آزمون حضور نابجای بذر تراریخته در پارت‌های بذری

سید حسین جمالی
عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

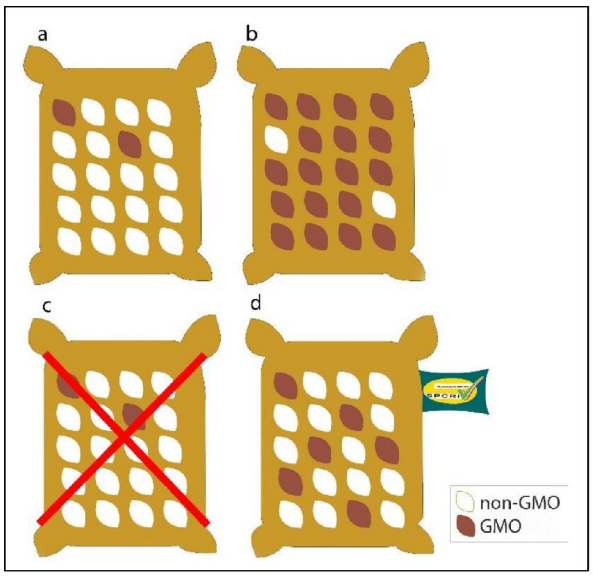
مقدمه

طبق گزارش سال ۲۰۱۶ نهاد ISAAA[1] ، ۷۸٪ دانه سویا، ۶۴٪ پنبه، ۳۳٪ ذرت و ۲۴٪ کلزا تولید شده در جهان از طریق مهندسی ژنتیک ایجاد گردیده و تراریخته[2] می‌باشند. نصب برچسب بر روی این محصولات در تمامی کشورها حتی آمریکا که قانون آن در سال ۲۰۱۸ تصویب شد، الزامی می‌باشد. در اتحادیه اروپا، با وجود الزام نصب برچسب بر روی محصولات مشتق شده از سویای تراریخته نظیر لسیتین که در تهیه شکلات بکار می‌رود، محصولاتی چون گوشت، شیر و تخم مرغ دام و طیوری که غذای تراریخته را مصرف می‌کنند و نیز محصولات غذایی و خوراک دامی حاوی مواد تراریخته کمتر از ۰/۹ درصد (حد آستانه) از نصب برچسب معاف می‌باشد .[3]

بیش از یک دهه است که ارقام تراریخته در کنار ارقام غیر تراریخته وارد بازار جهانی بذر شده‌اند. با وجود الزامی بودن نصب برچسب بر روی این بذرها، حضور غیرعمدی و تصادفی بذر تراریخته در پارت‌های بذری که ممکن است طی هر یک از مراحل تولید، برداشت، انبارداری یا بازاریابی اتفاق بیافتد برای خریداران بذر غیرتراریخته در آزمونی که به همین نام موسوم است (آزمون حضور نابجا[4]) ارزیابی می‌گردد. این آزمون روی دیگر سکه آزمون خلوص پارت‌های بذری تراریخته است که در آن حضور صفت تراریختگی در درصد بالایی از بذرها ارزیابی می‌گردد (شکل ۱). در سال ۲۰۱۵ روش کار این دو آزمون به مجموعه قوانین انجمن بین‌المللی آزمون بذر [5](ISTA) اضافه گردید. در این نوشتار روش انجام آزمون حضور نابجای بذر تراریخته در پارت‌های بذری غیرتراریخته معرفی و شرح داده شده و در نوشتار بعدی به روش‌های ارزیابی خلوص ژنتیکی پارت‌های بذری تراریخته اشاره می‌گردد.

مفهوم رخداد

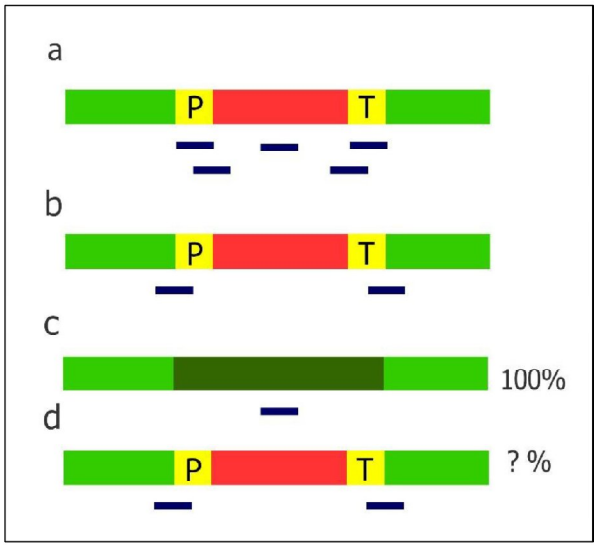
اصطلاح رخداد[6] در مهندسی ژنتیک اشاره به تصادفی بودن فرآیند انتقال ژن دارد. بنابراین، هر رخداد بیانگر ادغام یک ژن خارجی به یک ناحیه مشخص در کروموزوم گیاه می‌باشد. رخدادها معمولاً با یک نام تجاری معرفی می‌گردند. به عنوان مثال رخداد MON757 که توسط شرکت مونسانتو تولید گردیده است، حاوی ژن منتقل شده cry1AC (که با بیان پروتئین Bt موجب مقاومت گیاه به آفات می‌شود) می‌باشد. این ژن همچنین در رخدادهای MON1076 و MON531 که همگی با علامت تجاری پنبه Bollgard™ وارد بازار شده‌اند نیز وجود دارد؛ اگرچه جایگاه ژنومی ژن انتقال یافته در این سه رخداد یکسان نمی‌باشد.



شکل ۱- مقایسه آزمون حضور نابجای بذر تراریخته در پارت‌های بذری غیرتراریخته (a) و آزمون خلوص ژنتیکی پارت‌های بذری تراریخته (b) که در واقع دو روی یک سکّه می باشند. در آزمون اول (حضور نابجای بذر تراریخته) هر دو خطای نوع اول از طریق رد یک پارت بذر خالص (c) و خطای نوع دوم با پذیرفتن یک پارت بذر ناخالص (d) می‌توانند رخ دهند که کنترل آنها توسط آزمون کننده از اهمیت بالایی برخوردار است.

با وجود روش‌های مبتنی بر پروتئین (نظیر الایزا[7] ELISA) یا زیست‌سنجی[8] (برای ارزیابی مقاوم به آفت یا علف‌کش)، امروزه شناسایی رخدادها از طریق PCR کاربرد بسیار فراتری دارد. در این روش با وجود اینکه آغازگرها می‌توانند از روی نواحی پروموتر، ژن انتقال یافته، ترمیناتور یا نواحی بین آنها طراحی گردند؛ شناسایی اختصاصی هر رخداد با آغازگرهای اختصاصی که از محل ادغام ژن منتقل شده در ژنوم میزبان طراحی می‌گردند ارجحیت دارد (شکل ۲)؛ چرا که مجوز مصرف (انسان یا دام) یا کشت محصولات تراریخته به رخداد (و نه به ژن انتقال یافته) داده می‌شود و همانطور که مثال زده شد یک ژن مشابه می‌تواند در چند رخداد وجود داشته باشد. با تجمیع دو یا چند رخداد که به منظور بهبود کارایی مقاومت و عملکرد گیاه صورت می‌گیرد، شناسایی رخدادهای مجتمع[9] در یک گیاه فقط با آغازگرهای اختصاصی هر رخداد امکان پذیر می‌باشد. چرا که مثلاً ارزیابی همزمان صفات مقاومت به کرم ریشه و علف‌کش‌های گلایفوسیت و گلوفوسینات در رخداد مجتمع ذرت 59122 × NK603 (با علامت تجاری Herculex™ RW Roundup Ready™ 2)عملاً از طریق روش‌های مبتنی بر پروتئین یا زیست‌سنجی غیر ممکن یا بسیار سخت است.

با افزایش روند تجاری‌سازی گیاهان تراریخته، گروه کاری HROB سازمان توسعه تجارت و همکاری‌های اقتصادی[10] راهنمایی برای شناسایی منحصر به فرد گیاهان تراریخته تدوین کرد که اولین نسخه آن در سال ۲۰۰۲ منتشر شد. در این مکانیسم، در عین حال که هر شرکت می‌تواند نام‌گذاری خود را داشته باشد، هر رخداد با یک کد ۹ کاراکتری (رقم و حروف) از دیگر رخدادها متمایز می‌گردد. همچنین این کد به عنوان یک دیسکریپتور یکسان برای شناسایی محصولات تراریخته عمل نموده که ممکن است در کشورهای مختلف با علایم تجاری[11] متفاوت عرضه شده باشند. این گروه کاری در سال ۲۰۰۶ نسخه جدیدی از راهنمای خود را منتشر کرد که در آن به نحوه کدگذاری رخدادهای مجتمع اشاره می‌کند.



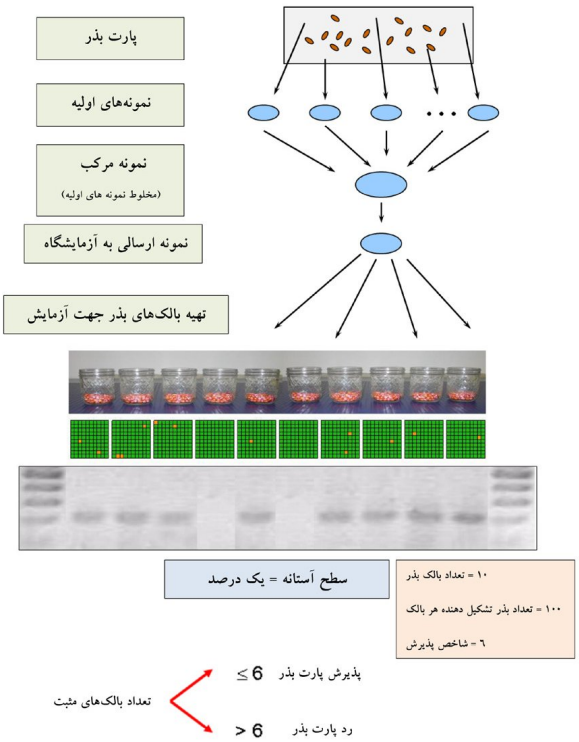
شکل ۲- تکثیر ژن منتقل شده توسط آغازگرهایی (نوارهای آبی) که می‌توانند از روی نواحی پروموتر (P)، ژن (ناحیه قرمز)، ترمیناتور (T) یا نواحی بین آنها طراحی گردند (a). شناسایی اختصاصی هر رخداد با آغازگرهایی امکان پذیر می‌گردد که از محل ادغام ژن منتقل شده و ژنوم میزبان (ناحیه سبز) طراحی می‌شوند (b). تعیین میزان کمّی تراریخته در پارت بذر با اندازه گیری نسبت بین توالی اختصاصی گیاه (c) و رخداد (d) میسّر می‌گردد.

روش انجام آزمون

آزمون حضور نابجا به یکی از دو روش کمّی یا کیفی بر روی نمونه‌ای صورت می‌پذیرد که بر اساس اصول صحیح نمونه‌برداری از پارت بذری تهیه گردیده است و به آزمایشگاه ارسال می‌گردد (شکل ۳). در روش کمّی درصد بذر تراریخته در پارت بذر با اندازه‌گیری نسبت بین توالی اختصاصی گیاه و رخداد صورت می‌گیرد (شکل ۲). بدین منظور میزان معینی از بذر (مثلا ۲۰۰ گرم بذر ذرت) آسیاب شده و آرد حاصل به چند ریزنمونه (جهت تعیین واریانس نمونه) تقسیم تا DNA آن استخراج گردد. از مواد مرجع معتبر[12] (CRM) موجود در بازار برای کالیبراسیون یا کنترل کیفیت در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمّی[13] (qPCR) استفاده می‌گردد. این مواد حاوی مقدار معینی (مثلا ۰/۵ درصد) از آرد بذر یک رخداد تایید شده در آرد بذر غیرتراریخته می‌باشند.

در روش کیفی که مبتنی بر حضور یا عدم حضور تراریخته می‌باشد، نمونه ارسالی به آزمایشگاه پیش از آسیاب شدن، شمرده شده و به چند بالک تقسیم می‌گردد تا استخراج DNA از بالک‌های بذری تهیه گردد. به عنوان مثال، تعداد ۲۰۰۰ بذر به ۲۰ بالک ۱۰۰ بذری تقسیم می‌گردند.

در این روش که نیازی به دستگاه Real-time PCR نمی‌باشد، بالک‌های بذر مثبت (حاوی صفت تراریخته) شمارش و با شاخص پذیرش[14] یا نقطه برش[15] از پیش تعیین شده (مثلاً شش بالک مثبت) مطابقت داده می‌شود که در صورت تجاوز از آن، پارت بذری رد شود. در این خصوص با درصد احتمال مشخصی (مثلاً ۹۵ درصد) می‌توان گفت که پارت بذر از خلوص (مثلاً ۹۹ درصد با در نظر گرفتن حد آستانه ناخالصی یک درصد) برخوردار می باشد (شکل ۳). همچنین این روش را می‌توان نیمه کمّی محسوب نمود، چرا که میزان درصد بذر تراریخته در پارت بذر پس از شمارش بالک‌های مثبت (حاوی صفت تراریخته) توسط فرمول مشخصی تخمین زده می‌شود.



شکل ۳- آزمون حضور نابجای بذر تراریخته در پارت‌های بذری غیرتراریخته به روش نیمه کمّی. در این روش نمونه ارسالی به آزمایشگاه به بالک‌هایی تقسیم می‌گردد. پس از استخراج DNA و الکتروفورز محصولات PCR، تعداد بالک‌های مثبت شمرده و با شاخص پذیرش از پیش تعیین شده مقایسه می‌گردند. در این مثال، در صورتیکه تعداد بالک‌های مثبت شش عدد یا کمتر باشد می‌توان پذیرفت که پارت بذر از خلوص ۹۹ درصد (آستانه) برخوردار است. (شکل از Laffont *et al.* ۲۰۰۵)

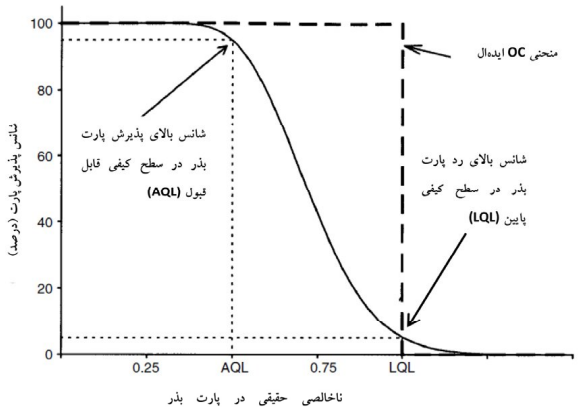
طراحی پلان آزمون

تصمیم‌گیری در خصوص رد یا پذیرش پارت بذری کاملاً به نتایج به‌دست آمده از ارزیابی صفت (یا صفات) تراریخته در نمونه بذری بستگی دارد. حتی در شرایط ایده‌ال، همیشه خطای عدم پذیرش پارت‌های به اندازه کافی خالص (خطای نوع اول) و خطای پذیرش پارت‌های بذر ناخالص (خطای نوع دوم) وجود دارد (شکل ۱). تنها راه اجتناب از این دو خطا، آزمایش تمامی بذرها در پارت بذر با یک روش غیر تخریبی و بدون عیب می‌باشد که عملاً امکان پذیر نمی‌باشد. از آنجا که حذف این دو خطا نیز امکان پذیر نمی‌باشد، پایین نگه داشتن احتمال وقوع خطا از طریق انتخاب یک روش نمونه‌برداری و پلان آزمون مناسب در هر دو روش کمّی و نیمه کمّی اهمیت زیادی دارد.

عوامل متعددی نظیر پایین‌ترین سطح کیفیت[16] (LQL)، سطح کیفیت قابل قبول[17] (AQL)، خطای تولید کننده یا خطای نوع اول (α) و خطای مصرف کننده یا خطای نوع دوم (β) موجب عدم قطعیت نتیجه آزمون گردند. بنا به تعریف، LQL پایین‌ترین سطح خلوص در پارت بذر بوده که برای مصرف کننده قابل قبول می‌باشد. در صورت پذیرفتن پارت بذر می‌توان با درصد بالایی از اعتماد اعلام نمود که پارت بذر از خلوص مساوی یا بالاتر از LQL برخوردار می‌باشد. به این محدوده، آستانه خلوص (یا ناخالصی) نیز گفته می‌شود. پایین‌ترین سطح خلوص در پارت بذر که شرکت‌های تولید بذر می‌توانند به آن دست یابند را AQL می‌نامند. در عمل، مقادیر مناسب LQL و AQL همواره مشخص نمی‌باشند. در حالت مطلوب، مصرف کننده ممکن است خلوص کامل را ترجیح دهد (یعنی LQL=AQL=۱۰۰٪)، هدفی که عموماً با توجه به محدودیت های عملی دست نیافتنی است. در عوض، LQL (حد آستانه) باید در بالاترین‌ترین سطح ناخالصی که مصرف کننده آن را می‌پذیرد، توسط مراجع قانون‌گذاری در نظر گرفته شود (مثلا آستانه ۰/۹ درصد که توسط اتحادیه اروپا برای رخدادهای مجاز اعلام گردیده است). در این خصوص، AQL باید در سطحی تنظیم گردد که شرکت‌های تولید بتوانند از آن تبعیت نموده یا ممکن است بر پایه سطوح ناخالصی تخمین زده شده در پارت های بذر پیشین بنا نهاده شود.

در یک پلان آزمون مناسب از نظر هر دو خطای نوع اول یا تولید کننده (احتمال رد یک پارت بذر خالص) و نوع دوم یا مصرف کننده (احتمال پذیرش یک پارت بذر ناخالص)، سطح خلوص AQL باید بزرگتر از سطح خلوص LQL در نظر گرفته شود؛ در غیر این صورت تولید بذری که به اندازه کافی خالص بوده تا انتظارات مصرف کننده را بر آورده نماید، مشکل می‌باشد. ابزار گرافیکی مورد استفاده در ارزیابی پلان‌های آزمون با شاخص‌های در نظر گرفته شده، منحنی OC[18] نامیده می‌شود؛ که در آن ناخالصی واقعی در یک پارت بذر در محور افقی و احتمال پذیرفتن پارت بذر در محور عمودی رسم می‌گردد. احتمال اینکه یک پلان آزمون پیشنهادی منجر به پذیرش یک پارت بذر در هر سطح مشخص از ناخالصی گردد، با یک منحنی به نمایش گذاشته می‌شود (شکل ۴).

طراحی یک پلان آزمون مطلوب که در آن با در نظر گرفتن سطوح LQL (آستانه) و AQL ، هر دو خطای مصرف کننده و تولید کننده به حداقل برسد، به عوامل مهم دیگری نظیر خطای آزمایشگاهی نیز بستگی دارد. در این خصوص روش‌های کیفی آزمایشگاهی می‌توانند از خطای کاذب- منفی[19] (عدم تشخیص صفت تراریخته در بذر یا بالک بذر در حالیکه در حقیقت تراریخته می‌باشد) و کاذب- مثبت[20] (تشخیص صفت تراریخته در بذر یا بالک بذر در حالیکه در حقیقت غیر تراریخته می‌باشد) برخوردار باشند. پایین بودن این دو خطا (به



شکل ۴- مثالی از منحنی CO یک پلان آزمون که در آن هر دو خطای مصرف کننده و تولید کننده پایین (پنج درصد) می‌باشد. منحنی CO ایده‌ال (خط چین)، که تنها در صورت آزمون تمامی پارت بذر بدست می‌آید، نیز در مقایسه با منحنی پیشنهادی (خط ممتد) نشان داده شده است. در منحنی ایده‌ال، شانس رد پارت بذری با ناخالصی حقیقی کمتر از LQL صفر درصد و شانس رد پارت بذری با ناخالصی حقیقی بیشتر از LQL ۱۰۰ درصد می‌باشد. (شکل از Remund *et al* . ۲۰۰۱)

عنوان مثال یک درصد) از آنجا که در محاسبه خطای مصرف کننده و تولید کننده مشارکت دارند، نیز از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد.

وضعیت فعلی در ایران

مطابق مقررات ۲۰۰۳/۱۸۲۹ اتحادیه اروپا، آستانه مورد پذیرش حضور بذر تراریخته در پارت های بذر غیرتراریخته، ۰/۹ درصد می باشد. از این رو نصب برچسب بر روی کیسه بذری که حاوی بیش از این مقدار باشد الزامی است. با وجود اینکه این آستانه برای رخدادهای دارای مجوز اعمال می‌گردد، آستانه اختیاری ۰/۵ درصد برای رخدادهای بدون مجوز در سال ۲۰۰۷ منقضی گردید و در حال حاضر در هیچ سطحی (صفر) نمی‌توانند در پارت‌های بذری حضور داشته باشند. در ایران، حد آستانه برای رخدادهای دارای مجوز در پیوست یک دستورالعمل آیین‌نامه اجرایی موضوع بند ب ماده ۷ قانون ایمنی زیستی که طی اطلاعیه ۹۳/۳/۱۲ وزارت جهاد کشاورزی اعلام گردید، ۲ درصد و برای رخدادهای بدون مجوز صفر در نظر گرفته شده است.

در مقررات صادرات و واردات ۱۳۹۵، ورود موجودات زنده تغییر یافته ژنتیکی و محصولات تراریخته به رعایت مفاد قانون ملی ایمنی زیستی (مصوب ۱۳۸۸) با کسب مجوز قبلی از وزارت جهاد کشاورزی ملزم گردیده است. از آنجا که نام و مشخصات هیچ رقم تراریخته‌ای در "فهرست ملی ارقام گیاهی ایران" که مشتمل بر ارقام دارای مجوز و عرضه تجاری رقم می‌باشد (آیین نامه معرفی ارقام گیاهی مصوب ۱۳۹۳)، درج نگردیده است؛ بذر محصولات تراریخته به طور رسمی جهت کشت وارد کشور نشده است.

تاکنون، اطمینان از غیرتراریخته بودن بذر وارداتی صرفاً از طریق اخذ گواهی Non-GMO صادر شده توسط تولید کننده حاصل شده و هیچ گونه ارزیابی فنی و آزمون آزمایشگاهی بر روی بذر انجام نپذیرفته است. در صورتی که مقرر باشد "مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال" به صورت تصادفی بذر محصولات مهم تراریخته (نظیر ذرت، کلزا و سویا) که توسط شرکت‌های مطرح تولید کننده بذر تراریخته (نظیر Monsanto ، Syngenta و Bayer CropScience) وارد کشور می‌گردد را آزمون نماید، در این خصوص، آستانه دو درصد در آزمون حضور نابجا (که در این نوشتار معرفی گردید) برای اطمینان از غیرتراریخته بودن پارت‌های بذری غیرتراریخته را می‌توان درنظر گرفت.

پی نوشت

1- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)
2-Transgenic
3- EC Regulation No. 1829/2003
4- Adventitious Presence (AP) Testing
5-International Seed Testing Association (ISTA)
6-Event
7- ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay
8-Bioassay
9-Stacked events
10-OECD›s Working Group on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology
11- Trade names
12-Certified Reference Materials
13-Quantitative Polymerase Chain Reaction
14-Acceptance criterion
15-Cut-off point (c)
16-Lower quality limit (LQL)
17-Acceptance quality level (AQL)
18-Operating Characteristic
19-False-negative error
20-False-positive error

منابع

- Remund KM, et al. 2001. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. Seed Science Research, 11(2), 101-120.
- Laffont JL, et al. 2005. Testing for adventitious presence of transgenic material in conventional seed or grain lots using quantitative laboratory methods: statistical procedures and their implementation. Seed Science Research, 15(3), 197-204.
- Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. (Available at http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32003R1829)
- ISTA rules. 2018. Chapter 19: Testing for seeds of genetically modified organisms
- OECD .2006. Guidance for the designation of a unique identifier for transgenic plants