وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية العلوم / قسم علوم الحياة

تحديد التحويرات الوراثية في الفاكهة المستوردة ودراسة تاثير هذه التحويرات على فترات الخزن

رسالة

مقدمة إلىمجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة

الطالب

باسم عبد الواحد جاسور سعدون

بكالوريوس علوم حياة جامعة كربلاء – 2006

بأشـــــــــــــراف

أ.م.د. خالد علي حسين اليساري

أ.د. مهند محسن احمد العتبي

1442 هـ

2021 م

بِسْمِ اللَّـهِ الرَّحْمَـٰنِ الرَّحِيمِ

﴿فَأَمَّا الزَّبَدُ فَيَذْهَبُ جُفَاءً ۖ وَأَمَّا مَا يَنفَعُ النَّاسَ فَيَمْكُثُ فِي الْأَرْضِ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة الرعد

الاية :17

شكرٌ وتقدير

لا يسعني وأنا أضع اللمسات الأخيرة لهذه الدراسة إلا أَنْ أَتقدَّم بالشُّكر الجزيل إلى أُستاذَيّ المشرفين الكريمين: الأُستاذ المساعدالدكتور خالد علي حسين , والأُستاذ الدكتورمهند محسن احمد(مثالا للوفاء, معيارا للصفاء, الزائد على العطاء بلا منازع ولاعناء) , وليس غريبا في شكري للأستاذ المساعد الدكتور خالد علي حسين لما شجعني وحفزني لإتمام مسيرتي العلمية فجزاه الله عني خير الجزاء.

كما لا يفوتني في هذا المقام إلاّأَنْأَتقدَّم بخالص شكري وتقديري الى رئاسة قسم علوم الحياة وعمادة كلية العلوم لإَتاحتها الفُرصة لي لإكمال دراستي .

وآعترافاً مني بالجميل أتقدَّم بالشُّكر إلى عائلتي لصبرهم وتحملهم إياي طيلةَ فترة الدراسة والبحث وللدعم المادي والمعنوي الذي قدموه الي .

و أخيرًاً بالغ تقديري لكل من ساعدني و أعانني في انجاز هذه الرسالة وبالخصوص الاستاذ الدكتور حيدر علي محمد كلية الطب البيطري – جامعة كربلاء ، فلهم في النَفْسِ مَنزِلة و إنْ لم يُسعِفُ المقام ذِكرُهُم ، فهم أَهلٌ للفضلِ والخير والشُّكرِ .

باسم

الخلاصة

تنتج معظم الاغذية في الوقت الحالي بآستخدام تقنيات الهندسة الوراثية او ما يعرف بتقنية الجين , وهو أُسلوب يُستخدم في نقل الجينات من كائن حي الى اخر, بهدف اعطاء سمات او خصائص مرغوبة وان اغلب عمليات نقل الجينات تتم بصورة عشوائية وسط المادة الوراثية مما يولّدُ مَخاوِفَ في عدم قدرة الـ DNA في التحكم في العمليات الايضية على المدى البعيد .

تعد تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز(PCR) للتحري عن الكائنات المعدلة وراثيًا GMO الخيار الأكثر موثوقية نظرًا لحساسيتها العالية وخصوصيتها. وهي مستخدمة في اكثر دول العالم.

جمعت 91 عينة لكل من حبوب فول الصويا ومشتقاتها الثانوية وكذلك حبوب الرز, التي تم الحصول عليها خلال فترة الدراسة الحالية التي بدأت من شهر كانون الاول 2019 ولغاية شهر اذار 2020 , تم عزل الـ DNA من العزلات النباتية الجافة (فول الصويا ومشتقاتها الثانوية وحبوب الرز) للأصناف المعتمدة في الدراسة باستعمال خطوات بروتوكول مجهزة ، وهذه العِدّة توفرّ طريقة سريعة وسهلة للحصول على DNA نقي من العزلات النباتية.

عند قياس الكثافة الضوئية (OD) للحامض النووي لجميع العزلات وُجِدَ أنَّ معظم قيم النقاوة تقع بين (1.7 – 2.0) .

خلال الدراسة الحالية تم آستخدام تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز للتحري عن البادئات الشائعة الاستخدام في التحويرات الوراثية في النباتات وهي كل من الباديء CaMV-35S promoter و المنهي Nos terminator ، وقد استخدم اسلوبين جزيئيين للتحري عن المحاصيل المعدلة وراثي المحصول وكما موضح كالاتي: الاسلوب الاول هو التحري باستخدام سلسلة تفاعل البوليميريز الـPCR Monoplex، الأسلوب الثاني هي الكشف باستخدام سلسلة تفاعل البوليميريز الثنائي douplex PCR.

أظهرت النتائج الحالية ان ثلاثة تراكيب وراثية من أصل سبعة عشر تركيباً وراثياً والعائدة لكسبة فول الصويا كانت محورة وراثيا اذ احتوت على الحفاز والمنهي في نفس العينة , والعينات المحورة وراثيا هي كسبة فول الصويا المستوردة الامريكية Healthy Fead No.1، و كسبة فول الصويا المستوردة البرازيلية Healthy Fead No.2، كسبة فول الصويا المستوردة الارجنتينية Healthy Feed No.3 وتم اكتشاف

التحوير الوراثي باستخدام كلا تفاعلي سلسلة البوليميريز الاعتيادي MonoplexPCR وسلسلة تفاعل البوليميريزالثنائي douplex PCR.

حيث تم تسجيل الحفاز الخاص بالبادئ CaMV-35S promoterناتج 195 زوجاً قاعديا في ثلاث تراكيب وراثية والعائدة لأعلاف فول الصويا المعدلة وراثيا , وكذلك سجل الحفاز الخاص بالمنهي Nos terminator ناتج 118 زوج قاعدي في ثلاث تراكيب وراثية والعائدة لكسبة فول الصويا المعدلة وراثيا , تم تقدير الأوزان الجزيئية للحزمة المتضاعفة على مواقع الحزم ذات الاوزان الجزئية المعروفة للدليل الحجمي (DNA-Marker) .

تمت مقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة اذ تبين ان الحزمة المتضاعفة تنحصر بين الحجمين 100-200 زوج قاعدي وتم تأكيد ذلك من خلال العلاقة بين الوزن الجزيئي لحزم الدليل الحجمي وبين المسافة التي تحركتها تلك الحزم المتضاعفة على هلام الاكاروز , بينما لم تسجل أي نتائج موجبة للبادئات النوعية المتخصصة لكل من الباديء P35S-cf3 والمنهي P35S-cf4 لجميع عزلات محصول الرز باستخدام سلسلة تفاعل البوليميريز(PCR) .

تم ارسال عينة كسبة فول الصويا (S1) الامريكية المعدلة وراثيا الى كوريا الجنوبية من اجل تاكيد تسلسلات القواعد النايتروجينية للحافز promoter والمنهيterminator ومقارنته مع التسلسلات المنشورة في موقع المركز الوطني للتقانات الإحيائية NationalCenter for Biotechnology , اوضحت نتائج الدراسة الحالية بان هناك تطابق 100% مع تسلسلات القواعد النايتروجينة للدراسات المنشورة على موقع المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية NationalCenter for Biotechnology.

تم دراسة المكونات الكيميائية لمحاصيل فول الصويا حيث بينت المقارنة بين المكونات الكيمائية للمحاصيل المعدلة وراثيا وغير المعدلة وراثيا وجود اختلافات جوهرية في المكونات اذا زادت نسبة البروتينات والدهون في النباتات المعدلة وراثيا عن النباتات غير المعدلة وراثيا وبالمقابل فان نسبة الالياف والمعادن (الرماد) قد قلت نسبتها في المعدلة وراثيا وهذه التغيرات قد يكون لها منافع اقتصادية الى ان اضرارها على صحة الحيوانات وبالتالي الانسان غير واضحة وتحتاج الى دراسات معمقة.

تتلخص الدراسة الحالية بأنّ أستخدام الطرائق الجزيئة المختلفة مثل تفاعل سلسلة البوليميريز هي اداوات قيمة ومفيدة للكشف عن المحاصيل المعدلة وراثيا، الخطوة الرئيسية للكشف عن نتائج المحاصيل المعدلة وراثيا هي استخدام طريقة استخلاص الحامض النووي المناسبة ومدى ملائمتها للتحليل اللاحق.

قائمة المحتويات

التسلسل	المحتويات	الصفحة
	المقدمة	1
1	استعراض المراجع	3
1-1	الهندسة الوراثية ووسائل التربية التقليدية	3
2-1	الكائنات المعدلة وراثيا	3
3-1	عناصر التحويل في التعديل الوراثي	4
4-1	المحاصيل المعدلة وراثيا	5
1	فول الصويا	6
2	الرز الذهبي	6
5-1	اسواق المحاصيل المعدلة وراثيا	8
6-1	الامان الحيوي ووضع علامات على المحاصيل المعدلة وراثيا	8
7-1	طرق التعديل الوراثي للمحاصيل	10
8-1	الكشف عن المحاصيل المعدلة وراثيا	16
1-8-1	الكشف المعتمد على الـDNA	17
1-1-8-1	تفاعل سلسلة البوليميريز	17
9-1	انواع نقل الجينات في النباتات المعدلة وراثيا	18
1-9-1	البادیء والمنهي	18
1-1-9-1	البادیء	18
2-1-9-1	المنهي	19

2-9-1	الجينات المعلمة	19
10-1	مخاطر ومنافع استخدام النباتات المعدلة وراثيا	19
1-10-1	المخاطر الناشئة عن استخدام النباتات المعدلة وراثيا	20
1-1-10-1	المخاطر الصحية	20
1	الحساسية والسمية	20
2-1-10-1	المخاطر البيئية	21
2-10-1	فوائد النباتات المعدلة وراثيا	22
1-2-10-1	مقاومة الافات	22
2-2-10-1	تحمل مبيدات الأعشاب	23
3-2-10-1	مقاومة الأمراض	23
4-2-10-1	الفوائد الغذائية	24
11-1	اهمية دراسة المكونات الكيميائية لحبوب فول الصويا	24
2	المواد وطرائق العمل	26
1-2	المواد والاجهزة المستخدمة	26
1-1-2	الادوات والمعدات	26
2-1-2	المواد الكيميائية	27
3-1-2	العدد التشخيصية	28
2-2	طرائق العمل	28

1-2-2	جمع العينات النباتية	28
2-2-2	عزل الـ DNA من النماذج النباتية	35
3-2-2	قياس تركيز ونقاوة الــ DNA	36
4-2-2	الترحيل الكهربائي لمستخلص الـDNA	36
1-4-2-2	المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي	36
1	داريء Tris- borate –EDTA buffer(TBE- 1X)	36
2	محلول صبغة بروميد الاثيديوم	36
3	الدليل الحجمي للـ DNA	37
2-4-2-2	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز	37
5-2-2	ظروف تفاعل سلسلة تفاعل البوليميريز وتحليلات حزم التضخيم	38
1-5-2-2	البادئات	38
1	البادئات الخاصة لفول الصويا	38
2	البادئات الخاصة للارز	39
3	تحضير البادئاتالاصلية	40
2-5-2-2	تفاعل سلسلة البوليميريز الاعتيادي	40
1	تحضير محاليل العمل اليومي لاجراء تفاعلات PCR الاعتيادي	40
2	برنامج المدور الحراري لسلسلة تفاعل البوليميريز الاعتيادي PCR	41
3-5-2-2	تفاعل سلسلة البوليميريز الثنائي	43

1	تحضير محاليل العمل اليومي لاجراء تفاعلات PCR الثنائي	43
2	برنامج التدوير الحراري لسلسلة تفاعل البوليميريز الثنائي	43
6-2-2	تحليل نتائج تسلسل الدنا	44
7-2-2	التحليل الكيميائي للعينات	44
8-2-2	التحليل الاحصائي	44
3	النتائج والمناقشة	45
1-3	جمع عينات فول الصويا ومشتقاته	45
2-3	استخلاص الـ DNA والتاكد من سلامة الـ DNA المستخلص من عينات فول الصويا لتفاعلPCR الاعتيادي	45
1-2-3	استخلاص وتنقية الـ DNA للأنماط الوراثية لمحصول فول الصويا	45
2-2-3	تقديرتركيز و نقاوة الـ DNA المستخلص للانماط الوراثية لمحصول فول الصويا وكسبة فول الصويا	46
3-3	التحري عن المورثات المحتمل وجودها في عزلات فول الصويا:	48
1-3-3	الكشف عن الجين المشفر CaMV-35S promoter و nos-terminator في حبوب فول الصويا وكسبة فول الصويا باستخدام تقنية سلسلة تفاعل البوليميريز الاعتيادي	48
4-3	التحري عن المورثات المحتمل وجودها في عزلات فول الصويا وكسبة الصويا باستخدام تقنية الـ PCR الاعتيادي MonoPlex PCR والـPCR الثنائي Duplex PCR	52
5-3	جمع عينات الرز	53
6-3	استخلاص الـ DNA من عينات حبوب الرز لتفاعلPCR	54
7-3	التاكد من سلامة الـ DNA المستخلص لتفاعل PCR لعينات محصول الرز	55

1-7-3	تقديرتركيز و نقاوة الـ DNA المستخلص للانماط الوراثية لمحصول الرز	56
8-3	الكشف عن الجين المشفر الباديء P35S والمنهي NOS في الطرز الوراثية للرز باستخدام تفاعل سلسلة البوليميريز	61
9-3	الكشـــف عن تسلسل القواعـــــد النتروجينية لمـــــــورثة P35Sو HA-nos في مشتقات فول الصويا	66
10-3	المكونات الكيميائية للفول الصويا	71
4	**الاستنتاجات والتوصيات**	73
1-4	**الاستنتاجات**	73
2-4	**التوصيات**	74
	المصادر	75

قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1.1	طريقة النقل المباشر بقاذفات الجينات لتعجيل سرعة الجسيمات الدقيقة الحاملة للجين المرغوب	1
1.3	حزم الحمض النووي الجيني لتسعة طرز وراثي من حبوب فول الصويا وكسبة الصويا باستخدام 1٪ جل أجاروز عند 90 فولت لمدة ساعة واحدة	46
2.3	الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسة الدنا بأستعمال البادئات P-35S promoterلعينات فول الصويا على هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 75 وزمن ساعة	49
3.3	الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسة الدنا لعزلات فول الصويا بأستعمال ثلاث بادئات نوعية -HA	50

	nos118-terminator في هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 75 وزمن ساعة	
4.3	الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسة الدنا duplex PCR لعزلات فول الصويا بأستعمال بادئات نوعية P-35S promoter و المنهي Nos terminator في هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 75 وزمن ساعة	53
5.3	حزم الحمض النووي لتسعة طرز وراثية من الرزعلى 1٪ جل أجاروز عند 90 فولت لمدة 20 دقيقة	56
6.3	الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسة الدنا لعزلات الرز بأستعمال ثلاث بادئات نوعية -HA nos118-terminator في هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 75 وزمن ساعة	62
7.3	تطابق القواعد النيتروجينية لموروث p35S للدراسة الحالية (Query) مع العزلة المرجعية (Sbject).	69
A-8.3	يوضح كروماتوكرافي لقمم تسلسلات الحامض النووي لموروث P35 والذي يمثل خطوط ومنحنيات قواعد النايتروجينية	69
B-8.3	يوضح كروماتوكرافي لقمم تسلسلات الحامض النووي لموروث P35 والذي يمثل خطوط ومنحنيات قواعد النايتروجينية	70
9.3	تطابق القواعد النايتروجينة لموروث (HA-nos) للدراسة الحالية (Query) مع العزلة العالمية (Sbject).	70
10.3	يوضح كروماتوكرافي لقمم تسلسلات الحامض النووي لموروث HA-nos والذي يمثل خطوط ومنحنيات قواعد النايتروجينية	71

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1.2	الادوات والمعدات المستخدمة في هذه الدراسة	**26**
2.2	المواد الكيميائية او المحاليل المستخدمة في هذه الدراسة	**27**
3.2	العدد المستخدمة في هذه الدراسة مع المصدر.	**28**
4.2	الأصناف قيد الدراسة مع مصدرها واصل نشؤها لمحصول فول الصويا ومشتقاتها.	**29**
5.2	الأصناف قيد الدراسة مع مصدرها واصل نشؤها لمحصول الرز.	**30**
6.2	الدليل الحجمي للـ DNA	**37**
7.2	البادئات النوعية المصممة للكشف عن التعديل الوراثي بواسطة الـ PCR	**39**
8.2	البادئات النوعية المصممة للكشف عن التعديل الوراثي بواسطة الـ PCR	**39**
9.2	مكونات تفاعل الـ PCR الاعتيادي للباديء CaMV-35S promoter و المنهي Nos terminator .	**41**
10.2	برنامج تفاعل الـ PCR الاعتيادي لجين (CaMV 35S promoter و-HANos 118) لعزلات فول الصويا وكسبة الصويا	**42**
11.2	برنامج تفاعل الـ PCR لجين (CaMV 35S promoter وNos terminator) لعزلات حبوب الرز	**42**
12.2	مكونات تفاعل سلسلة البوليميريز الثنائي Duplex PCR	**43**
13.2	برنامج التدوير الحراري في تفاعل الـ Duplex PCR لجين (S35 وHANos 118) لعزلات فول الصويا وكسبة الصويا الصويا .	**44**
1.3	مصادر واعداد العينات الخاصة بمحصول فول الصويا وكسبة فول الصويا المستخدمة في الدراسة الحالية .	**45**
2.3	تركيز ونقاوة مستخلصات عزلات فول الصويا ومشتقاتها بواسطة طريقة i-genomic DNA Extraction method	**46**

3.3	نتائج اختبار العينات المدروسة والعائدة لفول الصويا(حبوب فول الصويا وكسبة فول الصويا) بالنسبة الى المورثات التي تم التحري عنها والتي تستعمل في التعديل الوراثي .	**51**
4.3	مصادر واعداد العينات الخاصة بمحصول الرز المستخدمة في الدراسة الحالية.	**54**
5.3	تركيزونقاوة مستخلصات الانماط الوراثية لمحصول الرز بواسطة طريقة i-genomic DNA Extraction method	**56**
6.3	ملخص يوضح نتائج اختبار الانماط الوراثية المدروسة لمحصول الرز بالنسبة الى المورثات التي تم التحري عنها والتي تستعمل في التعديل الوراثي.	**63**
7.3	يوضح نسبة التشابه بين تسلسل القواعـــــد النتروجينية لناقل الكلونة للنباتات التي لها تشابه نسبي مع تسلسل القواعـــــد النتروجينية لمـــــورثة P35S و HA-nos في مشتقات فول الصويا في الموقع العالمي Gene bank .	**67**
8.3	يتضمن نتائج التحليل الإحصائي لمحتوى حبوب فول الصويا وكسبة فول الصويا من المركبات الغذائية الرئيسية المتمثلة بالبروتين والدهن والألياف والرماد باللاضافة الى محتواها من الرطوبة .	**71**

قائمة المخططات

رقم المخطط	العنوان	الصفحة
2.1	العمليات الرئيسية للكشف عن المحاصيل المعدلة وراثيا	**34**

قائمة المختصرات

المعنى	العنصر المختصر
Annealing Temperature	Ta
Bacillus thuringiensis	Bt
Backward	B
Cauliflower mosaic virus	CaMV
Cauliflower mosaic virus P35S promoter	P35S
Concentration	Con
De ionized Distilled Water	ddH2O
Deoxynucleotide Triphosphates	dNTP's
Deoxyribonucleic acid	DNA
Ethidium Bromide	EtBr
Food and Agriculture Organization	FAO
Genetically Engineered Organism	GEO
Genetically Modified crops	GM Crops
Genetically Modified Organisms	GMOs
Guanine	G
Herbicide-tolerant	HT
i-genomic DNA extraction	IGDE
Melting temperature	Tm

Microgram	Mg
Microlitre	Ml
Micromolar	Mm
Milliliter	Ml
Minutes	Min
Nanometre	Nm
Nopaline synthase	NOS
Nopaline Synthase Terminator	T-nos
Optical Density	O.D
Picomole	Pmole
Polyethylene glycol	PEG
Polymerase Chain Reaction	PCR
Reverse Primer	R
Single strand Deoxyribonucleic acid	ssDNA
Thymine	T
Transfer DNA	T-DNA
Tumour-inducing plasmid	Ti – plasmid
Ultra violate	UV
Tumour-inducing	Ti

Soy	S
Rice	R
Tris-Borate EDTA	TBE

المقدمة

المقدمة Introduction

اتَّسم النصف الثاني من القرن العشرين بالكثير من الإنجازات العلمية , وبشكل خاص التطور التقني والعلمي في العلوم الحيوية , وكانت تقنيات الهندسة الوراثية أو مايعرف تطويع الجين gene manipulation من أبرز سمات هذا التطور العلمي, لقد تمكن كل منJackson و Symons و كذلك Berg ولأول مرة في سنة 1972 من لصق جزيئين DNA من كائنين مختلفين في المختبر (Bawa, 2013).

الهندسة الوراثية تُعد اسلوبًا حديثًاً في عمليات انتقال الصفات الوراثية وبصورة مباشرة من كائن حي الى اخر حتى وان لم يكن بينهما صلة قرابة , وهذا خلاف ما هو معروف بانتقال الصفات الوراثية عن طريق التهجين , اذ لابد من توفر صلة وراثية بين الكائنين وهذا مايسمى بالتربية التقليدية breeding traditional (Maghari *et* . *al*.,2011)

تسمح الهندسة الوراثية بنقل الجينات بين الأنواع المتباعدة وراثيا ويعود السبب في ذلك الى ان الكائنات الحية تمتلك جزيئة الـ DNA مكونة من نفس المادة من الممكن قصها ولصقها واعادة ترتيبها مجددا في المختبر (Ammann, 2011) .

وفي نهاية القرن الماضي برزت الهندسة الوراثية ; لتعتمد على التعديل الوراثي كبديل للكثير من المشكلات ذات الصلة في ما يخص مقاومة الآفات ومستويات الانتاجوالجودة والتكيف مع البيئات المختلفة, نتج عن ذلك اتساع في المساحات المزروعة بالمحاصيل المعدلة وراثيا حول العالم (Matas *et al*., 2009) .

ازدادت المساحة المزروعة بالمحاصيل المعدلة وراثيًا سنويا من 1.71مليون هكتار في عام 1996 وحتى 181.5مليون هكتار في عام 2014 , حيث زرعت في 28 دولة من قبل 18 مليون مزارع , الولايات المتحدة تعتبر البلد الرائد بزراعة المحاصيل المعدلة وراثيا بمساحة مليون هكتار, يتبعها في المرتبة الثانية البرازيل , ثم الارجنتين والهند , ثم كندا , اما اهم المحاصيل المزروعة فتشمل الذرة والقطن وفول الصويا والكانولا والبابايا والبندورة , لإنتاج اصناف مقاومة للحشرات والامراض ومبيدات الاعشاب (Kamle & Ali ,2013)

على الرغم مما حققته تطبيقات الهندسة الوراثية من إنجازات لخدمة البشرية لم يكن يحلم بها, فقد أثير على منتجاتها مخاوف وجدلاً ساخناً , لم تزل بعد , والتي من المحتمل أن تهدد الصحة العامة للانسان بل والبيئة , وتنحصر أهم مصادر القلق المحتملة هو انتقال المورثات من النباتات المهندسة وراثيا الى البيئة من التهديدات المؤثرة على التنوع الحيوي (Ammann *et al*., 2001) .

انتقال مورثات مقاومة المضادات الحيوية من النبات المحور وراثيا إلى بكتيريا القناة الهضمية للحيوان والانسان من المحاصيل المستعملة في تغذيتها , ومن ثم الى بكتيريا التربة من مخلفات الحيوان والإنسان وبقايا النباتات , ومن المحتمل ان يؤدي ذلك إلى ظهور أمراض ميكروبية لا ينفع معها استعمال المضادات الحيوية (Wong*et al*.,2013) .

لذا تعتمد بروتوكولات على استعمال تقنية الـ PCR للكشف عن العناصر المعدلة وراثيًا وذلك باستعمال العناصر الوراثية الشائعة الاستخدام في التعديل الوراثي (Wang *et al*.,2015).

لشحة الدراسات والابحاث المتعلقة في الكشف عن النباتات المحورة وراثيا في العراق عموما وفي محافظة كربلاء خصوصًا مع الشك في وجود بعض النباتات المعدلة وراثيا لذا ارتات الدراسة التاكد من وجودها ومصدرها لغرض الكشف عنها .

أهداف البحث :

1. الكشف عن وجود تحويرات وراثية في فول الصويا ومحصول الرز المتداولة في الأسواق العراقية ، وذلك باستخدام العناصر الشائعة الاستخدام في التعديل الوراثي مثل المحفز الخاص بالـــــ CaMV-35S promoterوالحفاز الخاص بالمنهي Nos terminator في العينات المدروسة باستخدام طريقة سلسلة تفاعل البوليميريز (PCR).
2. دراسة تسلسل القواعد النايتروجينية للموروث الخاص بالمحفز CaMV-35S promoter والحفاز الخاص بالمنهي Nos terminator باستخدام جهاز Sequencing وتحليل النتائج .
3. دراسة التركيب الكيميائي لبعض بذور واعلاف فول الصويا الطبيعية والمحورة باستجدام جهاز (Near-Infrared Spectroscopy)

الـفـصل الأول

استـعـراض الـمـراجع

1- استعراض المراجع Literatures Review

1-1الهندسة الوراثية ووسائل التربية التقليدية

Geneticengineering andtraditional breeding techniques

هنالك تشابه بين وسائل التربية التقليدية Traditional breeding techniques وتقنية الهندسة الوراثية Genetic engineering technique , بالرغم من وجود اختلافات عديدة بين هاتين الاسلوبين , الا ان كل منهما استهدف التحسين الوراثي لمحاصيل النبات (السعدي واخرون, 2012).

تقتصر برامج التربية التقليدية في الوقت الحاضر على نقل الجينات عن طريق التهجين والانتخاب بين افراد النوع الواحد , في حين نجد ان طرائق الهندسة الوراثية قد تعدت حاجز النوع كثيرا , حيث يتم نقل المورثّات بين أي كائن حي وكائن اخر وبمدة زمنية قصيرة , وتشمل التربية التقليدية جمع العديد من توليفات الصفات المرغوبة التي يمكن نقلها باستخدام الطرق التقليدية (التهجين والانتخاب) خلال الدورة الجنسية للنبات , ولذلك تم تقليل مشاكل التربية التقليدية للمحاصيل النباتية , والتي تجلت في صعوبة السيطرة على نتائجها وطول المدة الزمنية لاجرائها , والقدرة المحدودة على تغير اكثر من صفة وراثية , اضافة الى صعوبة استعمالها لحدوث التعديل الوراثي بين الكائنات الحية المختلفة (El-Zaeem *et al.*, 2011).

ومن جانب اخر استعملت الهندسة الوراثية في تحسين انتاج العديد من النباتات , سواء فيما يخص السمات الزراعية المتنوعة المتعلقة بالجودة ومقاومة الحشرات والافات والحشرات وتحمل مبيدات الاعشاب , وهذه الخصائص او المميزات يصعب تلبيتها مع وسائل التربية التقليدية(الساهوكي وعبدالباسط, 2020).

2.1. الكائنات المعدلة وراثيا :Genetically Modified Organism (GMO)

الكائن المعدل وراثيا أو الكائن المهندس وراثيا هو كائن تم تغيير خصائصه الجينية من خلال إدخال جين معدل أو جين من كائن آخر بآستخدام تقنيات الهندسة الوراثية (Zhu *et al.*,2010) .

تسمى عملية إنتاج كائن معدل وراثيا "الهندسة الوراثية" ، ويمكن تطبيق الهندسة الوراثية على النباتات والبكتيريا والخمائر والحيوانات والفطريات , أيًّاً كانت الكائنات الحية التي سيتم تعديلها (Tam, 2015).

تتضمن الهندسة الوراثية ثلاث خطوات رئيسة :

- إيصال الحمض النووي DNA إلى الخلايا عن طريق عملية تعرف بآسم التحول Transformation (Freese & Schubert , 2004).
- تطوير نظام استزراع اذ يتم تجديد الخلايا المحولة بكفاءة إلى كائنات كاملة (Freese & Schubert , 2004).
- التعبيرالجيني للجينات المعدلة وراثيًا: الجين المعدل عبارة عن جين أو مادة وراثية تم نقلها بشكل طبيعي ، أو بأي عدد من تقنيات الهندسة الوراثية من كائن إلى آخر , الجينات المحورة لها القدرة على تغيير النمط الظاهري للكائن الحي عبر انتاج البروتين المشفر لها (Venken & Bellen,2007) .

أصبحت الهندسة الوراثية تقنية واعدة وفعالة لتحسين الخصائص الزراعية للنبات (Moghissi *et al*.,2016).

تم تصميم النباتات من أجل مقاومة الأمراض أو الآفات أو مبيدات الأعشاب أو مبيدات الآفات أو زيادة الغلة أو القيمة الغذائية(Holst-Jensen *et al*.,2012) .

من أمثلة الجينات التي تم نقلها هي جينات بي تي (Bt) المقاومة للحشرات والتي تم نقلها من بكتريا تعيش في التربة تسمي (*Bacillus thuringiensis*) وهذا النوع من البكتريا يعمل على صنع مواد سامّة ضد يرقات الفراشات التي تصيب الذرة الشامي، وبعضها لها اضرارًا مميته على أنواع أخرى من الحشرات , وبعد أن تم نقل هذه الجينات الى المادة الوراثية لمحصول الذرة , أصبحت هنالك المقدرة لنباتات هذا المحصول المهندس وراثياً لمقاومة الحشراتالتي تصيبه (Chakrabarty *et al*., 2020).

3.1 عناصر التحويل في التعديل الوراثي :

TransformationElements in Genetic Modification

يتم التعديل الوراثي عادة من خلال نقل المورث المانح للصفة المرغوب فيها, والذي يكون موجودا ضمن تركيب البلازميد (contruct plasmid) الذي يتألف عموما من الاجزاء التالية التي تعمل مجتمعة على اعطاء الصفة المرغوب بها . تمكَّن العالِمُ Chilton عام 1977 من عزل البلازميدات من البكتريا لاستعمالها في نقل الموروثات من نبات الى اخر, وهذا الاكتشاف أستُخدِم في الهندسة الوراثية (الرفاعي واخرون , 2002).

يحتوي الملحق النموذجي (تكوين الجين) في الكائنات المعدلة وراثيًا على ثلاثة عناصـــر (Tripathi, 2005) وكما موضح ادناه .

(1) جين التحكم المحفزpromoter sequence كمفتاح تشـــغيل / إيقاف لقراءة الجين المدخل او المعدلوهي تساعد في تحديد توقيت عمل الجين المدخل.

(2) عنصر التحكم الانهاء Terminater sequence كإشارة توقف للجين المدخل / المعدل وتكون مسؤولة عن انهاء عمل نسخة الـ mRNA الرسول transcript Messenger RNA

(3) بالإضافة إلى ذلك ، قد توجد أيضًا الجينات المعلمة (Marker gene) كعلامات اختيار لتمييز الكائنات المعدلة وراثياً عن الأنواع غير المعدلة وراثياً أثناء تطور المحاصيل .

4.1. المحاصيل المعدلة وراثيا Genetically Modified Crops

تسـمى المحاصـيل المهندسـة وراثيا أيضًـا محاصـيل التكنولوجيا الحيوية ، أو المحاصـيل المحورة وراثياً ، أو المحاصيل المعدلة وراثياً (Agnihotri *et al*., 2013).

المحصول المعدل وراثياً هو النبات الذي تم فيه إدخال واحد أو أكثر من الجينات بشكل مصطنع بدلا من الحصول عليها في ظل ظروف طبيعية كما هو الحال في عملية التكاثر ,قد يكون تسلسل الجين المدرج والمعروف باسم الجينات المحورة من نفس الأنواع أو الأنواع المختلفة الموجودة في نفس المملكة أو حتى من مملكة مختلفة , من فوائد تقنيات نقل الجين عبر طرائق الهندسة الوراثية هي سرعة نقل الجين على العكس من طريقة الزراعة التقليدية والتي تستهلك كثيراً من الوقت(Nábrádi& Popp, 2011).

وكذلك إنّ هذه التقنيات الحديثة لا تعتمد على كيفية التكاثر للمحصـول ;أي بمعني إن كان تكاثراً جنسـياً أو خضرياً (Rommens, 2004).

تمت زراعة محصـــول واحد فقط من المحاصـــيل المعدلة وراثيًا في الاتحاد الأوروبي ، وهو الذرة المقاوم للحشـرات MON810 ، في جمهورية التشـيك ، وبولندا ، والبرتغال ، وسـلوفاكيا ، ورومانيا ، وإسبانيا (السعدي ,2012).

جميع المحاصـيل المعدلة وراثيا المتاحة في السوق الدولية تم تصـميمها لمنح واحدة من ثلاث سمات أسـاسـية للمصـنع: نباتات مقاومة للحشـرات والامراض , وقادرة على النمو تحت ظروف قاسـية من درجات الحرارة والملوحة والرطوبة , وكذلك تحمل مبيدات الاعشـــاب , وذات قيمة غذائية عالية (Batista & Oliveira, 2009).

1 - فول الصويا : Soy bean

يُعد فول الصـــويا من أهم المحاصـــيل المنتجة بالتكنولوجيا الحيوية في جميع أنحاء العالم وهو أحد أكثر المحاصـيل انتاجا اذ تم إنتاج 226 مليون طن في أكثر من 70 دولة في عام 2013 ,تم زراعة فول الصـــويا لإنتاج البذور الزيتية لمعظم دول العالم في عام 2013 وهو ما يمثل 29 ٪ من إجمالي هكتار المحاصيل الزيتية في جميع أنحاء العالم (Park*et al*., 2015).

وتستخدم فول الصـويا ومشـتقاتها في مجال واسـع من منتجات الأغذية والأعلاف في جميع أنحاء العالم(Singh *et al*., 2008).

على وجه الخصـوص ، يتم اسـتخدام الوجبة المشـتقّة من فول الصـويا المعدلة وراثياً بشـكل متزايد كمصـــدر للبروتين في علف الحيوانات ، اذ يصـــل اســـتخدامه عالميا إلى حوالي 70 مليون طن ســـنويًا (Aljumali, 2011).

قام العلماء بدمج جين من اصل *Bacillus.thuringiensis* (*Bt*) في فول الصويا الذي يحتوي على بروتين مبيد حشري يحافظ على إنتاجية المحصول (Świątkiewicz*et al*.,2010).

تُعد البقوليات احدى مصـــادر البروتينات الهامة , والتي عادة ماتكون ناقصـــة في بعض الاحماض الأمينية الهامة كما هو الحال في بروتينات الحبوب , وباســـتخدام الهندســـة الوراثية امكان توافر كل الاحماض الامينية الضـــرورية في الغذاء النباتي واحد بوســـاطة تحديد الجينات التي تشـــفر اعداد من البروتينات، ويوجد فول الصويا معدل وراثيا غني بالمثيونين(Krishnan *et al*.,2011).

وهناك بعض الدراسـات التي تشـير الى انه بالامكان نقل جين جليسـينين فول الصـويا Soy bean glicinin والذي يسبب زيادة في البروتين الكلي (Bomgardner, 2012).

2- الرز الذهبي Golden rice

يُعد الرز مصـــدراً غذائياً للمليارات من البشـــر في كل أنحاء العالم، وهو الغذاء الاســـاس والأكثر أهمية, يعتمد نصف سكان العالم او اكثر على الرز في نظامهم الغذائي (محمد، 2014).

تحتوي حبـــوب الـــرز على نشا بنسبة (65-75) % وبروتين بنسبة (9-12)% وزيت بنسبة (4-6)%, و بروتين الرز يتميز عن بقية بروتينات الحبوب بوفرة البروتين glutelin ويحـــوي كمية قليلـــة من بروتين Prolamine وخلوه من الحـامض الاميني الأساس اللايسـين Lysine ممـا يقلل القيمـة الغذائيـة لبروتيـن الرز (Ellis *etal*., 1986) .

وضـمن تطورات الهندسـة الوراثية عمليات النقل الجيني كأداة مفيدة لإيجاد أصـناف من الرز تمتلك تراكيب وراثية قادرة على التحمل و التكيف للشـــد البيئي , وكذلك فضـــلاً عن المقاومة للمبيدات الاعشابHerbicides والامراض وتحسين القيمة الغذائية للرز , من ابرزتطورات الهندسة الوراثية في الرز هو غرس Incorporation الموروث المسـؤول عن بناء الحديد في محصـــول فول الصـــويا في جينوم الرز باستخدام بكتريا *Agrobacterium* (Brar & Khush, 1997) .

يُعد الرز من محاصـــيل الحبوب الهامة والتي نالت اهتمام الباحثين في مجال الهندســـة الوراثية ومن الصفات الهامة التي امكن تعديلها في الارز مايلي :

1. تخفيض مسببات الحساسية .
2. زيادة محتوى الحبوب في فيتامين A والحديد.
3. زيادة المحتوى من الاحماض الامينية الاساسية الناقصة .

وهذا ويُعد الرز المهندس وراثيا المعروف باســـم الارز الذهبي (Golden rice) مثال جيد لنجاح تقنية الهندســـة الوراثية في هذا المجال حيث امكن نقل ثلاث جينات لزيادة محتوى الرز من مولد فيتامين A (Provitamin A) (السعدي واخرون,2012) وهي :

1-Desaturase synthase (PSY)Gene

2-Phytoene (Cit 1) gene

3-Lycopene cyclase gene

من المعروف أن الرز العادي يفتقر الى مادة بيتا كاروتين الذي يُعد مصـــدرًا لفيتامين Aولوحظ ان حبوب الرز المحورة وراثيا يكون لها اندوسبرم اصـفر اللون يعود هذا اللون الى البيتاكاروتين ولزيادة نسبة الحديد بالارز والافادة منه تم نقل ثلاث جينات ايضا للتغلب على محتوى الحديد المنخفض (جندل, 2015).

وهناك بعض الدراسات التي تشير الى انه امكان زيادة الليسين في الارز عن طريق نقل جين من الفاصولياء والذي يشفرالبروتين B-phaseolin, وكذلك زيادة الميثيونيين من خلال نقل جين جليسينين فول الصويا (*Soybean glicin*) و 20% من البروتين الكلي عبارة عن كليسينين وكذلك امكان نقل موروث من محصول عباد الشمس لزيادة البروتينات الغنية في الكبريت ; لزيادة نسبة الاحماض الامينية الكبريتية , هذا ويمكن استخدام تقنية تعطيل الجين لانتاج ارز منخفض في مسببات الحساسية (السعدي واخرون, 2012).

الرز الذهبي هو مجموعة متنوعة من الأرز المنتج من خلال التعديل الوراثي لتخليق سلائف بيتا كاروتين (pro-vitamin A) (Premanandh,2011).

يعاني أكثر من 120 مليون طفل في العالم من نقص فيتامين A , لدى الرز الذهبي Golden rice القدرة على المســـاعدة في منع الوفيات من مليون إلى مليوني وفاة كل عام بســـبب نقص هذا الفيتامين (Bua & Ojirot, 2014).

1-5 اسواق المحاصيل المعدّلة وراثيا

Genetically modified crops markets

أول استخدام للتحوير الوراثي يعود الى العام 1987 لقد تمكن العلماء من انتاج المحاصيل المهندسة وراثيا تمت زراعة اول محصـول طماطم معدل وراثيا من قبل العالم الامريكي بيشـي وتم تسـويقها الى الاسواق في العام 1996 وهو المحصول الاول المهندس وراثيا (جندل,2015) .

بعد ذلك عرضت الأغذية المعدلة وراثيا لأول مرة في السوق في بداية التسعينيات , وعادة ما تكون الأغذية االمحورة وراثيا هي منتجات نباتية محورة جينيا مثلا فول الصـويا والذرة والكانولا وزيت بذور القطن (Schnurr, 2013).

الاغذية المحورة وراثياً انطلقت بشـــكل كبير لتحل محل المنتجات الطبيعية في الاســـواق , معظم الاطعمة المكدسة في السوبر ماركت في الوقت الحاضر هي عبارة عن اغذية مهندسة وراثيا موضوعة على رفوف محلات السوبر ماركت , فالنقاد اعترض على تسويق الأطعمة المعدلة وراثيا لعدة أسباب ، بما في ذلك الاهتمامات البيئية , وقضـايا السـلامة العامة ، و المخاوف الاقتصـادية التي أثارتها حقيقة أن هذه الكائنات تخضع لقانون الملكية (Rosellini, 2011).

المحاصـيل المعدلة وراثياً الموجودة في الاسـواق المحلية انتجت لتصـبح لها احدى السـمات التالية وهي تحمل مبيدات الاعشاب , ومقاومة الحشرات , ومقاومة العدوى بالفايروسات مثال على ذلك الذرة وفول الصويا والهندباء والبطاطس والقرع هي ابرز انواع الاغذية المهندسة وراثيا المتوفرة في الاسواق (جندل, 2015).

1-6 الامان الحيوي ووضع علامات على المحاصيل المعدلة وراثيا

Biosecurity and Genetically modified crops labeling

إنّ القلق جراء اســتعمال المحاصـــيل المعدلة وراثياً انعكس ســـلبا وعلى مدى واســـع على القوانين والتشريعات في اغلب البلدان المتقدمة , و يظهر الفرق واضحاً بين القوانين الأمريكية و الأوروبية فيما

يتعلق بالتحوير الوراثي بالذات, القانون الأمريكي يعتبر المحاصـــيل المحورة وراثياً مكونات طبيعية لا تهدد الامن الغذائي حتى يثبت العكس في حين ان القانون الأوروبي وعلى وجه الخصـــوص القانون الفرنســـي يعتبر الأغذية المحورة وراثيا غير طبيعية من المحتمل أن تشـــكل تهديدا غذائيا إلى أن يثبت العكس (السعدي واخرون,2012).

الهندســة الوراثية تُعد احد التقنيات التي اثارت الاهتمام في الوســط العلمي والرأي العام ; وذلك لعدم التاكد من عواقب هذه التقنية وعدم وجود رغبة او الفة مع هذه الاغذية المعدلة وراثيا , يستعمل مصطلح الامان الحيوي في ســرد طرق وســياســات المتبعة في تامين التطبيقات الامنة للبيئة باســتعمال تقنيات الهندسة الوراثية او هي سلامة تداول الاغذية المحورة وراثياً (السعدي واخرون , 2012).

ظهرت اصـــوات تنادي بلزوم تجميد انشـــطة و تجارب التقنيات الحيوية الحديثة , لحين اســـتكمال التشريعت الخاصة بالامان الحيوي وبما يغطي معظم الانتقادات الموجهة اليها , ومنح الفرصة الى التقييم العلمي للمخاطر وتوفر ادلة محددة من التجارب العملية تقود الوصول الى الاستنتاجات يوثق بها , على سبيل المثال الحساسية التي يمكن ان تبرز نتيجة وجود بروتينات جديدة تُعد احد المشاكل المقلقة لهذه المنتجات المهندسة وراثياً (Paganelli *et al.*, 2010) .

كما يوجد هنالك صـراعات و جدلٌ واسـعٌفيما يتعلق بوضـع بطاقات تعريفية على المنتجات المحورة وراثيًاً ومدى رغبة واسـتجابة المسـتهلك بجدوى مثل تلك الاغذية , ومن المتعارف ان القانون في معظم دول العالم يُلزِمُ منتجي الاغذية المُهندسَة وراثياً بالإعلان عن المُنتجِ المعدّل وراثيًا , وذلك بوضع بطاقت تعريفية عليهالان ذلكحقالمواطن فيمعرفة فيمااذا كان الغذاء معدل وراثياً منعدمه (,Robinson). 2013

ونظر لان عمليات الهندســـة الوراثية تؤدي الى ادخال بروتينات غريبة لذلك لابد من عمل التجارب الخاصـة بالحساسـية لاي نوع من المنتجات تحتوي بروتين غريب , وبذلك تصـبح عملية وضـع بطاقة البيانات هام للمواطن حفاظا على المســتهلك من خطورة هذه الحســاســية ان وجدت (HUANG & PENG, 2015).

على سـبيل المثال عند ادخال جين الفول الصـويا من محصـول Brazil nut لزيادة محتواه من الميثيونين فانه ينقل الجين المســبب للحســاســية , ليكون ســبب معاناة للافراد الذين لديهم حســاســية (Arora & Mishra, 2011) .

من ضـــمن العوامل الهامة في تقدير درجة الأمان الحيوي هو مصــــدر البروتين الجديد , إذ يجبُأنْ يكون آمنًاً في حالة احتوائه على بعض مركبات الحساسية او بعض مضادات التغذية (السعدي واخرون, 2012).

تم رصد ما يقارب 60 من المحاصيل المعدلة وراثيا وادخلت في الأسواق العالمية ، ومن المتوقع أن يزداد الى الضعف هذا العدد في السنوات القادمة (Stein& Rodriguez-Cerezo, 2010).

من جانب أخر ، اقترح بعض الباحثين أنه في الواقع لا توجد صــورة كاملة عن ســمية (وســلامة) المنتجات المعدلة وراثيا التي يتناولها البشـر والحيوانات , ومن نفس المنطلق ، هناك حاجة إلى تواصـل أفضل لإعلام المنتجين والمستهلكين حول اساليب الكشف وتشريع ووضع الملصقات , اذ يشعر الكثير من المسـتهلكين أن البطاقات من الضـروري أن تكون إلزامية وأنّ لَديهم حقُ المعرفةِ فيما إذا كان الطعام الذي يتناولونه قد تم انتاجه بإستخدام عناصر معدّلة وراثيًا ام لا ,على الاغلب لا يوجد شرط لدفع تكاليف وضع الملصقات التعريفية .(Maghani*et al*., 2011).

كما ان البعض من الدول تمنح الموافقة على اســتيراد المنتجات المحورة وراثيا والبعض الاخر لاتســمح بدخولها نهائيا والبعض منهم تسـمح بدخول هذه المنتجات ولكن بنسـب محددة , فهنالك قوانين ولوائح تشــريعية لكل بلد تؤكد على اهمية الكشــف عن المنتجات المعدلة وراثيا , ومن الضـــروري ان تكون النسب المئوية للمنتج المعدل وراثيا احد مكونات ملصقات التعريف على سبيل المثال في الاسواق الاوروبية وجوب اعلام المستهلك في ما اذا احتوت المنتج الغذائي على مكونات او عناصر معدلة وراثيا بنسبة 1% فما فوق (Wolt, 2010).

7.1. طرق التعديل الوراثي للمحاصيل:

Transformation Methods of Crop Genetic Modification

التحوير الوراثي أو الجيني للكائنات باســتخدام تقنيات تطويع الجين gene manipulation أو الهندسة الوراثية يتم عن طريق ادخال مادة وراثية غريبة الى جينوم الكائن المراد تحويره جينياً, ومصدر المادة الوراثية الغريبة انواع اخرى من الكائنات (Viljoen *et al*., 2006).

وتتكون المادة الوراثية المدخلة الى جينوم الكائن المراد تحويره من المكونات الاســاســي الآتية: باديء promoter لبدا عملية الاستنساخ و جين واسم marker gene يساعد في تحديد الخلايا التي تم تحويرها وكذلك المنهي terminator الذي يحدد اين تنتهي عملية الاســتنســاخ (Biłas *et al* ., 2016).

ويتم غالباً في النبات ادخال قطعة الـــــ DNA الغريبة الى الخلية المستقبلة عن طريق ناقل كلونة Cloing vector يتميز بقدرته على نقل قطعةالـــــ DNA الى خلية العائل المضـــيف للكائن المراد تحويره (Viljoen *et al.*, 2006) .

- **التحول المعتمد على بكتريا*Agrobacterium*:**

Agrobacterium Based Transformation

Agrobacteriumtumefaciens هي بكتيريا تربة شائعة تؤدي عادةً إلى تكوين الاورام مسببة مايسمى بالتدرن التاجي على مجموعة واسعة من أنواع النباتات ، بما في ذلك نبات ذوات الفلقتين dicotyledonous وبعض الأنواع ذوات الفلقة الواحدة monocotyledonous (Krenek*et* *al.*,2015).

ويحدث هذا التورّم عندما تُخدَش أو تُجرَح ساقُ النباتِ بحيث يُسمَح لهذه البكتريا بإحداث الاصابة تسبب البكتريا نمو سرطاني في انسجة الساق المصابة القدرة على احداث الورم وتترافق مع وجود بلازميد يسمى Ti داخل البكتريا وهو مشتق من التسمية استحثاث الورم Tumer inducing, ويعتبر هذا البلازميد من البلازميدات الكبيرة ويحمل عدد من الجينات المشتركة في عملية الاصابة , بعد الاصابة يستطيع جزء منه التكامل مع كروموسوم النبات وهذا الجزء يسمى T-DNA , تحتوي منطقة T-DNA على عدد من المورثات 8 او اكثر والمسؤلة عن الخصائص السرطانية في الانسجة النباتية المتحولة وهذه المورثات مسؤولة كذلك على تصنيع مواد ضارة للنبات تدعى Opiens التي تستعملها البكتريا كمركبات مغذية (Sood *et al.*, 2011) .

فقد طورت بلازميدات لاتحمل منطقة T-DNA فيها على هذه المورثات المكونة للمركبات الضارة (Păcurar*et al.*, 2011; Sood *et al.*, 2011).

بلازميد Ti يستخدم لادخال مورثات جديدة الى الانسجة النباتية ويستعمل اسلوبين لادخال البلازميد الى الانسجة النباتية :

1. احداث خدش (جرح) في النبات الاوراق او ساق واصابته بواسطة بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* المهندسة وراثيا ان هذه العملية لاتفي بالغرض لان الخلايا المستقبلة للموروث الجديد سوف تكون محصورة في منطقة الاصابة فقط (Kim & An, 2012).

2. تحطيم الجدران الخلوية لانتاج البروتوبلاست تتم هذه العملية بواسطة ازالة الجدران الخلوية النباتية التي تكون حاجز امام وصول جزيئات الـــ DNA وذلك عن طريق معاملة مزرعة من الخلايا النباتية بواسطة انزيمات خاصة, هذه العملية تضمن ايصال الجين الى كل الخلايا النباتية بعد ذلك يتم اظهار بروتوبلاست الخلايا النباتية الى بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* المهندسة وراثيا والتي تقوم اثناء دخولها على دمج T-DNA والذي يحوي على الموروث المطلوب والمراد ايصاله مع جينوم الخلايا النباتية يحضن النسيج النباتي بالبكتريا لفترة وجيزة متباينة للسماح بحدوث الاصابة ، بعد ذلك يتم وضعها على وسط صناعي يتوفر فيه الهرمونات والعناصر الغذائية التي تحفز اوتعزز نمو الخلايا المنفردة الى نبات كامل ، وكذلك وجود عامل انتقائي على سبيل المثال المضاد الحيوي يعمل على ازالة الخلايا غير المتحولة , بعد ذلك يمكن استخدام اسلوب زراعة الخلايا لتكشف الخلايا المتحولة الى نبات كامل معدل وراثيا (Sood *et al.*, 2011) .

ويمكن استعمال طريقة ثانية مشابهة للطريقة الاولى تدعى طريقة تحول الاقراص الورقية وذلك لاجل تجاوز المعوقات المتعلقة بانتاج البروتوبلاست واخلافه الى نبات كامل تتوضح الطريقة بتقطيع ورقة نباتية الى اجزاء صغيرة بعد تعقيمها تعدى الاجزاء الصغيرة بالبكتريا المحورة وراثيا ثم تنقل هذه الاجزاء الى وسط زرعي خاص يعمل على انتقاء النسيج النباتي المتحول ويهيءالوسط الظروفالمناسبة لتكشفها الى نبات كامل (Lacroix & Citovsky, 2016).

- **النقل المعتمد على الفايروس: Viral Based Transformation**

الفيروسات كأحد العوامل المساعدة في اجراء التحول في تقنيات الهندسة الوراثية حيث توجهت الابحاث والتجارب الى كيفية الاصابة بالفيروس وكذلك عملية تكامل او توحيد جينوم الفيروس مع جينوم العائل وكيفية التعبير عن تلك الجينات معا في البروتوبلاست وكل ذلك ممكن , من المعروف ان الفيروسات تصيب الانسجة النباتية وكذلك تتضاعف وتتكاثر في داخل خلايا العائل (الرفاعي, 2002).

الفيروس المسبب لمرض تخطط الاوراق في القرنبيط من احسن الفيروسات للاستعمال في الهندسة الوراثية (CaMV) واول تجربة ناجحة تحققت باستعمال فيروس *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) بواسطة العالم Brisson واخرين (1984) لقد نجح بادخال هذا الفيروس الى خلايا نبات اللفت فان الفيروس كان يتضاعف حتى في النباتات المحولة هنالك احتمال اخر هو استخدام البكتريا الزراعية المعدية عن طريق عمل توليفة من البكتريا والفيروس لادخال جينات الى العائل امكن ذلك من استعمال هذه الفيروسات في مجال الهندسة الوراثية (الرفاعي,2002).

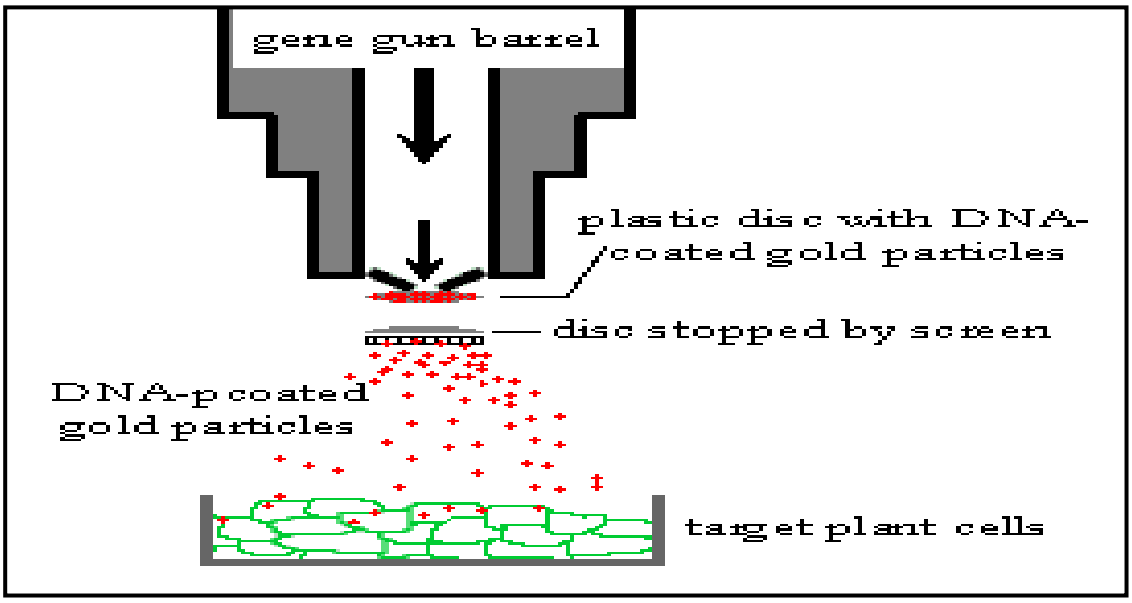
- **قذف الخلايا باستخدام قاذفات الجينات Microprojection bombardment**

حيث تستعمل اساليب خاصة تساعد في وصول الـــ DNA الى الخلايا من خلال الجدار الخلوي والغشاء البلازمي , وان هذه االعملية مناسبة وخاصة لمحصول ذوات الفلقة الواحدة التي يصعب فيها تحضير البروتوبلاست واخلافه الشكل (1-1) يوضح طريقة النقل المباشر بقاذفات الجينات لتعجيل سرعة الجسيمات الدقيقة الحاملة للجين المرغوب (Ahmed *et al.*, 2017) .

وقد استعملت بنجاح هذه الطريقة في حقن موروث المقاومة للمضاد الحيوي Kanamycin بصورة مباشرة الى السيقان الناشئة من بذور نبات الشليم *Secale cerale* (Kikkert *et al.*, 2004).

هذه الطريقة لاقت نجاحا في بعض الحبوب والمحاصيل الاخرى وتشمل هذه العملية لصق الـ DNA المراد ايصاله داخل الخلايا في النبات من خلال وضعه على جسيمات او قطعة دقيقة من التنجستين او الذهب ثم تطلق بعد ذلك داخل الخلايا النباتية وقطع الخلايا النباتية المعاملة (Darbani *et al.*,2008).

الطريقة تستلم الـ DNA من الجسيمات المعدنية , تنمى بعد ذلك الى نباتات كاملة من الخلايا بتقنية زراعة الانسجة Tissue Culture (Darbani *et al.*, 2008) .



الشكل (1-1) طريقة النقل المباشر بقاذفات الجينات لتعجيل سرعة الجسيمات الدقيقة الحاملة للجين المطلوب قذفه في الخلية (Ahmed *et al.*, 2017).

- **النقل باستخدام التيار الكهربائي**

Electroporation-MediatedTransformation

بينت الدراسات الى امكانية استعمال الحقول الكهربائية لتنفيذ عملية دمج البروتوبلاست , تسمى هذه العملية الدمج بالطاقة الكهربائية Electro-fosion , وجد فيما بعد انها عملية من السهل اجرائها وتم استخدامها لانتاج كميات كبيرة من الخلايا المدمجة على العكس من عملية الدمج باستخدام المواد الكيميائية المحفزة مثل مادة البولي اثيلين كلايكول (Polyethylene glycol) , والخلايا الناتجة بعملية الدمج الكهربائي لاتنتج مواد سامة بالمقارنة مع الدمج الكيمياوي بواسطة مادة الـ Polyethylene glycol (الرفاعي,2002).

و هذه التقنية تعمل بنجاح مع الانسجة النباتية منزوعة الجداران الخلوية Protoplast وفيها يتم استعمال مجال كهربائي بصورة نبضات سريعة , حيث يؤدي الى تكوين ثقوب دقيقة تظهر آنيًا او بصورة سريعة جدا في الانسجة النباتية مما يسمح للـ DNA بالوصول الى داخل الخلايا بواسطة المحلول المحيط (Darbani *et al.*, 2008).

يتطلب التحول بوساطة التيار الكهربائي استخدام نبضات المجال الكهربائي القوية للخلايا والأنسجة التي قد تحدث نوعًا من التعديل الهيكلي للغشاء الخلوي (Young& Dean, 2015).

في المختبر إدخال الحمض النووي في الخلايا في الوقت الحاضر هو الاستخدام الأكثر شهرة باستخدام التثقيب الكهربائيelectroporation (Chai*et al*., 2013) .

تم تطوير العملية في البداية من أجل تغيير نفاذية البروتوبلاست. الجهد من 25 مللي أمبير و 0.5 أمبير لمدة 15 دقيقة هي الفولتية المستخدمة إلى حد كبير, ومع ذلك ، فإن المتغيرات ، على سبيل المثال ، تركيز الحمض النووي ومقاومة الخلايا لنفاذ الغشاء قد تؤثر على النشاط الكهربائي , ولاجل الاستفادة من هذه التقنية ، تم تحقيق تغييرات مثمرة مع البروتوبلاست من كل من نبات ذوات الفلقة الواحدة ونبات ذوات الفلقتين (Chai *et al*., 2013).

- **النقل المعتمد على البروتوبلاست Protoplast Base Transformation**

البروتوبلاست هوخلية منزوعة الجدار الخلوي , والبروتوبلاست يعتبر ادق واصغر نظام خلوي ويمكن استعماله في عملية التهجين الخلوي وتحسين النبات , تمكن العالم Cocking عام 1960 من استعمال محلول مركز من انزيم السيليوليز Cellulase والذي حضر وعزل من مزارع الفطر *Myrothecium verrucaria* من تحليل جدران الخلايا وعزل كمية كبيرة من البروتوبلاست عن

طريق الانزيمات المحللة للجدار الخلوي , في الوقت الحاضـــر اصـــبحت انزيمات Cellulase وكذلك Pectinase متوفرة في الاسواق , انزيمات السيليليز تحلل السليلوز وتحلل مادة البكتين بواسطة انزيم البكتينيز وتصـــبح الخلايا بدون جدار Cell without wall فيتم دمج برتوبلاســـت الخلية الاولى مع بروتوبلاســت الخلية الاخرى لينتج تركيب وراثي جديد , وتعتبر الاوراق Leavese من اهم المصـــادر الحيوية للحصول على البروتوبلاست لانها تعطي الفرصة للحصول على خلايا جيدة ومتماثلة في الوقت نفسه من انسجتها (السعدي واخرون,2012).

- **النقل المعتمد على الليبوسوم:Liposome fusion Mediated Transformation**

الجسيمات الشحمية التي تحتوي على الحمض النووي قد تساعد في نقل الحمض النووي عن طريق البلازمودزماتا أو مباشرة عبر أغشية الخلايا (Husaini *et al.*, 2010) .

يتم ادخال اجزاء الدنا داخل حويصلات دهنية منتجة صناعيا حيث تخلط هذه الحويصلات مع الانسجة المراد تعديلها وراثياً فيندمج غشاءها الدهني مع الغشاء البلازمي وذلك لتشابه تركيبهما مفرغة محتوياتها من اجزاء الدنا الى داخل السايتوبلازم في الخلية , يساعد تغليف الجسيمات الشحمية في المحافظة على الحمض النووي من نشاط انزيم النيوكلييز داخل الكهربائي الخلايا . ومع ذلك ، فإن وتيرة التحول بوساطة الجسيمات الشحمية أقل بكثير من تلك التي يتم الحصول عليها إما عن طريق الترحيل electroporation أو عن طريق المحفزات الكيميائية (Almofti *et al.*, 2003) .

الليبوســوم عبارة عن فســيحة ذات كفاءة عالية تدخل بها جزيء الدنا , في هذه الطريقة يخترق الدنا البروتوبلاســت من خلال الجسـيمات الحالة وتحرير الدنا , في هذه الطريقة يخترق الدنا البروتوبلاســت من خلال الجسيمات الحالة, وتحرير البلازميد داخل الخلية (Ahmad *et al.*, 2017).

- **النقل المعتمد على الياف كربيد السليكون Silicon carbide fibers Mediated Transformation**

واحدة من الطرق المتطورة لإيصـــال الحمض النووي إلى الذباتات هو التحول بواســـطة كربيد الســيليكون, الســمات الفيزيائية والكيميائية لألياف كربيد الســيليكون تجعلها قادرة على ثقب الخلايا دون قتلها,مزايا هذا النظام سريعة وغير مكلفة وسهلة الإعداد وفعالة على مجموعة متنوعة من أنواع الخلايا, و تشمل بعض عيوبه كفاية التحول المنخفض (Komatsu*et al.*, 2006).

كفاءة كربيد السيليكون تعتمد على ِعدّة عوامل َأهمُها حجم الألياف ، الأنواع النباتية او الجزء النباتي explant وخصائص الخلايا النباتية وخاصة سمك جدار الخلية (Racoczy-Trijanowska ,2002) .

- **النقل المعتمد مادة البولي اثيلين كلايكول**

Polyethylene glycol -Mediated Transformations

التحول بواسطة مادة البولي إيثيلين كلايكول Polyethylene glycol هو طريقة تستخدم لنقل الحمض النووي عبر البروتوبلاست وهو من اكثر المواد الكيميائية شيوعاً في الإستخدام في عملية دمج البروتوبلاست وهي تعمل على زيادة قدرة البروتوبلاست على اخذ الاجزاء البروتوبلاستية الصغيرة (Lazzeri *et al.*,1991).

هذه التقنية تشبه إلى حد كبير طريقة التثقيب الكهربائي ، حيث يتم خلط الحمض النووي المراد حقنه فقط مع البروتوبلاست , ويتم بعد ذلك تحفيز امتصاص الحمض النووي عن طريق إضافة مادة الـ PEG. التغيير بوساطة PEG له مزايا ، (1) من السهل التعامل معه ، (2) وليس هناك حاجة إلى معدات محددة ، يتم استخدام هذه الطريقة من حين إلى آخر(Daveya *et al.*, 2005).

8.1. الكشف عن المحاصيل المعدلة وراثيا

Detecting Genetically Modified Crops

1.8.1. الكشف المعتمد على الـ DNA-based methods: DNA

تُعتَبر الطرق المستندة إلى الحمض النووي قوية مع خصوصية أعلى وحساسية وقابلية تطبيق أوسع , تعتمد طرق الكشف عن الحمض النووي للأطعمة المعدلة وراثيًا على تكامل خيطين من الحلزون المزدوج للحمض النووي الذي يتهجن بطريقة تسلسلية محددة , يتكون الحمض النووي الذي تم هندسته في محصول من عدة عناصر تحكم وهي عادة عبارة عن تسلسل محفز وجين هيكلي وتسلسل توقف للجين (Ahmed, 1995).

1.1.8.1. تفاعل سلسلة البوليميريز Polymerase Chain Reaction (PCR)

أمكَن تعريف هذه التقنية بأنّها الطريقة التي من خلالها يتضاعف بها تتابع دنا محدد انزيمياً ملايين النسخ خارج الجسم الحي *in vitro* بوجود البادئات وبفترة زمنية قصيرة ، وبالرغم لقلة اهتمام الباحثين به في البداية ، ولكن فيما بعد اصبح الـ PCR التقنية الاكثر استخداما في مختبرات الوراثة الجزيئية في

الكثير من دول العالم ,والمبدا الذي تعتمد عليه كثير من الابحاث على مستوى الدنا (Mullis & Fallona, 1987).

الـ PCR لما له من خصوصية specificity ، ومن حيث امكانيتها على التعامل مع اعداد ضخمة من النماذج، وهي لا تتطلب اعداد كبيرة من الدنا (Higuchi *et al*., 1988).

ويتطلب ذلك وجود انزيم بلمرة الدنا (Taq DNA Polymerase) والبادئات Primers والنيوكليوتيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات (deoxynucleoside triphosphate) والتي تضاف في انبوبة الاختبار (وحدة الـ PCR) وهيdTTP , dCTP , dATP , dGTP والمحلول المنظم (PCR buffers) الذي يحتوي على قالب الدنا (DNA Template) , وايونات المغنيسيوم Mg++ بالاضافة الى جهاز المبلمر الحراري Thermocycler (السعدي واخرون, 2012).

وعلى العموم يتم تفاعل فحص سلسلة البوليمريزبجهاز التدوير الحراري وهو جهاز بالامكان برمجته للتغيير بشكل سريع من درجة حرارة ما الى درجة اخرى (Wang *et al*., 2015).

المشاكل المتكررة لمراقبي الغذاء في مادة العينة هو التوفر المحدود للجزيئات الهدف المراد تحليلها (Wang *et al*., 2015;Raymond, 2010).

عند عمل طريقة الاستخلاص الاساسية فان مادة الدنا ذات التوفر القليل بالامكان اثرائها بواسطة تفاعلات تضخيم انتقائية , والتي تستفيد من تضاعف الحمض النووي اللذي يحدث طبيعيا (Man *et al*., 2007).

الغرض من هذه العملية هو تجميع الاجزاء القليلة من الحموض النووية مما يمكن من تعريف وتحديد الكمية , تم تطوير هذه التقنية فهو جهاز بسيط لكنه فعال للكشف عن كميات دقيقة من تسلسلات الدنا). Jiang *et al*., 2012)

9.1.انواع نقل الجينات في النباتات المعدلة وراثيا

The Types of Gene Transfer in GM Plants

إنتاج النباتات المعدلة وراثيا عن طريق إدخال جينات غريبة مختارة من كائنات محددة والذي يكون ضمن تركيب البلازميد (contract plasmid) , تتطلب العملية التي يتم بها بناء الحمض النووي الغريب الربط بين عدة عناصر لتشكيل وحدة وراثية وظيفية ,يشمل التعديل الوراثي عمومًا عنصرين تنظيميين ، المحفز والمُنهي Promoter and Terminator ، بالإضافة إلى الموروث المانح للصفة المرغوب Gene Marker فيها الذي يعطي ميزة قابلة للاختيار (Wang *et al*., 2014).

1.9.1. البادیء والمنهي : Promoter and Terminator

اثنان من العناصـر التنظيمية الأكثر اسـتخدامًا في عمليات التعديل الوراثي هما البادیء P-35s من فيروس فسـيفسـاء القرنبيط *cauliflower mosaic virus* (*CaMV*) والمنهي Nopaline Synthase Terminator(T-Nos) من اصـل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* , يوجد هذان العنصـران إما بشـكل مشـترك أو منفصـل في معظم الكائنات المحورة وراثيا (Hernandez-Garcia & Finer, 2014).

1.1.9.1.البادیء :Promoter

ولكي يكون الكائن الحي قادرًا على تنشيط أو إيقاف تشغيل جيناته الخاصـة ، فإنّلكل جينً لديه مفتاحه الجزيئي الخاصُ بِهْ ، والذي يطلق عليه اسـم البادیء Promoter , يتكون البادیء من الحمض النووي ويقع في مقدمة الجين (Oliveira *et al*., 2014) .

وقد تم تحديد عدد من الباديئات التي تعطي مسـتويات عالية من التعبير للجينات في النباتات المعدلة وراثيا , كان البادیء 35S من فيروس فسـيفسـاء القرنبيط *Ca**uliflower Mosaic virus*(CaMV) في العديد من التكوينات هو البادیء Promoter الأكثر اسـتخدامًا على نطاق واسـع في النباتات المعدلة وراثيا (Ho *et al*., 1999).

يؤدي البادیء S 35 إلى تعبير قوي عن الجينات التي يندمج بها ,يعمل فيروس البادیء Promoter الذي يشبه القرنبيط (CaMV) في كثير من الأنواع المختلفة من النباتات (Ho *et al*., 1999).

يمكن أن يتراوح طول البادیء CaMV-35S 400 زوجً قاعدي (Chen*etal*., 2019) .

يمكن العثور على البادیء P-35S أيضًـا في النباتات غير المعدلة وراثيًا في النباتات المصـابة مع فايروس فسيفساء القرنبيط Cauliflower Mosaic virus (Breyer*et al*., 2014) .

2.1.9.1. المنهي : Terminator

يعمل المنهي terminator كاشـارة توقف نسـخ الموروث المدخل,العنصـر الوراثي (T-Nos) اسـتخدم على نطاق واسـع لتطوير النباتات المعدلة وراثياً وهو مشـترك في العديد من الكائنات المعدلة وراثيا المرخصـة وغير المصـرح بها, المنهي Synthase Terminator Nopaline هو من اصـل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (Park *et al*., 2015) .

2.9.1. الجينات المعلمة : Gene Marker (selectable marker gene)

يمكن التحري عن الخلايا التي تحتوي على الجين المرغوب بآستعمال الجينات المعلمة (marker gene) التي تربط مع اجزاء الـــ DNA قبل حدوث عملية النقل , حيث تنمو الخلايا على بيئة زرعية انتقائية يحتوي على المضـاد الحيوي الذي يشـفر له الجين المعلم , وفي هذه الاثناء سَـيسـمح الوسـط الزرعي فقط بنمو الخلايا التي وصـل اليها الجين المطلوب فقط كونها سـتصـبح مقاومة لهذا المضـاد الحيوي , على العكس لاتنمو الخلايا غير المحتوية على الموروث المرغوب (Miki *et al*., 2004) . وفي الوقت الحاضـر توجد العديد من انظمة الجينات المعلمة Gene Marker التي انتجت لهذا الغرض (Rosellini, 2011).

10.1. مخاطر ومنافع استخدام النباتات المعدلة وراثيا :

Risks and Benefits of using GM plants

يذكرُ بعض العلماء أّنّ الكائنات المحورة وراثيًا تَسهُم بتقديمِ فوائدَ فيما يتعلق بتوافر الطعام في جميع بلدان العالم ، على الجانب الاخر يقول القسم الاخر من العلماء إن الكائنات المهندسة وراثيًا تُسبِبُ آثارا ضارةً على الصحة وأنها مضرة للبيئة , نظرًا لوجود الكثير من التقارير المتناقضة فإن الحصول على تقارير صحيحة ودقيقة وموثوقة فيما يتعلق بتأثيرات الكائنات المحورة جينيا أمُر صعب (Pauwels *et al*.,2015).

هناك قلق فيما يتعلق بالتدفق الجيني من النبات المحور جينيا الى البيئة وكذلك انتقال جينات مقاومة المضادات الحيوية والحساسية من المنتجات المهندسة وراثيا (Dona & Arvanitoyannis, 2009) .

1.10.1. المخاطر الناشئة عن استخدام النباتات المعدلة وراثيا:

Risks arising from the use of GM plants

يركز النقاش حول الأطعمة المعدلة وراثيا في الغالب على عدم اليقين بشأن الآثار العكسية المحتملة للأغذية المعدلة وراثيا على صحة الإنسان والسلامة البيئية , يمكن أن يُعزى القلق بين المستهلكين إلى عدة أسباب منها: (1) المخاوف بشأن النشر غير السليم للأغذية المحورة وراثيا (2) المبادئ الأخلاقية الكامنة في تجهيز الأغذية التقليدية (3) المخاوف بشأن مدى كفاية تقييم الأغذية المعدلة وراثيا (Wolt, 2010).

إن التقنيات المسـتخدمة في الوقت الحاضـر لا تزال غير كفؤة بدرجة كافية اذ أن اسـتيعاب الناقل الذي يحتوي على المورثات يحدث فى نسـبة تكاد تكون قليلة فقط من الانسـجة المراد تعديلها جينيا , كما

أن من الصـــعب حاليا تحديد وتوجيه مكان ادخال الموروث وعليه فإن ايراد الجين يتم بشـــكل غير دقيق(عشـوائي) و سـط الـــ DNA و هذا يمكن أن يسـبب تغيير فى مقدرة الـــ DNA على التحكم بالعمليات الأيضية وتتصاعد المخاطر لأن الموروث المدخل لا يعبر عن نفسه بطريقة صحيحة او مُثلى الا إذا تَمَّإدخالُهُ فى منطقة فعالة من الـ DNA (Allison and Palma, 1997).

1.1.10.1. المخاطر الصحية:Health risk

بالرغم من مما حققت تطبيقات الهندسـة الوراثية من انجازات لخدمة البشـرية فقد اثير على منتجاتها مخاوف وجدلا ساخنا ما زالت مستمرة الى الان ومن المحتمل ان تهدد الصحة العامة وكذلك البيئة ,هناك مخاطر صـــحية محتملة مرتبطة بالأغذية المحورة وراثياً منها: الســـمية ، الحســـاســـية والجين المُدرج وبروتيناته المُعبر عنها ، والآثار الثانوية لمنتجات التعبير الجيني , والإزعاج المحتمل للجينات الطبيعية في الكائن الحي المُعالج (Bawa & Anilakumar *et al.*, 2013).

تم ايجاد ذرة محورة وراثيا تنتج الافدين وهي مبيد حشري يسبب زيادة في نقص فيتامينات الجسم , وايضـا نوع اخر من الذرة المعدلة وراثيا تنتج الروتينين وهي مادة مخثرة للدم وتسبب مرض البنكرياس للانســان والحيوان. تناول الاطعمة المعدلة وراثيا يسـبب اضـطرابات في تنظيم الانسـولين في الجسـم وكذلك الشيخوخة المبكرة (جندل, 2015) .

1- الحساسية والسمية Toxicity and Allergenicity

التاثيرات الســـامة المحتملة والتحســـس المحتمل من منتجات النباتات المحورة جينياً والمســـتخدمة في التغذية من المواضيع التي أثارت الجدل عن التأثيرات الضارة على المستهلكين (Wong, 2013).

ومن الأسباب المحتملة لتلك التأثيرات ان يكون الجين او الجينات الغريبة المستخدمة في تحوير النبات ذات ســمية مباشــرة على الإنســان , او أنها قد تغير في تركيب مكونات النبات الغذائية مثل رفع مســتوى السـموم الطبيعية التي تحويها بعض النباتات بكميات صـغيرة ، وقد تنتج النباتات المحورة بروتينات تسـبب تفاعلات الحساسية (Jin *et al.*, 2017) .

تمتلك البروتينات التي تنتجها أي جينات تم إدخالها القدرة على التسبب في استجابة حساسية إضافية مثل الذرة Starlink تقدم مثالًا على الخطر الغذائي الناجم مباشـرة عن التـــعبير عن الجين المدخل (السـعدي واخرون,2012) .

ويرى Galvin في عام (1998) ان عملية ادخال الجين بالطرق الجزيئية هي عملية عشوائية ومن المحتمل ان تحول تنظيم تعبير جينات أخرى و إنتاج مركبات سامة. ويبدو حتى الآن عدم تسجيل حالات تسمم غذائي من المحاصيل المحورة جينياً, و يرجع ذلك الى الاختبارات التي تأخذ في الاعتبار الاحتمالات السابقة و فقا للقوانين المنظمة, الا ان المخاوف قد تتحقق احياناً , تسبب نقل جين من الـ Brazil nut الى فول الصويا تفاعلات حساسية شديدة للاشخاص المسجل تحسسهم من الـ Brazil nut ولم يسبق لهم التحسس من فول الصويا (Dona & Arvanitoyannis, 2009).

ويعود السبب الي احتمال تشفير الموروث المنقول لبروتينات مسببة للحساسية من محصول Brazil nut (Van Putten *et al.*,2011).

2.1.10.1. المخاطر البيئية:Ecological risks

بالإضافة إلى الآثار المباشرة المحتملة على صحة الإنسان ، فإن النباتات المعدلة وراثياً لها أيضًا تأثيرات بيئية على الكائنات غير المستهدفة (الكائنات التي ليست آفات) ، مثل الطيور والحشرات والديدان والنحل والأسماك (Pavone*et al.*, 2011).

تتمثل المخاطر البيئية المحتملة الأخرى في استمرار الجين بعد جني الكائنات المعدلة وراثيًا ، وإمكانية عدم استقرار الجينات ، أو فقدان التنوع البيولوجي (Wong, 2013).

تنشأ مشاكل صحية كثيرة ، مثل "العبث بالطبيعة الأم" ، من المخاوف الصحية التي يجب على المستهلكين إدراكها من النباتات المقاومة للآفات والمبيدات الحشرية (Jeschke *et al.*, 2013) .

يصف تطور الآفات والأعشاب الضارة المقاومة للجراثيم والأعشاب الضخمة مشكلة أخرى , يمكن أن تتطور المقاومة عند استمرار الموروث بالانتشار في البيئة بعد حصاد المحصول قويًا بدرجة كافية (Breckling *et al.*, 2011).

هناك مشكلة أخرى وهي الشك فيما إذا كانت الخاصية المقاومة للآفات لهذه المحاصيل يمكن أن تهرب إلى أقاربها من الأعشاب الضارة مسببة زيادة في مقاومة الأعشاب الضارة (Hilbeck& Otto, 2015).

ومن الممكن أيضًا أنه إذا تسببت النباتات المقاومة للحشرات في زيادة الوفاة في آفة معينة ، فقد يؤدي ذلك إلى تقليل المنافسة واستدعاء الآفات الصغيرة لتصبح مشكلة كبيرة , بالإضافة إلى ذلك ، يمكن أن يتسبب انتقال سكان الآفات إلى مجموعة نباتية أخرى لم يتم تهديدها (Bawa&Anilakumar, 2013) .

أيضًـــا ، من وجهة نظر الســـمية ، هناك حاجة أيضًـــا إلى إجراء تحقيقات لتحديد ما إذا كانت بقايا مبيدات الأعشـــاب أو النباتات المقاومة للآفات يمكن أن تلحق الضـــرر بمجموعات رئيســـية من الكائنات الموجودة في التربـة المحيطـة ، مثـل البكتيريـا والفطريـات والـديـدان الخيطيـة والكـائنـات الحيـة الـدقيقـة الأخرى (Tsatsakis *et al*., 2017; Allison & Palma, 1997).

2.10.1. فوائد النباتات المعدلة وراثيا Benefits of GM plants

بالرغم من التأثير الســـلبي الذي يُعتقد أنه يحيط بالأطعمة المحورة وراثياً ، هناك العديد من الجوانب المفيدة التي تأتي من اســـتخدام الأطعمة والمحاصـــيل المحورة وراثياً (Wolfenbarger & Phifer, 2000).

مثلاً فهي قادرة على زيادة إنتاج الغذاء في جميع أنحاء العالم عن طريق تحسين الغلة من خلال زيادة مقاومة الآفات المحاصيل وتحمل الظروف البيئية القاسية (Moellenbeck *et al*., 2001) .

1.2.10.1.مقاومة الافات Pest resistance

قد تكون خسائر المحاصيل من آفات الحشرات مذهلة ، مما يؤدي إلى خسائر مالية مدمرة للمزارعين وتجويعهم في البلدان النامية (Rani & Usha, 2013).

يستخدم المزارعون عادة العديد من أطنان المبيدات الكيميائية سنويًا (Tabashnik, 2010).

من أمثلة الجينات التي تم نقلها هي جينات بي تي (Bt) المقاومة للحشـــرات والتي تم نقلها من بكتريا *acillusthuringiensis* , وهذا النوع من البكتريا يقوم بصـنع مواد سـامة ضـد يرقات الفراشـات التي تصـيب نبات الذرة ، وبعض منها له اضـرار مميته على أنواع أخرى من الحشـرات ,وبعد أن تم نقل هذه الجينات الى المادة الوراثية لمحصـــول الذرة أصـــبحت هنالك المقدرة لنباتات هذا المحصـــول المهندس وراثياً لمقاومة الحشرات التي تصيبه, يمكن أن تساعد الذرة في القضاء على استخدام المبيدات الكيميائية وتقليل تكلفة طرح المحصـول إلى السـوق , جعلت المحاصـيل المعدلة وراثياً ، التي تحتوي على جينات مقاومة للحشـرات من بكتيريا *B. Thuringiensis* ، من الممكن تقليل كمية المبيدات الحشـرية إلى حد كبير (Carrière *et al*., 2016).

2.2.10.1. تحمل مبيدات الأعشاب Herbicide tolerance (HT)

تعتبر الحشـائش عنصـر محدد لنمو النبات لتسـببها في ضـعف المحصـول بما يعادل 10% في العديد من التقديرات , وتؤثر الادغال على صـــحة اللبائن في كثير من الجوانب اهمها مشـــاركة المحصـــول المزروع في غذائه وتعطي ظروف مناسـبة مما يسـاعد على جلب الافات الحاملة للفيروسـات كذلك من

المحتمل ان تعمل كمخازن للمسببات المرضية خاصة الفيروسات التي من المحتمل ان تنتقل منها للنبات المزروع محدثة اصابات خطيرة لهذا السبب تقاوم الاعشاب الضارة بعدة اساليب عديدة اهمها استعمال مبيدات الاعشـــاب او الادغال التي يجب ان لاتكون له تاثير ســـمي لكلا الانســـان والحيوان والنباتات الاقتصادية والكائنات الدقيقة في التربة من الضروري ان يتم انتقاله من موقع الاستعمال على المحصول الى القمم النامية وكذلك ان يكون اختياري في عمله أي انه يؤثرعلى الحشـائش ولايؤثر على المحصـول المزروع ومن القليل توفر مبيد يمتلك كل الشـروط كما ان مبيدات الادغال الضـارة المتوفرة في الوقت الحاضر ليست اختيارية لذا ترش المزرعة قبل زراعته كما هو الحال في مبيد glyphosate , تم إدخال أو اختيار الجينات التي تتحمل مبيدات الأعشاب في العديد من الأنواع الأخرى ، بما في ذلك جميع أنواع المحاصـــيل الرئيســـية في العالم تقريبًا وأنواع الزينة. في بعض الحالات ، تم اســـتخدام جينات مبيدات الاعشاب (HT) كعلامة اختبار (Rani & Usha, 2013).

3.2.10.1.مقاومة الأمراض Disease resistance

هنالك العديد من الفايروسات , البكتريا والفطريات التي تسبب امراض للمحاصيل النباتية ,يعمل علماء الاحياء النباتية على هندسة ناتات وجعلها مقاومة للامراض التي تصيب المحاصيل النباتية على سبيل المثال نبات الطماطم والتبغ المقاوم للفايروسTMV (Scorza *et al*., 2001).

ومن المحاصيل المحورة جينيا باستخدام غلاف الفيروس والمقاومة للفيروسات هومحصول البطاطا المقاوم لفايروس البطاطا, ومحصول الرز المقاوم لفيروس RSV (Rani &Usha, 2013) .

4.2.10.1. الفوائد الغذائية Nutritional benefits

الرز المطحون هو الغذاء الرئيســي لجزء كبير من ســكان العالم , لم تنجح طرق التكاثر التقليدية في إنتاج المحاصيل التي تحتوي على نسبة عالية من فيتامين A , الرز المطحون هو الغذاء الأساسي لجزء كبير من ســـكان العالم , أدخل الباحثون ثلاثة جينات في الرز: اثنان من أزهار النرجس والأخرى من الكـائنـات الحيـة الـدقيقـة, يُظهر الرز المحوَّر وراثيـاً زيـادة في إنتـاج كـاروتين B (β-carotene) كمشتقات لفيتامين A والبذور يكون لونها اصفر (Ye *et al.*, 2000).

قد يكون مثل هذا الرز الأصـــفر أو الذهبي أداة مفيدة لمعالجة مشـــكلة نقص فيتامين A في الأطفال ,والشباب الذين يعيشون في المناطق الاستوائية (Rani &Usha, 2013).

تم العثور على أرز التكنولوجيا الحيوية مع زيادة محتوى الفيريتين لتجديد تركيزات الهيموجلوبين وحديد الكبد في تجارب الفئران مما يشير إلى مساهمة الهندسة الوراثية في حل دائم للمشكلات العالمية

لنقص الحديد مثلا تضمن نقل موروث الفيرتين (Ferritin gene) من الفاصولياء يعمل هذا الجين على زيادة تجمع الحديد وكذلك يستعمل على تحسين امتصاص الحديد في امعاء الانسان ويوجد هذا الجين في فول الصـويا للبروتين المخزن للحديد (Ferinin) , يمكن رفع القيمة الغذائية لمنتجات بعض المحاصـيل الحقلية بإضافة جينات ملائمة مأخوذة من نباتات أخرى (Wang *et al.*, 2013) .

11.1. اهمية دراسة المكونات الكيميائية لحبوب فول الصويا

تحظى الحبوب بأهمية بالغة في الزراعة العالمية بسـبب ارتباطها بالأمن والسـلامة الغذائي للشـعوب ,تعتبرالحبوبمنأهممصـادرالغذاءللإنسـانوالحيوانمن بين اسـتخداماته يدخل في صـناعة الزيوت النباتية و كذلك تعتبر البذورمصدرمهم للأدويةوالعقاقير (السعدي واخرون,2012).

يعتمد العراق على استخدام حبة فول الصويا المستوردة من الخارج وباسعار غالية والتي تستعمل في غذاء الحيوانات الداجنة المجهز في العليقة كمصدر اساسي للبروتين , ولتاثيرها المباشر في انتاج فروج اللحم ونوعيته , يقع ترتيب فول الصويا من حيث الانتاج العالمي للبذور في مقدمة المحاصيل الزيتية, بلغت انتاجيته في سنة 1997 حوالي 132.112 مليون طن مايعادل 30% عالميا من الزيت المنتج , وتمتلك بذوره على نسبة زيت (16 – 22%)ونسبة البروتين (36 – 42%) , فول الصويا هو المنتج الوحيد الذي تمتلك بذوره جميع الاحماض الامينية الاساسية لنمو الانسان والحيوان , محصول فول الصويا ادخل الى العراق سنة 1992 (العبيدي واخرون , 2003).

وتحوي بذوره معظم الاحماض الامينية الاسـاس لنمو الانسـان عدا الاحماض الامينية الكبريتية مثل الميثايونين (الاميري واخرون , 2009).

أما بالنسبة للبذور البقولية ومنها الفول والعدس فتتميز بأنها تحتوي على نسبة مرتفعة من البروتين ، ويختلف التركيب الكيميائي إختلافاً جوهرياً وفقاً للعوامل الوارثية والبيئية ، وتتميز بذورالفول بمحتوى عالي نسبياً من البروتين (اسماعيل ,1997).

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

2.المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.2. المواد والاجهزة المستخدمة

1.1.2. الادوات والمعدات Equipment's and instruments

الادوات والمعدات المستخدمة في الدراسة الحالية (1.2):

جدول 1.2 الادوات والمعدات والشركات المصنعة لها

ت	المعدات	المنشا	الشركة المصنعة
1	الموصدة Autoclave	Japan	Sony
2	كاميرا رقمية Digital camera	Japan	CYAN-Cypress
3	انابيب ابندروف Eppendrof tubes	Belgium	BioBasic Inc.
4	مجمدة Freezer	Lebanon	Concord
5	نظام تصوير الهلام Gel documentation system	UK	Cleaver Scientific
6	حاوية النتروجين السائل Liquid Nitrogen container	USA	Native Industrialization
7	جهاز الطرد المركزي (انابيب ابندروف) Microcentrifuge	Germany	Witeg
8	أطراف الماصة الدقيقة (كل الاحجام) Micropipette tips(all size)	Germany	Hettich
9	الماصة الدقيقة (كل الاحجام) Micropipettes (all size)	Germany	Slamed
10	جهاز البلمرة الحراري Thermo Cycler PCR	UK	Cleaver scientific
11	جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV- Transilluminator	UK	LAB- LINE

12	محرك مغناطيسي Vortex mixer	USA	Tomy
13	حجرة التعقيم cabinatBiosafety	China	Biobase
14	جهاز الترحيل الكهربائي الافقي Horizontal Gel electrophoresis	UK	Cleaver Scientific
15	ميزان حساس Sensitive balance	Germany	Sartorius
16	هاون خزفيMortal	China	Tharco
17	مدقة صغيرة Micro pesttil	China	Tharco
18	الفرن الموجيMicrowave Oven	China	Gosonic
19	جهاز المطياف الضوئي spectro phptometer	Canda	Labwerench

2.1.2. المواد الكيميائيةChemicals and Solutions

المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة في هذه الدراسة في جدول (2.2)

جدول 2.2 المواد الكيميائية او المحاليل والشركات المصنعة لها.

ت	المواد الكيميائية	المنشأ	الشركة المصنعة
1	آكاروز Agarose	Canada	BHD
2	Nuclease-Free Water	USA	Sigma
4	صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide stain	USA	Siga
5	النتروجين السائل Liquid nitrogen	العراق	محلي
6	محلول دارئ TBE buffer	USA	Promega

7	الكحول الاثيلي ذو تركيز 70% Ethanol 70%	Iraq	Teeba
8	الكحول الاثيلي ذو تركيز 96 % 96%Ethanol	Iraq	Teeba
9	انزيم تحلل البروتين Proteinase-K	Taiwan	Geneaid
10	انزيم تحلل الـ RNase	Taiwan	Geneaid

3.1.2. العدد التشخيصية :Diagnostic kits

العدد المستخدمة في الدراسة الحالية مع المصدر جدول (3.2)

جدول 3.2 العدد المستخدمة في هذه الدراسة والشركات المصنعة لها.

TYPE OF KIT	COMPANY	ORIGIN
Go Taq®Green master mix PCR	Biolabs	Germany
Oligonucleotide Primers	Macrogen	Korea
DNA Ladder (100-1500) bp	iNtRon	Korera
. i-genomic Plant DNA extraction Mini Kit Catalogue number (17371)	iNtRon	Korera

2.2. طرائق العمل Methods

1.2.2. جمع العينات النباتية Collection of plant samples

جمعت 91 عينة غذائية وعلفية (حبوب فول الصويا -كسبة الصويا, حبوب الرز ,) بصورة عشوائية ومن مصادر مختلفة وهي كربلاء , والنجف , وبغداد, ووزارة الزراعة / قسم المحاصيل والبذوروكما موضحة في الجدول 4.2 لمحصول فول الصويا ومشتقاتها وكذلك جدول 5.2 لمحصول الرز على التوالي.

جدول 4.2الأصناف قيد الدراسة مع مصدرها واصل نشؤها لمحصول فول الصويا ومشتقاتها

ت	الرمز	العينة	المنتج	المصدر
.1	S1	كسبة فول الصويا مستوردة امريكية Healthy Fead No.1	Suhol AL Khairat Co	الاسواق المحلية كربلاء
.2	S2	كسبة فول الصويا مستوردة برازيلة Healthy Fead No.2	Suhol AL Khairat Co	الاسواق المحلية كربلاء
.3	S3	كسبة فول الصويا مستوردة ارجنتينية Healthy Fead No.3	Suhol AL Khairat Co	الاسواق المحلية كربلاء
.4	S4	Hassan	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
.5	S3	Lee74	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
.6	S4	Qt5	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
.7	S5	Tn12	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
.8	S6	حويجة101	Iraq	وزارة الزراعة/بغداد/ ابوغريب
.9	S7	صويا اباء	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
.10	S8	Energy 2	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
11	S9	QTLI	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب

12	S10	Dh4	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
.13	S11	Dt84	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
14	S12	Basir	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
15	S13	Tn3	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
.16	S16	Tn12	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
.17	S17	Hassan	Iraq	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب

جدول 5.2 الأصناف قيد الدراسة مع مصدرها واصل نشؤها لمحصول الرز.

ت	الرمز	العينة	المنتج	المصدر
1	R1	Royal Staylon	India	الاسواق المحلية / كربلاء
2	R2	Inidia Gate	India	الاسواق المحلية / كربلاء
3	R3	Seven Start	Pakistan	الاسواق المحلية / كربلاء
4	R4	ALtaiyab XL	Pakistan	الاسواق المحلية / كربلاء
5	R5	272	India	الاسواق المحلية / كربلاء
6	R6	Chopstick	U.S.A	الاسواق المحلية / كربلاء
7	R7	El-manara	Egypt	الاسواق المحلية / كربلاء
8	R8	Maharaja	India	الاسواق المحلية / كربلاء
9	R9	Almurad	India	الاسواق المحلية / كربلاء
10	R10	Magellan	India	الاسواق المحلية / كربلاء
11	R11	Beladi	India	الاسواق المحلية / كربلاء
12	R12	Uncle Bens white rice	U.S.A	الاسواق المحلية / كربلاء
13	R13	Durra	India	الاسواق المحلية / كربلاء

14	R14	Kohinoor	India	الاسواق المحلية / كربلاء
15	R16	Adolphus	U.S.A	الاسواق المحلية / كربلاء
16	R17	Shahjahan	India	الاسواق المحلية / كربلاء
17	R18	Nafees	Iraqi	الاسواق المحلية / كربلاء
18	R19	Baghdady	Iraqi	الاسواق المحلية / كربلاء
19	R20	AL-reef	India	الاسواق المحلية / كربلاء
20	R21	Kass India	India	الاسواق المحلية /كربلاء
21	R22	Basma	India	الاسواق المحلية /كربلاء
22	R23	Babaker	India	الاسواق المحلية /كربلاء
23	R24	Good garish rice	Thailand	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
24	R25	Bunjabi Almuhaidib	India	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
25	R26	Thai rice Normal	Thailand	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
26	R27	South American rice	Uruguay	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
27	R28	Thai rice mark(R)	Thailand	وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب
28	R29	Cano	Pakistan	الاسواق المحلية/بغداد
29	R30	Shaalan	India	الاسواق المحلية/بغداد
30	R31	Thai to day	Thailand	الاسواق المحلية/بغداد
31	R32	Yod Doy	Thailand	الاسواق المحلية/بغداد
32	R33	OURO	India	الاسواق المحلية/بغداد
33	R34	Kateer	India	الاسواق المحلية/بغداد

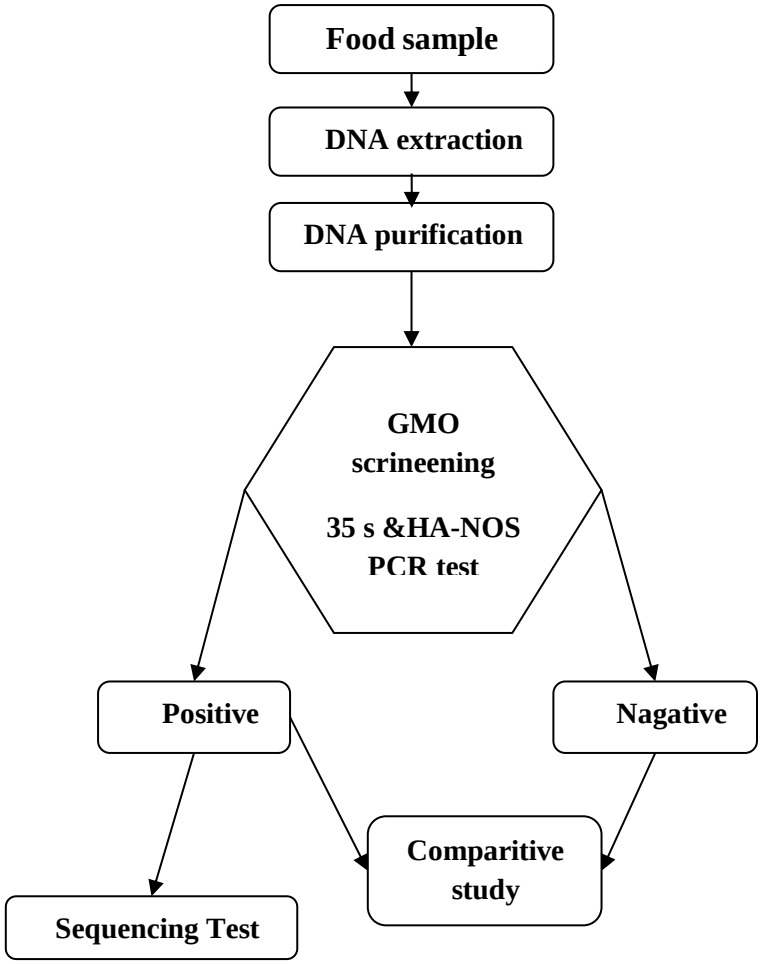
34	R35	Codawari	India	الاسواق المحلية/بغداد
35	R36	AL-sulatan	Pakistan	الاسواق المحلية/بغداد
36	R37	Jawahir	India	الاسواق المحلية/بغداد
37	R38	Mohsen	India	الاسواق المحلية/بغداد
38	R39	Bondi	India	الاسواق المحلية/بغداد
39	R40	Zain	India	الاسواق المحلية/بغداد
40	R41	Eldoha golden rice	Egypt	الاسواق المحلية/بغداد
41	R42	Almasre	Egypt	الاسواق المحلية/بغداد
42	R43	Eltaif	Egypt	الاسواق المحلية/بغداد
43	R44	White swan	Egypt	الاسواق المحلية/بغداد
44	R45	Haley	Egypt	الاسواق المحلية/بغداد
45	R46	Haley	Egypt	الاسواق المحلية/بغداد
46	R47	Green Farms	Egypt	الاسواق المحلية/بغداد
47	R48	Maxims	U.S.A	الاسواق المحلية/بغداد
48	R49	Abu Ali	Egypt	الاسواق المحلية/بغداد
49	R50	Almazraah	India	الاسواق المحلية / كربلاء
50	R51	Ishtar	India	الاسواق المحلية / كربلاء
51	R52	ALWAZEER	India	الاسواق المحلية / كربلاء
52	R53	KEEVA	India	الاسواق المحلية / كربلاء
53	R54	ALBAKHERA	India	الاسواق المحلية / كربلاء
54	R55	GIHAN	India	الاسواق المحلية / كربلاء

55	R56	AL-ALAMAIN	India	الاسواق المحلية / كربلاء
56	R57	Biriany King	India	الاسواق المحلية / كربلاء
57	R58	BAKHSHAYESH	India	الاسواق المحلية /بغداد
58	R59	Firdos	India	الاسواق المحلية /كربلاء
59	R60	Ahmed Gold	India	الاسواق المحلية /كربلاء
60	R61	DAAWAT	India	الاسواق المحلية /كربلاء
61	R62	MAHMOOD	India	الاسواق المحلية /كربلاء
62	R63	Basmati Sela	India	الاسواق المحلية /كربلاء
63	R64	Gulbaahar	India	الاسواق المحلية /كربلاء
64	R65	Basri	India	الاسواق المحلية /كربلاء
65	R66	عنبر البركة	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب
66	R67	مشخاب 2	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب
67	R68	عنبر عباسية	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب
68	R69	عنبر 33	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب
69	R70	برنامج 4	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب
70	R71	اباء 1	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب
71	R72	مشخاب 1	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب

72	R73	عنبر ياسمين	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب
73	R74	فرات 1	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب
74	R75	بحوث 1	صنف محلي	وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب

ووضعت العينات في اكياس بلاستيكية معقمة محكمة السد,والتي تم الحصول عليها خلال مدة الدراسة التي بدأت من شهر كانون الاول 2019 ولغاية شهر اذار 2020.

اتبعت الخطوات العزل المبينة في المخطط1.2.



مخطط 1.2 العمليات الرئيسية للكشف عن المحاصيل المعدلة وراثيا .

2.2.2. عزل الـ DNA من النماذج النباتية :DNA Isolation from Plant Samples

تم عزل الـ DNA من العزلات النباتية الجافة (حبوب فول الصويا – كسبة فول الصويا ,حبوب الرز) للأصناف المعتمدة في الدراسة باستعمال عدة استخلاص (Kit) i-genomic DNA plantextractionوحسب خطوات بروتوكول مجهزة من قبل شركة intron (Korea) .

تم اللجوء الى عدة الاستخلاص (IGDE) في عزل الدنا للعزلات النباتية قيد الدراسة والتي اجريت وفق تعليمات الشركة المصنعة وكالاتي :

1. تم سحق العينات النباتية بواسطة الهاون الخزفي وتحت ظروف معقمة وبوجود النايتروجين السائل , بعد ذلك تمت تعبئة العينات المطحونة بشكل جيد داخل اكياس معقمة ومعلمة وتحفظ بدرجة حرارة الغرفة من 15- 25 درجة سيليزسة.
2. تم وزن حوالي 50mg من البذور المطحونة ووضعت الى انبوبة ابندروف,ثم اضيف حوالي 390 مايكروليترمن محلول Buffer PG الى انبوبة ابندروف التي تحتوي على العينة واضيف 7 مايكروليتر من محلول Enhancer solution و20 مايكروليتر من محلول Protinase K و5 مايكروليتر من محلول Rnase A solution .
3. تم حفظ الخليط في درجة حرارة 65 درجة سليليزية لمدة نصف ساعة ثم مزج بهدوء لمدة 15 دقيقة لغرض تجانس العينة.
4. تم اضافة 100 مايكروليتر من محلول PPT Buffer الى الخليط السابق ويحفظ لمدة خمس دقائق بالثلج.
5. نبذ الخليط السابق باستخدام جهاز الطرد مركزي لمدة خمس دقائق , حوالي 13000 دوررة/دقيقة .
6. تم نقل حوالي 200 مايكروليتر للجزء الطافي للخليط السابق الى انبوب ابندروف جديد .
7. تمت أضافة 650µl من محلول (Buffer PB) ومزج بواسطة مايكروبايبيت5-6 مرات من دون استعمال المازج الدوار.
8. نقل الخليط الذي يحوي على حجم 650 مايكروليترالى انبوبة Spine Column جديدة بعد ذلك يعمل له طرد مركزي 13000 دورة بالدقيقة , تم التخلص من الخليط النازل.
9. ثم اضيف حوالي 700 مايكروليتر من محلول Washing PWA وبعد ذلك ينبذ الخليط بالطرد المركزي 13000 دورة بالدقيقة من اجل غسل الحامض النووي منقوص الاوكسجين الملتصق بالفلتر, وكذلك تم التخلص من الخليط النازل ومن ثم تستبدل العينة في انبوب column جديد.

10.اضيف حوالي 700 مايكروليتر من محلول Washing PWB وبعد ذلك نبذ الخليط بالطرد المركزي 13000 دورة بالدقيقة من اجل غسل الثاني للحامض النووي منقوص الاوكسجين الملتصق بالفلتر.

11.نبذ الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة بالدقيقة ولمدة دقيقتان ثم أزيل الراشح.

12.نقل انبوب الفلتر الذي يحوي على الحامض النووي الى انبوب ابندروف جديد واضيف محلول (Puffer PE) الى انبوبة ابندروف بكمية 100 µl ثم نبذ الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة بالدقيقة ولمدة دقيقة من اجل الحصول على الحامض النووي منقوص الاوكسجين النقي.

13.حفظ الحامض النووي منقوص الاوكسجين في التبريد من اجل عمل تفاعل سلسلة البوليمريز .

3.2.2. قياس تركيز ونقاوة الـ DNA Concentration measurement and purity: of DNA

كُشِفَ عن الحامض النووي DNA المستخلص من العينات بإستخدام جهاز خاص وهو ألـspectrophotometer (شركة Thermo الأمريكية) وذلك من خلال عدة جوانب: قياس نقاوة الحامض النووي DNA من خلال قراءة الإمتصاصية بدرجة (260 / 280) نانومتر.

و تحديد تركيز الحامض النووي (DNA µg/ml). ويتم القياس على النحو التالي:

1- تشغيل جهاز spectrophotometer

2- تم تصفير ركيزة المقياس وذلك بوضع 20 مايكرولتر من محلول buffer BE (Blank) ويكمل الحجم الى 1000 مايكروليتر من محلول (ddH_2O) بإستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير وبعدها تُنظَّف الركيزة لقياس العينات.

3- تُحدَّد نقاوة عينات ألـ DNA المستخلص بقراءة الإمتصاصية بجهاز spectrophotomete على طولين موجيين (260 و 280) نانومتر, اذ أن الحامض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الإمتصاصية 1.7– 2.0 (Viljen *et al.*, 2006).

4.2.2. الترحيل الكهربائي لمستخلص الـ DNA

Agarose Gel Electrophoresis for DNA Extraction

1.4.2.2. المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي

1. دارىء Tris- borate –EDTA buffer(TBE- 1X)

حضر هذا المحلول من خلال مزج 10 مل من المحلول الاصلي Stock TBE (10X)واكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ بدرجة4C° لحين الاستعمال ليصبح التركيز X1

2. محلول صبغة بروميد الاثيديوم (0.5 %) Ethidium bromide

تم استعمال محلول الصبغة بروميد الاثيديوم لاظهارحزم عينات الحمض النووي على المواد الهلامية وتم إضافة هذا المحلول المحمل بالصبغة إلى عينات استخلاص الحمض النووي ومنتج تفاعل البوليميراز المتسلسل الذي سيتم ترحيله كهربائيا.

3.الدليل الحجمي للـ DNADNA Molecular Size of Markers

جهز الدليل الحجمي المستعمل في هذه الدراسة من قبل شـركة iNtRon - Korera بـتركيـز 100 نانوغرام/ مايكروليتر، وبحجم 500 مايكروليتر ومدى يتراوح من 100- 1500 زوج قاعدي وكما موضح في الجدول 6.2.

جدول 6.2 الدليل الحجمي للـ DNA

دليلDNA	الوصف
100 bp Plus DNA Ladder	100-1500 زوج قاعدي 11 حزمة 100 – 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 700 – 800 – 900 – 1000 – 1500 زوج قاعدي تظهر الحزم كافة بكثافة متساوية ما عدا الحزم 500 ، 1000 ، 1500 تكون أكثر شدة وتألق . حجم التحميل الموصى به 5/ µl حفرة.

2.4.2.2. الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز: Agarose Gel Electrophoresis

أجري الترحيل الكهربائي وفقا لـSambrookوRussel (2001) كما ياتي:

1. بدات عملية الهجرة الكهربائية بتحضير الهلام ; وذلك بأذابة 1 غم من الاكاروز في 100 مل من الدارىء TBE (lX) إذ تتم الأذابة بتسخينه في فرن الموجي لمدة 60 ثانية لحين إذابة كل الأكاروز بعد ذلك ترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة.
2. تمت اضافة 3 مايكروليترمن محلول صبغة بروميد الأثيديوم.

3. سكب الهلام في صفيحة اسناد الاكاروز (Tray) الخاصة بجهاز الهجرة الكهربائي وثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد 1سم من احدى حافتي الصفيحة, وازالة الفقاعات الهوائية باستخدام راس ماصة معقمة .
4. ترك الهلام ليتصلب لمدة 15 دقيقة بعد ذلك رفع المشط من الأكاروز المتصلب.
5. تمت اضافة 5 مايكروليتر من مزيجناتج تفاعل البلمرة المراد تهجيره في حفرة الهلام.
6. وكذلك تمت اضافة الدليل الحجمي (DNAMarker) بمقدار5 مايكروليتر في حفرة الهلام واستعمل هذا لمعرفة حجم قطع DNA المعزولة,وثبتت الصفيحة على ساندها في وحدة الترحيل (Cell unit) الحاوية على دارىء(TBE(IX وتم بعد ذلك تغطية الهلام بأرتفاع (2-1) مل من الدارىء نفسه.
7. تم وضع غطاء جهاز الترحيل الكهربائي , ووصلت الاقطاب ورحلت النماذج كهربائياً بفولتية مقدارها (100) فولت لمدة ساعة أي بمدة كافية تتناسب مع الوزن الجزيئي للـDNA المرحل.
8. ضغط زر ايقاف الطاقة الكهربائية ورفع غطاء جهاز الترحيل الكهربائي بعد استكمال الوقت , ورفعت الصفيحة من وحدة الترحيل الخاصة بالجهاز وجففت من المحلول دارىء(TBE (IX ومن ثم تم الكشف عن حزم الدنا وتصويرها وذلك بتعريض الهلام للاشعة فوق البنفسجية .

5.2.2. ظروف تفاعل سلسلة تفاعل البوليميريز وتحليلات حزم التضخيم

Conventional PCR Condition and Amplification Analysis

1.5.2.2. البادئات Primers

البادئات النوعية تم تجهيزها من شركة Macrogen/korea, البادىء عبارة عن سلاسل قصيرة محددة من DNA أحادي السلسلة (ssDNA) ، والمعروف باسم oligodeoxy ribonucleotides أو oligomers. هذه البادىئات تحاذي خيوط متقابلة على طرفي الحمض النووي المستهدف.

1. البادئات الخاصة لفول الصويا :Soy bean Specific Primers

استخدمت في هذه الدراسة بادئات خاصة للكشف عن الجينات المعدلة وراثيا في الطرز الوراثية لمحصول فول الصويا ومشتقاتها (اعلاف فول الصويا) وهو البادىء CaMV35S والمنهي NOS , ذات احجام 195 bp و 118 bp على التوالي (Zaulet *et al.*, 2009) والمجهزة من شركة .Macrogen وكما موضح في الجدول (7.2).

الجدول (7.2) البادئات النوعية المصممة للكشف عن التعديل الوراثي بواسطة الـ PCR للدراسة الحالية.

	ناتج التفاعل	تسلسل النيوكليوتيدات (5'→ 3')	اصل الباديء	اسم البادئ
Forward	**195 bp**	**5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'**	***Cauliflower mosaic virus***	**35S1**
Reverse		**5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'**		**35S2**
Forward	**118 bp**	**5'-GCATGACGTTATTTATGAGATGGG-3'**	***Agrobacterium tumefaciens***	**HANos-118 F**
Reverse		**5-GACACCGCGCGCGATAATTTATCC-3'**		**HANos-118 R**

2.البادئات الخاصة للارز Rice Specific Primers

بسبب معظم المنتجات المعدلة وراثيًا تحتوي إما على محفز فيروس الموزاييك CaMV- 35S أو المنهي nopaline synthase (Nos) ، أو كليهما ، فإن معظم طرق فحص PCR تعتمد على الكشف عن هذه التسلسلات في المنتج (Forte *et al.*, 2005).

استخدمت في الدراسة الحالية بادئات خاصة للكشف عن الجينات المعدلة وراثيًا في الطرز الوراثية لحبوب الرز وهو الباديء CaMV35S والمنهي NOS , ذات احجام bp123 و 118 bp على التوالي (Safaei *et al.*, 2019) . وكما موضح في الجدول (8.2).

الجدول (8.2) البادئات النوعية المصممة للكشف عن التعديل الوراثي بواسطة الـ PCR للدراسة الحالية.

اتجاه الباديء	ناتج التفاعل	تسلسل النيوكليوتيدات (5'→ 3')	اصل الباديء	اسم البادئ
Forward	**123 bp**	**5'-CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG-3'**	***Cauliflower mosaic virus***	P35S-cf3
Reverse		**5'-TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C-3'**		P35S-cr4
Forward	**118 bp**	**5'-GCATGACGTTATTTATGAGATGGG-3'**	***Agrobacterium tumefaciens***	HANos-118 F
Reverse		-5GACACCGCGCGCGATAATTTATCC-3'		HANos-118 R

3.تحضير البادئات الاصلية

اتبعت الخطوات التالية لتحضير بادئات عمل الـ PCR :

- قبل فتح الباديء المجفف بالتجميد ، تم نبذه بجهاز الطرد المركزي لضمان أن حبيبات الباديء تكون في قاع الأنبوب.
- حضرت زوج البادئان (35S2, 35S1) باذابتهما في 320 و300 مايكروليتر من الماء المقطر الخالي من الايونات وعلى التوالي،وكذلك تمت اذابة المنهيHANos-118 F, HANos-118 R كل منهما في 300 مايكروليتر من الماء المقطر خالي من الايونات , كذلك حضرت زوج البادئان (P35S-cr4, P35S-cf3) باذابتهما في 400 مايكروليتر من الماء المقطر الخالي من الايونات حسب تعليمات الشركة المجهزة , للحصول على محلول خزين Stock solution بتركيز 100 بيكومولر/مايكرولتر لكل باديء.
- تم اخذ 10 مايكروليتر لكل عنصر واذابته مع 90 مايكروليتر من الماء المعقم خالي من الايونات للحصول على المحلول النهائي Work solution ذو تركيز 10 بيكومولر/مايكرولتر
- حفظت البادئات بالتبريد لحين اجراء تفاعل سلسلة البوليمريز.

2.5.2.2.تفاعل سلسلة البوليميريز الاعتيادي :

Polymerase Chain Reaction Conventional

أُجري العمل تحت ظروف معقمةمع حفظ المحاليل كافة على الثلج,إذ تم تطبيق المؤشــر الجزيئي المعتمد في هذه الدراسة في تقنية الـ PCR الاعتيادي وفق الخطوات الاتية:

1- تحضير محاليل العمل اليومي لاجراء تفاعلات PCR الاعتيادي:

- ❖ وذلك من خلال استعمال مكونات عدة الـ PCR ومحاليل البادئات مع مراعاة التبريد بوضع العدة في صندوق ثلجي .
- ❖ اضيف 5µl من الدنا القالب في انبوبة معقمة سعة 0.5 مل معلمة بأسم العزلة النباتية المراد فحصها.
- ❖ اضيف خليط التفاعل الرئيسي (Green master mix) بمعدل 12.5µl.
- ❖ اضــــيفت البوادىء من المحلول الخزين بمعدل 1 مايكرولتر لكل بادئة الى انبوب الأبندروف الذي يحوي على الخليط.
- ❖ مزجت مكونات التفاعل بأستخدام الماصة الدقيقة من خلال تحريكها بشكل دائري

- نبذت الانابيب بوساطة جهاز الطرد المركزي لجمع القطرات المتلصقة في الجدران لضمان ضبط تراكيز مواد التفاعل.
- اكمل الحجم بالماء المقطر الخالي من الايونات ليصبح الحجم النهائي لمحلول التفاعل 25 µl. وكما موضح في جدول 9.2 .

جدول 9.2 : مكونات تفاعل الـ PCR الاعتيادي للباديء CaMV-35S promoter و المنهي Nos terminator .

PCR REACTION MIXTURE	VOLUME IN ONEREACTION(ML)
Sterile dd H2O	5.5 µl
GoTaq®Green master mix PCR	12.5 µl
Forward Primer (10 Pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 Pmol)	1 µl
DNA	5 µl
Final Volume for reaction	25µl

.

2- برنامج المدور الحراري لسلسلة تفاعل البوليميريز الاعتيادي (PCR)

نفذت التجربة في جهاز المبلمر الحراري الخاص بعزلات حبوب فول الصويا – كسبة فول الصويا وكذلك حبوب الرز حيثنقلت الانابيب الى جهاز الدوران الحراري ; (Thermocycler) لبدء التفاعل التضاعفي وفق البرنامج الخاص لكل مجموعة من البادئات وكما موضح في الجدول (10.2) وجدول (11.2)

جدول 10.2برنامج تفاعل الـــ PCR الاعتيادي لجين (CaMV 35S promoter وHANos118-) لعزلات فول الصويا وكسبة الصويا (Zaulet *et al*., 2009).

البادئ PRIMER		عدد الدورات NO. OF CYCLES	الخطوات STEPS	درجة الحرارة TEMPRETURE	الوقت/الثانية TIME
35S1	35S2	1	Initial Denaturation	95C°	1 دقيقة
		35 Cycles	Denaturation	94C°	ثانية 30
HANos-118 F	HANos-118 R		Annealing	62C°	45 ثانية
			Elongation	72C°	55 ثانية
		1	Extension	72C°	5 دقيقة

.

جدول 11.2برنامج تفاعل الـ PCRلجين (CaMV 35S promoter وNos terminator) لعزلات حبوب الرز (Safaei *et al*., 2019).

البادئ PRIMER		عدد الدورات NO. OF CYCLES	الخطوات STEPS	درجة الحرارة TEMPRETURE	الوقت/الثانية TIME
35S1	35S2	1	Initial Denaturation	94C°	5 دقيقة
		35 Cycles	Denaturation	94C°	1 دقيقة
HANos-118 F	HANos-118 R		Annealing	60C°	40 ثانية
			Elongation	72C°	3دقيقة
		1	Extension	72C°	5 دقيقة

.

3.5.2.2.تفاعل سلسلة البوليميريز الثنائي

Polymerase Chain Reaction Duplex

1- تحضير محاليل العمل اليومي لاجراء تفاعلات PCR الثنائي:

تم تحضير محاليل العمل اليومي لاجراء تفاعلات الـ PCRDuplex ,تم استخدام الطريقة الجزيئية الـ PCRDuplex للكشف عن المحاصيل المعدلة وراثيا لحبوب فول الصويا وكسبتها وكما موضح في الجدول (12.2).

جدول 12.2مكونات تفاعل سلسلة البوليميريز الثنائيPCRDuplex

PCR REACTION MIXTURE	VOLUME IN ONEREACTION(ML)
Sterile dd H2O	15 µl
GoTaq®Green master mix PCR	25 µl
Forward Primer P35S	1 µl
Reverse HA-nos Primer	1 µl
DNA	6 µl
Forward HA-nos Primer	1 µl
Reverse HA-nos Primer	1 µl
Final Volume for reaction	50µl

.

2- برنامج التدوير الحراري لسلسلة تفاعل البوليميريز الثنائي (PCR):

نفذت التجربة في جهاز المبلمر الحراري الخاص بعزلات حبوب فول الصويا – كسبة فول الصويا حيثنقلت الانابيب الى جهاز الدوران الحراري (Thermocycler) لبدء التفاعل التضاعفيعلى وفق برنامج خاص وكما موضح في الجدول (13.2).

جدول 13.2 برنامج التدوير الحراري في تفاعل الـDuplex PCR لجين (35S وNos-118HA) لعزلات فول الصويا وكسبة الصويا .

عدد الدورات NO. OF CYCLES	الخطوات STEPS	درجة الحرارة TEMPRETURE	الوقت/الثانية TIME
1	Initial Denaturation	95C°	5 دقيقة
35	Denaturation	94C°	30 ثانية
	Annealing	61C°	45 ثانية
	Elongation	72C°	55 ثانية
1	Extension	72C°	5 دقيقة

.

6.2.2. تحليل نتائج تسلسل الدنا Data sequencing Analysis

بعد معرفة عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية,ارسل ما يقارب 20 مايكروليتر من ناتج التفاعل من عينة كسبة فول الصويا اللامريكية المستوردة (S1) عن طريق مكتب ايسكو العلمي الى كوريا الجنوبية من اجل التاكد على تسلسل قواعد النايتروجينية باستخدام جهاز الـ Sanger ومقارنتها مع تسلسلات الجينات المنشورة في موقع جين بنك العالمي للجينات NCBI.

7.2.2.التحليل الكيميائي للعينات

بعد معرفة العينات المعدلة وراثيًا خلال عملية الكشف في الدراسة الحالية والتي تعود لكسبة فول الصويا, وضعت العينات في اكياس تعبئة معقمة ومعلمة وارسلت العينات الى مختبر اعلاف الواحة التابع للعتبة العباسية المقدسة ;لغرض التحليل الكيميائي لبعض المكونات الكيميائية لعينات حبوب وكسبة فول الصويا وذلك باستخدام جهاز Near-Infrared Spectroscopy .

8.2.2.التحليل الاحصائي :

حللت النتائج باستخدام الحاسوب بواسطة برنامج الاكسل لتحليل النتائج التحليل الكيميائي لاصناف فول الصويا وبعد الحصول على المعدل القياسي والانحراف القياسي واختبرت النتائج تحت مستوى احتمالية (0.05)

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

3. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.3. جمع عينات فول الصويا ومشتقاته :

جمعت 17 عينة تعودلمحصول فول الصويا وكسبة فول الصويا من مصادر مختلفة وبصورة عشوائية , تضمنت ثلاث عينات تعود لعينة كسبة فول الصويا مستوردة من الاسواق المحلية / كربلاء وبنسبة (17.6%) من مجموع العينات الكلي والبالغ 17 عينة , وكذلك 14 عينة تعود لحبوب فول الصويا من وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب وبنسبة (82.35 %) من مجموع العينات الكلي والبالغة 17 عينة من مجموع العينات الكلي . وكما موضح في الجدول (1.3).

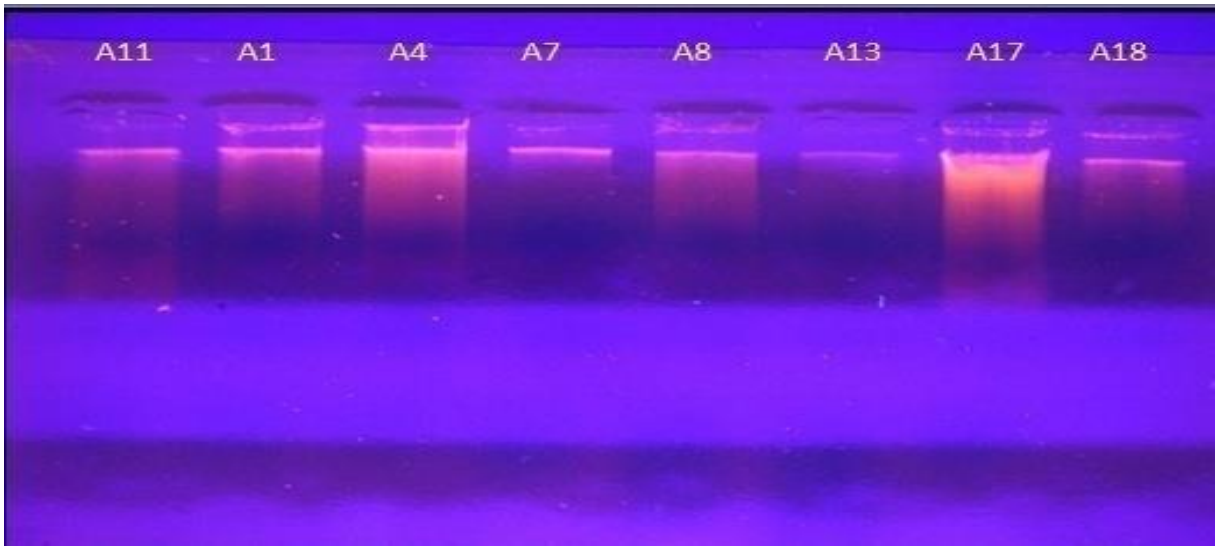
جدول 1.3 مصادر واعداد العينات الخاصة بمحصول فول الصويا وكسبة فول الصويا المستخدمة في الدراسة الحالية .

المصدر	عدد العينات	النسبة المئوية %
الاسواق المحلية / كربلاء	3	%17.6
وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب	14	% 82.4
المجموع	17	% 100

2.3. استخلاص الـ DNA والتاكد من سلامة الـ DNA المستخلص من عينات فول الصويا لتفاعلPCR الاعتيادي :

1.2.3.استخلاص وتنقية الـ DNA للانماط الوراثية لمحصول فول الصويا:

تم استخلاص الـ DNA من العزلات النباتية الجافة (حبوب وكسبة فول الصويا) للأصناف المعتمدة في الدراسة الحالية وذلك باستعمال عدة استخلاص Extraction Kitمجهزة من قبل شركة Korea/intron وكما موضح في الشكل 1.3.



شكل 1.3: حزم الحمض النووي الجيني لتسعة طرز وراثي من حبوب فول الصويا وكسبة الصويا باستخدام 1٪ جل أجاروز عند 90 فولت لمدة ساعة واحدة.المسار الاول : S11 , المسار الثاني : S1, المسار الثالث S4 , المسار الرابع : S7 , المسار الخامس : S8 , المسار السادس : S13 , المسار السابع : S17 , المسار الثامن : S18.

2.2.3. تقديرتركيز و نقاوة الـ DNA المستخلص للانماط الوراثية لمحصول فول الصويا وكسبة فول الصويا:

تم التقدير النوعي للعينات المدروسة باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وبعد ترحيل العينات كهربائيا , اذ يظهر الـ DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band , بينما يكون الـ DNA سيء النوعية مبعثرا (Sierra& Escarpa, 2019). وكما موضح في الشكل (2.3).

جدول 2.3 تركيز ونقاوة مستخلصات عزلات فول الصويا ومشتقاتها بواسطة طريقة i- genomic DNA Extraction method .

ت	العينة	التركيز µg/ml	الامتصاصية A260\280
.1	كسبة فول الصويامستوردة الامريكية Healthy Fead No.1	162.5	1.92
.2	كسبة فول الصويا مستوردة برازيلية Healthy Fead No.2	100	1.79
.3	كسبة فول الصويا مستوردة ارجنتينية Healthy Fead No.3	292.5	1.76

.4	Hassan	130	1.92
.5	Lee74	132.5	1.80
.6	Qt5	345	1.94
.7	Tn12	422.5	2.01
.8	حويجة101	282.5	1.86
.9	صويا اباء	127.2	1.82
.10	Energy 2	642.5	1.76
.11	QTLI	240	1.72
.12	Dh4	167.5	1.91
.13	Dt84	137.5	1.84
.14	Basir	160	1.77
.15	Tn3	280	1.70
.16	Tn12	380	1.69
.17	Hassan	117.5	1.76

ومن ثم اظهار حزم الـ DNA وذلك باستخدام الاشعة فوق البنفسجية UV , واعيد عزل الـ DNA من العينات ذات النوعية غير الجيدة مثلا عينة فول الصويا Tn12 كانت نسبة نقاءها اي النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر بلغت حوالي 1.63 وبعد اعادة استخلاصها مرة اخرى اعطت نقاوة جيدة بلغت 1.69, وكذلك عينة فول الصويا QTLI كانت نسبة نقاءها اي النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر 1.55 وبعد اعادة استخلاصها مرة اخرى اعطت نقاوة جيدة بلغت 1.72 و تم التقدير الكمي من خلال قياس تركيز الحمض النوويDNAفي العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophtomiter (Nzilibili*et al.*, 2018).

ان النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي اذ يجب ان تتراوح هذه النسبة بين 1.7- 2.0 (Saadedin *et al.*, 2019).

تم استخلاص الحمض النووي لجميع الأنماط الجينية لعزلات فول الصويا باستخدام هذه الطريقة المشار اليها اعلاه، وبعد قياس التركيز والنقاوة، أظهرت النتائج أن أعلى التركيزات التي تم الحصول عليها كانت 642.5µg/ml , 422.5 µg/ml , 380 µg/ml و345 µg/ml ، وكان اقل تركيز تم الحصول عليه 100 µg/ml, 17.5 µg/ml1, و127.2 µg/ml و 130 µg/ml .

وأن أعلى نقاء (OD) للحمض النووي (A260 / A280) تم الحصول عليه كان 2.01µg/ml , 1.94 µg/mlو1.92 µg/ml و1.91 µg/ml وكان أدنى نقاء مسجل 1.69 µg/ml, 1.70µg/ml , 1.72 µg/ml وكذلك 1.76 µg/ml.

عند قياس النقاوة للحمض النووي لعزلات فول الصويا ، تم العثور على معظم قيم النقاوة بين 1.69-2.0 (الجدول2.3) ، مما يؤكد النقاء الجيد للحمض النووي المستخرج وهذا ما اوضحته الدراسات السابقة (Saadedin *et al.*, 2019).

3.3. التحري عن المورثات المحتمل وجودها في عزلات فول الصويا:

يعتمد العراق على محصول فول الصويا التي يستوردها من الخارج وباسعار مرتفعة , والتي تستعمل كعليقه في تغذية الحيوانات الداجنة كمصدر أساسي للبروتين المجهز في العليقة ولتأثيرها المباشر في إنتاجية فروج اللحم ونوعية اللحم المنتج (Epley,1998).

تتطلب دراسات الحمض النووي DNA الجينومي عالي الجودة ، مع التأكيد على الحاجة إلى طرق استخراج الحمض النووي غير المكلفة والسريعة والبسيطة.

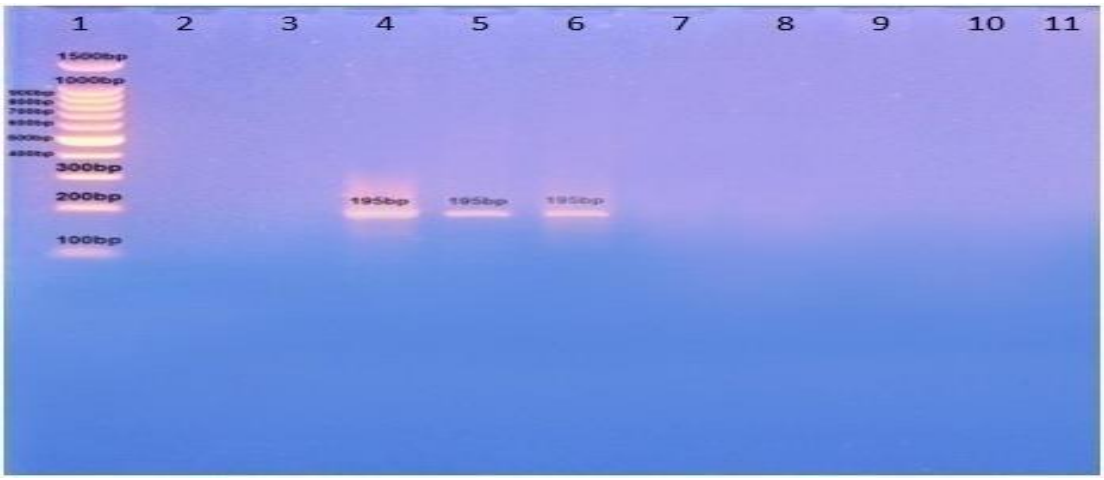
1.3.3.الكشف عن الجين المشفر CaMV-35S promoterوnos-terminator في حبوب فول الصويا وكسبة فول الصويا باستخدام تقنية سلسلة تفاعل البوليميريز الاعتيادي:

يُعد المحفز (35S2 , 35S1) من اصل بكتيري من المورثات الشائعة الاستخدام في عمليات التعديل الوراثي وهو من اصل بكتيري , يعد هذا الباديئ (35S2 , 35S1) متخصص في عملية نسخ الجين الهدف ,اجريت التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا لجميع الانماط الوراثية , وباستخدام سلسلة تفاعل البوليميريز الاعتيادي بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز وفحص النتائج تحت الأشعة فوق البنفسجية.

اظهرت النتائج عند استعمال بادئات متخصصة في الكشف عن الباديءP-35S promoterعن وجود حزمة ناتجة عن عملية التضخم في كل من المسار الرابع والخامس والسادس على التوالي عند الوزن الجزيئي الموافق لـ 195 زوج قاعدي تحتوي الباديء نفسه P-35S promoter مع عينة كسبة فول الصويا المستوردة1.No Healthy Fead (S1) في المسار الرابع , ومع عينة كسبة فول الصويا Healthy

Fead No.2 (S2) في المسار الخامس وكذلك مع عينة كسبة فول الصويا Healthy Fead No.3 (S3) في المسار السادس .

بينما اعطت العينات الباقية نتائج سالبة عرفت بخلوها من التعديل الوراثي وكما موضح في الشكل 2.3 وجدول 3.3.

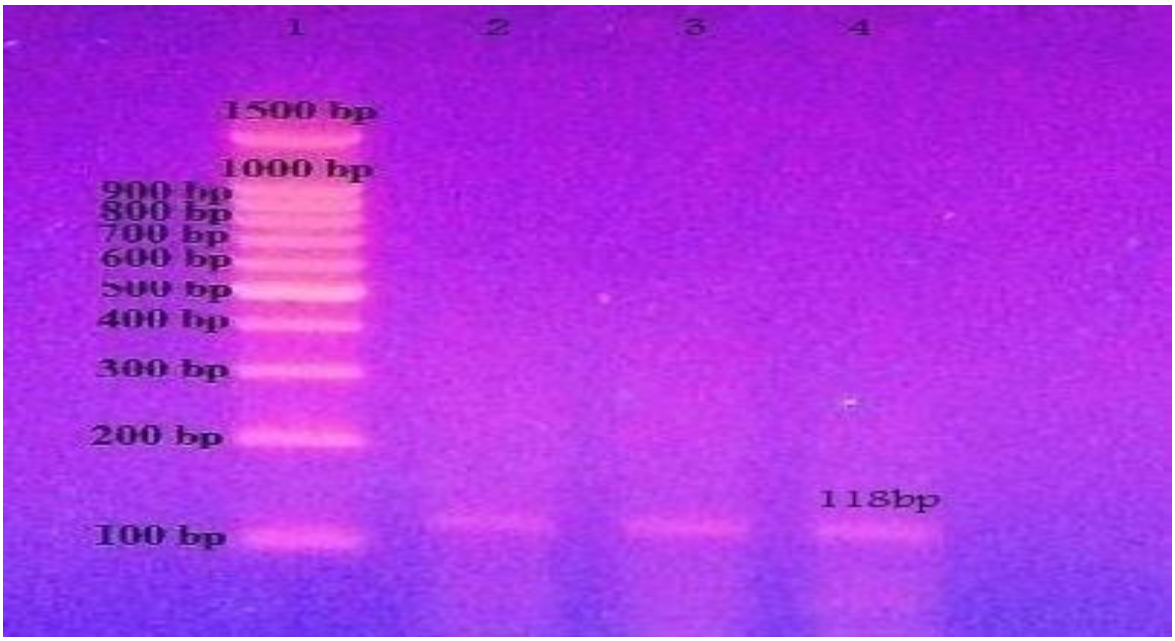


شكل (2.3) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسة الدنا بأستعمال البادئات P-35S promoterلعينات فول الصويا على هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 75 وزمن ساعة . المسار الاول : الدليل الحجمي (DNA Marker) ,المسار الثاني : S9 , المسار الثالث :S10 , المسار الرابع : S1 مع البادیء (P-35S promoter), المسار الخامس : S2 مع البادیء (P-35S promoter) ,المسار السادس : S3 مع البادیء (P-35S promoter) , المسار السابع : S9 , المسارالثامن : S10 , المسار التاسع :S11 , المسار العاشر :S12 , المسار الحادي عشر:S13.

جاءت نتائج هذه الدراسة مطابقة مع نتائج دراسات سابقة في رومانيا في الكشف عن الباديء P-35S promoter في خمسين عينة من مشتقات فول الصويا كانت هنالك خمس عينات من اصل خمسين عينة معدلة وراثيا بهذا الجين أي بنسبة (10%) من المجموع الكليلمجموع العينات (Zaulet *et al.*, 2009). كذلك جاءت نتائج هذه الدراسة مطابقة مع نتائج الدراسة السابقة في سوريا ,اذ وجدت ثلاث عينات معدلة وراثيا بنفس الباديء المستخدم في الدراسة الحالية لكل من عينتي الذرة المستوردة M3,M1 وعينة كسبة الصويا A1 المستوردة وحسب ما اوضحته كلا الدراستين لنواتج الـ PCR التي تظهر قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الباديء الموافق لـ 195 bp في العينات المحورة فقط (الاسعد,2010).

تكون المورثات تحت تحكم المحفزات والمنهيات , يعد المنهي NOS terminator من اكثر التسلسلات المستخدمة بشكل اوسع لتنظيم المورثات المعدلة وراثيا وهومن اصلبكتيريفهو يحدد اين تنتهي الرسالة الوراثية , ويكثر استعماله في عملية التحوير الوراثي (الاسعد ,2012).

لوحظت النتائج عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن البادئات HA-nos118-terminatorعن وجود حزمة ناتجة عن عملية التضخم في كل من المسار الثانيوالثالث والرابع على التوالي عند الوزن الجزيئي الموافق لـ 118 زوجًا قاعديًاباستعمال جين المنهي نفسه HA-nos118-terminatorمع عينة كسبة فول الصويا Healthy Fead No.1 (S1) في المسار الثاني , ومع عينة كسبة فول الصويا Healthy Fead No.2 (S2) في المسار الثالث وكذلك مع عينة كسبة فول الصويا Healthy Fead No.3 (S3) في المسار الرابع. وكما موضح في الشكل 3.3. وجدول 3.3حسب ما اوضحته نتائج تفاعل سلسلة البوليميريز في جهازالـPCR.



شكل (3.3) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا لعزلات فول الصويا بأستعمال ثلاث بادئات نوعية (HA-nos118-terminator) في هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 75 وزمن ساعة . المسار الاول : الدليل الحجمي (DNA Marker) , المسار الثاني : S1 مع المنهي (HA-nos118-terminator), المسار الثالث :S2 مع المنهي (HA-nos118-terminator) , المسار الرابع S3 مع المنهي (HA-nos118-terminator).

جدول 3.3 نتائج اختبار العينات المدروسة والعائدة لمحصول فول الصويا(حبوب فول الصويا وكسبة فول الصويا) بالنسبة الى المورثات التي تم التحري عنها والتي تستعمل في التعديل الوراثي .

ت	العينة	NOS	35S
1	كسبة فول الصويا مستوردة امريكية Healthy Fead No.1	+	+
2	كسبة فول الصويا مستوردة برازيلة Healthy Fead No.2	+	+
3	كسبة فول الصويا مستوردة ارجنتينية Healthy Fead No.3	+	+
4	Hassan		–
5	Lee74	–	–
6	Qt5	–	–
7	Tn12	–	–
8	حويجة101	–	–
9	صويا اباء	–	–
10	Energy 2	–	–
11	QTLI	–	–
12	Dh4		–
13	Dt84	–	
14	Basir	–	–
15	Tn3	–	–
16	Tn12	–	–
17	Hassan	–	–

الاشارة (+) تعني الكائن معدل وراثيا GMO

الاشارة (-) تعني الكائن غير معدل وراثيا No GMO

جاءت نتيجة هذه الدراسة مطابقة للدراسة السابقة(Zaulet *et al.*,2009). تشير الدراسة السابقة في الكشف عن جين المنهي HA-nos118-terminator في خمسين عينة من مشتقات فول الصويا كانت هنالك خمس عينات من اصل خمسين عينة معدلة وراثيا بهذا الجين أي بنسبة (10%) من المجموع الكلي لمجموع العينات حيث كانت مشتقات الصويا معدلة وراثيا وتحوي كلا الجينين البادیء والمنهي في نفس العينة .

تم تقدير الاوزان الجزيئية للحزمة المتضاعفة للدراسة الحالية على مواقع الحزم ذات الاوزان الجزئية المعروفة للدليل الحجمي (DNA-Marker) والموضحة في المسار الاول على هلام الاكاروز وكما موضح في الشكل (3.3) اذ تبين ان الحزمة المتضاعفة تنحصر بين الحجمين 100-200 زوج قاعدي.

وفي دراسة نشرت سابقا في ايران , فحص الذرة وفول الصويا في الأطعمة المصنعة للكشف عن البادیء CaMV 35S والمنهي NOS عن طريق تقنية الـ PCR ، اظهرت أن 25 من اصل 100 عينة (25 ٪) كانت إيجابية لوجود هذان البادئان (Arun *et al.* , 2013).

4.3. التحري عن المورثات المحتمل وجودها في عزلات فول الصويا وكسبة الصويا باستخدام تقنية الـ PCR الاعتيادي (MonoPlex PCR) والـ PCR الثنائي (Duplex PCR)

تم استخدام اسلوبين جزيئيين للكشف عن المحاصيل المعدلة وراثيا لمحصول فول الصويا وكما موضح كالاتي .

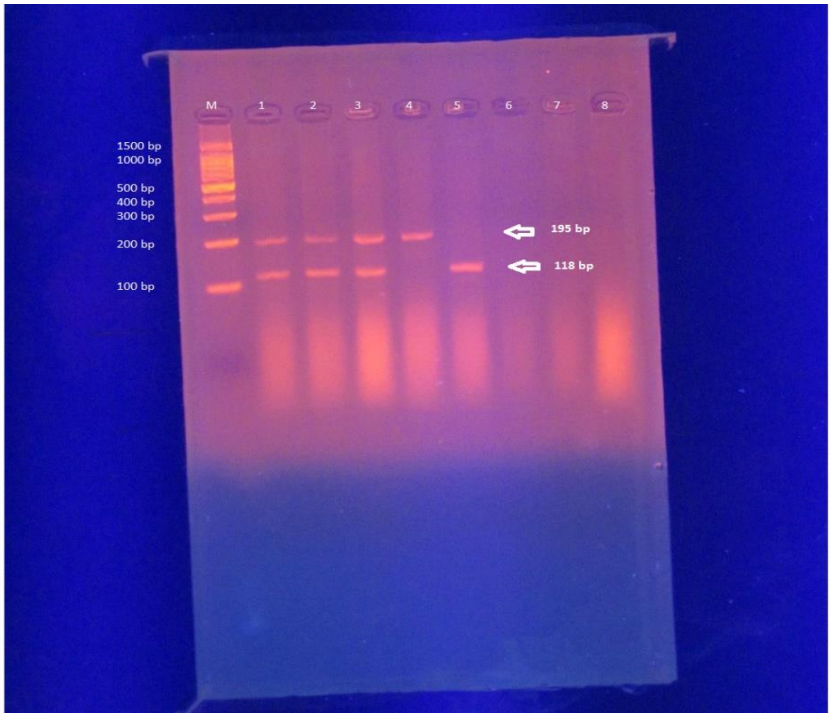
الاسلوب الاول : الكشف بأستخدام سلسلة تفاعل البوليميريز Monoplex PCR , وجد عند الفحص باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وفحص النتائج تحت الأشعة فوق البنفسجية.

لوحظت النتائج عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن الباديئات (35S2 , 35S1)عن وجود حزمة ناتجة عن عملية التضخم في المسار الرابع والعائد الى العينة (S1), والتي تظهر وجود قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الموروث الموافق لـ 195 زوجًاً قاعديًا باستعمال جين P-35S promoter. وكذلك وجود حزمة ناتجة عن عملية التضخم في المسار الخامس والعائد الى العينة (S1) باستعمال جين HA-nos118-terminatorوالتي تظهر وجود قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الموروث الموافق لـ 118 زوج قاعدي وكما موضح فيالشكل (4.3)

الاسلوب الثاني: الكشف باستخدام سلسلة تفاعل البوليميريزالثنائي (Douplex PCR). في هذه العملية تم استخدام اثنان من البواديء وهي الشائعة الاستخدام في التعديل الوراثي وهما البادیء CaMV-35S

promoterو المنهي Nos terminator , اجريت التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا لجميع الانماط الوراثية, رحلت التراكيب الوراثية باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز, وفحص النتائج تحت الأشعة فوق البنفسجية. لوحظت النتائج عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن البادىء (35S2 , 35S1) والمنهي HA-nos118-terminator عن وجود ثلاث عينات تعود لكسبة فول الصويا (S1 + S2+S3)في كل من المسار الاول والثاني والثالث معدلة وراثيا باحتوائها كلا البادئين CaMV-35S promoterو المنهي Nos terminator .حيثظهرت نتائج موجبة ذو حزمة 118 قاعدة نايتروجينية و195 قاعدة نايتروجينية في كل مسار(S1 + S2+S3) في اختبارDouplex PCR مع التسلسل المكمل له في الدنا القالب (Template DNA) وكما موضح فيالشكل (4.3) . والتي تظهر وجود قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الموروث الموافق لـ 195 زوج قاعدي و الموافق لـ 118 زوج قاعدي

شكل (4.3) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (duplex PCR) لعزلات فول الصويا بأستعمال بادئات نوعية P-35S promoter و المنهي Nos terminator في هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 75 وزمن ساعة. المسار M : الدليل الحجمي (DNA Marker) , المسارالاول : S1 مع المنهي HA-nos118-terminator + البادىء P-35S promote , المسار الثاني : S2 مع المنهي HA-nos118-terminator + البادىء P-35S promoter , المسار الثالث : S3مع المنهي HA-nos118-terminator + البادىء P-35S promote ,المسارالرابع: S1 مع البادىء P-35S promoter ,المسار الخامس:S1مع المنهي HA-nos118-terminator , المسار السادس :S4مع المنهيHA-nos118-terminator + البادىء P-35S promote , المسار السابع :S5المنهي HA-nos118-terminator + البادىء P-35S promote, S6 مع المنهيHA-nos118-terminator + البادىء P-35S promote.



5.3 جمع عينات الرز

يُعد الرز من محاصيل الحبوب المهمة والرئيسة في العالم، اذ يحتل المرتبة الثانية من حيث الأهمية بعد الحنطة,ويتغذى عليه نحو نصف سكان العالم, لا سيما في منطقة الشرق الأقصى واليابان والهند والصين, ويعد الغذاء الرئيس لمئات الملايين من سكان قارة آسيا , وبلغت المساحة المزروعة منه عالمياً بحدود 151541 هكتار وأعطت إنتاجا كلياً قدره 592831 طن رز خام أي بمعدل غلة 4.2 طن/هكتار,في العراق يعد محصولاً حبوبياً غذائياً مهماً ويدخل في كثير من الصناعات الغذائية ;لارتفاع نسبة البروتين والدهن وبلغت المساحة المزروعة منه في جميع المحافظات عام 2010 حوالي191895 ألف دونم,أما المساحة المزروعة في محافظتي النجف والقادسية 183487 ألف دونم , وبذلك تعد نسبة زراعة الرز في محافظتي النجف والقادسية حوالي 95.6% من مجمل المساحة المزروعة في العراق (محمد،2014).

جمعت 74 عينة من محصول الرز بصورة عشوائية ومن مصادر مختلفة , تضمنت 37 عينة من عينات حبوب الرز من الاسواق المحلية / كربلاء وبنسبة 50 % , والقسم الاخر تضمنت خمس عينات وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب وبنسبة 6.8 %, ,واثنان وعشرون عينة من الاسواق المحلية / بغداد وبنسبة (29.3%) , وعشر عينات تعود لحبوب الرز من وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز في المشخاب وبنسبة (13.5 %) وكما موضحة في الجدول 4.3.

جدول4.3 يبين مصادر واعداد العينات الخاصة بمحصول الرز المستخدمة في الدراسة الحالية.

المصدر	عدد العينات	النسبة المئوية %
الاسواق المحلية /كربلاء	37	% 50
وزارة الزراعة/ بغداد/ ابوغريب	5	% 6.8
الاسواق المحلية / بغداد	22	% 29.7
وزارة الزراعة/محطة أبحاث الرز / المشخاب	10	% 13.5
المجموع	74	

وبعد ذلك تم سحقها بواسطة الهاون الخزفي وتحت ظروف معقمة وبوجود النايتروجين السائل , بعد ذلك تمت تعبئة العينات المطحونة بشكل جيد داخل اكياس معقمة ومعلمة مسبقا لحين الاستخدام .

6.3. استخلاص الـ DNA من عينات حبوب الرز لتفاعل ألـ PCR

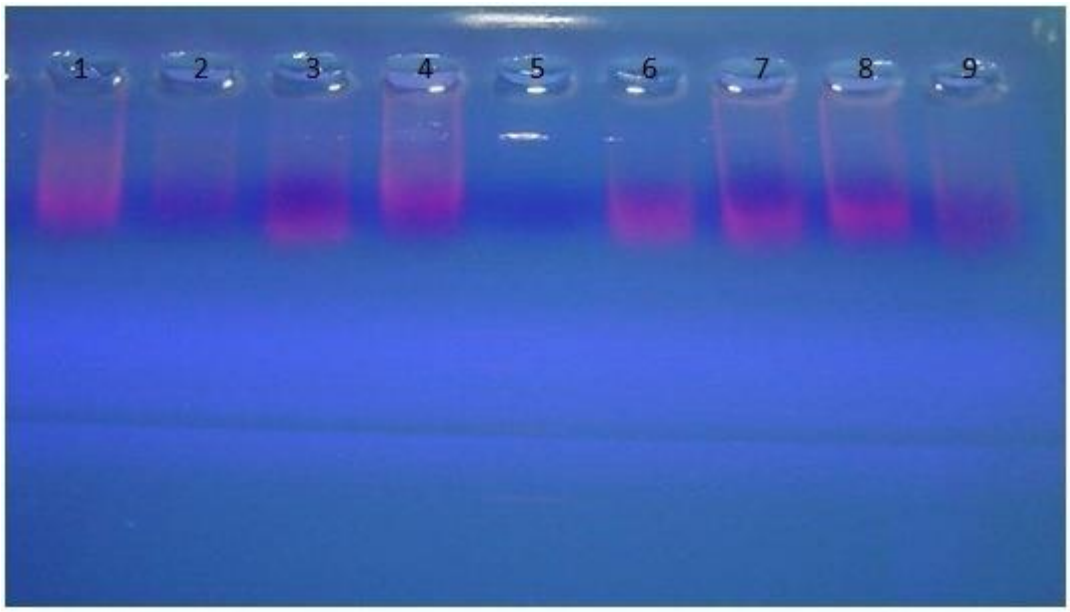
من أجل إجراء الكشف عن الكائنات المعدلة وراثيًا استنادًا إلى الحمض النووي الـDNA، يجب استخراج الحمض النووي أولاً. تتوفر العديد من طرائق استخلاص الحمض النووي ، وقد تم استخدام العديد منها من حيث قابليتها للتطبيق على اكتشاف الكائنات المعدلة وراثيًا في المواد النباتية والأغذية المشتقة من النباتات تم إجراء استخلاص الحمض النووي من عينات حبوب الأرز المجمعة بعد سحقها (Yari *et al.*, 2013).

تم استخلاص الـ DNA من العزلات النباتية الجافة لمحصول الرز للأصناف المعتمدة في الدراسة الحالية وذلك باستعمال خطوات بروتوكول مجهزة من قبل شركة Korea / intron ، وهذه العدة i-genomic DNA extraction توفر طريقة سريعة وسهلة للحصول على DNA نقي من العزلات النباتية , وفي بعض الحالات تظهر لنا بعض المشاكل في عملية الاستخلاص , على سبيل المثال عند استخلاص الدنا وترحيل بعض العينات في جهاز الترحيل الكهربائي بعض العينات لاتظهر حزم للحامض النووي او تعطي حزم مشوهة , كذلك عند قياس نقاوة الطرز الوراثية للـ DNA في جهاز الـ Spectrophotomiter تظهر بعض العينات ملوثة بالبروتينات كل هذه الُامور تعطي نتائج خاطئة تؤثر على نتيجة العمل وبالتالي ضرورة تطبيق خطوات البروتوكول العدة (Kit) بصورة صحيحة واجراء عملية الاستخلاص تحت ظروف معقمة وفي بعض الحالات تعاد عملية استخلاص بعض العينات للاسباب المذكورة اعلاه وذلك لتحقيق تركيز ونقاوة عاليين يؤهلها للعمل اللاحق .

7.3 . التاكد من سلامة الـ DNA المستخلص لتفاعل PCR لعينات محصول الرز

الخطوة الاخرى بعد عملية الاستخلاص هو التأكد من سلامة الـ DNAلتفاعل وحدة الـ PCR وهي خطوة اساسية لابد من تنفيذها ;لان عمل وحدة الـ PCR يعتمد عليه اذ يُعد حلقة الوصل مابين عملية الاستخلاص ووحدة تفاعل الـ PCR , حيث غير ممكن اجراء الكشف عن العناصر المعدلة وراثيًا بدون هذه الخطوة ,وتم فحص العينات المستخلصة بعد اجراء عملية النقاوة في جهاز الـ Spectrophotomiter.

إن أفضل طريقة للحصول على نتيجة في جهازالترحيل الكهربائي وباستخدام هلام الاكاروز وبعد ترحيلها كهربائيا , اذ يظهر الـ DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band , بينما يكون الـ DNA سيء النوعية مبعثرا وغير واضح الحدود وكما موضح في الشكل شكل (5.3) والذي اظهر نطاقات الحمض النووي الجيني لتسعة طرز وراثية من الرز في جهاز الترحيل الكهربائي , جميع الحزم واضحة ومتجانسة أي غير مبعثرة (Piskata *et al.*, 2019) .



شكل 5.3: حزم الحمض النووي لتسعة طرز وراثية من الرزعلى 1٪ جل أجاروز عند 90 فولت لمدة 20 دقيقة . تم استخراج عينات الحمض النووي بطريقة i-genomic DNA Extraction plant. المسار الاول :R23 , المسار الثاني : R20 , المسار الثالث : R2 , المسار الرابع : R15, المسار الخامس :R7 , المسار السادس :R8 , المسار السابع :R55 , المسار الثامن :R27, المسار التاسع : R40.

1.7.3. تقديرتركيز و نقاوة الـ DNA المستخلص للانماط الوراثية لمحصول الرز

جدول (5.3) يوضح تركيز ونقاوة الانماط الوراثية لعزلات حبوب الرز المستخلص بطريقة i-genomic DNA Extraction .

جدول 5.3 تركيز ونقاوة الانماط الوراثية لعزلات حبوب الرز .

ت	الرمز	العينة	التركيز µg/ml	الامتصاصية A260\280
1	R1	Royal Staylon	345	1.94
2	R2	Inidia Gate	115	1.78
3	R3	Seven Start	432.5	1.83
4	R4	ALtaiyab XL	127.5	2.1
5	R5	272	197.5	1.84
6	R6	Chopstick	345	1.91
7	R7	El-manara	450	1.92
8	R8	Maharaja	182.5	1.93
9	R9	Almurad	147.5	1.95
10	R10	Magellan	82.5	1.94

1.99	327.5	Beladi	R11	11
1.82	317.5	Uncle Bens white rice	R12	12
1.93	267.5	Durra	R13	13
1.94	87.5	Kohinoor	R14	14
1.85	97.5	Adolphus	R15	15
1.81	165	Shahjahan	R16	16
1.94	272.5	Nafees	R17	17
1.88	262.5	Baghdady	R18	18
2.17	665	AL-reef	R19	19
1.79	475.5	Kass India	R20	20
1.85	390	Basma	R21	21
1.97	92.5	Babaker	R22	22
1.84	637.5	Good garish rice	R23	23
1.99	127.5	Bunjabi Almuhaidib	R24	24
1.92	375	Thai rice Normal	R25	25
1.80	675	South American rice	R26	26
1.92	262.5	Thai rice mark(R)	R27	27
1.90	197.5	Cano	R28	28
1.73	192.5	Shaalan	R29	29
1.79	332.5	Thai to day	R30	30
1.94	172.5	Yod Doy	R31	31
1.82	112.5	OURO	R32	32
1.86	152.5	Kateer	R33	33

1.77	375	Codawari	R34	34
1.85	195	AL-sulatan	R35	35
1.83	550	Jawahir	R36	36
1.90	125	Mohsen	R37	37
1.88	332.5	Bondi	R38	38
1.81	100	Zain	R39	39
1.99	192.5	Eldoha golden rice	R40	40
1.83	157.5	Almasre	R41	41
1.80	145	Eltaif	R42	42
1.79	125	White swan	R43	43
1.90	307.5	Haley	R44	44
1.93	297.5	Haley	R45	45
1.99	150	Green Farms	R46	46
1.81	102.5	Maxims	R47	47
1.82	117.5	Abu Ali	R48	48
1.76	317.5	Almazraah	R49	49
1.72	162.5	Ishtar	R50	50
1.83	225	ALWAZEER	R51	51
1.95	122.5	KEEVA	R52	52
1.95	300	ALBAKHERA	R53	53
1.92	127.5	GIHAN	R54	54

1.80	360	AL-ALAMAIN	R55	55
1.89	114.5	Biriany King	R56	56
1.72	640	BAKHSHAYESH	R57	57
1.72	342.5	Firdos	R58	58
2.0	140	Ahmed Gold	R59	59
1.79	357.5	DAAWAT	R60	60
1.78	175	MAHMOOD	R61	61
1.75	130	Basmati Sela	R62	62
1.82	165	Gulbaahar	R63	63
1.74	105	Basri	R64	64
1.78	497.5	عنبر البركة	R65	65
1.81	570	مشخاب 2	R66	66
1.89	335	عنبر عباسية	R67	67
1.89	225	عنبر 33	R68	68
1.99	167.5	برنامج 4	R69	96
1.85	115	اباء 1	R70	70
1.91	375	مشخاب 1	R71	71
1.93	170	عنبر ياسمين	R72	72
1.86	570	فرات 1	R73	73
1.81	387.5	بحوث 1	R74	74

.

وكشفت النتائج عن قيم مختلفة ، واعيد عزل الـDNA من العينات ذات النوعية غير الجيدة مثلا عينة الرز نوع Kohinoor كانت نسبة نقاءها اي النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر (OD 280 ⁄ OD 260) بلغت حوالي 1.59 وبعد اعادة استخلاصها مرة اخرى اعطت نقاوة جيدة بلغت 1.94, وكذلك عينة الرز Cano كانت نسبة نقاءها اي النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر (OD 280 ⁄ OD 260) 1.49وبعد اعادة استخلاصها مرة اخرى اعطت نقاوة جيدة بلغت 1.90, وكذلكعينة الرز Kateer كانت نسبة نقاءها اي النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر (OD 280 ⁄ OD 260) 1.52وبعد اعادة استخلاصها مرة اخرى اعطت نقاوة جيدة 1.86 , كان أدنى تركيز للحمض النووي 82.5 µg/ml و 87.5 µg/ml و 100 µg/ml و 115 µg/ml في عينات الأرز في حين أن أعلى تركيز كان 675 µg/ml، 665µg/ml ، 640µg/ml و637.5µg/ml في عينات الرز.

أظهرت نتائج الكثافة الضوئية (OD) التي تشير إلى الجودة (النقاء) تباينًا بين عينات الحمض النووي للأرز ، عند A280 / A260 كانت أدنى قيمة الامتصاصية OD سجلت1.72 , 1.73 , 1.74 و 1.80 في عينات الأرز بينما وصلت أعلى قيمة إلى 2.17 ، 2.11 ، 1.99، 1.97 في عينات الأرز عند قياس الكثافة البصرية لعينات الحمض النووي للرز عند A280 / A260 ، تراوحت القيم الإجمالية بين 1.78-1.99 التي أشارت إلى نقاء جيد للحمض النووي المستخرج. تم الاتفاق على هذه النتيجة مع (Couto *et al.*, 2013) الذي أكد أن نسبة أعلى من 2.0 تشير بشكل عام إلى تلوث بالحمض النووي الـ RNA ، في حين أن النسبة الأقل من 1.7 تشير عادة إلى تلوث بالبروتين أثناء عملية الاستخراج ; لذلك يجب أن يتراوح الحمض النووي عالي الجودة بين 1.7 - 2.0.

وأشارت البيانات الحالية إلى أن جميع الحمض النووي المستخرج من الرز مع سلامة كافية لتحليل PCR.

يشير الجدول (5.3) إلى نتائج الحمض النووي لجميع عينات الأرز ومعظم الحمض النووي المستخرج بطريقة i-genomic plant DNA Extraction في هذه الدراسة أظهر نقاوة جيدة.

إنْ أفضل طريقة للحصول على نتيجة جيدة باستخدام هلام الاكاروز في جهازالترحيل الكهربائي ، يمكن تعريف جودة عالية من DNA أو الحصول على DNA النقي (Schalamun*et al.*,2019).

هناك العديد من الصعوبات في استخلاص الحمض النووي من المواد الغذائية قد تكون مرتبطة بربط الحمض النووي بمكونات الطعام وبالتالي تتداخل مع إطلاق الحمض النووي (Aboul-Maaty & Oraby, 2019).

وأي انحراف يمكن أن يشير إلى وجود مواد مستخرجة بشكل مشترك يمكن أن يضعف توافر الحمض النووي للباديء وبالتالي يؤثر على كفاءة تفاعل البوليميراز المتسلسل (Manchester, 1995).

نقاوة الحمض النووي المعزول هي الخطوة الرئيسة لكفاءة عمل الـ PCR (Gryson,2010).

8.3.الكشف عن الجين المشفر البادئ P35S والمنهي NOSفي الطرز الوراثية للرز باستخدام تفاعل سلسلة البوليميريز.

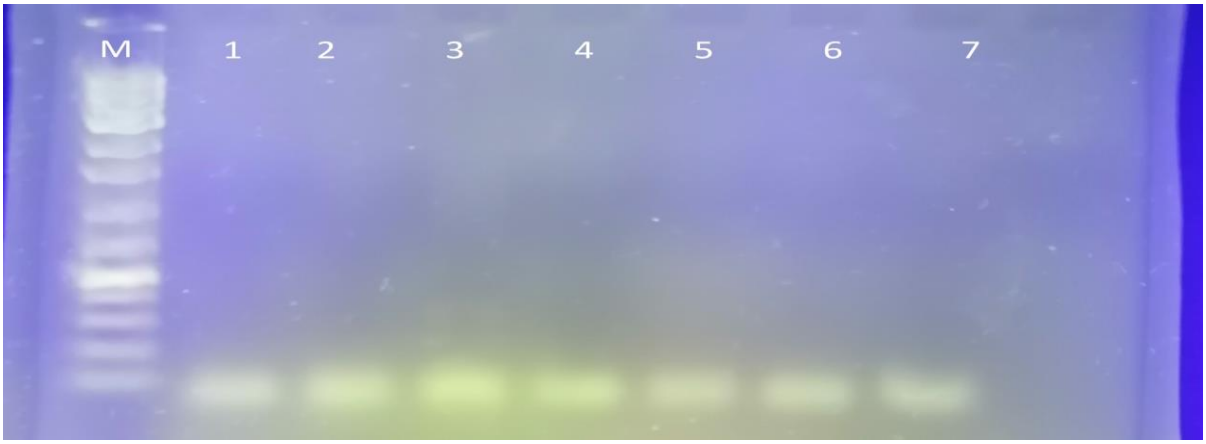
في هذه الدراسة تم استخلاص وتنقية الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA من محلول الحمض النووي من حبوب الأرز باستخدام مجموعة استخراج الحمض النووي i-genomic plant DNA Extraction والمجهز من شركة Intron/Korea. كان نطاق نسبة الامتصاص إلى مراقبة الجودة وتركيز الحمض النووي المستخرج للعيناتيتراوح على الاغلب بين 1.7 و 1.9.

لتحقيق هذا النطاق كررنا المحاولات في بعض الحالات بناءاً على دراسات سابقة ، هذا المبلغ مقبول لتضخيم ناتج الـ PCR (Guertler *et al.*, 2013).

في دراسة سابقة لتقييم المخاطر ذكر أن الرزالمعدل وراثيا قد يزيدمن المخاوف بشأن المخاطر المتعلقة بصحة الإنسان (Xue *et al*, 2012) .

باستخدام سلسلة تفاعل البوليميريزPCR لم تسجل أي نتائج موجبة للبادئات النوعية المتخصصة لكل من البادىء P35S-cf3 والمنهي P35S-cf4 لجميع عزلات محصول الرز, وجميع العزلات التي تم استخلاصها في هذه الدراسة لم تكن معدلة وراثيًا .

اظهرت النتائج خلال الكشف عن المحفز CaMV 35S والمنهي NOS عند استخدام بادئات شائعة الاستخدام في التعديل الوراثي , تبين عدم وجود تعديل وراثي لكافة عينات الرز والموضحة في الشكل (6.3) وجدول (6.3) .



شكل 6.3 الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل التضاعفي لسلسة الدنا لعزلات الرز بأستعمال ثلاث بادئات نوعية P-35S promoterفي هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 75 وزمن ساعة . المسار M : الدليل الحجمي (DNA Marker) , المسار الاول : R1 مع الباديء (P-35S promoter) , المسار الثاني : R17مع الباديء (P-35S promoter), المسار الثالث : R20 مع الباديء (P-35S promoter), المسار الرابع :R22مع الباديء (P-35S promoter), المسار الخامس : R27مع مع الباديء (P-35S promoter), المسار السادس : R30مع الباديء (P-35S promoter), المسار السابع :R32مع الباديء (P-35S promoter) .

وفي دراسة نشرت سابقا قائمة من 24 منتجًا غذائيًا تم شراؤها من السوق المحليةأشارت النتائج إلى أنه من بين 24 منتجًا غذائيًا تم اختبارها ، أعطت ثلاثة منتجات نتائج إيجابية مع الباديء CaMV35S أي بنسبة 12.5٪ ، أعطت بادئات NOS نتائج سلبية مع جميع العينات المختبرة(Oraby *et al.*,2005) .وفقًا لدراسات سابقة نشرت عام 2019 في دولة ايران ، وجدت 2 من أصل 81 أي بنسبة (2.4٪) عينة تم اختبارها إيجابية لمحفز CaMV35S في حين لم يتم الكشف عن أي نتيجةإيجابية للمنهي Safaei*et al.*, NOS (2019). أظهرت دراسة سابقة اجريت في الصين أن عينة من مجموعتين من عينات الأرز التي تم اختبارها كانت إيجابية لمحفز CaMV 35S (Mäde *et al.*, 2006).

في دراسة أخرى ، تم اختبارمائتي عينة (بما في ذلك الذرة وفول الصويا والأرز) للكشف عن التعديل الوراثي ، واستخدم زوجان من جينات التحكم (p35S و NOS) ، وأوضحت هذه النتيجة أن 26 و 44٪ من العينات معدلة وراثيا كانت لعينات فول الصويا والذرة على التوالي ، على النقيض من ذلك ، كانت جميع عينات الأرز سلبية لهذين العنصرين (Elsanhoty *et al.*, 2013) .

كما اختتم باحثون آخرون أن الفحص الناجح للكائنات المعدلة وراثيًا في المنتجات الغذائيةهي بواسطة تفاعل سلسلة البوليميريزالـ PCR يمكن تحقيقه ويفضل عن الطرائقالأخرى, ومن جانب اخر ، أعلن باحثون آخرون عن إمكانية اكتشاف الكائنات المعدلة وراثيًا بطريقة الـPCR التقليدي لهذين العنصرين (Rabiei *et al.*, 2013).

وفي دراسة عراقية منشورة سابقا تم اختبار 86 عزلة من محصول الرز كانت النتيجة جميع الطرز الوراثية خالية من التعديل الوراثي باستعمال تقنية الـ PCR الاعتيادي أي نسبة التعديل الوراثي (0 %) وذلك باستخدام عناصر شائعة الاستخدام في التعديل الوراثي (Farhan, 2014).

أظهرت دراسات سابقة اجريت في الهند أن المحفز CaMV35S من اصل *Agrobacterium tumefaciens* كان مفيدًا في التعديل الوراثي لمحصول الرز, ذكرت مستوى عال من التعبير الجيني مع المحفز35s (Pipatpanukul*et al*., 2004).

جدول 6.3 نتائج اختبار الانماط الوراثية المدروسة لمحصول الرز بالنسبة الى المورثات التي تم التحري عنها والتي تستعمل في التعديل الوراثي.

العينة	35S	NOS
Royal Staylon	-	-
Inidia Gate	-	-
Seven Start	-	-
ALtaiyab XL	-	-
272	-	
Chopstick	-	-
El-manara	-	-
Maharaja	-	-
Almurad	-	-
Magellan	-	-
Beladi	-	-
Uncle Bens white rice	-	-
Durra	-	-
Kohinoor	-	-
Adolphus	-	-
Shahjahan	-	-
Nafees	-	-
Baghdady	-	-

-	-	AL-reef
-	-	Kass India
-	-	Basma
-	-	Babaker
-	-	Good garish rice
	-	Bunjabi Almuhaidib
-	-	Thai rice Normal
-	-	South American rice
-	-	Thai rice mark(R)
-	-	Cano
-	-	Shaalan
-	-	Thai to day
-	-	Yod Doy
-	-	OURO
-	-	Kateer
-	-	Codawari
-	-	AL-sulatan
-	-	Jawahir
-	-	Mohsen
-	-	Bondi
-	-	Zain
-	-	Eldoha golden rice

-	-	Almasre
-	-	Eltaif
-	-	White swan
-	-	Haley
-	-	Haley
-	-	Green Farms
-	-	Maxims
-	-	Abu Ali
-	-	Almazraah
-	-	Ishtar
-	-	ALWAZEER
-	-	KEEVA
-	-	ALBAKHERA
-	-	GIHAN
-	-	AL-ALAMAIN
-	-	Biriany King
-	-	BAKHSHAYESH
-	-	Firdos
-	-	Ahmed Gold
-	-	DAAWAT
-	-	MAHMOOD
-	-	Basmati Sela

Gulbaahar	-	-
Basri	-	-
عنبر البركة	-	-
مشخاب 2	-	-
عنبر عباسية	-	-
عنبر 33	-	-
برنامج 4	-	-
اباء 1	-	-
مشخاب 1	-	-
عنبر ياسمين	-	-
فرات 1	-	-
بحوث 1	-	-

9.3. الكشـــــف عن تسلسل القواعـــــــد النتروجينية لمـــــــــورثة *P35S* و HA-nos في مشتقات فول الصويا

أُجريَّ الكشـــــــــف عن تتابع تسلسل القـــــــواعد النتروجينية لمورثة P35S و HA-nos في مشتقات فول الصويا لبيان أوجه التشابه والإختلاف مع الموروثات P35S وHA-nos القياسية العالمية من خلال تحليل تتابع تسلسل المـــــــــــورث بوساطة Multiple sequence aligment في موقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI) ,إنَّ الغرض من ألـ DNA sequencer هو تأكيد لعينات مشتقات فول الصويا المحلية بالإضافة إلى معرفة مع من يكون تشابهها من بين العزلات العالمـــــــية. وهذه النتائج تؤكـــد على صحـــــــة تشخـــيص كل من ناقل الكلونة P35S و HA-NOS بعد مقارنتها مع عينات قياسية عالمـــــــية لمعرفة تسلســـــــل القواعد النتروجينية لهذه الموروثات التي تُمثِّل المـــــورثة المـــــرجعية (Refrence gene) لتشخيص ناقل الكلونا لمشتقات فول الصويا .

إذ أظهرت نتائج تحليل القواعد النايتروجينية في كسبة فول الصويا الامريكية المستوردة (S1) وجود تقارب بنسبة 100% مع ناقل الكلونة القياسيي الامريكي (MN991175.1) و (MN956899.1)

حسب ما اوضحته الدراسات السابقة (Alvarez *et al.*,2020). إضافةً إلى وجود تقارب بنسبة 100 % للباحث Asano *et al.*, (2020) للناقل الكلونة نوع Gateway binary pB4GWcV DNA vector والذي يحمل رقم قياسي (AP019393) ,حيث عمل على نبات الأرابيدوبسيس Arabidopsis و كذلك تشابهت مع الباحث Cai *etal.*, (2018) حيث عمل على نبات العنب لناقل الكلونة نوع Vitis amurensiscytokinin oxidase والذي يحمل الرقم القياسي (MK412539.1) وكذلك تطابق التسلسل قواعد النايتروجينية لهذه الدراسة مع ناقل الكلونة للباحثKomori(2020) *et al.*, والذي عمل على محصول الرز المعدل وراثيًا transgenic rice في اليابان حيث سجل عترته ذو الرقم التسلسلي (LC506530.1) في موقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI) من جانب اخر فقد تقاربت تسلسل القواعد النايتروجينية في ناقل الكلونة لدراستنا الحالية لكل من موثات P35S و HA-nos مع الباحثPeyret(2019) *et al.*,اذ عمل على ناقل كلونة مصنع لبلازميد Synth cassetteواثبت بانه يملك كلا الموروثين P35S و HA-nos في البلازميد نفسها في المملكة المتحدة حيث حصل على تسلسل قياسي (MK521430) وكذلك تطابقت النتائج مع الباحث (2020),Soga *et al.*اذ استخدم تلك البوائ في الكشف عن الرز المحور وراثيا وحصل على تسلسل قياسي (LC485253.1) ولم نجد أي اختلافات في القواعد النايتروجينية في تسلسلات الحامض النووي المشورة على موقع Gene bankhttps://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiوكما موضح في الجدول (7.3).

جدول7.3 نسبة التشابه بين تسلسل القواعـــــد النتروجينية لناقل الكلونة للنباتات التي لها تشابه نسبي مع تسلسل القواعـــــد النتروجينية لمـــــــورثة P35S و HA-nos في مشتقات فول الصويا في الموقع العالمي Gene bank .

Accession number	Max score	Total score	Query cover	E. value	Per. Ident	Description of organisms
MN956899.1	100.00%	1.8	100%	114	38.2	Cloning vector pDamBOB, complete sequence
MN043929.1	100.00%	1.8	100%	76.3	38.2	Cloning vector pFLP19, complete sequence
AP019393.1	100.00%	1.8	100%	38.2	38.2	Gateway binary vector pB4GWcV DNA, complete sequence

AP019392.1	100.00%	1.8	100%	38.2	38.2	Gateway binary vector pB4GWnV3 DNA, complete sequence
AP019391.1	100.00%	1.8	100%	38.2	38.2	Gateway binary vector pB4cVGW DNA, complete sequence
AP019390.1	100.00%	1.8	100%	38.2	38.2	Gateway binary vector pB4nVGW3 DNA, complete sequence
MN793977.1	100.00%	1.8	100%	76.3	38.2	Cloning vector pSMXL6-SMXL6-no-EAR-HA, complete sequence
MN780595.1	100.00%	1.8	100%	152	38.2	Cloning vector p35S-TCP1-SRDX, complete sequence
MN728556.1	100.00%	1.8	100%	76.3	38.2	Cloning vector TCP1-CRISPR, complete sequence
MN728555.1	100.00%	1.8	100%	76.3	38.2	Cloning vector PAPs-CRISPR, complete sequence
MN728551.1	100.0(	1.8	100%	76.3	38.2	Cloning vector pSMXL6-SMXL6-HA, complete sequence

اوضحت نتائج الدراسة الحالية بان تسلسل القواعد النايتروجينية لموروث p35S للدراسة الحالية والمرسل الى كوريا الجنوبية وتحليلها بواسطة جهاز Sanger , إذ أظهرت نتائج تحليل القواعد النايتروجينية لموروث p35S في مشتقات فول الصوياالمحلية وجود تقارب بنسبة 100% مع ناقل الكلونة نوع pBOB11- C-Term complete sequence والذي يحمل الرقم القياسي MN991175.1 في موقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI)وكما موضح في الشكل (8.3)

Alignments

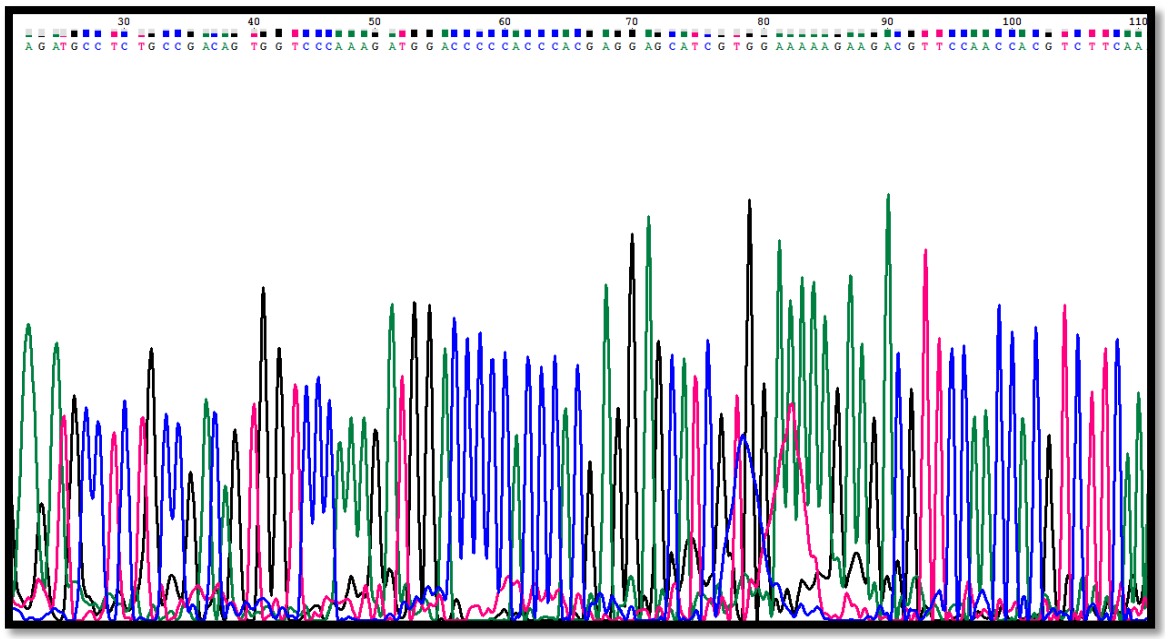
Cloning vector pBOB11_C-Term, complete sequence
Sequence ID: **MN991175.1** Length: 8509 Number of Matches: 3
Range 1: 3290 to 3450

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
298 bits(161)	2e-84()	161/161(100%)	0/161(0%)	Plus/Plus	

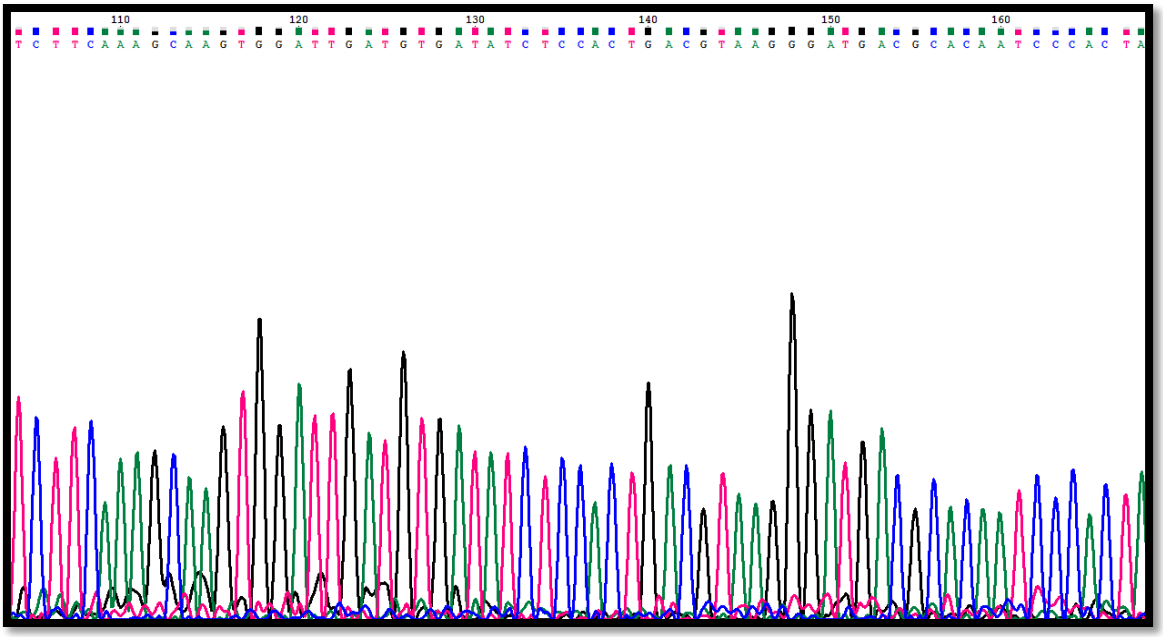
Features:

```
Query  1     GCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGG  60
Sbjct  3290  GCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGG  3349
Query  61    AGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAT  120
Sbjct  3350  AGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAT  3409
Query  121   ATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCC  161
Sbjct  3410  ATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCC  3450
```

الشكل (7.3):التطابق القواعد النيتروجينية لموروث العزلة الامريكية المستوردة p35S للدراسة الحالية (Query) مع العزلة المرجعية (Sbject).



شكل (A-8-3) يوضح كروماتوكرافي لقمم تسلسلات الحامض النووي لموروث العزلة الامريكية المستوردة P35 والذي يمثل خطوط ومنحنيات قواعد النايتروجينية . اللون الاحمر يمثل القاعدة النايتروجينية الثايمين، اللون الازرق يمثل القاعدة النايتروجينية السايتوسين ، اللون الاسود يمثل القاعدة النايتروجينية الكوانين ، واللون الاخضر يمثل القاعدة النايتروجينية الادنين.



شكل (B-8-3) يوضح كروماتوكرافي لقمم تسلسلات الحامض النووي لموروث العزلة الامريكية المستوردة P35 والذي يمثل خطوط ومنحنيات القواعد النايتروجينية . اللون الاحمر يمثل القاعدة النايتروجينية الثايمين، اللون الازرق يمثل القاعدة النايتروجينية السايتوسين ، اللون الاسود يمثل القاعدة النايتروجينية الكوانين ، واللون الاخضر يمثل القاعدة النايتروجينية الادنين.

كذلك اوضحت نتائج الدراسة الحالية بان تسلسل القواعد النايتروجينية لموروث HA-nos والعائدة للعزلة الامريكية للدراسة الحالية والمرسل الى كوريا الجنوبية وتحليلها بواسطة جهاز Sanger , إذ أظهرت نتائج تحليل القواعد النايتروجينية لموروث HA-nos في مشتقات فول الصوياالمحلية وجود تقارب بنسبة 100% مع ناقل الكلونة نوع pBOB11-C-Term complete sequence والذي يحمل الرقم القياسيي (JF927991.1) في موقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI)وكما موضح في الشكل (9.3)

Alignments

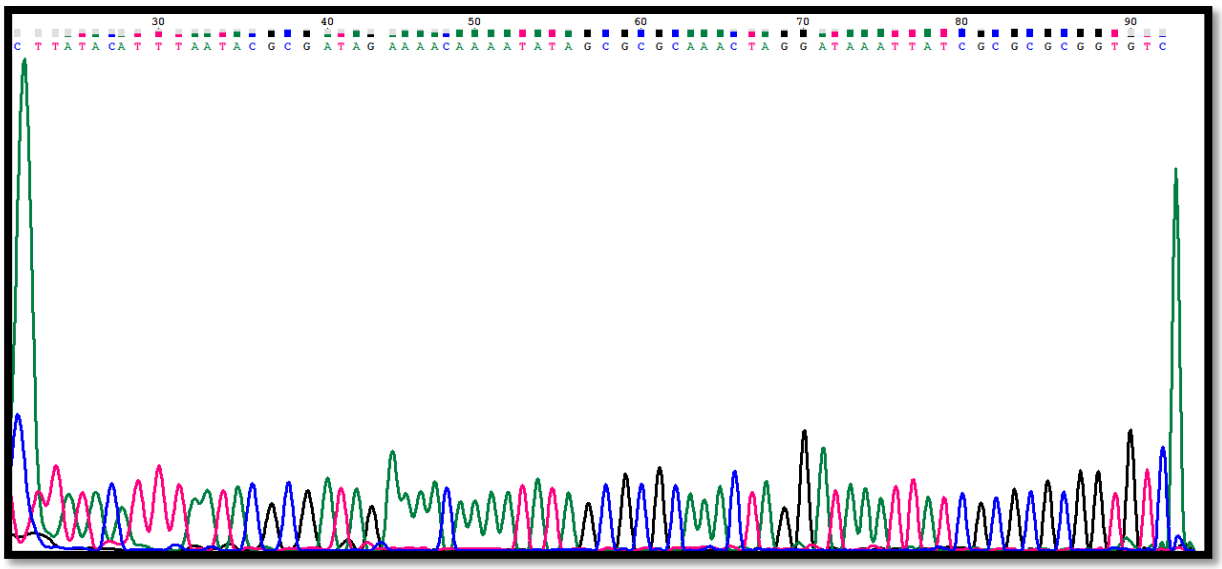
Cloning vector pBOB, complete sequence
Sequence ID: **JF927991.1** Length: 8730 Number of Matches: 1
Range 1: 5179 to 5249

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
132 bits(71)	1e-34()	71/71(100%)	0/71(0%)	Plus/Plus	

Features:

```
Query  22    TTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCG  81
Sbjct  5179  TTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCG  5238
Query  82    CGCGCGGTGTC  92
Sbjct  5239  CGCGCGGTGTC  5249
```

شكل 3-9 تطابق القواعد النايتروجينة لموروث (HA-nos) للعزلة الامريكية المستوردة للدراسة الحالية (Query) مع العزلة العالمية (Sbject).



شكل (10.3)كروماتوكرافي لقمم تسلسلات الحامض النووي لموروث HA-nos للعزلة الامريكية المستوردة والذي يمثل خطوط ومنحنيات قواعد النايتروجينية . اللون الاحمر يمثل القاعدة النايتروجينية الثايمين، اللون الازرق يمثل القاعدة النايتروجينية السايتوسين ، اللون الاسود يمثل القاعدة النايتروجينية الكوانين ، واللون الاخضر يمثل القاعدة النايتروجينية الادنين.

10.3. المكونات الكيميائية للفول الصويا

جدول (8.3) يتضمن نتائج التحليل الإحصائي لمحتوى حبوب فول الصويا وكسبة فول الصويا من المركبات الغذائية الرئيسية المتمثلة بالبروتين والدهن والألياف والرماد باللاضافة الى محتواها من الرطوبة

جدول (8.3) التحليل الكيميائي لمحتوى حبوب فول الصويا وكسبة فول الصويا .

No.	Chemical composition	اعلاف الصويا المحورة وراثيا عدد العينات 3 المعدل والانحراف القياسي	حبوب الصويا غير معدلة وراثيا عدد العينات 3 المعدل والانحراف القياسي
1	Protein	46.83±0.13a	39.78 ± 0.77b
2	Fat	1.64± 0.11a	1.29±0.22b
3	Fiber	3.32±0.19b	4.01±0.26a
4	Ash	5.31±0.19b	6. 23±0.16a
5	Moisture	8.59 ± 0.53b	9.74 ± 0.31a

تشير نتائج التحليل الإحصائي لهذه البيانات إلى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال (0.05) بين المركبات الغذائية لكل من نوعي حبوب الصويا وكسبة فول الصويا . اذ تفوقت الكسبة المعدلة وراثيا في محتواها من البروتين الخام Crude Protein (46.83 %) والدهن الخام Fat Crude (1.64) على قرينتها غير المعدلة وراثيا في محتواها من نفس المكونين الغذائيين (39.78%) للبروتين الخام و (1.29%)للدهن الخام . فيما انخفضت نسب كل من الالياف الخام FiberCrude (3.32 %) والرماد Ash (5.31 %) والرطوبة Moisture (8.59 %) لكسبة فول الصويا المعدلة وراثيا وعند مقارنتها بموكنات قريناتها من نفس المكونات الغذائية (4.01 % و6.23 % و9.74 %) للالياف الخام والرماد والرطوبة على التوالي .

هذه النتائج تتفق مع جميع الابحاث العلمية السابقة (العطار, 1980). التي تؤكد بان هنالك علاقة عكسية بين محتوى المواد العلفية من كل من البروتين والرماد والبروتين والرطوبة وكذلك بين محتواها من الدهن والرماد وايضا بين الدهن والرطوبة . ان مثل هذه النتائج تعد ايجابية وفي صالح كسبة فول الصويا المنتجة من فول الصويا المعدلة وراثيا لاسيما وان كل من المحتوى البروتيني والدهن هما اهم المكونات الغذائية في أي مادة علفية وليست فقط كسبة فول الصويا وبالتالي هذا يخدم قطاع الثروة الحيوانية بجميع مفاصلها الانتاجية لاسيما قطاع الدواجن (الجنابي ومحمد ,1989 ; ابراهيم ,2000 ; الياسين وعبد العباس,2010).

ومن الجدير بالذكر ان كسبة فول الصويا والتي هي المنتج الثانوي "by-product"لعمليات استخلاص الزيت من بذور فول الصويا , تعد اهم المواد العلفية التي تمثل المصدر البروتيني النباتي الاول التي تعتمد عليه صناعة الدواجن . اذ لايمكن تحقيق تغذية صحيحة دون توليف علائق متزنة بمحتواها من البروتين والطاقة والفيتامينات والعناصر المعدنية , علما ان مثل هكذا علائق غذائية لايمكن الوصول اليها من دون كسبة فول الصويا التي قد تشكل مايقرب 4/1 مكونات العليقة , من جانب اخر فان كسبة فول الصويا هي من اهم المصادر البروتينية الداخلة في توليف علائف الماشية سواء المنتجة للحليب او اللحم حيث تشكل ما يقرب من 1/ 6 مكونات علائف هذه الحيوانات . ومن الجدير بالذكر فانه ومن المعروف ان كسبة فول الصويا هي من اغنى المصادر البروتينية بالاحماض الامينية الاساسية وغير الاساسية الازمة للنمو والانتاج .

الاستنتاجات والتوصيات

4-الاستنتاجات والتوصيات Conclusions andRecommendation

4-1 الاستنتاجاتConclusions

1. نستنتج من نتائج البحث, تم اللجوء في عزل الدنا للنباتات باستخدام عدة استخلاص الحامض النووي في قيد الدراسة والتي اجريت وفق تعليمات الشركة المصنعة , أثبتت النتائج أن هذه الطريقة فعالة لاستخلاص DNA من العينات المدروسة بتركيز ونقاوة عالية .
2. أشارت النتائج إلى أن PCRالتقليدية والـPCRالثنائيبنوعية وحساسية دقيقة وكذلك عالية الموثوقية يمكن استخدامها للكشف عن الاغذية المعدلة وراثيا محددة عن طريق استخدام بادئات محددة تستهدف العناصر المشتركة في النباتات المعدلة وراثيا.
3. لم تكن الاعلاف الحيوانية او مايسمى مشتقات فول الصويا في العراق خالية من التعديل الوراثي اذ تم اكتشاف بعض اعلاف الصويا المعدلة وراثيا .
4. ان عدم وجود مورثات معدلة وراثيا في المحصول باستخدام بادئات متخصصة للكشف عنها هذا لايعني خلو النبات من التعديل الوراثي .
5. نستنتج من الدراسة الحالية وعلى ضوء النتائج المتحصل عليها , ان التعديل الوراثي الذي اجري على محصول فول الصويا وهو من اهم المحاصيل الصناعية عالميا ذات التجارة الرائقة , وقد اثر بشكل مباشر على محتواه من المركبات الغذائية وبالأخص محتواه من البروتين والدهن اللذان يعدان من اهم المركبات الغذائية على اعتبار ان هذا المحصول يعد من المحاصيل الصناعية العالمية ذات التجارة الرائقة وانه يزرع بهدف انتاج الزيت كمصدر غذائي أولا بالاضافة إلى إنتاج الكبسة منه والتي تعتبر من اهم مصادر البروتين النباتي ذات الاهمية البالغة والتي تدخل في تحضير الاعلاف الحيوانية لاسيما اعلاف الدواجن الا ان هذا التغير في الترتيب قد لا يخلو من اثار جانبية بسبب قلت الالياف والمعدان الموجود في الرماد

4-2التوصياتRecommendation

1. نوصي خلال دراستنا الحالية بضرورة مراقبة دخول المحاصيل المعدلة وراثيا الى البلد منها مايدخل غذاء للانسان ومنها ما يدخل غذاء للحيوان كما في حالة الاعلاف الحيوانية المستوردة وذلك من خلالإنشاء مختبرات متخصصة للكشف عن النباتات والمنتجات المحورة وراثياً .
2. لا بد من اعداد خطط ستراتيجية من اجل تطوير الدراسات المتعلقة بالتعديل الوراثي لما لها من تاثير على صحة الانسان , ولهذا تُعد هذه الدراسة اللبنة الاساسية لتطوير القدرات العلمية والتقنية في هذا المجال , وكذلك تطبيق قانون الأمان الحيوي ; وذلك بهدف حماية التنوع الحيوي في بلدنا العراق .
3. ضـــرورة وضـــع وتطوير الآليات لدراســـة الآثار المحتملة لهذه الأحياء والمنتجات على صـحة الإنسـان والحيوان والبيئة وخصـوصـا تاثير تغير المحتوى الغذائي للنبات المحور وراثيا

المصادر والمراجع

المصادر العربية :

إبراهيم, إسـماعيل خليل .(2000) . تغذية الدواجن . الطبعة الثانية , مطبعة جامعة الموصـل وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .

الأسعد, نور, الخياط, غسان حمادة, خنشور, انس, الطاهر, عبدالله,عبدالقادر,احمد .(2010). الكشـــف عن وجود منتجات معدلة وراثيا في الأســـواق المحلية.مجلة جامعة دمشـــق للعلوم الزراعية . العدد(26):311–326.

إسماعيل،أحمدمحمدعلي . (1997) : إنباتالبذور . جامعةقطر.

ألعبيدي , جمعة . (2003) . السلوك الوراثي وتقدير معامل التحديد لصفات اصناف من فول الصـويا (Glycine Max L.Merrill). رسـالة ماجسـتير ,قسـم المحاصـيل الحقلية , كلية الزراعة , جامعة تكريت .

الأميري ,عامر محمد علي ,جاسم محمد عزيز,بشير محمد اقديم.(2009) .التركيب الكيميائي لبذور بعض بعض اصناف فول الصوياGlycine max وامكانية استعمالها في تصنيع اغذية الاطفال الحبوبية المساعدة. مجلة ام سلمة

الجنابي, عبدالكريم ناصـــر وعطاالله ســـعيد محمد.(1989). الاســـس العلمية لتغذية الدجاج .مطبعة جامعة بغداد وزارة التعليم العالي والبحث العلمي..

جندل , جاســـم .(2015). الاغذية المعدلة وراثيا . دار البداية .الطبعة الاولى ناشـــرون وموزعون .

الرفاعي , عبدالرحيم توفيق , سمير عبد الرزاق شوكي , (2002) . تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة .الطبعة الاولى . دار الفكر العربي .القاهرة . مصر.

السـاهوكي ,مدحت ,عبدالباسـط عبدالرزاق داوود .(2020). جينوم وتربية النبات .كلية علوم الهندسة -جامعة بغداد

السـعدي , علي حمود , فهيم عبدالكريم بن خيال , رمضـان شـحاته عطية . (2012) . الاغذية المهندسة وراثيا . الطبعة الاولى . دار الرضوان للنشر والتوزيع.

عبد العباس , محمد حسـن .(2007). اسـتخدام مركز بروتيني النباتي المحلي محل البروتين النباتي والحيواني المســـتوردين في الصـــفات الانتاجية للدجاج بيض المائدة . مجلة علوم الزراعية العراقية.

العطار,علي عبد الكريم .(1980). التغذية العلمية للدجاج. تأليف تيتوس وهري.كلية الزراعة -جامعة البصرة : ص 149-312.

محمد، كريم احمد. (2014). اقليم زراعة الرز في محافظتي النجف والقادسية. مجلة البحوث الجغرافية في كلية التربية للبنات - جامعة الكوفة.

الياسين,علي عبدالخالق.محمد حسن عبالعباس.(2010).تغذية الطيور الداجنة.وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد.

المصادر الاجنبية :

Aboul-Maaty, N. A. F., & Oraby, H. A. S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 25–31.

Agnihotri, S., Burrell, K. E.,Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., & Zadeh, G. (2013). Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 61(1), 25-41.

Ahmed, F.E. (1995). Applications of molecular biology to biomedicine and toxicology. *Journal of Environmental Science and Health*, 13(1): 1-51.

Aljumali, J. M. A. (2011). Growth and yield of soybean as effect of planting dates. *Iraqi Journale. Agriculture. Scince.* 42(5): 38-45.

Ahmad, M.M., Ali, A, Siddiqui, S. and Abdin, M.Z. (2017). MethodsinTransgenic Technology. In Plant Biotechnology: Principles and Applications. *Springer Singapore*.p. 93-115.

Allison, S. & Palma, P.M. (1997). Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience*, 47:86–96.

Almofti; M.R, Hideyoshi, H, Yasuo, S., Almofti, A., Li, W. *et al.* (2003). Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum. *Molecular Membrane Biology*, 20(1):35-43.

Alvarez, J. M., Schinke, A. L., Brooks, M. D., Pasquino, A., Leonelli, L., Varala, K., *et al* & Coruzzi, G. M. (2020). Transient genome-wide interactions of the master transcription factor NLP7 initiate a rapid nitrogen-response cascade. *Nature communications*, 11(1), 1-13.

Ammann, K. (2011). Molecular differences between GM-and non-GM crops over-estimated. *Nepal JBiotechnology*, 1(1), 31-48.

Ammann, K., Jacot, Y., & Al Mazyad, P. R. (2001). Field release of transgenic crops in Switzerland. An ecological risk assessment of vertical gene flo Gene technisch veränderte Krankeits und Schädlingsresistente Nutzpflanzen. *Nature communications*, 13(2), 111-131.

Andersen, V. (Ed.). (2020). Genetically Modified and Irradiated Food: Controversial Issues: Facts Versus Perceptions. Academic Press.

Arnheim, N. and Erlich, H. (1992). Polymerase Chain Reaction strategy. Anne Rev. *Biochem*. 61: 131-156.

Arora, N., & Mishra, A. (2011). Safety assessment of genetically modified food crops. *Allergy Asthma Immunology*, 25(2), 53-60.

Arun, Ö. Ö., Yılmaz, F., & Muratoğlu, K. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. *Food Control*, 32(2), 525-531.

Asano, T., Nguyen, T. H. N., Yasuda, M., Sidiq, Y., Nishimura, K., Nakashita, H., & Nishiuchi, T. (2020). Arabidopsis Mapkkk δ-1 is required for full immunity against bacterial and fungal infection. Journal .*Experimental Botany*, 71(6), 2085-2097 .

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E.; Moore, D.D., Seidman, et al .(2002). Short Protocols in Molecular Biology. 5th edn. John Wiley and Sons Publications: New Yor

Babekova, R., Funk, T., Pecoraro, S., Engel, K. H., Baikova, D. andBusch, U. (2008). Duplex polymerase chain reaction (PCR) for thesimultaneous detection of CryIA(b)and the maize ubiquitin promoter inthe transgenic rice line KMD1. *Biotechnology Equip*, 22(2):705–708.

Bua, B. and Ojirot, M. (2014). Assessing the Importance of Rice as Food and Income Security Crop in Puti-puti Sub-county, Pallisa District,Uganda. *American Journal of Experimental Agriculture. science domaininternational* 4(5): 532-540.

Batista, R. and Oliveira, M. M. (2009).Facts and fiction of geneticallyengineered food. *Trends in Biotechnology*, 27(5):277-286.

Biłas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., & Kononowicz, A. K. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *PlantCell, Tissue and Organ Culture*, 127(2), 269-287.

Bomgardner, M. M. (2012). Replacing trans-fat. *Chemical and Engineering News*, 90(11): 30-32.

Brar, D. S. and Khush, G. S. (1997). Alien introgression in rice. *Plant Molcular. Biological*. 35: 35-47.

Bawa, A. S., & Anilakumar, K. R. (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns a review. *Journal of food science and technology*, 50(6), 1035-1046

Brar, D. S., Dalmacio, R., Elloran, R., Aggarwal, R., Angeles, R. and Khush, G. S.(1996). Gene transfer and molecular characterization of introgression from wild Oryza species into rice. In: Rice Genetics III. International Rice Research Institute, Manila, *The Philippines*, pp. 477-486.

Breyer, D., Kopertekh, L. and Reheul, D. (2014). Alternatives to antibiotic resistance marker genes for in vitro selection of Genetically Modified Plants–Scientific Developments; Current Use, operational access and biosafety considerations. *critical reviews in plant sciences*; 33(4): 286-330.

Breckling, B., Reuter, H., Middelhoff, U., Glemnitz, M., Wurbs, A., Schmidt, G., & Windhorst, W. (2011). Risk indication of genetically modified organisms (GMO): modelling environmental exposure and dispersal across different scales: oilseed rape in Northern Germany as an integrated case study. *Ecological indicators,* 11(4), 936-941.

Cai,L; Lu Z., Qiantang F., and Zeng F.(2018). Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes IPTs, CYP735A and CKXs in the biofuel plant Jatropha curcas, *Peer Journal*, 6: 812-899.

Carrière, Y., Fabrick, J. A., & Tabashnik, B. E. (2016). Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops. *Trends in Biotechnology*, 34(4), 291-302.

Chai, R., Zhang, G., Sun, Q., Zhang, M., Zhao, S., & Qiu, L. (2013). Liposome-mediated mycelial transformation of filamentous fungi. *Fungal biology*, 117(9), 577-583.

Chakrabarty, S., Jin, M., Wu, C., Chakraborty, P., & Xiao, Y. (2020). Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein family Vip3A and mode of action against pest Lepidoptera. *Pest Management Science,* 76(5), 1612-1617

Chen, Q., Shinozaki, D., Luo, J., Pottier, M., Havé, M., Marmagne, A., ...& Masclaux-Daubresse, C. (2019). *Autophagy and nutrients management in plants*. Cells, 8(11), 1426-1478.

Couto, M., Sudre, A., Lima. M. and Bomfim , T.(2013). Comparison of techniques for DNA extraction and agarose gel staining of DNA fragments using samples of Cryptosporidium. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropedica, Rio de Janeiro, Brazil, *Journal. Veterinarian Medicine*. 58(10):535–542.

Darbani, B., Farajnia, S., Noeparvar, S., Stewart, E., Moharnmadi, S. *et al*. (2008). Plant transformation. Needs and futurity of the transgenes. *Biotechnology*, 7: 403-412.

Daveya, M. R., Anthony, P., Power, J. B. and Lowe, K. C. (2005). Plant protoplasts statusand biotechnological perspectives . *biotechnology advances* ,23(2) :131-171.

Dona, A. and Arvanitoyannis, I. S. (2009). Health risks of genetically modified foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(2): 164-175.

Ellis, J. R., Villareal, C. P. and Juliano, B. O.(1986). Protein content, distribution and retention during milling of brown rice. Qual. *Plant. Plant Foods Hum. Nutrition*. 36 (1): 17-26.

Elsanhoty, R. M., Al-Turki, A. I., & Ramadan, M. F. (2013). Prevalence of genetically modified rice, maize, and soy in Saudi food products. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(4), 883-899.

El-Zaeem, S. Y., Ahmed, M. M. M., Salama, M. E., & El-Maremie, H. A. (2011). Production of salinity tolerant Nile tilapia, Oreochromis niloticus through traditional and modern breeding methods: II. Application of genetically modified breeding by introducing foreign DNA into fish gonads. *African Journal of Biotechnology*, 10(4), 684-695.

Epley, R.J. (1998) . Meat tenderness Regentes of the University of Minnesata Fagan, J. (2003). DNA Based Methods for Detection and Quantificationof GMOs: Principles and Standards. In: Testing of GeneticallyModified Organisms in Foods Ed. F.E. Ahmed. Food Products Press, *Animprint of The Haworth Press*, 6:163-215.

Farhan, Y.I. (2014). Detection of Genetically Modified Rice by different type of PCR. M.S.C. Thesis, instituted of Genetic Engineering and Biotechnology, University of Baghdad Iraq.

Freese, W.and Schubert, D. (2004). Safety testing and regulation of geneticallyengineeredfoods. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 21: 229-324.

Forte, V. T., Di Pinto, A., Martino, C., Tantillo, G. M., Grasso, G. et al. (2005). A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. *Food Control*, 16(6): 535-539.

Gryson, N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2003-2022.

Guertler, P., Harwardt, A., Eichelinger, A., Muschler, P., Goerlich, O., & Busch, U. (2013). Development of a CTAB buffer-based automated gDNA extraction method for the surveillance of GMO in seed. *European Food Research and Technology*, 236(4), 599-606.

Hernandez-Garcia, C. M., & Finer, J. J. (2014). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*, 217, 109-119.

Higuchi, D., Von Berlodingen, C.H., Sensabough, G.F. and Erlich, H.A. (1988). DNA typing from single hairs. Nucl. *Acids Reserch*. 33(2): 543-546.

Hilbeck, A., & Otto, M. (2015). Specificity and combinatorial effects of Bacillus thuringiensis Cry toxins in the context of GMO environmental risk assessment. *Frontiers in Environmental Science*, 3: 71-112.

Ho, M. W., Ryan, A. and Cummins, J. (1999). Cauliflower mosaic viral promoter-a recipe for disaster. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(4): 194-197.

Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., Wulff, D. (2012). Detecting un-authorized genetically

modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology advances*, 30(6), 1318-1335.

HUANG, J. K., & PENG, B. W. (2015). Consumers' perceptions on GM food safety in urban China. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(11), 2391-2400.

Husaini, A. M., Abdin, M. Z., Parray, G. A., Sanghera, G. S., Murtaza, I., Alam, T., & Khan, H. N. (2010). Vehicles and ways for efficient nuclear transformation in plants. *genetically modified crops*, 1(5), 276-287.

Jeschke, J. M., Keesing, F., & Ostfeld, R. S. (2013). Novel organisms: comparing invasive species, GMOs, and emerging pathogens. *Ambio*, 42(5), 541-548.

Jiang, C., Xu, S., Zhang, S., & Jia, L. (2012). Chitosan functionalized magnetic particle-assisted detection of genetically modified soybeans based on polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 420(1), 20-25.

Jin, Y., Goodman, R. E., Tetteh, A. O., Lu, M., & Tripathi, L. (2017). Bioinformatics analysis to assess potential risks of allergenicity and toxicity of HRAP and PFLP proteins in genetically modified bananas resistant to Xanthomonas wilt disease. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 81-89.

Kikkert, J.R.; Vidal, J.R. and Reisch, B.I. (2004). Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, pp. 61-78.

Kamle, S., & Ali, S. (2013). Genetically modified crops: detection strategies and biosafety issues. *Gene*, 522(2), 123-132.

Komori,T., Sun, Y., Kashihara, M., Uekawa, N., Kato, N., Usami, S., ...& Bortiri, E. (2020). High-throughput phenotypic screening of random

genomic fragments in transgenic rice identified novel drought tolerance genes. *Theoretical and Applied Genetics*,6 ,1-11.

Kim, S. R., &An, G. (2012). Bacterial transposons are co-transferred with T-DNA to rice chromosomes during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecules and cells*, 33(6), 583-589.

Komatsu, A.; Ohtake, M.; Hasegawa, H., Terakawa, T. and Wakasa, K. (2006). Transgenic Rice for Animal Feed with High Tryptophan content generated by a Selectable Marker and vector backbone-free technology. Journal. *Plant Biotechnology*, 23: 39-46.

Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Doskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1024-1042.

Krishnan, H. B., Jang, S., KW. S., Kerley, M. S., Oliver, M. J., & Trick, H. N. (2011). Biofortification of soybean meal: immunological properties of the 27 kDa γ-zein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(4), 1223-1228.

Lacroix, B., & Citovsky, V. (2016). A functional bacterium-to-plant DNA transfer machinery of Rhizobium etli. *PLoS pathogens*, 12(3). (6), 1154-11925.

Lazzeri, P. A., Brettschneider, R., Lührs, R., & Lörz, H. (1991). Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(4), 437-444.

Made, D., Degner, C., & Grohmann, L. (2006). Detection of genetically modified rice: a construct-specific real-time PCR method based on DNA sequences from transgenic Bt rice. *European Food Research and Technology*, 224(2), 271.

Man, Y. C., Aida, A. A., Raha, A. R., & Son, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase

chain reaction (PCR) for halal verification. *Food control*, 18(7), 885-889.

Manchester, K.L. (1995). Value of A260/A280 ratios for measurement ofpurity of nucleic acids. *Journal. Biotechniques*, 19:208–210.

Matas, A. J., Gapper, N. E., Chung, M. Y., Giovannoni, J. J., & Rose, J. K. (2009). Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. *Current opinion in biotechnology*, 20(2), 197-203.

Moellenbeck, D.J., Peters, M.L., Bing, J.W., Rouse, J.R., Higgins, L.S. et al. (2001). Insecticidal Proteins from Bacillus thuringiensis protect corn from corn rootworms. *Nature biotechnology*, 19(7): 668-672.

Miki, B. and McHugh, S. (2004). Selectable Marker Genes in Transgenic Plants: applications; alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107(3): 193-232.

Moghissi, A. A., Pei, S., & Liu, Y. (2016). Golden rice: Scientific, regulatory and public information processes of a genetically modified organism. *Critical reviews in biotechnology*, 36(3), 535-541.

Mullis, K.B. and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methodsin in Enzymol*. 25: 155-335.

Maghari, B. M., & Ardekani, A. M. (2011). Genetically modified foods and social concerns. *Avicenna journal.medical biotechnology*, 3(3), 109-136.

Nábrádi, A., & Popp, J. (2011). Economics of GM crop cultivation. Apstract*applied Studdiesin AgribusInessand Commerce*, 5(3), 7-19.

Nzilibili, S. M. M., Ekodiyanto, M. K. H., Hardjanto, P., & Yudianto, A. (2018). Concentration and Purity DNA Spectrophotometer: Sodium

Monofluorophosphate forensic impended effect. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 8(1): 34-44.

Oliveira, P. H., Touchon, M., & Rocha, E. P. (2014). The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic acids research*, 42(16), 10618-10631.

Oraby, H. A., Hassan, A. A. and Abou Mossallam, A. A. (2005). Screening food products for the presence of CaMV 35S promoter and NOS 3′ terminator. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(12): 1974-1980.

Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., & Bellini, C. (2011). Agrobacterium tumefaciens: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and molecular plant pathology*, 76(2), 76-81.

Park, S. B., Kim, H. Y., & Kim, J. H. (2015). Multiplex PCR system to track authorized and unauthorized genetically modified soybean events in food and feed. *Food Control*, *54*, 47-52.

Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., Lopez, S.L. and Carrasco, A.E.(2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects onvertebrates by impairing retinoic acid signalling. *Chemical Research inToxicology* 23: 1586-95.

Park, S. B.; Kim, H. Y. and Kim, J. H. (2015). Multiplex PCR system to track authorized and unauthorized Genetically Modified Soybean events in Food and Feed. *Food Control*, 54: 47-52.

Pauli, U., Liniger, M., Zimmermann, A. and Schrott, M. (2000).Extraction and Amplification of DNA from 55 Foodstuffs. *Journal. Mitt.Lebensm Hygiene*, 91:491-501.

Pauwels, K., De Keersmaecker, S. C., De Schrijver, A., du Jardin, P., Roosens, N. H., & Herman, P. (2015). Next-generation sequencing

as a tool for the molecular characterisation and risk assessment of genetically modified plants: Added value or not. *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 319-326.

Pavone, V., Goven, J., & Guarino, R. (2011). From risk assessment to in-context trajectory evaluation-GMOs and their social implications. *Environmental Sciences Europe*, 23(1), 3-11 .

Peyret, H., Brown, J. K., & Lomonossoff, G. P. (2019). Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5′ and 3′ untranslated regions. *Plant methods*, 15(1), 108-127.

Pipatpanukul, T., Bunnag, S., Theerakulpisut, P., & Kosittrakul, M. (2004). Transformation of indica rice (Oryza sativa L.) cv. RD6 mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Transformation*, 26(1), 2-9.

Premanandh, J. (2011). Global consensus–Need of the hour for genetically modified organisms (GMO) labeling. *Journal of Commercial Biotechnology*, 17(1), 37-44.

Rabiei, M., Mehdizadeh, M., Rastegar, H., Vahidi, H., & Alebouyeh, M. (2013). Detection of genetically modified maize in processed foods sold commercially in Iran by qualitative PCR. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 12(1), 25-81.

Racoczy-Trijanowska, M. (2002). Alternative methods of planttransformation. *Jornal. Cell Molecular Biology*, 7(3):849-858.

Rani, S. J. and Usha, R. (2013). Transgenic plants: Types; benefits; public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research*, 6(8): 879-883.

Rzymski, P., & Królczyk, A. (2016). Attitudes toward genetically modified organisms in Poland: to GMO or not to GMO. *Food Security*, 8(3), 689-697.

Raymond, P., Gendron, L., Khalf, P., Dibley, K., Bhat, S. et al. (2010). Detection and Identification of Multiple Genetically Modified events

using DNA insert fingerprinting. *Journal. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6): 2091-2102.

Robinson, C. (2013). Don't look; don't find: Health hazards of Genetically Modified Food. *Journal of the Canadian Association of Naturopathic Doctors*, 20: 17-24.

Rommens, C.M. (2004). All-native DNA Transformation: a new approach to Plant Genetic Engineering. Trends in plant science, 9(9): 457-464.

Rosellini, D. (2011). Selectable Marker Genes from Plants: Reliability and Potential. *In Vitro.Cellular and Developmental Biology-Plant*, 47(2): 222-233.

Saadedin, S. M., Abbas, M. R., & Suleiman, A. A. (2019). Detection of CaMV-35S Promoter and NOS Terminator in Genetically Modified Tomato Seed in Iraqi Markets. *Iraqi journal of biotechnology*, 18(2).51-72.

Safaei, P., Aghaee, E. M., Khaniki, G. J., Afshari, S. A. K., & Rezaie, S. (2019). A simple and accurate PCR method for detection of genetically modified rice. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 1-5.

Samac, D. A.; Tesfaye, M.; Dornbusch, M.; Saruul, P. and Temple, S. J. (2004). A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic research*, 13(4): 349-361.

Schalamun, M., Nagar, R., Kainer, D., Beavan, E., Eccles, D., Rathjen, J. P., & Schwessinger, B. (2019). Harnessing the MinION: An example of how to establish longread sequencing in a laboratory using challenging plant tissue from Eucalyptus pauciflora. *Molecular ecology resources*, 19(1), 77-89.

Schnurr, M. A. (2013). Biotechnology and bio-hegemony in Uganda: unraveling the social relations underpinning the promotion of

genetically modified crops into new African markets. *Journal of Peasant Studies*, 40(4), 639-658.

Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Damsteegt, V., Webb, K. et al. (2001). Post-transcriptional Gene silencing in plum pox virus Resistant Transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein Gene. *Transgenic Research*, 10(3): 201-209.

Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S.N. and Bawa, A.S. (2008). Functional and Edible uses of Soy protein products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 7(1): 14-28.

Soga, K., Kimata, S., Narushima, J., Sato, S., Sato, E., Mano, J., & Kondo, K. (2020). Development and Testing of an Individual Kernel Detection System for Genetically Modified Soybean Events in Non-identity-preserved Soybean Samples. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 43(8), 1259-1266.

Sood, P., Bhattacharya, A. and Sood, A. (2011). Problems and Possibilities of Monocot Transformation. *Journal*. *BiologicalPlant arum*, 55:1-15.

Stein, A. J. and Rodríguez-Cerezo, E. (2010). International trade and the global pipeline of new GM crops. *Journal. Nature Biotechnology*, 28: 23-25.

Świątkiewicz, S. Y. L., Twardowska, M., Markowski, J., Mazur, M. A. Ł. G. O.., Sieradzki, Z. B. I.., & Kwiatek, K. (2010). Fate of transgenic DNA from Bt corn and Roundup Ready *soybean meal* in broilers fed GMO feed. *Bull Vet Inst Pulawy*, 54, 237-242.

Sierra,T., Crevillen, A. G., & Escarpa, A. (2019). Electrochemical detection based on nanomaterials in CE and microfluidic systems. Electrophoresis, 40(1), 113-123 .

Tabashnik, B. E., Huang, F., Ghimire, M. N., Leonard, B. R., Siegfried, B. D. et al. (2011). Efficacy of Genetically Modified Bt toxins

against insects with Different Genetic mechanisms of Resistance. *Nature biotechnology*, 29(12), 1128-1131.

Tam, P. D. (2015). Genetically modified organism (GMO) detection by biosensor based on SWCNT material. *Current Applied Physics*, 15(3), 397-401.

Tripathi, L. (2005). Techniques for Detecting Genetically Modified Crops and Products. *African Journal of Biotechnology*, 4(13), 1472-1479.

Tsatsakis, A. M., Nawaz, M. A., Tutelyan, V. A., Golokhvast, K. S., Kalantzi, O. I., Chung, D. H., & Chung, G. (2017). Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 108-121.

Van Putten, M. C., Kleter, G. A., Gilissen, L. J. W. J., Gremmen, B., Wichers, H. J., & Frewer, L. J. (2011). Novel foods and allergy: Regulations and risk-benefit assessment. *Food control*, 22(2), 143-157.

Venken, K. J. T., Bellen, H. J. (2007). Transgenesis upgrades for Drosophila melanogaster. *J0urnal. Development*, 124: 3571-3584.

Viljoen, C. D, Dajee, B. K. and Botha, G. M. (2006). Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labelling. *African Journal. Biotechnology*, 5:73–82.

Viljoen, C. D, Dajee, B. K. and Botha, G. M. (2006). Detection of GMO in food products in South Africa: Implications of GMO labelling. *African Journal. Biotechnology*, 5:73–82.

Wang, W., Deng, Y., Li, S., Liu, H., Lu, Z. et al. (2013). A novel Acetylcholine Bioensor and its Electrochemical behavior. *Journal of Biomedical nanotechnology*, 9(4): 736-740.

Wang, X., Teng, D., Guan, Q., Tian, F., & Wang, J. (2015). Detection of genetically modified crops using multiplex asymmetric polymerase

chain reaction and asymmetric hyperbranched rolling circle amplification coupled with reverse dot blot. *Food chemistry*, 173, 1022-1029.

Wong, T. B. (2013). Playing Politics with Food: Comparing Labeling Regulations of Genetically Engineered Foods Across the North Atlantic in the United States and European Union. *San Joaquin Agriculture.* 23: 243-297.

Wang,Y., Guo, G., Wang, H., Yang, X., Shao, F., Yang, C., & Yang,Y. (2014). Comparative study of bacteriological culture afluorescence quantitative PCR (RT-PCR) and multiplex PCR-based reverse line blot (mPCR/RLB) hybridization assay in the diagnosis of bacterial neonatal meningitis. *San Joaquin Agriculture*, 14(1), 224.

Wolt, J. D., Keese, P., Raybould, A., Fitzpatrick, J. W., Burachik, M., Gray & Wu, F. (2010). Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. *Transgenic research*, 19(3), 425-436.

Wolfenbarger, L.L. and Phifer, P.R. (2000). The Ecological risks and Benefits of Genetically Engineered Plants. *Science*, 290(5499), 2088-2093.

Xue,K., Yang, J., Liu, B., & Xue, D. (2012). The integrated risk assessment of transgenic rice Oryza sativa: A comparative proteomics approach. *Food chemistry*, 135(1), 314-318.

Yari, H., Alireza, E., Reza, H., Khosrav, M. and Pourmehdi, S. (2013). Optimization of a rapid DNA extraction protocol in rice focusing on age of plant and EDTA concentration. *Journal. Medical and Bioengineering*, 2(3):218-223.

Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P. et al. (2000). Engineering the Provitamin A (β-carotene) Biosynthetic pathway

into (carotenoid-free) Rice endosperm. *Science*, 287(5451): 303-305.

Young, J. L., & Dean, D. A. (2015). Electroporation-mediated gene delivery. *In Advances in genetics*(89): 49-88.

Zaulet, M., Rusu, L., Kevorkian, S., Luca, C., Mihacea, S., Badea, E. M., & Costache, M. (2009). Detection and quantification of GMO and sequencingoftheDNAamplifiedproducts.*Romania Biotechnological Letters*, 14(5), 4733-4746.

Zhu, D., Liu, J., Tang, Y., & Xing, D. (2010). A reusable DNA biosensor for the detection of genetically modified organism using magnetic bead-based electrochemiluminescence. *Sensors and Actuators B Chemical*, 149(1), 221-225.

Summery

Most foods are produced at the present time using genetic engineering techniques or what is known as gene technology, which is a method used to transfer genes from one organism to another with the aim of giving desired traits or characteristics and that most of the gene transfer operations take place randomly among the genetic material, which raises concerns about the inability of DNA In controlling the metabolic processes in the long run.

Polymerase chain reaction (PCR) technology for GMO detection is the most reliable option due to its high sensitivity and specificity. It is used in most countries of the world.

91 samples were collected for each of the soybean beans and their secondary derivatives, as well as the rice grains, which were obtained during the current study period, which started from December 2019 to March 2020. DNA was isolated from dry plant isolates (soybeans and their secondary derivatives and rice grains) of the approved cultivars using prepared protocol steps. This kit provides a fast and easy way to obtain pure DNA from plant isolates.

When measuring the optical density OD of the DNA of all isolates, most of the purity values were found between (1.7 - 2.0).

During the current study, the polymerase chain reaction technique was used to investigate the common primers used in genetic modifications in plants, which are both the CaMV-35S promoter and the Nos terminator. Two molecular methods were used to investigate genetically modified

crops, which are soybeans and soybean meal, as follows: The first method is detection using the Monoplex PCR chain, the second method is detection using the douplex PCR chain reaction.

The current results showed that three genotypes out of seventeen genotypes belonging to the soybean cake were genetically modified containing the Promoter and terminator of the same sample for the samples of the American imported soybean meal Healthy Fead No. 1, and the Brazilian imported soybean meal Healthy Fead No. 2. Healthy Feed No.3 Argentine soybean meal, using both Monoplex PCR and douplex PCR.

The promoter for the CaMV-35S promoter recorded the product of 195 base pairs in three genotypes of GM soybean feed, as well as the catalyst record of the terminator of the product of 118 base pairs in three genotypes of the GM soybean meal, The molecular weights of the replicated beam were estimated on the sites of the beams with known partial weights of the DNA-Marker.

The results of this study were compared with previous studies, as it was found that the multiplicative beam is confined between the two sizes 100-200 base pairs, and this was confirmed by the relationship between the molecular weight of the volumetric guide beams and the distance that those multiplying beams moved on the acarose gel. Whereas, no positive results were recorded for the specific primers of P35S-cf3 and terminator P35S-cf4 for all rice crop isolates using the polymerase chain reaction (PCR).

A sample of genetically modified US soybean meal was sent to South Korea in order to confirm the sequence of nitrogen bases for the promoter and terminator and to compare it with the sequences published on the NCBI website. The results of the current study indicated that there was 100%

conformity with the nitrogen base sequences for the studies published on the NCBI website.

The chemical components of soybean crops were studied, where the comparison between the chemical components of genetically modified and non-genetically modified crops showed the existence of fundamental differences in the components if the percentage of proteins and fats in genetically modified plants increased than in non-genetically modified plants. Genetically modified and these changes may have economic benefits that harm them to the health of animals, and thus humans, are not clear and need in-depth studies.

The present study summarizes that the use of different molecular methods such as the polymerase chain reaction are valuable and useful tools for the detection of genetically modified crops. The main step for detecting the results of genetically modified crops is the use of the appropriate DNA extraction method and its suitability for subsequent analysis.

Ministry of Higher Education

& Scientific Research

University of Kerbala/College of Science

Department of Biology

Detection of genetically medication among imported fruits and studying effects on duration of storage

A thesis

Submitted to the council of the

College of Science – University of Karbala

In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology

By

Basim Abdul Wahid Jasur

B.Sc. Kerbala University 2007

Supervised by

Assist / Prof.

Dr.Khaled A.Hussain

Prof.

Dr.Mohanad M. Ahmed

1442 A.H **2020 A.D**