداقل یکی از این توالی‌ها، می‌توان حداقل ۸۰٪ رخدادهای ذرت تراریخته ثبت شده در یک بانک اطلاعاتی را ردیابی کرد. مسلم است که رخدادهایی وجود دارند که حاوی دو یا هر سه این توالی‌ها هستند، و نیز رخدادهایی ممکنست وجود داشته باشند که هیچ یک از این توالی‌ها در آنها بکار نرفته باشد، بنابراین، با افزایش تعداد نواحی مورد جستجو، می‌توان احتمال ردیابی ارگانسیم‌های تراریخته را در روش‌های

غربالگری افزایش داد. در سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO) استانداردهای ردیابی ارگانسیم‌های تراریخته با استفاده از PCR به روش کیفی و کمی تدوین شده است، که شامل روش‌های غربالگری براساس توالی‌های ژنومی موجود معمول در اغلب ارگانسیم‌های تراریخته (مانند پیشبر P35S، پایانبر NOS و ژن‌های نشانگر مقاومت آنتی‌بیوتیک، مثل nptII)، همچنین شناسایی نواحی ویژه ساختار و ویژه رخداد است. همه روش‌های بیان شده در استانداردهای سازمان ایزو، با استفاده از مطالعات بین آزمایشگاهی در تعداد زیادی آزمایشگاه در سطح بین‌المللی صحت‌گذاری شده‌اند و نشان داده شده که نتایج حاصل از این روش‌ها، به شرط رعایت الزامات بیان شده در این استانداردها، قابل اعتماد، تکرارپذیر و تجدیدپذیر است (۶، ۷، ۱۷).

این استانداردها مطابق با روش تدوین سازمان ملی استاندارد ایران، در قالب استانداردهای ملی ایران تدوین شده است. بنابراین، بهتر است در مطالعاتی که هدف آنها ردیابی و شناسایی ارقام تراریخته

"داورزی و همکاران، ردیابی ارقام تراریخته ذرت در نمونه‌های وارداتی خوراک دام"

است، از روش‌های استاندارد استفاده شود. با توجه به نظرات مختلف در مورد تولید و به‌خصوص واردات ارگانسیم‌های تراریخته، مطالعات متعددی برای بررسی وجود ارقام تراریخته در میان محصولات غذایی و خوراک دام موجود در بازارها یا وارداتی در کشورهای مختلف، انجام شده است. در ایران در سال‌های اخیر، برخی محصولات از نظر تراریخته بودن مورد بررسی قرار گرفته‌اند. ربیعی و همکاران برای اولین بار در ایران در سال ۲۰۱۳ رخدادهای Bt 11 و Mon 810 ذرت تراریخته را در غذاهای فرآوری شده موجود در بازار ایران ردیابی کردند (۱۰). فولادگر و همکاران در سال ۱۳۹۴ نمونه‌هایی از محصولات کشاورزی شامل گوجه‌فرنگی، برنج، سویا، ذرت، کلزا و پنبه، جمع‌آوری شده از منابع مختلف مانند فروشگاه‌ها، گلخانه‌ها، کارخانجات خوراک دام و طیور و دامپروری‌ها در سطح استان اصفهان را از نظر وجود ارقام تراریخته مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش، نشان داده شد که برخی از نمونه‌های گوجه‌فرنگی، سویا، کلزا، پنبه و

ذرت حاوی توالی‌های مربوط به پیشبر P35S و پایانبر NOS بوده و با آزمایش‌های تکمیلی، تراریخته بودن گوجه‌فرنگی اثبات شد (۶).

براساس مطالعه انجام شده توسط پیرای و همکاران در سال ۱۳۹۴ بر روی دانه‌های کلزای کشت‌شده در ایران، مورد استفاده در صنایع روغن، علی‌رغم عدم وجود توالی‌های مربوط به پیشبر P35S و پایانبر NOS در دانه‌های کلزا، وجود ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک npt II در برخی از ارقام کلزای کشت‌شده در ایران، نشان داد که برخی از دانه‌های کلزا که در مزارع داخلی کشت می‌شوند، ممکن است تراریخته باشند ولی نشان داده شد که تراریختگی اثری بر پروفایل اسیدهای چرب این دانه‌ها نداشته است (۷). سرمدی و عالم‌زاده، در سال ۱۳۹۱ وضعیت تراریختگی ۵ دانه ذرت وارداتی از کشور آرژانتین در نیمه دوم سال ۱۳۸۹ را مورد بررسی قرار داده و نشان دادند ۳ نمونه در ژنوم خود دارای پیشبر P35S و پایانبر NOS و ۲ نمونه فقط دارای پایانبر NOS بودند، که نشان‌دهنده‌ی تراریخته

- بودن آن‌ها بود (۸).
- حیدری و همکاران نیز با هدف تشخیص ذرت‌های تراریخته در سبد کالای مصرف‌کنندگان ایرانی در سال ۱۳۹۲ مطالعه‌ای بر روی ۴۶ نمونه ذرت جمع‌آوری شده از گمرک شیراز، بازار مصرف هفت شهر و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذور و نهال وزارت جهاد کشاورزی، نشان دادند که ۲۶ نمونه دارای توالی پیشبر P35S بودند که می‌تواند دلیل بر تراریختگی آنها باشد (۹).
- مطالعات در کشورهای همسایه و کشورهایی که از نظر ایمنی زیستی و کشت و واردات محصولات زراعی تراریخته مشابه ایران هستند، نیز نتایج مشابهی را نشان می‌دهد. Herzallah و همکاران در سال ۲۰۱۲، ۲۰۰ محصول غذایی و ۸۰ خوراک دام را از نظر وجود پیشبر P35S و ژن‌های ذرت Bt 176 و سویای RR مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که ۱۵ نمونه از کل مواد غذایی و خوراک دام مورد آزمون قرار گرفته موجود در بازار اردن حاوی ارقام
- تراریخته Bt 176 یا سویای RR بودند (۱۸).
- Elsanhoty و همکاران در سال ۲۰۱۳ بررسی روی تعدادی از محصولات غذایی موجود در عربستان سعودی، شامل ذرت، سویا و برنج انجام داده و نشان دادند که این محصولات تراریخته هستند (۱۹). در پژوهش دیگری توسط Matsuoka و همکاران، تراریخته بودن لاین‌های وارداتی ذرت از آمریکا به ژاپن با روش PCR اعلام شد (۲۰).
- در صورت وجود ارقام تراریخته، در بین محصولات وارداتی، براساس قوانین داخلی، بررسی ایمنی زیستی این محصولات ضرورت پیدا کرده و طبق پروتکل‌های بین‌المللی، این حق برای واردکنندگان بوجود می‌آید که از کشور واردکننده، درخواست جبران خسارت نماید (۱۰).
- این تحقیق، با هدف بررسی وضعیت تراریختگی ذرت در نمونه‌های وارداتی مورد مصرف خوراک دام انجام شد. دی.ان.ای نمونه‌ها پس از دریافت و آماده‌سازی، استخراج شده و با استفاده از

آغازگرهای اختصاصی برای ارگانسیم‌های تراریخته برای بررسی وجود نواحی تنظیمی پیشبر، پایانبر و مقاومت به آنتی بیوتیک، با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج دی.ان.ا از نمونه‌ها طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۶۳ و غربالگری با روش PCR براساس استاندارد ملی ایران شماره ۱-۹۶۱۷ انجام شد (۱۱،۱۲).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به منظور ارزیابی وضعیت تراریختگی دانه های ذرت وارداتی، ۲۵ نمونه خوراک دام وارداتی، شامل کنجاله ذرت و خوراک دام غیرفراوری شده حاوی ذرت (براساس اظهارنامه‌های گمرکی) از مبادی ورودی کشور تحویل گرفته شد. نمونه‌ها توسط شرکت‌های بازرسی مستقر در گمرکات و براساس استانداردهای نمونه‌برداری برداشته شده و با رعایت شرایط استاندارد و با استفاده از کیسه‌های مخصوص به آزمایشگاه منتقل شد (۱۳، ۱۴). در بسته‌های دریافت شده، نام و برجستگی که

نشان از تراریخته بودن آنها باشد، وجود نداشت. برای واکنش PCR، حدود صد گرم به صورت توده‌ای و کاملاً تصادفی از هر بسته برداشته شد.

نمونه‌های ذرت با کدهای Ind 1 تا Ind 21، Chn 1 و Chn 2 و Hng 1 و Hng 2 مشخص شدند.

استخراج و خالص‌سازی DNA

استخراج دی.ان.ای ژنومی به روش ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) و براساس روش ارائه شده در استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۶۳ انجام شد (۱۱). بر اساس مطالعات انجام شده، بهترین روش استخراج دی.ان.ا از دانه ذرت، روش CTAB است (۲۱).

نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع در هاون تا پودر شدن خرد شده، سپس از هر نمونه دو قسمت ۲۵۰ میکرولیتری برای انجام مراحل استخراج برداشته شد و به آن ۵/۱ میلی‌لیتر بافر استخراج، ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K، ۱۰ میکرولیتر آلفا آمیلاز و ۱۰ میکرولیتر RNase اضافه شد و پس از گرمخانه‌گذاری به مدت یک شب در

شاهد‌های مثبت و منفی

برای شاهد مثبت از ماده مرجع تأیید شده (CRM) تهیه شده از انستیتو مواد مرجع (IRRM گیل بلژیک) که حاوی توالی‌های مورد بررسی بودند، استفاده شد. شاهد مثبت مورد استفاده در این مطالعه، IRMM-416C که حاوی $8/9 \text{ g/Kg}$ ذرت تراریخته MON 863 است، برای ردیابی توالی‌های مربوط به پیشبر CAMV 35S، پایانبر NOS و ژن nptII بود (۲۲). این ذرت، براساس اطلاعات موجود در مرکز اطلاعات ایمنی زیستی (BCH) حاوی هر سه توالی مورد بررسی است (۲۳). دی.ان.ای ماده مرجع با همان روش مورد استفاده برای نمونه‌ها، استخراج و با هر آغازگر همراه با نمونه‌ها PCR شد. برای شاهد منفی استخراج از یک باکتری (*شریشیا کالی* ATCC 21592) استفاده شد.

بر روی دی.ان.ای استخراج شده از باکتری، همزمان با آغازگرهای مورد استفاده PCR انجام شده و محصول PCR الکتروفورز شد. از آب مقطر به عنوان شاهد منفی PCR استفاده شد.

بن‌ماری ۶۵ درجه سانتیگراد به منظور حذف پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها با کلروفرم، دی.ان.ا با بافر حاوی CTAB رسوب داده شده و رسوب دی.ان.ا در محلول کلرید سدیم حل شد.

برای حذف نمک‌ها و آلاینده‌ها، شستشو با کلروفرم انجام شده، دی.ان.ای باقی مانده، با ایزوپروپانل رسوب داده، با اتانل شسته شده و در بافر TE حل شد (۱۱).

میزان دی.ان.ای موجود در بافر، با روش اسپکتروسکوپی بوسیله دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین شد و کیفیت دی.ان.ای استخراج شده، با الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد (۱۱).

به منظور بررسی قابلیت تکثیر دی.ان.ا برای PCR های بعدی، از PCR با آغازگر ژن اینورتاز که یک ژن داخلی ذرت است، استفاده شد.

ردیابی قطعه‌ای با اندازه ۲۲۶ bp نشان‌دهنده این بود که محلول دی.ان.ای نمونه دارای دی.ان.ای قابل تکثیر ذرت بوده است (۱۲).

"داورزی و همکاران، ردیابی ارقام تراریخته ذرت در نمونه‌های وارداتی خوراک دام"

غربال‌گری GMOها

و ژن نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین فسفوترانسفراز (npt II) بودند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش به همراه اندازه دی.ان.ای هدف در جدول ۱ نشان داده شده است.

ردیابی GMOها بوسیله روش غربال‌گری و انجام PCR با استفاده از آغازگرهای توصیه شده در استاندارد ملی ایران ۹۶۱۷ انجام شد (۱۱). آغازگرهای مورد استفاده شامل: پیش‌بر CAMV 35S، پایانبر NOS

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای غربال‌گری و تأیید قابلیت تکثیر دی.ان.ای استخراج شده

آغازگر	نوع آغازگر	توالی 5' به 3'	توالی دی.ان.ای هدف	اندازه محصول PCR (bp)
IVR1-F	ژن داخلی	5'-CCg CTg TAT CAC AAg ggC Tgg TAC C-3'	ژن اینورتاز	۲۲۶
IVR1-R	ذرت	5'-ggA gCC CgT gTA gAg CAT gAC gAT C-3'		
35s-1	پیش‌بر	5'-gCT CCT ACA AAT gCC ATC A-3'	P-35S	۱۹۵
35s-2		5'-gAT AgT ggg ATT gTg CgT CA-3'		
HA-nos118f	پایانبر	5'-gCA TgA CgT TAT TTA TgA gAT ggg-3'	NOS-T	۱۱۸
HA-nos118r		5'-gAC ACC gCg CgC gAT AAT TTA TCC -3'		
APH2 short	ژن مقاومت به	5'-CTC ACC TTg CTC CTg CCg -3'	npt II	۲۱۵
APH2 reverse	آنتی‌بیوتیک	5'-CgC CTT gAg CCT ggC gAA CAg -3'		

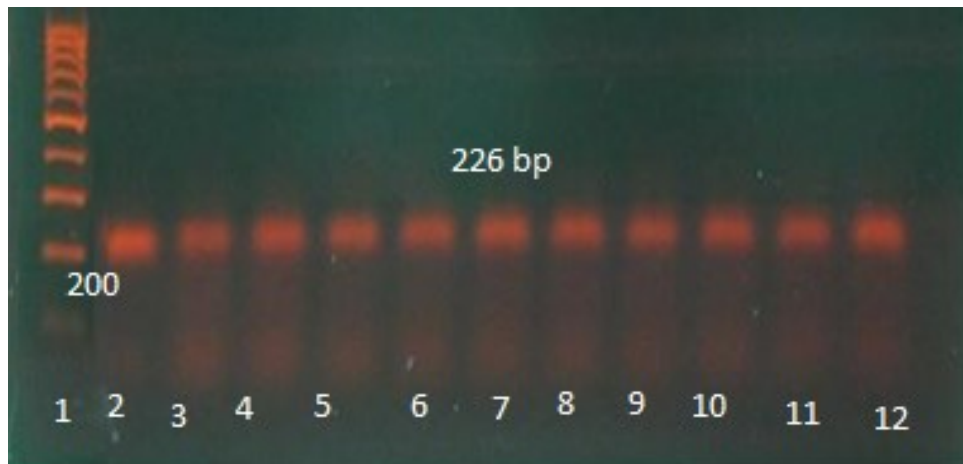
نتایج

نتایج مربوط به قابلیت تکثیر DNAهای

استخراج شده از نمونه‌ها و شاهد مثبت

به منظور بررسی قابلیت دی.ان.ا. برای PCR از آغازگر ژن اینورتاز ذرت استفاده شد، که محصول آن یک قطعه ۲۲۶ bp است. ردیابی این قطعه در محصولات

PCR تأییدکننده وجود ذرت و قابلیت تکثیر دی.ان.ای استخراج شده است. در این تحقیق، در همه دی.ان.ای‌های استخراج شده، وجود دی.ان.ای مربوط به ذرت تأیید شد که نمونه‌ای از نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: تعیین قابلیت دی.ان.ای برخی از نمونه‌های استخراج شده برای تکثیر با استفاده از آغازگر ژن اینورتاز ذرت (۲۲۶ bp)
چاهک ۱: نشانگر (۱۰۰ bp - ۱۵۰۰ bp)، چاهک‌های ۲ تا ۱۲: محصول PCR نمونه‌های ذرت (Ind 5- Ind 15)

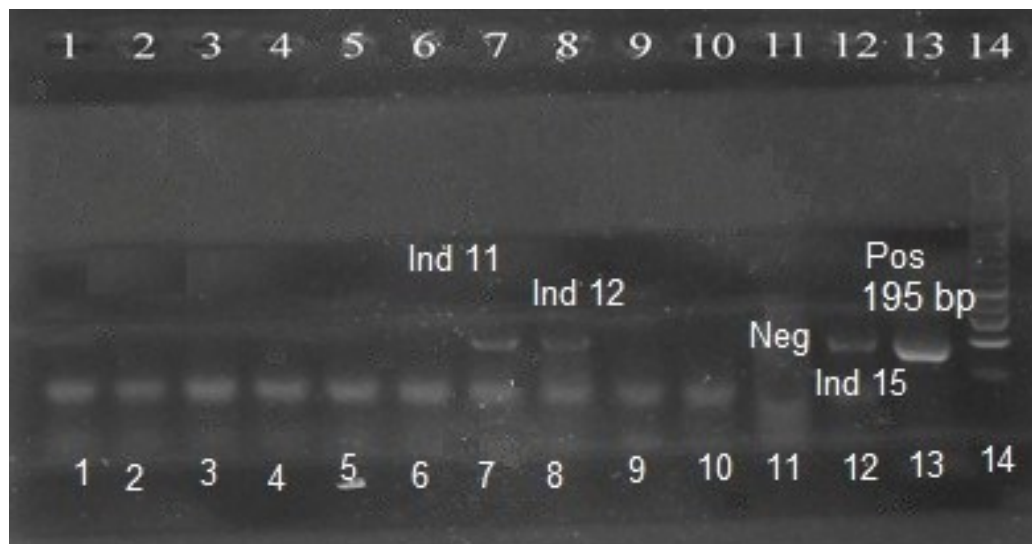
نتایج مربوط به غربالگری نمونه‌های ذرت از نظر وجود قطعات مربوط به ارگانسیم‌های تراریخته

به دلیل اینکه پیش‌بر CAMV 35S در بسیاری از گیاهان تغییر ژنتیکی یافته وجود دارد، وجود این توالی می‌تواند برای غربال‌گری گیاهان تراریخته بکار رود. ردیابی قطعاتی با اندازه ۱۹۵ bp می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که نمونه دارای دی.ان.ای نو ترکیبی حاوی این پیش‌بر بوده

و تراریخته است. بررسی الکتروفورزی محصولات PCR نمونه‌ها با آغازگر CAMV 35S نشان داد، در سه نمونه Ind 11، 12 و Ind 15، باند ۱۹۵ bp مربوط به توالی پیش‌بر CAMV 35S مشاهده شد، که می‌تواند نشان‌دهنده تراریخته بودن این نمونه‌ها باشد (شکل ۲).

عکس الکتروفورز تعدادی از نتایج، در شکل ۲ نشان داده شده است.

"داورزی و همکاران، ردیابی ارقام تراریخته ذرت در نمونه‌های وارداتی خوراک دام"



شکل ۲- غربال‌گری نمونه‌ها با استفاده از توالی پیش‌بر (CaMV 35S (۱۹۵ bp)

چاهک‌های ۱ تا ۱۰: محصول PCR نمونه‌های ذرت (Ind 5- Ind 14)، چاهک ۱۱: شاهد منفی استخراج (شریشیا کلی)، چاهک ۱۲: (Ind 15)، چاهک ۱۳: شاهد مثبت IRMM-416c (ذرت MON 863)، چاهک ۱۴: نشانگر (۱۵۰۰ bp - ۱۰۰ bp) (باند‌های زیری احتمالاً ناشی از تشکیل آغازگر دایمر است).

ردیابی دی.ان.ای ذرت تراریخته با

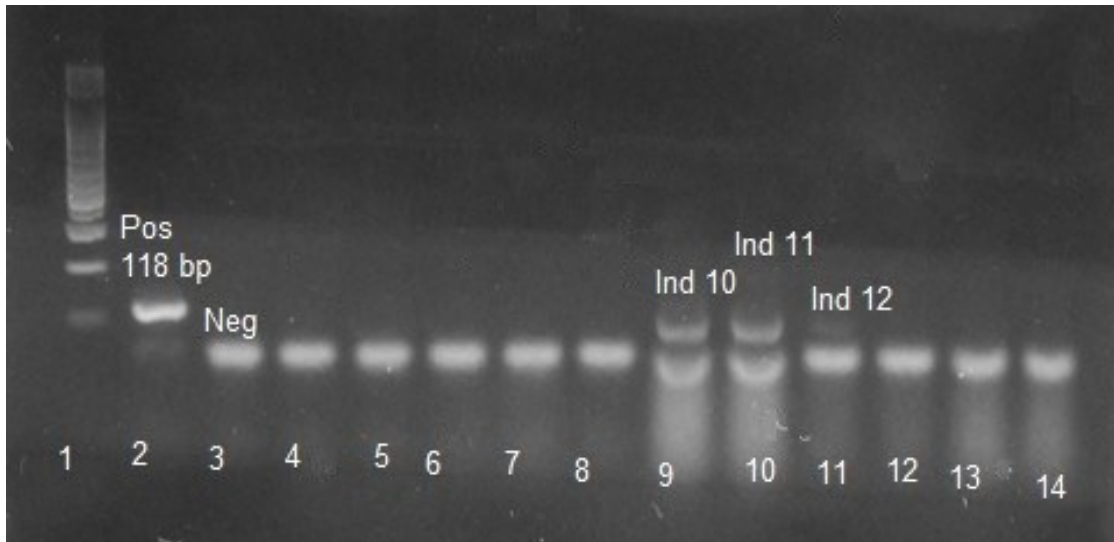
استفاده از آغازگر NOS

به دلیل اینکه پایانبر نوپالین سنتاز (NOS) در بسیاری از گیاهان تراریخته وجود دارد، می‌توان از این توالی برای غربالگری استفاده کرد.

ردیابی قطعاتی با اندازه ۱۱۸ bp نشان دهنده این است که دی.ان.ای استخراج شده از نمونه دارای توالی قابل تکثیری با منشاء پایانبر NOS بوده است. بررسی

محصولات PCR نمونه‌ها با استفاده از آغازگر مربوط به پایانبر NOS نشان داد، در سه نمونه Ind 10، Ind 11 و Ind 12، باند ۱۱۸ bp مربوط به توالی پایانبر NOS وجود دارد، که می‌تواند نشان‌دهنده تراریخته بودن این نمونه‌ها باشد (شکل ۳).

عکس الکتروفورز تعدادی از نتایج، در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- غربال گری نمونه ها با استفاده از توالی پایانه NOS (۱۱۸ bp)

چاهک ۱: نشانگر (۱۰۰ bp - ۱۵۰۰ bp)، چاهک ۲: شاهد مثبت IRMM-416c (ذرت MON 863)، چاهک ۳: شاهد منفی استخراج (شریشت کلی)، چاهک های ۴ تا ۱۴: محصول PCR نمونه های ذرت (Ind 5- Ind 15) (باندهای زیری احتمالاً ناشی از تشکیل آغازگر دایمر است).

دی.ان.ای استخراج شده از نمونه دارای توالی قابل تکثیری حاوی ژن فسفوترانسفراز نئومایسین بوده است. بررسی محصول PCR نمونه ها با استفاده از ژن شناساگر npt II نشان داد که این توالی در هیچیک از نمونه های ذرت وجود نداشت (شکل ۴).

عکس الکتروفورز تعدادی از نتایج، در شکل ۴ نشان داده شده است.

ردیابی ذرت تراریخته با استفاده از ژن

شناساگر npt II

به دلیل اینکه در بسیاری از گیاهان تراریخته از ژن کدکننده نئومایسین فسفوترانسفراز (npt II) استفاده می شود، می توان برای غربالگری مواد حاصل از گیاهان تراریخته توالی از ردیابی مربوط به این ژن استفاده کرد. ردیابی قطعاتی با اندازه ۲۱۵ bp نشان دهنده این است که

"داورزنی و همکاران، ردیابی ارقام تراریخته ذرت در نمونه‌های وارداتی خوراک دام"



شکل ۴: غربال‌گری نمونه‌ها با استفاده از توالی ژن npt II (۲۱۵ bp)

چاهک ۱: نشانگر (۱۵۰۰bp - ۱۰۰bp)، چاهک‌های ۲ تا ۷: محصول PCR نمونه‌های ذرت (Ind16-)
چاهک ۸: شاهد مثبت IRMM-416c (ذرت MON 863)، چاهک ۹: شاهد منفی (باندهای زیری
احتمالاً ناشی از تشکیل آغازگر دایمر است).

یافته‌ها و بحث

استخراج دی.ان.ای نمونه‌ها با روش CTAB و طبق استاندارد ملی ایران ۱۰۷۶۳ انجام شد (۱۱). نتایج بررسی کیفی و کمی دی.ان.ای‌های استخراج شده نشان داد که روش انتخاب شده، روش مناسبی بوده و با توجه به وجود باندهای مربوط به ژن داخلی ژئین ذرت در همه نمونه‌ها، کیفیت و قابلیت تکثیر دی.ان.ای مناسب بوده است. Elsanhoty و همکاران

در سال ۲۰۱۰ و HEO و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که استفاده از کیت‌های حاوی CTAB روش مناسبی برای استخراج محصولات فراوری شده حاوی ذرت است (۲۱، ۲۴).

همچنین Yoke و همکاران در سال ۲۰۱۱ کارایی این روش را برای استخراج دی.ان.ای از خوراک دام و Sönmezoğlu و KESKIN در سال ۲۰۱۵ مناسب بودن آن را برای استخراج از فراورده‌های حاوی

CAMV 35S از ویروس بیماری موزایک گل کلم مشتق شده است، ممکن است وجود قطعاتی با اندازه ۱۹۵ bp به دلیل وجود ویروس در روند آزمایش بوده و مثبت کاذب باشد. بنابراین نتایج مثبت به دست آمده، بخصوص نتایج حاصل از نمونه های خانواده گل کلم باید با دقت تفسیر شوند و نتایج مثبت که ممکن است دال بر وجود یک محصول حاصل از گیاه تراریخته باشند، نباید بدون انجام آزمون های تأییدی، مانند RFLP به عنوان وجود قطعی گیاه تراریخته تفسیر شوند. در استاندارد ملی ایران ۱-۹۶۱۷ بیان شده است که می توان محصول PCR را به وسیله آنزیم های محدودگر Xmn I که انتظار می رود دو قطعه ۱۱۵ bp و ۸۰ bp حاصل آن باشد، تأیید کرد. با توجه به اینکه در این تحقیق، نمونه ها ذرت بوده و احتمال آلودگی آنها با ویروس گل کلم بسیار پایین بود، آزمون تأییدی انجام نشد، ولی به همین دلیل، نتایج به طور قطعی به عنوان محصول تراریخته تعیین نشدند (۱۲).

علی رغم اینکه ردیابی قطعاتی با اندازه

ذرت و سویا اثبات کردند (۲۵، ۲۶).
براساس نتایج به دست آمده از تکثیر توالی های معمول در گیاهان تراریخته، که شامل پیشبر CAMV 35S، پایانبر NOS و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک نتومايسين فسفوترانسفراز (npt II) بود، از ۲۵ نمونه خوراک دام حاوی ذرت، در سه نمونه وارداتی از هند که با کدهای Ind 11، Ind 12 و Ind 15 نشانه گذاری شده بودند، باند مربوط به توالی پیشبر CAMV 35S و در سه نمونه وارداتی از هند که با کدهای Ind 10، Ind 11 و Ind 12 نشانه گذاری شده بودند، باند مربوط به توالی پایانبر NOS مشاهده شد. در دو نمونه Ind 11 و Ind 12 هر دو باند مربوط به توالی های پیشبر و پایانبر مشاهده شد. در هیچیک از نمونه ها توالی مربوط به ژن نشانگر nptII مشاهده نشد. در نمونه های وارداتی از چین و مجارستان نیز، هیچ بانندی که مربوط به توالی های مورد بررسی باشد، مشاهده نشد، که می تواند نشان دهنده عدم وجود توالی مربوطه یا پایین بودن حد ردیابی روش باشد. از آنجایی که توالی پیشبر

bp ۱۱۸ می‌تواند نشان‌دهنده وجود یک گیاه تراریخته باشد، به دلیل اینکه توالی پایانبر نوپالین سنتاز از آگروباکتریوم که یک باکتری خاک‌زی است، مشتق شده است، ممکن است نتایج مثبت کاذب حاصل شود که ناشی از آلودگی نمونه با آگروباکتریوم یا باکتری‌های وابسته است. بنابراین، مشاهده باندهای مربوط به این توالی نباید بدون انجام آزمون‌های تأییدی به‌طور قطعی به‌عنوان محصول تراریخته تفسیر شوند. در استاندارد ملی ایران ۹۶۱۷-۱ توصیه شده است که هویت محصول PCR مشتق شده از نمونه مجهول، به‌وسیله روش‌هایی مثل استفاده از آنزیم‌های محدودگر، توالی‌یابی دی.ان.ا. یا دورگه‌سازی دی.ان.ا. تأیید شود، ولی در حال حاضر هیچ روش صحه‌گذاری شده‌ای برای این منظور در استاندارد فوق تعریف نشده و در این تحقیق نیز که براساس استاندارد مذکور انجام شد، آزمون تأییدی انجام نشد، لذا نتایج به‌طور قطعی به‌عنوان محصول تراریخته تعیین نشدند (۱۲).

با توجه به میزان ذرت تراریخته موجود

در ماده مرجع IRMM-416c (۸/۹ g/Kg)، می‌توان LOD روش را حدود ۱٪ برآورد کرد، که به این معنی است که در صورت وجود مقادیر ارگانسیم تراریخته کمتر از ۱٪ در نمونه، قابل ردیابی نیست. با در نظر گرفتن اینکه تعدادی از خوراک دام‌های مورد آزمون، حاوی ترکیبات دیگری غیر از ذرت نیز بودند، این احتمال وجود دارد که به‌دلیل کم بودن مقدار ذرت تراریخته در محصول، ردیابی نشده است. مطالعات مشابهی که در ایران و کشورهای همجوار با وضعیت اقتصادی و اجتماعی نزدیک به ایران، بر روی محصولات موجود در بازار انجام شده نیز، وجود ذرت تراریخته را در محصولات غذایی و خوراک دام نشان می‌دهد. در ایران مطالعات متعددی در زمینه بررسی تراریختگی نمونه‌های حاوی ذرت انجام شده است، که نتایج همه آنها وجود ارقام تراریخته را نشان می‌دهد. در سال ۱۳۹۱، سرمدی و همکاران با بررسی ۵ نمونه ذرت وارداتی از کشور آرژانتین، با استفاده از پیشبر P35S و پایانبر NOS، نشان دادند که سه نمونه حاوی هر

دو توالی و دو نمونه فقط حاوی توالی پایانبر NOS بودند (۸). در سال ۱۳۹۱ ربیعی و همکاران وجود رخدادهای ذرت Bt-11 و MON810 را در محصولات غذایی فراوری شده و در سال ۱۳۹۲، حیدری و همکاران با استفاده از پیشبر P35S، در ۵/۵۶٪ از نمونه‌های بسته‌بندی شده، فله و کنسروی حاوی ذرت، وجود ذرت تراریخته را نشان دادند (۹، ۱۷).

براساس گزارش سرویس بین‌المللی دستیابی به کاربردهای بیوتکنولوژی در کشاورزی (ISAAA) در حال حاضر، هند چهارمین کشور پس از آمریکا، آرژانتین و برزیل است که بزرگترین سطح زراعی محصولات تراریخته را زیر کشت دارد (۱۶). در حالیکه بیشترین زمین زیر کشت در هند متعلق به پنبه است و براساس گزارش این سرویس، در هند تنها پنبه مجوز کشت دارد، ولی براساس گزارش مربوط به وضعیت محصولات تراریخته در هند، مجوز کشت برای سایر محصولات تراریخته مثل برنج، ذرت و کلزا نیز توسط دولت هند صادر شده است (۲۷). بنابراین، دور از انتظار نیست که برخی از

محصولات ذرت کشت شده در این کشور تراریخته باشند، گرچه هیچ اطلاعاتی در مورد پذیرش یا ارزیابی ریسک این محصول در هند در بانک‌های اطلاعاتی مانند BCH و ISAAA ثبت نشده است (۱۶، ۲۳). در حال حاضر، پذیرش ۶ رخداد پنبه و ۵ رخداد سویا در مرکز اطلاعات ایمنی زیستی هند ثبت شده است (۲۸). در مطالعه‌ای که Bhushan و همکاران در هند بر روی تعدادی محصولات غذایی وارداتی و موجود در بازارها انجام دادند، نشان دادند که ۳۲٪ از محصولات غذایی مورد بررسی در آن مطالعه، از نظر وجود توالی‌های معمول در ارگانیسم‌های تراریخته، مثبت بوده و تعدادی نمونه غذای فراوری شده حاوی ذرت، شامل شربت ذرت و اسنک‌های برپایه ذرت نیز در بازارهای هند، یافت شد (۲۹).

براساس گزارش‌های استخراج شده از سرویس بین‌المللی دستیابی به کاربردهای بیوتکنولوژی در کشاورزی (ISAAA) و مرکز اطلاعات بیوتکنولوژی (BCH) در چین ۲۱ رخداد ذرت تراریخته برای

فراوری پذیرفته شده، که اغلب آنها در سایر کشورها، از جمله اتحادیه اروپا، برای مصارف خوراک دام نیز مورد تأیید قرار گرفته‌اند و در اتحادیه اروپا نیز ۵۲ رخداد ذرت تراریخته برای مصرف خوراک دام پذیرفته شده است (۲۳، ۳۰). بیشتر مطالعاتی که تاکنون انجام شده، بر روی فراورده‌های غذایی بوده و این بررسی جزو معدود مطالعاتی است که بر روی خوراک دام انجام شده است (۱۷، ۱۹، ۲۶، ۳۱).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به بالا بودن میزان مصرف و واردات خوراک دام در بسیاری از کشورها، از جمله ایران و تفاوت قیمت اقلام تراریخته با غیرتراریخته، ردیابی و شناسایی ارقام تراریخته و درخواست درج برچسب تراریختگی از صادرکننده، می‌تواند اثرات غیرقابل انکاری در هزینه‌های واردکنندگان و اقتصاد کشور داشته باشد. به منظور شناسایی احتمالی ارقام تراریخته در مواد اولیه خوراک دام، بخصوص جرم،

جوانه و دانه ذرت و همچنین کنجاله سویا، توصیه می‌شود بررسی تراریخته بودن در استانداردهای ملی ایران مرتبط با خوراک دام اضافه شود و استانداردهای مربوط به چگونگی غربال‌گری، تأیید و شناسایی رخدادهای محتمل تعیین گردد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح پژوهشی ردیابی اقلام تراریخته سویا و ذرت در نمونه‌های وارداتی با سفارش سازمان ملی استاندارد ایران با شماره ۹۱۰۴۰۰۲ و پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی است. نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند از همه عزیزانی که در انجام این پژوهش کمک و مساعدت نمودند، به خصوص سازمان ملی استاندارد که منابع مالی این پژوهش را تأمین کرده‌اند، تشکر و قدردانی نمایند.

References

فهرست منابع

۱. "چکیده نتایج طرح آمارگیری زراعت. (۱۳۹۷) - ریاست جمهوری - سازمان برنامه و بودجه کشور - مرکز آمار ایران - آبان ۱۳۹۸."
۲. خبرگزاری صدا و سیما. (۱۳۹۶). سهم ۶۰ درصدی ذرت در واردات نهاده‌های دامی.
Available at <http://www.iribnews.ir/0071d4>
۳. حاجت‌پور ز. و قره‌یاضی ب. (۱۳۹۷). خلاصه‌ای از آخرین وضعیت جهانی محصولات تراریخته در انتهای سال ۲۰۱۷ میلادی.
۴. مدیر کل امور فراورده‌های غذایی و آشامیدنی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. (۱۳۹۷). بخشنامه شماره ۶۷۵/۱۵۸۶۸.
۵. پایگاه اطلاع‌رسانی بیوتکنولوژی ایران. (۱۳۹۷). واردات محصولات تراریخته مشمول مجوز شد.
Available at <https://irbic.ir/10677>
۶. فولادگر ف.، طالبی م. و بهار م. (۱۳۹۷). ردیابی و شناسایی گوجه‌فرنگی‌های تغییر یافته ژنتیکی با استفاده از تکنیک PCR و توالی‌یابی. مجله علوم و فنون کشت‌های گلخانه ای. ۹(۴): ۷۱-۷۹.
۷. پیراوی ونک ز.، مختاری ف. و انصاری ف. (۱۳۹۴). بررسی وجود ارقام تراریخته در دانه‌های کلزای کشت شده در ایران و ارزیابی اسیدهای چرب آن. فصل‌نامه علمی-ترویجی ایمنی زیستی. ۸(۲)، ۲۳-۳۵.
۸. سرمدی ل.، عالم‌زاده ع. و قره‌یاضی ب. (۱۳۹۱). بررسی مولکولی وضعیت تراریختگی دانه‌های ذرت وارداتی به ایران. دوفصل‌نامه مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. ۱(۲): ۱۰۳-۱۱۲.
۹. حیدری د.، شاه حسینی و صالحی ز. (۱۳۹۲). تشخیص مولکولی ذرت‌های تراریخته براساس پیشبر P35S. دوفصل‌نامه مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. ۲: ۱۱۱-۱۱۸.
۱۰. مرکز پژوهش‌های مجلس شورای اسلامی، قانون ایمنی زیستی جمهوری اسلامی ایران. (۱۳۸۸). شماره ۲۶۶/۲۴۸۲۸.
۱۱. استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۷۶۳. (۱۳۹۷). مواد غذایی - روش‌های ردیابی ارگانسیم‌های تغییر ژنتیکی یافته و فراورده‌های حاصل از آنها - استخراج اسید نوکلئیک.
۱۲. استاندارد ملی ایران ۱-۹۶۱۷. (۱۳۹۸). مواد غذایی - روش‌های ردیابی ارگانسیم‌های تغییر ژنتیکی یافته و محصولات حاصل از آنها - روش‌های کیفی مبتنی بر اسید نوکلئیک - تجدید نظر اول.

"داورزی و همکاران، ردیابی ارقام تراریخته ذرت در نمونه‌های وارداتی خوراک دام"

۱۳. استاندارد ملی ایران ۷۵۷۰. (۱۳۹۸). خوراک دام - نمونه‌برداری.
۱۴. استاندارد ملی ایران ۱۴۹۴۸. (۱۳۹۲). فراورده‌های غذایی و کشاورزی - طرحی برای استاندارد نمونه‌برداری از یک بهر.
15. Oishimaya Sen Nag. (2017). World facts-world leaders in corn (maize) production, By Country.
16. Clive J. (2009). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, ISAAA brief, 41. Available at <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/default.asp>.
17. Rabiei M., Mehdizadeh M., Rastegar H., Vahidi H. and Alebouyeh M. (2013). Detection of genetically modified maize in processed foods sold commercially in iran by qualitative PCR. Iran J Pharm Res. 12 (1): 25-30.
18. Herzallah S.M. (2012). Detection of genetically modified material in feed and foodstuffs containing soy and maize in Jordan. Journal of Food Composition and Analysis. 26(1):169-172.
19. Elsanhoty R.M., Al-Turki A.I and Ramadan M.F. (2013). Prevalence of genetically modified rice, maize, and soy in Saudi food products. Applied Biochemistry and Biotechnology. 171 (4): 883-899.
20. Matsuoko T., Kawashima Y., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakab Y., Isshiki K., Toyoda M. and Hino A. (2000). A Method of detecting recombin.ant DNAs from flour lines of genetically modified maize. Journal of the Food Hygienic Society of Jappan. 41(2):137-143.
21. Elsanhoty R.M., Ramadan M.F. and Jany K.D. (2010). DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study. Food Chemistry. 126 (4):1883-1889.
22. BCH. (2006). Modified Organism MON-00863-5 - Yield Gard™ Rootworm™ maize, Biosafety Clearing .House, finding information, record details. Available at <https://bch.cbd.int/database/record.shtml?Documentid 14778>.
23. BCH. (2019). Country's decisions and other communications. Available at <http://bch.cbd.int/database/decisions>.
24. Heo M.S., Kim J.H., Park S.H., Woo G.J. and Kim, H.Y. (2004). Detection of genetically modified maize by multiplex PCR method. J. Microbiol. Biotechnol. 14(6): 1150-1156.
25. Yoke-Kqueen C., Yee-Tyan C., Siew-Ping K. and Son R. (2011). Development of multiplex-PCR for Genetically Modified Organism (GMO) detection targeting EPSPS and Cry1Ab genes in soy and maize samples. International Food Research Journal. 18: 515-522.
26. Sönmezoğlu Ö.A. and Keskin H. (2015). Determination of genetically modified corn and soy in processed food products. Journal of Applied Biology and Biotechnology. 3: 32-37.
27. Uttara Shankar. (2017). Status of genetically modified (GM) crops in India. Available at <https://www.teriin.org/library/files/GM-crops-in-India.pdf>.
28. BCH. (2019). Country Profile. Available at <https://bch.cbd.int/about/countryprofile.shtml?country=india>.

29. Bhushan Ch., Khurana A., Taneja S. and Khullar B. (2018). Genetically modified processed foods in India—need to curb illegal sales in the indian market, Centre for Science and Environment, New Delhi.
30. ISAAA. (2019). GM approval database. Available at <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>.
31. Arun Ö.Ö., Yılmaz F and Muratoğlu K. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. Food Control. 32(2): 525-531.

Detection of Genetically Modified Maize in Imported Animal Feed

Sareh Davarzani ¹, Fahimdokht Mokhtari^{*1}, Farnoosh Attar ¹, Faezeh Shirkha²

1-Standard Research Institute, Karaj- Iranian National Standard Organization (INSO)- Standard Research Institute- Faculty of Food Industry and Agriculture.

2-Tehran Azad University, Institute of Nutrition Sciences and Food industry Researches.

mfahimdokht@gmail.com

Abstract

Genetically modified crops are produced using modern biotechnology to create or increase desirable traits such as increased efficiency or resistance to unfavorable factors. In recent years, Almost 200 million hectares of world crop acreage planted with GM crops including maize, so it is possible that GM maize has been imported to Iran especially as animal feed. Therefore, 25 samples of imported maize used for animal feed were tested to detect probable GM maize. The DNA of samples was extracted by CTAB method and its quality and quantity were evaluated by electrophoresis and spectroscopic methods and their amplifiability confirmed by PCR using the internal maize genomic gene of Zein based on INSO 10763. Detection of GM varieties was performed by the polymerase chain reaction (PCR) method based on INSO 9617 using primers CaMV 35S, NOS terminator, npt II marker gene generally existed in GMOs. According to PCR results with primers specific for sequences common in GM organisms, in 3 samples out of 25 samples a 195 bp band related to CaMV 35S promoter and in 3 feed samples out of 25 samples a 118 bp band related to NOS terminator were observed, 2 of them showed both sequences. The band related to nptII marker gene was observed in none of samples. These results can lead to the probability of existing of GM ingredients in samples. In order to identify that the observed electrophoretic bands are belonged to the GM organisms, some confirmation tests are needed.

Keywords: Genetically Modified, Maize, Animal Feed, PCR.