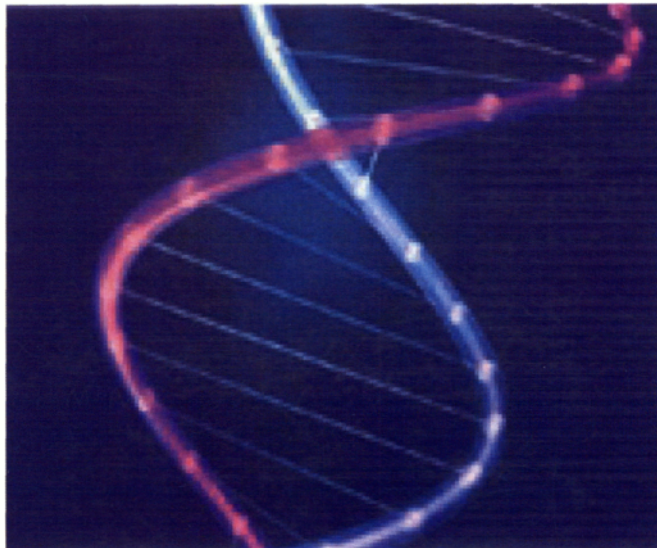




Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ-Σ.Τ.Ε.Γ.: ΤΜΗΜΑ ΤΕ.ΓΕ.Π.

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ
ΑΠΟ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΣΟΓΙΑ
ΣΕ ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ**



ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ: ΡΑΧΙΩΤΗ ΑΣΗΜΙΝΑ (Α.Μ.: 2001114)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: κ. ΒΑΡΖΑΚΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

Θερμές ευχαριστίες προς τον Δρ. Επίκουρο Καθηγητή Επεξεργασίας Φυτικών Προϊόντων Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας κ. Θεόδωρο Βαρζάκα για την καθοδήγηση, το συντονισμό και την ουσιαστική βοήθειά του για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικής Έρευνας (Λυκόβρυση) κ. Κλεάνθη Ισραηλίδη, ο οποίος επέτρεψε την διεξαγωγή της έρευνας και διέθεσε τους χώρους και τον απαραίτητο εξοπλισμό και τον κ. Δημήτρη Αργυρόπουλο για τις μεθοδολογικές υποδείξεις του κατά την εκτέλεση του πειράματος.

Ευχαριστώ το διδακτικό και διοικητικό προσωπικό του τμήματος ΤΕ.ΓΕ.Π. για τη σημαντική συνεισφορά τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος θα ήθελα να αναφέρω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου και στην αδελφή μου καθώς επίσης στο Νίκο και στο Σπύρο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | 3 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 5 |
| ABSTRACT | 5 |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ..... | 6 |
| ΜΕΡΟΣ 1 | 8 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ..... | 8 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΗ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ..... | 9 |
| 1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή της Γενετικής Μηχανικής και της Βιοτεχνολογίας..... | 9 |
| 1.2 Σημαντικότερες ιστορικές στιγμές για τη βιοτεχνολογία..... | 9 |
| 1.3 Ορισμοί..... | 11 |
| 1.3.1 Γενετική Μηχανική..... | 11 |
| 1.3.2 Βιοτεχνολογία..... | 12 |
| 1.3.3 Γενετικώς Τροποποιημένος Οργανισμός (ΓΤΟ)..... | 13 |
| 1.3.4 Γενετικά τροποποιημένα συστατικά..... | 13 |
| 1.3.5 Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα..... | 13 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ..... | 14 |
| 2.1 Νιτρογενάση..... | 14 |
| 2.2 Η συμβιωτική δέσμευση του αζώτου..... | 15 |
| 2.3 Ελεύθεροι μικροοργανισμοί που δεσμεύουν το άζωτο..... | 18 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ..... | 19 |
| 3.1 Μετασχηματισμός (Transformation)..... | 19 |
| 3.2 Σύζευξη (Conjugation)..... | 20 |
| 3.3 Μεταγωγή (Transduction)..... | 22 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ..... | 24 |
| 4.1 Ιστορική αναδρομή..... | 24 |
| 4.2 Παραδείγματα φυτών που παρήχθησαν από μεταλλάξεις και από γενετική τροποποίηση..... | 26 |
| 4.3 Γενετική τροποποίηση (Genetic Modification)..... | 26 |
| 4.4 Μέθοδοι γενετικής τροποποίησης..... | 29 |
| 4.4.1 Η μέθοδος του Αγροβακτηρίου..... | 31 |
| 4.4.2 Ηλεκτροπόρωση..... | 33 |
| 4.4.3 Βομβαρδισμός σωματιδίων..... | 34 |
| 4.4.4 Χημική και μηχανική μεταφορά γονιδίων..... | 35 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ..... | 37 |
| 5.1 Ανίχνευση DNA ή πρωτεϊνών..... | 37 |
| 5.2 Απομόνωση DNA από τα δείγματα..... | 38 |
| 5.3 Επιλογή DNA αλληλουχιών-στόχων για PCR..... | 39 |
| 5.4 Δοκιμασίες Ελέγχου της PCR..... | 40 |
| 5.5 Η Μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)..... | 41 |
| 5.5.1 Τα Στάδια της PCR..... | 41 |
| 5.5.2 Τα αποτελέσματα της PCR..... | 44 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ ΜΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ..... | 46 |
| 6.1 Δημιουργία φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα..... | 46 |
| 6.1.1 Ανθεκτικότητα στο Glyphosate..... | 47 |
| 6.2 Οφέλη και επιπτώσεις από τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα..... | 48 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ..... | 54 |
| 7.1 Απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στο φυσικό περιβάλλον..... | 54 |
| 7.2 Τι προβλέπει η Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και η Ελληνική Νομοθεσία για τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα..... | 56 |
| 7.2.1 Κανονισμοί..... | 56 |
| 7.2.3. Οδηγία..... | 60 |

| | |
|---|-----|
| ΜΕΡΟΣ II | 62 |
| ΕΡΕΥΝΑ - ΠΕΙΡΑΜΑ | 62 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 63 |
| 1.1 Βασική υποδομή εργαστηρίου..... | 63 |
| 1.1.1 Όργανα..... | 63 |
| 1.1.2 Ειδικά διαμορφωμένοι χώροι | 65 |
| 1.1.3 Μητρικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα | 65 |
| 1.2 Διαδικασία απομόνωσης βακτηρίων <i>Rhizobium</i> από τα φυμάτια τριφυλλιού..... | 67 |
| 1.2.1 Προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας και απομόνωση μικροοργανισμών με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων..... | 69 |
| 1.2.2 Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού..... | 70 |
| 1.2.3 Μικροσκοπική παρατήρηση-χρώση Gram..... | 70 |
| 1.3 Προσδιορισμό της συγκέντρωσης της βιομάζας | 71 |
| 1.3.1 Ως ξηρή βιομάζα..... | 71 |
| 1.3.2 Εκτίμηση της πυκνότητας της θολομετρικά..... | 72 |
| 1.4 Συνθήκες αποθήκευσης των προς ανάλυση δειγμάτων..... | 72 |
| 1.5 Έλεγχος μεταφοράς DNA από ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο 2,5% w/w σε κύτταρα <i>Rhizobium</i> | 73 |
| 1.5.1 Καλλιέργεια <i>Rhizobium</i> σε υπόστρωμα με 2,5% (w/w) ΓΤ σογιάλευρο..... | 73 |
| 1.5.2 Απομόνωση γονιδιακού DNA | 75 |
| 1.5.2.1 Με κολώνες | 75 |
| 1.5.2.2 Με ρητίνη | 77 |
| 1.5.2.3 Μέθοδος λύσης με βρασμό..... | 78 |
| 1.5.2.4 Μέθοδος CTAB..... | 79 |
| 1.5.3 Φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός του DNA..... | 80 |
| 1.5.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) | 81 |
| 1.5.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή..... | 83 |
| 1.6 Έλεγχος εισαγωγής DNA από ΓΤ σογιάλευρο σε κύτταρα <i>Rhizobium</i> αν αυξήσουμε τη συγκέντρωσή του..... | 86 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 87 |
| 2.1 Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου | 87 |
| 2.2 Ταυτοποίηση Βακτηρίων <i>Rhizobium</i> | 87 |
| 2.3 Διαδοχή των χαρακτηριστικών φάσεων του κύκλου αύξησης των <i>Rhizobium</i> σε κλειστές καλλιέργειες..... | 88 |
| 2.4 Εκτίμηση μεταφοράς DNA από ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο 2,5% (w/w) σε κύτταρα <i>Rhizobium</i> | 92 |
| 2.4.1 Μετά από επώαση 2 ημερών | 92 |
| 2.4.2 Μετά από επώαση 15 ημερών | 95 |
| 2.5 Εκτίμηση μεταφοράς DNA από ΓΤ σογιάλευρο σε κύτταρα <i>Rhizobium</i> αν αυξήσουμε τη συγκέντρωσή του..... | 97 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 98 |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ..... | 101 |
| ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 102 |
| ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 103 |
| ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ..... | 107 |
| ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΤΥΠΟΣ..... | 107 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελείται από δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τη συμβίωση ανάμεσα στα βακτήρια του γένους *Rhizobium* και των ριζών των ψυχανθών, για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων, τις κυριότερες μεθόδους γενετικής τροποποίησης, τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), τις επιπτώσεις από τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα καθώς και τη νομοθεσία για τους ΓΤΟ που καλύπτεται κυρίως από τους κανονισμούς 1829/2003 και 1830/2003.

Στο δεύτερο μέρος αναλύονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος, τα αποτελέσματα καθώς και ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος εισαγωγής, λήψης και έκφρασης εξωκυτταρικού DNA από γενετικά τροποποιημένη σόγια σε βακτηριακά κύτταρα *Rhizobium*.

ABSTRACT

The current project consists of 2 parts. In the first part there is information pertinent to the cohabitation among the bacteria of the *Rhizobium* gene and the rest of sprouts, the horizontal transfer of genes, the most important methods concerning genetic modification, the method of Polymerase Chain Reaction (PCR), the effects derived from the creation of genetically modified plants resistant to pesticides as well as the GMOs legislation which is predominantly covered by the 1829/2003 and 1830/2003 regulations.

In the second part there is exhaustive analysis concerning the methods applied for the conduct of the experiment, its results and comments on the results.

The purpose of this current research is the monitoring of the introduction uptake and expression of extra cellular DNA from genetically modified soya on *Rhizobium* bacteria cells.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αν ο 20ός αιώνας χαρακτηρίστηκε από τη θεαματική πρόοδο της επιστήμης στους τομείς της φυσικής και της χημείας, τότε σίγουρα ο 21ος ανήκει στις βιολογικές επιστήμες. Επιστήμονες σε όλο τον κόσμο αποκωδικοποιούν ταχύτατα τον γενετικό κώδικα της ζωής, ξεδιαλώνοντας μυστήρια αιώνια σχετικά με τη βιολογική εξέλιξη στη Γη. Τα γονίδια είναι η πρώτη πρόσοδος της νέας οικονομικής εποχής και ήδη χρησιμοποιούνται σε ευρύτατα επιχειρησιακά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της γεωργίας, της κτηνοτροφίας, της ενέργειας, των ινών και υλικών συσκευασίας, των φαρμάκων και αλλού. Στην ουσία ο κόσμος μας μετατρέπεται σε βιολογικό-βιομηχανικό (Rifkin, 1998).

Δύο ευρείες προσεγγίσεις του βιοτεχνολογικού αιώνα έχουν αρχίσει να αναδύονται και η καθεμία βασίζεται σε εντελώς διαφορετικό πλέγμα αξιών. Η μία χρησιμοποιεί τα σύγχρονα επιτεύγματα της γενετικής επιστήμης για να φέρει ριζικές αλλαγές στα γενετικά χαρακτηριστικά των διαφόρων ειδών τα οποία θέλει να αλλάξει στο όνομα της προόδου. Η άλλη χρησιμοποιεί τα ίδια επιτεύγματα της γενετικής επιστήμης όχι για να αλλάξει τα είδη, αλλά για να βελτιώσει τις σχέσεις των υπάρχοντων ειδών με το περιβάλλον στο οποίο ζει το καθένα (Rifkin, 1998).

Η βιοτεχνολογία στηρίζεται κυρίως σε τεχνικές καλλιέργειας και ανάπτυξης των μικροοργανισμών και σε τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές καθώς χαρακτηρίζονται από ταχύτατο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μπορούν να αναπτυχθούν σε ποικιλία θρεπτικών υποστρωμάτων. Σε κατάλληλες συνθήκες διαφορετικές καλλιέργειες μικροοργανισμών μπορούν να παράγουν σημαντικές ποσότητες μεγάλης ποικιλίας επιθυμητών προϊόντων. Η απομόνωση των παραπάνω προϊόντων είναι σχετικά εύκολη καθώς η πλειονηφία τους παράγεται εξωκυτταρικά, εκκρίνεται δηλαδή στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας (www.kpe-kastor.kas.sch.gr/istoselida-biodiversity/b/biotechnology.htm).

Με την τεχνική της Γενετικής Μηχανικής μεταφέρονται τμήματα DNA ενός κυττάρου, που ρυθμίζουν ορισμένους επιθυμητούς χαρακτήρες, σε ένα άλλο κύτταρο, όπου ενσωματώνονται στο γενετικό του υλικό. Έτσι παράγεται ένα καινούργιο τεχνητό μόριο, το ανασυνδυασμένο DNA. Οι τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση γονιδίων -παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός γονιδίου-

στη γενετική τροποποίηση των οργανισμών και γενικά για την ανάπτυξη ποικίλων τεχνικών της μοριακής βιολογίας (www.kpe-kastor.kas.sch.gr/istoselida-biodiversity/h/biotechnology.htm).

ΜΕΡΟΣ Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΗ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

1.1 Σύντομη ιστορική αναδρομή της Γενετικής Μηχανικής και της Βιοτεχνολογίας

Η εφαρμογή της γενετικής στη γεωργία μέχρι το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, είχε συμβάλλει στην ουσιαστική αύξηση της παραγωγής πολλών καλλιεργειών. Αυτό είναι περισσότερο αξιοσημείωτο στις υβριδικές ποικιλίες καλαμποκιού και σόργου. Την ίδια στιγμή, η διασταύρωση διαφορετικών ποικιλιών οδήγησε σε περισσότερο παραγωγικές ποικιλίες σιταριού και ρυζιού. Οι τεχνικές, γνωστές ως τεχνητή επιλογή ή επιλεκτική αναπαραγωγή, αποτελούν μέρος της γενετικής μηχανικής.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους βελτιωτές φυτών έχει η ανάπτυξη των τεχνικών για την εκούσια μεταβολή των λειτουργιών των γονιδίων, με τον χειρισμό του ανασυνδυσμένου DNA. Αυτό βοήθησε τους ερευνητές να επικεντρωθούν στη δημιουργία φυτών με ιδιαίτερες ιδιότητες (όπως η ικανότητα να χρησιμοποιούν το ατμοσφαιρικό άζωτο ή να αντέχουν στις ασθένειες) τις οποίες δεν έχουν από τη φύση τους.

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμού του DNA χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά εμπορικά για την παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης από βακτήρια. Η ινσουλίνη παράγεται κανονικά από το πάγκρεας. Το πάγκρεας των σφαγμένων ζώων όπως του χοίρου ή του προβάτου χρησιμοποιούνταν ως πηγή ινσουλίνης.

Για την εξασφάλιση αξιόπιστης πηγής ανθρώπινης ινσουλίνης, οι ερευνητές λαμβάνουν από το DNA των ανθρώπινων κυττάρων το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία ανθρώπινης ινσουλίνης. Έφτιαξαν έτσι ένα αντίγραφο του DNA μεταφέροντας το γονίδιο της ινσουλίνης και το τοποθέτησαν σε ένα βακτήριο.

Το 1982, η γενετικά τροποποιημένη ινσουλίνη εγκρίθηκε για χρήση στους διαβητικούς.

1.2 Σημαντικότερες ιστορικές στιγμές για τη βιοτεχνολογία

Η λέξη «Βιοτεχνολογία» προσδιορίζεται το 1917, όπου συνηθιζόταν να αναφέρεται σε μια παραγωγή μεγάλης κλίμακας υλικών από μικρόβια που αναπτύσσονταν σε δεξαμενές. Όμως οι ρίζες της τεχνολογίας είναι τόσο οικείες και αρχαίες όπως το ψήσιμο και το ζύμωμα του ψωμιού και βρίσκονται 6000 χρόνια πριν.

π.Χ. ΕΤΗ**ΕΠΙΤΕΥΓΜΑ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

- 4000π.Χ. Κλασσική βιοτεχνολογία. Τα γαλακτοκομεία αναπτύσσονται στη Μέση Ανατολή. Οι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούν ζυμομύκητες για να ψήνουν ψωμί με προζύμι και να φτιάχνουν κρασί.
- 3000π.Χ. Οι Περουβιανοί συλλέγουν και καλλιεργούν πατάτες.
- 2000π.Χ. Οι Αιγύπτιοι, οι Σουμέριοι και οι Κινέζοι εφευρίσκουν τεχνικές ζύμωσης, ζυθοποίησης και κατασκευής τυριού.
- 1500π.Χ. Παρασκευή τυριού και γιαουρτιού, που είναι δύο παραδείγματα χρησιμοποίησης ευεργετικών βακτηρίων στη γεύση και στη διατήρηση τροφίμων. Οι Αζτέκοι φτιάχνουν κέικ από φύκη *Spirulina*.
- 500π.Χ. Οι Μεσογειακοί λαοί εφευρίσκουν το μαρινάρισμα και οι Ευρωπαίοι εφευρίσκουν την αλάτωση για τη διατήρηση τροφίμων.

18^ο ΑΙΩΝΑΣ μ.Χ.**ΕΠΙΤΕΥΓΜΑ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

- 1859 Η θεωρία για την εξέλιξη «Στην αρχή των ειδών» του Άγγλου φυσιοδίφη Charles Darwin δημοσιεύεται στο Λονδίνο.
- 1861 Ο Γάλλος χημικός Louis Pasteur εφευρίσκει την παστερίωση, κατά την οποία τα τρόφιμα διατηρούνται θερμαίνοντάς τα, έτσι ώστε να καταστραφούν τα βλαβερά μικρόβια.
- 1865 Ο Αυστριακός βοτανολόγος και μοναχός Gregor Mendel περιγράφει τα πειράματα του για την κληρονομικότητα, ανακαλύπτοντας το πεδίο της γενετικής.
- 1879 Ο William James Beal δημιουργεί το πρώτο πειραματικό υβρίδιο καλαμποκιού.

19^ο ΑΙΩΝΑΣ μ.Χ.**ΕΠΙΤΕΥΓΜΑ ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

- 1910 Ο Αμερικανός βιολόγος Thomas Hunt Morgan ανακαλύπτει ότι τα γονίδια βρίσκονται στα χρωμοσώματα.
- 1928 Ο F. Griffith ανακαλύπτει τη γενετική μεταφορά. Τα γονίδια μπορούν να μεταφέρονται από ένα στέλεχος ενός βακτηρίου σε άλλο στέλεχος.
- 1941 Ο Δανός μικροβιολόγος A. Jost επινοεί τον όρο «γενετική μηχανική», σε μία διάλεξη για τη γενετική αναπαραγωγή των ζυμομυκήτων.
- 1943 Οι Oswald Avery, Colin MacLead και Maclyn McCarty χρησιμοποιούν βακτήρια για να δείξουν ότι το DNA φέρει τη γενετική πληροφορία του κυττάρου.
- 1953 Ο James Watson και ο Francis Crick περιγράφουν τον διπλό έλικα του DNA, χρησιμοποιώντας πρότυπα περίθλασης ακτίνων X της Rosalind Franklin και της Maurice Wilkins.

| | |
|------------|---|
| Αρχές 1970 | Ο Paul Berg, ο Stanley Cohen και ο Herbert Boyer εφευρίσκουν τρόπους για το τεμαχισμό και τη συρραφή του DNA, κάνοντας γνωστές τις τεχνικές ανασυνδυασμού DNA. |
| 1975 | Οι επιστήμονες οργανώνουν την συνδιάσκεψη της Asilomar για να συζητήσουν τον κανονισμό των πειραμάτων του ανασυνδυασμένου DNA. Ο George Kohler και ο Cesar Milstein δείχνουν ότι τα συντηγημένα κύτταρα μπορούν να παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα. |
| 1982 | Το πρώτο γενετικά τροποποιημένο προϊόν (είναι η ανθρώπινη ινσουλίνη που την παράγουν η Eli Lilly & Company χρησιμοποιώντας το βακτήριο <i>E. coli</i>) φτιάχνεται για χρήση από τους διαβητικούς. |
| 1984 | Ο Kary Mullis ανακαλύπτει την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τη μαζική παραγωγή συγκεκριμένων τμημάτων DNA. |
| 1986 | Πρώτη απελευθέρωση ενός γενετικά τροποποιημένου φυτού (καπνός) στο περιβάλλον. |
| 1987 | Πρώτη απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων μικροβίων στον πειραματικό αγρό. |
| 1990 | Η Pfizer Inc., ανακαλύπτει την Chymax χυμοσίνη και το ένζυμο που χρησιμοποιείται στο φτιάξιμο του τυριού (το πρώτο προϊόν της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA που χρησιμοποιείται σε τροφή που προμηθεύεται στις Ηνωμένες Πολιτείες). |
| 1993 | Ύστερα από δέκα χρόνια επιστημονικής κριτικής και πολιτικής συζήτησης, η U.S. Food and Drug Administration (FDA) επιδοκιμάζει την έκθεση της Monsanto Co του rBGH/rBST να αυξήσει την παραγωγή γάλακτος. |
| 1994 | Η Calgene, Inc., εμπορεύεται τη τομάτα FLAVRSVR που είναι το πρώτο γενετικά τροποποιημένο τρόφιμο στις Ηνωμένες Πολιτείες. |
| 1996 | Αναπαραγωγή με τη μέθοδο της κλωνοποίησης (το πρόβατο Dolly). |
| 2000 | Παρουσίαση της πρώτης χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος καθώς και της παρουσίασης της αλληλουχίας των βάσεων DNA ορισμένων φυτών, όπως το φυτό <i>Arabidopsis</i> που είναι φυτό πρότυπο. |

1.3 Ορισμοί

1.3.1 Γενετική Μηχανική

Η Γενετική Μηχανική, πολύ γενικευμένα, είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μεταβολή ή τη μεταφορά γενετικού υλικού (γονιδίων) των ζώντων κυττάρων. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, κάτω από οδηγίες που προέρχονται από την Υπηρεσία Επιθεώρησης της Υγείας Ζώων και Φυτών της USDA, η Γενετική Μηχανική ορίζεται ως

η γενετική τροποποίηση των οργανισμών μέσω των τεχνικών του ανασυνδυασμού του DNA. Ενώ στην Ευρώπη οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται είναι κάπως ευρύτεροι.

Ένας άλλος ορισμός της Γενετικής Μηχανικής είναι ο εξής: Η Γενετική Μηχανική είναι η επιστήμη που αναφέρεται σε τεχνικές που είναι απαραίτητες για την άμεση μεταφορά γονιδίων από οργανισμούς δότες σε δέκτες οργανισμούς. Οι επιστήμονες της Γενετικής Μηχανικής μπορούν να μεταφέρουν γονίδια από οποιαδήποτε βιολογική πηγή ζώων, φυτών ή βακτηρίων σε οποιοδήποτε σχεδόν φυτικό είδος. Επομένως μπορούν να τροποποιούν τα γνωρίσματά τους κατά βούληση.

1.3.2 Βιοτεχνολογία

Ετυμολογικά ο όρος είναι σύνθετος (Βιο-τεχνολογία) και παραφραζόμενος υπό ευρεία έννοια περιλαμβάνει κάθε διαδικασία επεξεργασίας και χειρισμού βιολογικού υλικού για συγκεκριμένο σκοπό.

Με την ευρύτατη αυτή έννοια του όρου ένας ορισμός θα μπορούσε να είναι ο εξής:

«Βιοτεχνολογία είναι ένα σύνολο μεθόδων ή τεχνικών με την βοήθεια των οποίων επιδιώκεται η χρησιμοποίηση των ζωντανών οργανισμών (ή μέρος αυτών) για την παραγωγή ή τροποποίηση προϊόντων, τη βελτίωση φυτών ή ζώων ή την ανάπτυξη μικροοργανισμών για συγκεκριμένες χρήσεις».

Από άποψη χρονικής ανάπτυξης ή εξέλιξης διακρίνουμε:

α) Τη συμβατική ή πρόωμη βιοτεχνολογία: Αυτή περιλαμβάνει τις παραδοσιακές μορφές εκτροφής και αναπαραγωγής των ζώων, τις τεχνικές αναπαραγωγής και βελτίωσης των φυτών και τη χρησιμοποίηση ζυμομυκήτων στην αρτοποιία, ζυθοποιία, οινολογία και τυροκομία.

β) Τη σύγχρονη βιοτεχνολογία: Αυτή περιλαμβάνει τη βιομηχανική αξιοποίηση των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA, την κυτταρική σύντηξη και τις νέες τεχνικές βιοεπεξεργασίας και βιοθεραπείας (www.pi-schools.gr/sxoleia/56gymn-ath/ergasies/biotechell.htm).

Σύμφωνα με το σχέδιο του Πρωτοκόλλου για την Βιοασφάλεια (Καθαργένη, 1999), η σύγχρονη βιοτεχνολογία περιλαμβάνει την εφαρμογή:

- i. Των *in vitro* τεχνικών παρασκευής νουκλεϊκών οξέων.

- ii. Της κυτταρικής σύντηξης πέρα από την ταξινομική οικογένεια που υπερνικά τα φυσικά, φυσιολογικά αναπαραγωγικά εμπόδια ή τα εμπόδια του ανασυνδυασμού και που δεν είναι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή βελτίωση με επιλογή ή άλλες συμβατικές μεθόδους.

Η βιοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογή στον τομέα της υγείας (αντιβιοτικά, ινσουλίνη, ιντερφερόνη...), στο αγροδιατροφικό σύστημα (μικροοργανισμοί, φυτά και ζώα), και στις βιομηχανικές διαδικασίες όπως η ανακύκλωση αποβλήτων (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2001).

1.3.3 Γενετικώς Τροποποιημένος Οργανισμός (ΓΤΟ)

Σύμφωνα με την οδηγία 2001/18/ΕΚ ως γενετικώς τροποποιημένος οργανισμός (ΓΤΟ) ορίζεται ο οργανισμός εξαιρουμένων των ανθρώπινων όντων, του οποίου το γενετικό υλικό έχει τροποποιηθεί κατά τρόπο που δεν συμβαίνει φυσιολογικά με τη σύζευξη ή/και το φυσιολογικό ανασυνδυασμό (www.efet.gr/gen_food).

1.3.4 Γενετικά τροποποιημένα συστατικά

Τα τρόφιμα που προέρχονται από μια γενετικά τροποποιημένη καλλιέργεια, όπως ο αραβόσιτος, μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία, π.χ. αλεύρι όπου το γενετικά τροποποιημένο DNA υπάρχει στο επεξεργασμένο προϊόν και ανιχνεύεται (Βαρζάκας κ.ά., 2006).

Τα τρόφιμα που προέρχονται από μία γενετικά τροποποιημένη καλλιέργεια αλλά στο τελικό προϊόν δεν ανιχνεύεται DNA. Για παράδειγμα, στο σογιέλαιο λόγω της επεξεργασίας του, υπάρχει εξαιρετικά χαμηλό ποσοστό DNA με αποτέλεσμα να μη μπορεί να ταυτοποιηθεί αν προέρχεται από γενετικά τροποποιημένη ή συμβατική καλλιέργεια σόγιας (Βαρζάκας κ.ά., 2006).

1.3.5 Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα

Τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα είναι τα τρόφιμα και τα συστατικά των τροφίμων που περιέχουν ή αποτελούνται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, ή παράγονται από τέτοιους οργανισμούς (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 1999).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Από τους οργανισμούς, μόνον ορισμένοι προκαρυωτικοί έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και να ανάγουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία. Μεταξύ αυτών τα ελεύθερα ζώντα βακτήρια του γένους *Azotobacter*, *Clostridium*, *Azospirillum* και τα κυανοφύκη, όπως επίσης και τα συμβιωτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium*, *Frankia* και *Azorhizobium*. Το φαινόμενο καλείται αζωτοδέσμευση ή βιολογική δέσμευση του αζώτου και είναι μια πολύπλοκη βιοχημική διεργασία που απαιτεί, πέρα από τους απαραίτητους μοριακούς εξοπλισμούς, την παρουσία συστημάτων παροχής ηλεκτρονίων και ενέργειας. Συνολικά, για την αναγωγή ενός μορίου ατμοσφαιρικού αζώτου απαιτούνται έξι ηλεκτρόνια και τουλάχιστον 12 μόρια ATP (Διαμαντίδης, 1994).

Η αμμωνία είναι το πρώτο προϊόν της δέσμευσης του μοριακού αζώτου, η οποία αφομοιώνεται σε αμινοξέα και ακολούθως σε πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Οι πρωτεΐνες τα αμινοξέα και τα ανόργανα ιόντα αμμωνίου χρησιμοποιούνται ως πηγή αζώτου από εκείνους τους οργανισμούς που δεν είναι ικανοί να αφομοιώσουν άμεσα το ατμοσφαιρικό άζωτο (Καραγκούνη-Κύρτσου, 1999).



2.1 Νιτρογενάση

Ο υπεύθυνος ενζυμικός μηχανισμός της αζωτοδέσμευσης σε όλους τους οργανισμούς που έχουν την ικανότητα αναγωγής του N_2 ονομάζεται νιτρογενάση. Η νιτρογενάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο που αποτελείται από δύο πρωτεϊνικά μόρια, η συνεργασία των οποίων είναι απαραίτητη για την αναγωγή του μοριακού αζώτου. Το ένα πρωτεϊνικό μόριο ονομάζεται σιδηρο-μολυβδαίνιο-πρωτεΐνη σε σύντμηση Fe-Mo-πρωτεΐνη ή μολυβδαίνιο-φερρεδοξίνη, το άλλο ονομάζεται Fe-πρωτεΐνη ή αζωφερρεδοξίνη (Διαμαντίδης, 1994).

Τα υπεύθυνα γονίδια σύνθεσης της νιτρογενάσης και όλων των άλλων απαραίτητων μηχανισμών της αζωτοδέσμευσης ονομάζονται NIF-γονίδια (Nitrogen Fixation γονίδια). Τα NIF γονίδια είναι 17 και βρίσκονται συγκεντρωμένα σε ένα μεγάλο πλασμίδιο (Διαμαντίδης, 1994).

Η νιτρογενάση είναι ένα ένζυμο υπερ-ευαίσθητο στο οξυγόνο, το οποίο και προκαλεί τη μη αντιστρεπτή καταστροφή της. Έτσι όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί

οργανισμοί, είτε είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι (όπως π.χ. το βακτήριο *Clostridium*), ή διαθέτουν τους κατάλληλους μηχανισμούς προστασίας της νιτρογενάσης από το οξυγόνο. Στην περίπτωση των βακτηριοειδών, στη συμβιωτική δέσμευση στα ψυχανθή, η νιτρογενάση προστατεύεται από το οξυγόνο καθώς τα βακτηριοειδή βρίσκονται σε χώρους όπου απαντάται μια ειδική πρωτεΐνη, η λεγκαιμογλοβίνη που ελέγχει την πίεση του οξυγόνου. Η λεγκαιμογλοβίνη είναι μια αιμο-πρωτεΐνη (δηλαδή περιέχει ως προσθετική ομάδα την αίμη και συνεπώς έχει κόκκινο χρώμα), που δομικά και λειτουργικά μοιάζει με την αιμογλοβίνη και τη μυογλοβίνη των θηλαστικών (Διαμαντίδης, 1994).

2.2 Η συμβιωτική δέσμευση του αζώτου

Μολονότι τα ελεύθερα ζώντα βακτήρια συνεισφέρουν κατά πολύ στον εμπλουτισμό του εδάφους και των νερών σε άζωτο αμμωνιακής μορφής (στους ωκεανούς π.χ. τα κυανοφύκη είναι οι κύριοι οργανισμοί δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου), τα συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά συστήματα που αναπτύσσονται μεταξύ αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και άλλων οργανισμών, παρουσιάζουν ιδιαίτερο οικολογικό αλλά και οικονομικό ενδιαφέρον (Διαμαντίδης, 1994).

Ιδιαίτερο όμως γεωγραφικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό σύστημα που αναπτύσσεται μεταξύ βακτηρίων του γένους *Rhizobium* (ριζόβιο) και των ριζών των ψυχανθών φυτών. Τα ριζόβια είναι τυπικά μονοκύτταρα βακτήρια (Διαμαντίδης, 1994).

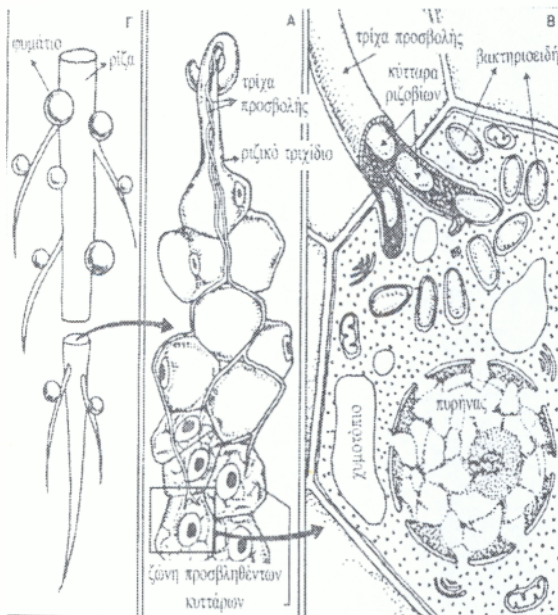
Τα βακτήρια αυτά όταν ζουν ελεύθερα στο έδαφος αδυνατούν να δεσμεύσουν το άζωτο, μολονότι περιέχουν τις απαραίτητες γενετικές πληροφορίες, είναι δηλαδή ολοκληρωτικά ετερότροφοι οργανισμοί (και ως προς το άζωτο και ως προς τον άνθρακα).

Η συμβίωση ξεκινά με την ενεργοποίηση των βακτηρίων που βρίσκονται σε μεγάλους πληθυσμούς στο άμεσο περιβάλλον της ρίζας ως συνέπεια έκκρισης ειδικών χημικών σημάτων (π.χ. ινδόλυλο-οξικό οξύ, φλαβόνες). Ένας μικρός σχετικά αριθμός ατόμων στη συνέχεια, προσβάλλουν τα άκρα των ριζικών τριχιδίων, τα οποία συστρέφονται, και εισέρχονται σε αυτά. Το στάδιο αυτό δεν διαφέρει από όλες εκείνες τις περιπτώσεις εισόδου παθογόνων μικροοργανισμών σε φυτικούς ιστούς. Πρόκειται δηλαδή για αληθινή προσβολή, η οποία στη συνέχεια εξελίσσεται σε ευεργετική

συνύπαρξη (συμβίωση), τόσο για τα βακτήρια όσο και για τον ξενιστή-φυτό (Διαμαντίδης, 1994).

Στην περίπτωση των ριζοβίων και των ψυχανθών φυτών, στα πολύ πρώιμα στάδια της συμβίωσης, φυτά και βακτήρια ανταλλάσσουν χημικά μηνύματα. Οι ρίζες των ψυχανθών εκκρίνουν χημικές ουσίες, τα φλαβονοειδή, που προσελκύουν τα ριζόβια στο περιβάλλον τους, ενώ παράλληλα προκαλούν την έκφραση ορισμένων γονιδίων τους (των γονιδίων nod). Τα δευτερογενή προϊόντα έκφρασης των γονιδίων nod των ριζοβίων (τα πρωτογενή προϊόντα είναι τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις παραγωγής των δευτερογενών προϊόντων που ονομάζονται παράγοντες Nod) συμμετέχουν με τη σειρά τους στους μηχανισμούς αναγνώρισης του κατάλληλου ξενιστή, την προσβολή των ριζικών τριχιδίων και τη δημιουργία του φυματίου (Διαμαντίδης, 1994).

Το φυμάτιο είναι ένα πλήρες διαφοροποιημένο σε διάκριτους ιστούς, νέο φυτικό όργανο των ριζών με μορφή μικρών καρκινωμάτων, που επιτρέπει την ανταλλαγή υλικών μεταξύ των ριζοβίων και του ξενιστή-φυτού. Στα κύτταρα της κεντρικής ζώνης του φυματίου εισέρχονται τα ριζόβια διαμέσου της τρίχας προσβολής. Η τρίχα προσβολής είναι ένας κυλινδρικός αγωγός που προκύπτει από τη διαφοροποίηση των τοιχωμάτων των ριζικών τριχιδίων στα σημεία συστροφής (κατσαρώματος) των άκρων τους (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Δημιουργία φυματίων. Η ανάπτυξη των φυματίων είναι αποτέλεσμα της εισόδου των *Rhizobium* ή των ακτινομοκλήτων στα μεριστωματικά κύτταρα των ριζών. Η είσοδός τους γίνεται πάντοτε από τα άκρα των ριζικών τριχιδίων, τα οποία και συσπρέφονται κατάλληλα (Α). Στα ψυχανθή μετά την είσοδο των βακτηρίων στο ριζικό τριχίδιο σχηματίζεται από τροποποιημένο κυτταρικό τοίχωμα του ριζιδίου, η τρίχα προσβολής, κάτι σαν κυλινδρικός αγωγός, μέσω της οποίας τα βακτήρια που περιβάλλονται από μια φυτική μεμβράνη, φτάνουν στα εσωτερικά κύτταρα της ρίζας. Εκεί το εκτεινόμενο άκρο της τρίχας προσβολής σπάει και ελευθερώνει τα βακτήρια στο εσωτερικό των κυττάρων, τα οποία παραμένουν εγκλωβισμένα κατ' άτομο ή κατά ομάδες στη φυτική μεμβράνη (Β). Στη συνέχεια τα βακτήρια μεταμορφώνονται σε βακτηριοειδή, και αποκτούν την ικανότητα να ανάγουν το αμοσφαιρικό άζωτο, ενώ τα φυτικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται έντονα και σχηματίζονται τα φυμάτια (Γ) (Διαμαντίδης, 1994).

Οι παράγοντες Nod συνίστανται από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ συνδεδεμένο στο ένα άκρο μικρών τμημάτων, με τέσσερις ή πέντε δομικές μονάδες, χιτίνης (η χιτίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που απαντάται στους μύκητες και στον εξωσκελετό των αρθροπόδων, με δομικές μονάδες την N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη). Στη συνέχεια στη βασική αυτή δομή, που είναι κοινή σε κάθε είδος ριζοβίου, απαντώνται διάφορα μόρια (υποκαταστάτες), η φύση των οποίων καθορίζει τη συμβατότητα μεταξύ του είδους του βακτηρίου και του ξενιστή-φυτού (κάθε είδος ριζοβίου δημιουργεί συμβιωτικό σύστημα μόνο με ορισμένο αριθμό ειδών ψυχανθών φυτών).

Στα χρωμοσώματα του ξενιστή-φυτού περιέχονται όλες οι απαραίτητες γενετικές πληροφορίες (στο σύνολό τους αναφέρονται ως συμβιωτικά γονίδια ENOD) για την κατάλληλη διαφοροποίηση των κυττάρων της ρίζας και την ανάπτυξη των φυματίων, η έκφραση των οποίων επηρεάζεται από την άφιξη των παραγόντων Nod. Στην πράξη, η προσθήκη χημικώς παρασκευασμένων παραγόντων Nod στο έδαφος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού φυματίων ανά μονάδα επιφάνειας της ρίζας και κατά συνέπεια την αύξηση της ποσότητας του αζώτου που δεσμεύεται (Διαμαντίδης, 1994).

Μέσα στα κύτταρα των φυματίων, τα κύτταρα των ριζοβίων χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους και διαφοροποιούνται μορφολογικά και βιοχημικά: καταστρέφεται το βακτηριακό τους τοίχωμα και τα κύτταρά τους περιβάλλονται μόνον από την κυτοπλασματική μεμβράνη, η μορφή τους από σφαιροειδής γίνεται επιμήκης και παράλληλα αποκτούν την ικανότητα δέσμευσης και αναγωγής του ατμοσφαιρικού αζώτου. Με άλλα λόγια μέσα στα κύτταρα των φυματίων εκφράζονται τα γονίδια NIF των ριζοβίων και παράγεται το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα των ριζοβίων ονομάζονται βακτηριοειδή και περιβάλλονται κατά ομάδες ή κατ' άτομο από ένα μεμβρανώδη σάκκο, μέσα στον οποίο παράλληλα απαντώνται και τα μόρια της λεγκ-αιμογλοβίνης.

Οι γενετικές πληροφορίες βιοσύνθεσης της λεγκ-αιμογλοβίνης βρίσκονται στο DNA των φυτών, αλλά δεν εκφράζονται απουσία των ριζοβίων. Με την παρουσία της λεγκ-αιμογλοβίνης εξασφαλίζεται χαμηλή συγκέντρωση O_2 ώστε να μην αναστέλλεται η δράση της νιτρογενάσης, ικανοποιητική όμως για να τροφοδοτούνται τα βακτηριοειδή κανονικά με το απαραίτητο για την αναπνοή τους οξυγόνο. Η ταχύτητα αναπνοής στα βακτηριοειδή είναι αρκετά μεγάλη γιατί είναι αναγκαίες μεγάλες ποσότητες ATP που καταναλώνονται στην αναγωγή του μοριακού αζώτου. Οι απαραίτητες ανθρακούχες ουσίες για την αναπνοή των βακτηριοειδών αλλά και των ριζοβίων που παραμένουν μέσα στην τρίχα προσβολής αδιαφοροποίητα, όπως επίσης και για την αφομοίωση της

αμμωνίας που παράγεται, παρέχονται από τον ξενιστή φυτό. Με τη σειρά τους τα βακτηριοειδή τροφοδοτούν τον ξενιστή και τα ριζόβια με αμινοξέα ή άλλες αζωτούχες ουσίες. Με τον τρόπο αυτό τα ψυχανθή καλύπτουν τις ανάγκες τους σε άζωτο (Διαμαντίδης, 1994).

2.3 Ελεύθεροι μικροοργανισμοί που δεσμεύουν το άζωτο

Υπάρχουν και άλλα βακτήρια που δεσμεύουν άζωτο, τα οποία ανήκουν στο γένος *Azotobacter*, ζουν ελεύθερα στο έδαφος και όχι στα φυμάτια των ριζών. Και αυτά τα βακτήρια έχουν μελετηθεί από τους επιστήμονες της γενετικής μηχανής είτε για τη βελτίωση της ικανότητάς τους να δεσμεύουν άζωτο είτε για να χρησιμοποιηθούν ως πηγή γονιδίων νιτρογενάσης για ενσωμάτωση στα φυτά (Fincham and Ravetz, 1991).

Έτσι μη συμβιωτικά βακτήρια των γενών *Azotobacter* και *Clostridium* είναι ικανά να δεσμεύσουν άζωτο. Το *Azotobacter* είναι αερόβιο και το *Clostridium* αναερόβιο και τα δύο είναι συνηθισμένα σαπροφυτικά βακτήρια εδάφους. Υπολογίζεται ότι πιθανά προσθέτουν περίπου 700 gr αζώτου ανά στρέμμα εδάφους το χρόνο. Μια άλλη σπουδαία ομάδα περιλαμβάνει πολλά φωτοσυνθετικά βακτήρια, όπως κυανοβακτήρια.

Οι διαφορές μεταξύ δέσμευσης αζώτου από ελεύθερα βακτήρια και δέσμευσης αζώτου από βακτήρια που ζουν σε συμβιωτικές σχέσεις δεν είναι πάντα ευδιάκριτες. Για παράδειγμα, τα αερόβια βακτήρια *Azotobacter* που δεσμεύουν άζωτο αναπτύσσονται συνήθως γύρω, από τις ρίζες ορισμένων αγρωστωδών, όπως του σακχαροκάλαμου (*Saccharum officinarum*), όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στον εφοδιασμό των φυτών με άζωτο. Τα αγρωστώδη (και τα άλλα φυτά) ίσως αποβάλλουν οργανικές ενώσεις που λειτουργούν ως πηγή ενέργειας γι' αυτά τα «ελεύθερα» βακτήρια. Έτσι, το αποτέλεσμα είναι μια σχέση που εγγίζει τη συμβίωση (Καραμπέτσος, 1999).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT: horizontal gene transfer) είναι η άμεση μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ κυττάρων ή οργανισμών ακολουθούμενο από την έκφραση γονιδίων. Εμφανίζεται κυρίως μεταξύ προκαρυωτικών οργανισμών. Η HGT διαφέρει από την κάθετη μεταφορά γονιδίων η οποία αποτελεί την μετάβαση των γενετικών πληροφοριών από τον γονέα στον απόγονο (Heineman, 1991).

Έτσι ο χρωμοσωμικός ανασυνδυασμός, δηλαδή η ανταλλαγή χρωμοσωμάτων μεταξύ κυττάρων είναι διαφορετικός στους προκαρυωτικούς και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα κύτταρα των πρώτων οργανισμών η γενετική αυτή λειτουργία είναι ακανόνιστη, λιγότερο αναπτυγμένη και δεν συνοδεύεται με αληθινή συγχώνευση δύο γαμετών διαφορετικού φύλου όπως στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Κέκου και Μακρή, 1988). Στα προκαρυωτικά κύτταρα ο χρωμοσωμικός ανασυνδυασμός γίνεται με τους εξής τρόπους: μετασχηματισμό, σύζευξη και μεταγωγή όπου και αναλύονται παρακάτω.

3.1 Μετασχηματισμός (Transformation)

Με τον όρο μετασχηματισμό εννοούμε τη γενετική αλλαγή ενός κυττάρου ως αποτέλεσμα της εισαγωγής, της λήψης και της έκφρασης του ξένου γενετικού υλικού (DNA ή RNA) (Lorenz and Wackernagel, 1994). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται όταν κάποιο ζωντανό κύτταρο προσλαμβάνει από το περιβάλλον του ένα «γυμνό» μόριο DNA και το ενσωματώνει στο γενετικό του υλικό (Δημόπουλος, 1993).

Ο μετασχηματισμός μπορεί να διαιρεθεί σε δύο διαδικασίες: Λήψη του DNA, από τον δέκτη οργανισμό, και η ένταξη του DNA στο γονιδίωμα του οργανισμού. Μέχρι σήμερα οι περισσότερες εργασίες αναφέρονται στην πρώτη εκ των διαδικασιών. Η δυνατότητα ενός βακτηρίου που μετασχηματίζεται εξαρτάται από τη φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού (Rose, 1968). Έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια κάτω από συνθήκες stress (υψηλή θερμοκρασία, υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, μειωμένο οξυγόνο, μείωση θρεπτικού υποστρώματος κ.ά.) είναι ικανά να λάβουν από το περιβάλλον «γυμνό» DNA (Hecker *et al.*, 1996). Περίπου δέκα δευτερόλεπτα απαιτούνται συνήθως για να εισέλθει το «γυμνό» DNA στα κύτταρα των βακτηρίων από τη στιγμή της προσκόλλησής του (Rose, 1968).

Έτσι κατά το μετασχηματισμό μικρά τμήματα δίκλωνου DNA από τα κύτταρα-δότες (εξωγονιδίωμα) μεταφέρονται στο γονιδίωμα των κυττάρων-δεκτών (ενδογονιδίωμα) (Dubnau, 1999). Αυτό γίνεται με ελευθέρωση πρώτα των τμημάτων του DNA από τα κύτταρα-δότες, την προσρόφηση των τμημάτων αυτών στην επιφάνεια των κυττάρων-δεκτών, την είσοδο τους στα τελευταία και, τέλος, τον ανασυνδυασμό τους με το ενδογονιδίωμα (Logenz and Wackernagel, 1994). Η διαδικασία αυτή είναι σχετικά απλή σε εκτέλεση και βρίσκει εφαρμογή στην πράξη. Ο μηχανισμός του ανασυνδυασμού στηρίζεται στο ζευγάρι συμπληρωματικών αλληλουχιών βάσεων μεταξύ εξωγονιδιώματος και ενδογονιδιώματος. Το ζευγάρι αυτό γίνεται με δεσμούς υδρογόνου. Το αποτέλεσμα μπορεί να είναι η ενσωμάτωση τμήματος ή ολοκλήρου του εξωγονιδιώματος στο ενδογονιδίωμα. Εάν για κάποιο λόγο αυτό δεν συμβεί, τότε το εξωγονιδίωμα μπορεί είτε να διπλασιαστεί ανεξάρτητα από το υπόλοιπο γενετικό υλικό, είτε να παραμείνει στο κύτταρο χωρίς να πολλαπλασιάζεται, είτε να υποστεί ενζυμική αποικοδόμηση (Hall and Collis, 1995).

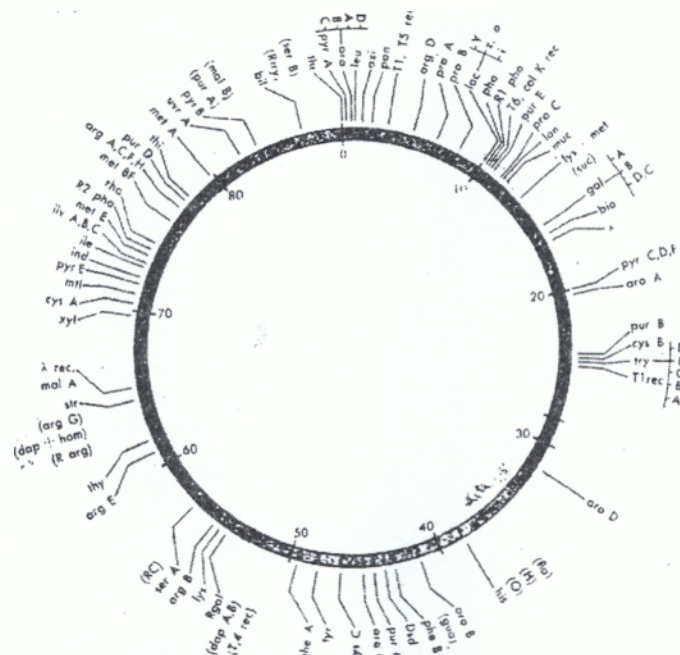
3.2 Σύζευξη (Conjugation)

Η σύζευξη είναι ένα σπουδαίο γενετικό φαινόμενο των προκαρυωτικών οργανισμών. Έφερε στο φως καινούρια στοιχεία για το φύλο των ατελών αλλά σπουδαίων αυτών οργανισμών. Ανακαλύφθηκε ότι υπάρχουν δύο τύποι προκαρυωτικών κυττάρων. Ο ένας δρα ως γενετικός δότης ή αρσενικό κύτταρο και περιέχει τον γενετικό παράγοντα F. Ο άλλος δρα ως δέκτης ή θηλυκό κύτταρο και δεν περιέχει τον παράγοντα F (F').

Στα αρσενικά κύτταρα υπάρχουν τα φυλετικά ινίδια που αποτελούν τη γέφυρα σύνδεσης με τα θηλυκά. Όταν οι δύο αυτοί τύποι ζευγαρώνουν γίνεται μεταφορά του F στα θηλυκά κύτταρα (F') με αποτέλεσμα τα τελευταία να μετατραπούν σε αρσενικά (F⁺) (Wilkins, 1995). Διαπιστώθηκε ότι η σύζευξη καθορίζεται από ένα πλασμίδιο που υπάρχει στα αρσενικά κύτταρα και του οποίου τμήμα είναι ο παράγοντας F. Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά κυκλικά τμήματα DNA. Βρίσκονται κυρίως στα βακτήρια και αντιγράφονται αυτόνομα σε σχέση με το υπόλοιπο γενετικό υλικό. Περιέχουν $(2-200) \times 10^3$ βάσεις και κατευθύνουν ορισμένες γενετικές λειτουργίες του κυττάρου.

Η διαδικασία σύζευξης περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο σχηματίζεται η γέφυρα σύζευξης. Αυτή είναι αποτέλεσμα αντίδρασης της κυτταρικής επιφάνειας του κυττάρου-δότη με την επιφάνεια του κυττάρου-δέκτη. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται

σύνθεση πλασμιδιακού DNA στο F^+ και διέλευση του μέσα από τη γέφυρα στο F^- . Αποτέλεσμα της σύζευξης είναι η δημιουργία δύο F^+ βακτηρίων. Με πολύ μικρή συχνότητα (10^{-5}) ο παράγοντας F είναι δυνατόν να ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα οπότε το βακτηριακό αυτό κύτταρο (Hfr) μεταφέρει ολόκληρο το χρωμόσωμα του στο F^- κύτταρο. (Bennett, 2000). Σειρά πειραματικών δεδομένων έδειξε ότι όταν το χρωμόσωμα των F^+ κυττάρων εισέρχεται στο κύτταρο F^- με γραμμική σχέση. Εάν η γραμμική αυτή μεταφορά διακοπεί σε διάφορους χρόνους τότε τμήματα χρωμοσώματος διαφορετικού μήκους βρίσκονται στα κύτταρα F^- . Σύγκριση των χαρακτηριστικών πληθυσμών κυττάρων F^- που περιέχουν διάφορα ποσά εισαχθέντος χρωμοσώματος δείχνει τη σχετική θέση όπου είναι αποθηκευμένη η αντίστοιχη γενετική πληροφορία στο χρωμόσωμα των F^+ . Κατ' αυτό τον τρόπο έχουν δημιουργηθεί λεπτομερείς γενετικοί χάρτες όπως αυτός της Εικόνας 2. Οι συντμήσεις λέξεων που υπάρχουν γύρω από το χρωμόσωμα αναφέρονται στα γονίδια. π.χ. το *his* αναφέρεται στο γονίδιο σύνθεσης της ιστιδίνης. Οι αριθμοί διαιρούν το κυκλικό χρωμόσωμα σε χρονικά διαστήματα (λεπτά) που χρειάζεται κάθε χρωμοσωμικό τμήμα του F^+ να φανεί στο F^- (Κέκου και Μακρή, 1988).



Εικόνα 2: Γενετικός χάρτης προκαρυωτικού κυττάρου, όπου φαίνονται οι σχετικές θέσεις διαφόρων γονιδίων στο κυκλικό χρωμόσωμα (Κέκου και Μακρή, 1988).

3.3 Μεταγωγή (Transduction)

Μεταφορά γενετικού υλικού (χρωμοσώματα) από ένα βακτήριο σ' άλλο γίνεται και με βακτηριοφάγο που παίζει το ρόλο μεταφορέα του γενετικού υλικού του κυττάρου-δότη (Τρακατέλλης, 1984). Υπάρχουν δύο τύποι μεταγωγής. Ο πρώτος ονομάζεται γενικευμένη μεταγωγή και σημαίνει ότι ο φάγος μπορεί να μεταφέρει οποιοδήποτε γενετικό χαρακτηριστικό με την ίδια πιθανότητα. Στο δεύτερο τύπο (εξειδικευμένη μεταγωγή) γίνεται μεταφορά μόνο των γονιδίων εκείνων που γειτονεύουν με το προφάγο. Ο τελευταίος είναι ένα πρόδρομο είδος φάγου που δίνει στα κύτταρα που τον περιέχουν την ικανότητα να σχηματίζουν υπό ορισμένες συνθήκες μολυσματικούς φάγους, χωρίς τη μεσολάβηση εξωτερικών βακτηριοφάγων (Lacey, 1973).

Στον πίνακα I παρουσιάζονται επιλεγμένα παραδείγματα που επεξηγούν την οριζόντια μεταφορά γονιδίων από τους διάφορους μηχανισμούς στα διάφορα περιβάλλοντα που έχουν σχέση με την τροφική αλυσίδα.

Πίνακας 1: Παραδείγματα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων στην τροφική αλυσίδα

| Μηχανισμός | Δοκτήρας | Δότης | Παράθεμα | Αναφορές |
|--------------------------------|---|--|---|---|
| Μετασηματισμός | <i>Escherichia coli</i> | Πλασμιδιακό DNA απομονωμένο από <i>E. coli</i> | Γάλα, λαχανικά/χυμοί φρούτων, ρόφημα σόγιας, κονσερβοποιημένο λάχανο, κονσερβοποιημένα φασόλια σόγιας, κονσερβοποιημένες γαρνιέρες, μίξη λαχανικών, πολτός, σπανάκιου | Bauer <i>et al.</i> (1999) |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>B. subtilis</i> ομόλογο χρωμοσωμικό DNA | Γάλα και σοκολατούχο γάλα | Brautigam <i>et al.</i> (1997) |
| | <i>B. subtilis</i> | Πλασμιδιακό DNA απομονωμένο από <i>Lactococcus lactis</i> | Γάλα | Zenz <i>et al.</i> (1998) |
| | <i>Acinetobacter</i> | <i>E. coli</i> ομόλογο χρωμοσωμικό DNA | Επιφάνεια από ακατέργαστες πατάτες, λουκάνικο | Schon S. <i>et al.</i> , unpublished results. |
| | <i>Acinetobacter</i> | Αντισυνδυασμένο φυτικό DNA | Υγροποιημένες μαγειρικές μη διαγονιδιακές πατάτες | Schon S. <i>et al.</i> , unpublished results |
| | <i>Streptococcus garcinii</i> | Πλασμιδιακό DNA απομονωμένο από <i>E. coli</i> . Ομόλογο χρωμοσωμικό DNA από <i>L. lactis</i> και <i>E. faecalis</i> | Ανθρώπινο σάλιο | Mercer <i>et al.</i> (1999a); Mercer <i>et al.</i> (2001) |
| | <i>Campylobacter jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> ομόλογο χρωμοσωμικό DNA | Εντερικός σάλινας από κοτόπουλο | Boer <i>et al.</i> (2002) |
| Μεταγωγή | <i>Streptococcus thermophilus</i> | Φάγος α10/9 (πλασμιδίο DNA) | Γιαούρτι | Heller <i>et al.</i> (1995) |
| | <i>E. coli</i> | Φάγος H-19B | Εντερικός σάλινας από ποντίκι | Acheson <i>et al.</i> (1998) |
| | <i>Vibrio cholerae</i> | Φάγος CTXΦ | Εντερικός σάλινας από ποντίκι | Waldor and Mekalanos (1996) |
| Σύζευξη | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> (R πλασμιδίο) | Σανιά που κοβεται ο κρέμας | Kruse and Sorum (1994) |
| | <i>E. coli</i> | <i>Aeromonas salmonicida</i> (R πλασμιδίο) | Σανιά που κοβεται ο κρέμας σολωμός | Kruse and Sorum (1994) |
| | <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> | <i>L. curvatus</i> (rAMβ1) | Η ζύμωση του λουκάνικου | Hertel <i>et al.</i> (1995); Vogel <i>et al.</i> (1992) |
| | <i>L. lactis</i> | <i>L. Lactis</i> (Prl205) | Η ζύμωση του τυριού | Gabin-Gauthier <i>et al.</i> (1991) |
| | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>E. faecium</i> (PrlMB1) | Εντερικός σάλινας από κοτόπουλο | Netherwood <i>et al.</i> (1999) |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>E. faecalis</i> (pCT10) | Εντερικός σάλινας από χοίρου | Licht <i>et al.</i> (2002) |
| | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> (60kb πλασμιδίο) | Γαστρικό υγρό | Scott and Flint (1995) |
| | <i>Bacteroides sp.</i> | <i>E. coli</i> (Prk2013, pRR1207) | Εντερικός σάλινας ποντικών χωρίς μικρόβια | Garrigues-Jeanjean <i>et al.</i> (1999) |
| | <i>E. coli</i> | <i>Serratia liquefaciens</i> (R πλασμιδίο), <i>E. coli</i> (pRR πλασμιδίο), <i>Enterococcus faecalis</i> (pAT191) | Εντερικός σάλινας χωρίς μικρόβια από ποντίκια | Doucet-Populaire <i>et al.</i> (1992); Duval-Flah <i>et al.</i> (1980); Duval-Flah <i>et al.</i> (1994) |
| | <i>E. faecalis</i> | <i>L. lactis</i> (Prl205), <i>Lactobacillus reuteri</i> (rAMβ1) | Εντερικός σάλινας χωρίς μικρόβια και HFA ποντίκια | Gruzza <i>et al.</i> (1994); Morelli <i>et al.</i> (1988) |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>E. faecalis</i> (Tn1545) | Εντερικός σάλινας χωρίς μικρόβια από ποντίκια | Doucet-Populaire <i>et al.</i> (1991) |
| | <i>E. faecalis</i> ή ανθρώπινη χλωρίδα | <i>L. lactis</i> (γενετικά τροποποιημένο Tn916 και pH_205) | Εντερικός σάλινας χωρίς μικρόβια από ποντίκια και ποντίκια συσχετισμένα με την ανθρώπινη χλωρίδα | C. Alpert, to be published; GMOBIL (TY (2003) |
| | <i>L. Lactis</i> | <i>L. lactis</i> (rAMβ1) | Εντερικός σάλινας χωρίς μικρόβια από αρσενίου | Schlundt <i>et al.</i> (1994) |
| Λήψη DNA σε κύτταρα θηλαστικών | Ισοί σπλήνας - ήπατος | Σπόροι σόγιας | Ποντίκια | Hohlweg and Deorfler (2001) |
| | Λεμφοκύτταρα, μακροφάγος, B κύτταρα, T κύτταρα, ηπατικά κύτταρα | Φάγος M13 DNA, πλασμιδίο DNA | Ποντίκια | Schubbert <i>et al.</i> (1997); Schubbert <i>et al.</i> (1998) |
| | Κύτταρα ανοσοποιητικού συστήματος | Εξασθενημένη δράση <i>Salmoneilla typhimurium</i> | Ποντίκια | Darji <i>et al.</i> (2000) |
| | Hcl a, CHO, COS-1 | <i>E. coli</i> (γγ*) | Καλλιέργεια κυττάρων | Grillot-Courvalin <i>et al.</i> (1998) |
| | Επιθηλιακά κύτταρα, μακροφάγος | (<i>Shigella flexneri</i> , <i>L. monocytogenes</i>) | Καλλιέργεια κυττάρων | Grillot-Courvalin <i>et al.</i> (2002) |

HFA: Συσχετισμός της ανθρώπινης μικροχλωρίδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ

4.1 Ιστορική αναδρομή

Μιλώντας για τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς είναι απαραίτητο να γίνει μία σύντομη παρουσίαση της πορείας που ακολουθήθηκε στην βελτίωση των φυτών για να φτάσουμε στην υπάρχουσα κατάσταση. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία και για την αποσαφήνιση κάποιων όρων.

Αρχικά λοιπόν και σε όλη τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας μέχρι την πράσινη επανάσταση, στην γεωργική παραγωγή χρησιμοποιήθηκαν οι «ποικιλίες». Με τον όρο αυτό εννοούμε μία ομάδα όμοιων φυτών που με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά τους και την συμπεριφορά τους στον αγρό μπορούν να διαφοροποιηθούν από άλλες ποικιλίες του αυτού είδους. Χαρακτηριστικό των ποικιλιών είναι ότι οι σπόροι τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αναπαραγωγή των καλλιεργούμενων φυτών χωρίς μείωση της παραγωγικότητας. Οι ποικιλίες αυτές, είχαν ως κυριότερη πηγή γενετικής παραλλακτικότητας, της ποικιλότητας δηλαδή που μας βοηθάει στο να προχωρήσει η βελτίωση των ποικιλιών, τις μεταλλάξεις. Ο όρος μετάλλαξη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον De Vries για την περιγραφή απότομων αλλαγών του γονότυπου και ορίζεται ως «κάθε απότομη κληρονομούμενη μεταβολή στην αλληλουχία ή τον αριθμό των νουκλεοτιδίων ενός νουκλεϊκού οξέος» (Καλτσίκης, 1989).

Στην αρχή υπήρχαν μόνο οι φυσικές μεταλλάξεις με χαρακτηριστικά τους ότι οι περισσότερες είναι επιβλαβείς για το φυτό και ότι η συχνότητά τους δεν αλλάζει με τη πάροδο του χρόνου. Το μικρό ποσοστό που είναι επωφελές αν συμβεί να παρουσιαστούν σε φυτό που καλλιεργείται, είναι δυνατόν να επιλεγεί από τον καλλιεργητή και να διατηρηθεί. Αν δεν γίνεται τεχνητή επιλογή για να διαωριστούν οι μεταλλάξεις θα πρέπει να προσαρμοστούν στο εσωτερικό (ισορροπημένος γονότυπος) και εξωτερικό περιβάλλον του φυτού (κλίμα, έδαφος κ.ά.) (Καλτσίκης, 1989).

Οι τεχνητές μεταλλάξεις, αυτές δηλαδή που προκαλούνται με την επέμβαση του ανθρώπου, ξεκίνησαν τη δεκαετία του '30 όταν παρατηρήθηκε ότι οι ακτίνες Χ αυξάνουν τη συχνότητα των μεταλλάξεων. Σκοπός τους είναι η σκόπιμη πρόκληση μεταβολών στο γενετικό υλικό για να δημιουργήσουμε καινούργια γενετική παραλλακτικότητα. Οι τεχνητές μεταλλάξεις είναι αποτέλεσμα της επίδρασης διαφόρων μεταλλαξιογόνων τα οποία διαιρούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις ακτινοβολίες και

τα χημικά μεταλλαξιογόνα (Καλτσίκης, 1989). Οι τεχνητές μεταλλάξεις λοιπόν έχουν εφαρμογή αρκετών δεκαετιών.

Μια από τις μεγαλύτερες αλλαγές στην ιστορία της παγκόσμιας γεωργίας προήλθε με τη χρήση των υβριδίων. Με τον όρο υβρίδια εννοούμε πληθυσμούς που είναι οι πρώτοι απόγονοι διασταυρώσεων γενετικά ανόμοιων γονέων. Γονέων που ανήκουν όμως στο ίδιο είδος ή σε συγγενή είδη (Καλτσίκης, 1989). Η χρήση τους οδήγησε σε αύξηση της παραγωγικότητας με συνήθως όμως αυξημένες απαιτήσεις και σε εισροές. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι για να παραχθούν οι σπόροι των υβριδίων απαιτούνται συγκεκριμένες διαδικασίες που μόνο εξειδικευμένοι επιστήμονες μπορούν να πραγματοποιήσουν καθώς και ότι αν οι σπόροι τους χρησιμοποιηθούν για την αναπαραγωγή καλλιεργούμενων φυτών δίνουν συνεχώς μειωμένη παραγωγή. Τα τελευταία αυτά χαρακτηριστικά οδηγούν στο ότι οι καλλιεργητές θα πρέπει κάθε χρόνο να αγοράζουν τους σπόρους των υβριδίων που θα χρησιμοποιήσουν.

Η επόμενη μεγάλη ίσως αλλαγή στη παγκόσμια γεωργία είναι αυτή που βιώνουμε στις μέρες μας, η εφαρμογή δηλαδή της γενετικής μηχανικής και τα προϊόντα αυτής, που είναι οι ΓΤΟ. Στην περίπτωση της γενετικής τροποποίησης το γονίδιο απομονώνεται και ενσωματώνεται, με συγκεκριμένες διαδικασίες και έχουμε μεταφορά του όχι μόνο μέσα στο ίδιο είδος αλλά ακόμα και σε είδη διαφορετικών βασιλείων π.χ. από βακτήριο σε φυτό (Τσαυτάρης, 1997). Με βάση τα παραπάνω νομίζουμε ότι γίνεται ξεκάθαρο πως οι όροι «μετάλλαξη» και «γενετική τροποποίηση» δεν θα πρέπει να συγχέονται.

Ένας όρος που μπορεί να εμπεριέχει τη λέξη «μετάλλαξη» είναι αυτός του «γενετικά μεταλλαγμένου οργανισμού» που πολύ περιορισμένα είχε χρησιμοποιηθεί στο ξεκίνημα της χρήσης των νέων τεχνικών, ο οποίος όμως εγκαταλείφθηκε στη πορεία μιας και μάλλον περισσότερη σύγχυση δημιουργεί. Άλλοι όροι που έχουν προταθεί είναι «οργανισμός που δέχεται εισβολή αλλογενών γονιδίων» που περιγράφει με ιδιαίτερη ακρίβεια την κατάσταση αλλά είναι μάλλον σύνθετος, και ο όρος «μη σεξουαλικά γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί» που υποδηλώνει οργανισμούς που δημιουργούνται με τεχνητή ενσωμάτωση αλλογενών γονιδίων παρακάμπτοντας τη σεξουαλική διαδικασία (Ρουπακιάς, 2002).

Ο όρος που θα χρησιμοποιηθεί είναι αυτός του «ΓΤΟ» μιας και είναι περιεκτικός, ξεκάθαρος και αυτός που χρησιμοποιείται παγκοσμίως. Άλλοι όροι που χρησιμοποιούνται είναι «διαγονιδιακά φυτά», «διαγονίδιο», «προϊόντα γενετικής μηχανικής», «προϊόντα βιοτεχνολογίας».

4.2 Παραδείγματα φυτών που παρήχθησαν από μεταλλάξεις και από γενετική τροποποίηση.

Για την περαιτέρω κατανόηση της διαφοράς των δύο τεχνικών που περιγράψαμε παραπάνω ακολουθούν πίνακες με παραδείγματα μεταλλαγμένων και γενετικά τροποποιημένων τροφίμων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Φυτά που έχουν προέλθει από μεταλλάξεις.

| Καλλιέργεια | Καλλιεργητικό όνομα | Μέθοδος Μετάλλαξης |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Ρύζι | Calrose 76 | Ακτίνες γάμμα |
| Αλεύρι | Lewis | Thermal neutrons |
| Oats (δημητριακά) | Alamo-X | Ακτίνες Χ |
| Σταφύλια | Rio Red/ Star Ruby | Thermal Neutrons |
| Burmuda grass | Tifeagle/ Tifgreen II / Tift 94 | Ακτίνες γάμμα |
| Λάχανο | Ice cube / Mini- Green | Ethyl methanesulphonate |
| Φασόλι | Seafarer / Seaway | Ακτίνες Χ |
| Lilac | Prairie Petite | Thermal neutrons |
| St. Augustine grass | TXSA 8202 / TXSA 8212 | Ακτίνες γάμμα |

(Σκοτειδάκης, 2003)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Γενετικά Τροποποιημένες καλλιέργειες της διεθνούς αγοράς.

| Είδος φυτού | Χαρακτηριστικό | Περιοχές / Χώρες που έχει εγκριθεί | Μέθοδος γεν. τροποποίησης |
|-------------|--|---|------------------------------|
| Καλαμπόκι | Αντοχή σε έντομα Αντοχή σε ζιζανιοκτόνα | Αργεντινή, Καναδάς, ΗΠΑ, ΕΕ, Νότια Αφρική | Γονίδια από μικροοργανισμούς |
| Σόγια | Αντοχή σε ζιζανιοκτόνα | Καναδάς, ΗΠΑ, Αργεντινή, Ν. Αφρική, ΕΕ (για μεταποίηση) | Γονίδια από μικροοργανισμούς |
| Ελαιοκράμβη | Αντοχή σε ζιζανιοκτόνα | Καναδάς, ΗΠΑ | Γονίδια από μικροοργανισμούς |
| Κολοκυθιά | Αντοχή σε ιώσεις | Καναδάς, ΗΠΑ | Γονίδια από μικροοργανισμούς |
| Πατάτα | Αντοχή σε έντομα / ζιζανιοκτόνα | Καναδάς, ΗΠΑ | Γονίδια από μικροοργανισμούς |

(Σκοτειδάκης, 2003)

4.3 Γενετική τροποποίηση (Genetic Modification).

Ένας γενετικά τροποποιημένος οργανισμός (ΓΤΟ) είναι ένας ζωντανός οργανισμός, φυτικός ή ζωικός που έχει υποστεί τροποποίηση των αρχικών γενετικών του χαρακτηριστικών με προσθήκη, αφαίρεση ή αντικατάσταση τουλάχιστον ενός γονιδίου. Η πράξη αυτή λαμβάνει χώρα τόσο σε αναπαραγωγικά κύτταρα (γαμέτες), τα οποία μεταφέρουν το χαρακτηριστικό στους απογόνους, όσο και σε σωματικά κύτταρα (μη αναπαραγωγικά). Σε αυτήν την περίπτωση ο τροποποιημένος χαρακτήρας δεν μεταφέρεται. Η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών είναι δυνατή χάρη στο γεγονός ότι τα γονίδια όλων των οργανισμών είναι κατασκευασμένα από το ίδιο υλικό, το DNA (Σκοτειδάκης, 2003).

Η γενετική τροποποίηση είναι η πλέον αμφισβητούμενη κατηγορία βιοτεχνολογικών εφαρμογών και αφορά λοιπόν την άμεση εισαγωγή επιθυμητών γνωρισμάτων σε ένα οργανισμό χωρίς την διαδικασία της εγγενούς αναπαραγωγής, δηλαδή επιτρέπει τη μεταφορά γονιδίων μεταξύ οργανισμών ακόμα και αυτών που δεν είναι εξελικτικά συγγενείς. Με τον τρόπο αυτό παρέχεται η δυνατότητα ακριβέστερου χειρισμού των γονιδίων, αξιοποίησης γονιδίων ανεξάρτητα από ταξινομικά εμπόδια και ταχύτερης ενσωμάτωσης γνωρισμάτων σε συγκεκριμένο γονότυπο.

Οι εφαρμογές των σύγχρονων αυτών τεχνικών της γενετικής τροποποίησης οδήγησαν και στη δημιουργία νέων μορφών τροφίμων, των «καινοφανών ή νεοφανών τροφίμων».

Τα κυριότερα γενετικά τροποποιημένα προϊόντα που κυκλοφορούν εκτός από τη σόγια και τον αραβόσιτο είναι το βαμβάκι, η ελαιοκράμβη και τα σπορέλαια (σογιέλαιο, καλαμποκέλαιο, κραμβέλαιο, βαμβακέλαιο) (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Τα παράγωγα σόγιας εντοπίζονται σε αλλαντικά, διαιτητικά προϊόντα, συμπληρώματα διατροφής σε χάπια (λεκιθίνη), επιδόρπια, ζαχαρωτά-γλυκά, κονσέρβες ψαριού (λόγω σογιέλαιου), κρέμα για καφέ (ΓΤ γαλακτωματοποιητής), μπισκότα (αλεύρι σόγιας), παιδικές τροφές, προϊόντα σοκολάτας (ΓΤ λεκιθίνη), τσίχλες (ΓΤ γλυκόζη), μπιφτέκια, ζυμαρικά (σογιάλευρο), σούπες (σογιέλαιο και γαλακτωματοποιητής), μαργαρίνες (λόγω φυτικών λιπαρών και γαλακτωματοποιητή), ροφήματα σόγιας (πρωτεΐνη σόγιας), τροφές για κατοικίδια αλλά και στο ψωμί (σογιάλευρο ή σπόροι σόγιας) και σε μη γαλακτοκομικά προϊόντα όπως φυτικές κρέμες μαγειρικής ζαχαροπλαστικής όπως και σε σάλτσες σόγιας (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Τα παράγωγα αραβοσίτου εντοπίζονται σε δημητριακά (καλαμποκάλευρο, σιμιγδάλι, άμυλο, νιφάδες καλαμποκιού), ζαχαρωτά, καραμέλες, κονσέρβες ψαριού, μαγιονέζες, μίγματα καρυκευμάτων, παιδικές τροφές, ποτά (γλυκόζη, φρουκτόζη από άμυλο καλαμποκιού), προϊόντα υγιεινής διατροφής, σιρόπι, σούπες, τортίγια τσιπς, τσίχλες και φυτικά έλαια (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Ωστόσο η κύρια είσοδος των μεταλλαγμένων στη καθημερινή διατροφή παραμένουν οι ζωοτροφές. Κατά συνέπεια προϊόντα όπως κρέας, πουλερικά, γάλα, τυρί, αυγά και ψάρια μπορεί να προέρχονται από ζώα που έχουν τραφεί με μεταλλαγμένους οργανισμούς. (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2004).

Στον πίνακα 3 περιγράφονται οι εγκεκριμένοι ΓΤΟ για χρήση σε τρόφιμα (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Πίνακας 4: Εγκεκριμένοι ΓΤΟ & προϊόντα τους για χρήση σε τρόφιμα

| ΕΤΑΙΡΕΙΑ | ΠΡΟΪΟΝ | ΜΟΝΑΔΙΚΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΤΗΣ ΓΤΟ | ΘΕΣΜΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ |
|----------|---|------------------------------|---|
| MONSANTO | Roundup Ready σόγια (GTS 40/3/2) – Σπόρος για μεταποίηση – χρήση σε τρόφιμα, συστατικά τροφίμων και ζωοτροφές | MON-04032-6 | Οδηγία 90/220 Απόφαση 96/281 |
| SYNGENTA | Αραβόσιτος Bt-176 – Σπόρος για μεταποίηση – χρήση σε τρόφιμα, συστατικά τροφίμων και ζωοτροφές | SYN-EV176-9 | Οδηγία 90/220 Απόφαση 97/98 |
| MONSANTO | Τρόφιμα & συστατικά τροφίμων από αραβοσιτάλευρο, γλυκύτενη αραβ., σιμηδάκι αραβ., άμυλο αραβ., γλυκόζη αραβ. και αραβοσιτέλαιο από ΓΤ αραβόσιτο MON 810 | MON-00810-6 | Κανονισμός 258/97 |
| BAYER | α) άμυλο και όλα τα παραγώγα του β) ακατέργαστο και εξευγενισμένο έλαιο γ) όλα τα θερμικά επεξεργασμένα ή ζυμούμενα προϊόντα που λαμβάνονται από χονδροκοκκο ή λεπτόκοκκο αλεύρι από ΓΤ αραβόσιτο T25 | ACS-ZM003-2 | Κανονισμός 258/97 |
| SYNGENTA | Τρόφιμα & συστατικά τροφίμων από ΓΤ αραβόσιτο Bt-11 | SYN-BT011-1 | Κανονισμός 258/97 |
| SYNGENTA | ΓΤ γλυκός αραβόσιτος Bt-11 για κατανάλωση ως ορέσako τρόφιμο ή για χρήση σε τρόφιμα και συστατικά τροφίμων | SYN-BT011-1 | Κανονισμός 258/97 Απόφαση 2004/657 |
| MONSANTO | Τρόφιμα & συστατικά τροφίμων από ΓΤ αραβόσιτο NK-603 | MON-00603-6 | Κανονισμός 258/97 Η απόφαση δεν έχει δημοσιευτεί ακόμα |
| BAYER | Επεξεργασμένο έλαιο από ΓΤ ελαιοκράμβη TOPAS 19.2 | ACS-BN007-1 | Κανονισμός 258/97 |
| BAYER | Επεξεργασμένο έλαιο από ΓΤ ελαιοκράμβη B91-4, B94-2, MS1XRF2 | ACS-BN004-7 XACS-BN002-5 | Κανονισμός 258/97 |
| MONSANTO | Εξευγενισμένο έλαιο από ΓΤ ελαιοκράμβη σειρά GT73 | MON-00073-7 | Κανονισμός 258/97 |
| BAYER | Επεξεργασμένο έλαιο από ΓΤ ελαιοκράμβη MS8, RF και 3 | ACS-BN005-8 X ACS-BN003-6 | Κανονισμός 258/97 |
| MONSANTO | Βαμβάκελαιο από ΓΤ βαμβάκοσπορο σειρά 1445 | MON-01445-2 | Κανονισμός 258/97 |
| MONSANTO | Βαμβάκελαιο από ΓΤ βαμβάκοσπορο σειρά 531 | MON-00531-6 | Κανονισμός 258/97 |

(www.efsa.eu.int)

4.4 Μέθοδοι γενετικής τροποποίησης.

Με τον όρο γενετική τροποποίηση παρότι αναφερόμαστε και σε αντικατάσταση ή αφαίρεση γενετικού υλικού αλλά η πιο συνηθισμένη διαδικασία, είναι η λήψη γενετικού υλικού από ένα είδος δωρητή και η άμεση μεταφορά του σε μια άλλη κυτταρική σειρά ή σε ένα άλλο είδος λήπτη.

Η διαδικασία διαιρείται ως εξής:

1. Απομόνωση του υλικού από το δωρητή.
2. Εισαγωγή του υλικού στον λήπτη.
3. Ενσωμάτωση αυτού του υλικού στο γονιδίωμα του λήπτη.
4. Έκφραση των χαρακτηριστικών του εισαχθέντος υλικού.

Απαραίτητα για την απομόνωση του γενετικού υλικού του δωρητή είναι τα περιοριστικά ένζυμα, τα οποία ταξινομούνται σε 4 κυρίως ομάδες. Όταν βρεθούν σε συγκεκριμένες συνθήκες π.χ. υψηλό ποσοστό γλυκερόλης χάνουν την εξειδίκευσή τους και κόβουν το DNA σε παρόμοιες θέσεις αλληλουχίας. Δείχνουν δηλαδή προτίμηση σε μια θέση αναγνώρισης έναντι άλλων και επομένως υπάρχουν θέσεις που κόβονται και αναγνωρίζονται πιο γρήγορα από άλλες. Υπεύθυνη για αυτό είναι η τοπική δόμηση του DNA. Τα τμήματα που δημιουργούνται στα άκρα έχουν συγκεκριμένες όμοιες αλληλουχίες (Χατζόπουλος, 2001).

Τα κατατμήματα αυτά μπορούν να συνδεθούν και να δημιουργήσουν ένα ενιαίο τμήμα με απαραίτητη την ύπαρξη ενός άλλου ενζύμου που συνήθως είναι η T4 DNA λιγάση. Η συνένωση αυτή μπορεί να γίνει όταν έχουν ομόλογα ή συμπληρωματικά άκρα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα είναι ότι μπορούν να συνδεθούν διαφορετικά ως προς το μέγεθος και την προέλευση τμήματα του DNA. Τα άκρα αυτά που ονομάζονται και κολλώδη δεν συνδέονται μόνο μεταξύ τους αλλά μπορούν να συνδεθούν και με συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων οποιουδήποτε άλλου DNA που έχει κοπεί με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο. Οι γενετιστές χρησιμοποιούν τόσο τα περιοριστικά ένζυμα όσο και τις λιγάσες για να ενώνουν τα μόρια DNA και έτσι είναι σε θέση να παρασκευάσουν οποιοδήποτε συνδυασμό μορίων DNA. Η διαδικασία αυτή είναι και η βάση της γενετικής μηχανικής (Χατζόπουλος, 2001).

Το DNA που προέρχεται από δύο ή περισσότερες διαφορετικές πηγές ονομάζεται ανασυνδυασμένο DNA. Ένα ανασυνδυασμένο DNA που περιέχει αλληλουχίες βάσεων από περισσότερους από έναν οργανισμούς ονομάζεται χιμαιρικό DNA (Μολφέτας, 1994). Το χιμαιρικό αυτό DNA έχει όλες τις ιδιότητες των τμημάτων του. Αυτό είναι που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως φορέας.

Φορέας είναι ένα μόριο DNA στο οποίο ενσωματώνονται τμήματα από άλλα μόρια και το τελικό προϊόν μεταφέρεται σε ένα κύτταρο ξενιστή. Οι φορείς είναι απαραίτητοι για την εισαγωγή και την ενσωμάτωση του γενετικού υλικού στο λήπτη, προέρχονται από πλασμίδια ή βακτηριοφάγους.

Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των φορέων είναι:

- ♦ Είναι μικρά μόρια με γνωστή δομή.
- ♦ Έχουν το δικό τους σημείο έναρξης της αντιγραφής, πράγμα που επιτρέπει τόσο την αντιγραφή του φορέα, όσο και του ξένου τμήματος DNA που περιέχει μέσα στο κύτταρο λήπτη.
- ♦ Περιέχουν συνήθως ένα ή περισσότερα γονίδια σήμανσης όπως π.χ. αντίστασης σε κάποια αντιβιοτικά, που χρησιμοποιούνται για να απομονωθούν στη συνέχεια τα κύτταρα λήπτες που περιέχουν το φορέα (Μολφέτας, 1994).

Στα φυτά ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος φορέας είναι το πλασμίδιο Ti του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*.

Ο φορέας λοιπόν εξασφαλίζει την είσοδο στο γονιδίωμα του λήπτη ενώ την επιτυχή έκφραση του εισαχθέντος γενετικού υλικού την εξασφαλίζει η χρήση του υποκινητή CaMV 35S που προέρχεται από τμήμα του γονιδιώματος του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού. Έχουν γίνει προσπάθειες να εφαρμοστούν και άλλοι υποκινητές όμως η εισαγωγή στο φορέα του υποκινητή CaMV 35S έχει τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Στη συνέχεια τα μόρια-φορείς αφού απομονωθούν δεν μπορούν να αντιγραφούν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Πρέπει να εισαχθούν σε κύτταρα και να αντιγραφούν μέσα στο κυτταρόπλασμα τους. Ο οργανισμός που χρησιμοποιείται συνήθως για την αναπαραγωγή τους είναι το βακτήριο *Escherichia coli*. Χρησιμοποιούνται και ζύμες καθώς και κύτταρα θηλαστικών σε ιστοκαλλιέργειες κυρίως όμως για την παραγωγή εμβολίων (Μολφέτας, 1994).

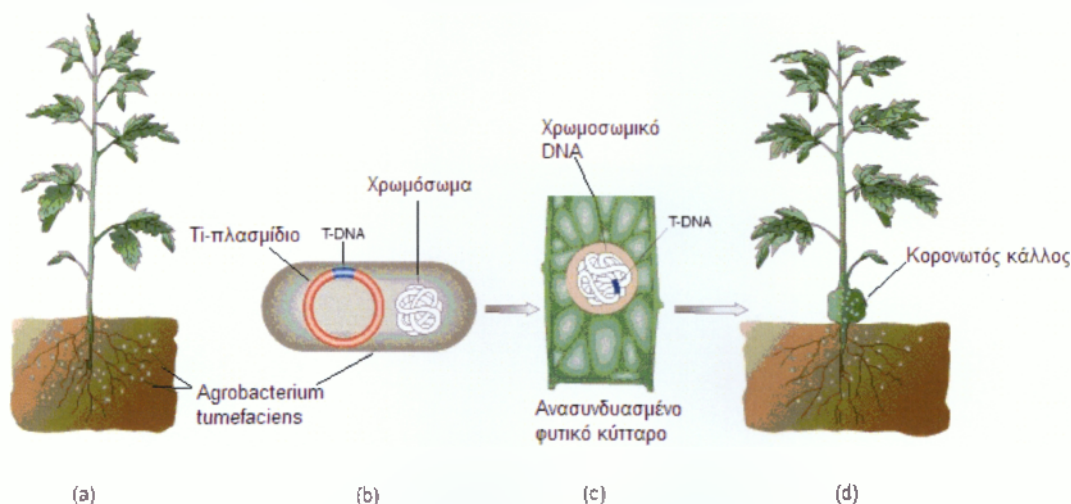
Η ενσωμάτωση του ανασυνδυασμένου DNA είτε στο βακτήριο *Escherichia coli* για την αναπαραγωγή του, είτε κατά την εισαγωγή του στα φυτικά κύτταρα που θέλουμε να αποκτήσουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, έχει πολύ περιορισμένο βαθμό επιτυχίας. Η επιλογή των κυττάρων γίνεται και στις δύο περιπτώσεις, στις οποίες έχει ολοκληρωθεί με επιτυχία η ενσωμάτωση, με τη βοήθεια των γονιδίων σήμανσης που προαναφέρθηκαν. Γονίδια δηλαδή που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε μία ουσία (αντιβιοτικά, ζιζανιοκτόνα κ.ά.) που έχουν ενσωματωθεί και αυτά στον φορέα. Χάρη στα γονίδια σήμανσης επιβιώνουν μόνο τα κύτταρα που έχει επιτύχει η εισαγωγή.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να πραγματοποιηθούν τα παραπάνω είναι:

- η μέθοδος του Αγροβακτηρίου (Agrobacterium-mediated transformation).
- η μέθοδος του εκτοξευτήρα μικροσωματιδίων ή «βιο-βαλλιστική» μέθοδος.
- η ηλεκτροπόρωση και η μηχανική και χημική μεταφορά των γονιδίων.

4.4.1 Η μέθοδος του Αγροβακτηρίου.

Οι αλληλεπιδράσεις του Αγροβακτηρίου με τα φυτικά κύτταρα είναι ένας τρόπος μεταφοράς DNA μεταξύ δύο βασιλείων. Κατά τη μεταφορά αυτή ογκογενετικά γονίδια από το αγροβακτήριο μεταφέρονται στο φυτό, προκαλώντας την ασθένεια της νεοπλασίας που ονομάζεται κορονωτός κάλλος (Εικόνα 3). Τα τοξικά στελέχη του αγροβακτηρίου περιέχουν ένα μεγάλο εξωχρωμοσωμικό πλασμιδίο, στο οποίο εδράζουν τα γονίδια που εμπλέκονται στη δημιουργία του κάλλου (Χατζόπουλος, 2001).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου του αγροβακτηρίου.

http://www.cas.muohio.edu/~wilsonkg/gene2005/manipulation/genecngneering/tools/F11_13.JPG

Στα καρκινικά κύτταρα του κάλλου παράγονται κάποιες ουσίες που ονομάζονται οπίνες τις οποίες το αγροβακτήριο απαιτεί για την ανάπτυξη του, αλλά δεν είναι σε θέση να συνθέσει. Μόνο δύο είδη το *Agrobacterium tumefaciens* και το *Agrobacterium rhizogenes* (προκαλεί την ασθένεια των θυσσανωδών ριζών) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το μετασχηματισμό των φυτών. Αυτά περιέχουν ένα εξωχρωμοσωμικό πλασμίδιο (μήκους μεγαλύτερο από 200 kb). Το πλασμίδιο αυτό ονομάζεται Ti (tumour inducing) όταν προέρχεται από το *Agrobacterium tumefaciens* και Ri (root inducing) όταν προέρχεται από το *Agrobacterium rhizogenes* και έχουν την ιδιότητα να μετασχηματίζουν τα φυτικά κύτταρα (δηλαδή εισαγωγή του DNA στο γονιδίωμα των κυττάρων) (Eeda *et al.*, 2004). Η τοξικότητα των *Agrobacterium* χάνεται όταν τα πλασμίδια αυτά αποβάλλονται από τα βακτήρια, απλά με την επώαση των κυττάρων αυτών στους 37°C αντί για τους 28°C, που είναι και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των βακτηρίων επανακτούν την τοξικότητα τους όταν τα πλασμίδια Ti εισάγονται στα συγκεκριμένα στελέχη (Χατζόπουλος, 2001). Από το εξωχρωμοσωμικό πλασμίδιο Ti ή Ri ένα συγκεκριμένο μικρό τμήμα, το T-DNA(Transfer DNA)μήκους περίπου 20 kb(Chilton *et al.*, 1977), εισέρχεται μέσα στο γονιδίωμα του φυτού. Από το T-DNA ένα τμήμα έχει ογκογενετικές ιδιότητες, ενώ ένα άλλο κωδικοποιεί τα ένζυμα της βιοσύνθεσης των οπινών.

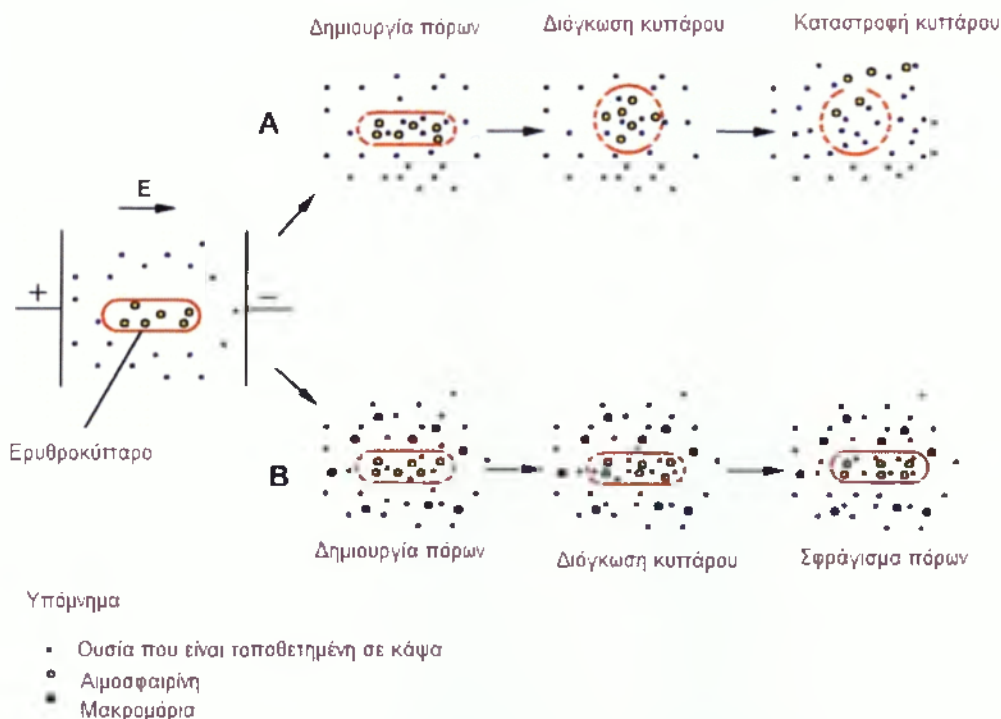
Στόχος των βιοτεχνολόγων ήταν να διατηρηθεί η ιδιότητα του T-DNA χωρίς όμως τα ογκογενετικά χαρακτηριστικά. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την διατήρηση μόνο του δεξιού και του αριστερού συνοριακού του T-DNA και την εισαγωγή κάθε φορά των επιθυμητών γονιδίων ανάμεσά τους.

Ως γονίδιο σήμανσης στη μέθοδο του αγροβακτηρίου χρησιμοποιείται πιο συχνά το NPTII που κωδικοποιεί τη φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης και προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Η καναμυκίνη είναι το πιο γνωστό μέλος της ομάδας των αμινογλυκοσιδίων. Έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στα δικότυλα φυτά. Αλλά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται είναι η γκενταμυκίνη, το G4 18, η νεομυκίνη, η πουρομυκίνη, η υγρομυκίνη. Τα αντιβιοτικά αυτά προκαλούν χλώρωση και αποχρωματισμό των φύλλων στα φυτά που δεν έχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας.

Πέρα από τα αντιβιοτικά και γονίδια ανθεκτικά στα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται συχνά ως γονίδια σήμανσης στα γενετικά τροποποιημένα φυτά. Ζιζανιοκτόνα που χρησιμοποιούνται είναι το glyphosate, η φωσφινοθρισίνη, η ατραζίνη, το βρωμοξυνίλιο κ.ά. Επίσης χρησιμοποιείται και η αυξίνη 2,4-D (Χατζόπουλος, 2001).

4.4.2 Ηλεκτροπόρωση

Από το 1950 ερευνητές έδειξαν ότι, στο κύτταρο που εφαρμόζεται εξωτερικά κάποιο ηλεκτρικό πεδίο, δημιουργείται ένα μεγάλο ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης στους δύο πόλους του κυττάρου. Εάν η εφαρμογή αυτή του ηλεκτρικού πεδίου είναι μεγάλη, τότε το κύτταρο λύεται. Εάν όμως το ηλεκτρικό πεδίο είναι κατάλληλο και το ηλεκτρικό δυναμικό της μεμβράνης λαμβάνει μια κρίσιμη τιμή, τότε προκαλείται μια διηλεκτρική βλάβη της μεμβράνης. Αποτέλεσμα της διηλεκτρικής αυτής βλάβης της μεμβράνης του κυττάρου είναι η δημιουργία των «μεμβρανικών πόρων» ή της μεμβρανικής αποσταθεροποίησης. Εάν η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου γίνει με παλμούς, πολύ μικρής χρονικής διάρκειας, τότε το κύτταρο μπορεί να διασωθεί από την ηλεκτρική κατεργασία με μια περαιτέρω κατάλληλη επεξεργασία, κατά την οποία οι δημιουργούμενοι «μεμβρανικοί πόροι» κλείνουν. Έτσι, η ηλεκτροπόρωση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο η μεμβράνη του κυττάρου που εκτίθεται σε μικρούς χρονικά παλμούς υψηλού ηλεκτρικού πεδίου, μπορεί παροδικά να αποσταθεροποιηθεί και να δημιουργήσει «μεμβρανικούς πόρους» οι οποίοι στη συνέχεια κλείνουν (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση εισαγωγής εξωκυτταρικού DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροπόρωσης.
http://www.eurekah.com/dbimages/magnani/01_1.jpg

Η εφαρμογή των παλμών του ηλεκτρικού πεδίου πρέπει να είναι τέτοια ώστε η ηλεκτροπόρωση να μη δημιουργεί μόνιμη καταστροφή των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αποσταθεροποίησης της μεμβράνης ή της δημιουργίας «μεμβρανικών

πόρων», η κυτταρική μεμβράνη είναι πολύ διαπερατή από διάφορα μόρια τα οποία βρίσκονται στο περιβάλλον μέσο. Το μέγεθος των μορίων αυτών είναι είτε από πολύ μικρό όπως ιόντα, σουκρόζη ή δείκτες, ή πολύ μεγάλο όπως πρωτεΐνες, RNA ή DNA.

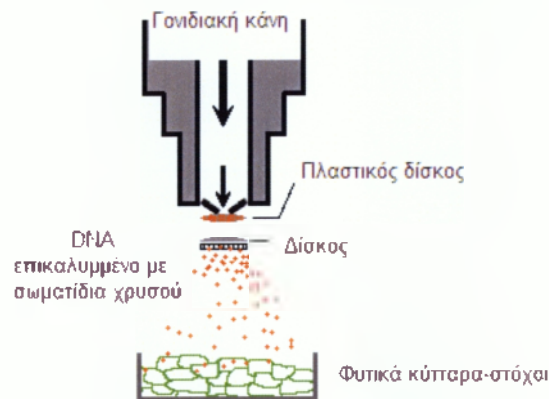
Η κυτταρική διαπερατότητα με τη χρήση παλμών ηλεκτρικού πεδίου έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων συμβατικών μεθοδολογιών. Είναι μια φυσική μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλούς και διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους ή είδη. Στην ηλεκτροπόρωση η αποδοτικότητα ως προς την μεταφορά μορίων, ανεξαρτήτου μεγέθους είναι γενικά μεγαλύτερη από τις άλλες μεθοδολογίες. Είναι μη διεισδυτική, μη χημική (μη τοξική) και γενικά δεν επηρεάζει τις βιολογικές δομές των κυττάρων-στόχων. Από την άλλη πλευρά, τα μειονεκτήματα της μεθοδολογίας αυτής, τουλάχιστον κατά την ηλεκτροπόρωση των πρωτοπλαστών, είναι ο μεγάλος αριθμός κυττάρων που απαιτούνται ανά πείραμα, η διεργασία καθώς και οι πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την έκβαση των αποτελεσμάτων όπως η χρονική διάρκεια και η ένταση του ρεύματος.

Αν και η βασική φαινομενολογία της ηλεκτροπόρωσης είναι γνωστή, ο μοριακός μηχανισμός της αλληλεπίδρασης της κυτταρικής μεμβράνης και του ηλεκτρικού πεδίου είναι άγνωστος. Το ηλεκτρικό πεδίο που συνήθως επάγεται από ένα παλμό σταθερού ηλεκτρικού ρεύματος μικρής χρονικής διάρκειας, διεγείρει το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης λαμβάνει την κρίσιμη τιμή, δημιουργείται μια ηλεκτρική βλάβη της μεμβράνης. Η τιμή αυτού του κρίσιμου δυναμικού είναι περίπου 1 V, αλλά εξαρτάται από το μήκος των παλμών που μπορεί να είναι είτε τετραγωνικά κύματα παλμών, διάρκειας 100 μs, είτε κύματα με εκθετική εξασθενημένη χωρητικότητα διάρκειας ms. Η σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή ο τύπος των κυττάρων και το είδος του φυτού απ' όπου προέρχονται οι πρωτοπλάστες, επηρεάζει την κρίσιμη τιμή του δυναμικού της μεμβράνης (Χατζόπουλος, 2001).

4.4.3 Βομβαρδισμός σωματιδίων

Η βασική αρχή του βομβαρδισμού σωματιδίων για τη μεταφορά γονιδίων είναι η χρήση επιταχυνόμενων με μεγάλη ταχύτητα σωματιδίων-μικροπροεξοχών ώστε να διαπεράσουν τις εξωτερικές κυτταρικές στοιβάδες ή τα κυτταρικά τοιχώματα και να εισαχθούν μέσα στα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά βεβαίως πρέπει να επιζήσουν ώστε να εκφράσουν, και πολλές φορές να διαιωνίσουν, τη γενετική πληροφορία που εισήχθη με το σωματίδιο. Αν και η τεχνική ή ο μηχανισμός ονομάστηκε στην αρχή βιολιστική,

σήμερα αναφέρεται ως βομβαρδισμός σωματιδίων, βομβαρδισμός μικροπροεξοχών, επιταχυντής σωματιδίων, το γονιδιακό όπλο ή το όπλο σωματιδίων (Εικόνα 5). Τα σωματίδια-μικροπροεξοχές στην ουσία είναι σωματίδια ανενεργού υλικού όπως χρυσός ή βολφράμιο καλυμμένα συνήθως από DNA ή άλλα βιομόρια όπως RNA, ή πρωτεΐνες.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση με την τεχνική 'βομβαρδισμός σωματιδίων'.
<http://www.artsci.wustl.edu/~anthro/blurb/fg8.t.gif>

Το DNA συνδέεται πάνω στα σωματίδια βολφραμίου με συν-καθίζηση παρουσία CaCl_2 και σπερμιδίνης, ενώ στα σωματίδια χρυσού παρουσία αιθανόλης. Γενικά, και οι δύο τρόποι είναι αποτελεσματικοί. Παρ' όλα αυτά, όμως, ο τρόπος καθίζησης θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να αποφεύγεται η οξείδωση, η συσσωμάτωση ή η καθίζηση των σωματιδίων πριν την καθίζηση του DNA καθώς επίσης θα πρέπει να υπάρχει και ένας συγκεκριμένος λόγος ποσότητας DNA / ποσότητα σωματιδίων.

Η μεταφορά γονιδίων με αυτή τη μέθοδο είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί είναι αποτελεσματική στον σταθερό μετασχηματισμό οργανισμών που διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν αποτύχει. Εφαρμόζεται εύκολα, έχει ευρύτερο φάσμα από τη μέθοδο του αγροβακτηρίου και όχι ιδιαίτερα υψηλό κόστος (Χατζόπουλος, 2001).

Οι βαλιστικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα επιτυχούς μεταφοράς του ανασυνδυασμένο DNA είναι:

- Ο βαθμός των νεκρωμένων κυττάρων λόγω βομβαρδισμού.
- Η ταχύτητα, η σύσταση και το μέγεθος των μικροσωματιδίων.
- Ο τρόπος σύνδεσής του DNA με τα σωματίδια (Χατζόπουλος, 2001).

4.4.4 Χημική και μηχανική μεταφορά γονιδίων

Η μεθοδολογία της εισαγωγής DNA σε πρωτοπλάστες με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG), όπως και σ' όλες τις τεχνικές της απ' ευθείας μεταφοράς γονιδίων, δεν

απαιτεί κάποιους ιδιαίτερους φορείς, διότι η εισαγωγή του DNA είναι μια χημική διαδικασία (Χατζόπουλος, 2001). Παρότι δεν είναι ξεκάθαρος ο ρόλος της πολυαιθυλενική γλυκόλη στην εισαγωγή του DNA στους πρωτόπλαστες, πιστεύεται ότι προκαλεί αναστρέψιμη μεταβολή της κυτοπλασματικής μεμβράνης η οποία επιτρέπει την είσοδο των μακρομορίων. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται σπάνια εξαιτίας της μειωμένης επιτυχίας μετασχηματισμού (περίπου 1-2 %) και της ανικανότητας πολλών ειδών να αναπαραχθούν σε φυτά από πρωτοπλάστες (περίπου 0,1%) καθιστώντας όλη τη μέθοδο δραστική κατά 0,0004% (Paszkowski *et al.*, 1984).

Εντούτοις, η χημική ή φυσική μεταφορά του DNA με οποιοδήποτε πρωτόκολλο είναι μια απλή διεργασία. Τα περισσότερα φυτά μεγάλης εμπορικής σημασίας δεν επιδέχονται την ίδια πειραματική προσέγγιση τουλάχιστον στο επίπεδο της ιστοκαλλιέργειας, διότι αυτή εξαρτάται από το είδος, την ποικιλία ακόμη και το γονίδιο που εισάγεται. Παρόλα αυτά όμως έχει γίνει αρκετά μεγάλη πρόοδος στον τομέα της αναγέννησης φυτών από πρωτοπλάστες σε εμπορικές καλλιέργειες μονοκότυλων όπως στο ρύζι και στο καλαμπόκι (Χατζόπουλος, 2001)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Με την αυξανόμενη εισαγωγή στην Ευρωπαϊκή αγορά γενετικά τροποποιημένων τροφίμων κυρίως από τις ΗΠΑ, παρουσιάζεται η ανάγκη να αναπτυχθούν κατάλληλες μέθοδοι για την αποτελεσματική ανίχνευση των τροφίμων εκείνων που περιέχουν συστατικά από γενετικά τροποποιημένα φυτά. Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα έχει θεσπίσει τους κανονισμούς 1829/2003 και 1830/2003 για τα γενετικά τροποποιημένα προϊόντα τα οποία πρέπει να σημαίνονται εφόσον βεβαίως μπορούν να διακριθούν από τα αντίστοιχα «παραδοσιακά» προϊόντα με επιστημονικές και αναλυτικές μεθόδους.

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά περιέχουν επιπλέον γενετικές πληροφορίες σε σχέση με τα παραδοσιακά φυτά, εφόσον έχουν εισαχθεί σε αυτά ξένα γονίδια. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη ανίχνευσης της «ξένης» γενετικής πληροφορίας δηλαδή των ξένων DNA αλληλουχιών ως απόδειξη ότι τα φυτά έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (ή PCR =Polymerase Chain Reaction). Εναλλακτικά ή και παράλληλα υπάρχει δυνατότητα σε ορισμένες περιπτώσεις να ανιχνευθεί και η πρωτεΐνη που παράγεται από το γενετικά τροποποιημένο DNA με τις κλασικές μεθόδους ανοσοδοκιμασιών όπως η ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

5.1 Ανίχνευση DNA ή πρωτεϊνών;

Στο ερώτημα εάν είναι καλύτερη η ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων πρωτεϊνών ή γενετικά τροποποιημένου DNA στα τρόφιμα που προέρχονται από GMOs, φαίνεται ότι τα περισσότερα πλεονεκτήματα παρουσιάζονται στην ανίχνευση DNA και αυτό γιατί:

- ♦ Οι πρωτεΐνες καθώς είναι θερμο-ευαίσθητα μόρια, αποικοδομούνται με την επεξεργασία των τροφίμων και δεν μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν. Το DNA απεναντίας καταστρέφεται ελάχιστα με τη θερμική επεξεργασία γιατί είναι πιο ανθεκτικό μόριο και επομένως έχει περισσότερες πιθανότητες να ανιχνευτεί σε ένα δείγμα.
- ♦ Η μέθοδος PCR που ανιχνεύει DNA είναι πολύ πιο ευαίσθητη από τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης πρωτεϊνών. Η μέθοδος ELISA που βασίζεται στην χρήση

αντισωμάτων για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μπορεί να είναι 100 φορές λιγότερο ευαίσθητη από ότι η μέθοδος PCR.

- ♦ Η μέθοδος PCR για την ανίχνευση DNA, μπορεί να απομονώσει ακόμη και ένα ΓΤ συστατικό που βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση σε ένα δείγμα.
- ♦ Τέλος, η γενετική πληροφορία, δηλαδή το DNA, βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα του φυτού και επομένως θα βρίσκεται σε οποιοδήποτε τμήμα του φυτού χρησιμοποιηθεί για τρόφιμο (σπόροι, καρποί, φύλλα, ρίζες κ.λπ.). Σε αντίθεση, οι πρωτεΐνες μπορεί να εκφράζονται μόνο σε ορισμένα τμήματα του φυτού και να είναι τελείως απύσες από άλλα.

Επομένως ένα πολύ μεγάλο φάσμα γενετικά τροποποιημένων τροφίμων μπορεί να αναλυθεί με τη μέθοδο PCR, όπως προϊόντα καλαμποκιού (αλεύρι, πάστα, φύτρα, δημητριακά από αλεύρι, ποπ κόρν, πατατάκια αλευριού, γλυκίσματα) και προϊόντα σόγιας (φασόλια σόγιας, κρέμα ή γάλα σόγιας, προϊόντα κρέατος σόγιας, λεκιθίνη σόγιας και ακόμα λάδι σόγιας σε ορισμένες περιπτώσεις που δεν έχει υποστεί πολύ υψηλή επεξεργασία).

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου PCR είναι:

- ♦ Απαιτεί εξειδικευμένα μηχανήματα και προσωπικό.
- ♦ Δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε επεξεργασμένες τροφές.
- ♦ Είναι περίπου 10 φορές πιο ακριβή από την μέθοδο ELISA (κοστίζει περίπου στην Ελλάδα 250-350€ ανά τεστ σε σχέση με περίπου 10€ ανά τεστ της ELISA) (European Commission, 2000).

5.2 Απομόνωση DNA από τα δείγματα

Προτού εφαρμοστεί η τεχνική της PCR για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε δείγματα, είναι απαραίτητο το DNA που υπάρχει μέσα στα δείγματα υπό ανάλυση, να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα μακρομόρια (πρωτεΐνες, λίπη και υδατάνθρακες) και να απομονωθεί (DNA extraction) (Gachet *et al.*, 1999).

Μέχρι πριν από λίγα χρόνια η απομόνωση του DNA από φυτικά κύτταρα ήταν μια αρκετά δύσκολη και αμφίβολη διαδικασία. Η δυσκολία εστιαζόταν σε δύο σημεία: α) στο σπάσιμο των φυτικών κυττάρων (λόγω του κυτταρικού τοιχώματος) και β) στην απομόνωση του DNA, η καθίζηση του οποίου παρεμποδιζόταν από διάφορες ουσίες

φυτικής προέλευσης. Σήμερα, η δυσκολία αυτή έχει ξεπεραστεί σε μεγάλο βαθμό και υπάρχουν μέθοδοι απομόνωσης DNA από φυτικά κύτταρα εύκολες και οικονομικές (Σκούρας, 1993).

5.3 Επιλογή DNA αλληλουχιών-στόχων για PCR

Για την εφαρμογή της τεχνικής της PCR, πρέπει πρώτα να καθοριστεί ποια θα είναι η αλληλουχία-στόχος, δηλαδή η αλληλουχία DNA η οποία θα πολλαπλασιαστεί επιλεκτικά και θα ανιχνευτεί έτσι ώστε να αποτελέσει απόδειξη ότι κάποιο δείγμα περιέχει γενετικά τροποποιημένο DNA.

Τρεις βασικές κατηγορίες αλληλουχιών-στόχων μπορούν να επιλεγούν για την ανίχνευση των GMOs:

- Ρυθμιστικές αλληλουχίες των διαγονιδίων: Αυτές μπορεί να είναι υποκινητές, όπως ο υποκινητής P35S (υποκινητής που απομονώνεται από τον ιό της μωσαϊκής του κουνουπιδιού-cauliflower mosaic virus) ή η ρυθμιστική αλληλουχία *Tnos* (που ρυθμίζει το τέλος της μεταγραφής της συνθετάσης της νοπαλίνης στα αγροβακτήρια) (Gachet *et al.*, 1999).
- Γονίδια-δείκτες αναγνώρισης: Ακολουθούν το διαγονίδιο σε όλη τη διαδικασία γενετικής τροποποίησης γιατί επιτρέπουν την επιλογή των διαγονιδιακών φυτών από τα μη διαγονιδιακά. Είναι συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή ζιζανιοκτόνα (Gachet *et al.*, 1999).
- Τα διαγονίδια: Τα γονίδια που εισάγονται στο φυτό με σκοπό να του δώσουν μια επιθυμητή ιδιότητα. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την φωσφονοθρισινο-ακετυλοτρανσφεράση που δίνει ανθεκτικότητα σε ορισμένα ζιζανιοκτόνα, ή το γονίδιο *cryA(h)* που κωδικοποιεί μια δ-ενδοτοξίνη ειδική για ορισμένα είδη εντόμων, τα οποία υπάρχουν σε φυτά που κυκλοφορούν στην Ευρωπαϊκή αγορά (Gachet *et al.*, 1999).

Για να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας-στόχου με PCR, χρειάζεται να υπάρχουν και οι κατάλληλοι εκκινητές (primers), δηλαδή τα ζεύγη ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών που χρησιμεύουν για την έναρξη της αντιγραφής του DNA με την DNA πολυμεράση.

Οι εκκινητές αυτοί είναι συνήθως προκατασκευασμένοι. Στον Πίνακα 5 αναφέρονται οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται και οι αλληλουχίες-στόχοι για την ανίχνευση ορισμένων γονιδίων που περιέχονται σε γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα.

Πίνακας 5: Οι Εκκινητές και οι Αλληλουχίες-Στόχοι για τις Δοκιμασίες Ανίχνευσης Γενετικά Τροποποιημένης Σόγιας και Καλαμποκιού

| Δοκιμασία | Εκκινητές | DNA αλληλουχία-στόχος | Μέγεθος PCR προϊόντος |
|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| "Roundup Ready" σόγια | RR01/RR02 | EPSPS γονίδιο | 508 bp |
| | RR04/RR05 | EPSPS γονίδιο | 179 bp |
| | GMO5/GMO9 | EPSPS γονίδιο | 447 bp |
| | GMO7/GMO8 | EPSPS γονίδιο | 169 bp |
| | P35s-f2/petu-r1 | EPSPS γονίδιο | 171 bp |
| "Maximizer" καλαμπόκι | CRYIA1/CRYIA2 | Γονίδιο ενδοτοξίνης | 420 bp |
| | CRYIA3/CRYIA4 | Γονίδιο ενδοτοξίνης | 189 bp |
| | Cry03/Cry04 | Γονίδιο ενδοτοξίνης | 211 bp |

(Gachet *et al.*, 1999)

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, η ανίχνευση του γονιδίου EPSPS (EpoIpryruvyl-Shikinate-5-Phosphate-Synthase) που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο RoundUp, μπορεί να γίνει με διάφορα ζεύγη εκκινητών.

5.4 Δοκιμασίες Ελέγχου της PCR

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR είναι επίσης απαραίτητο να γίνουν πολλαπλοί έλεγχοι της ίδιας της τεχνικής. Αυτοί οι έλεγχοι συνήθως περιλαμβάνουν ως «θετικούς μάρτυρες» δηλαδή δοκιμασίες κατά τις οποίες ελέγχεται αν έχουν τεθεί οι κατάλληλες χημικές παράμετροι (επιλογή εκκινητών, θερμοκρασία, χρόνος, αριθμός κύκλων, κ.λπ.) για τον επαρκή πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχου.

Συνήθως ελέγχεται η παρουσία ενός γονιδίου που συναντάται στο τρόφιμο υπό ανάλυση είτε είναι γενετικά τροποποιημένο είτε όχι, όπως π.χ. το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λεκτίνη που υπάρχει και στη διαγονιδιακή και στη μη διαγονιδιακή σόγια. Η δοκιμασία θα πρέπει να δώσει θετικό αποτέλεσμα σε οποιοδήποτε δείγμα σόγιας, αλλιώς σημαίνει ότι α) δεν υπάρχει αρκετό DNA στο δείγμα, β) οι παράμετροι της PCR δεν είναι σωστές, γ) υπάρχει κάποιος κατασταλτικός παράγοντας της όλης διαδικασίας.

Ο «αρνητικός μάρτυρας» περιλαμβάνει δοκιμασίες για τον έλεγχο πιθανής «μόλυνσης» από γενετικά τροποποιημένο DNA στο εργαστήριο. Η δοκιμασία αυτή περιλαμβάνει δείγματα που δεν περιέχουν καθόλου DNA και θα πρέπει να δώσουν

αρνητικό αποτέλεσμα. Αν μια τέτοια δοκιμασία δώσει θετικό αποτέλεσμα, τότε σημαίνει ότι υπάρχει κάπου μόλυνση στα αντιδραστήρια ή στα διαλύματα που χρησιμοποιούνται.

Επίσης, μπορεί να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα που υπάρχει αν το DNA υπό ανάλυση δεν πολλαπλασιάζεται επαρκώς, γιατί ίσως μπορεί να είναι αρκετά κατεστραμμένο. Τότε, στο αποτέλεσμα της πρώτης PCR, εφαρμόζεται μια δεύτερη PCR, με άλλους συμπληρωματικούς εκκινητές, ειδικούς για την αλληλουχία DNA που είναι υπό πολλαπλασιασμό.

5.5 Η Μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR είναι μία από τις πιο πρόσφατες επαναστατικές τεχνικές του DNA (Saiki *et al.*, 1985, Mullis *et al.*, 1986, Mullis & Faloona 1987, Saiki *et al.*, 1988) η οποία διευκόλυνε εξαιρετικά τη μελέτη και τις εφαρμογές της Μοριακής Γενετικής. Η PCR λειτουργεί ως μια εναλλακτική μέθοδος κλωνοποίησης διότι μπορεί να αναπαράγει σε μεγάλες ποσότητες και με μεγάλη ταχύτητα μια συγκεκριμένη μικρή αλληλουχία DNA που βρίσκεται μέσα σε ένα πολύπλοκο μίγμα.

Η τεχνική είναι πολύ γρήγορη, προσφέρει υψηλή ακρίβεια και αποτελεσματικότητα και έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να πολλαπλασιάσει αλληλουχίες DNA που υπάρχουν ακόμη και σε ελάχιστα αντίγραφα μέσα σε ένα μίγμα, καθώς επίσης μπορεί να απομονώσει μια αλληλουχία από ένα πολύ μικρό δείγμα.

Μια από τις βασικές προϋποθέσεις για να μπορέσει να πολλαπλασιαστεί μια δίκλωνη αλληλουχία DNA με την τεχνική της PCR είναι να είναι γνωστή η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του κάθε κλώνου. Η πληροφορία αυτή είναι απαραίτητη για να κατασκευαστούν οι «εκκινητές» της PCR, δηλαδή οι αλληλουχίες που απαιτούνται για την εκκίνηση της αντίδρασης.

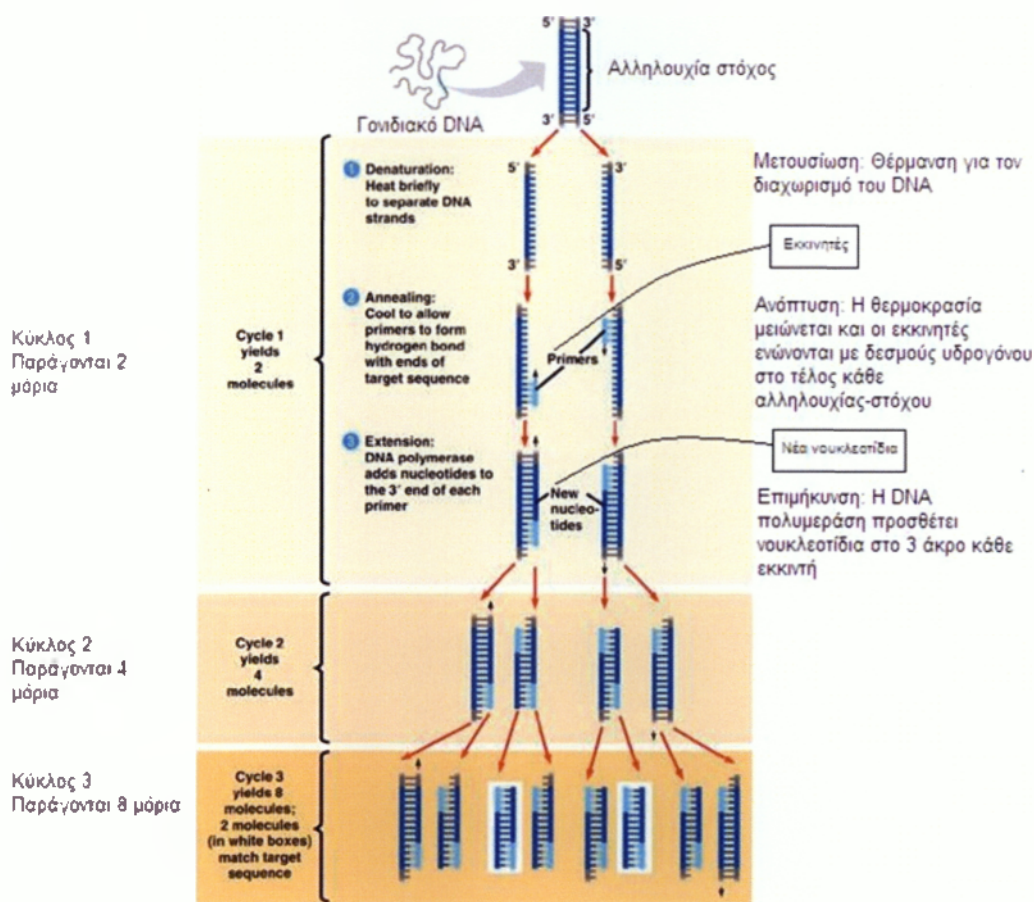
5.5.1 Τα Στάδια της PCR

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μια σειρά από κύκλους κατά τους οποίους επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία η οποία καταλήγει στον πολλαπλασιασμό της επιλεγμένης αλληλουχίας σε πολύ μεγάλες ποσότητες.

Όταν ο πρώτος κύκλος της σύνθεσης έχει ολοκληρωθεί, έχουν παραχθεί δύο νέα δίκλιωνα μόρια με βάση το αρχικό μόριο. Το μίγμα ξαναθερμαίνεται ώστε να ξανααποδιαταχθούν τα δίκλιωνα μόρια, η θερμοκρασία χαμηλώνει και ένας νέος κύκλος

σύνθεσης DNA γίνεται επειδή υπάρχουν ακόμη πολλά μόρια εκκινητές. Ο δεύτερος κύκλος παράγει τέσσερα νέα δίκλιωνα μόρια, αντίγραφα του αρχικού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές (Εικόνα 6).

Ο κάθε κύκλος διαρκεί περίπου 5 λεπτά και διπλασιάζει την ποσότητα του DNA που συντέθηκε στον προηγούμενο κύκλο. Το αποτέλεσμα είναι ότι η συγκεκριμένη επιλεγμένη αλληλουχία πολλαπλασιάζεται επί 2^n φορές, όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων που έχουν προηγηθεί. Επομένως 30 κύκλοι πολλαπλασιάζουν μια αλληλουχία πάνω από ένα δισεκατομμύριο φορές. Οι αλληλουχίες DNA που πολλαπλασιάζονται πρέπει να έχουν μήκος ως 2.000 ζεύγη βάσεων. Η μέθοδος έχει την δυνατότητα να πολλαπλασιάσει μία αλληλουχία DNA ακόμη και όταν βρίσκεται μόνο σε ένα μοναδικό αντίγραφο μέσα σε μίγμα που προέρχεται από το περιεχόμενο 10^5 κυττάρων (Saiki *et al.*, 1988).



Εικόνα 6: Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.
www.copernicusproject.ucr.edu/ssi/HSBiologyResources.htm

Τα βασικά στάδια της PCR είναι τα ακόλουθα:

1. Το γονιδιακό DNA τεμαχίζεται σε τμήματα με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων.
2. Τα τμήματα DNA υποβάλλονται σε υψηλή θερμοκρασία (92° C) για να επιτευχθεί αποδιάταξη (denaturation) των δίκλωνων μορίων σε μονόκλιωνα λόγω της λύσης των υδρογονικών δεσμών μεταξύ των κλώνων. Έτσι, η δίκλινη αλληλουχία η οποία έχει επιλεγεί για πολλαπλασιασμό διαχωρίζεται στους δύο κλώνους της. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι η αλληλουχία αυτή πρέπει να είναι γνωστής νουκλεοτιδικής σύνθεσης στο σύνολο της ή τουλάχιστον να είναι γνωστά τα τελευταία περίπου 20 νουκλεοτίδια του κάθε 3' άκρου της (Saiki *et al.*, 1988).
3. Κατασκευάζονται δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (από περίπου 20 νουκλεοτίδια το καθένα) που είναι συμπληρωματικά των 3' άκρων των δύο κλώνων της υπονήφιας για πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA που θα χρησιμεύσουν ως εκκινητές (primers) για την έναρξη μιας φυσιολογικής DNA αντιγραφής με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση. Το ένα ολιγονουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό του 3' άκρου του ενός κλώνου DNA και το άλλο ολιγονουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό του 3' άκρου του άλλου κλώνου DNA που έχουν προέλθει από την αποδιάταξη της δίκλωνης αλληλουχίας.
4. Η αρχική θερμοκρασία μειώνεται στους 50°-60°C και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια προστίθενται στο μίγμα σε πολύ μεγάλες ποσότητες για να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες που βρίσκονται στο μίγμα, δηλαδή με τα 3' άκρα των δύο κλώνων που έχουν προέλθει από την αποδιάταξη της επιλεγμένης δίκλωνης αλληλουχίας που υπήρχε στο αρχικό μίγμα (Saiki *et al.*, 1988).
5. Αφού υβριδοποιηθούν τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια με τα 3' άκρα κάθε συμπληρωματικής μονόκλωνης αλληλουχίας, δημιουργούνται δύο μόρια όπου το καθένα έχει ένα δίκλινο άκρο από 20 περίπου ζεύγη νουκλεοτιδίων και μια μονόκλινη «ουρά» μήκους ανάλογου με το μέγεθος της αρχικής αλληλουχίας.
6. Στο μίγμα προστίθενται δεοξυνουκλεοτίδια και μία ειδική θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που ονομάζεται Taq πολυμεράση (προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus* που ζει σε θερμές πηγές). Η Taq πολυμεράση λειτουργεί στις υψηλές θερμοκρασίες που διεξάγεται η PCR (Φανουράκης, 1999).
7. Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται πλέον ως εκκινητές (primers) δηλαδή σημεία έναρξης για τη σύνθεση συμπληρωματικής DNA αλυσίδας και για τις υπόλοιπες αλληλουχίες της ουράς, προκειμένου να δημιουργηθεί ξανά μια δίκλινη

αλληλουχία για ολόκληρο το μόριο της αλληλουχίας που είναι πλέον πιστό αντίγραφο της αρχικής πριν αυτή αποδιαταχθεί.

5.5.2 Τα αποτελέσματα της PCR

Η ποιότητα του αποτελέσματος της PCR εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του DNA υπό εξέταση και από το ποσοστό τεμαχισμού (fragmentation) του. Όσο μεγαλύτερη η αρχική συγκέντρωση του DNA και μικρότερος ο βαθμός τεμαχισμού του, τόσο πιο γρήγορα και αποτελεσματικά η αλληλουχία-στόχος πολλαπλασιάζεται με την PCR. Το πρόβλημα του τεμαχισμένου DNA παρουσιάζεται κυρίως όταν εξετάζονται τρόφιμα που έχουν υποστεί πολύ υψηλή επεξεργασία. Συνίσταται να ελέγχεται ο βαθμός τεμαχισμού πριν ξεκινήσει η PCR.

Το προϊόν της PCR (που ονομάζεται και “amplicon” από το amplification=πολλαπλασιασμός) που προκύπτει, ελέγχεται στη συνέχεια για το αν περιέχει σε μεγάλες ποσότητες τα τμήματα DNA με το αναμενόμενο μήκος (δηλαδή αν έχει όντως πολλαπλασιαστεί η αλληλουχία-στόχος). Ο έλεγχος γίνεται συνήθως σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης 1,5-2% με βρωμιούχο αιθίδιο (χρωστική που δεσμεύεται στο DNA και εμφανίζεται κάτω από υπεριώδες φως). Τα μόρια DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, κινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Όσα τμήματα έχουν το ίδιο μέγεθος σχηματίζουν μια ενιαία ζώνη. Η φωτογράφιση κάτω από υπεριώδες φως εμφανίζει μια έντονη ζώνη ορισμένου μήκους που αντιστοιχεί στην πολλαπλασιασμένη με PCR αλληλουχία. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης (Σκούρας, 1993).

Αν υπάρχουν αμφιβολίες για την ταυτότητα των τμημάτων DNA που έχουν προκύψει, τότε το προϊόν της PCR μπορεί να τεθεί σε διάφορες επιπλέον δοκιμασίες όπως:

- ♦ Ανίχνευση με ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (αποτύπωση κατά Southern ή Southern Blotting). Το μίγμα προς ανάλυση περνάει από ηλεκτροφόρηση πηκτώματος (gel electrophoresis). Στη συνέχεια, με την προσθήκη αλκαλικού διαλύματος το DNA αποδιατάσσεται δηλαδή διαχωρίζονται οι δύο κλώνοι μεταξύ τους και προκύπτει μονόκλωνο DNA. Το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε ένα φίλτρο νιτροκυτταρίνης και το DNA του πηκτώματος μεταφέρεται πάνω στο φίλτρο μέσω διάχυσης

τριχοειδών (capillary action), διατηρώντας όμως τις ίδιες ακριβώς αρχικές θέσεις (δηλαδή τις θέσεις των ζωνών) που είχαν οι ζώνες στο πήκτωμα. Το φίλτρο δηλαδή λειτουργεί όπως το στυπόχαρτο στο οποίο αποτυπώνονται με ακρίβεια οι θέσεις κάθε γράμματος ενός κειμένου. Το φίλτρο επωάζεται κάτω από ειδικές συνθήκες με ένα ειδικό ραδιοσημασμένο ανιχνευτή που είναι μία μονόκλωνη αλληλουχία DNA. Ο ανιχνευτής θα υβριδοποιηθεί με τις συμπληρωματικές βάσεις δημιουργώντας ένα δίκλωνο μόριο, μόνο με το περιοριστικό τμήμα DNA με το οποίο είναι συμπληρωματικός. Τα σημεία όπου έχει γίνει υβριδοποίηση εντοπίζονται με αυτοραδιογραφία.

- ♦ Τεμαχισμός με περιοριστικά ένζυμα που είναι γνωστό ότι τεμαχίζουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις και θα προκύψουν γνωστού μήκους τμήματα DNA.
- ♦ Ταυτοποίηση αλληλουχίας, ώστε να προσδιοριστεί η σειρά των βάσεων του DNA (sequencing). Για την ταυτοποίηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιούνται κυρίως η μέθοδος Maxam & Gilbert και η μέθοδος Sanger. Η μέθοδος Sanger αναπτύχθηκε από τον Sanger και τους συνεργάτες του το 1980 (Sanger *et al.*, 1980) και αποτελεί σήμερα την βάση των πιο ταχέων αυτοματοποιημένων και ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων ταυτοποίησης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ ΜΕ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

Οι στόχοι της γενετικής τροποποίησης όσο αφορά τη γεωργία είναι η βελτίωση κυρίως αγρονομικών αλλά και ποιοτικών χαρακτηριστικών των φυτών. Τέτοια αγρονομικά χαρακτηριστικά είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε ζιζανιοκτόνα, η ανθεκτικότητα σε έντομα, ιούς, μύκητες και βακτήρια, η ανθεκτικότητα στη ξηρασία και στην αλμυρότητα του εδάφους, η συμπεριφορά ως προς τα μέταλλα (Engel, 2002). Στη συνέχεια θα αναφερθούμε διεξοδικότερα στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα.

6.1 Δημιουργία φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα

Είναι γνωστό ότι ένα ζιζανιοκτόνο προκαλεί το θάνατο στα ευαίσθητα φυτά, ενεργώντας σε κάποια συγκεκριμένη θέση, που λέγεται «θέση δράσης», στο κυτταρικό και βιοχημικό επίπεδο. Η «θέση δράσης» είναι συνήθως κάποιο ένζυμο που συμμετέχει στην πραγματοποίηση, μιάς ζωτικής σημασίας, λειτουργίας για το φυτό. Η εξουδετέρωση του συγκεκριμένου ενζύμου συνεπάγεται το σταμάτημα της λειτουργίας αυτής και το θάνατο του φυτού.

Ανθεκτικά στο ζιζανιοκτόνο είδη φυτών ή άλλων οργανισμών, συνήθως οφείλουν την ανθεκτικότητά τους σε έναν από τους παρακάτω δύο λόγους:

- ♦ Είτε έχουν τη θέση δράσης του ζιζανιοκτόνου διαφοροποιημένη κατά τρόπο που ενώ αυτή επιτελεί τον βιολογικό της ρόλο δεν επηρεάζεται από το ζιζανιοκτόνο. Στη περίπτωση αυτή λέμε ότι η ανθεκτικότητα οφείλεται σε ανθεκτική θέση δράσης, συνήθως στη δράση κάποιου ενζύμου.
- ♦ Είτε έχουν κάποιο μηχανισμό που αδρανοποιεί γρήγορα το ζιζανιοκτόνο πριν φτάσει στη θέση δράσης του. Υπεύθυνο για το μηχανισμό αδρανοποίησης είναι κάποιο άλλο ένζυμο που καταλύει αντιδράσεις διάσπασης του ζιζανιοκτόνου. Στην περίπτωση αυτή γίνεται λόγος για ανθεκτικότητα λόγω «αδρανοποίησης» του ζιζανιοκτόνου (Γιαννοπολίτης, 1999α).

Ο μετασχηματισμός των φυτών από ευαίσθητα σε ανθεκτικά στα ζιζανιοκτόνα επιτεύχθηκε με τη μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας από άλλους οργανισμούς, αξιοποιώντας τον έναν ή τον άλλο μηχανισμό ανάλογα με το ζιζανιοκτόνο. Τα κύρια

ζιζανιοκτόνα στα οποία δίνεται ανθεκτικότητα με τη τροποποίηση είναι το glyphosate (Roundup) με το οποίο και θα ασχοληθούμε, το glyphosinate (Basta), το bromoxynil (Buctril) και οι σουλφονουλουργίες.

6.1.1 Ανθεκτικότητα στο Glyphosate

Το ζιζανιοκτόνο glyphosate (N-φωσφονονεθυλογλυκίνη) έχει μια απλή μοριακή δομή και είναι ένα ανάλογο της γλυκίνης (Don Grierson, 1991). Είναι μη εκλεκτικό, ευρέως φάσματος μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο με καλή αποτελεσματικότητα και σε πολυετή ζιζάνια (Γιαννοπολίτη, 1999α). Είναι φιλικό προς το περιβάλλον, καθ' ότι αποικοδομείται πολύ γρήγορα σε μη τοξική χημική ένωση στο έδαφος. Ισχυρές ενδείξεις πιστοποιούν ότι υπάρχει ένας μόνο βιοχημικός στόχος, παρόλο που δεν μπορούν να αποκλειστούν άλλοι στόχοι (Χατζόπουλος, 2001).

Το glyphosate οφείλει τη ζιζανιοκτόνο αποτελεσματικότητά του στην ικανότητα που έχει να σταματά τη σύνθεση ορισμένων απαραίτητων για τα φυτικά κύτταρα αρωματικών αμινοξέων, παρεμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου EPSPS synthase το οποίο είναι το ένζυμο-κλειδί στην σχετική αλληλουχία των αντιδράσεων βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (Μπαλαγιάνης, 1994). Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα αρωματικών αμινοξέων ελαττώνονται με τη προσθήκη glyphosate και ότι η αναστολή της ανάπτυξης καταστέλλονται με τη προσθήκη αρωματικών αμινοξέων (Χατζόπουλος, 2001).

Ελαφρά διαφοροποιημένο το ένζυμο EPSPS synthase και με σχετική ανθεκτικότητα στο glyphosate, εντοπίστηκε σε ορισμένα βακτήρια (π.χ. *Salmonella*) αλλά και σε ορισμένα φυτά (π.χ. πετούνια). Παράλληλα διαπιστώθηκε η παρουσία ενός αδρανοποιητικού ενζύμου (του glyphosate oxidoreductase) σε ορισμένους μικροοργανισμούς που αποικοδομούν ταχύτατα το glyphosate στο έδαφος (Γιαννοπολίτης, 1999α).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των φυτών στο glyphosate επιτυγχάνεται με δύο κυρίως τρόπους: 1) με τη μεταφορά σε φυτά ενός μεταλλαγμένου γονιδίου από το βακτήριο *Salmonella typhimurium* που ελέγχει τη σύνθεση ενζύμου EPSPS μειωμένης συγγένειας για το glyphosate, 2) με την υπερέκφραση του κανονικού ενζύμου EPSPS. Τα ανθεκτικά φυτά επιβιώνουν σε δόση περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερη από αυτήν που σκοτώνει τα κανονικά φυτά (Λουλακάκης, 1999).

Τα γενετικά τροποποιημένα αυτά φυτά αναφέρονται στις ΗΠΑ ως Roundup Ready (Γιαννοπολίτης, 1999α).

6.2 Οφέλη και επιπτώσεις από τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά με ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα είναι τα πλέον διαδεδομένα. Το ποσοστό τους ανέρχεται σε αυτό του 75% επί του συνόλου των γενετικά τροποποιημένων φυτών παγκόσμια για το 2002.

Με τα γενετικά τροποποιημένα φυτά γίνεται δυνατή η αξιοποίηση ήδη γνωστών ζιζανιοκτόνων σε καλλιέργειες που λόγω έλλειψης φυσικής ανθεκτικότητας ήταν πριν αδύνατη η χρήση τους. Οι δυνατότητες που προσφέρει σήμερα η γενετική μηχανική στο ζιζανιολογικό τομέα αποτελούν ουσιαστικά ένα πρωτοποριακό συμπλήρωμα της χημικής καταπολέμησης που δίνει ταχύτερα, οικονομικότερα και πιο προβλέψιμα αποτελέσματα απ' ό τι η κλασική μέθοδος νέων ζιζανιοκτόνων.

Τα οφέλη για τον καλλιεργητή από τη χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα, μπορεί να είναι αύξηση της απόδοσης λόγω αποτελεσματικότερης καταπολέμησης των ζιζανίων ή και μείωση του κόστους παραγωγής αν το νέο σύστημα καταπολέμησης είναι οικονομικότερο. Αυτό εξαρτάται κυρίως απ' την καλλιέργεια και ιδιαίτερα από το πόσο επαρκή και οικονομικά είναι τα ήδη διαθέσιμα για τη συγκεκριμένη καλλιέργεια μέσα καταπολέμησης.

Εκτός από αυτά με την ενσωμάτωση ανθεκτικότητας σε μεταφυτρωτικά ζιζανιοκτόνα ευρέως φάσματος επιτυγχάνονται και άλλα σημαντικά οφέλη όπως:

- ♦ Γίνεται δυνατή η αντιμετώπιση του συνόλου των ζιζανίων με ένα απλούστερο πρόγραμμα ζιζανιοκτονίας. Δεν υπάρχει συνήθως ανάγκη χρήσης προφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων ούτε συνδυασμών ζιζανιοκτόνων ανάλογα με τη χλωρίδα των ζιζανίων.
- ♦ Ο καλλιεργητής αποκτά μεγαλύτερη ευελιξία στο χρόνο εφαρμογής μιάς και η ανθεκτικότητα της καλλιέργειας στο ζιζανιοκτόνο, είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη από το στάδιο ανάπτυξης της. Επομένως έχει την ευχέρεια να επιλέξει την χρονική περίοδο που εκείνος θα κρίνει για να εφαρμόσει ζιζανιοκτονία. Έτσι έχει την δυνατότητα να περιμένει και να κάνει την εφαρμογή. Μάλιστα αφού η εφαρμογή γίνεται σε φυτρωμένα ήδη ζιζάνια, μπορεί να προσαρμόσει τη δόση του

ζιζανιοκτόνου ανάλογα με τη πυκνότητα, το μέγεθος και το είδος των ζιζανίων (Γιαννοπολίτης, 1999β).

Είναι φανερό ότι για να επωφεληθεί τα μέγιστα από τα δύο αυτά πλεονεκτήματα ο καλλιεργητής θα χρειαστεί καλύτερη οργάνωση και εκπαίδευση.

Η αντοχή στα ζιζανιοκτόνα είναι ένας όρος που αναφέρεται στην ικανότητα των φυτών να αντέχουν στη χρήση ορισμένων χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των ζιζανίων. Η ιδιότητα αυτή παρέχει πολλά οφέλη, συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητας για τους καλλιεργητές να επιλέξουν τη χρήση ζιζανιοκτόνων με περισσότερο ευνοϊκά περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά, καθώς και να ελαττώσουν τη συνολική ανάγκη για χρήση ζιζανιοκτόνων και άλλων γεωργικών εισροών.

Με τη βοήθεια της βιοτεχνολογίας, αρκετές καλλιέργειες έχουν αποκτήσει αντοχή στο ζιζανιοκτόνο Roundup. Τα φυτά αυτά παράγουν μια πρωτεΐνη η οποία μοιάζει πολύ με εκείνη την οποία αδρανοποιεί το ζιζανιοκτόνο Roundup, αλλά αρκετά διαφορετική από αυτή ώστε να μην προκαλεί ανόσχεση στις ζωτικές διαδικασίες του φυτού. Ως αποτέλεσμα, σ' αυτές τις καλλιέργειες, που ονομάζονται Roundup Ready, οι καλλιεργητές δε χρειάζεται να χρησιμοποιούν πολλά ζιζανιοκτόνα για τον έλεγχο των ζιζανίων. Αντίθετα, μπορούν να χρησιμοποιούν μόνο το Roundup. Μπορούν να αποφύγουν έτσι τη χρήση ορισμένων προφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων, τα οποία χρησιμοποιούνται προληπτικά κατά των ζιζανίων που ενδέχεται να εμφανιστούν στο μέλλον. Το όλο σύστημα είναι πιο ευέλικτο επειδή ο αγρότης μπορεί να εφαρμόσει το ζιζανιοκτόνο μόνο ανάλογα με τις ανάγκες του και ευρύτερα χρονικά περιθώρια εφαρμογής. Συμπερασματικά, απλοποιείται ο έλεγχος των ζιζανίων.

Οι καλλιέργειες τύπου Roundup Ready προσφέρουν και άλλα περιβαλλοντικά πλεονεκτήματα. Επειδή το Roundup δεν παραμένει στο έδαφος, η αμειψισπορά, η οποία είναι ωφέλιμη και επιδιωκόμενη γεωργική πρακτική, καθίσταται περισσότερο ευέλικτη μετά από χρήση Roundup. Σε πολλές περιπτώσεις, χρειάζεται μόνο μία εφαρμογή του, και οι λιγότερες διαδρομές μέσα στο χωράφι για την εφαρμογή του σημαίνουν μικρότερη συμπίεση του εδάφους. Η δυνατότητα χρήσης του Roundup καθ' όλη την καλλιεργητική περίοδο είναι συμβατή με όλες τις γεωργικές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων διατήρησης (κατευθείαν σπορά χωρίς καλλιέργεια του εδάφους) οι οποίες βοηθούν στην πρόληψη της διάβρωσης του εδάφους. Το Roundup επίσης αντιμετωπίζει αποτελεσματικά το πρόβλημα της παρουσίας μεγάλου αριθμού ζιζανίων, ενός παράγοντα που πιθανόν να αποτρέπει κάποιους καλλιεργητές να υιοθετούν συστήματα διατήρησης.

Δύο καλλιέργειες τύπου Roundup Ready διατέθηκαν στην αγορά το 1996, η σόγια και η canola (ελαιοκράμβη ανοιξιάτικης σποράς). Η παραγωγή σόγιας η οποία προήλθε από καλλιέργεια φυτών σόγιας τύπου Roundup Ready ανήλθε στο 1 έως 2% της συνολικής παραγωγής σόγιας των ΗΠΑ το 1996. Η αντίστοιχη παραγωγή του 1997 ήταν πάνω από το 10% της συνολικής παραγωγής σόγιας. Σε χωράφια που σπάρθηκαν με σόγια τύπου Roundup Ready χρησιμοποιήθηκαν από 9 έως 39% λιγότερα ζιζανιοκτόνα απ' ό τι σε χωράφια που σπάρθηκαν με τις κλασικές ποικιλίες σόγιας. Οι τρεις απ' τους τέσσερις γεωργούς χρησιμοποίησαν Roundup μόνο μία φορά για έλεγχο των ζιζανίων, και το 24% το χρησιμοποίησαν δύο φορές. Παρομοίως, 80% των αγροτών που έσπειραν ελαιοκράμβη τύπου Roundup Ready, χρησιμοποίησαν το Roundup μόνο μία φορά. Οι καλλιεργητές τόσο σόγιας όσο και ελαιοκράμβης παρατήρησαν βελτίωση στην παραγωγή κυρίως λόγω του αποτελεσματικότερου ελέγχου των ζιζανίων (Monsanto Ελλάς, 1997).

Από τους διάφορους πιθανούς κινδύνους που παρουσιάζονται σε σχέση με τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά με ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα θα πρέπει να προσεχθούν οι παρακάτω:

- ♦ Με τα φυτά αυτά, δεν αποφεύγουμε τη χρήση ζιζανιοκτόνων και τους κινδύνους υπολειμμάτων και ρύπανσης του περιβάλλοντος που αυτή συνεπάγεται. Προς το παρόν είναι αδύνατη η αποφυγή των ζιζανιοκτόνων χωρίς σοβαρή μείωση των αποδόσεων ή αύξηση των ζιζανιοκτόνων χωρίς σοβαρή μείωση των αποδόσεων ή αύξηση του κόστους παραγωγής. Το γεγονός όμως ότι τα γενετικά τροποποιημένα φυτά μπορούν να βοηθήσουν στην προτίμηση των ασφαλέστερων ζιζανιοκτόνων αποτελεί μια σημαντική εξέλιξη που πρέπει να αξιοποιηθεί. Βέβαια σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να επιτραπεί η ανάπτυξη και χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών που προωθούν τοξικότερα ζιζανιοκτόνα. Επίσης θα πρέπει να γίνουν προσπάθειες ώστε οι δυνατότητες της γενετικής μηχανικής να αξιοποιηθούν και με άλλες μη χημικές μεθόδους αντιμετώπισης των ζιζανίων (Benbrook, 2001).
- ♦ Με τα φυτά αυτά οδηγούμαστε στην επαναλαμβανόμενη χρήση λίγων ζιζανιοκτόνων (της ενσωματωμένης ανθεκτικότητας), σε μεγάλες εκτάσεις, γεγονός που θα οξύνει πολύ το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των ζιζανίων. Λόγω της αυξημένης πίεσης επιλογής μετά την επέκταση των γενετικά τροποποιημένων φυτών σε μεγάλες εκτάσεις πρέπει πράγματι να θεωρείται αναμενόμενη η επικράτηση στις περιοχές

καλλιέργειας τόσο ορισμένων ανθεκτικών ειδών ζιζανίων όσο και ανθεκτικών πληθυσμών ορισμένων ευαίσθητων ζιζανίων (Γιαννοπολίτης, 1999β).

- ♦ Το πρόβλημα αυτό το οποίο υπάρχει και σήμερα, θα ενταθεί με τη διάδοση των γενετικά τροποποιημένων φυτών και ανάλογα με το ζιζανιοκτόνο θα μειώσει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου σε λιγότερα ή περισσότερα χρόνια. Είναι απαραίτητο επομένως η διάδοση των γενετικά τροποποιημένων φυτών να συνδυαστεί με βασικά μέτρα διαχείρισης της ανθεκτικότητας στα ζιζάνια. Η εναλλαγή ζιζανιοκτόνων με διαφορετικό τρόπο δράσης θα πρέπει να επιδιώκεται ακόμα και στα γενετικά τροποποιημένα φυτά. Επίσης, θα πρέπει να αποφεύγεται η ενσωμάτωση στα καλλιεργούμενα φυτά ανθεκτικότητας σε ζιζανιοκτόνα στα οποία είναι γνωστό ότι τα ζιζάνια αναπτύσσουν εύκολα ανθεκτικότητα (Γιαννοπολίτης, 1999β).
- ♦ Μπορεί να έχουμε επίδραση σε οργανισμούς μη-στόχους ή και ωφέλιμους για τη καλλιέργεια. Σε κάποια από τα χρησιμοποιούμενα ΓΤ φυτά με ανθεκτικότητα στο Glyphosate έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζεται η δέσμευση αζώτου από το φυτό, γιατί το αζωτοβακτήριο της σόγιας *Bradyrhizobium japonicum* είναι ευαίσθητο στο ζιζανιοκτόνο. Το βακτήριο αυτό συμβιώνει με τη σόγια και δεσμεύει άζωτο από την ατμόσφαιρα που προσδίδει στο φυτό. Η ευαισθησία του βακτηρίου γίνεται πιο έντονη σε συνθήκες ξηρασίας και σε άγονα εδάφη (Benbrook, 2001).
- ♦ Η εισαγωγή των γονιδίων από άλλους οργανισμούς μπορεί να έχει επίδραση στις άλλες φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού (Benbrook, 2001). Μία από αυτές τις επιδράσεις μπορεί να είναι και η μείωση της παραγωγικότητας του φυτού. Σε έρευνα του Πανεπιστημίου της Νεμπράσκα τα έτη 1998, 1999 έγινε αρχικά σύγκριση ανάμεσα σε 13 ποικιλίες ΓΤ σόγιας με ανθεκτικότητα στο glyphosate. Στην πρώτη περίπτωση εφαρμόστηκε ζιζανιοκτονία με glyphosate ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν άλλα ζιζανιοκτόνα. Τα αποτελέσματα στις αποδόσεις ήταν περίπου τα ίδια. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των πέντε από τις πιο παραγωγικές από αυτές, με τις πέντε πιο κοντινές τους συμβατικές ποικιλίες σόγιας από τις οποίες και προήλθαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παραγωγή των συμβατικών ποικιλιών αυξημένη κατά 6% (IANR, 2000).
- ♦ Η χρήση των ΓΤ φυτών μπορεί να οδηγήσει σε μεταφορά των γονιδίων ανθεκτικότητας σε συγγενικά είδη, καλλιεργούμενα ή άγρια, που υπάρχουν στη περιοχή. Είναι πιθανό για παράδειγμα, γονίδια ανθεκτικότητας σε κάποιο ζιζανιοκτόνο να μεταφερθούν με τη γύρη (Γιαννοπολίτης, 1999β).

Στη συνέχεια αναφέρονται ορισμένοι βιολογικοί κίνδυνοι οι οποίοι αφορούν κυρίως το στάδιο κατασκευής διαγονιδιακών οργανισμών ή φυτών.

- ♦ Κατά την μεταφορά γονιδίων με την γενετική μηχανική από έναν οργανισμό σε έναν άλλον «καταργούνται» οι φυσικοί γενετικοί φραγμοί και επιτελούνται αλλαγές στο γονιδίωμα των φυτών που πιθανόν να έχουν απρόβλεπτες αρνητικές επιπτώσεις (Butler *et al.*, 1999).
- ♦ Το «ξένο» DNA όταν ενσωματωθεί σε μια περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να επηρεάσει τη ρύθμιση άλλων γειτονικών γονιδίων με πιθανές αρνητικές συνέπειες π.χ. την ενεργοποίηση ενός ανενεργού γονιδίου με αποτέλεσμα την παραγωγή τοξίνης (Conner and Jeanne, 1999).
- ♦ Επισημαίνεται ο κίνδυνος από την εισαγωγή της αλληλουχίας DNA του υποκινητή CaMV 35S σχεδόν σε όλα τα γενετικά τροποποιημένα φυτά που βρίσκονται στο εμπόριο ή σε πειραματικές καλλιέργειες. Θεωρείται ότι ο υποκινητής αυτός μπορεί να ενεργοποιήσει γονίδια που υπάρχουν στα φυτά σε λανθάνουσα κατάσταση με πιθανές απρόβλεπτες συνέπειες στη γονιδιακή έκφραση (Ho *et al.*, 1998).

Εκτός των άλλων οι πιθανοί περιβαλλοντικοί κίνδυνοι είναι:

- ♦ Μεταφορά γονιδίων των γενετικά τροποποιημένων φυτών σε συγγενή φυτά ή σε ζιζάνια μέσω της γύρης και τη δημιουργία «υπερανθεκτικών» παρασίτων (Klinger, 1998).
- ♦ Οι καλλιέργειες που φέρουν το γονίδιο Bt (π.χ. καλλιέργειες Bt-καλαμποκιού) είναι εντομοανθεκτικές εφόσον παράγουν την τοξίνη Bt που εξοντώνει ορισμένα είδη εντόμων. Η συνεχή έκθεση στην τοξίνη Bt μπορεί να οδηγήσει μέσω της φυσικής επιλογής στην επικράτηση στελεχών εντόμων ανθεκτικών στην τοξίνη αυτή (Shelton and Zhao, 2000).
- ♦ Απρόβλεπτες επιδράσεις της τοξίνης Bt σε οργανισμούς (κυρίως αρθρόποδα) που δεν είναι βλαβεροί για τις καλλιέργειες και που ίσως είναι και ωφέλιμοι για τη γεωργία.

Τέλος θα ήταν παράλειψη αν δεν αναφέραμε τους πιθανούς κινδύνους κατά την κατανάλωση των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων από ανθρώπους ή ζώα.

- ♦ Οι νέες πρωτεΐνες που δημιουργούνται στα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα πιθανόν να έχουν απρόβλεπτη αλλεργιογόνο δράση (Astwood *et al.*, 1996).
- ♦ Το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που φέρουν τα περισσότερα γενετικά τροποποιημένα φυτά μπορεί να «περάσει» σε βακτήρια του πεπτικού συστήματος καθιστώντας τα πιο ανθεκτικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα έχουν αποτελέσει ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα ζητήματα των τελευταίων ετών στον επιστημονικό, εμπορικό, νομοθετικό και κοινωνικο-ηθικό τομέα σε όλο τον κόσμο. Στην Αγγλία, οι 7 μεγαλύτερες εφημερίδες έχουν γράψει χιλιάδες στήλες για τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα μόνο μέσα στο 1999, με την πλειοψηφία των σχολίων να είναι αρνητικά (Dorey, 1999).

Για να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερα η διασφάλιση έναντι των ποικίλων προβληματισμών για πιθανούς κινδύνους και να ληφθούν υπόψη οι παράμετροι εκείνοι που αφορούν το κάθε προϊόν ξεχωριστά, εξεταζόμενο κατά περίπτωση σε συνάρτηση και με το περιβάλλον και τις χρήσεις του, θεσπίστηκαν ρυθμιστικά πλαίσια για τη διαχείριση και την αξιοποίηση αυτών των προϊόντων. Οι διαδικασίες άρχισαν από τις Η.Π.Α. όπου υπήρχαν και τα πρώτα επιτεύγματα της γενετικής μηχανικής. Δεδομένου ότι η αλματώδης ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας συντελείται σε μια περίοδο που η κοινωνία είναι ιδιαίτερα ευαισθητοποιημένη και επιφυλακτική με τα επιστημονικά και τεχνολογικά επιτεύγματα, οι σχετικές νομοθετικές διατάξεις θα έπρεπε να γίνονται αντικείμενο διαλόγου ανάμεσα στην ανάγκη των χωρών για οικονομική ανάπτυξη και την επιθυμία του κοινού για ασφάλεια και ηθική. Στην Ευρώπη έχει θεσπιστεί ένα αυστηρό νομοθετικό πλαίσιο, το οποίο ισχύει και στην Ελλάδα.

7.1 Απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στο φυσικό περιβάλλον

Όπως συνέβη και με άλλες τεχνολογίες, έχουν διατυπωθεί πολλές επιφυλάξεις σχετικά με την ασφάλεια των καταναλωτών και του περιβάλλοντος από την καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων φυτών. Όμως αναγνωρίζοντας τα οφέλη από τη σύγχρονη βιοτεχνολογία, κυβερνήσεις και οργανισμοί έχουν θεσπίσει ρυθμιστικούς κανόνες για την αξιολόγηση των πιθανών κινδύνων και τη διαχείριση της αναπόφευκτης εισαγωγής των γενετικά τροποποιημένων φυτών στα γεωργικά συστήματα παραγωγής. Στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα η σκόπιμη απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στο περιβάλλον, είτε για πειραματικούς σκοπούς είτε για παραγωγή και εμπορία προϊόντων ή άλλους σκοπούς, καλύπτεται από την οδηγία 2001/18 (Λουλακάκης, 1999).

Στις δεκαετίες του 1970 και 1980 υπήρχε μια έντονη ανησυχία με τις επιπτώσεις των νέων τεχνολογιών στην υγεία και το περιβάλλον. Αυτό οδήγησε σε νέα και πιο αυστηρά πρότυπα αξιολόγησης των νέων προϊόντων και διαδικασιών. Επίσης οδήγησε σε εκκλήσεις για καλύτερη ενημέρωση του κοινού και μεγαλύτερη συμμετοχή του στην απόφαση αν είναι παραδεκτοί οι δυνατοί κίνδυνοι από αυτά τα προϊόντα και διαδικασίες. Οι κανονισμοί της βιοτεχνολογίας είναι κάτι σαν δοκιμή για την υλοποίηση μερικών από τις νέες μεθόδους και βασικές αρχές. Η βασική δυσκολία στην νομοθετική ρύθμιση μιας νέας τεχνολογίας είναι ότι η φύση και η κλίμακα των κινδύνων δεν είναι εκ των προτέρων γνωστά. Όμως σ' όλες τις χώρες ακόμα και στις αναπτυσσόμενες έχουν γίνει νομοθετικές ρυθμίσεις των κινδύνων από τα βιομηχανικά και γενετικά τροποποιημένα προϊόντα. Οι κυβερνήσεις έχουν θεσπίσει ελέγχους για την προστασία της υγείας, της ασφάλειας και πιο πρόσφατα του περιβάλλοντος. Με βάση την εμπειρία από τα δυσμενή αποτελέσματα, έχει ψηφιστεί νομοθεσία που ορίζει ότι το προϊόν ή η διαδικασία θα πρέπει να πληρούν ορισμένα κριτήρια υγείας, ασφάλειας και όπου ενδείκνυται, αποτελεσματικότητας και περιβαλλοντικής προστασίας.

Σε γενικές γραμμές, σύμφωνα με τους κανονισμούς που ισχύουν σήμερα για τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, κάθε αίτηση απελευθέρωσης εξετάζεται ξεχωριστά με καθιερωμένες μεθόδους αξιολόγησης των κινδύνων και ανάλογα εγκρίνεται ή απορρίπτεται από την αρμόδια επιτροπή αξιολόγησης. Έτσι η απελευθέρωση φυτών με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνο δεν γίνεται αποδεκτή στην περίπτωση που το φυτό μπορεί να διασταυρωθεί με συγγενικά του ζιζάνια, γεγονός που θα επέτρεπε την ανάπτυξη ζιζανίων ανθεκτικών στο ζιζανιοκτόνο. Επίσης, φυτά που παράγουν τρόφιμα με ενδεχόμενη τοξική ή αλλεργιογόνο δράση απαιτούν προσεκτική εκτίμηση. Τα θέματα βιοασφάλειας μπορεί να ποικίλουν σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές, λόγω διαφορετικών εθνικών περιστάσεων. Στις Η.Π.Α., για παράδειγμα, δεν υπάρχουν άγρια συγγενικά είδη των βασικών καλλιεργειών όπως καλαμπόκι, σόγια, σιτάρι και βαμβάκι και επομένως εκλείπει ο κίνδυνος ανεπιθύμητων διασταυρώσεων των διαγονιδιακών φυτών των ειδών αυτών με φυσικούς πληθυσμούς. Σε αντίθεση στη Νορβηγία, όπου η οικονομία εξαρτάται σημαντικά από τα γηγενή δέντρα, η εισαγωγή νέων χαρακτήρων στα είδη αυτά δεν πρέπει να επηρεάζει αρνητικά την πολύχρονη αξιοπιστία των φυσικών πόρων (Λουλακάκης, 1999).

7.2 Τι προβλέπει η Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και η Ελληνική Νομοθεσία για τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα

Με την ψήφιση των Κανονισμών 1829/2003 για «τα γενετικώς τροποποιημένα τρόφιμα και ζωοτροφές» και 1830/2003 σχετικά με «την ιχνηλασιμότητα και την επισήμανση γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών και την ιχνηλασιμότητα τροφίμων και ζωοτροφών» θεσπίστηκε ένα νέο νομοθετικό πλαίσιο διάθεσης στην αγορά, υποχρεωτικής επισήμανσης και ιχνηλασιμότητας των γενετικώς τροποποιημένων τροφίμων και ζωοτροφών. Στη συνέχεια περιγράφονται οι κανονισμοί 1829/2003, 1830/2003, 258/1997 και η οδηγία 2001/18.

7.2.1 Κανονισμοί

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ 1829/2003

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1829/2003 προβλέπει διαδικασίες για την έγκριση και την εποπτεία γενετικώς τροποποιημένων τροφίμων και ζωοτροφών καθώς και για την επισήμανση αυτών των τροφίμων και ζωοτροφών (www.efet.gr). Επίσης προβλέπει ότι τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα και ζωοτροφές πρέπει:

- ♦ να μην έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων, στην υγεία των ζώων ή στο περιβάλλον.
- ♦ να μην παραπλανούν τον καταναλωτή.
- ♦ να μην διαφέρουν από τα τρόφιμα / τις ζωοτροφές στην αντικατάσταση των οποίων αποσκοπούν, σε βαθμό που η συνήθης κατανάλωσή τους να ζημιώνει τον καταναλωτή / τα ζώα από άποψη διατροφικής αξίας (www.europa.eu.int/rapid/press.Releases.Action.do?reference=MEMO.04/102&format).

Το πεδίο εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1829/2003 περιλαμβάνει:

- ♦ Τα τρόφιμα που αποτελούνται, περιέχουν ή παράγονται από γενετικώς τροποποιημένους οργανισμούς («ΓΤΟ») όπως γενετικώς τροποποιημένα φυτά και μικροοργανισμούς, καλύπτει επίσης τα υφιστάμενα τρόφιμα που αποτελούνται, περιέχουν ή παράγονται από γενετικώς τροποποιημένα φυτά και μικροοργανισμούς.
- ♦ Τις ζωοτροφές, συμπεριλαμβανομένων των πρόσθετων υλών στις ζωοτροφές όπως ορίζονται στην οδηγία 70/524/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 23ης Νοεμβρίου 1970, περί

των προσθέτων υλών στη διατροφή των ζώων, οι οποίες αποτελούνται, περιέχουν ή παράγονται από ΓΤΟ όπως γενετικώς τροποποιημένα φυτά και μικροοργανισμούς, καλύπτει επίσης τις υφιστάμενες ζωοτροφές, συμπεριλαμβανομένων των πρόσθετων υλών στις ζωοτροφές που αποτελούνται, περιέχουν ή παράγονται από γενετικώς τροποποιημένα φυτά και μικροοργανισμούς.

- ♦ Δεν καλύπτει τα τεχνολογικά βοηθήματα, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων που χρησιμοποιούνται ως τεχνολογικά βοηθήματα. Συνεπώς, το πεδίο εφαρμογής του παρόντος κανονισμού ομοίως δεν πρέπει να καλύπτει τα υφιστάμενα τεχνολογικά βοηθήματα (www.efet.gr).

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ 1830/2003

Ο κανονισμός σχετικά με την ιχνηλασιμότητα και την επισήμανση των ΓΤΟ και των προϊόντων που λαμβάνονται από ΓΤΟ προβλέπει ότι η ιχνηλασιμότητα θα απαιτείται καθ' όλο το μήκος της τροφικής αλυσίδας. Το μέτρο αυτό αποβλέπει σε δύο κύριους στόχους: αφενός, ενημερώνονται οι καταναλωτές χάρη στην υποχρεωτική επισήμανση αυτού του τύπου προϊόντων, ενώ αφετέρου δημιουργείται ένα «δίχτυ ασφαλείας» χάρη στην ιχνηλασιμότητα των προϊόντων αυτών σε όλα τα στάδια της παρασκευής και της διάθεσης στην αγορά. Αυτό το «δίχτυ ασφαλείας» θα επιτρέψει τον έλεγχο και την επαλήθευση των θρεπτικών ενδείξεων που αναφέρονται σε ετικέτες, τη στοχευόμενη εποπτεία των δυνητικών επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία ή στο περιβάλλον και την απόσυρση προϊόντων εάν διαπιστωθεί απρόβλεπτος κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία ή το περιβάλλον.

Πεδίο εφαρμογής

Ο κανονισμός αφορά τη ιχνηλασιμότητα των ΓΤΟ, ως προϊόντων ή στοιχείων προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των σπόρων, καθώς και των προϊόντων που προορίζονται για την ανθρώπινη ή ζωική διατροφή, τα οποία έχουν παρασκευαστεί από ΓΤΟ. Η εφαρμογή αυστηρότερων υφιστάμενων κανονισμών σχετικά με την ιχνηλασιμότητα και την επισήμανση προϊόντων δεν παρεμποδίζεται.

Επισήμανση

Ο νέος κανονισμός είναι αυστηρότερος από την υφιστάμενη νομοθεσία σε ό,τι αφορά την επισήμανση. Περιλαμβάνει όλα τα τρόφιμα που παράγονται από ΓΤΟ, χωρίς

να κάνει διάκριση μεταξύ εκείνων που περιέχουν DNA (δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ) ή γενετικές τροποποιήσεις στα χρωμοσώματα, και εκείνων που περιέχουν πρωτεΐνες προερχόμενες από ΓΤΟ. Η παλαιά νομοθεσία των ΓΤΟ κάλυπτε μόνο τα τρόφιμα με ίχνη ΓΤΟ στο DNA. Η νέα νομοθεσία περιλαμβάνει επίσης όλες τις γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές, με τον ίδιο βαθμό προστασίας όπως τα τρόφιμα που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο.

Όλα τα εγκεκριμένα σύμφωνα με αυτόν το μελλοντικό κανονισμό προϊόντα οφείλουν να υπόκεινται σε υποχρεωτική επισήμανση, με αποτέλεσμα ο καταναλωτής να διαθέτει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την επισήμανση των προϊόντων ΓΤΟ, είτε προορίζονται για κατανάλωση από άνθρωπο είτε από ζώα.

Τα ίχνη των ΓΤΟ στα προϊόντα (η παρουσία τους είναι μη ηθελημένη και τεχνικά αναπόφευκτη) θα συνεχίσουν να απαλλάσσονται της υποχρέωσης επισήμανσης αν δεν υπερβαίνουν το ανώτατο όριο των 0,9%.

Δεν είναι δυνατόν να αποκλειστεί η τυχαία παρουσία ΓΤΟ στις παραδοσιακές καλλιέργειες. Αυτό δύναται να υποθέσει την παρουσία ελάχιστων ιχνών ΓΤΟ στα κλασικά τρόφιμα και ζωοτροφές, που συμβαίνει είτε από ατύχημα είτε από την τεχνικά αναπόφευκτη μόλυνση κατά την καλλιέργεια, τη συγκομιδή, τη μεταφορά ή την επεξεργασία. Η τυχαία παρουσία των ΓΤΟ αποτελεί σημαντικό σημείο που θα πρέπει να αναφέρεται στον κανονισμό αυτό. Το ανώτατο όριο ορίστηκε σε 0,5% για αυτό τον τύπο «μόλυνσης» για τους ΓΤΟ για τους οποίους έχει υπάρξει ευνοϊκή επιστημονική γνωμοδότηση.

Αφετέρου, ο κανονισμός προβλέπει ότι οι υπεύθυνοι γεωργικών εκμεταλλεύσεων που διαθέτουν στην αγορά ένα προσυσκευασμένο προϊόν αποτελούμενο από ΓΤΟ ή που περιέχει τέτοιους, σε όλα τα στάδια της αλυσίδας παραγωγής και διανομής, θα φροντίζουν ώστε η ένδειξη «το παρόν προϊόν περιέχει γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς» ή «προϊόν από ΓΤΟ (ονομασία του οργανισμού)» να εμφανίζεται σε ετικέτα τοποθετημένη επί του προϊόντος. Αν πρόκειται για προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων σε μεγάλες ποσότητες, που δεν είναι συσκευασμένα και αν η χρησιμοποίηση ετικέτας είναι αδύνατη, ο υπεύθυνος της γεωργικής εκμετάλλευσης θα πρέπει να φροντίζει ώστε οι πληροφορίες αυτές να διαβιβάζονται με το προϊόν. Αυτές μπορούν να εμφανίζονται, π.χ., με τη μορφή συνοδευτικών εγγράφων.

Ο νέος κανονισμός εναρμονίζει επίσης την ανομοιογενή νομοθεσία σε ό,τι αφορά την επισήμανση των ΓΤΟ τροποποιώντας ή καταργώντας την ισχύουσα νομοθεσία. Τροποποιεί τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 258/97 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του

Συμβουλίου της 27ης Ιανουαρίου 1997 σχετικά με τα νέα τρόφιμα και τα νέα συστατικά τροφίμων και τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1139/98 για την υποχρεωτική αναγραφή στοιχείων, στην επισήμανση ορισμένων τροφίμων που παράγονται από γενετικώς τροποποιημένο καλαμπόκι και σόγια.

Για να διευκολυνθεί η ιχνηλασιμότητα των ΓΤΟ και για να προστατευθεί επίσης το περιβάλλον, ο κανονισμός απαιτεί από τους υπεύθυνους γεωργικών εκμεταλλεύσεων τη διαβίβαση των ακόλουθων πληροφοριών:

- την ένδειξη ότι τα προϊόντα είναι ΓΤΟ ή περιέχουν τέτοιους οργανισμούς.
- τον ενιαίο κωδικό ή τους ενιαίους κωδικούς που αντιστοιχούν στους ΓΤΟ οι οποίοι περιέχονται στα προϊόντα.

Αυτό το σύστημα ενιαίας αναγνώρισης των ΓΤΟ θα επιτρέψει τη γνώση των ιδιαιτεροτήτων και χαρακτηριστικών που προσιδιάζουν σε αυτά τα προϊόντα για την εποπτεία της ιχνηλασιμότητας (www.europa.eu/scadplus/leg/el/lvb/l2117.htm).

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ 258/97

Ο κανονισμός αφορά:

- τρόφιμα και συστατικά τροφίμων τα οποία έχουν στοιχειώδη μοριακή δομή.
- τρόφιμα και συστατικά τροφίμων τα οποία συντίθενται από μικροοργανισμούς, μύκητες ή άλγη.
- τρόφιμα και συστατικά τροφίμων τα οποία συντίθενται από φυτικούς οργανισμούς και λαμβάνονται με βάση αυτούς ή με βάση ζωικούς οργανισμούς.
- τρόφιμα και συστατικά τροφίμων των οποίων η θρεπτική αξία, ο μεταβολισμός και η περιεκτικότητα σε ανεπιθύμητες ουσίες έχουν μεταβληθεί σημαντικά μέσω της μεθόδου παραγωγής.

Ο κανονισμός δεν έχει εφαρμογή σε πρόσθετα τροφίμων, αρτοματικές ουσίες και διαλύτες εκχύλισης.

Τα τρόφιμα ή συστατικά τροφίμων δεν πρέπει να ενέχουν κινδύνους για τον καταναλωτή, να οδηγούν σε παραπλάνηση τον καταναλωτή ή να θίγουν τον καταναλωτή από άποψη θρεπτικής αξίας.

Καθορίζει ειδικές απαιτήσεις σχετικά με την επισήμανση των εν λόγω ειδών διατροφής. Αναγράφονται υποχρεωτικά:

- ♦ κάθε χαρακτηριστικό όπως σύνθεση, θρεπτική αξία και χρήση για τα οποία προορίζεται το νέο προϊόν.
- ♦ η παρουσία υλών που ενδέχεται να έχουν επίπτωση στην υγεία ορισμένων ατόμων.
- ♦ η παρουσία υλών που εγείρουν επιφυλάξεις δεοντολογικού χαρακτήρα.
- ♦ η παρουσία οργανισμού γενετικώς τροποποιημένου (ΓΤΟ). Από το 2003 οι ΓΤΟ εγκρίνονται βάσει του κανονισμού 1829/2003.

Τα τρόφιμα και τα συστατικά τροφίμων που καλύπτονται από τον κανονισμό και που περιέχουν οργανισμούς γενετικώς τροποποιημένους αποτελούν αντικείμενο ειδικής διαδικασίας που δίνει έμφαση στην εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων (www.europa.eu/scadplus/leg/el/lvb/l21119.htm).

7.2.3. Οδηγία

ΟΔΗΓΙΑ 2001/18

Η οδηγία αυτή αποσκοπεί κυρίως στο να καταστεί αποτελεσματικότερη και διαφανέστερη η διαδικασία χορήγησης άδειας για σκόπιμη απελευθέρωση και διάθεση ΓΤΟ στην αγορά, να περιοριστεί ο χρόνος ισχύος των σχετικών αδειών σε 10 έτη, με δυνατότητα ανανέωσης και να θεσπιστεί υποχρεωτικός έλεγχος μετά την διάθεση των ΓΤΟ στην αγορά.

Προβλέπει επίσης κοινή μέθοδο εκτίμησης της επικινδυνότητας που συνδέεται με την απελευθέρωση ΓΤΟ (οι γενικές αρχές που διέπουν την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου παρατίθενται στο παράρτημα II της οδηγίας), καθώς και μηχανισμό που επιτρέπει την τροποποίηση, την αναστολή ή την παύση της απελευθέρωσης των ΓΤΟ, όταν προκύπτουν νέες πληροφορίες για την επικινδυνότητά της.

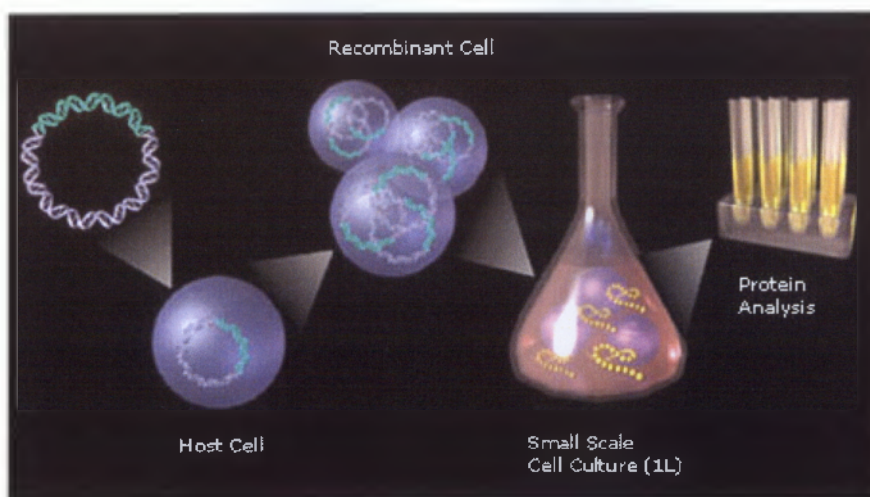
Σύμφωνα με την οδηγία 2001/18/ΕΚ, η Επιτροπή είναι υποχρεωμένη να δημιουργήσει ένα ή περισσότερα μητρώα με τις πληροφορίες τις σχετικές με τις γενετικές τροποποιήσεις των ΓΤΟ. Η απόφαση αυτή ορίζει ότι τα εν λόγω μητρώα πρέπει να περιέχουν δεδομένα προσβάσιμα στο σύνολο του κοινού και άλλες πληροφορίες προσβάσιμες μόνο στα κράτη μέλη, στην Επιτροπή και στην Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων.

Τα προς καταγραφήν δεδομένα είναι τα ακόλουθα:

- ♦ λεπτομερή στοιχεία σχετικά με τα πρόσωπα που είναι αρμόδια για την απελευθέρωση ή τη διάθεση στην αγορά.
- ♦ γενικές πληροφορίες για τους ΓΤΟ (εμπορική ονομασία και επιστημονική ονομασία, κοινοποιούν κράτος μέλος, απόφαση εγκρίσεως του ΓΤΟ κ.λπ.).
- ♦ πληροφορίες για το DNA που περιέχεται στον ΓΤΟ.
- ♦ πληροφορίες για τις μεθόδους ιχνηλάτησης και αναγνώρισης.
- ♦ πληροφορίες για την αποθήκευση, αποθεματοποίηση και διάθεση δειγμάτων (www.europa.eu/scadplus/leg/el/lvb/l28130.htm).

ΜΕΡΟΣ II

ΕΡΕΥΝΑ - ΠΕΙΡΑΜΑ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Βασική υποδομή εργαστηρίου

Στο υποκεφάλαιο αυτό θα αναφερθούμε στα όργανα και υλικά (χημικά, διαλύματα, πλαστικά ή γυαλικά σκεύη) καθώς και σε ορισμένους ειδικά διαμορφωμένους χώρους που απαιτούνται για την εκτέλεση των πειραμάτων.

1.1.1 Όργανα

- ♦ *Επωαστήρες (incubators)*: υπάρχουν οι ξηροί και οι υγροί επωαστήρες. Ξηροί επωαστήρες είναι οι κλίβανοι και υγροί είναι τα υδατόλουτρα και τα δύο είδη υπάρχουν στο εργαστήριο σε δυο τύπους: τους ανακινούμενους και τους μη. Για την ανάπτυξη των καλλιεργειών βακτηρίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανακινούμενοι επωαστήρες, τόσο υδατόλουτρα όσο και κλίβανοι (environmental shakers), αρκεί να φέρουν κατάλληλους υποδοχείς στήριξης για τις φιάλες των καλλιεργειών (Σκούρας, 1993). (Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ανακινούμενος ξηρός της εταιρείας Termaks Bergen-Norway Type: B8 054 και ξηρός της εταιρείας Gerhardt, Germany).
- ♦ *Θάλαμος νηματικής ροής (laminar flow)*: ο οποίος αποτελείται από ειδικούς ηθμούς υψηλής απόδοσης (συγκράτησης του 99,7% των σωματιδίων διαμέτρου 0,3 μm) είναι πολύ σημαντικό όργανο για κάθε μικροβιολογικό εργαστήριο. Προστατεύει και τους ερευνητές αλλά και τα αντικείμενα έρευνας. Σκοπό έχει να διατηρεί αποστειρωμένο τον εργαστηριακό χώρο (Καραγκούνη-Κύρτσου, 1999). (Ο θάλαμος νηματικής ροής ήταν της εταιρείας TELSTAR BIO-LL-A).
- ♦ *Όργανα αποστείρωσης*: υποχρεωτικώς, όλα τα υλικά (γυάλινα και πλαστικά σκεύη, διαλύματα, κ.λπ.) που χρησιμοποιούνται στη μοριακή γενετική πρέπει να είναι αποστειρωμένα. Για το σκοπό αυτό χρειάζονται συσκευές υγρής αποστείρωσης (ταυτόκαυστα) και ξηρής (φούρνοι, κλίβανοι > 200°C). Σε πολλές περιπτώσεις, αντί αυτοκαύστων μπορούν να χρησιμοποιηθούν και χύτρες ταχύτητας που είναι πιο οικονομικές. Στο βασικό εξοπλισμό αποστείρωσης απαραίτητα είναι: τα φίλτρα αποστείρωσης 0,22 μm (για διαλύματα), υπεριώδες φως, 70% αιθανόλη και οξειδωτική φλόγα (από συνήθη «γκαζάκια» ή από λύχνους hunsen) (Σκούρας, 1999).

- ♦ *Καταψύκτες και ψυγεία:* η κατάψυξη θα πρέπει να είναι ρυθμισμένη στους -20°C , η οποία μπορεί να είναι ενσωματωμένη και με ψυγείο (4°C).
- ♦ *Φυγόκεντροι:* οι περισσότερες μέθοδοι που περιγράφονται απαιτούν τη χρήση φυγόκεντρων. Απαραίτητη είναι μια μεγάλη ψυχόμενη φυγόκεντρος (δύναμη να φθάσει τις 20.000 στροφές/λεπτό), εξοπλισμένη με κεφαλές φυγόκεντρου διαφόρων μεγεθών. Απαραίτητη επίσης είναι μια μικρή επιτραπέζια φυγόκεντρος (13.000 rpm) με κεφαλή κατάλληλη για φιαλίδια erpendorf (Σκούρας, 1993). (Η φυγόκεντρος ήταν της εταιρείας SIGMA 1-15K, Germany).
- ♦ *Οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων* (της εταιρείας Motic B3 Professional series).
- ♦ *Φασματοφωτόμετρο:* θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα λήψης μετρήσεων τόσο στο ορατό όσο και στο υπεριώδες φως. (Το φασματοφωτόμετρο ήταν της εταιρείας HITACHI U-1500, Japan).
- ♦ *Συσκευή παροχής υπεριώδους φωτός (uv evansilluminator):* είναι απαραίτητο όργανο και χρησιμοποιείται για την παρατήρηση των πυρηνικών οξέων συνήθως μετά από ανάλυση σε διάφορες πηκτές. Ένα σύστημα φωτογράφισης πηκτών αγαρόζης είναι απαραίτητο. (Η συσκευή παροχής υπεριώδους φωτός ήταν της εταιρείας VILBEN LOORMAT, France και το σύστημα φωτογράφισης της εταιρείας SONY CORPORATION).
- ♦ *Κοινά όργανα μικροόργανα.*
 - ▶ Ζυγός ακριβείας (της εταιρείας SCALTC 5BC 22).
 - ▶ Ανακινητής vortex (της εταιρείας Heidolph REAX top).
 - ▶ Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (της εταιρείας Heidolph MK 3001).
 - ▶ Ανακινούμενη πλάκα.
 - ▶ Ξηραντήρας.
 - ▶ Τροφοδοτικό μηχάνημα (της εταιρείας Amershum Pharmacia Biotech AB).
 - ▶ Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης (της εταιρείας Amershum Pharmacia Biotech AB).
 - ▶ Φούρνος μικροκυμάτων (της εταιρείας Panasonic).
 - ▶ Αυτόματες μικροπιπέτες μεταβλητού όγκου.
 - ▶ Λύχνος bunsen (γκαζάκια).
 - ▶ Πεχάμετρο (της εταιρείας CRISON GLP21).

1.1.2 Ειδικά διαμορφωμένοι χώροι

- ♦ *Θάλαμος καλλιέργειας μικροοργανισμών:* ο θάλαμος καλλιέργειας μικροοργανισμών φιλοξενεί την πειραματική δραστηριότητα που έχει σχέση με την ανάπτυξη των μικροβίων ή άλλων μικροοργανισμών και την επιμόλυνση με διάφορα πλασμίδια ή βακτηριοφάγους. Ο ιδιαίτερος αυτός πειραματικός χώρος προστατεύει αφ' ενός τις καλλιέργειες από ανεπιθύμητες μολύνσεις και αφ' ετέρου τον περιβάλλοντα χώρο από την πιθανή μόλυνση από τις καλλιέργειες. Μέσα στο βασικό εξοπλισμό ενός θαλάμου καλλιέργειας μικροοργανισμών πρέπει να περιλαμβάνονται: απαγωγός νηματικής ροής (laminar flow), επωαστήρες (υγροί ή ξηροί), επωαστήρες υγρών καλλιιεργειών (environmental shakers), διάφορα όργανα για άμεση αποστείρωση (70% αιθανόλη, οξειδωτική φλόγα, κ.ά.) (Σκούρας, 1993).
- ♦ *Σκοτεινός θάλαμος:* μέσα στο σκοτεινό θάλαμο πραγματοποιούνται οι εργασίες που έχουν σχέση με τη φωτογραφία και την αυτοραδιογραφία. Ο βασικός εξοπλισμός ενός σκοτεινού θαλάμου περιλαμβάνει: εκτυπωτή φωτογραφιών, εργαστηριακά ωρολόγια (timers), λεκάνες διάφορων μεγεθών, φως προστασία των φιλμ (κόκκινο φως), κ.λπ. (Σκούρας, 1993).

1.1.3 Μητρικά διαλύματα και θρεπτικά μέσα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα μητρικά διαλύματα (πυκνά διαλύματα) και στα διαλύματα εργασίας τα οποία προκύπτουν είτε από αραιώσεις μητρικών διαλυμάτων, είτε παρασκευάζονται κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ειδικά αντιδραστήρια ή ρυθμιστικά διαλύματα που απαιτούνται για κάθε μία από τις μεθόδους που θα αναπτυχθούν στη συνέχεια, αναφέρονται αμέσως πριν από τη διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου (Σκούρας, 1993).

LB

Το θρεπτικό μέσο LB (της εταιρείας FLUKA, Switzerland) για την καλλιέργεια βακτηρίων περιέχει (στο 1 lt):

- 10 gr bacto-tryptone
- 5 gr bacto-yeast extracts
- 10 gr NaCl
- 950 ml αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό

Ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι την πλήρη διάλυση των συστατικών και προσθήκη NaOH (5 M) έως ότου το pH φθάσει στο 7,0. Συμπλήρωση με νερό μέχρι το 1 lt. Ακολουθεί αποστείρωση του θρεπτικού μέσου LB σε αυτόκαυστο και φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου.

Αν θέλουμε να έχουμε στερεή καλλιέργεια για να κάνουμε επίστρωση σε τρυβλία προσθέτουμε 1,5% άγαρ.

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης (gel loading buffer)

Για την παρασκευή 10 ml:

250 ml (1x) 50x TAE

1 ml (0,25%) κυανού της βρωμοφαινόλης (της εταιρείας USB, CLEVELAND OHIO)

1 ml (0,25%) κυανού του ξυλενίου (της εταιρείας USB, CLEVELAND OHIO)

2,75 ml αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό

Μοιράζεται ανά 1 ml σε φιαλίδια erppendorf και φυλάσσεται στην κατάψυξη (-20°C).

TAE, 50x

Ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για προετοιμασία πηκτής και ηλεκτροφόρησης αγαρόζης.

Σε φιάλη του 1 lt προσθέτουμε:

24,2 gr Tris-HCl

57,1 ml π CH₃COOH

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

Προσθέτουμε απιονισμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί το 1 lt.

Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου

TE (Tris/EDTA)

Για 100 ml TE προσθέτουμε:

0,5 ml (10 mM Tris-HCl)

Tris-HCl (2 M) (pH 7,4)

0,2 ml (1 mM EDTA)

EDTA (0,5 M) (pH 8,0)

99,3 ml αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό
Διατηρείται είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε στο ψυγείο.

Tris-HCl 2M (PH≈7,4)

Διάλυση 242,2 gr Tris-base σε 850 ml αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό. Προσθήκη 75 ml πυκνού HCl, κάτω από συνεχή ανάδευση. Με την προσθήκη σταγόνων πυκνού HCl γίνεται η ρύθμιση του pH στην επιθυμητή τιμή. Προσθέτουμε αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό μέχρι να συμπληρωθεί 1 lt.

STET

Διάλυμα για την απομόνωση DNA με τη μέθοδο του βρασμού.

Στο 1Lt περιέχει:

| | |
|-------------------------|--------------------------|
| 100 mM NaCl | 160 μl NaCl 3 M |
| 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) | 50 μl Tris-HCl 2 M |
| 1 mM EDTA (pH 8,0) | 10 μl EDTA 0,5 M |
| 5% Triton-X-100 | 250 μl Triton-X-100 |
| | 4500 μl απεσταγμένο νερό |

CTAB

Διάλυμα για την απομόνωση DNA με τη μέθοδο CTAB.

2% w/v hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)

1,4 M NaCl

0,2% w/v 2-μερκαπτοαιθανόλη

20 mM EDTA

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1.2 Διαδικασία απομόνωσης βακτηρίων *Rhizobium* από τα φυμάτια τριφυλλιού

Όργανα-Υλικά

- ▶ Λαβίδα
- ▶ Γυάλινη ράβδος
- ▶ Νυστέρι

- ▶ Ποτήρι ζέσεως των 100 ml
- ▶ Τρυβλία
- ▶ Αποστειρωμένοι μικροσωλήνες φυγοκέντρισης (erpendorfs)
- ▶ Γκαζάκι
- ▶ Βακτηριακός κρίκος
- ▶ Επωαστήρας

Διαλύματα

- ▶ Διάλυμα αιθανόλης 70%
- ▶ Διάλυμα χλωρίνης 1%
- ▶ Αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό
- ▶ LB

Διαδικασία

- 1) Λήψη ενός άθικτου συστήματος ρίζας από υγιές φυτό τριφυλλιού. Ξέβγαλμα για την απομάκρυνση των ρίζων έως ότου να γίνουν ευδιάκριτα τα φυμάτια της ρίζας.
- 2) Αποστείρωση της λαβίδας, της γυάλινης ράβδου και του νυστεριού μέσα σε ένα ποτήρι ζέσεως όπου έχει τοποθετηθεί διάλυμα αλκοόλης 70%. Απαραίτητη προϋπόθεση τοποθέτηση αυτών σε οινόπνευμα ανάμεσα στις χρήσεις.
- 3) Κόψιμο ενός τμήματος ρίζας όχι μεγαλύτερο από ένα εκατοστό που περιέχει ένα υγιές φυμάτιο.
- 4) Βύθιση των 5 ή 6 τμημάτων της ρίζας που έχουμε λάβει σε διάλυμα χλωρίνης 1% για 15 min και ανακίνηση.
- 5) Τοποθέτηση των φυματίων της ρίζας σε 20 ml διαλύματος αιθανόλης 70%, ανάδευση για 1 min.
- 6) Κάλυψη των φυματίων της ρίζας με αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό ανακίνηση για 1min. Επανάληψη του βήματος 3 φορές.
- 7) Με τη βοήθεια της λαβίδας γίνεται συλλογή των φυματίων από τις ρίζες και μεταφορά σε ένα τρυβλίο που περιέχει αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό. Κατόπιν γίνεται τοποθέτηση των φυματίων σε ένα erpendorf, κάψιμο της γυάλινης ράβδου σε φλόγα, κρύωμα και στη συνέχεια πολτοποίηση των φυματίων.

- 8) Αποστείρωση του βακτηριακού κρίκου σε φλόγα μέχρι να πυρακτωθεί, κρύωμα για μερικά δευτερόλεπτα και με τη βοήθεια του κρίκου τοποθέτηση των συνθλιμμένων φυματίων στα τρυβλία όπου έχουν θρεπτικό υπόστρωμα LB.
- 9) Τοποθέτηση των τρυβλίων στον επωαστήρα στους 25°C για 3 ημέρες.

1.2.1 Προσδιορισμός της μικροβιακής βιομάζας και απομόνωση μικροοργανισμών με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων

Υλικά και όργανα

- ♦ Θρεπτικό υπόστρωμα LB
- ♦ NaCl
- ♦ Απιονισμένο νερό
- ♦ 9 Βιδωτοί δοκιμαστικοί σωλήνες
- ♦ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ♦ Κωνική φιάλη των 250 ml
- ♦ Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- ♦ Αυτόκαυστο

Διαδικασία

1. Παρασκευή υγρής καλλιέργειας 50 ml κλειστού τύπου σε κωνική φιάλη 250 ml με υλικά ανάπτυξης LB (10% w/v), τοποθέτηση για αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά και εμβολιασμός με κύτταρα *Rhizobium*.
2. Προσθήκη 9 ml φυσιολογικού ορού (0,85% w/v NaCl) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, τοποθετείται βαμβάκι και αποστειρώνονται στους 121°C για 15 λεπτά.
3. Προσθήκη 1 ml καλλιέργειας στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα. Ανακίνηση έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης ανάμειξη με το διάλυμα του φυσιολογικού ορού. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με τον ίδιο τρόπο, μεταφέροντας 1 ml από την πρώτη αραιώση (αραίωση 10^1) στον δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα (αραίωση 10^2). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται, με τον ίδιο τρόπο, μέχρι τον ένατο δοκιμαστικό σωλήνα (10^9 αραιώση).
4. Από κάθε αραιώση, 0,2 ml αιωρήματος εμβολιάζεται σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα LB.
5. Επώαση στους 25°C για 3 ημέρες.

Με την ολοκλήρωση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων, το αιώρημα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα περιέχει το ένα δέκατο των μικροβιακών κυττάρων σε σχέση με τον αμέσως προηγούμενο δοκιμαστικό σωλήνα.

1.2.2 Εκτίμηση μικροβιακού πληθυσμού

Τρεις ημέρες μετά την πραγματοποίηση των διαδοχικών αραιώσεων και την διασπορά των κυττάρων *Rhizobium* σε τρυβλία Petri έγινε καταμέτρηση των αποικιών, για την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων.

1.2.3 Μικροσκοπική παρατήρηση-χρώση Gram

Όργανα

- ▶ Αντικειμενοφόρες πλάκες
- ▶ Καλυπτρίδες
- ▶ Βακτηριακός κρίκος
- ▶ Δηθητικό χαρτί
- ▶ Γκαζάκι

Διαλύματα

- ▶ Διάλυμα κρυσταλλικού ιωδίου
- ▶ Διάλυμα στερεωτικού ιωδίου (KI)
- ▶ Αιθανόλη 70% v/v
- ▶ Σαφρανίνη

Διαδικασία

- 1) Δημιουργία επιχρίσματος (τοποθέτηση δείγματος από τις αποικίες *Rhizobium* σε αντικειμενοφόρο πλάκα).
- 2) Προσθήκη διαλύματος κρυσταλλικού ιωδίου για 1 min.
- 3) Προσεκτικό ξέπλυμα με νερό βρύσης.
- 4) Προσθήκη διαλύματος KI για 1 min.
- 5) Προσεκτικό ξέπλυμα με νερό βρύσης.
- 6) Προσθήκη διαλύματος αιθανόλης 70% v/v για 30sec (στάδιο αποχρωματισμού).
- 7) Προσεκτικό ξέπλυμα με νερό βρύσης.

- 8) Προσθήκη σαφρανίνης για 30sec.
- 9) Ξέπλυμα με νερό βρύσης και στέγνωμα με διηθητικό χαρτί περιμετρικά.
- 10) Τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου πλάκας κάτω από το μικροσκόπιο, για να πραγματοποιηθεί η παρατήρηση της χρώσης των κυττάρων.

1.3 Προσδιορισμό της συγκέντρωσης της βιομάζας

Η βιομάζα μετρήθηκε με δυο τρόπους: α) ως ξηρή βιομάζα και β) εκτίμηση της πυκνότητας της θολομετρικά.

1.3.1 Ως ξηρή βιομάζα

Υλικά

- ▶ Κύτταρα Rhizobium
- ▶ LB

Όργανα

- ▶ Κωνικές φιάλες (250 ml)
- ▶ Κρίκος εμβολιασμού
- ▶ Γκαζάκι
- ▶ Επωαστήρας
- ▶ Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπέτων (tips)
- ▶ Σωλήνες φυγοκέντρωσης των 1,5 ml (erpendorfs)
- ▶ Φυγόκεντρος

Διαδικασία

- 1) Παρασκευή υγρής καλλιέργειας 50 ml κλειστού τύπου σε κωνική φιάλη 250ml με υλικό ανάπτυξης LB (10% w/v), τοποθέτηση για αποστείρωση στους 121°C για 15 min και εμβολιασμός με κύτταρα Rhizobium.
- 2) Τοποθέτηση της φιάλης σε επωαστήρα με σύστημα ανάδευσης με πίεση 1 atm, στους 25°C και με ταχύτητα περιστροφής 200 rpm.
- 3) Λήψη δείγματος 1 ml με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας κάθε μία ώρα και το τοποθέτηση αυτού σε erpendorf.

- 4) Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στους 2°C και ταχύτητα περιστροφής 14.000 rpm (16.000 x g), απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και ξήρανση του ιζήματος στους 100-150°C για 12 έως 18 ώρες.

1.3.2 Εκτίμηση της πυκνότητας της θολομετρικά

Υλικά

- ▶ Κύτταρα Rhizobium
- ▶ LB

Όργανα

- ▶ Κωνικές φιάλες (250 ml)
- ▶ Κρίκος εμβολιασμού
- ▶ Γκαζάκι
- ▶ Επωαστήρας
- ▶ Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ▶ Eppendorfs
- ▶ Κυβέττες χαλαζία (0,5 ή 1 ml)
- ▶ Φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης

Διαδικασία

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη παράγραφο 1.3.1 με τη διαφορά ότι δεν γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων αλλά τοποθέτηση σε κυβέττες χαλαζίας και μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 500 nm πριν μηδενίζουμε με LB. Με αυτή τη μέθοδο γίνεται μέτρηση της πυκνότητας του εναιωρήματος της καλλιέργειας και έκφραση της βιομάζας σε μονάδες οπτικής πυκνότητας (Optical Density=OD). Στους μονοκύτταρους οργανισμούς η απορρόφηση είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων.

1.4 Συνθήκες αποθήκευσης των προς ανάλυση δειγμάτων

Ανακαλιέργεια στελεχών βακτηρίων Rhizobium κάθε 20 ημέρες σε τρυβλία που περιέχουν ως θρεπτικό υπόστρωμα LB και επώαση σε θερμοκρασία 25°C. Διατήρηση του απομονωμένου DNA των βακτηρίων στον καταψύκτη στους -20°C.

1.5 Έλεγχος μεταφοράς DNA από ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο 2,5% w/w σε κύτταρα Rhizobium

1.5.1 Καλλιέργεια Rhizobium σε υπόστρωμα με 2,5% (w/w) ΓΤ σογιάλευρο

ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Όργανα & Υλικά

- ▶ Κωνικές φιάλες 250 ml
- ▶ Κρίκος εμβολιασμού
- ▶ Γκαζάκι
- ▶ Αποστειρωτής
- ▶ Επωαστήρας με σύστημα ανάδευσης
- ▶ Αυτόματες μικροπιπέτες
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ▶ Σωλήνες φυγοκέντρησης (ependorfs)
- ▶ Δύο υδατόλουτρα ρυθμισμένα στους 65°C και 80°C αντίστοιχα.

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ▶ Θρεπτικό υπόστρωμα LB (10% w/v)
- ▶ 2,5% w/w γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο Roundup ready™ Soya (Reference Standards, IRMM, Fluka Gmb H Buchs, Switzerland)
- ▶ NaOH
- ▶ DNase
- ▶ Ρυθμιστικό διάλυμα DNase (10xDNase Buffer: 400 mM Tris-HCl, pH 7,5, 80mM MgCl₂, 50 mM DTT)

Διαδικασία

1. Παρασκευή υγρής καλλιέργειας 50 ml κλειστού τύπου σε κωνική φιάλη 250 ml με υλικό ανάπτυξης LB (10% w/v), τοποθέτηση για αποστείρωση στους 121°C για 15 min.
2. Προσθήκη 1 gr μερικώς υδρολυμένο γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο. Η υδρόλυση πραγματοποιείται με προσθήκη 0,1% NaOH και θέρμανση για 15 λεπτά στους 65°C για να επέλθει μερική λύση των κυττάρων. [Το 1 gr ΓΤ σογιάλευρο έχει αρχική συγκέντρωση 2,5% w/w (δηλαδή στο 1 gr σογιάλευρο τα

0,025 gr είναι γενετικά τροποποιημένη ουσία) και τελική συγκέντρωση στο υλικό καλλιέργειας 0,05% w/v. Θεωρείται ότι στο 1 gr ΓΤ σογιάλευρο περιέχεται 10% DNA επομένως η συγκέντρωση στο υλικό καλλιέργειας είναι 0,005% w/v (0,005 mg/ml)].

3. Εμβολιασμός καλλιέργειας με κύτταρα *Rhizobium*.
4. Τοποθέτηση της φιάλης σε επωαστήρα με σύστημα ανάδευσης στους 25°C και με ταχύτητα περιστροφής 200 rpm.
5. Λήψη δείγματος 1 ml κάθε 1 ώρα με τη βοήθεια αυτόματης μικροπιπέτας, τοποθέτηση σε αποστειρωμένο μικροσωληνίσκο φυγοκέντρωσης (erpendorf), προσθήκη 10 μl DNase (για να καταστραφεί το DNA που βρίσκεται έξω από το κύτταρο) και 25 μl ρυθμιστικό διάλυμα για να δράσει η DNase. Ανάδευση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Φυγοκέντρωση με ταχύτητα περιστροφής 10.000 rpm, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και τοποθέτηση του ιζήματος σε λουτρό με θερμοκρασία νερού 80°C για 10 min έτσι ώστε να αδρανοποιηθεί η DNase σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.

ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Όργανα & Υλικά

- ▶ Κωνικές φιάλες 250 ml
- ▶ Κρίκος εμβολιασμού
- ▶ Γκαζάκι
- ▶ Αποστειρωτής
- ▶ Επωαστήρας με σύστημα ανάδευσης
- ▶ Αυτόματες μικροπιπέτες
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ▶ Σωλήνες φυγοκέντρωσης (erpendorfs)
- ▶ Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 65°C
- ▶ Τρυβλία Petri

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ▶ Θρεπτικό υπόστρωμα LB (10% w/v)
- ▶ 2,5% w/w γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο Roundup ready™ Soya (Reference Standards, IRMM, Fluka GmbH Buchs, Switzerland)

- ▶ NaOH

Διαδικασία

1. Παρασκευή υγρής καλλιέργειας 50 ml κλειστού τύπου σε κωνική φιάλη 250 ml με υλικό ανάπτυξης LB (10% w/v), τοποθέτηση για αποστείρωση στους 121°C για 15 min.
2. Εμβολιασμός καλλιέργειας με κύτταρα *Rhizobium*.
3. Τοποθέτηση της φιάλης σε επωστήρα με σύστημα ανάδευσης στους 25°C και με ταχύτητα περιστροφής 200 rpm.
4. Λήψη δείγματος κάθε μία ώρα με τη βοήθεια αυτόματης μικροπιπέτας και επίστρωση σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB και ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο (η υδρόλυση του ΓΤ σογιάλευρου γίνεται όπως την υγρή καλλιέργεια βήμα 2).

1.5.2 Απομόνωση γονιδιακού DNA

Η απομόνωση γονιδιακού DNA έγινε: με κολώνες, με ρητίνη σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας MACHEREY-NAGEL GmbH and Co KG, Germany, με βρασμό και με τη μέθοδο CTAB.

1.5.2.1 Με κολώνες

Όργανα & Υλικά

- ▶ Μικρές σπάτουλες
- ▶ Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ▶ Δύο υδατόλουτρα ρυθμισμένα στους 65°C και 70°C αντίστοιχα
- ▶ Σωλήνες φυγοκέντρησης των 2 ml και 1,5 ml (ependorfs)
- ▶ Κολώνες καθαρισμού (μιας χρήσης, εκλεκτικές ως προς τον ιοντισμό)
- ▶ Φυγόκεντρος

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ▶ CF
- ▶ Πρωτεΐνάση K

- ▶ C4
- ▶ Αιθανόλη
- ▶ CW
- ▶ C5
- ▶ CE

Διαδικασία

- 1) Με τη βοήθεια της αποστειρωμένης σπάτουλας γίνεται μεταφορά βιομάζας των προς ανάλυση βακτηρίων, από τα τρυβλία σε αποστειρωμένους μικροσωλήνες φυγοκέντρησης των 2 ml (erpendorfs) (λήψη δειγμάτων απ' όλα τα τρυβλία γιατί ο μικροοργανισμός βρίσκεται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και τοποθέτηση στους αντίστοιχους μικροσωληνίσκους).
- 2) Ζέσταμα του διαλύματος λύσης των κυττάρων CF στους 65°C.
- 3) Προσθήκη στους μικροσωληνίσκους 550 μl από το διάλυμα λύσης CF, 10 μl πρωτεΐνωση K (μετουσιώνει τις πρωτεΐνες έτσι ώστε να γίνει πιο γρήγορα η λύση του κυττάρου).
- 4) Ακολουθεί επώαση στους 65°C για 30 min.
- 5) Φυγοκέντρηση για 5 min πάνω από 10.000 x g για καθίζηση των πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών.
- 6) Τοποθέτηση 300 μl από το υπερκείμενο σε σωλήνα φυγοκέντρησης του 1,5ml και προσθήκη 300 μl από το διάλυμα C4 και 200 μl αιθανόλη, ισχυρή ανακίνηση του δείγματος με στόχο την απενεργοποίηση των ενζύμων και το καθαρισμό της υδατικής φάσης από τις πρωτεΐνες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min πάνω από 10.000 x g.
- 7) Τοποθέτηση 750 μl από το υπερκείμενο στη κολώνα καθαρισμού και φυγοκέντρηση με ταχύτητα περιστροφής 10.000 x g για 1 min.
- 8) Προσθήκη 400 ml από το διάλυμα πλύσης CW στη κολώνα καθαρισμού, φυγοκέντρηση με ταχύτητα περιστροφής 10.000 x g για 1 min και απομάκρυνση του διαλύματος πλύσης.
- 9) Ακολουθεί δεύτερη πλύση, τοποθέτηση 700 μl από το διάλυμα πλύσης C5 στην κολώνα καθαρισμού, φυγοκέντρηση για 1 min με ταχύτητα περιστροφής 10.000 x g.
- 10) Επανάληψη του σταδίου 9 μόνο που χρησιμοποιούμε 200 μl από το διάλυμα C5 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min με ταχύτητα περιστροφής 10.000 x g.

- 11) Έκπλυση του DNA: σε σωλήνα φυγοκέντρησης του 1,5 ml τοποθετούμε 100 μl από το διάλυμα CE το οποίο πριν το έχουμε ζεστάνει στους 70°C και στη συνέχεια το αφήσαμε να κρυώσει για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 12) Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min με ταχύτητα περιστροφής 10.000 x g και τοποθέτηση του ιζήματος στην κατάψυξη.

1.5.2.2 Με ρητίνη

Όργανα και Υλικά

- ▶ Μικρές αποστειρωμένες σπάτουλες
- ▶ Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ▶ Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C
- ▶ Σωλήνες φυγοκέντρησης (ependorfs)
- ▶ Φυγόκεντρος

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ▶ Αντιδραστήριο 1
- ▶ Αντιδραστήριο 2
- ▶ Χλωροφόρμιο
- ▶ Ρητίνη
- ▶ Κρία ισοπροπανόλη
- ▶ Αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό

Διαδικασία

- 1) Μεταφορά 0,1 gr κυττάρων σε σωλήνες φυγοκέντρησης με τη βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας
- 2) Προσθήκη 600 μl από το αντιδραστήριο 1 έτσι ώστε να διασπαστούν τα κυτταρικά τοιχώματα, ελαφρά ανάδευση και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min.
- 3) Προσθήκη 200 μl από το αντιδραστήριο 2 και αφήνετε για 20 min στο πάγο.
- 4) Προσθήκη 500 μl χλωροφόρμιο έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι πολυσακχαρίτες.

- 5) Προσθήκη 200 ml ρητίνη και φυγοκέντρωση με ταχύτητα περιστροφής 1.500 x g για 10 min. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο σωληνίσκο, προσθήκη 500 ml κρύα ισοπροπανόλης.
- 6) Φυγοκέντρωση με ταχύτητα περιστροφής 4.000 x g για 10 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 7) Προσθήκη στο ίζημα 200 ml αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό και αποθήκευση στην κατάψυξη στους -20°C.

1.5.2.3 Μέθοδος λύσης με βρασμό

Η μεθοδολογία που ακολουθεί περιγράφεται από τους Holmes and Quigley, 1981.

Όργανα και Υλικά

- ▶ Μικρές αποστειρωμένες σπάτουλες
- ▶ Αυτόματη πιπέτα του 1 ml
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ▶ Σωλήνες φυγοκέντρωσης (erpendorfs)
- ▶ Φυγόκεντρος

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

- ▶ Διάλυμα STET
- ▶ Ισοπροπανόλη
- ▶ Διάλυμα αιθανόλης 70% v/v
- ▶ Διάλυμα TE

Διαδικασία

1. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας γίνεται μεταφορά βιομάζας των προς ανάλυση βακτηρίων σε σωλήνες φυγοκέντρωσης erpendorf.
2. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 ml διαλύματος STET.
3. Βρασμός του δείγματος για 45 sec και φυγοκέντρωση για 10 min με ταχύτητα περιστροφής 12.000 rpm.
4. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε νέο erpendorf με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας.

5. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης σε σχέση με τον όγκο του δείγματος.
6. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 12 min στις 12.000 rpm.
7. Ξέπλυμα του ιζήματος με 250 μl 70% v/v αιθανόλης.
8. Το DNA επαναδιαλύεται σε 100 μl TE.

1.5.2.4 Μέθοδος CTAB

Όργανα και Υλικά

- ▶ Συσκευή υγρού αζώτου
- ▶ Γουδί λειοτριβίσης
- ▶ Σωλήνες Falcon
- ▶ Υδατόλουτρο
- ▶ Φυγόκεντρος
- ▶ Αυτόματες μικροπιπέτες
- ▶ Ακρορύγχια μικροπιπέτων (tips)

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- ▶ Διάλυμα CTAB
- ▶ Χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη (24:1)
- ▶ Ρυθμιστικό διάλυμα κατακρήμνισης CTAB 1% w/v
- ▶ Διάλυμα REB
- ▶ Αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό
- ▶ Διάλυμα αιθανόλης (70% v/v)

Διαδικασία

- 1) Κύτταρα *Rhizobium* ομογενοποιούνται παρουσία υγρού αζώτου σε κατάλληλο γουδί λειοτριβίσης.
- 2) Το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε σωλήνες Falcon. Για κάθε gr ομογενοποιημένου ιστού προστίθενται στο σωλήνα 2ml 2x διαλύματος CTAB, προθερμασμένου στους 60°C. Σ' αυτό το στάδιο δημιουργούνται σύμπλοκα CTAB - νουεκλεϊνικών οξέων.
- 3) Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και το μίγμα αναδεύεται ελαφρά.

- 4) Φυγοκέντριση του δείγματος στις 5.000 rpm για 5 min.
- 5) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προσδιορίζεται ο όγκος του. Προστίθεται 1/5 του όγκου του διαλύματος CTAB 5% w/v (προθερμασμένου στους 60°C). Ανάμιξη του μίγματος.
- 6) Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου: ισοαμλικής αλκοόλης (24:1) στο δείγμα. Ανάμειξη.
- 7) Φυγοκέντριση του δείγματος στις 10.000 rpm για 12 min.
- 8) Προσδιορίζεται ο όγκος του υπερκείμενου διαλύματος και πάλι. Στη συνέχεια προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα κατακρήμνισης CTAB 1% w/v, σε αναλογία 1:1,3 σε σχέση με τον όγκο του υπερκείμενου. Το δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- 9) Φυγοκέντριση του δείγματος στις 10.000 rpm για 12 min.
- 10) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 0,5 ml REB (ρυθμιστικού διαλύματος επαναδιάλυσης) για κάθε gr φυτικού ιστού που χρησιμοποιήθηκε.
- 11) Το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη δύο όγκων αιθανόλης. Ανάμειξη και επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για τα 10 min.
- 12) Φυγοκέντριση για 10 min στις 12.000 rpm, το ίζημα που προκύπτει ξεπλένεται με 70% v/v αιθανόλη. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου υπερκάθαρου νερού.

1.5.3 Φασματοφωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Η μέτρηση της απορρόφησης του υπεριώδους φωτός από τις βάσεις των πυρινητικών οξέων είναι μια εύκολη και αρκετά ακριβής μέθοδος προσδιορισμού της ποσότητας του DNA μέσα σε ένα παρασκεύασμα.

Όργανα και Υλικά

- ▶ Φασματοφωτόμετρο
- ▶ Κυβέττες χαλαζία (0,5 ή 1 ml)
- ▶ Αυτόματες μικροπιπέτες
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ▶ Φιαλίδια erpendorf

Διαλύματα

- ▶ TE

Διαδικασία

- 1) Ενεργοποίηση του φασματοφωτόμετρο στο υπεριώδες φως και αναμονή μισή ώρα.
- 2) Προσεκτικός καθαρισμός των κυβετών χαλαζίας.
- 3) Γέμισμα της κυβέτας μέχρι τα 2/3 με το διάλυμα του δείγματος.
- 4) Τοποθέτηση της κυβέτας και μηδενισμός του οργάνου στα 260 nm.
- 5) Προσθήκη 5 μl από το δείγμα μας, προσεκτική ανακίνηση και λήψη ένδειξης στα 260 nm (OD_{260}).

Η ένδειξη στα 260nm επιτρέπει τον υπολογισμό της ποσότητας του DNA στο δείγμα μας.

$OD_{260}=1$ αντιστοιχεί με 50μg/ml δίκλωνου DNA.

ή με 20μg/ml απλόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

- 6) Λήψη ένδειξης στα 280 nm (OD_{280}).
- 7) Ο λόγος OD_{260}/OD_{280} παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της καθαρότητας του DNA (καθαρό θεωρείται το δείγμα του DNA όταν ο λόγος είναι OD_{260}/OD_{280} είναι 1,8).

1.5.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Όργανα

- ▶ Αποστειρωμένοι σωλήνες φυγοκέντρισης των 1,5 ml (eppendorfs)
- ▶ Αυτόματες μικροπιπέτες
- ▶ Αποστειρωμένοι σωλήνες αντιδράσεως πολυμερισμού 0,2 ml (PCR tube)
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών
- ▶ Στατό
- ▶ Μηχανή PCR (APPLIED BIOSYSTEMS GENE AMP PCR SYSTEM 9700)

Αντιδραστήρια

- ▶ Αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό
- ▶ 10x ρυθμιστικό διάλυμα (10x PCR buffer, Mas Taq Mix της εταιρείας Hy Test) (δημιουργεί άριστες συνθήκες για τη δράση του ενζύμου πολυμεράση) η τελική συγκέντρωση των συστατικών του είναι (1x)
 - ◆ 16,6 mM (NH₄)₂SO₄
 - ◆ 67 mM Tris-HCl (pH 8,8 στους 25°C)
 - ◆ 0,01% Tween-20
 - ◆ dNTP's-0,2 mM από το κάθε ένα
 - ◆ MgCl₂-0,2 mM (δρα ως καταλύτης της ενζυμικής αντίδρασης πολυμερισμού)
 - ◆ SmaS Taq -1,5 U
- ▶ Εκκινητές (χρησιμοποιείται ο εκκινητής 35S)
 - ~ 50 ml 35S-F: (5' -GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3') με συγκέντρωση 10pmol/μl
 - ~ 50 ml 35S-R: (5' -AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C -3') με συγκέντρωση 10pmol/μl(Η εταιρεία είναι Foster City, CA 94404 USA)

Διαδικασία

- 1) Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι ποσότητες αντιδραστηρίων:
 - ◆ 10 μl αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό
 - ◆ 1,25 μl εκκινητής 35S-F (5' - GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3')
 - ◆ 1,25 μl εκκινητής 35S-R (5' - AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C -3')
 - ◆ 10 μl DNA
 - ◆ 2,5 μl Mas Taq Mix

Προς διευκόλυνση, πραγματοποιήθηκε παρασκευή διαλύματος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Master-mix, 7 δειγμάτων). Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού χρησιμοποιήθηκαν επταπλάσιες ποσότητες όλων των παραπάνω αντιδραστηρίων εκτός από το DNA των δειγμάτων που προστέθηκε σε κάθε σωλήνα αντιδράσεως πολυμερισμού (0,2 ml PCR tube) ξεχωριστά. Το έβδομο δείγμα αποτελεί το «δείγμα-μάρτυρα» όπου ακολουθείται η άνωθεν πορεία εκτός της εισαγωγής του DNA.

2) Τα δείγματα τοποθετούνται στις κατάλληλες θήκες του μηχανήματος πολυμερισμού.

Οι συνθήκες υπό τις οποίες έλαβε χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι οι ακόλουθες:

1^ο Στάδιο: 5min στους 95°C (αποδιάταξη DNA).

2^ο Στάδιο: 40 κύκλους όπου ο κάθε κύκλος αποτελείται από:

- ♦ 25 sec στους 95°C (αποδιάταξη DNA).
- ♦ 30 sec στους 60°C (υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών).
- ♦ 45 sec στους 72°C (δράση πολυμεράσης-προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων).

3^ο Στάδιο: 7min στους 72°C (δράση πολυμεράσης-προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων).

3) Μετά το πέρας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση.

1.5.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόξης χρησιμοποιείται προκειμένου να διαχωριστούν και να αναλυθούν νουκλεϊκά οξέα διαφορετικού μεγέθους και διαμόρφωσης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων γίνονται ορατά στην πηκτή αгарόξης με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αгарόξη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν και κυμαίνεται μεταξύ 0,7% και 2% (w/v). Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα της πηκτής σε αгарόξη τόσο μικρότερα μόρια DNA μπορούν να διαχωριστούν. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι σύμφωνη με το πρωτόκολλο της εταιρείας Amersham Pharmacia Biotech AB.

Όργανα

- ▶ Πλήρης συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης: ηλεκτροφοριστικό δοχείο, υποδοχέας πηκτής αγαρόζης, χτένες δημιουργίας πηγαδιών για την τοποθέτηση του δείγματος
- ▶ Τροφοδοτικό
- ▶ Συσκευή υπεριώδους φωτός
- ▶ Αυτόματες μικροπιπέτες
- ▶ Αποστειρωμένα ακρορύγχια μικροπιπετών (tips)
- ▶ Κωνικές φιάλες
- ▶ Ογκομετρικοί κύλινδροι
- ▶ Ζυγός
- ▶ Φούρνος μικροκυμάτων
- ▶ Σύστημα φωτογράφισης πηκτών αγαρόζης
- ▶ Πιπέτες παστέρ
- ▶ Φιαλίδια erpendorf

Διαλύματα

- ▶ Αγαρόζη (Electrophoresis Grade Agarose, Lift Technologies GIBCO BTL UK)
- ▶ 50x TAE pH 8,0
- ▶ 1x TAE (20 ml 50x TAE σε 1 lt απιονισμένο νερού)
- ▶ Διάλυμα φορτώσεως (loading buffer) (0,25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% w/v κυανό του ξυλενίου, 15% φικόλη Amersham Pharmacia Biotech AB)
- ▶ 10 mg/ml αρχικού διαλύματος, 1mg/lt τελική συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr ή CH₃CH₂Br)
- ▶ 10 μl δείκτη μοριακών μεγεθών DNA (1 kb Plus DNA Ladder της εταιρείας GIBCO BRL αρχική συγκέντρωση 1 μg/μl, τελική συγκέντρωση 100 ng/μl)

Διαδικασία

1. Παρασκευή πηκτής 50 ml 1% w/v σε αγαρόζη. Το παρασκεύασμα τοποθετείται στον φούρνο μικροκυμάτων έως ότου πραγματοποιηθεί πλήρη διάλυση της αγαρόζης και το μίγμα καταστεί διαφανές. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και να αποκτήσει θερμοκρασία περίπου ίση με 50°C.
2. Προσθήκη EtBr ώστε η τελική συγκέντρωσή του στην πηκτική να είναι 1 mg/lt καλή ανάμειξη.

3. Σφράγισμα των ανοικτών πλευρών του υποδοχέα με κολλητική ταινία και τοποθέτηση του υποδοχέα σε επίπεδη επιφάνεια. Η ειδική χτένα τοποθετείται στην κατάλληλη θέση.
4. Εισαγωγή του περιεχόμενου της φιάλης στον υποδοχέα και με τη βοήθεια πιπέτας παστέρ απομάκρυνση των φυσαλίδων που πιθανώς να έχουν δημιουργηθεί και αφήνεται να στερεοποιηθεί η αγαρόζη σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Αφαίρεση με προσοχή της κολλητικής ταινίας από τις δύο πλευρές του υποδοχέα με την πηκτή αγαρόζης. Τοποθέτηση με προσοχή του υποδοχέα με τη πηκτή μέσα στην υποδοχή της ηλεκτροφορητικής συσκευής.
6. Γέμισμα της ηλεκτροφορητικής συσκευής με ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE ώστε να καλυφθεί πλήρως η πηκτή αγαρόζης.
7. Αφαίρεση με προσοχή της χτένας έτσι ώστε οι σχηματιζόμενες θέσεις «πηγάδια» για τα δείγματα του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν να παραμείνουν ανέπαφες.
8. Προετοιμασία των δειγμάτων του DNA για ηλεκτροφόρηση καθώς και του μάρτυρα DNA (DNA marker: ακολουθίες DNA γνωστών μοριακών βαρών).
Σε κάθε φιαλίδιο erpendorf προσθέτουμε:
 - ♦ 12 μl του απομονωμένου DNA
 - ♦ 5 μl από το διάλυμα φόρτωσης
9. Τοποθέτηση των δειγμάτων προσεκτικά με τη βοήθεια μικροπιπέτας σε κάθε μια από τις θέσεις ηλεκτροφόρησης («πηγάδια») και στο τέλος της σειράς των πηγαδιών φορτώνουμε την κατάλληλη ποσότητα μάρτυρα DNA.
10. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων υπό σταθερή τάση 5 v/cm για 30 min.
11. Τοποθέτηση της πηκτής σε τράπεζα (συσκευή) υπεριώδους φωτός και φωτογράφησή της με την βοήθεια ψηφιακής μηχανής.

1.6 Έλεγχος εισαγωγής DNA από ΓΤ σογιάλευρο σε κύτταρα *Rhizobium* αν αυξήσουμε τη συγκέντρωσή του

Διαδικασία

Σε αυτό το πείραμα αναφέρεται εν συντομία μόνο η διαδικασία που ακολουθήθηκε γιατί πολλές από τις μεθοδολογίες έχουν αναφερθεί σε προηγούμενα υποκεφάλαια.

1. Απομόνωση DNA με κλώνες από γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο (Roundup Ready 2,5% w/w) και PCR με τον εκκινητή 35S.
2. Παρασκευή υγρής καλλιέργειας 50 ml LB.
3. Εμβολιασμός με κύτταρα *Rhizobium*, τοποθέτηση σε επωαστήρα με σύστημα ανάδευσης και ταχύτητα περιστροφής 200 rpm. Μετά από 8 ώρες λήψης δειγμάτων.
4. Στους τρεις πρώτους σωλήνες errendorf τοποθετούνται 25 μl προϊόν PCR και 75 μl κύτταρα *Rhizobium*, ακολουθεί επώαση για 10, 15 και 20 min. Στον τέταρτο σωλήνα τοποθετούνται μόνο 25 μl προϊόν PCR.
5. Στους τρεις πρώτους σωλήνες γίνεται προσθήκη 4 μl DNase και 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα. Ανάδευση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί βρασμός στους 80°C έτσι ώστε να αδρανοποιηθεί η DNase για 10 min.
6. Φυγοκέντρηση με ταχύτητα περιστροφής 2.000 x g για 5 min και συλλογή του ιζήματος.
7. PCR με τον εκκινητή 35S και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του μικροβιακού φορτίου, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Για την εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε επίστρωση σε τρυβλία με LB 10% w/v στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 1: Εκτίμηση μικροβιακού φορτίου

| Βακτήρια | Ποσοστό LB στα τρυβλία επίστρωσης | Πληθυσμός βακτηρίων | Αριθμός βακτηρίων στην 10^{-9} αραιώση |
|-----------|-----------------------------------|---------------------|--|
| Rhizobium | 10% w/v | $25 * 10^{12}$ | 100 |

2.2 Ταυτοποίηση Βακτηρίων Rhizobium

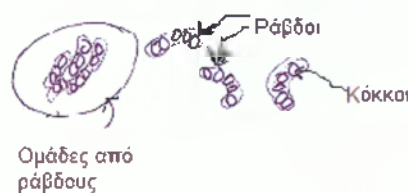
Το πιο πιθανό είδος Rhizobium που απομονώθηκε από τα φυμάτια τριφυλλίου είναι το *Rhizobium leguminosarum bu. trifolii* (*R. L. bu. Trifolii*) το οποίο είναι το μόνο που αναπτύσσεται μαζί με τριφύλλι (Noble, 1998). Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με υπόστρωμα LB σύμφωνα με την μεθοδολογία που παρατέθηκε στα υλικά και μέθοδοι και αφού επώαστηκαν στους 20-25°C για 3 ημέρες παρατηρήθηκαν ελαφρά κίτρινες αποικίες. Η μικροσκοπική ανάλυση και η χρώση Gram επιβεβαίωσαν την αποκλειστική παρουσία των συγκεκριμένων βακτηριδίων. Η μορφολογία κυττάρων Rhizobium από αποικία που εμβολιάστηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB και επώαστηκε για 3 ημέρες στους 25°C συνοψίζεται στον πίνακα 2 και σκιαγραφείται στο Σχήμα 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Μορφολογία κυττάρων Rhizobium

| | |
|----------------------------------|--|
| Μορφή | Ορθογώνιες ράβδοι |
| Άξονας | Ευθύς ή με κλίση |
| Άκρες | Στρογγυλεμένες |
| Αναλογία μεγέθους (πλάτος:μήκος) | 1:3 |
| Ομαδοποίηση | Ζευγαρωμένα, αλυσίδες και πυκνές συστάδες |
| Χρώση Gram | Αρνητική |
| Άλλα | 3-5 στρογγυλοί πορφυροί κόκκοι μέσα στις ράβδους |

(www.geocities.com/waterose_test/labs15.html)

Σχήμα 1: Χρώση Gram σε κύτταρα *Rhizobium*



(www.geocities.com/waterose_test/labs15.html)

Τα βακτήρια *Rhizobium* είναι αρνητικά κατά Gram. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο εκπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται. Αυτό αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και αυξάνει την διαπερατότητα της. Έτσι το σύμπλοκο της χρωστικής μπορεί να εκπλυθεί, αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρω από την σασφρανίνη.

Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχουν πολυπλοκότερο κυτταρικό τοίχωμα, με εξωτερική μεμβράνη που καλύπτει την πεπτιδογλυκάνη. Η πεπτιδογλυκάνη αντιπροσωπεύει το 5-10% του ξηρού βάρους και βρίσκεται ανάμεσα στην κυτοπλασματική μεμβράνη και την εξωτερική μεμβράνη. Οι λιποπολυσακχαρίτες είναι χαρακτηριστικοί των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Καραγκούνη-Κύρτσου, 1999).

2.3 Διαδοχή των χαρακτηριστικών φάσεων του κύκλου αύξησης των *Rhizobium* σε κλειστές καλλιέργειες

Με τον όρο «καλλιέργεια κλειστού τύπου» εννοούμε τη διαδικασία ανάπτυξης μικροοργανισμών σε «κλειστά» (ή περιορισμένα) συστήματα, δηλαδή σε βιοαντιδραστήρες στους οποίους δεν ανανεώνεται κανένας παράγοντας αύξησης (παρά μόνο το οξυγόνο). Στις συγκεκριμένες καλλιέργειες εμβολιάζεται ο μικροοργανισμός στο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα, που βρίσκεται στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα και στη συνέχεια αναπτύσσεται σε ένα περιβάλλον, στο οποίο μεταβάλλεται συνεχώς η σύνθεση του υποστρώματος και η συγκέντρωση της βιομάζας ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού των κυττάρων (Ζερβάκης, 2004).

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης αύξησης των βακτηριακών κυττάρων *Rhizobium* υπολογίσθηκε η ξηρή βιομάζα των κυττάρων αλλά και η πυκνότητα της

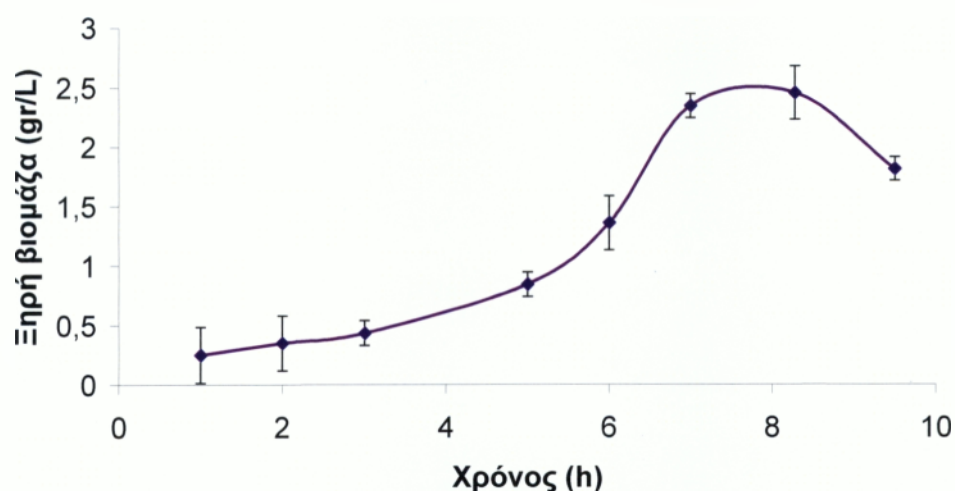
θολομετρικά. Τα αποτελέσματα που περιγράφονται παρακάτω αφορούν την ξηρή βιομάζα.

Αρχικά έγινε υγρή καλλιέργεια κλειστού τύπου με κύτταρα *Rhizobium* τα οποία εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα LB (10% w/v) για να προσδιορισθεί η καμπύλη αύξησης των βακτηρίων. Σε ζυγαριά ακριβείας ζυγίσαμε το βάρος κάθε erpendorf. Κάθε μια ώρα παίρναμε δείγμα 1ml από την καλλιέργεια φυγοκεντρούσαμε για 5 min στους 2°C και ταχύτητα περιστροφής 14.000 rpm απομακρύνουμε το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα το ξηράναμε στους 100-105 °C για 12-18 ώρες. Μετά ζυγίσαμε τους σωλήνες erpendorf με τα κύτταρα και στη συνέχεια υπολογίσαμε τη ξηρή βιομάζα των κυττάρων *Rhizobium*.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον πίνακα 2 και το γράφημα 1. Τα αποτελέσματα του τρόπου ανάπτυξης είναι ενδεικτικά του χρόνου διενέργειας των δειγματοληψιών για να μελετηθεί σε κάθε διαφορετική φάση ανάπτυξης η δυνατότητα πρόσληψης εξω-κυτταρικού DNA προερχομένου από την αποδόμηση γενετικά τροποποιημένης σόγιας.

Πίνακας 2: Τιμές ξηρής βιομάζας κυττάρων *Rhizobium* στον αντίστοιχο χρόνο

| Χρόνος (h) | Ξηρή βιομάζα (gr/L) ± σταθερό σφάλμα |
|------------|--------------------------------------|
| 1 | 0,24±0,236 |
| 2 | 0,34±0,231 |
| 3 | 0,43±0,104 |
| 5 | 0,84±0,102 |
| 6 | 1,35±0,227 |
| 7 | 2,34±0,102 |
| 8 | 2,44±0,222 |
| 9.5 | 1,81±0,098 |



Γράφημα 1: Διαδοχή των χαρακτηριστικών φάσεων του κύκλου αύξησης κυττάρων *Rhizobium*.

- Από 0-3 ώρες ο μικροοργανισμός είναι στη φάση υστέρησης.
- Από 3-7 ώρες ο μικροοργανισμός είναι στη φάση αύξησης.
- Από 7-8 ώρες ο μικροοργανισμός είναι στη φάση στασιμότητας.
- Από 8-10 ώρες ο μικροοργανισμός είναι στη φάση θανάτου.

Η ανάπτυξη του *Rhizobium* σε καλλιέργεια κλειστού τύπου μπορεί να περιγραφεί από τέσσερις διακριτές φάσεις:

A) Φάση υστέρησης ή λανθάνουσα φάση ("lag Phase"): Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής, που αρχίζει αμέσως μετά τον εμβολιασμό του υποστρώματος από τον μικροοργανισμό δεν παρατηρείται αύξηση της βιομάζας (Ζερβάκης, 2004). Αυτό οφείλεται σε διάφορους λόγους όπως η ανάγκη του πληθυσμού να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες αύξησης. Στη διάρκεια αυτής της φάσης πιθανόν να γίνεται η σύνθεση ενός ειδικού ενζύμου που απαιτείται για τον καταβολισμό της πηγής άνθρακα και της πηγής ενέργειας (Καραγκούνη-Κύρτσου, 1999). Στο περιβάλλον ανάπτυξης πραγματοποιείται μια φυσικοχημική εξισορρόπηση και προσαρμογή των ενζυμικών

συστημάτων του μικροοργανισμού στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η διάρκεια της συγκεκριμένης φάσης εξαρτάται από την ποιότητα του εμβολίου, τα μεταβολικά χαρακτηριστικά του, αλλά και από τη φύση του υποστρώματος (Ζερβάκης, 2004).

B) Φάση αύξησης ("growth Phase"): Η φάση μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρία επιμέρους στάδια: επιταχυνόμενης αύξησης, εκθετική και επιβραδυνόμενης αύξησης. Το πρώτο είναι σύντομης διάρκειας και αρχίζει αμέσως μετά τη φάση υστέρησης ως αποτέλεσμα της προσαρμογής του μικροοργανισμού στο νέο περιβάλλον αύξησης. Ακολούθως ο μικροοργανισμός αρχίζει να αναπτύσσεται διπλασιάζοντας τη βιομάζα του στη μονάδα του χρόνου και ο ειδικός ρυθμός αύξησης έχει τη μέγιστη τιμή παρόλο που ο μεταβολισμός των κυττάρων ελαττώνει την ποσότητα του διαθέσιμου υποστρώματος αλλά μεταβάλλει και τη σύσταση του λόγω της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων, ο ρυθμός αύξησης παραμένει σταθερός (και ανεξάρτητος της συγκέντρωσης του υποστρώματος με την προϋπόθεση πως υπάρχει περίσσεια του) κατά τη διάρκεια του σταδίου της εκθετικής αύξησης. Τέλος στο στάδιο επιβραδυνόμενης αύξησης, ο ειδικός ρυθμός αύξησης βαίνει μειούμενος, ενώ ο ρυθμός αύξησης υπερβαίνει τον ρυθμό θανάτου των κυττάρων (Ζερβάκης, 2004).

Γ) Φάση στασιμότητας ("stationary phase"): Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής παρατηρείται μηδενισμός της αύξησης (δηλαδή ο ρυθμός αύξησης ισούται με το ρυθμό θανάτου των κυττάρων), λόγω της εξάντλησης ενός ή περισσότερων περιοριστικών παραγόντων για την αύξηση της βιομάζας ή και λόγω της παρουσίας τοξικών συγκεντρώσεων μεταβολικών προϊόντων. Η αποσύνθεση των νεκρών κυττάρων παρέχει νέο υπόστρωμα για την επιβίωση νεώτερων κυττάρων, ενώ οι μεταβολίτες που παράγονται κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης φάσης έχουν συχνά πολύ μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (Ζερβάκης, 2004).

Δ) Φάση autólυσης ή φάση θανάτου ("death phase"): Κατά τη φάση αυτή τα ενεργειακά αποθέματα των κυττάρων έχουν εξαντληθεί και ο ρυθμός αύξησης είναι μικρότερος από τον ρυθμό θανάτων των κυττάρων (λόγω της αυτολύσης τους).

Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της φάσης στασιμότητας και της φάσης autólυσης εξαρτάται από τον μικροοργανισμό και της παραμέτρους της καλλιέργειας. (Ζερβάκης, 2004).

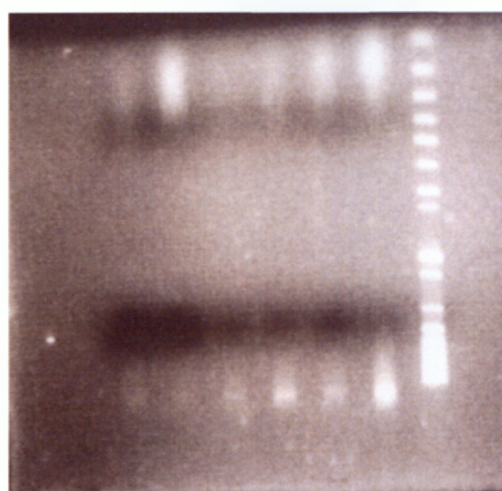
2.4 Εκτίμηση μεταφοράς DNA από ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο 2,5% (w/w) σε κύτταρα Rhizobium

2.4.1 Μετά από επώαση 2 ημερών

Αρχικά καλλιεργήσαμε κύτταρα Rhizobium σε υπόστρωμα με LB και 2,5% w/w αλεύρι από γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready™ Soya) μερικώς υδρολυμένο.

Τα δείγματα υγρής καλλιέργειας τα λάβαμε στις 2h, 5h & 9h, προσθέσαμε DNase με σκοπό να καταστρέψουμε το DNA που βρίσκεται έξω από τα κύτταρα ακολούθησε βρασμός στους 80°C για 10 min με στόχο την αδρανοποίησή της και στη συνέχεια απομονώσαμε το DNA των Rhizobium με κολώνες. Μετά κάναμε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για να εξετάσουμε αν υπάρχει DNA στο δείγμα (Εικόνα 1).

Τα δείγματα που προέρχονται από τα τρυβλία επώαστηκαν για 2 ημέρες στους 25°C στη συνέχεια απομονώσαμε το DNA των Rhizobium με κολώνες και κάναμε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην πηκτή προσθέσαμε υλικό καλλιέργειας μετά από πέψη με DNase και δείκτη (marker) μοριακών μεγεθών DNA έτσι ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα (Εικόνα 1).



C L₂ L₅ L₉ P₂ P₅ P₉ M

Εικόνα 1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης DNA Rhizobium.

L₂, L₅, L₉: Ολικό DNA Rhizobium μετά από πέψη με DNase του εξωκυτταρικού DNA. Τα δείγματα προέρχονται από υγρή καλλιέργεια κλειστού τύπου με LB και ΓΤ σογιάλευρο (Roundup Ready™ Soya) από τρία διαφορετικά σημεία ανάπτυξης (2h, 5h, 9h).

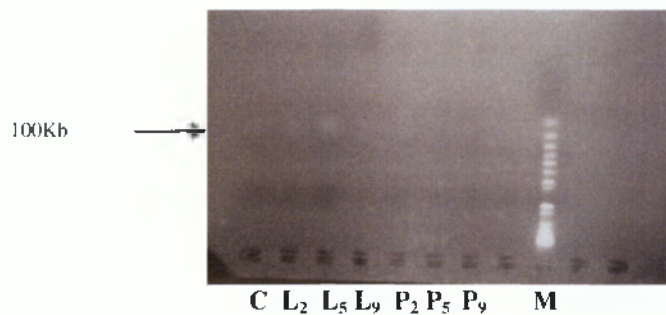
P₂, P₅, P₉: Ολικό DNA Rhizobium από δείγματα που ελήφθησαν από τρυβλία Petri μετά από επώαση 2 ημερών. Το υπόστρωμα περιείχε LB και ΓΤ σογιάλευρο (Roundup Ready™ Soya). Ο αρχικός εμβολιασμός των τρυβλίων Petri έγινε με Rhizobium από υγρή καλλιέργεια κλειστού τύπου με LB, τα δείγματα προέρχονται από τρία διαφορετικά σημεία ανάπτυξης (2h, 5h, 9h).

C: Υλικό καλλιέργειας μετά από πέψη με DNase.

M: 1kb + marker.

Από την Εικόνα 1 συμπεραίνουμε ότι στα δείγματα υπάρχει αρκετή ποσότητα DNA.

Στη συνέχεια διενεργήθηκε PCR με τον εκκινητή 35S ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την εξέταση της πιθανότητας να ενσωματωθεί το DNA από γενετικά τροποποιημένη σόγια στο γονιδίωμα ή να διατηρηθεί μέσα στο κύτταρο για ορισμένο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντων PCR.

Δείγματα DNA Rhizobium μετά από PCR με την χρήση του εκκινητή 35S.

L₂, L₅, L₉: Προϊόντα PCR από DNA Rhizobium μετά από πέψη με DNase του εξωκυτταρικού DNA και επαύξηση με την χρήση του εκκινητή 35S. Τα δείγματα προέρχονται από υγρή καλλιέργεια κλειστού τύπου με LB και ΓΤ σογιάλευρο (Roundup Ready™ Soya) από τρία διαφορετικά σημεία ανάπτυξης (2h, 5h, 9h).

P₂, P₅, P₉: Προϊόντα PCR από DNA Rhizobium και επαύξηση με την χρήση του εκκινητή 35S. Τα δείγματα ελήφθησαν από τρυβλία Petri μετά από επώαση 2 ημερών. Το υπόστρωμα περιείχε ΓΤ σογιάλευρο (Roundup Ready™ Soya). Ο αρχικός εμβολιασμός των τρυβλίων Petri έγινε με Rhizobium από υγρή καλλιέργεια κλειστού τύπου με LB. τα δείγματα προέρχονται από τρία διαφορετικά σημεία ανάπτυξης (2h, 5h, 9h).

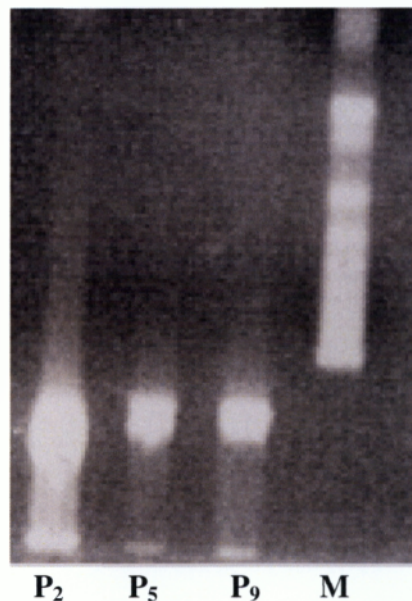
C: Υλικό καλλιέργειας μετά από πέψη με DNase.

M: 1 kb+ marker .

Από την Εικόνα 2 συμπεραίνουμε ότι τα κύτταρα Rhizobium δεν έχουν προσλάβει DNA από γενετικά τροποποιημένα σόγια.

2.4.2 Μετά από επώαση 15 ημερών

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε και εξετάστηκε μετά από 15 ημέρες. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην εικόνα 3 και στην εικόνα 4. Στην εικόνα 3 εμφανίζονται τα αποτελέσματα επώασης κυττάρων *Rhizobium* μετά από 15 ημέρες. Τα δείγματα προέρχονται από καλλιέργεια σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB και ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο (Roundup ReadyTM Soya 2,5% w/w).



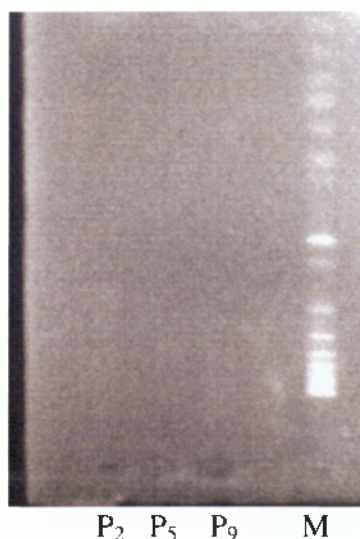
Εικόνα 3: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης DNA *Rhizobium*.

P₂, P₅, P₉: Ολικό DNA *Rhizobium* από δείγματα που ελήφθησαν από τρυβλία Petri μετά από επώαση 15 ημερών. Το υπόστρωμα περιείχε LB και ΓΤ σογιάλευρο (Roundup ReadyTM Soya). Ο αρχικός εμβολιασμός των τρυβλίων Petri έγινε με *Rhizobium* από υγρή καλλιέργεια κλειστού τύπου με LB, τα δείγματα προέρχονται από τρία διαφορετικά σημεία ανάπτυξης (2h, 5h, 9h).

M: 1 kb+ marker.

Από την Εικόνα 3 συμπεραίνουμε ότι στα δείγματα μας υπάρχει αρκετή ποσότητα DNA.

Στην εικόνα 4 εμφανίζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης προϊόντων PCR με εκκινητή 35S. Τα δείγματα προέρχονται από καλλιέργεια σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB και αλεύρι από γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready™ Soya 2,5% w/w) μερικώς υδρολυμένο.



Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντων PCR.

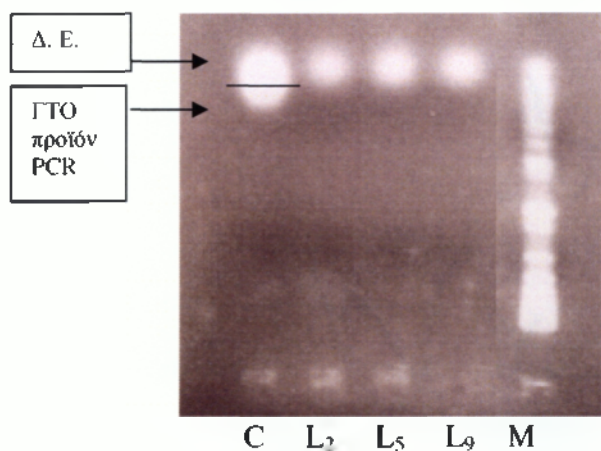
P₂, P₅, P₉: Προϊόντα PCR από DNA *Rhizobium* και επαύξηση με την χρήση του εκκινητή 35S. Δείγματα που ελήφθησαν από τρυβλία Petri μετά από επώαση 15 ημερών. Το υπόστρωμα περιείχε ΓΤ σογιάλευρο (Roundup Ready™ Soya). Ο αρχικός εμβολιασμός των τρυβλίων Petri έγινε με *Rhizobium* από υγρή καλλιέργεια κλειστού τύπου με LB, τα δείγματα προέρχονται από τρία διαφορετικά σημεία ανάπτυξης (2h, 5h, 9h).

M: 1 kb και marker.

Από την Εικόνα 4 συμπεραίνουμε ότι τα κύτταρα *Rhizobium* δεν έχουν προσλάβει DNA από γενετικά τροποποιημένη σόγια.

2.5 Εκτίμηση μεταφοράς DNA από ΓΤ σογιάλευρο σε κύτταρα *Rhizobium* αν αυξήσουμε τη συγκέντρωσή του

Αρχικά απομονώσαμε με κολώνες DNA από γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο και στη συνέχεια διενεργήθηκε PCR με τον εκκινητή 35S. Το προϊόν PCR επώαστηκε με κύτταρα *Rhizobium* τα οποία ήταν στο τέλος της φάσης στασιμότητας για 10, 15 και 20 min. Κατόπιν προσθέσαμε DNase με σκοπό να καταστρέψουμε το εξωκυτταρικό DNA και βρασμός στους 80°C με στόχο την αδρανοποίησή της. Ακολούθησε PCR με τον εκκινητή 35S και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης προϊόντων PCR.

L₂, L₅, L₉: Προϊόντα PCR από DNA *Rhizobium* μετά από πέψη με DNase του εξωκυτταρικού DNA με επαύξηση με τη χρήση του εκκινητή 35S. Τα αρχικά δείγματα *Rhizobium* ελήφθησαν στο τέλος της φάσης στασιμότητας από υγρή καλλιέργεια κλειστού τύπου με LB. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μικροσυλινίσκους και επώασθηκαν για τρεις διαφορετικούς χρόνους 10 min (L₂), 15 min (L₅), και 20 min (L₉) με καθαρό DNA (1 mg/ml) που ήταν προϊόν PCR από γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο με τον εκκινητή 35S. Ακολούθησε επώαση με DNase και μετά βρασμός για την αδρανοποίησή της.

C: Καθαρό DNA (1 mg/ml) που ήταν προϊόν PCR από γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο με τον εκκινητή 35S.

M: 1 kb + marker

Από την Εικόνα 5 συμπεραίνουμε ότι παρότι αυξήσαμε την ποσότητα DNA από γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο τα βακτηριακά κύτταρα *Rhizobium* δεν προσέλαβαν DNA. Αυτό αποδεικνύεται συγκρίνοντας τα δείγματα L₂, L₅, L₉ με το δείγμα C. Το gel έπρεπε να τρέξει περισσότερο ώστε να διαχωριστούν τα διμερή εκκινητών από το καθαρό DNA προϊόν PCR από γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος εισαγωγής, λήψης και έκφρασης εξωκυτταρικού DNA από γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο που φέρει τη γενετική τροποποίηση Roundup Ready σε μικροοργανισμούς του εδάφους και συγκεκριμένα σε είδη του γένους *Rhizobium*.

Αρχικά έγινε συλλογή τριφυλλιού και απομόνωση φυματίων από τις ρίζες τους. Τα φυμάτια αποστειρώθηκαν, πολτοποιήθηκαν, εμβολιάστηκαν σε τρυβλία όπου είχαν ως θρεπτικό υπόστρωμα LB (10% w/v) και επωάστηκαν στους 25°C για 3 ημέρες. Το θρεπτικό υπόστρωμα LB ανήκει στα εμπειρικά υποστρώματα και περιέχει τρυπτόνη που συνεισφέρει ως πηγή άνθρακα, ενέργειας και αζώτου, εκχύλισμα ζύμης όπου είναι μία εξαιρετική πηγή βιταμινών B καθώς επίσης αζώτου και άνθρακα και χλωριούχο νάτριο έτσι ώστε να αποφευχθούν τα φαινόμενα όσμωσης. Ακολούθησε χρώση Gram έτσι ώστε να διαπιστωθεί η αποκλειστική παρουσία κυττάρων *Rhizobium*.

Τα *Rhizobium* είναι κινητοί βάκιλλοι, αρνητικά κατά Gram αερόβια βακτήρια. Η μορφολογία των κυττάρων *Rhizobium* χαρακτηρίζεται ως αμβλεία διαμορφωμένη ράβδος. Τα Gram αρνητικά κύτταρα εμφανίζονται συχνά ενωμένα λόγω της παρουσίας πολύ-β-υδροξυβουτρικού οξέος (Royal Roads, 1998). Οι Gram κηλίδες των πολτοποιημένων φυματίων, όπως περιγράφονται στον πίνακα 1 στα αποτελέσματα, δείχνουν την παρουσία βακτηριακών κυττάρων που έχουν χαρακτηριστική μορφολογία κυττάρων *Rhizobium*. Τα αρνητικά κατά Gram κύτταρα ήταν ορθογώνιες ράβδοι με στρογγυλεμένες άκρες. Οι ράβδοι ήταν ομαδοποιημένες σε ζευγάρια, αλυσίδες και συστάδες. Επιπρόσθετα περιείχαν 3-5 στρογγυλούς πορφυρούς κόκκους μέσα στις ράβδους.

Στη συνέχεια έγινε υγρή καλλιέργεια (με LB χωρίς ΓΤ σογιάλευρο) και εμβολιασμός με κύτταρα *Rhizobium* έτσι ώστε να μελετηθούν άμεσα οι φάσεις ανάπτυξης του μικροοργανισμού και έμμεσα η δυνατότητα πρόσληψης εξωκυτταρικού DNA προερχομένου από την αποδόμηση γενετικά τροποποιημένης σόγιας. Έτσι διαπιστώθηκε ότι ο μικροοργανισμός είναι σε φάση στέρησης, τις πρώτες 3 ώρες, στη φάση αύξησης από 3-7 ώρες, στη φάση στασιμότητας από 7-8 ώρες και τέλος στις φάσεις θανάτου από 8-10 ώρες.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια είναι ικανά να λάβουν από το περιβάλλον «γυμνό» DNA κάτω από συνθήκες stress (Hecker *et al.*,

1996) και απαιτούνται περίπου 10sec από τη στιγμή της προσκόλλησής του για να εισέλθει το «γυμνό» DNA στα κύτταρα (Rose, 1968).

Η πρώτη ομάδα των πειραμάτων είχε ως σκοπό να προσομοιώσει καταστάσεις φυσικού περιβάλλοντος. Στο υλικό ανάπτυξης είτε σε υγρή είτε σε στερεή καλλιέργεια είχε προστεθεί μερικώς υδρολυμένο ΓΤ σογιάλευρο με αρχική περιεκτικότητα 2,5% w/w. Συγκριτικά με τα επιτρεπόμενα όρια για την παρουσία πρόσμειξης γενετικά τροποποιημένης σόγιας σε καλλιεργούμενα είδη στον αγρό επιτρέπεται σε επίπεδα μέχρι του 0,5% από τον Ευρωπαϊκό κανονισμό 1829/2003 που αφορά θετικά αξιολογημένους ΓΤΟ ενώ η συγκέντρωση στα πειράματα ήταν 5 φορές υψηλότερη.

Για τη μελέτη εισαγωγής «γυμνού» DNA στα βακτηριακά κύτταρα *Rhizobium* έγινε αρχικά υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υπόστρωμα LB και ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο (2,5% w/w αλεύρι από γενετικά τροποποιημένη σόγια Roundup Ready), επώαση 2 ημερών, απομόνωση DNA με κλώνες, ηλεκτροφόρηση για να εξετάσουμε αν απομονώθηκε επαρκή ποσότητα DNA, PCR με τον εκκινητή 35S και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για να ελέγξουμε την πιθανότητα εισαγωγής DNA και ύπαρξής του μέσα στα κύτταρα. Έπειτα από όλα αυτά συμπεράναμε ότι τα βακτηριακά κύτταρα *Rhizobium* δεν έχουν προσλάβει εξωκυτταρικό DNA.

Στη συνέχεια το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε με την εξής διαφορά: η υγρή καλλιέργεια είχε ως θρεπτικό υπόστρωμα μόνο LB και ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλία Petri που είχαν ως θρεπτικό υπόστρωμα LB και ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο. Αυτό το πείραμα είχε ως σκοπό να διαπιστωθεί αν υπάρχει πιθανότητα να μεταφέρεται «γυμνό» DNA από το υπόστρωμα στα κύτταρα. Και σε αυτό το πείραμα αποδείχτηκε ότι τα *Rhizobium* δεν προσέλαβαν εξωκυτταρικό DNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η πιθανότερη που μπορεί να συμβεί στη φύση όμως η πρώτη μέθοδος δίνει πιο γρήγορα αποτελέσματα.

Και τα δύο προηγούμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν έπειτα από επώαση δύο ημερών κυττάρων *Rhizobium* με «γυμνό» DNA ενώ το πείραμα που είχε στα τρυβλία ως θρεπτικό υπόστρωμα LB και ΓΤ μερικώς υδρολυμένο σογιάλευρο επαναλήφθηκε και εξετάστηκε μετά από 15 ημέρες. Τα αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αρνητικά.

Για την περαιτέρω διερεύνησης της πιθανής εισαγωγής γενετικά τροποποιημένου DNA σε βακτηριακά κύτταρα *Rhizobium* διερευνήθηκε η περίπτωση της μεταφοράς DNA σε υψηλότερη συγκέντρωση από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στα μερικώς υδρολυμένα υποστρώματα, με καθαρό πλέον DNA με συγκέντρωση 1 mg/ml προϊόν

PCR από γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο εφόσον δεν ήταν δυνατή η προσθήκη μερικής υδρολυμένου υποστρώματος με αυτή την συγκέντρωση στο υλικό καλλιέργειας. Τα εγκεκριμένα υλικά γενετικά τροποποιημένου σογιάλεου από το IRMM (Institute of Ref. Materials, Belgium) είναι μέχρι 5%. Αυξημένη παρουσία ΓΤ σογιάλεου στο θρεπτικό υπόστρωμα δεν είναι δυνατή καθώς καθιστά αδύνατη την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κυρίως λόγω αλλαγής των φυσικών ιδιοτήτων στο υλικό καλλιέργειας. Επιπρόσθετα δεν υφίστανται άλλα προϊόντα αποδόμησης του σογιάλεου που ουσιαστικά είναι άγνωστη η πιθανή εμπλοκή τους στην μεταφορά γενετικού υλικού. Οι χρόνοι επώασης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μέχρι 20 min καθώς μεγαλύτεροι σε διάρκεια χρόνοι οδηγούν σε πιθανή λύση των κυττάρων με αποτέλεσμα ο προσδιορισμός του γενετικού υλικού από το σογιάλευρο που πιθανά έχει εισέλθει σε μικροοργανισμούς να είναι αδύνατος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκε παρουσία γενετικού υλικού από σογιάλευρο στο εσωτερικό των κυττάρων *Rhizobium* για τους χρόνους επώασης που χρησιμοποιήθηκαν.

Η διαδικασία της PCR με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών είναι αρκετά ευαίσθητη στον προσδιορισμό DNA έστω και μερικών αντίγραφων. Ο μη προσδιορισμός DNA στο εσωτερικό των *Rhizobium* από το σογιάλευρο δεν είναι και οριστικός εφόσον μπορεί να υπάρξει εισαγωγή αλλά να καταστρέφεται εσωτερικά από τις ενδοουκλεάσες των κυττάρων των *Rhizobium*. Το DNA που ελέγχθηκε αφορούσε μόνο μέρος της γενετικής τροποποίησης του σογιάλεου. Εάν άλλα τμήματα του γενετικά τροποποιημένου γονιδίου έχουν εισέλθει αυτό δεν εξετάστηκε καθώς δεν υφίστανται κατάλληλοι εκκινητές.

Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Το DNA σε όλα τα πειράματα απομονώθηκε με τις κλώνες.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CaMV: Cauliflower Mosaic Virus

DNA: δεοξυ-ριβο-νουκλεϊκό οξύ

EtBr: βρωμιούχο αιθίδιο

GMOs: Genetical Modified Organisms

HGT: Horizontal Gene Transfer

PCR: Polymerase Chain Reaction

PEG: πολυαιθυλενική γλυκόζη

Ri: Root Inducing

TAE: Tris-Hcl-Acetic and - EDTA

T-DNA: Transfer DNA

TE: Tris-Hcl EDTA

Ti: Tumour Inducing

Γ.Τ.: Γενετική Τροποποίηση

ΓΤ σογιάλευρο: Γενετικά Τροποποιημένο σογιάλευρο

ΓΤΟ: Γενετικώς Τροποποιημένος Οργανισμός

Δ.Ε.: Διμερή εκκινητών

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βαρζάκας Θ. / Αρβανιτογιάννης Ι. Σ.: Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα, Εκδόσεις Έμβρυο In Press, Αθήνα 2006.
- Βαρζάκας Θ. / Νέστορα Θ. / Αγγελόπουλος Σ.: Το κανονιστικό πλαίσιο για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων, 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο για την Τυποποίηση, τα Πρότυπα και την Ποιότητα, Θεσσαλονίκη 26-27 Μαΐου 2006, (σελ. 257-258).
- Γιαννοπολίτης Κ.: Γενετικά τροποποιημένα φυτά. Ανάπτυξη και χρήση φυτών με ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα. Περιοδικό Γεωργία και Κτηνοτροφία, 1999, (Τεύχος 2, σελ. 12-17).
- Γιαννοπολίτης Κ.: Γενετικά τροποποιημένα φυτά. Μια πρώτη εικόνα της σημερινής κατάστασης. Περιοδικό Γεωργία και Κτηνοτροφία, 1999, (Τεύχος 1, σελ. 18-20).
- Δημόπουλος Κ. Α.: Μαθήματα Βιοχημείας, Επιμέλεια Έκδοσης: Σμαράγδη Αντωνοπούλου, Αθήνα 1993, (σελ. 283-285).
- Διαμαντίδης Γρ.: Εισαγωγή στη Βιοχημεία. UNIVERSITY STUDIO PRESS, Θεσσαλονίκη 1994, (σελ. 229-236).
- Ζερβάκης Γ.: Ζυμώσεις-Βιοτεχνολογία, Σημειώσεις ΤΕΙ Καλαμάτας, Καλαμάτα 2004, (σελ. 23-27).
- Καλτσίκης Π.: Βελτίωση φυτών, αρχές και μέθοδοι, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα 1989, (σελ. 42, 219, 401, 529).
- Καραγκούνη-Κύρτσου Α. Δ.: Μικροβιολογία, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα 1999, (σελ. 56-57, 166-168, 191, 198-200, 212, 254).
- Καραμπέτσος Ι.: Φυσιολογία Φυτών, Σημειώσεις ΤΕΙ Καλαμάτας, Καλαμάτα 1999, (σελ. 68-69).
- Κέκου Δ / Μακρή Β.Ι.: Εισαγωγή στα βιολογικά συστήματα, Σημειώσεις ΕΜΠ, Αθήνα 1988, (σελ. 67-70).
- Λουλακάκης Κ. Α.: Βιοτεχνολογίας Φυτών, Σημειώσεις ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 1999, (σελ. 120-122, 125, 130-142, 144-146).
- Μολφέτας Σ.: Βιολογία ένα ταξίδι στη ζωή, Εκδόσεις Καστανιώτης, Αθήνα 1994.
- Μπαλαγιάννης Π.: Εγχειρίδιο γεωργικών φαρμάκων, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα 1994, (σελ. 82).
- Ρουπακιάς Δ.: Γενετικώς τροποποιημένοι οργανισμοί και Βιοηθική. Πειραματική Έρευνα στη Βιοιατρική. Τόμος 1, Τεύχος 1.
- Σκοτειδάκης Π.: Γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί στα αγροτικά συστήματα παραγωγής: τροφή για σκέψη, Διατριβή, Μυτιλήνη 2003, (σελ. 13-15).
- Σκούρας Ζ.: Μόρια και γονίδια μια πρακτική προσέγγιση, Εκδόσεις ART of TEXT, Θεσσαλονίκη 1993, (σελ. 3-9, 27, 66-67, 83).
- Τρακατέλλης Α.: Βιοχημεία, Εκδόσεις Αφοί Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1984, 2^η Έκδοση, Τόμος Α. (σελ. 836).
- Τσαυτάρης Α.: ΓΤΟ- Νομικά, Ηθικά και Κοινωνικά ζητήματα. Ημερίδα ΕΘΙΑΓΕ Αθήνα 20/12/1997.
- Φανουράκης Ν.: Γενετική Βελτίωση Φυτών, Βασικές αρχές, Εκδόσεις ΙΩΝ, 1999, (σελ. 273-276).
- Χατζόπουλος Π.: Βιοτεχνολογία φυτών, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα 2001, (σελ. 71-79, 154, 178, 225-226, 255-257, 259).

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acheson, D. W. K. / Reidl, J. / Zhang, X. / Keusch, G. T. / Mekalanos, J. J. / Waldor, M. K.: (1998) In vivo transduction with Shiga toxin 1-encoding phage. *Infection and Immunity* 66, (pp. 4496-4498).
- Astwood, J. D. / Leach, J. N. / Fuchs R. L.: (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro, *Nature Biotechnology* 10, (pp. 1269-1273).
- Bauer, F./ Hertel, C./ Hammes, W. P.: (1999) Transformation of *Escherichia coli* in foodstuffs. *Systematic and Applied Microbiology* 22, (pp. 161-168).
- Benbrook C.: (2001) Troubled times and commercial success for Roundup Ready Soybeans. *AgBioIntoNet Technical Paper Num 4*.
- Bennett P. M.: (2000) Transposable elements. In *Encyclopedia of Microbiology*, 2nd edn, Vol. 2 (Lederberg, J., Id.), (pp. 704-724). Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Boer, P. P. / Wagenaar, J. A. / Achterberg, R. P. / Putten, J. P. / Schouls, L. M. / Duim, B.: (2002) Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Molecular Microbiology* 44, (pp. 351-359).
- Brautigam, M. / Hertel, C. / Hammes, W. P.: (1997) Evidence for natural transformation of *Bacillus subtilis* in foodstuffs. *FEMS Microbiology Letters* 155, (pp. 93-98).
- Butler, D. / Reichhardt, T. / Abbott A. / Dickson, D. / Saegusa, A.: (1999) Long-term effects of GM Crops serves up food for thought, *Nature* 398, (pp. 651-656).
- Chilton, M. D / Drummond, M. H / Merlo, D. J / Sciaky, D. / Montoya Gordon, M. P / Nester, E. W.: (1977) Stable incorporation of Plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of Crown gall tumorigenesis cell 11, (pp. 263-271).
- Conne, A and Jacobs M.: (1999) Genetic engineering of crops as potential source of genetic hazard in the human dipt, *Mutation Research /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, (pp. 223-234), [www. Biotech-info.net/genetic-hazard.html](http://www.Biotech-info.net/genetic-hazard.html)
- Darji, A. / Zur, L. S. / Garbe, A. I. / Chakraborty, T. / Weiss, S.: (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 27, (pp. 341-349).
- Dorly E.: (1999) Europa Bio unit created to boost agbio defense, *Nature Biotechnology* 17, pp. 631-632).
- Doucet-Populaire, F. / Trieu-Cuot, P. / Dosbaa, I. / Andremont, A. / Courvalin, P.: (1991) Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, (pp. 185-187).
- Dubnau, D.: (1999) DNA uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 53, (pp. 217-244).
- Duval-Flah, Y. / Gainche, I. / Ouriet, M. F. / Lett, M. C. / Hubert, J. C.: (1994) Recombinant DNA transfer to *Escherichia coli* of human faecal origin in vitro and in digestive tract of gnotobiotic mice. *FEMS Microbiology Ecology* 15, (pp. 79-88).
- Duval-Flah, Y. / Raibaud, P. / Tancrede, C. / Rousseau, M.: (1980) Rplasmic transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* in vitro and in vivo in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. *Infection and Immunity* 28, (pp. 981-990).
- Engel K.: (2002) Current and future benefits from the use of GM technology in food production. *Toxicology letters* 127, (pp. 329-336).
- European Commission.: (2000) *Economic Impact of Genetically Modified Crops on the Agri-Food Sector*, Chapter 5: Markets: Segregation, Identity Preservation and Labeling, <http://europa.eu.int/comm/dg06/publi/gmdfullrep/ch5.htm>
- Fincham, J. R. S and Ravetz, J. R.: (1991) *Genetically engineered organisms: benefits and risks*. Open University Press, Buckingham 1991, (pp. 57-58).
- Edeea, G. / Aarts, H. / Buhk, H. J. / Corthier, G. / Flint, H. J. / Hammes, W. / Jacobsen, B. / Midtvedt, T. / Vossen, J. / Wright, A. / Wackernagel, W. / Wilcks, A.: (2003) The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants, (pp. 1130).

- Gabin-Gauthier, K. / Gratadoux, J. J. / Richard, J.: (1991) Conjugal plasmid transfer between lactococci on solid surface matings and during cheese making. *FEMS Microbiology Ecology* 85, (pp. 133–140).
- Gachet, E. / Martin, G. G / Vigneau, F. / Meyer, G.: (1999) Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available, *Trends in Food Science and Technology*, (pp. 380-388).
- Garrigues-Jeanjean, N. / Wittmer, A. / Ouriet, M. F. / Duval-Iflah, Y.: (1999) Transfer of the shuttle vector pRR1207 between *Escherichia coli* and *Bacteroides* ssp. in vitro and in vivo in the digestive tract of axenic mice and in gnotoxenic mice inoculated with a human microflora. *FEMS Microbiology Ecology* 29, (pp. 33–43).
- Grienson, Don.: (1991) Plant genetic engineering. Blackie Academic and Professional, London Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, (pp. 84/87/89-90/119/125/131-132/136-138/160).
- Grillot-Courvalin, C. / Goussard, S. / Courvalin, P.: (2002) Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cellular Microbiology* 4, (pp. 177–186).
- Grillot-Courvalin, C. / Goussard, S. / Huetz, F. / Ojcius, D. M. / Courvalin, P.: (1998) Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nature Biotechnology* 16, (pp. 862–866).
- Gruzza, M. / Fons, M. / Ouriet, M. F. / Duval-Iflah, Y. / Ducluzeau, R.: (1994) Study of gene transfer in vitro and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora. *Microbial Releases* 2, (pp. 183–189).
- Hall, R. M. and Collis, C. M.: (1995) Mobile gene Cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology* 15, (pp. 593-600).
- Hecker, M. / Schumann, W. / Valker, U.: (1996) Heat-Shock and general stress - response in *Bacillus Subtilis*. *Mol Microbial* 19 (pp. 417).
- Heinemann, J. A.: (1991) Genetics of gene transfer between species. *Trends in Genetics* 7, (pp. 181–185).
- Heller, K. J. / Geis, A. / Neve, H.: (1995) Behaviour of genetically modified microorganisms in yoghurt. *Systematic and Applied Microbiology* 18, (pp. 504–509).
- Ho Mae-Wan / Traavik, T. / Olsvik, O. / Tappeser, B. / Vyvyan Howard, C. / Von Weizacker, C. / Mc Gavin C.: (1998) Gene technology and gene exology of infections diseases, *Microbial Ecology in Health and Disease* 10, (pp. 33-59).
- Hohlweg, U. / Doerfler, W.: (2001) On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Molecular Genetics and Genomics* 265, (pp. 225–233).
- Holmes, D. S. and Quigley M.: (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal Biochem* 114, (pp. 193-197). [This paper introduced the mini pree procedure used in this exercise and has subsequently been adopted by many investigators].
- IANR, Research Shows Roundup Ready Soybeans yield less. University of Nebraska.: (2000) Institute of Agriculture and Natural Reasources. [www.biotech-info.net/roundup soybeans yield less.htm](http://www.biotech-info.net/roundup_soybeans_yield_less.htm).
- Klinger, T.: (1998) Biosafety assessment of genetically engineered organisms in the environment *Trends in Ecology and Evolution* 13, (pp. 5-6).
- Kruse, H. / Sorum, H.: (1994) Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology* 60, (pp. 4015–4021).
- Lacey R. W.: (1973) Genetic basis, epidemiology, and future significance of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: a review *Journal of Clinical Pathology* 26, (pp. 899, 913).
- Licht, T. R. / Laugesen, D. / Jensen, L. B. / Jacobsen, B. L.: (2002) Transfer of the pheromone-inducible plasmid pCF10 among *Enterococcus faecalis* microorganisms colonizing the intestine of minipigs. *Applied and Environmental Microbiology* 68, (pp. 187–193).
- Lorenz, M. G. / Wackernagel, W.: (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews* 58, (pp. 563–602).

- Mercer, D. K. / Scott, K. P. / Bruce-Johnson, W. A. / Glover, L. A. / Flint, H. J.: (1999a) Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 65, (pp. 6–10).
- Mercer, D. K. / Scott, K. P. / Melville, C. M. / Glover, L. A. / Flint, H. J.: (2001) Transformation of an oral bacterium via chromosomal integration of free DNA in the presence of human saliva. *FEMS Microbiology Letters* 200, (pp. 163–167).
- Morelli, L. / Sarra, P. G. / Bottazzi, V.: (1988) In vivo transfer of pAM beta 1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Bacteriology* 65, (pp. 371–375).
- Mullis, K. / Faloona, S. / Saiki, R. / Scharf, S. / Horn, G. / Erdich, H.: (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, (pp. 263-273).
- Mullis, K. and Faloona F.: (1987) Specific of DNA in Vitro via a polymerase-catalyzed Chain reaction, *Methods Enzymal* 155, (pp. 335-350).
- Netherwood, T. / Bowden, R. / Harrison, P. / O'Donnell, A. G. / Parker, D. S / Gilbert, H. J.: (1999) Gene transfer in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 65, (pp. 5139–5141).
- Noble, M.: (1998) Lecture Notes, "Nitrogen Fixation in Root Modules of Legumes". Friday, February 6, 1998. Royal Roads University Victoria, B. C.
http://www.geocities.com/waterose_test/labs15.html.
- Paszkowski, J. / Shillito, R. D. / Saul, M. / Manda´ K. V. / Hohn, T. / Hohn, B. / Potrykus, I.: (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO Journal* 3, (pp. 2717–2722).
- Rifkin Jeremy: Ο Αιώνας της Βιοτεχνολογίας, Εφημερίδα ΤΟ ΒΗΜΑ, 25/12/1998, (pp. 105).
- Rose Anthony H.: (1968) *Chemical Microbiology* London Butterworths, second edition, (pp. 223-226).
- Royal Roads Environmental Science Lab Manual: (1997) Experiment 12: Aspects of the Nitrogen Cycle, (pp. 12-1 to 12-12) Royal Roads University, Victoria, B.C.
http://www.geocities.com/waterose_Test/labs15.html.
- Saiki, R. K. / Gelfand, D. H / Stoffed, S / Scharf, S. J / Higuchi, R. / Horn, G. T. / Mullis, K. B. / Erlich, H. A.: (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: (pp. 487-491).
- Saiki, R. K. / Scharf, S. / Faloona, F. / Muddis, K. B. / Horn, G. T. / Erlich, H. A. / Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of a-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230 (pp. 1350-1354).
- Sanger, F. / Coulson, A. R. / Barell, B. G. / Smith, A. S. H. / Roc, B. A.: (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing, *J. Mol. Biol.* 143: (pp. 161-178).
- Schlundt, J. / Saadbye, P. / Lohmann, B. / Jacobsen, B. L. / Nielsen, E. M.: (1994) Conjugal transfer of plasmid DNA between *Lactococcus lactis* strains and distribution of transconjugants in the digestive tract of gnotobiotic rats. *Microbial Ecology in Health and Disease* 7, (pp. 59–69).
- Schubbert, R. / Hohlweg, U. / Renz, D. / Doerfler, W.: (1998) On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Molecular and General Genetics* 259, (pp. 569–576).
- Schubbert, R. / Renz, D. / Schmitz, B. / Doerfler, W.: (1997) Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, (pp. 961–966).
- Scott, K. P. / Flint, H. J.: (1995) Transfer of plasmids between strains of *Escherichia coli* under rumen conditions. *Journal of Applied Bacteriology* 78, (pp. 189–193).
- Shelton, A. M. and Zhao, J. Z.: (2000) Insect resistance and the future of Bt transgenic plants, Information systems for Biotechnology News Report, May 2000, www.isb.vt.edu/articlesmay0005.htm
- Vogel, R.F. / Becke-Schmid, M. / Entgens, P. / Gaier, W. / Hammes, W. P.: (1992) Plasmid transfer and segregation in *Lactobacillus curvatus* LTH1432 in vitro and during sausage fermentations. *Systematic and Applied Microbiology* 15, (pp. 129–136).

- Waldor, M. K. / Mekalanos, J. J.: (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272, (pp. 1910–1914).
- Wilkins, B. M.: (1995) Gene transfer by bacterial conjugation: diversity of Systems and functional specializations. In *society for General Microbiology Symposium 52: Population Genetics of Bacteria* (Baumbanys, Young JPW, Wellington E M H et al., Eds) (pp. 59-88). Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Zenz, K. I. / Neve, H. / Geis, A. / Heller, K. J.: (1998) *Bacillus subtilis* develops competence for uptake of plasmid DNA when growing in milk products. *Systematic and Applied Microbiology* 21, (pp. 28–32).

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

Eurekah Bioscience Database:

www.eurekah.com/dbimages/magnani/01_1.jpg

European Food Safety Authority:

www.efsa.eu.int

Miami University:

www.cas.muohio.edu/~wilsonkg/gene2005/manipulation/geneengineering/tools/FLL_13.jpg

University of California Riverside, The Copernicus project:

www.copernicusproject.ucr.edu/ssi/HSBiologyResairces.htm

Washington University in St. Louis, Arts & Science, Department of Anthropology:

www.artisci.wustl.edu/~anthro/blurb/fg8.t.gif

Watcrose Environmental:

www.geocities.com/waterase_test/labs15.html

Ευρωπαϊκή Ένωση:

www.europa.eu.int/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMOon/102&format

www.europa.eu/scadplus/leg/el/lv0/l2117.htm

www.europa.eu/scadplus/leg/el/lv0/l2119.htm

www.europa.eu/scadplus/leg/el/lv0/l28130.htm

Κέντρο Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης Καστοριάς:

www.kpe-kastor.kas.sch.gr/istoselida-biodiversity/b/biotechnology.htm

Υπουργείο Ανάπτυξης Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων:

www.efet.gr/gen-food

Υπουργείο Εθνικής Παιδείας & Θρησκευμάτων, Παιδαγωγικό Ινστιτούτο:

www.pi-schools.gr/sxoleia/56gymm-ath/ergasies/biotechel1.htm

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΤΥΠΟΣ

Ευρωπαϊκή Επιτροπή: (1999) Οι «κερκόπορτες» για τα μεταλλαγμένα. Αφιέρωμα «Μεταλλαγμένα τρόφιμα», Εφημερίδα Ελευθεροτυπία 29/5/1999.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή: (2001) Έγγραφο διαβούλευσης: Για μια στρατηγική θεώρηση των βιοεπιστημών και της βιοτεχνολογίας, ΦΑΡΜ Consulting 2/2001.

Mozanto Ελλάς Ε.Π.Ε.: Γενετικά τροποποιημένα φυτά: Σημαντικά τα περιβαλλοντικά οφέλη από τη χρήση τους. Περιοδικό Γεωργία και Κτηνοτροφία 1997, (Τεύχος 7, σελ. 47-49).