



**Τ.Ε.Ι.
Καλαμάτας**

Τ.εχ.ολογική
Γεωργική Προϊόντων

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΓΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΗΘΟΥΡΓΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ**

ΚΑΡΝΙΑΚΤΣ ΔΑΦΕΑΝΑΡΟΣ

A.M. 2002162

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΒΑΠΑΑΝΤΕΡΗ ΜΑΡΙΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2009

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ**

ΚΑΡΝΑΚΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ
Α.Μ. 2002162

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΞΑΠΛΑΝΤΕΡΗ ΜΑΡΙΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2009

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη καθηγήτριά μου καθώς και την οικογένειά μου, για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξή τους κατά τη διάρκεια συγγραφής της πτυχιακής μου μελέτης. Ακόμη σημαντική υπήρξε η βοήθεια από το βιβλίο του κ. Βαρζάκα

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ	
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ.....	9
1.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	10
1.1.1 ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ GM ΦΥΤΩΝ.....	12
1.1.2 ΟΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	15
1.1.3 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	24
1.1.4 ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΤΩΝ ΓΤ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	27
1.1.5 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ.....	28
1.1.6 ΑΝΗΣΥΧΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ.....	29
1.2 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.....	31
1.2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ	31
1.2.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.....	32
1.2.3.ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	33
1.2.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	34
1.2.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	34

1.2.6 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΤΟΜΩΝ (ΒΤ-ΦΥΤΑ)	35
1.2.7 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΝΗΜΑΤΩΔΗ.....	39
1.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ	40
1.3.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	42
1.3.2 Η ΔΙΑΜΑΧΗ ΓΙΑ ΤΗΝ «ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗ» ΣΟΓΙΑ	43
1.3.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ.....	44
1.3.4 ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	46
1.3.5 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΛΥΣΙΝΗ ΚΑΙ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ.....	49
1.3.6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΛΑΙΩΝ	51
1.3.7 ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	53
1.4 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	55
1.4.1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ.....	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	61
2.1 ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ	61
2.1.1.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙUM ΤUMEFACIENS	64
2.1.1.1 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ ΚΑΙ ΤΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΤΟΥ.....	65
2.2 ΜΙΚΡΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΙ-ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΥΑΔΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ	77

2.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΕΓΧΥΣΗ.....	79
2.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΒΟΜΒΑΡΔΙΣΜΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	79
2.5 ΑΜΕΣΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA.....	82
2.5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	88
2.5.2.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ.....	94
2.6.ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΤ-ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ.....	95
2.6.1.ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΤ ΤΟΞΙΝΗΣ ΣΕ ΈΝΤΟΜΑ ΜΗ ΣΤΟΧΟΥΣ	99
2.6.2.ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΒΤ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	100
2.6.3.ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΗ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ	102
2.7.ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΥΓΕΙΑΣ	103
2.7.1.ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΩΝ	106
2.7.2.Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ «ΔΗΛΗΤΗΡΙΩΔΩΝ» ΠΑΤΑΤΩΝ.....	108
2.8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 - ΓΕΝΙΚΑ ΟΦΕΛΗ ΠΟΥ ΑΝΑΜΕΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	12
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 - ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΖΗΤΟΥΝ ΟΡΙΣΤΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	13
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 - ΠΙΘΑΝΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ	17
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 - ΠΙΘΑΝΟΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ	20
ΠΙΝΑΚΑΣ 5 - ΟΡΙΣΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΒΑΣΙΚΟΤΕΡΕΣ ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΥ ΑΠΟΚΤΟΥΝ ΤΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ ΈΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	40
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 - ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ.....	46
ΠΙΝΑΚΑΣ 7 - ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	47
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 - ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΕΡΕΙ ΤΟ «ΞΕΝΟ» DNA ΠΟΥ ΜΕΤΑΦΕΡΕΤΑΙ.....	86
ΠΙΝΑΚΑΣ 9 - ΟΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ – ΣΤΟΧΟΙ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΣΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ.....	91
ΠΙΝΑΚΑΣ 10 - ΠΙΘΑΝΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΑΠΟ ΒΤ-ΦΥΤΑ	102
ΠΙΝΑΚΑΣ 11 - ΠΙΘΑΝΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΥΓΕΙΑΣ.....	105

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρωτοποριακή ανακάλυψη των τεχνικών της Γενετικής Μηχανικής (Genetic Engineering) οι οποίες χειρίζονται το βασικό μόριο της ζωής, το DNA (δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ), έδωσε τη δυνατότητα να δημιουργηθούν οι πρώτοι οργανισμοί οι οποίοι φέρουν ξένο γενετικό υλικό ενσωματωμένο με τεχνητό τρόπο στο γονιδίωμά τους. Οι οργανισμοί αυτοί ονομάστηκαν διαγονιδιακοί (transgenic) και οι πρώτες αναφορές για την δημιουργία διαγονιδιακών ζώων και φυτών έγιναν το 1980.

Η αρχή στην οποία βασίζεται η δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών είναι ότι ο γενετικός κώδικας (δηλαδή η γενετική πληροφορία όπως κωδικοποιείται στις βάσεις του DNA) είναι γενικευμένος και ο ίδιος για όλα τα είδη των οργανισμών. Αυτό σημαίνει ότι τα μηνύματα είναι γραμμένα στην ίδια κωδική «γλώσσα» ώστε να αναγνωρίζονται (και να «διαβάζονται») από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς.

Η ιδιότητα αυτή του γενετικού κώδικα επιτρέπει την εισαγωγή «ξένου» γενετικού υλικού που προέρχεται από οποιοδήποτε οργανισμό (ιό, βακτήριο, μύκητα, φυτό, ζώο), σε άλλο οργανισμό π.χ. φυτά και την έκφραση της γενετικής πληροφορίας που περιέχει αυτό το υλικό δηλαδή την μεταγραφή της σε mRNA και στη συνέχεια την μετάφραση της σε πρωτεΐνη από το φυτό που δέχθηκε το ξένο γονίδιο.

Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενσωμάτωση μίας νέας γενετικής πληροφορίας (ενός γονιδίου δηλαδή) σε ένα φυτό με σκοπό να του προσδώσει μια νέα ιδιότητα. Το φυτό θα παράγει μία επιπλέον νέα πρωτεΐνη η οποία είναι κατάλληλα επιλεγμένη ώστε να επιφέρει νέα και κατά προτίμηση βελτιωμένα χαρακτηριστικά στο φυτό. Η βελτίωση μπορεί να αφορά την ανθεκτικότητα του σε περιβαλλοντικές συνθήκες και σε διάφορα παθογόνα, την διατροφική του σύνθεση, όπως και παρά πολλές άλλες ιδιότητες χρήσιμες στις γεωργικές καλλιέργειες και στα τρόφιμα.

Η διαδικασία της ενσωμάτωσης ξένων γονιδίων σε οργανισμούς ξεκίνησε πρώτα με εφαρμογές σε μικροοργανισμούς για την παραγωγή χρήσιμων ουσιών στη φαρμακοβιομηχανία. Χαρακτηριστικό πετυχημένο παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή της ανθρώπινης ινσουλίνης σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*, που για πρώτη φορά κυκλοφόρησε το 1982 και έλυσε τα προβλήματα και τις ελλείψεις που υπήρχαν στην διάθεση της ορμόνης αυτής.

Οι οργανισμοί που προκύπτουν από αυτή την διαδικασία ονομάζονται γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί ή GMOs (Genetically Modified Organisms). Ακόμη αναφέρονται και ως διαγονιδιακοί (transgenic) ή και γενετικά ανασυνδυασμένοι (recombinant).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ

Η διαδικασία για την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων φυτών ακολουθεί τα βήματα που είναι απαραίτητα για την γενετική τροποποίηση οποιουδήποτε οργανισμού (μικροοργανισμού, φυτού, ζώου ή και του ανθρώπου)¹.

Αρχικά εστιάζεται η προσπάθεια των επιστημόνων να βρεθεί ένα κατάλληλο γονίδιο από κάποιον οργανισμό και να μελετηθούν καλά οι ιδιότητες του γονιδίου (όπως η δομή, η λειτουργία του και η ρύθμιση της έκφρασης του) αλλά και του προϊόντος του δηλαδή της πρωτεΐνης που παράγει (δράση, χαρακτηριστικά κ.λπ.). Το γονίδιο αυτό θα επιλεγθεί γιατί θα απομονώνεται εύκολα από την πηγή του, θα έχει καλά μελετημένες και γνωστές ιδιότητες και θα μπορεί να επιφέρει μία νέα επιθυμητή ιδιότητα στο φυτό (π.χ. θα παράγει μία τοξίνη επιλεκτική για την εξόντωση των εντόμων που καταστρέφουν το φυτό). Οι ορολογίες αυτές αναφέρονται παρακάτω²:

1. Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί: Οργανισμοί που έχουν ενσωματώσει ξένο γενετικό υλικό στο γονιδίωμά τους, με την επέμβαση της γενετικής μηχανικής, το οποίο τους προσδίδει νέες ιδιότητες.
2. GMOs (Genetically Modified Organisms): Η ορολογία που έχει καθιερωθεί διεθνώς για τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.
3. GM φυτά: Γενετικά τροποποιημένα φυτά.
4. Διαγονιδιακοί οργανισμοί (transgenic): Οργανισμοί που έχουν ενσωματώσει «ξένα» γονίδια με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής

¹ Ανθμία Μπατρίνου, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον, Εκδόσεις Σαββάλας, σελ 12

² Sally Morgan, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Εκδόσεις Σαββάλας, 2004, σελ 22

(ο όρος αυτός χρησιμοποιείται και για τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς).

5. Γενετικά ανασυνδυασμένοι (recombinant) οργανισμοί: Αντίστοιχος όρος με τους διαγονιδιακούς οργανισμούς. Αναφέρεται στην εισαγωγή γονιδίων με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (Recombinant DNA Technology), δηλαδή το σύνολο των τεχνικών που ονομάζουμε «γενετική μηχανική».

1.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Η εύρεση του γονιδίου οριοθετεί και τη διαδικασία της κλωνοποίησης κατά την οποία θα πρέπει να κλωνοποιηθεί σε κάποιο φορέα κλωνοποίησης που είναι συνήθως ένα βακτηριακό πλασμίδιο εξωχρωμοσωμικό αυτοαναπαραγόμενο κυκλικό μόριο DNA που περιέχεται συνήθως σε βακτήρια και ζύμες. Η διαδικασία της κλωνοποίησης έχει σκοπό:

1. Την αναπαραγωγή ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε μεγάλες ποσότητες,
2. Τη διατήρηση του σε ένα συγκεκριμένο μόνο γενετικό στοιχείο όπως είναι το πλασμίδιο, για μοριακές αναλύσεις ή για προετοιμασία για την μεταφορά του σε κάποιον άλλο οργανισμό³.

Η κλωνοποίηση επιτυγχάνεται με τις τεχνικές του ανασυνδυασμένου DNA (recombinant DNA technology) ή όπως ονομάζονται γενικότερα της γενετικής μηχανικής (genetic engineering). Η βάση των τεχνικών αυτών είναι οι χειρισμοί που γίνονται με ειδικά ένζυμα που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

³ Ανθιμία Μπατρίνου, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον, Εκδόσεις Σαββάλας, σελ 12-14

Τα ένζυμα αυτά έχουν την δυνατότητα να τεμαχίζουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις-στόχους τις οποίες αναγνωρίζουν σε αλληλουχίες DNA που μπορεί να προέρχονται από οποιαδήποτε πηγή.

Μία σειρά άλλων ενζύμων που ονομάζονται λιγάσες ή συνδετάσες έχουν την ιδιότητα να επανενώνουν τα τμήματα DNA που έχουν προέλθει από τον τεμαχισμό των περιοριστικών ενζύμων. Η δράση των δύο αυτών τύπων ενζύμων μπορεί να δημιουργήσει μια ποικιλία από νέα μόρια DNA που προκύπτουν από τον τεμαχισμό και συνένωση τμημάτων DNA που προέρχονται από διαφορετικές πηγές. Το νέο ενιαίο λειτουργικό γενετικό στοιχείο που δημιουργείται ονομάζεται ανασυνδυασμένο DNA (recombinant DNA).

Με την δράση των ενζύμων αυτών, ένα γονίδιο απομονώνεται από την πηγή του και συνδέεται με έναν φορέα κλωνοποίησης, δημιουργώντας έναν ανασυνδυασμένο φορέα.

Οι ανασυνδυασμένοι φορείς εισάγονται σε κύτταρα ξενιστών και αναπαράγονται. Όλοι οι απόγονοι ενός τέτοιου κυττάρου έχουν τις ίδιες κληρονομικές ιδιότητες με το μητρικό κύτταρο αλλά και μεταξύ τους και μεταφέρουν τον ίδιο ανασυνδυασμένο φορέα που περιέχει το ξένο γονίδιο που έχει εισαχθεί στο κύτταρο.

Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται κλώνοι και πολλαπλασιάζονται συνεχώς μαζί με τον ανασυνδυασμένο φορέα, ο οποίος ονομάζεται φορέας κλωνοποίησης. Η δημιουργία και στη συνέχεια η απομόνωση ενός τέτοιου κλώνου (δηλαδή αποικίας κυττάρων) δίνει την δυνατότητα να παραχθούν απεριόριστες ποσότητες από το συγκεκριμένο DNA που έχει εισαχθεί στους φορείς, το οποίο ονομάζεται κλωνοποιημένο DNA⁴.

Το κλωνοποιημένο DNA που παράγεται με την κλωνοποίηση σε μεγάλες ποσότητες περιέχει και το γονίδιο που θα προσδώσει στο φυτό τις

⁴ Ανθιμία Μπατρίνου, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον, Εκδόσεις Σαββάλας, σελ 12-14

επιθυμητές ιδιότητες και μπορεί στη συνέχεια είτε να υποστεί περαιτέρω αναλύσεις της δομής, λειτουργίας ή έκφρασης του, είτε να προετοιμαστεί κατάλληλα ώστε να μεταφερθεί με ειδικούς φορείς (δηλαδή γενετικά «οχήματα») στα φυτικά κύτταρα.

1.1.1 ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ GM ΦΥΤΩΝ

Γενικότερα, τα πλεονεκτήματα της παραγωγής GM φυτών είναι η βελτίωση της παραγωγής τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο με τη δημιουργία νέων φυτών πιο ευπροσάρμοστων, πιο ανθεκτικών και με βελτιωμένη ποιότητα και διατροφική αξία. Αναφέρονται ενδεικτικά τα οφέλη που αναμένονται από τις καλλιέργειες γενετικά τροποποιημένων φυτών (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Γενικά Οφέλη που Αναμένονται από τη Χρήση Γενετικά Τροποποιημένων Φυτών

- Ελάττωση της χρήσης χημικών εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων, τα οποία έχουν βλαβερές συνέπειες στο οικοσύστημα αλλά και στην υγεία των ανθρώπων.
 - Αύξηση της αποδοτικότητας και ανθεκτικότητας των καλλιεργειών σε ακραίες συνθήκες γεγονός που θα βοηθήσει στην καταπολέμηση της έλλειψης τροφίμων σε χώρες Τρίτου Κόσμου.
 - Αύξηση θρεπτικής αξίας ορισμένων τροφίμων που αποτελούν τη βασικότερη πηγή σε ορισμένες χώρες (π.χ. αύξηση της περιεκτικότητας σε σίδηρο στους σπόρους ρυζιού).
 - Λιγότερη επιβάρυνση στο περιβάλλον από την μειωμένη χρήση χημικών τοξικών ουσιών.
-

Ενώ τα πρώτα βιοτεχνολογικά προϊόντα που κατασκευάστηκαν για την βιομηχανία φαρμάκων, (π.χ. ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη που παράγεται από βακτήρια, ανασυνδυασμένη ανθρώπινη αυξητική ορμόνη κ.λπ.) έχουν καθιερωθεί ως επιτεύγματα της επιστήμης που βοηθούν στην προώθηση της υγείας του ανθρώπου, δεν συνέβη το ίδιο όταν οι ίδιες τεχνικές εφαρμόστηκαν για την παραγωγή τροφίμων.

Τα πρώτα προϊόντα της διαγονιδιακής τεχνολογίας των φυτών, όπως η «μεταλλαγμένη» σόγια, η τομάτα και το καλαμπόκι δέχτηκαν από την πρώτη στιγμή παρά πολλές αμφισβητήσεις και κύματα αντιδράσεων, κυρίως όταν πρώτο-κυκλοφόρησαν στην Ευρωπαϊκή αγορά. Στις ΗΠΑ, αφού τα γενετικά τροποποιημένα προϊόντα εγκρίθηκαν από το FDA ως ισοδύναμα των συμβατικών, η αγορά τα δέχτηκε χωρίς να τα διαφοροποιεί ιδιαίτερα από τα συμβατικά προϊόντα⁵.

Οι Ευρωπαίοι, όμως πρόβαλλαν ισχυρές αντιρρήσεις και αναζητούν ακόμη και μέχρι σήμερα απαντήσεις σε ζωτικά ερωτήματα, όπως το κατά πόσο ασφαλή είναι τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα και τι είδους απρόβλεπτοι κίνδυνοι μπορούν να προκύψουν από την γενετική επέμβαση στα φυτά (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Ερωτήματα που Ζητούν Οριστική Απάντηση για την Εξάπλωση των Γενετικά Τροποποιημένων Καλλιεργειών

- Πόσο ασφαλή είναι τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα όταν καταναλώνονται από ανθρώπους ή ζώα;
- Πώς επηρεάζουν τα οικοσυστήματα οι καλλιέργειες γενετικά τροποποιημένων φυτών;
- Πώς θα αλλάξουν οι οικονομικές ισορροπίες όταν οι μεγάλες πολυεθνικές

⁵ Ανθιμία Μπατρίνου, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον, Εκδόσεις Σαββάλας, σελ 12-15

εταιρίες ελέγχουν όλο το φάσμα της αγροτικής παραγωγής;

- Ποιο είναι το πραγματικό όφελος για τον καταναλωτή από την χρήση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων;
 - Υπάρχει πραγματική ανάγκη για αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων και κατά πόσο θα συμβάλλουν οι γ.τ. καλλιέργειες σε αυτό;
-

Αμφισβητείται ακόμη και το κατά πόσο τα νέα βιοτεχνολογικά τρόφιμα έχουν στόχο να βοηθήσουν τις αναπτυσσόμενες χώρες ή απλώς να αυξήσουν τα κέρδη των πολυεθνικών εταιριών στις βιομηχανοποιημένες χώρες⁶.

Επίσης, ιδιαίτερες επιφυλάξεις έχουν και οι καταναλωτές, οι οποίοι δεν αντιλαμβάνονται ποιο είναι το άμεσο όφελος που έχουν οι ίδιοι από την κατανάλωση των γ.τ. τροφίμων. Ο μέσος πολίτης στην Ευρώπη νιώθει ότι συμμετέχει σε ένα μεγάλο γενετικό πείραμα που εκτελείται από απρόσωπες εταιρίες-κολοσσούς. Τα μέσα μαζικής επικοινωνίας προβάλλουν κυρίως τους πιθανούς κινδύνους της νέας τεχνολογίας και όχι τόσο τα οφέλη τους. Είναι χαρακτηριστικό επίσης ότι οι περισσότερες έρευνες δείχνουν πολύ χαμηλά ποσοστά αποδοχής των νέων αυτών τροφίμων⁷.

Βέβαια, είναι πλέον κοινά αποδεκτό ότι τα πρώτα προϊόντα της διαγονιδιακής τεχνολογίας πράγματι δεν αποφέρουν κάποιο όφελος στον

⁶ Tanglely, L. (2000, October 30). Animal emotions. *U.S. News & World Report*, pp. 48–52.

⁷ Mitsch, F.J. and Mitchell, J.S. (1999), AgBiotech: Thanks, but no thanks?

Deutsche Banc Alex. Brown. <http://www.biotech-info.net/Deutsche.pdf>

Σακελλάρης, Γ (1998) Ευρωβαρόμετρο 1997: Η θέση των Ευρωπαίων απέναντι στην Βιοτεχνολογία, «Η άλλη πλευρά της Βιοτεχνολογίας», Ειδικές Μορφωτικές εκδηλώσεις Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), Αθήνα 1998

Ευρωβαρόμετρο 1997: European Commission: "Les Européens et la Biotechnologie Moderne" Eurobarometre 46.1, Luxemburg: Directorate-General Research

μέσο καταναλωτή. Το προϊόν που έχει δεχτεί τις περισσότερες επιθέσεις είναι η περίφημη μεταλλαγμένη σόγια της εταιρίας Monsanto.

Η λεγόμενη διαγονιδιακή “Roundup Ready σόγια” έχει κατασκευαστεί από την εταιρία για να είναι ανθεκτική στο ζιζανιοκτόνο Roundup που παρασκευάζει η ίδια εταιρία και τυχάνει να είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα διεθνώς. Η κίνηση αυτή της Monsanto θεωρήθηκε ως αλαζονική από πολλούς και ως προσπάθεια για απόκτηση του πλήρη ελέγχου της παραγωγής σόγιας.

Η προβληματική όμως «εκκίνηση» που έκανε ο κλάδος της σύγχρονης βιοτεχνολογίας τροφίμων μπορεί να αντισταθμιστεί όταν κυκλοφορήσουν οι επόμενες γενεές προϊόντων που θα προσδώσουν μεγαλύτερα οφέλη στον καταναλωτή, όταν επίσης θα έχουν επιβληθεί ακόμη αυστηρότεροι έλεγχοι ασφαλείας για τα προϊόντα αυτά και όταν υπάρξει πλήρης ενημέρωση για τα οφέλη και τους κινδύνους, σήμανση των προϊόντων και περισσότερη συμμετοχή του κοινού στις νομοθετικές διαδικασίες. Την προσδοκία αυτή συμμερίζονται αναλυτές, επιστήμονες και οικονομικοί παράγοντες.

1.1.2 ΟΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Από τις πρώτες εισαγωγές γενετικά τροποποιημένων τροφίμων στην Ευρώπη από τις ΗΠΑ (το 1996), ξεκίνησε μια σειρά από έντονες διαμάχες και σκληρές συζητήσεις μεταξύ των ενδιαφερόμενων ομάδων (επιστημόνων, κρατικών φορέων, καταναλωτών, αγροτών, εταιριών κ.λπ.) καθώς και «ακτιβιστικές» κινητοποιήσεις από ορισμένες ομάδες (π.χ. Greenpeace) με αντικείμενο το κατά πόσο ασφαλή είναι τα νέα αυτά τρόφιμα. Οι ενδιαφερόμενες ομάδες έχουν χωριστεί στους «υποστηρικτές» των νέων μεθόδων της βιοτεχνολογίας και στους «πολέμιους».

Η διαμάχη αυτή εμφανίζει εκτός των άλλων και την ενδιαφέρουσα πτυχή ότι ενώ στις ΗΠΑ, στις οποίες υπάρχουν σοβαρές και αυστηρές

υπηρεσίες προστασίας της υγείας και των καταναλωτών, τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα κυκλοφορούν στην αγορά κανονικά χωρίς καν να απαιτείται ειδική σήμανση, στην Ευρώπη, οι καταναλωτές αλλά και μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας φαίνονται ιδιαίτερα επιφυλακτικοί στην νέα τεχνολογία και επισημαίνουν ότι πιθανόν να προκύψουν σημαντικοί κίνδυνοι στο μέλλον από την δημιουργία, την εξάπλωση και την κατανάλωση των GMOs.

Τα αίτια της αρνητικής στάσης των Ευρωπαίων είναι πολλά. Το βασικότερο πρόβλημα όμως εστιάζεται στο γεγονός ότι η νέα τεχνολογία βασίζεται σε βιολογικές διαδικασίες οι οποίες κατά ένα πολύ μεγάλο ποσοστό είναι ακόμη αδοκίμαστες και είναι πιθανόν να υπάρξουν απρόβλεπτες αρνητικές επιπτώσεις από την εφαρμογή τους. Δηλαδή υπάρχει μεγάλος βαθμός «απροβλεψιμότητας» για τις συνέπειες που θα έχει η απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στη φύση.

Η επιφυλακτικότητα και η αρνητική στάση των Ευρωπαίων εντείνεται και από το πρόσφατο παράδειγμα της εξάπλωσης της ασθένειας των «τρελών αγελάδων» καθώς και άλλων διατροφικών σκανδάλων και της αδυναμίας των ειδικών να προβλέψουν και να αντιμετωπίσουν εγκαίρως την κρίση⁸:

Οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι στην φύση από την καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων φυτών είναι από τους πιο ευρέως αποδεκτούς, εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι τα GM αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους και κανείς δεν μπορεί να εγγυηθεί ότι θα παραμείνουν «γονιδιακά» σταθερά με το πέρασμα του χρόνου⁹.

⁸ Kappeli O, Auberson L (1998) How safe is safe enough in plant genetic engineering? Trends Plant Sci. 3: 276-281

⁹ Klinger, T.S., Johnson, C.R. (1998). Spatial and temporal distribution of feeding of Aspidochirotida (Holothuroidea) on Heron Island, Great Barrier Reef, Proceedings of the Ninth International Echinoderm Conference, San Francisco, 467-471.

Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει περίπτωση τα γονίδια που έχουν εισαχθεί στα γενετικά τροποποιημένα φυτά να μεταφερθούν με κάποιους τρόπους είτε σε άλλα φυτά (μέσω της γύρης), είτε ακόμη και σε ακραίες συνθήκες σε άλλους οργανισμούς του οικοσυστήματος (π.χ. βακτήρια).

Πίνακας 3 Πιθανοί Βιολογικοί Κίνδυνοι

Κίνδυνος	Περιγραφή
<p>Κατάργηση φυσικών γενετικών φραγμών</p> <p>Ενσωμάτωση «ξένου» γενετικού υλικού σε τυχαίες θέσεις στο γονιδίωμα ενός φυτού ή ζώου</p> <p>Εισαγωγή ρυθμιστικών</p>	<p>Κατά την μεταφορά γονιδίων με την γενετική μηχανική από έναν οργανισμό σε έναν άλλο «καταργούνται» οι φυσικοί γενετικοί φραγμοί που υπάρχουν εδώ και αιώνες μεταξύ των ειδών και επιτελούνται αλλαγές στα γονιδιώματα των οργανισμών που πιθανόν να έχουν απρόβλεπτες αρνητικές επιπτώσεις.</p> <p>Μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή ή αλλαγή του γενετικού προγράμματος του οργανισμού με αποτέλεσμα να προκληθούν αλλαγές στη μορφολογία ή στα χαρακτηριστικά του φυτού. Το «ξένο» DNA όταν ενσωματωθεί σε μία περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να επηρεάσει τη ρύθμιση άλλων γειτονικών γονιδίων με πιθανές αρνητικές συνέπειες όπως π.χ. την ενεργοποίηση ενός ανενεργού γονιδίου με αποτέλεσμα την παραγωγή κάποιας τοξίνης ή την αλλαγή στη σύσταση των θρεπτικών συστατικών ενός φυτού.</p> <p>Επισημαίνεται ο κίνδυνος από την εισαγωγή της αλληλουχίας DNA του υποκινητή CaMV 35S (ρυθμιστική αλληλουχία) σχεδόν σε όλα τα γενετικά τροποποιημένα φυτά που βρίσκονται στο εμπόριο ή</p>

<p>αλληλουχιών</p>	<p>σε πειραματικές καλλιέργειες. Ο υποκινητής αυτός είναι μία αλληλουχία DNA που εισάγεται μαζί με το ξένο γονίδιο στα γενετικά τροποποιημένα φυτά προκειμένου να ρυθμίσει την έκφραση του ξένου γονιδίου. Είναι ένας ισχυρός υποκινητής που προέρχεται από τον ιό της μωσαϊκής του κουνουπιδιού (Cauliflower Mosaic Virus = CaMV).</p> <p>Θεωρείται ότι ο υποκινητής αυτός μπορεί να ενεργοποιήσει και άλλα γονίδια μέσα στα φυτά με πιθανές απρόβλεπτες συνέπειες στην γονιδιακή έκφραση, π.χ. ενεργοποίηση «κοιμισμένων» γονιδίων που βρίσκονται στο γονιδίωμα των φυτών και δημιουργία μολυσματικών ιών .</p> <p>Επιφυλάξεις υπάρχουν επίσης και σχετικά με την ασφάλεια της χρήσης των φορέων (vectors) που χρησιμοποιούνται για την μεταφορά των γονιδίων στους οργανισμούς-ξενιστές και κυρίως τους φορείς που προέρχονται από ιούς (οι οποίοι πιθανά να αποκτήσουν ξανά την λοιμογόνο δράση τους).</p>
<p>Χρήση φορέων για τη μεταφορά γονιδίων</p>	

Το γεγονός αυτό δεν σημαίνει από μόνο του ότι τα GM φυτά είναι επικίνδυνα για τα οικοσυστήματα στα οποία εισάγονται αλλά υποδηλώνει ότι υπάρχει ένας βαθμός επικινδυνότητας εφόσον οι μακροχρόνιες επιπτώσεις στο περιβάλλον είναι απρόβλεπτες, δηλαδή δεν μπορούν να εκτιμηθούν με ακρίβεια με τα σημερινά μέσα που διαθέτει η επιστήμη.

Το θέμα της εκτίμησης των περιβαλλοντικών κινδύνων είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντικό και λόγω του γεγονότος ότι αναμένεται εκπληκτική

εξάπλωση των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών σε παγκόσμια κλίμακα. Εκτιμάται ότι σε 10 χρόνια το 70% των βασικότερων καλλιεργειών θα είναι γενετικά τροποποιημένος.

Ήδη το 1999 στις ΗΠΑ, το γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (εντομο-ανθεκτικό) καταλαμβάνει περίπου το 30% της καλλιέργειας καλαμποκιού, ενώ η γενετικά τροποποιημένη σόγια (ανθεκτική σε ζιζανιοκτόνο) και το γενετικά τροποποιημένο βαμβάκι (εντομο-ανθεκτικό) καταλαμβάνουν πάνω από το 50% των συνολικών καλλιεργειών σόγιας και καλαμποκιού αντίστοιχα¹⁰. Επίσης, αυξάνονται και οι εκτάσεις καλλιέργειας γενετικά τροποποιημένων φυτών στην Νότια Αμερική, Καναδά, Κίνα, Νότια Αφρική, Αυστραλία.

Λαμβάνοντας υπόψη την ραγδαία εξάπλωση των γενετικά τροποποιημένων φυτών, είναι επόμενο πολλοί περιβαλλοντολόγοι, οικολόγοι αλλά και άλλοι επιστήμονες να έχουν ευαισθητοποιηθεί στο θέμα της επίδρασης των νέων αυτών καλλιεργειών στο περιβάλλον και να εκφράζουν τις επιφυλάξεις τους, τονίζοντας ότι απαιτείται διεξοδική μελέτη των επιπτώσεων αυτών.

Οι περισσότεροι επιστήμονες συμφωνούν ότι το θέμα της επίδρασης των GMOs στα οικοσυστήματα και γενικότερα στο περιβάλλον χρειάζεται πολύ πιο εκτεταμένες έρευνες, περισσότερες δοκιμές πεδίου και συνεχή στενή παρακολούθηση για πολλά χρόνια ακόμη.

Συνοπτικά οι βασικότεροι πιθανοί κίνδυνοι που μπορούν να προκύψουν στο περιβάλλον από την χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών σε

¹⁰ European Commission (2000a), Economic Impacts of Genetically Modified Crops on the Agri-Food sector, chapter 1: Areas shown to GM crops in the world: fast but uneven developments, http://europa.eu.int/comm/dg06/publi/gmo!fullrep/ch_1.htm, Mitten, OH, MacDonald, R, Klonus, O (1999) Regulations of foods derived from genetically engineered crops, Current opinion in Biotechnology 10:298-302

καλλιέργειες αναφέρονται στον Πίνακα 4. και αναλύονται στις επόμενες παραγράφους.

Πίνακας 4 Πιθανοί Περιβαλλοντικοί Κίνδυνοι

Κίνδυνοι	Περιγραφή
Μεταφορά γονιδίων στο περιβάλλον	Μεταφορά των γονιδίων των γενετικά τροποποιημένων φυτών σε συγγενή φυτά ή σε ζιζάνια μέσω της γύρης και δημιουργία «υπέρ-ανθεκτικών» παρασίτων.
Δημιουργία Bt-ανθεκτικών εντόμων	Η συνεχής έκθεση στην τοξίνη Bt που παράγουν ορισμένα γ.τ. φυτά μπορεί να οδηγήσει μέσω της φυσικής επιλογής στην επικράτηση στελεχών εντόμων ανθεκτικών στην τοξίνη αυτή.
Επίδραση της Bt-τοξίνης σε έντομα μη-στόχους	Πιθανές απρόβλεπτες επιδράσεις της τοξίνης Bt σε έντομα που δεν είναι επιβλαβή για την γεωργία. Πιθανή κατάχρηση χημικών ζιζανιοκτόνων λόγω της δημιουργίας γ.τ. φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα.
Αύξηση στη χρήση ζιζανιοκτόνων	

Μία από τις βασικότερες επιφυλάξεις των διαφόρων επιστημόνων σχετικά με την χρήση καλλιεργειών γενετικά τροποποιημένων φυτών είναι ο κίνδυνος της «μεταφοράς ή διασποράς ή διαρροής γονιδίων» (gene transfer ή gene flow) από την διασταύρωση διαγονιδιακών φυτών με συγγενή φυτά που αποτελούν την φυσική βλάστηση ή με ζιζάνια (weeds).

Η πιθανότητα μεταφοράς διαγονιδίων στα ζιζάνια των καλλιεργειών, προβληματίζει τους ειδικούς. Υπάρχει κίνδυνος για τα ζιζάνια, εάν και εφόσον αποκτήσουν τα διαγονίδια αυτά που συνήθως είναι γονίδια ανθεκτικότητας σε παθογόνα και ασθένειες, να γίνουν και τα ίδια πιο ανθεκτικά και απειλητικά και να αντιμετωπίζονται πολύ πιο δύσκολα.

Η μεταφορά γονιδίων μεταξύ φυτών είναι εφικτή, ιδιαίτερα μεταξύ συγγενών ειδών φυτών, με την μεταφορά της γύρης. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι μπορεί να γίνει και μεταφορά των «διαγονιδίων» μεταξύ φυτών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη.

Σύμφωνα με μία έρευνα, γύρη μεταφέρθηκε από ένα παράσιτο, σε ένα διαγονιδιακό φυτό ελαιοκράμβης που περιείχε ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο ζιζανιοκτόνο glufosinate ammonium. Τα υβρίδια που προέκυψαν, μετά από διαδοχικές γενεές απέκτησαν τα χαρακτηριστικά του παρασίτου αλλά περιείχαν και το γονίδιο της ανθεκτικότητας, αποδεικνύοντας ότι έγινε μεταφορά διαγονιδίων¹¹.

Ανάλογες έρευνες έδειξαν δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων μεταξύ καλλιεργημένου τεύτλου (beet) και του άγριου συγγενούς φυτού *Beta vulgaris*¹².

Ορισμένοι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι στην φύση η πιθανότητα μεταφοράς διαγονιδίων με την γύρη και οι επιπτώσεις στο περιβάλλον είναι πολύ μικρές για να μελετηθούν αποτελεσματικά. Η εμπειρία δείχνει ότι για τους περισσότερους κόκκους γύρης, μία απόσταση 200 μέτρων μεταξύ δύο καλλιεργειών οδηγεί σε καθαρότητα σπόρου 99,9%¹³.

¹¹ Chevre AM, Barret P, Eber F, Dupuy P, Brun H, Tanguy X, Renard M (1997). Selection of stable *Brassica napus*-*B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1104- 1111

¹² Bartsch, D., M. Lehnen, J. Clegg, M. Pohl-Orf, I. Schupan and N.C. Ellstrand. 1999. Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild seed beet populations. *Molecular Ecology* 8:1733-1741.

¹³ Masood, E. 1998a. Biodiversity body 'needs more science'. *Nature* 391: 215 (News).

Πρόσφατα, το δικαστήριο του Λονδίνου απέρριψε την αίτηση ενός αγρότη να διακοπούν δοκιμές πεδίου γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού που βρίσκονταν κοντά σε δική του καλλιέργεια βιολογικού καλαμποκιού με την αιτιολογία ότι γονιμοποίηση με το διαγονίδιο ήταν σχεδόν απίθανη δεδομένου ότι οι δύο καλλιέργειες είχαν απόσταση μεταξύ τους 2 χιλιόμετρα¹⁴.

Ορισμένοι ερευνητές μελετούν την εισαγωγή γονιδίων στο DNA των χλωροπλαστών του φυτού (οι χλωροπλάστες είναι οργανίδια των φυτικών κυττάρων όπου γίνεται η φωτοσύνθεση, δηλαδή η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημικής). Οι χλωροπλάστες έχουν ορισμένα δικά τους γονίδια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενσωμάτωση ξένων διαγονιδίων ως εναλλακτική λύση.

Θεωρείται ότι τα χλωροπλαστιδικά διαγονίδια δεν μεταδίδονται με την γύρη¹⁵. Όπως δείχθηκε σε φυτά καπνού και ελαιοκράμβης οι χλωροπλάστες κληρονομούνται από το μητρικό φυτό (maternal inheritance)¹⁶.

Πολλοί όμως ερευνητές αμφισβητούν το γεγονός ότι οι χλωροπλάστες κληρονομούνται με αυτόν τον τρόπο σε όλα τα είδη φυτών^{17,18}. Η προοπτική της εισαγωγής γονιδίων στους χλωροπλάστες έχει το επιπλέον πλεονέκτημα

¹⁴ Masood, S. 1998b. Organic farmer takes gene battle to court. *Nature*. (Lond.) 394:8

¹⁵ Daniel, et al., 1998: Daniel, H., Levenes, C., and Crepel, F. (1998) "Cellular mechanisms of cerebellar LTD. " *Trends Neurosci.* 21 (9), 401-407

¹⁶ Scott, SE and Wilkinson, MJ (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*, *Nature Biotechnology*, 17:390-392

¹⁷ Cummins, JE (1998) Chloroplast-transgenic plants are not a gene flow panacea, *Nature Biotechnology* 16:401

¹⁸ Stewart Jr., C.N., and C.S. Prakash. 1998. Chloroplast-transgenic plants are not a gene flow panacea. *Nature Biotechnology* 16(May):401

ότι το ξένο γονίδιο μπορεί να εισαχθεί σε πολλά αντίγραφα (ως και 10.000 αντίγραφα) που οδηγούν σε μεγάλες ποσότητες διαγονιδιακών προϊόντων.

Η Ευρώπη αντιμετωπίζει το ζήτημα με ιδιαίτερη ευαισθησία και σοβαρότητα. Παράδειγμα αποτελεί η Ελβετία όπου διαπιστώθηκε πρόσφατα ότι δύο «παραδοσιακές» ποικιλίες καλαμποκιού που είχαν εισαχθεί από της ΗΠΑ (από την εταιρία Pioneer Hi-Bred), οι ονομαζόμενες Ulla και Benicia, ήταν «μολυσμένες» με γενετικά τροποποιημένο DNA σε ποσοστό 0,1-0,5%. Το ποσοστό αυτό δεν θεωρείται υψηλό μεν αλλά επειδή ακόμη δεν είχαν οριστεί τα πρότυπα γενετικής μόλυνσης στην χώρα, απαγορεύτηκε η εμπορία των σπόρων και διατάχθηκε η καταστροφή των καλλιεργειών που είχαν ήδη φυτευτεί. Η έκταση αυτή αφορούσε 400 εκτάρια δηλαδή περίπου το 0,5% της συνολικής καλλιέργειας καλαμποκιού στην Ελβετία.

Η αιτία της μόλυνσης των σπόρων της φυσικής καλλιέργειας δεν έχει διευκρινιστεί, πιθανολογείται όμως ότι έγινε με γύρη από γειτονικές καλλιέργειες γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού στις ΗΠΑ. Το γεγονός αυτό δείχνει:

- Τη διαφορά στην αποδοχή γενετικά τροποποιημένων τροφίμων μεταξύ ΗΠΑ και Ευρώπης. Στις ΗΠΑ οι καλλιέργειες γ.τ. καλαμποκιού και άλλων ειδών επεκτείνονται συνέχεια και τα προϊόντα που προκύπτουν από αυτές δεν χρειάζονται καν ειδική σήμανση.
- Την αυστηρότητα ορισμένων Ευρωπαϊκών χωρών στην αντιμετώπιση της «επιμόλυνσης» τροφίμων με γενετικά τροποποιημένα στοιχεία.
- Τα δραστικά μέτρα που πήρε μία χώρα σαν την Ελβετία (ολική καταστροφή καλλιεργειών) λόγω «επιμιξίας» με 0,1-0,5% γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι, όταν μία ολόκληρη ήπειρος όπως η Αμερική καταναλώνει χωρίς κανένα περιορισμό μεγάλες ποσότητες από 100% γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι.

Στην Ελλάδα, ο κίνδυνος της διασποράς διαγονιδίων από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά στον φυσικό φυτικό πληθυσμό περιορίζεται μόνο σε

είδη που είναι γηγενή δηλαδή προϋπαρχαν στην Ελλάδα και για τα οποία υπάρχουν και συγγενή φυτά. Τέτοιο φυτό είναι η ελαιοκράμβη, η οποία μπορεί να διασταυρωθεί με τον φυσικό φυτικό πληθυσμό.

Για τον λόγο αυτό η αίτηση καλλιέργειας γ.τ. ελαιοκράμβης που φέρει ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνο απορρίφθηκε ομόφωνα από την Ελληνική Εθνική Επιτροπή προφανώς για να αποφευχθεί ο κίνδυνος να μεταφερθεί η «ανθεκτικότητα» σε συγγενή φυτά της Ελλάδας.

Υπάρχουν όμως άλλα είδη, όπως το καλαμπόκι, η τομάτα και η σόγια, που είναι μη γηγενή φυτά δηλαδή δεν υπάρχουν συγγενή φυτά στην Ελλάδα. Επομένως, οι καλλιεργητές αγοράζουν κάθε χρόνο νέο σπόρο για να φυτέψουν. Σε αυτή την περίπτωση θεωρητικά δεν υπάρχει κίνδυνος μεταφοράς γονιδίων από το γενετικά τροποποιημένο φυτό σε συγγενή φυτά.

1.1.3 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Τα κύτταρα ξενιστές που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο DNA επιλέγονται από εκείνα που δεν το έχουν προσλάβει. Αυτό συμβαίνει επειδή τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εκτός από το ξένο DNA που έχουν προσλάβει, περιέχουν και γονίδιο ανθεκτικότητας (γονίδιο δείκτη) σε αντιβιοτικό. Αν επομένως καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει το συγκεκριμένο αντιβιοτικό θα επιβιώσουν και θα δώσουν απογόνους (κλώνους) μόνο τα βακτήρια που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο (άρα και την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό).

Κάθε βακτήριο που προσέλαβε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πολλαπλασιάζεται και δίνει ένα κλώνο. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων που περιέχει το συνολικό DNA οργανισμού ονομάζεται γονιδιωματική βιβλιοθήκη.

Ένα παράδειγμα φαίνεται στο σχήμα. Πλασμίδιο που φέρει θέση που αναγνωρίζεται από ένζυμο περιορισμού και γονίδιο-δείκτη που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό κόβεται με το ένζυμο περιορισμού (ή περιοριστική ενδονουκλεάση).

Με το ίδιο ένζυμο κόβεται και το DNA του οργανισμού που μας ενδιαφέρει να κλωνοποιήσουμε. Προκύπτει έτσι το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Η διαδικασία εισαγωγής αυτού του ανασυνδυασμένου DNA στο νέο βακτηριακό κύτταρο (κύτταρο ξενιστής) ονομάζεται μετασχηματισμός. Αν ο μετασχηματισμός έχει πετύχει τότε τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, φτιάχνουν νέες πρωτεΐνες λόγω των επιπλέον γονιδίων που περιέχει το πλασμίδιο.

Έτσι, συνθέτουν και πρωτεΐνη που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Αν μετά το μετασχηματισμό, τα βακτήρια αυτά καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αμπικιλίνη, μόνο όσα έχουν ενσωματώσει το πλασμίδιο θα αναπτυχθούν, καθώς εκφράζουν νέα ιδιότητα την αντοχή στο αντιβιοτικό. Κάθε ένα από αυτά τα βακτήρια θα δώσει μία αποικία βακτηρίων, ίδιων με το αρχικό, φτιάχνοντας έτσι ένα κλώνο που περιέχει αντίγραφα των γονιδίων του ξένου DNA που ενσωματώσαμε στο γενετικό υλικό. Η μεταφορά μπορεί να γίνει:

- α) μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*
- β) με ηλεκτροχημικές μεθόδους.

Το γενετικό υλικό που εισάγεται μπορεί να είναι:

- α) γονίδια από φυτά του ίδιου ή άλλου είδους
- β) γονίδια από άλλους οργανισμούς
- γ) αλληλουχίες DNA που καταστέλλουν τη δράση του κανονικού γονιδίου

Το *A.tumefaciens* είναι βακτήριο που ζει στο έδαφος και μολύνει τραυματισμένα φυτικά κύτταρα μεταφέροντας σε αυτά τμήμα του πλασμιδίου του Τί (ογκοεπαγωγέας), το οποίο ενσωματώνεται σε χρωμόσωμα του φυτού. Οι πρωτεΐνες που συντίθενται από τα γονίδια του πλασμιδίου αυτού προκαλούν στο φυτό όγκο, όπως φαίνεται στο σχήμα.

Το πλασμίδιο Τί μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί σα φυσικός φορέας μεταφοράς και έκφρασης ξένων γονιδίων σε φυτικά κύτταρα. Το τμήμα του πλασμιδίου που μεταφέρεται στα φυτά (Τ-περιοχή) απομονώθηκε και σε αυτό προστέθηκε το γονίδιο που θέλουμε να μεταφέρουμε στα φυτά μαζί με ένα γονίδιο – δείκτη (προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό ή ζιζανιοκτόνο), με τις διαδικασίες που προαναφέρθηκαν.

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται στο φυτό κι αυτό στη συνέχεια σε καλλιέργεια φυτικών κυττάρων που περιέχει και το ζιζανιοκτόνο. Τα κύτταρα που ενσωματώνουν το ξένο γονίδιο επιβιώνουν, καθώς εκφράζουν το νέο γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο. Η διαδικασία περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα.

Η ανάγκη για αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής αγροτικών τροφίμων είναι μεγάλη. Ο υποσιτισμός είναι από τα κυριότερα προβλήματα που καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε, καθώς ο πληθυσμός της γης αυξάνεται ραγδαία (1,5% κάθε χρόνο) και υπολογίζεται ότι θα έχει φτάσει τα 11 δισεκατομμύρια το 2050. Εκτός από την ανάγκη για αύξηση της ποσότητας της τροφής, υπάρχει παράλληλα ανάγκη για βελτίωση της ποιότητας και διατροφικής αξίας των τροφών, που θα συμβάλλει στην καταπολέμηση της πείνας, ιδιαίτερα σε τροφές που αποτελούν το βασικό είδος διατροφής στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπως γενετικά τροποποιημένο ρύζι με αυξημένη περιεκτικότητα σε σίδηρο ή βιταμίνη Α, για αυξημένη προστασία του περιβάλλοντος, ώστε να ελαττωθεί η χρήση εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων και χημικών ουσιών, για καλλιέργειες πιο ανθεκτικές σε ακραίες κλιματικές

συνθήκες που θα βοηθήσει τις καλλιέργειες σε Αφρική, Ασία. Τα διαγονιδιακά φυτά μπορούν να καλύψουν τέτοιες ανάγκες.¹⁹

1.1.4 ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΤΩΝ ΓΤ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Τα επόμενα χρόνια θα εμφανιστούν στην αγορά πολλά ΓΤ φυτά που ενδέχεται να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη γεωργία και στη διατροφή μας.

Γίνονται έρευνες για τη δημιουργία φυτών, όπως δημητριακά, που θα παράγουν το δικό τους λίπασμα.

Το άζωτο, με τη μορφή νιτρικών αλάτων, είναι απαραίτητο για τα φυτά και περιέχεται στα λιπάσματα. Φυτά όπως το μπιζέλι δεν χρειάζονται τέτοια λιπάσματα, επειδή στις ρίζες τους ζουν βακτήρια που παίρνουν το άζωτο του αέρα και το μετατρέπουν σε νιτρικά άλατα που μπορεί να προσλάβει το φυτό. Το γονίδιο καθήλωσης του αζώτου εντοπίστηκε στα βακτήρια και γίνεται προσπάθεια να εισαχθεί σε φυτά σιταριού. Αν πετύχει, θα είναι ωφέλιμο και για τους αγρότες και για το περιβάλλον.

Η έλλειψη ορισμένων ιχνοστοιχείων και βιταμινών στη διατροφή μας προκαλεί ασθένειες. Η αναιμία είναι συνηθισμένη στην Ασία, όπου καταναλώνεται πολύ άσπρο ρύζι που δεν έχει αρκετό σίδηρο. Δημιουργήθηκε ένας νέος τύπος ρυζιού που έχει τριπλάσια ποσότητα σιδήρου. Έτσι, με μια μερίδα ρύζι μπορεί κανείς να καλύψει το μισό των ημερήσιων αναγκών του σε σίδηρο. Στον αναπτυσσόμενο κόσμο πολλοί τυφλώνονται λόγω έλλειψης βιταμίνης Α. Ένα ΓΤ ρύζι με υψηλά επίπεδα βιταμίνης Α θα έλυσε το πρόβλημα.

«Το όνειρο της ισοκατανομής χρημάτων και τροφής στον κόσμο είναι πολύ ωραίο, αλλά απραγματοποίητο ... Η μόνη λύση είναι να ενσωματωθεί η βιταμίνη Α στη βασική τροφή και αυτό ακριβώς κάνουμε. Ελπίζω ότι όσοι είναι

¹⁹ Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Εκδόσεις Έμβριο, 2006

επιφυλακτικοί για τη νέα τεχνική θα δουν ότι στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε για κάτι ωφέλιμο».

Ingo Potrykus, καθηγητής στο Ελβετικό Ομοσπονδιακό Ινστιτούτο Τεχνολογίας, όπου δημιουργήθηκε το ρύζι με υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη Α και το οποίο είναι υπό δοκιμή. Στο μέλλον θα εμφανιστούν πολλά «υγιεινά» τρόφιμα, όπως ντομάτες με περισσότερες βιταμίνες, μη αλλεργιογόνα φιστίκια, σιτάρι με περισσότερο φολικό οξύ για την πρόληψη της διοχιδούς ράχης και σιτάρι με περισσότερες φυτικές ίνες για τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου του εντέρου.

1.1.5 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Στην Ευρώπη η αντιμετώπιση των ΓΤ τροφίμων υπήρξε αρνητική και εκδηλώθηκαν πολλές αντιδράσεις. Παρά το γεγονός ότι έχουν εγκριθεί τρία ΓΤ φυτά στην ΕΕ, στα καταστήματα βλέπει κανείς πολύ λίγα ΓΤ προϊόντα. Στη Βόρεια Αμερική, αντίθετα, υπάρχουν πολλά ΓΤ τρόφιμα και μέχρι στιγμής φαίνεται πως είναι ασφαλή.

Τα πρόσφατα σκάνδαλα – όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια και τα μολυσμένα με διοξίνες τρόφιμα-έχουν κάνει το κοινό ακόμη πιο επιφυλακτικό απέναντι στα νέα τρόφιμα. Το θέμα των περιβαλλοντικών επιπτώσεων επίσης απασχολεί πολύ το ευρωπαϊκό κοινό. Στο μεταξύ, οι πωλήσεις βιολογικών προϊόντων αυξάνονται κατακόρυφα και η ζήτηση ξεπερνά την προσφορά.

Τα ελαιοπαραγωγά φυτά, όπως το λινάρι και η ελαιοκράμβη, δίνουν έλαια για τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Θα μπορούσαν να τροποποιηθούν γενετικά, ώστε να παράγουν έλαια που τώρα λαμβάνονται από το πετρέλαιο.

Το γονίδιο για την παραγωγή ενός συγκεκριμένου ελαίου που υπάρχει σε κάποιον άλλον οργανισμό, φυτό ή βακτήριο, μπορεί να εισαχθεί στο DNA ενός καλλιεργούμενου φυτού. Λόγου χάρη, το φυτό κορίανδρος παράγει

πετροσελινικό οξύ, που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία ελαίων. Το γονίδιο αυτό θα μπορούσε να εισαχθεί στην ελακοκράμβη. Το ένα τρίτο της γεωργικής γης στην Ευρώπη είναι σε αχρησία. Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τέτοιες καλλιέργειες.

Τα τελευταία 60 χρόνια εξαφανίστηκαν περισσότερα από τα τρία τέταρτα των ποικιλιών των καλλιεργούμενων φυτών, καθώς οι αγρότες προτιμούν λίγες εμπορικές ποικιλίες. Στην Ευρώπη, οι σποροπαραγωγοί πληρώνουν δικαιώματα για κάθε ποικιλία σπόρων που πουλάνε. Για τον λόγο αυτό δεν διαθέτουν τις λιγότερο εμπορικές ποικιλίες. Όταν μια ποικιλία παύει να χρησιμοποιείται, μπορεί να εξαφανιστεί τελείως, εκτός αν διατηρηθεί σε ειδικά κέντρα.

Η γεωργία βασίζεται όλο και περισσότερο σε λίγες ποικιλίες φυτών. Το 1900 υπήρχαν πάνω από 30.000 ποικιλίες ρυζιού. Σήμερα υπάρχουν ελάχιστες. Πολλές χρήσιμες ποικιλίες, με φυσική ανθεκτικότητα σε έντομα και ασθένειες έχουν χαθεί. Συχνά καλλιεργείται μόνο ένας τύπος φυτού σε τεράστιες περιοχές. Αυτό λέγεται μονοκαλλιέργεια. Αυτά τα τεράστια χωράφια είναι πιο ευάλωτα σε ασθένειες και έντομα παρά τα μικρά χωράφια με διάφορα φυτά. Είναι πολύ πιθανό ότι τα ΓΤ φυτά θα καλλιεργούνται επίσης σε τεράστιες εκτάσεις. Αυτό είναι επικίνδυνο. Κλιματικές αλλαγές, νέες ασθένειες και εχθροί των καλλιεργειών θα μπορούσαν να καταστρέψουν ορισμένες ποικιλίες.

1.1.6 ΑΝΗΣΥΧΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

Η γενετική μηχανική μεταφέρει γονίδια από έναν οργανισμό σε έναν άλλο. Ένα γονίδιο μπορεί να κοπεί ακριβώς από το DNA ενός οργανισμού αλλά η είσοδος του μέσα στο DNA του οργανισμού στόχου είναι τυχαία. Κατά συνέπεια, υπάρχει κίνδυνος να διακοπεί η λειτουργία άλλων, σημαντικών για τη ζωή του οργανισμού, γονιδίων. Τα γονίδια εισέρχονται για να παράξουν

χρήσιμες για τις διαδικασίες της ζωής πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από πολλές χιλιάδες αμινοξέα. Η υποκατάσταση ενός και μόνο αμινοξέος, ακόμη και στη μεγαλύτερη πρωτεΐνη, μπορεί να κάνει τη διαφορά μεταξύ ενός τοξικού ή μη τοξικού, σταθερού ή ασταθούς, βιολογικά λειτουργικού ή όχι προϊόντος.

Οι επιστήμονες δεν έχουν κατανοήσει ακόμη τόσο καλά τα ζωντανά συστήματα, ώστε να πραγματοποιήσουν μια επέμβαση στο DNA ενός οργανισμού, χωρίς να υπάρξουν μεταλλάξεις που θα μπορούσαν να αποδειχθούν βλαβερές για το περιβάλλον και την υγεία μας. Ο πειραματισμός, τις περισσότερες φορές, γίνεται εν αγνοία των πιθανών επιπτώσεων.

Η γενετική μηχανική στοχεύει στο κέρδος δημιουργώντας γενετικά τροποποιημένους σπόρους. Αυτό σημαίνει πως όταν ένας αγρότης σπέρνει γενετικά τροποποιημένους σπόρους, όλοι οι σπόροι έχουν όμοια γενετική δομή με αποτέλεσμα, αν ένας μύκητας, ένας ιός ή ένα παράσιτο που μπορεί να τους βλάψει προσβάλλει την καλλιέργεια, και αναπτυχθεί, μπορεί να διακινδυνεύσει με καταστροφή ολόκληρη η σοδειά.

Υπάρχει προβληματισμός ότι μπορεί να λειτουργεί ως απειλή για τα αποθέματα τροφής: έντομα, πουλιά και άνεμος, μπορούν να μεταφέρουν γενετικά τροποποιημένους σπόρους σε γειτονικά και όχι μόνο εδάφη. Γύρη από τροποποιημένα φυτά μπορεί να σταυρογονιμοποιηθεί με γενετικά φυσιολογικά φυτά και άγρια συγγενή τους είδη.

Η ανθεκτικότητα που φέρεται να έχει ένα γονίδιο σε ασθένειες ή παράσιτα μπορεί να γίνει μη-αποτελεσματική. Πολλά γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ασθένειες των φυτών, είναι συγκεκριμένα και αντιστοιχούν σε επίσης συγκεκριμένα παθογόνα.

Αυτό σημαίνει πως καλλιεργώντας τέτοια φυτά, δημιουργείται ένα ιδανικό περιβάλλον για τη σπάνια πιθανότητα μετάλλαξης στον πληθυσμό του παθογενούς ή του παρασίτου, το οποίο θα υπερβεί την ανθεκτικότητα του

γονιδίου. Στρατηγικές για να αποφευχθεί ή τουλάχιστον να επιβραδυνθεί αυτό το αποτέλεσμα, περιλαμβάνουν τη χρήση γονιδίων πολλαπλής ανθεκτικότητας ή την καλλιέργεια μικρής περιοχής από ευαίσθητες ποικιλίες φυτών, για να παρέχεται «καταφύγιο» στο οποίο τα παθογενή ή παράσιτα χωρίς ανθεκτικότητα θα επιβιώσουν.

Κατ' αυτόν τον τρόπο, θα αναπτυχθεί πιο αργά η ανθεκτικότητα στη γενετική τροποποίηση. Ωστόσο, η χρήση των ζιζανιοκτόνων με τα οποία ψεκάζονται τα φυτά, ενθαρρύνει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας κατ' αντίστοιχο τρόπο. Οι παράγοντες που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα γενετικά τροποποιημένα φυτά, φαίνεται να μην διαφέρουν από εκείνους των συνηθισμένων φυτών.

Η διαταραχή στις λειτουργίες της ζωής που οφείλεται στην εισαγωγή ενός ξένου γονιδίου, σε συνάρτηση με τις επιπτώσεις εξαιτίας του ότι εξαναγκάζεται να παράξει μια άχρηστη και ξένη ουσία, προκαλούν επιβάρυνση στον γενετικά τροποποιημένο οργανισμό, που εκδηλώνεται υπό τη μορφή του στρες. Για παράδειγμα, οι γενετικά τροποποιημένες πετούνιες για να παράξουν ένα πιο εμπορικού χρώματος λουλούδι, παρουσίασαν απώλεια του χρώματός τους όταν εκτέθηκαν σε ακραίους περιβαλλοντικούς παράγοντες ή λόγω της μεγάλης τους ηλικίας. Η αυξανόμενη ευαισθησία στο στρες, είναι μια αναπόφευκτη συνέπεια της γενετικής τροποποίησης.

1.2 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

1.2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

Οι εταιρίες Monsanto, Agrevo, Plant genetic Systems δημοσίευσαν το 1987 την δημιουργία φυτών διαγονιδιακών που ήταν ανθεκτικά στα έντομα με την έκφραση μιας τοξίνης που παράγεται φυσιολογικά από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*. Παράλληλα διάφορες στρατηγικές αναπτύχθηκαν για την δημιουργία φυτών ανθεκτικών σε ιούς που είχαν σαν στόχο να

παρεμποδίσουν τον κύκλο ανάπτυξης του ιού με την παρουσία ενός RNA ή μιας πρωτεΐνης.

Από το 1986 που η ομάδα του Roger Beachy σε συνεργασία με την Monsanto έδειξαν ότι διαγονιδιακά φυτά καπνού που εξέφραζαν μια πρωτεΐνη του περιβλήματος του ιού του μωσαϊκού του καπνού παρουσίαζαν μία καθυστέρηση στην εκδήλωση συμπτωμάτων μετά την μόλυνση από τον ιό, συνέχισε να μεγαλώνει η γκάμα των φυτών που έγιναν ανθεκτικά σε ιούς με αυτή την τεχνική ή και με άλλες τεχνικές.

1.2.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η διαγονιδιακή τεχνολογία στα φυτά αποτελεί ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται ευρύτατα αφενός στην βασική έρευνα για την μελέτη της ρύθμισης και της έκφρασης των γονιδίων των φυτών και αφετέρου για την βελτίωση των φυτών. Συμπληρώνει τις κλασσικές μεθόδους γενετικής και τελευταίως χρησιμοποιείται πλέον και για εμπορικούς σκοπούς για την παραγωγή φυτών με μεγαλύτερη προστιθέμενη αξία.

Η μεταφορά γονιδίων για την κατασκευή διαγονιδιακών φυτών επιτυγχάνεται με την εισαγωγή γενετικού υλικού (DNA) στο γονιδίωμα ενός κυττάρου και την σταθερή του έκφραση και κληρονόμηση. Επομένως είναι εφικτό εάν εισαχθεί γενετικό υλικό σε ένα φυτικό κύτταρο να προκύψει ένα πλήρες φυτό του οποίου όλα τα κύτταρα φέρουν την ίδια γενετική πληροφορία που είχε εισαχθεί στο αρχικό μητρικό κύτταρο.

Η γονιδιακή τεχνολογία επιτρέπει την μεταφορά κατάλληλων γονιδίων τα οποία θα προσδώσουν στα φυτά νέες μοναδικές ιδιότητες, όπως την ικανότητα να προσαρμόζονται καλύτερα στους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Προβλέπεται ότι οι νέες καλλιέργειες θα είναι πιο αποδοτικές, θα χρειάζονται λιγότερους χημικούς ψεκασμούς γιατί θα είναι πιο ανθεκτικές και θα έχουν καρπούς με μεγαλύτερη διατροφική αξία ή βελτιωμένες ιδιότητες (π.χ. θα παραμένουν φρέσκα για περισσότερο χρόνο).

1.2.3.ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Θεωρείται ότι υπάρχει πολύ μεγάλη πίεση για την αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής αγροτικών τροφίμων. Υπολογίζεται ότι ο πληθυσμός της γης αυξάνεται κατά 1,5% κάθε χρόνο και ότι το 2050, θα έχει περίπου 11 δισεκατομμύρια κατοίκους κυρίως στις υποανάπτυκτες περιοχές (Vasil:1998).

Οι αγρότες θα πρέπει να παράγουν σε ένα χρόνο ότι έχει παραχθεί σε όλους τους αιώνες από τότε που ξεκίνησε ο άνθρωπος να καλλιεργεί. Παράλληλα, υπάρχει μεγάλη πίεση για βελτίωση της ποιότητας και διατροφικής αξίας των τροφών και για την αυξημένη προστασία του περιβάλλοντος.

Οι υποστηρικτές της νέας τεχνολογίας κατασκευής διαγονιδιακών φυτών με νέες βελτιωμένες ιδιότητες θεωρούν ότι ένας από τους βασικότερους στόχους είναι η δημιουργία φυτών που θα συμβάλλουν στην καταπολέμηση της πείνας. Οι νέες καλλιέργειες θα έχουν καλύτερη απόδοση, βελτιωμένη διατροφική σύσταση και θα είναι πιο ανθεκτικές σε ακραίες κλιματικές συνθήκες, γεγονός που θα τις καθιστά ιδανικές για τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων χωρών (Αφρική, Ασία). Παράδειγμα αποτελεί η δημιουργία γενετικά τροποποιημένου ρυζιού (βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο) με ενισχυμένη σύνθεση σε βιταμίνη Α ή σίδηρο και με δυνατότητα για αυξημένη απόδοση καλλιέργειας με στόχο να βελτιωθεί η βασικότερη τροφή του μισού σχεδόν πληθυσμού της γης²⁰.

Αξιόλογοι επιστήμονες αφρικανικής καταγωγής, όπως ο Κενυάτης Calestous Juma (Διευθυντής του Προγράμματος Επιστήμης, Τεχνολογίας και Ανάπτυξης του Πανεπιστημίου του Harvard των ΗΠΑ) υποστηρίζουν ότι οι αναπτυσσόμενες χώρες κυρίως στην Αφρική (που υποφέρουν από ξηρασία, φτωχά εδάφη, κ.λπ.) μπορούν να επωφεληθούν από τις εφαρμογές της

²⁰ Tanglely, L. (2000, October 30). Animal emotions. *U.S. News & World Report*, pp. 48–52.

Βιοτεχνολογίας, όσον αφορά την αύξηση της αποδοτικότητας των καλλιεργειών, την ενισχυμένη θρεπτική αξία των τροφίμων κ.α.

Τονίζει επίσης, ότι στη Δύση έχει επικεντρωθεί η προσοχή των περισσότερων στους πιθανούς κινδύνους της βιοτεχνολογίας και δεν γίνεται αναφορά όσο θα έπρεπε στα συμφέροντα των αναπτυσσόμενων χωρών από την ανάπτυξη της νέας τεχνολογίας²¹.

1.2.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

Όλο και περισσότερες εφαρμογές δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών επιτυγχάνονται σε εργαστήρια σε όλο τον κόσμο. Αναπτύσσονται φυτά που παρουσιάζουν νέες ιδιότητες από την μεταφορά γονιδίων των οποίων οι αλληλουχίες προέρχονται από άλλα φυτά ή ζώα ή μικροοργανισμούς ή έχουν κατασκευαστεί χημικά. Η βελτίωση των φυτών με την διαγονιδιακή τεχνολογία επιτρέπει την εισαγωγή γονιδίων σε φυτά από οποιαδήποτε προέλευση και όχι μόνο από άλλα φυτά συγγενικά όπως γίνεται στις παραδοσιακές καλλιέργειες. Οι πιο καλά μελετημένοι χαρακτήρες είναι εκείνοι που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα, έντομα ή φυτοπαθογόνους οργανισμούς (ιοί, βακτήρια ή μύκητες).

1.2.5 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Ένας σημαντικός τομέας της έρευνας στην αγροτική βιοτεχνολογία κατευθύνεται από την ανάγκη να ελαχιστοποιηθούν οι αγροτικές εφαρμογές χημικών. Εκτός από τα οικονομικά πλεονεκτήματα που θα επιφέρει η μείωση στην χρήση χημικών παραγόντων, υπάρχει και η πίεση από περιβαλλοντικές οργανώσεις διεθνώς για τον περιορισμό της χρήσης τους. Η εφαρμογή της

²¹ Juma, C. 2000. "Biotechnology and Sustainable Agriculture: Developing Country Perspectives", 21 January 2000

σύγχρονης βιοτεχνολογίας σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μειώσει την χρήση χημικών, με την δημιουργία φυτών πιο ανθεκτικών σε παθογόνους οργανισμούς, πιο ανταγωνιστικών σε σχέση με τα ζιζάνια των καλλιεργειών και πιο ικανών να προσλαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά από το έδαφος.

Από τις πιο σημαντικές πρώτες εφαρμογές γενετικά τροποποιημένων φυτών σε εμπορική κλίμακα ήταν η εισαγωγή γονιδίων σε φυτά που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διάφορους παθογόνους οργανισμούς. Οι οργανισμοί αυτοί συνήθως αποτελούν τους φυσικούς εχθρούς των καλλιεργειών και είναι υπεύθυνοι για την καταστροφή μεγάλων τμημάτων τους με αποτέλεσμα να υπάρχουν και οι αντίστοιχες οικονομικές απώλειες.

Η πιο σημαντική εφαρμογή σε αυτόν τον τομέα είναι η παραγωγή των «εντομοανθεκτικών» φυτών που παράγουν την δική τους φυσική εντομοκτόνο τοξίνη. Τα φυτά αυτά ονομάζονται Bt φυτά από το όνομα της τοξίνης και αναφέρονται λεπτομερέστερα στην επόμενη παράγραφο. Οι βασικότερες κατηγορίες παθογόνων οργανισμών που προσβάλλουν τα φυτά είναι οι ακόλουθες:

1. Έντομα
2. Νηματώδη
3. Ιοί
4. Μύκητες
5. Βακτήρια

1.2.6 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΤΟΜΩΝ (BT-ΦΥΤΑ)

Η παραδοσιακή θεραπεία των καλλιεργειών με χημικά εντομοκτόνα εξουδετερώνει πολλά είδη εντόμων και επιβαρύνει το περιβάλλον με αποτέλεσμα την διαταραχή της οικολογικής ισορροπίας. Η διαγονιδιακή

τεχνολογία στοχεύει στην δημιουργία φυτών που παράγουν τα δικά τους «βιο-εντομοκτόνα».

Το πιο καλά μελετημένο γονίδιο με φυσική εντομοκτόνο δράση έχει απομονωθεί από το βακτήριο εδάφους *Bacillus thuringiensis* και κωδικοποιεί μία δ-ενδοτοξίνη η οποία έχει ειδική εντομοκτόνο δράση. Η πρωτεΐνη αυτή είναι τοξική σε συγκεκριμένο περιβάλλον με pH 7,5-8 που παρατηρείται στα έντομα (και όχι στο στομάχι των ανθρώπων). Εδώ και 25 χρόνια χρησιμοποιούνται ψεκασμοί με το ίδιο το βακτήριο σε καλλιέργειες, διαδικασία που θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον εφόσον αποκλείει την χρήση βλαβερών εντομοκτόνων και δεν οδηγεί σε αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία και το περιβάλλον²².

Η διαγονιδιακή τεχνολογία επιτρέπει την μεταφορά σε φυτά του γονιδίου της δ-ενδοτοξίνης, του οποίου το προϊόν προστατεύει τα φυτά από την καταστρεπτική δράση ορισμένων εντόμων της τάξης των λεπιδοπτερών. Υπάρχουν διάφορα στελέχη του *Bacillus thuringiensis* και κάθε στέλεχος παράγει μία διαφορετική δ-ενδοτοξίνη που δρα σε ένα συγκεκριμένο είδος εντόμων²³. Τα γονίδια αυτά (που ονομάζονται γενικά Bt) όταν μεταφέρονται στο γονιδίωμα φυτών και εκφράζουν την συγκεκριμένη πρωτεΐνη προσφέρουν προστασία από την δράση των εντόμων.

Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται αντίσταση των φυτών σε ορισμένα είδη εντόμων με την εισαγωγή ενός συγκεκριμένου γονιδίου (καλά χαρακτηρισμένου και γνωστής δράσης) αντί για την εισαγωγή χιλιάδων ανεπιθύμητων γονιδίων από έναν φυσικού τύπου συγγενή που κωδικοποιούν

²² De Maagd, R. A., D. Bosch, and W. Stiekema. 1999. "Bacillus Thuringiensis Toxin-Mediated Insect. Resistance in Plants." *Trends in Plant Science* 4 (1): 9–13 και Τύπας Μ (1999) Όχι σε όλα ή υπεύθυνος έλεγχος; *The medical Magazine*, Τεύχος 3, Μάρτιος 1999: 46-49

²³ F. Estruch, M. A. Treitel, X. Yang and M. Carlson , 1996, Department of Genetics and Development and Institute of Cancer Research, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York

μη χαρακτηρισμένες και πιθανά τοξικές πρωτεΐνες που θα πρέπει να εξουδετερωθούν με πολλαπλές διασταυρώσεις και ανιχνεύσεις για την ανάκτηση ενός εμπορικά αποδεκτού έντομο-ανθεκτικού στελέχους.

Ένας από τους στόχους των Bt είναι η καταπολέμηση του European corn borer, που αποτελεί το βασικότερο εχθρό των καλλιεργειών καλαμποκιού στις ΗΠΑ και υπεύθυνο για απώλειες της τάξεως του 1 δισεκατομμύρια δολαρίων ετησίως²⁴. Γενετικά τροποποιημένα φυτά καλαμποκιού που φέρουν το γονίδιο Bt παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο έντομο.

Σύμφωνα με την Monsanto, πλεονέκτημα της παραγωγής των Bt φυτών που είναι «έντομο-ανθεκτικά» είναι ότι υπολογίζεται ότι δεν θα είναι πλέον αναγκαία η χρήση περίπου 1 εκατομμύρια λίτρων χημικών εντομοκτόνων τον χρόνο²⁵.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ανάλογη εντομοκτόνο δράση παρουσιάζει και μια άλλη τοξίνη που εκκρίνεται από το βακτήριο *Photobacterium luminescens* που ζει στο έντερο των εντομοφάγων νηματωδών.

Ερευνάται η χρήση του γονιδίου της τοξίνης αυτής ως εναλλακτική μέθοδος της Bt τοξίνης ή σε συνδυασμό με αυτή έτσι ώστε να γίνει πιο αποτελεσματική η παραγωγή «βιοεντομοκτόνων»²⁶.

²⁴ Huang Y et al. (1999) Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol Cell Biol*, 19, 2986–2997

²⁵ Wadman M., 1997, Journals joust over policy on authors' interests, *Nature* 386 (1997) (6626), p. 634

²⁶ Bowen, D, Rochelau, TA, Blackburn, M, Adreev, O, Golubeva, E, Bhartia, R, French-Constant, RH (1998) Insecticidal Toxins from the bacterium *Photobacterium luminescens*, *Science* 280: 2129 και Strauss, E (1998) Possible new weapon for insect control, *Science* 280:2050

Το πρώτο διαγονιδιακό φυτό που φέρει το γονίδιο Bt, δημιουργήθηκε από την εταιρία Monsanto Co και είναι η ποικιλία βαμβακιού Bt, η οποία περιέχει γονίδια από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* υπεύθυνα για την παραγωγή μιας τοξίνης που εξουδετερώνει τρία είδη εντόμων που επιτίθενται στο βαμβάκι. Η ποικιλία βαμβακιού Bt πρωτοκυκλοφόρησε (έπειτα από 10 χρόνια έρευνας) το 1996 και αποτέλεσε το 1997, το 15% ενώ το 1999 πάνω από το 50% της συνολικής καλλιέργειας βαμβακιού στις ΗΠΑ.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκε η ποικιλία καλαμποκιού Bt από την εταιρία CibaGeigy (που αργότερα συγχωνεύτηκε με την Sandoz και μετονομάστηκε σε Novartis) που αποτέλεσε το 1997, το 9% της συνολικής καλλιέργειας καλαμποκιού στις ΗΠΑ²⁷.

Κάθε χρόνο σημειώνεται σημαντική αύξηση των καλλιεργειών που αποτελούνται από Bt καλαμπόκι (το 1999 στις ΗΠΑ, περίπου το 30% της συνολικής καλλιέργειας καλαμποκιού ήταν Bt καλαμπόκι).

Στις ΗΠΑ, η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος επιβάλλει να εφαρμόζεται στις καλλιέργειες Bt ένα ειδικό πρόγραμμα «Διαχείρισης Ανθεκτικότητας» (Resistance Management) με στόχο να αποτραπεί η ανάπτυξη στην φύση εντόμων ανθεκτικών στην τοξίνη Bt²⁸.

Στην Ευρώπη, επιτράπηκε «μετ' εμποδίων» η εισαγωγή του καλαμποκιού-Bt που είναι ανθεκτικό στο έντομο corn borer (το οποίο είναι υπεύθυνο για την καταστροφή του 5-10% της ετήσιας σοδειάς) και αυτό γιατί από τις πρώτες εισαγωγές γενετικά τροποποιημένων σπόρων στην Ευρώπη επικράτησε ένα έντονο κλίμα αμφισβήτησης και σύγχυσης για την ασφάλεια των προϊόντων αυτών.

²⁷ Wadman, M (1997b) Dispute over insect resistance to crops, *Nature* 388: 817 και Kaiser, J. (1996) Pests overwhelm Bt cotton, *Science* 273: 423

²⁸ MacLain, C (1996) Bollworms chew hole in gene engineered cotton, *Nature* 382:289

Είναι χαρακτηριστικό ότι στην Γαλλία, ενώ αρχικά επιτράπηκε η εισαγωγή του καλαμποκιού-Bt, απαγορεύτηκε η καλλιέργειά του, γεγονός που οδήγησε τον Axel Kahn, έναν από τους μεγαλύτερους γενετιστές στην Ευρώπη και επικεφαλής της επιτροπής που συμβουλεύει την Γαλλική κυβέρνηση για τα GMOs, να παραιτηθεί από την επιτροπή²⁹.

Οι καλλιέργειες του γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού αποτελούν ακόμη θέμα έντονης διαμάχης ανάμεσα στις εταιρίες, στους αρμόδιους κρατικούς φορείς, τις ενώσεις των περιβαλλοντολόγων και τους επιστήμονες. Σε πολλές περιπτώσεις, έχουν σημειωθεί σημαντικές καταστροφές καλλιεργειών που βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο, όπως η καταστροφή γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού στο Devon που κόστισε 600.000 λίρες³⁰.

1.2.7 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΝΗΜΑΤΩΔΗ

Τα παρασιτικά νηματώδη είναι υπεύθυνα για σημαντικές απώλειες καλλιεργειών. Μπορούν να προσβάλλουν μία μεγάλη ποικιλία από φυτά και τα αυγά τους επιβιώνουν στο έδαφος σε αντίξοες συνθήκες για πολλά χρόνια.

Έχουν βρεθεί όμως ορισμένα φυτά που είναι ανθεκτικά στα νηματώδη και έχουν απομονωθεί τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα αυτή και επομένως έχει ανοίξει ο δρόμος για την ενδεχόμενη εισαγωγή των γονιδίων αυτών σε καλλιέργειες για την αντιμετώπιση της απειλής από τα νηματώδη³¹.

²⁹ Butler, D (1997) Chair of GMO panel resigns over maize battle, *Nature* 385: 667

³⁰ Masood, E. 1998. Biodiversity body 'needs more science'. *Nature* 391: 215 (News).

³¹ Han-Min Jung, Sanhwa Yuh, Chul-Min Sim, Taewan Kim, and Dong-I Park. 1998. A domain identifier using domain keywords from balanced web

1.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Τα διαγονιδιακά φυτά, εφόσον έχουν ενσωματώσει τα κατάλληλα γονίδια, μπορούν να αποκτήσουν πολύτιμες ιδιότητες. Πολλά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο διεξάγουν έρευνες σε αυτό τον τομέα και ενώ μόνο λίγα προϊόντα διατροφής έχουν κυκλοφορήσει στις αγορές, δεκάδες άλλα βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο, ή αναμένουν έγκριση και σύντομα αναμένεται ότι θα «πρωταγωνιστήσουν» στο καθημερινό μας διαιτολόγιο.

Πίνακας 5 Ορισμένες από τις Βασικότερες Χρήσιμες Ιδιότητες που Αποκτούν τα Διαγονιδιακά Φυτά Έπειτα από την Ενσωμάτωση των Κατάλληλων Γονιδίων

Αυξημένη αντοχή	<ul style="list-style-type: none">• σε ασθένειες (π.χ. ιούς, μύκητες)• σε κλιματολογικές συνθήκες (π.χ. ξηρασία, κρύο, ζέστη)• σε έντομα, παράσιτα, αγριόχορτα, τοξικά μέταλλα,• σε χημικές ουσίες όπως π.χ. ζιζανιοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα
Βελτιωμένη διατροφική αξία και ποιότητα	<ul style="list-style-type: none">• ενίσχυση της θρεπτικής αξίας (π.χ. αύξηση περιεκτικότητας του σιδήρου στο ρύζι)• βελτίωση ποιότητας των καρπών (π.χ.

documents. In *First International Conference on Language Resources & Evaluation, Granada, Spain*

	<p>περισσότερο άμυλο και πρωτεΐνες, λιγότερο λίπος, περισσότερες βιταμίνες και μέταλλα)</p> <ul style="list-style-type: none"> • βιολογικός έλεγχος της ωρίμανσης των φρούτων και λαχανικών • απομάκρυνση βλαβερών ουσιών από τρόφιμα (π.χ. πρωτεϊνών που προκαλούν αλλεργίες) • ενίσχυση σε χρήσιμες ουσίες (π.χ. παραγωγή από φυτά αντικαρκινογόνων ουσιών όπως η σουλφοραφάνη)
<p>Νέες μοναδικές ιδιότητες και χρήσεις</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ικανότητα παραγωγής «φυτικών εμβολίων» (π.χ. ικανότητα έκφρασης του αντιγόνου της ηπατίτιδας Β ή μιας βακτηριακής εντεροτοξίνης) • ικανότητα παραγωγής αντιβιοτικών • ικανότητα παραγωγής σπάνιων χρήσιμων πρωτεϊνών
<p>Βελτιωμένες ιδιότητες</p>	<ul style="list-style-type: none"> • βελτιωμένη ικανότητα φωτοσυνθέσεως • ικανότητα παραγωγής μεγαλύτερων ποσοτήτων αυξητικών ορμονών • ικανότητα δεσμεύσεως του ατμοσφαιρικού

	αζώτου
--	--------

Πηγή: Τσαυτάρης, Α (1998) Βιοτεχνολογία: Επιτεύγματα-Προοπτικές-Προβληματισμοί, «Η άλλη πλευρά της Βιοτεχνολογίας", Ειδικές Μορφωτικές εκδηλώσεις Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), Αθήνα 1998

Συνοπτικά στον Πίνακα αναφέρονται οι βασικότερες χρήσιμες ιδιότητες που στοχεύει η διαγονιδιακή τεχνολογία στα φυτά. Ορισμένες από τις εφαρμογές αυτές θα αναλυθούν λεπτομερέστερα στις επόμενες παραγράφους.

1.3.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Η γενετικά μεταλλαγμένη σόγια που έχει προκαλέσει θύελλα αντιδράσεων στην Ευρώπη δημιουργήθηκε για πρώτη φορά από την εταιρία Monsanto και κυκλοφόρησε στην αγορά το 1996³².

Το 1997 το 12% των καλλιεργειών σόγιας στις ΗΠΑ ήταν GM σόγια ενώ το 1998 το ένα τρίτο περίπου της συνολικής καλλιέργειας σόγιας στις ΗΠΑ ήταν γενετικά τροποποιημένη και πάνω από το μισό κατά το 1999³³.

Η σόγια είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς τα παράγωγα της χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμα επεξεργασμένα τρόφιμα (π.χ. η λεκιθική σόγιας που χρησιμοποιείται στην σοκολατοποιία και ζαχαροπλαστική).

³² Wadman, M (1997a) Us farmers warm to bioengineered crops, Nature 387: 221

³³ Mitten, OH, MacDonald, R, Klonus, O (1999) Regulations of foods derived from genetically engineered crops, Current opinion in Biotechnology 10:298-302

Τα γενετικά τροποποιημένα φασόλια σόγιας της Monsanto, ονομάζονται "Roundup Ready" και είναι ανθεκτικά στο ζιζανιοκτόνο Roundup (από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα, το οποίο παράγεται από την ίδια την εταιρία, την Monsanto).

Στα γενετικά τροποποιημένα φασόλια σόγιας έχει εισαχθεί το βακτηριακό γονίδιο CP4-EPSPS το οποίο παράγει ένα ένζυμο ανθεκτικό στην δράση του ζιζανιοκτόνου. Το Roundup κανονικά καταστέλλει την δράση του φυσικού φυτικού ενζύμου EPSPS και καταστρέφει τα φυτά. Τα γενετικά τροποποιημένα όμως φυτά, που παράγουν το «ανθεκτικό» ένζυμο δεν επηρεάζονται από τη δράση του Roundup.

1.3.2 Η ΔΙΑΜΑΧΗ ΓΙΑ ΤΗΝ «ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗ» ΣΟΓΙΑ

Οι ΗΠΑ εξάγουν ετησίως 3 δις. δολάρια σε προϊόντα σόγιας στην Ευρώπη και η υπερβολική καθυστέρηση της έγκρισης της γενετικά τροποποιημένης σόγιας από την Ευρωπαϊκή Ένωση οδήγησε σε σημαντικές οικονομικές απώλειες τις ΗΠΑ, εκπρόσωποι των οποίων μίλησαν με σκληρά λόγια για την στάση των Ευρωπαίων και την αδυναμία τους να υιοθετήσουν έγκαιρα μία κοινή στάση απέναντι στην έγκριση γενετικά τροποποιημένων προϊόντων διατροφής³⁴.

Το πρόβλημα, βέβαια όπως αποδείχθηκε είναι πολύ βαθύτερο και εμπλέκονται πολλές κοινωνικές ομάδες όπως επιστήμονες, καταναλωτές, στελέχη επιχειρήσεων, αγρότες, δημοσιογράφοι, περιβαλλοντολόγοι, ηθικολόγοι κ.α., με αποτέλεσμα η θέσπιση μίας κοινά αποδεκτής πολιτικής να είναι εξαιρετικά δύσκολη.

³⁴ Chesley, M (1998) The impact of biotechnology on transatlantic trade, Speech presented during the Conference "Biotechnology and the future of Greek Agriculture", hosted by the Hellenic-American Chamber of Commerce, Intercontinental Hotel, Athens 6 May 1998.

1.3.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ

Η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών χρησιμεύει και στην βιομηχανία για την παραγωγή πρωτεϊνών υψηλής αξίας που είναι δύσκολο να παραχθούν και να εξαχθούν με άλλους τρόπους, όπως π.χ. ανθρώπινες θεραπευτικές πρωτεΐνες. Επιπλέον τα γονίδια των ζωικών πρωτεϊνών εκφράζονται καλύτερα σε φυτικά κύτταρα παρά σε βακτήρια ή και σε ζύμες όπου δεν τελούνται οι απαραίτητες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως γλυκοζυλιώσεις προκειμένου να είναι δραστικές οι πρωτεΐνες.

Τα φυτικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν σε βιοαντιδραστήρες σε πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες και οι πρωτεΐνες που παράγονται από την έκφραση των διαγονιδίων μπορούν να απομονωθούν σχετικά εύκολα. Για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών φαρμακευτικής χρήσης, τα συστήματα αυτά παρουσιάζουν πραγματικά πλεονεκτήματα όπως ότι ελαχιστοποιούνται οι κίνδυνοι επιμόλυνσης με ζωικούς ιούς και ότι η τελική καθαρότητα του προϊόντος είναι πολύ υψηλή.

Η έρευνα για την παραγωγή χρήσιμων φαρμακευτικών πολυπεπτιδίων από διαγονιδιακά φυτά προχωράει με όλο και αυξανόμενους ρυθμούς. Το ενδιαφέρον της έρευνας εστιάζεται στην παραγωγή ανθρώπινων αυξητικών παραγόντων όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, ορμονών όπως η ιντερφερόνη, ερυθροποιητίνη και άλλων.

Πρόσφατα, επιτεύχθηκε η παραγωγή βιολογικά ενεργούς ανθρώπινης σωματοτροπίνης από χλωροπλάστες φυτών καπνού³⁵. Παράλληλα, μελετάται η παραγωγή και η απομόνωση μονοκλωνικών αντισωμάτων από διαγονιδιακά φυτά. Μία σχετικά πρόσφατη εφαρμογή αφορούσε την

³⁵ Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlitter M, Carroll JA, Spatola I, Ward O, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts, *Nature Biotechnology* 18 (3): 333-338

παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων εναντίον μιας επιφανειακής πρωτεΐνης του βακτηρίου *Streptomyces mutans*, υπεύθυνου για την τερηδόνα³⁶.

Η φυτική παραγωγή πρωτεϊνών που χρησιμεύουν ως εμβόλια είναι πολύ σημαντική εφαρμογή και αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Πρόκειται για φυτά που είτε:

1. Είναι διαγονιδιακά παράγοντας μία πρωτεΐνη που δρα σαν αντιγόνο, όμοιο με το αντιγόνο κάποιου παθογόνου, είτε
2. Είναι προσβεβλημένα με ένα γενετικά τροποποιημένο ιό έτσι ώστε το περίβλημά του να είναι ο επίτοπος ενός παθογόνου παράγοντα για ζώα ή ανθρώπους.

Τέτοιου είδους εμβόλια έχουν το πλεονέκτημα ότι παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και είναι πιο οικονομικά από τα εμβόλια που παρασκευάζονται σε καλλιέργειες ζωικών κυττάρων ή σε ζύμες. Οι έρευνες αυτές έχουν σκοπό να οδηγήσουν σε «φαγώσιμα εμβόλια» όπως π.χ. σε μπανάνες για ανθρώπους που θα τους δίνουν ανοσία για την ηπατίτιδα, την χολέρα και για διάφορες άλλες ασθένειες³⁷.

³⁶ Ma, J., Hikmat, BY, Wykoff, K, Vine, NO, Chargelegue, O., Yu, L., Hein, M.B., Lehrer, T (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans, *Nature Biotechnology* 4(5): 601-606

³⁷ Herbers, K, Sonnewald, U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants, *Current opinion in Biotechnology* 10: 163-168, Arakawa, T et al (1998a): Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine, *Nature Biotechnology* 16:292, Tacket CO, Mason, HS, Losonsky, G., Clements, JD, Levine, MM, Arntzen, CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato, *Nature Biotechnology* 4(5): 607-609

Σε πειραματικό επίπεδο δείχθηκε ότι ποντικοί που είχαν τραφεί με διαγονιδιακές πατάτες που εξέφραζαν το αντιγόνο της Β υπομονάδας της τοξίνης της χολέρας, παρουσίασαν 60% μείωση στο ποσό διαρροϊκού υγρού που συσσωρεύτηκε στο λεπτό έντερο, όταν εκτέθηκαν στην τοξίνη της χολέρας³⁸.

Στον Πίνακα 1.6 παρουσιάζονται ορισμένα από τα αντιγόνα που έχουν εισαχθεί με επιτυχία σε διαγονιδιακά φυτά με σκοπό την παραγωγή φυτικών εμβολίων³⁹.

Πίνακας 6 Παραδείγματα Διαγονιδιακών Φυτικών Εμβολίων.

Αντιγόνο	Πηγή	Φυτό
Β υπομονάδα της τοξίνης της χολέρας (CT-B).	<i>Vibrio cholerae</i>	Πατάτα
Β υπομονάδα της θερμο-ασταθούς τοξίνης (που προκαλεί διάρροια) (LT-B).	Εντεροτοξιγενής <i>E. coli</i>	Πατάτα, Καπνός
Επιφανειακό αντιγόνο	Ιός ηπατίτιδας Β	Καπνός

1.3.4 ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Με την γενετική μηχανική είναι δυνατό να γίνει παρέμβαση στην σύνθεση των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης στον σπόρο του φυτού για να βελτιωθεί η διατροφική του ποιότητα. Επίσης η γεύση ενός φυτικού

³⁸ Arakawa, T et al (1998a): Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine, *Nature Biotechnology* 16:292

³⁹ Herbers, K, Sonnewald, U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants, *Current opinion in Biotechnology* 10: 163-168

προϊόντος μπορεί να βελτιωθεί με την εισαγωγή και έκφραση ορισμένων γονιδίων όπως της μονελλίνης που δίνει μία γεύση πιο γλυκιά.

Η εισαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα του μεταβολισμού των λιπιδίων μπορεί να τροποποιήσει το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων ή την θέση και τον αριθμό των τριπλών δεσμών βελτιώνοντας έτσι την ποιότητα των ελαίων για διατροφική χρήση.

Διάφορες στρατηγικές έχουν εφαρμοστεί για την βελτίωση της διατηρησιμότητας των φρούτων, όπως η καταστολή του ενζύμου πολυγαλακτουρονάση, και των δύο τελευταίων ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού του αιθυλενίου ή της υπερέκφρασης ενός γονιδίου που συνθέτει κυτταροκίνη. Στον Πίνακα 7. αναφέρονται ορισμένες βασικές εφαρμογές βελτίωσης της διατροφικής ποιότητας των φυτών με την διαγονιδιακή τεχνολογία.

Πίνακας 7 Κυριότερες Εφαρμογές Διαγονιδιακών Φυτών για τη Βελτίωση της Ποιότητας και Θρεπτικής Αξίας των Τροφίμων

1. Ενίσχυση λυσίνης στα δημητριακά και μεθειονίνης στα όσπρια
 2. Αύξηση περιεκτικότητας σιδήρου στο ρύζι
 3. Γενετική τροποποίηση ελαίων
 4. Παραγωγή βιταμινών από διαγονιδιακά φυτά
 5. Βιολογικός έλεγχος της ωρίμανσης φρούτων και λαχανικών
 6. Βελτίωση ποιότητας των καρπών (π.χ. περισσότερο άμυλο και πρωτεΐνες, λιγότερο λίπος, περισσότερες βιταμίνες και μέταλλα)
 7. Ενίσχυση φυτών σε χρήσιμες ουσίες (π.χ. παραγωγή από διαγονιδιακά φυτά αντικαρκινογόνων ουσιών όπως η σουλφοραφάνη).
-

Χαρακτηριστική είναι η παραγωγή της βιοτεχνολογικής τομάτας με την επωνυμία “Flavr Savr” η οποία διατέθηκε στην αγορά το 1994 από την εταιρία **Calgene** (Καλιфорνία, ΗΠΑ). Χρειάστηκε παραπάνω από μία δεκαετία έρευνας για την ανάπτυξη της τομάτας αυτής, η οποία ήταν από τα πρώτα διαθέσιμα για κατανάλωση τρόφιμα που έχουν παραχθεί με την γενετική τεχνολογία. Οι τομάτες “Flavr Savr” ωριμάζουν πιο αργά και πιο ομοιόμορφα και επομένως παρατείνεται η διάρκεια ζωής τους από την συγκομιδή έως την διάθεσή τους στην αγορά.

Οι αγρότες μπορούν να αφήσουν τις τομάτες αυτές στα φυτά για ορισμένες μέρες παραπάνω από τις κανονικές τομάτες των Supermarkets οι οποίες συλλέγονται όταν είναι ακόμη άγουρες και αργότερα εκτίθενται σε αέριο αιθυλένιο για να κοκκινίσουν. Οι λίγες μέρες αυτές παραπάνω επιτρέπουν στα σάκχαρα του φυτού να μεταφερθούν στον καρπό και επομένως οι τομάτες να είναι πιο νόστιμες. Επιπλέον, οι τομάτες Flavr Savr δεν μαλακώνουν εύκολα και διατηρούνται ακέραιες κατά την μεταφορά τους στα σημεία πώλησης.

Για τη δημιουργία των τοματών Flavr Savr εισάγεται μέσω ενός φορέα στο γονιδίωμα των φυτών, ένα γονίδιο που αναστέλλει την δράση του ενζύμου πολυγαλακτουρονάση, υπεύθυνου για την ωρίμανση της τομάτας (το γονίδιο που εισάγεται είναι η αντί-νοσηματική αλληλουχία του γονιδίου της πολυγαλακτουρονάσης) και ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό που χρησιμεύει ως δείκτης αναγνώρισης.

Το 1996 η παραγωγή της γενετικά τροποποιημένης τομάτας περιορίστηκε, καθώς η εταιρία Calgene θεώρησε ότι το προϊόν χρειαζόταν ποιοτική βελτίωση. Παράλληλα και άλλες εταιρίες ξεκίνησαν την παραγωγή και διάθεση γενετικά τροποποιημένων τοματών.

1.3.5 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΛΥΣΙΝΗ ΚΑΙ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ

Ένας από τους στόχους της βιοτεχνολογίας των φυτών είναι να δημιουργήσει καλλιέργειες φυτών που να παρέχουν καλύτερη διατροφική αξία στους ανθρώπους και τα ζώα κτηνοτροφίας. Από τις βασικότερες καλλιέργειες είναι τα δημητριακά και τα όσπρια, τα οποία αποτελούν σημαντικές πηγές πρωτεΐνης για τον άνθρωπο και τα ζώα που εκτρέφει. Η ιδανική πηγή πρωτεΐνης πρέπει να περιέχει ένα ισορροπημένο ισοζύγιο και από τα 20 αμινοξέα που χρειάζονται για την σύνθεση των πρωτεϊνών και ιδιαίτερα των 10 αμινοξέων που δεν μπορούν να συντεθούν από τον άνθρωπο και τα ζώα (απαραίτητα αμινοξέα).

Τα δημητριακά περιέχουν 10-15% πρωτεΐνη αλλά είναι φτωχά στο αμινοξύ λυσίνη, ενώ τα όσπρια περιέχουν 20-30% πρωτεΐνη αλλά έχουν χαμηλή περιεκτικότητα στο αμινοξύ μεθειονίνη. Προς το παρόν η έλλειψη των δύο αυτών συστατικών στις ζωοτροφές μπορεί να αντισταθμιστεί από την προσθήκη πλούσιων σε μεθειονίνη ιχθυοτροφών και πλούσιων σε λυσίνη σόγιας.

Όμως, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον να βελτιωθεί η διατροφική αξία των σπόρων, ενισχύοντας την περιεκτικότητά τους σε λυσίνη και μεθειονίνη με την βοήθεια της γενετικής μηχανικής. Οι προσπάθειες των ερευνητών εστιάζονται σε δύο στρατηγικές για την επίτευξη αυτού του στόχου⁴⁰:

1. με την γενετική τροποποίηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών που παράγουν τα συγκεκριμένα αμινοξέα,
2. με την έκφραση πρωτεϊνών με υψηλή περιεκτικότητα σε μεθειονίνη ή λυσίνη σε διαγονιδιακούς σπόρους. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να προέρχονται από άλλα φυτικά είδη, ή μπορεί να τροποποιηθεί η

⁴⁰ Herbers, K, Sonnewald, U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants, *Current opinion in Biotechnology* 10: 163-168 Tabe, I, Higgins, T JV (1998) Engineering plant protein for improved nutrition, *Trends in Plant Science* 3: 282-286

αμινοξική σύσταση των υπαρχόντων πρωτεϊνών του φυτού, είτε τέλος να συντεθούν νέα γονίδια που να δίνουν πρωτεΐνες πλούσιες σε μεθειονίνη ή κυστεΐνη.

Η έλλειψη σιδήρου είναι ένα από τα σημαντικά προβλήματα διατροφής που επηρεάζει περίπου το 30% του παγκόσμιου πληθυσμού. Η πρόσληψη σιδήρου σε ταμπλέτες είναι μεν αποτελεσματική αλλά είναι δύσκολο να εφαρμοστεί στις αναπτυσσόμενες χώρες λόγω του αυξημένου κόστους. Η περιεκτικότητα του σιδήρου σε ορισμένες καλλιέργειες μπορεί να αυξηθεί με τις κατάλληλες επεμβάσεις στο έδαφος (εμπλουτισμό με σίδηρο), διαδικασία όμως που είναι επίσης οικονομικά ασύμφορη.

Μία από τις εφαρμογές της γενετικής μηχανικής εστιάζεται στην παραγωγή διαγονιδιακών φυτών και κυρίως ρυζιού, με ενισχυμένη περιεκτικότητα σε σίδηρο.

Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την εισαγωγή στο φυτό του ρυζιού, του γονιδίου της φερριτίνης με την βοήθεια του βακτηρίου *Agrobacterium* (που χρησιμεύει ως το «όχημα» μεταφοράς γονιδίων στα φυτά). Η φερριτίνη είναι μία πρωτεΐνη που συναντάται σε ζώα, φυτά και βακτήρια και χρησιμεύει στην αποθήκευση του σιδήρου. Πειράματα σε ποντικούς έδειξαν ότι η στοματική χορήγηση φερριτίνης μπορεί να αποτελέσει πηγή σιδήρου για την αντιμετώπιση αναιμίας⁴¹.

Οι ενδείξεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε φερριτίνη των δημητριακών, όπως του ρυζιού, μπορεί να βοηθήσει το πρόβλημα της έλλειψης σιδήρου στην δίαιτα.

Τα σχετικά πειράματα που έγιναν από μία ερευνητική ομάδα της Ιαπωνίας, έδειξαν ότι το γονίδιο της φερριτίνης προερχόμενο από φυτά σόγιας μπορεί να εισαχθεί με επιτυχία σε φυτά ρυζιού και να εκφραστεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στον ενδοσπέρμιο των διαγονιδιακών φυτών. Οι

⁴¹ Beard, JL, Burton, JW & Theil EC (1996) Purified ferritin and soybean meal can be sources of treating iron deficiency in rats, *J. Nutr.* 126: 154-160

διαγονιδιακοί σπόροι είχαν αποθηκεύσει 3 φορές περισσότερο σίδηρο από τους κανονικούς σπόρους⁴².

Το ρύζι αποτελεί μία από τις βασικότερες τροφές των αναπτυσσόμενων χωρών και για αυτό αποτελεί έναν από τους κυριότερους στόχους της γενετικής μηχανικής, όχι μόνο για βελτίωση της διατροφικής του σύστασης αλλά και για αύξηση της αποδοτικότητας των καλλιεργειών.

1.3.6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΛΑΙΩΝ

Η σύγχρονη επιστήμη της διατροφής μελετά τις ιδιότητες και τις επιδράσεις των διαφόρων διατροφικών συστατικών στον οργανισμό μας και καθορίζει τι είναι απαραίτητο να λαμβάνεται από τις τροφές και τι θα πρέπει να αποφεύγεται.

Οι γενετιστές με βάση τις οδηγίες αυτές μπορούν να τροποποιήσουν γενετικά τα ελαιοπαραγωγά φυτά έτσι ώστε να μεγιστοποιούν την διατροφική αξία των ελαίων και να ελαχιστοποιούν τις βλαβερές επιδράσεις τους, δημιουργώντας όμως πάντα νέα προϊόντα με συνολικό αποδεκτό κόστος.

Υπάρχουν δύο βασικοί στόχοι στην γενετική τροποποίηση των ελαίων⁴³:

- Να βελτιωθεί η αναλογία πολυακόρεστων προς κορεσμένων λιπαρών οξέων ώστε να επικρατήσουν τα πιο «υγιεινά» πολυακόρεστα και για

⁴² Goto, F, Yoshihara, T, Shigemoto, N, Toki, S, Takaiwa, F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene, *Nature Biotechnology* 17: 282-286

⁴³ Murphy, DJ (1999) Production of novel oils in plants, *Current opinion in Biotechnology* 10: 175-180 και Diehl, JH (1998) Genetically engineered vegetable oils, *General Foods World* 43: 17-19 Donaldson, I, May, R (1999) *Health Implications of Genetically Modified Foods*, UK

να αποφευχθεί η ανάγκη για χημική υδρογόνωση των ελαίων που οδηγεί στην δημιουργία των ανεπιθύμητων trans-λιπαρών οξέων.

- Να δημιουργηθούν έλαια με υψηλή περιεκτικότητα σε «ευεργετικές» ενώσεις όπως τα 3-ωμέγα λιπαρά οξέα, το δωδεκαεξανοϊκό οξύ (DHA) και το εικοσιδυοπεντανοϊκό οξύ (EPA) που είναι πρόδρομα μόρια για την παραγωγή ορισμένων προσταγλανδινών και παραγόντων που μειώνουν την χοληστερίνη.

Μία ακόμη χρήσιμη εφαρμογή της διαγονιδιακής τεχνολογίας στην βελτίωση της αναλογίας των θρεπτικών στοιχείων στα φυτά είναι η παραγωγή βιταμινών όπως τα καροτενοειδή (τα οποία δρουν ως πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης A και ως αντιοξειδωτικά) και οι τοκοφερόλες (δηλαδή η βιταμίνη E, απαραίτητο στοιχείο στην διατροφή του ανθρώπου, που παράγεται μόνο από φυτά).

Υπάρχουν πληθυσμοί κυρίως στον αναπτυσσόμενο κόσμο που υποφέρουν από έλλειψη βιταμινών και ιχνοστοιχείων στην διατροφή τους. Εκτιμάται ότι περίπου 124 εκατομμύρια παιδιά στον κόσμο πάσχουν από έλλειψη βιταμίνης A και ότι μία βελτιωμένη διατροφή σε βιταμίνη A μόνο, θα μπορούσε να αποτρέψει 1,3 με 2,5 εκατομμύρια θανάτους παιδιών κάθε χρόνο⁴⁴.

Επομένως, η ανάπτυξη της τεχνολογίας που επιτρέπει την γονιδιακή επέμβαση στους πολύπλοκους μεταβολικούς μηχανισμούς της παραγωγής βιταμινών στα φυτά έχει ιδιαίτερη οικονομική σημασία. Η εισαγωγή στα φυτά των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των βιταμινών με σκοπό την αύξηση της βιοσύνθεσης των

⁴⁴ Sommer, A (1997) Vitamin A deficiency, child health and survival, Nutrition 1997, 13:484-485

βιταμινών είναι ακόμη σε αρχικό στάδιο αλλά έχουν σημειωθεί ήδη αρκετές επιτυχίες⁴⁵.

1.3.7 ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

Πολλές ακόμη εφαρμογές για την κατασκευή διαγονιδιακών φυτών βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο καθώς η νέα αυτή τεχνολογία δίνει θεωρητικά απεριόριστες δυνατότητες εισαγωγής νέων γονιδίων σε φυτά και δημιουργίας νέων χαρακτηριστικών. Αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένες από αυτές⁴⁶:

- Αύξηση ανθεκτικότητας των φυτών σε ακραίες κλιματολογικές συνθήκες (ξηρασία, αλατότητα, καύσωνας, παγωνιά κ.λπ.)
- Παραγωγή σε μεγάλες ποσότητες προϊόντων μεγάλης βιομηχανικής αξίας όπως ελαστομερή και βιοαποικοδομήσιμες πλαστικές ύλες που παράγονται από χιμαιρικά γονίδια υπεύθυνα για την βιοσύνθεση των πολυδροξυαλκανοατών, πολυεστέρων που συσσωρεύονται σε μορφή έγκλειστων σε ορισμένα βακτήρια⁴⁷.
- Παραγωγή από φυτά, ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων (όπως: υδρολάσες που βοηθούν στην αποικοδόμηση του

⁴⁵ Hirschberg, J (1999) Production of high-value compounds: carotencids and vitamin E, *Current opinion in Biotechnology* 10: 186-191

⁴⁶ Apse, MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*, *Science* 285:1256-1258

Holmberg, N, Bulow, I (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer, *Trends in Plant Science* 3: 61-66

⁴⁷ Murphy, DJ (1999) Production of novel oils in plants, *Current opinion in Biotechnology* 10: 175-180, Poirier, Y (1999) Production of new polymeric compounds in plants, *Current opinion in Biotechnology* 10: 181-185

κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, α-αμυλάση για την ρευστοποίηση του αμύλου, φυτάση για την βελτίωση της διατροφικής αξίας των ζωοτροφών)⁴⁸.

- Παραγωγή μικροβιακών εξωπολυσακχαριτών, όπως η ξανθάνη, που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητές, γαλακτωματοποιητές ή πηκτικοί παράγοντες, από διαγονιδιακούς μικροοργανισμούς⁴⁹.
- Παραγωγή λουλουδιών με νέα χρώματα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής⁵⁰.
- Καταπολέμηση της περιβαλλοντικής μόλυνσης, με γονίδια που είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση τοξικών στοιχείων, (βαριά μέταλλα κ.λπ.) από τον αέρα, το έδαφος ή το νερό⁵¹, ή απορρόφηση πολύτιμων μεταλλευμάτων όπως χρυσό.

⁴⁸ Herbers, K, Sonnewald, U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants, *Current opinion in Biotechnology* 10: 163-168

⁴⁹ VanKranenburg, R, Boels, IC, Kleerebezem, M, DeVos WM (1999) Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides, *Current opinion in biotechnology* 10: 498-504

⁵⁰ Mol, J, Cornish, E, Mason, J, Koes, R (1999) Novel coloured flowers, *Current opinion in Biotechnology* 10: 198-201

⁵¹ Raskin, I. (1996) Plant genetic engineering may help with environmental cleanup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3164-3166, Rugh, CL, Senecoff, JF, Meagher, RB, Merkle, SA (1998) Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation, *Nature Biotechnology* 16:925-928

1.4 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Οι κυριότεροι πιθανοί κίνδυνοι των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων εστιάζονται: α) στο περιβάλλον κατά την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων φυτών και β) στην υγεία κατά την κατανάλωση των τροφίμων αυτών.

Από τις χιλιάδες δοκιμές πεδίου που έχουν γίνει την τελευταία δεκαετία δεν υπάρχουν προς το παρόν σοβαρές ενδείξεις ότι οι νέες καλλιέργειες έχουν βλαβερές συνέπειες στο περιβάλλον.

Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι: α) είναι εφικτή η μεταφορά στην φύση των διαγονιδίων μέσω της γύρης, β) μπορεί να προκύψουν έντομα ανθεκτικά στην εντομοκτόνο τοξίνη Bt που παράγεται από ορισμένα γ.τ. φυτά και γ) η τοξίνη Bt μπορεί να επηρεάσει και έντομα μη στόχους. Επομένως πολλοί επιστήμονες διατηρούν επιφυλακτική στάση σχετικά με το κατά πόσο τελικά θα επηρεαστούν τα φυσικά οικοσυστήματα από την απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων φυτών.

Το χρονικό διάστημα που έχουν δοκιμαστεί οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες, δεν θεωρείται ικανοποιητικό για να αποδειχθεί πλήρως ότι δεν υπάρχει οικολογικός κίνδυνος. Επικρατεί η άποψη ότι οι σημερινές μας γνώσεις δεν μας παρέχουν τα μέσα να προβλέψουμε τις μακροπρόθεσμες οικολογικές συνέπειες από την απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων φυτών.

Πολλοί επιστήμονες συμφωνούν με την άποψη ότι η επιστημονική κοινότητα δεν θα πρέπει να εφησυχάζει διότι ακόμη δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά οι επιπτώσεις των μαζικών καλλιεργειών γενετικά τροποποιημένων φυτών στα φυσικά οικοσυστήματα. Οι έρευνες πεδίου πρέπει να συνεχιστούν σε αυτόν τον τομέα για να εκτιμηθεί σωστότερα ο κίνδυνος των απρόβλεπτων αρνητικών επιπτώσεων από τις αλλαγές στο γενετικό υλικό των οργανισμών

δεδομένου ότι αυτές πραγματοποιούνται τεχνητά από τον άνθρωπο σε τόσο βραχύ εξελικτικά χρόνο.

Στον τομέα της υγείας, επίσης, δεν έχουν παρατηρηθεί βλαβερές επιπτώσεις στον άνθρωπο από την κατανάλωση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων. Οι πιθανοί κίνδυνοι εστιάζονται στις αλλεργίες που μπορεί να προκαλέσουν οι νέες πρωτεΐνες των γ.τ. τροφίμων και στην ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

Επισημαίνεται ότι χιλιάδες επεξεργασμένα τρόφιμα ήδη περιέχουν συστατικά από γενετικά τροποποιημένα φυτά και καταναλώνονται από εκατομμύρια ανθρώπους. Όμως, το διάστημα το οποίο, ο άνθρωπος έχει αρχίσει να καταναλώνει τα τρόφιμα αυτά (περίπου 5 χρόνια) θεωρείται μικρό. Εξάλλου δεν έχουν πραγματοποιηθεί ακόμη εκτεταμένες επιδημιολογικές μελέτες σε μεγάλη κλίμακα που είναι απαραίτητες για την διεξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων.

Το μάθημα που δόθηκε στην Ευρώπη από την εξάπλωση της ασθένειας των «τρελών αγελάδων» επιβάλλει την στενή παρακολούθηση και έλεγχο των εξελίξεων της σύγχρονης βιοτεχνολογίας στον τομέα των τροφίμων από τις αρχές, την επιστημονική κοινότητα και από τους καταναλωτές.

Απαραίτητη όμως είναι και η αντικειμενική ενημέρωση του κοινού. Στην Ευρώπη, φαίνεται να υπάρχει μία διαρκής κινδυνολογία και εκφοβισμός του κοινού από τα μέσα μαζικής ενημέρωσης που πιθανόν να ενισχύεται από την εμπορική ανταγωνιστικότητα με τις ΗΠΑ.

1.4.1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

Η ΓΤ μπορεί να «αξιοποιήσει» τη γενετική σύσταση φυτών, ζώων, μικροοργανισμών, ακόμα και ιών. Ο αριθμός των γονιδίων που έχουν απομονωθεί και είναι διαθέσιμα προς μεταφορά αυξάνεται διαρκώς. Στον

τομέα της γεωργίας, οι περισσότερες εφαρμογές της ΓΤ αφορούν τα καλλιεργούμενα φυτά και συνοψίζονται στις ακόλουθες:

Αναγνώριση λειτουργίας γονιδίων. ΓΤ φυτά αναπτύσσονται με σκοπό να αναγνωριστεί η δράση συγκεκριμένων γονιδίων, παρατηρώντας απλά αν το εισαγόμενο γονίδιο έχει κάποια φανερή επίδραση στο φυτό στο οποίο εισάχθηκε.

Η ΓΤ είναι σήμερα τόσο στερεότυπη σε μερικά είδη φυτών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο, ώστε να αναγνωρίσει πιο τμήμα του DNA ενός φυτού περιέχει κάποια «σημαντικό» γονίδιο.

Διάσπαση ενός τμήματος του DNA σε μικρότερα τμήματα και εισαγωγή του σε φυτά, καταδεικνύει ποια από αυτά είχαν το επιθυμητό αποτέλεσμα, ώστε να κατανοηθεί η λειτουργία του γονιδίου που είχε εισαχθεί.

Στα φυτά, τα πρώτα γονίδια που τροποποιήθηκαν ήταν αυτά που αφορούσαν στην ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα. Αυτό ήταν εφικτό, επειδή τα γονίδια για ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα είναι ανεξάρτητα γονίδια και γι' αυτό ήταν ευκολότερο να απομονωθούν και να τροποποιηθούν, σε αντίθεση με τα πολυγονιδιακά σύμπλοκα γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για σημαντικά γνωρίσματα, όπως ανθεκτικότητα στην αλατότητα και αντίσταση στην ξηρασία. Η βιοτεχνολογία έχει την ικανότητα να παράξει πολλά νέα φυτικά προϊόντα. Πολλοί διαφορετικοί τύποι προκύπτουν από:

1. Εφαρμογή μιας σειράς τεχνικών που αδρανοποιούνται μέσω γονιδίων, για να περιοριστεί ή να ανασταλεί η δραστηριότητα συγκεκριμένων μη επιθυμητών γονιδίων. Αυτά μπορεί να είναι το μαλάκωμα των φρούτων, η παρουσία τοξικών γονιδίων ή γονιδίων που προκαλούν αλλεργίες.
2. Εισαγωγή νέων φυτικών γονιδίων ή εμπλουτισμός της δράσης των ήδη υπάρχοντων για να βελτιωθεί ή να τροποποιηθεί το άμυλο ή η απόδοση των ελαίων, η γεύση των φρούτων, το χρώμα και τα θρεπτικά συστατικά.

3. Εισαγωγή γονιδίων για να προσδώσουν ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα, παθογόνα και επιβλαβείς οργανισμούς ή να ενισχύσουν την ανθεκτικότητα σε περιβαλλοντολογικά στρες όπως οι ξηρασίες, οι υψηλές ή οι χαμηλές θερμοκρασίες.
4. Εισαγωγή νέων φυτικών γονιδίων για να ενισχύσουν την παραγωγή υβριδίων ή να τροποποιήσουν την παραγωγή σπόρου εισάγοντας απομικτικά γονίδια, έτσι ώστε τα υβρίδια να είναι πιο αποτελεσματικά κατά τη διαδικασία της συγκομιδής και του επαναοργώματος.

Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν:

1. Φυτά με ανθεκτικότητα σε πολλά ζιζανιοκτόνα, παθογόνα συμπεριλαμβανομένων και ιών, βακτήρια και μύκητες.
2. Φρούτα και λαχανικά με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και καλύτερα εμπορικά χαρακτηριστικά.
3. Φρούτα και λαχανικά με βελτιωμένο άρωμα, υφή και θρεπτικό περιεχόμενο.
4. Τροποποιημένες καλλιέργειες που παράγουν έλαια με ιδιότητες πιο κατάλληλες για βιομηχανική χρήση, λίπη κατάλληλα για την ανθρώπινη διατροφή και τροποποιημένο άμυλο και υδατάνθρακες για κάθε διαιτολόγιο και βιομηχανική χρήση.
5. Φυτά με διάφορα σχέδια και χρώματα, τα οποία χρησιμοποιούνται στην ανθοκομική βιομηχανία (π.χ. μωβ γαρύφαλλα, γαλάζια τριαντάφυλλα, γεράνια που μυρίζουν σαν τριαντάφυλλα, γρασίδι που δεν χρειάζεται κοπή).
6. Απομάκρυνση των γονιδίων που ενοχοποιούνται για την τοξικότητα ή για την εμφάνιση αλλεργιών (ορισμένοι άνθρωποι είναι αλλεργικοί στους ξηρούς καρπούς).

7. Φυτά που μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλοντα όπου μέχρι πρόσφατα ήταν αδύνατον (π.χ. σε εδάφη με υψηλή αλατότητα ή ξηρασία).
8. Φυτά τα οποία, ελέγχοντας την ανάπτυξη και τη διαφοροποίησή τους, κατορθώνουν να ωριμάζουν ταχύτερα ή να αναπτύσσονται περισσότερο.
9. Φυτά στα οποία μπορεί να καθυστερήσει η άνθηση ή να μειωθεί η νεανική τους περίοδος.
10. Φάρμακα και εμβόλια.
11. Νέα γενετικά συστήματα που μπορούν να επιφέρουν αύξηση της παραγωγής, π.χ. τροποποιώντας τη φωτοσύνθεση ή επιτρέποντας σε εσοδείες όπως το σιτάρι, να δεσμεύουν άζωτο.
12. Γενετικά τροποποιημένα φυτά με την ικανότητα καθαρισμού μολυσμένων περιοχών.

Για παράδειγμα, η γενετική τροποποίηση στις πατάτες μπορεί:

1. Να αυξήσει την διαθεσιμότητα των ποικιλιών, επιμηκύνοντας την εποχή ανάπτυξης με την εισαγωγή χαρακτηριστικών ανθεκτικότητας στο στρες.
2. Να βελτιώσει τη γεύση και την υφή του πουρέ, τροποποιώντας το περιεχόμενο σε άμυλο και σάκχαρα.
3. Να μειώσει τα λιπαρά που συκρατούνται στις τηγανητές πατάτες και στα πατατάκια, περιορίζοντας την περιεκτικότητα της πατάτας σε νερό και αλλάζοντας τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος.
4. Να επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των βλαστών και περιορίζοντας τη σήψη.

5. Να ελαττώσει τα χημικά υπολείμματα, εισάγοντας χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα, στις ασθένειες και στα έντομα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

2.1 ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η μοριακή γενετική τροποποίηση των οργανισμών είναι η διαδικασία απομόνωσης επιλεγμένων γονιδίων από ένα οργανισμό (ζωικό, φυτικό, μικροβιακό) και η με τεχνητό τρόπο, εισαγωγή αυτών των γονιδίων σε ίδιου επιπέδου ή εντελώς διαφορετικό οργανισμό, με σκοπό τη δημιουργία ειδών με νέες ιδιότητες (νεοφανή). Η προσθήκη του ενθεματικού DNA στο γενετικό υλικό των κυττάρων του οργανισμού-ξενιστή γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε, αφ' ενός να είναι δυνατοί οι μηχανισμοί της αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του νέου αυτού μηνύματος μέσα στα κύτταρα-ξενιστές, και, αφ' ετέρου, να διασφαλίζεται η σταθερή κληρονόμησή του στους απογόνους.

Η ΓΤ συνήθως περιλαμβάνει, μαζί με τα μεταφερόμενα γονίδια, τη μεταφορά και άλλων αλληλουχιών, όπως γονίδια που αυξάνουν την αντίσταση στα αντιβιοτικά (τα οποία λειτουργούν ως γονίδια σήμανσης – marker genes), ρυθμιστικές αλληλουχίες των γονιδίων κ.α. Ακόμη, η ΓΤ μπορεί να γίνει όχι μόνο με την προσθήκη αλλά και με την αφαίρεση ή την τροποποίηση ενός ή περισσότερων γονιδίων.

Η ΓΤ των οργανισμών είναι μια διαδικασία που δεν σχετίζεται με τη συμβατική γενετική βελτίωση των ειδών, όπου συμβαίνει επιλεγμένη διασταύρωση οργανισμών του ίδιου είδους ή συγγενών ειδών. Η ΓΤ ξεπερνά τους φραγμούς της φύσης και δημιουργεί διαγονιδιακούς οργανισμούς σε ελάχιστο χρόνο από άποψη εξέλιξης. Ακόμη, με την υπάρχουσα γνώση, η θέση της ενσωμάτωσης των ξένων γονιδίων στο DNA του ξενιστή είναι πάντα μια προβλέψιμη διαδικασία. Οι οργανισμοί που παράγονται με τις μεθόδους της γενετικής μηχανικής μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες από πλευράς επικινδυνότητας για την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον:

Οι ΓΤ οργανισμοί χρησιμοποιούνται τόσο στην προαγωγή της έρευνας, όσο και στην παραγωγή χρήσιμων βιοτεχνολογικών προϊόντων. Εκείνους που δημιουργούνται με σκοπό να απελευθερωθούν στη φύση ή σε περιορισμένους χώρους (π.χ. θερμοκήπια ή ιχθυοτροφεία). Μέχρι σήμερα έχουν προκύψει:

1. ΓΤ φυτά ανθεκτικά σε ζιζανιοκτόνα ή σε βλαβερούς μικροοργανισμούς, αναπτύσσονται σε αντίξοες συνθήκες (π.χ. σε αλμυρά ή άνυδρα εδάφη), ή ακόμη παράγουν τροφή με ειδική σύσταση (π.χ. ΓΤ ρύζι με ενσωματωμένο το γονίδιο της βιταμίνης Α).
2. ΓΤ ζώα που έχουν ταχύτερη και μεγαλύτερη ανάπτυξη (π.χ. ΓΤ σολομός) ή επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες (π.χ. σε υπερβολικό ψύχος).
3. ΓΤ μικρόβια με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (π.χ. για την απορρύπανση του εδάφους).

Οι πρώτες εφαρμογές της Γενετικής Μηχανικής παρουσιάστηκαν στην Ιατρική. Η ανάγκη για ανάπτυξη πιο οικονομικών και πιο ασφαλών ενώσεων από περισσότερες πηγές, όπως η ινσουλίνη και η ιντερφερόνη, οδήγησε στη σύσταση ενός αριθμού νέων, μικρών εταιριών βιοτεχνολογίας, συχνά συνεργαζόμενων με Πανεπιστήμιο.

Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη παραγωγή γνώσεων και τη δημιουργία εμπορικών ευκαιριών, οι οποίες υιοθετήθηκαν από τη φαρμακευτική βιομηχανία και πιο πρόσφατα από εταιρίες γεωργικών φαρμάκων και σπόρων. Οι αρχικοί εμπορικοί στόχοι της αγροτικής βιοτεχνολογίας ήταν οι αγορές του αναπτυσσόμενου κόσμου. Παράλληλα, υπήρχε η άποψη ότι αυτές οι καινοφανείς τεχνολογίες μπορούν να συμβάλλουν στην μείωση του τεράστιου προβλήματος της έλλειψης τροφίμων. Η τροποποίηση σε επίπεδο μικροοργανισμών επιτεύχθηκε το 1973. Τα φυτά ήταν πιο δύσκολο να τροποποιηθούν εξαιτίας του πυκνού κυτταρικού τους τοιχώματος.

Τα πρώτα επιτυχημένα πειράματα καταγράφηκαν μετά από 10 έτη και περιλάμβαναν τη χρήση του ογκοεπαγόμενου βακτηριακού είδους *Agrobacterium tumefaciens* για τη μεταφορά γονιδίων που παρουσιάζουν αντίσταση στα αντιβιοτικά, σε φυτά καπνού. Αρχικά, η γενετική τροποποίηση εφαρμόστηκε σε πλατύφυλλα φυτά, όπως ο καπνός και η τομάτα. Οι σημαντικότερες καλλιέργειες δημητριακών, όπως για παράδειγμα τα στενόφυλλα φυτά, ήταν ιδιαίτερα δύσκολο να τροποποιηθούν και μόνο στα τέλη της δεκαετίας του 1980 αναφέρθηκαν επιτυχημένες τροποποιήσεις στο ρύζι και στον αραβόσιτο. Ακόμη πιο πρόσφατα επιτεύχθηκε η τροποποίηση πιο πολύπλοκων ειδών, όπως το βαμβάκι και το κριθάρι. Τα ΓΤ φυτά βρέθηκαν σε εξέχουσα θέση κατά την τελευταία δεκαετία, κι αυτό γιατί οι καλλιεργητές εξοικειώθηκαν με την εφαρμογή των καλλιεργητικών τεχνικών που αυτά απαιτούν και οι οποίες πρωτοχρησιμοποιήθηκαν σε εργαστηριακή κλίμακα το 1983.

Η τεχνολογία που μέχρι τότε βρισκόταν στα χέρια λίγων μόνο εξελιγμένων ακαδημαϊκών εργαστηρίων, εδραιώθηκε στα εργαστήρια των κυριότερων εταιριών αγροτικών εφοδίων.

Περίπου το 80% των μέχρι τώρα ερευνών που αφορούν την ΓΤ των φυτών, αποβλέπουν στη βελτίωση των βρώσιμων φυτών, ενώ το υπόλοιπο 20% εστιάζεται σε βιομηχανικές καλλιέργειες (όπως το βαμβάκι και ο καπνός), καλλωπιστικά και φαρμακευτικά φυτά.

Η διεργαστηριακή κινητικότητα των ερευνητών, η εργασία φορέων όπως το Τμήμα για διεθνή Ανάπτυξη (Department for International Development (DFID) στην Μ.Βρετανία και προγραμμάτων όπως το Rockefeller Rice Biotechnology Program επιβεβαιώνουν ότι η ΓΤ που εφαρμόζεται στα ερευνητικά κέντρα των ανεπτυγμένων αλλά και αναπτυσσόμενων χωρών, είναι αποτελεσματική από τεχνική άποψη.

2.1.1.ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*, ανήκει στην οικογένεια *Rhizobiaceae*, προκαλεί εμφάνιση όγκων σε μια ευρεία σειρά δικότυλων (πλατύφυλλων) φυτών, ειδικά σε μέλη της οικογένειας του ρόδου (*Rosaceae*) όπως το μήλο, το αχλάδι, το ροδάκινο, το κεράσι, το αμύγδαλο, το σμέουρο και τα τριαντάφυλλα και είναι ο μοναδικός παράγοντας που προκαλεί την ασθένεια της νεοπλασίας των φυτών που ονομάζεται κορονωτός κάλλος. Η ασθένεια στην άμπελο αποδίδεται σε έναν ειδικό βιότυπο, που είναι γνωστός ως *biovar 3*. Η νόσος οφείλει το όνομα της στους χαρακτηριστικούς όγκους που εμφανίζονται στο υπέργειο τμήμα του φυτού, ακριβώς επάνω από το επίπεδο του εδάφους. Αν και μειώνει την εμπορευσιμότητα του παραγόμενου προϊόντος, συνήθως δεν προκαλεί σοβαρή ζημία στα παλαιότερα φυτά. Εντούτοις, αυτή η νόσος είναι ευρύτατα γνωστή λόγω της αξιοπρόσεκτης βιολογίας της.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, έγινε γνωστός ο μηχανισμός του σχηματισμού όγκων σε φυτά από το είδος *A.tumefaciens*. Κατά την προσβολή σε τραυματισμένα κύτταρα, τα βακτήρια εισάγουν ένα τμήμα DNA σε γειτονικά μη πληγωμένα κύτταρα.

Το τμήμα αυτό του DNA ενσωματώνεται τυχαία μέσα στο γονιδίωμα των κυττάρων του φυτού και τα γονίδια του T-DNA, καθώς εκφράζονται από το φυτικό κύτταρο, επάγουν τη δημιουργία όγκων στα προσβεβλημένα κύτταρα. Παράλληλα, συντίθενται και εξειδικευμένα αμινοξέα, τα οποία χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια ως πηγή άνθρακα και ενέργειας.

Ο μοναδικός τρόπος δράσης του *A.tumefaciens* το ανέδειξε σε σημαντικό εργαλείο για τη ΓΤ των φυτών. Η αρχή πάνω στην οποία στηρίζεται η χρήση του αγρο-βακτηρίου στη γενετική εφαρμοσμένη μηχανική είναι ότι το T-DNA του *A.tumefaciens* αποκόπτεται και ενσωματώνεται στο φυτικό γονιδίωμα, ως τμήμα της φυσικής διαδικασίας μόλυνσης από αυτό το βακτήριο.

Έτσι, οποιοδήποτε ξένο DNA που παρεμβάλλεται στο T-DNA του βακτηρίου, θα ενσωματωθεί και στο γονιδίωμα του φυτού⁵².

Οποιαδήποτε επιθυμητά γονίδια, όπως τοξικά για τα έντομα γονίδια του είδους *Bacillus thuringiensis* ή γονίδια με αντίσταση στα ζιζανιοκτόνα, μπορούν να ενσωματωθούν στο DNA του βακτηρίου και με αυτόν τον τρόπο να παρεμβοληθούν στο γονιδίωμα των φυτών.

Η χρήση του αγροβακτηρίου όχι μόνο μειώνει χρονικά τη συμβατική διαδικασία αναπαραγωγής φυτών, αλλά επιτρέπει την εισαγωγή νέων γονιδίων στα καλλιεργούμενα φυτά. Στη συνέχεια παρατίθενται κάποιες πληροφορίες για το εν λόγω βακτήριο, καθώς και για τη διαδικασία μόλυνσης των φυτικών κυττάρων σε αυτό, αφού πάνω σε αυτήν στηρίζεται και η συγκεκριμένη μέθοδος γενετικής τροποποίησης.

2.1.1.1 ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ ΚΑΙ ΤΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΤΟΥ

Το *A.tumefaciens* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, με ικανότητα κίνησης, ραβδόμορφο βακτήριο εδάφους, που δεν παράγει σπόρια. Το συγκεκριμένο βακτήριο συγγενεύει με το είδος *Rhizobium*, το οποίο σχηματίζει τα αζωτοδεσμευτικά φυμάτια στο τριφύλλι και σε άλλα ψυχανθή φυτά.

Τα διάφορα είδη του αγροβακτηρίου είναι ταξινομημένα σε τρεις βιοτύπους, που καθορίζονται με βάση διαφορές σε υδατάνθρακες. Οι διαφορές μεταξύ των βιοτύπων ελέγχονται από γονίδια που εδρεύουν στο

⁵² Tsaftaris A. S., Polidoros A. N., Karavangeli M., Nianou-Obeidat I., Madesis P. Goudoula C. (2000). Transgenic crops: recent developments and prospects. In Balazs, E., Galante, E., Lynch, J.M., Schepers, J.S., Toutant, J.-P., Werner, D., Werry, P.A.T.J., (Eds.). *Biological Resource Management-Connecting Science and Policy*. Pp 187-203. Springer, Berlin .

κυκλικό χρωμοσωμικό DNA του βακτηρίου. Οι διαφορές στους βιότυπους δεν συνδέονται με την παθογένεια του *A.tumefaciens*, εκτός από τον βιότυπο 3 (biovar 3) που είναι παθογόνο της αμπέλου. Ωστόσο, αυτό οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στο γεγονός ότι ο βιότυπος 3 έχει διαδοθεί ευρέως λόγω των μοσχευμάτων της αμπέλου, και δεν οφείλεται, συνεπώς, σε φυτικά αίτια.

Τα περισσότερα από τα γονίδια που ελέγχουν τη διαδικασία προσβολής και την εμφάνιση της ασθένειας δεν εδρεύουν στο χρωμοσωμικό DNA του *A.tumefaciens* αλλά σε ένα μεγάλο πλασμίδιο, το πλασμίδιο Ti.

Αντίστοιχα, τα περισσότερα από τα γονίδια που εκδηλώνουν την ασθένεια από το είδος *Rhizobium* και την παραγωγή των αζωτοδεσμευτικών φυματίων, εδρεύουν σε ένα μεγάλο πλασμίδιο, γνωστό ως πλασμίδιο Sym (symbiotic/συμβιωτικά). Κατά συνέπεια, η χαρακτηριστική βιολογία αυτών των δύο βακτηρίων οφείλεται στη λειτουργία κυρίως των γονιδίων των πλασμιδίων τους και όχι του χρωμοσωμικού DNA του βακτηρίου.

Ο πρωταγωνιστικός ρόλος των πλασμιδίων σε αυτά τα βακτήρια μπορεί να διερευνηθεί εύκολα με κατάλληλη μεταχείριση των στελεχών. Εάν καλλιέργειες του βακτηρίου αναπτυχθούν κοντά στη μέγιστη θερμοκρασία αντοχής του (περίπου 30°C στην περίπτωση του *Agrobacterium* ή του *Rhizobium*), το πλασμίδιο αποσυντίθεται και παρατηρείται απώλεια της παθογένειας είτε του *Agrobacterium* είτε του *Rhizobium*.

Η απώλεια, ωστόσο, του πλασμιδίου δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των βακτηρίων στην καλλιέργεια, τα οποία παραμένουν λειτουργικά χωρίς να είναι παθογόνα. Κάτω από εργαστηριακές συνθήκες είναι επίσης εφικτή η μεταφορά του πλασμιδίου από το ένα βακτήριο στο άλλο, με ταυτόχρονη διατήρηση των ιδιοτήτων του.

Το *A.tumefaciens* βρίσκεται συνήθως επάνω ή γύρω από τις ριζικές επιφάνειες, όπου επιβιώνει χρησιμοποιώντας ως θρεπτικά στοιχεία ουσίες που εγκρίνονται από τους ριζικούς ιστούς. Η προσβολή γίνεται μόνο από σημεία στα οποία διακόπτεται η συνοχή της ριζικής επιδερμίδας και που

προκλήθηκαν είτε από φυσικά αίτια, είτε από μεταφυτεύσεις. Τα στάδια πριν τον σχηματισμό όγκου είναι τα ακόλουθα: α) αναγνώριση του κυττάρου-στόχου του φυτού από το *Agrobacterium*, β) προσκόλληση του βακτηρίου στα κύτταρα των φυτών, γ) μεταφορά και έκφραση του T-DNA, δ) ενσωμάτωση του T-DNA στο γονιδίωμα και ε) έκφραση των συμπτωμάτων από τα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το *Agrobacterium*, που έχει την ικανότητα αυτόνομης κίνησης, προσελκύεται χημειοτακτικά από τους τραυματισμένους φυτικούς ιστούς. Αυτό συμβαίνει κυρίως ως αντίδραση στην απελευθέρωση σακχάρων και άλλων ουσιών του μεταβολισμού των ριζικών κυττάρων. Ωστόσο, με την παρουσία του T_i πλασμιδίου τα στελέχη του βακτηρίου αντιδρούν πολύ πιο έντονα, εξαιτίας της αναγνώρισης φαινολικών ενώσεων χαρακτηριστικών σε περιπτώσεις τραυματισμού, όπως η ακετοσυριγκόνη, ακόμα και αν αυτές οι ενώσεις βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (10^{-7} M).

Συνεπώς, μια από τις λειτουργίες του T_i πλασμιδίου είναι η παραγωγή χημειοτακτικών ενώσεων, για τις εν λόγω ουσίες, δεκτών που παρεμβάλλονται σε συγκεκριμένα σημεία της βακτηριακής μεμβράνης και ενεργοποιούν την αναγνώριση των τραυματισμένων ιστών από το βακτήριο. Η ακετοσυριγκόνη διαδραματίζει ένα ακόμα πιο ενεργό ρόλο στη διαδικασία προσβολής. Όταν αυτή η ένωση βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον του βακτηρίου (10^{-5} έως 10^{-4} M), ενεργοποιεί συγκεκριμένα γονίδια του T_i πλασμιδίου, τα γονίδια τοξικότητας vir (virulence genes). Αυτά τα γονίδια είναι υπεύθυνα για τον συντονισμό της διαδικασίας προσβολής και συγκεκριμένα:

1. Προάγουν την παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών (περμεασών) που παρεμβάλλονται στην βακτηριακή μεμβράνη και που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη των ειδικών αμινοξέων (οπινών), τα οποία θα συνθέσουν το προσβληθέν φυτό που το βακτήριο χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας και άνθρακα και

2. Ενεργοποιούν την παραγωγή συγκεκριμένων ενδονουκλεασών, περιοριστικών ενζύμων, τα οποία αποκόπτουν-κόβουν σε οποιαδήποτε σημείο μέσα ή έξω από την περιοχή T-DNA (tumor DNA – ογκογενετικό DNA). Η πολικότητα αυτή οφείλεται στην ύπαρξη εξειδικευμένης αλληλουχίας DNA στο T_i (tumor-inducing-ογκοεπαγωγικό) πλασμίδιο δίπλα στο δεξιό συνοριακό. Αυτός ο ενισχυτής της μεταφοράς του T-DNA ενισχύει κατά πολύ το σχηματισμό της αλυσίδας του T-DNA στο *Agrobacterium* λόγω μοριακών αλληλεπιδράσεων⁵³.

Η επαγωγή του συστήματος *vir* μπορεί να ελεγχθεί με την χρησιμοποίηση προαγωγέα των γονιδίων της περιοχής *vir* συνδεδεμένου με ένα γονίδιο αναφοράς το *lacZ* το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση του *E.coli*. Οι δύο πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *virA*, *virG*, από την περιοχή τοξικότητας, διαμεσολαμβάνουν για την ενεργοποίηση όλων των υπολοίπων γονιδίων της περιοχής *vir*. Μόρια σηματοδότες που απελευθερώνονται από τους τραυματισμένους φυτικούς ιστούς αναγνωρίζονται από το ρυθμιστικό σύστημα *virA/virG*, όπου η *virA* εντοπίζεται στη μεμβράνη και η *virG* στο κυτταρόπλασμα του *Agrobacterium*.

Υπάρχουν και άλλα μονοκυκλικά φαινορικά παράγωγα που μπορούν να δράσουν ως επαγωγείς, συμπεριλαμβανομένων και των πρόδρομων μορφών λιγνίνης, και μερικών πρόδρομων φλαβονοειδών (σιναπικό οξύ, συριγκαλδεύδη, συριγγικό οξύ και διμεθοξυφαινόλη).

Η σύνδεση του *Agrobacterium* με τα φυτικά κύτταρα είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του DNA. Η σύνδεση αυτή με το φυτικό κύτταρο γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο το βακτήριο συνδέεται χαλαρά με την επιφάνεια του κυττάρου και στο δεύτερο στάδιο τα συνδεδεμένα βακτήρια συνθέτουν ινίδια κυτταρίνης που σταθεροποιούν την αρχική σύνδεση με αποτέλεσμα μια ισχυρή σύνδεση μεταξύ *Agrobacterium* και κυττάρου ξενιστή.

⁵³ Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία φυτών, εκδ. Έμβρυο, Αθήνα

Όπως φαίνεται και την Εικόνα 4.3, το T-DNA, αφού αποκοπεί, μεταφέρεται εντός του φυτικού κυττάρου και ενσωματώνεται τυχαία σε κάποιο χρωμόσωμα. Ο ακριβής μηχανισμός της μεταφοράς δεν είναι γνωστός αλλά φαίνεται ότι απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες, που προϋποθέτουν την παραγωγή φυτικών ορμονών από το βακτήριο. Η παραγωγή αυτών των ορμονών γίνεται από το *tsz* γονίδιο που βρίσκεται στο Tι πλασμίδιο.

Επιγραμματικά η μεταφορά και ένθεση του T-DNA στο φυτό από το *Agrobacterium* περιγράφεται ως εξής: φαινολικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους όπως ακετοσυριγκόνη απελευθερώνονται από τους πληγωμένους φυτικούς ιστούς. Οι ενώσεις αυτές επάγουν την πρωτεΐνη *virA* η οποία ενεργοποιεί την *virG*. Η τελευταία υποκινεί την επαγωγή των οπερονίων της περιοχής τοξικότητας του πλασμιδίου.

Οι πρωτεΐνες *virD2* (συνδεδεμένη ομοιοπολικά στο 5' άκρο μέσω μιας τυροσίνης, διατηρεί το άκρο αυτό κατά την ενσωμάτωση), *virE2* (συνδέεται συνεργιστικά με το μονόκλωνο DNA) είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία συμπλόκου νουκλεοπρωτεΐνης T και εμπλέκονται στη διαδικασία της ένθεσης.

Η ενσωμάτωση του T-DNA στο φυτικό γονιδίωμα οδηγεί στη δημιουργία όγκου και παραγωγή οπινών που λαμβάνονται μέσω των περμεακών οπινών που κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στο πλασμίδιο Tι έξω από τις περιοχές *onc*, *vir*⁵⁴. Σύμφωνα με το μοντέλο ένθεσης T-DNA οι ενδονουκλεάσες κόβουν το DNA σε 3 θέσεις και μετά σε δύο θέσεις. Το 5' άκρο της T-αλυσίδας υβριδίζει με το γονιδιωματικό DNA σε επίπεδο μικροομολογίας, ενώ το 3' ελεύθερο υδροξύλιο του T-DNA και του γονιδιωματικού χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για την αντιγραφή και την πλήρωση των κενών που δημιουργούνται στο γονιδιωματικό DNA λόγω των ενδονουκλεασών. Τέλος, το τμήμα του γονιδιωματικού DNA του φυτού μεταξύ των εγκοπών χάνεται και χρησιμοποιείται το 3 ελεύθερο υδροξύλιο για αντιγραφή με ταυτόχρονη απελευθέρωση των πρωτεϊνών *virD2* και *virE3*.

⁵⁴ Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία φυτών, εκδ. Έμβρυο, Αθήνα

Είναι σημαντικό να γίνει σαφές ότι μόνο ένα μικρό τμήμα από το πλασμίδιο T_i, το T-DNA, εισέρχεται τελικά μέσα στο φυτικό κύτταρο-ξενιστή σύμφωνα με την τεχνική του υβριδισμού κατά Southern, ενώ το υπόλοιπο πλασμίδιο παραμένει μέσα στο φυτό, όπου έχει συγκεκριμένους ρόλους. Επίσης στελέχη *Agrobacterium* με πλασμίδια T_i μπορούν να μεταφέρουν κατά τη διάρκεια της επαγωγής του όγκου στα φυτικά κύτταρα ένα συνεχές και ενιαίο τμήμα του πλασμιδιακού DNA 13 kb ή ένα μεγαλύτερο συνεχές τμήμα 20 kb. Ένα μέρος από αυτά τα τμήματα DNA αποδείχτηκε ογκογενετικό για τα φυτικά κύτταρα και ονομάζεται αριστερό T-DNA μεγέθους 13 kb (T_L-DNA). Το άλλο μέρος του τμήματος T-DNA του πλασμιδίου T_i, το οποίο μπορεί να μεταφερθεί, ονομάζεται δεξιό T-DNA μεγέθους 7kb (T_R-DNA) χωρίς ογκογενετικές ιδιότητες με κωδικοποίηση των ενζύμων της βιοσύνθεσης της αγροπίνης.

Μόλις το T-DNA ενσωματωθεί στο φυτικό γονιδίωμα, καθίσταται υπεύθυνο για πληθώρα διεργασιών όπως την παραγωγή των κυτοκινών, την παραγωγή του ινδολιλο-3-οξικού οξέος και τη σύνθεση και την απελευθέρωση νέων μεταβολικών προϊόντων, που θα χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά από το *Agrobacterium*.

Οι φυτικές ορμόνες διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία της κυτταρικής αύξησης, δημιουργώντας όγκους και ένα περιβάλλον πολύ πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία για τα βακτήρια. Τα θρεπτικά στοιχεία που καταναλώνει το βακτήριο είναι παράγωγα αμινοξέων, τα οποία διαφέρουν από τα φυσιολογικά παράγωγα του φυτικού μεταβολισμού, ενώ μια άλλη ομάδα θρεπτικών στοιχείων, που επίσης αξιοποιεί το βακτήριο για κάλυψη των αναγκών του σε ενεργειακό περιεχόμενο και άτομα άνθρακα, είναι οι αγροτοπίνες οι οποίες είναι φωσφοριωμένα παράγωγα υδατανθράκων.

Επιπλέον, επειδή τα προαναφερόμενα συστατικά διαφέρουν από τα φυσιολογικά παράγωγα του μεταβολισμού των φυτών, το *Agrobacterium* αποφεύγει τον ανταγωνισμό με άλλα είδη βακτηρίων.

Διαφορετικά στελέχη του *A.tumefaciens* περιέχουν διαφορετικούς τύπους T_i πλασμιδίου. Τα πιο κοινά T_i πλασμίδια παράγουν τη νοπαλίνη και την αγροκινοπίνη A. Το υπόλοιπο πλασμίδιο έχει γονίδια που διευκολύνουν την πρόσληψη και επιτρέπουν τον καταβολισμό των εν λόγω στοιχείων (στην περίπτωση αυτή, της νοπαλίνης και της αγροκινοπίνης A), δηλαδή το Nos γονίδιο και το Acc γονίδιο, αντιστοίχως.

Το *A.tumefaciens* έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη γενετική τροποποίηση των φυτών. Αυτό έχει επιτευχθεί με εισαγωγή των επιθυμητών γονιδίων με μεθόδους γενετικής μηχανικής, έτσι ώστε να ενσωματωθούν στο φυτικό γονιδίωμα μαζί με το T-DNA του βακτηρίου.

Μετά την επαγωγή των οπερονίων της τοξικότητας νιγ εντοπίζονται στο *Agrobacterium* μονόκλιωνα μόρια (αντιπροσωπεύουν την κάτω αλυσίδα του T-DNA) αλλά και δίκλιωνα T-DNA μόρια.

Ο σχηματισμός των μορίων αυτών εξαρτάται από τη δραστικότητα δύο πρωτεϊνών που ονομάζονται νιγ D1 νιγ D2 που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο νιγD.

Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μια ενδονουκλεολυτική δράση, ικανή για μονόκλιωνα κοπή στα επαναλαμβανόμενα συνοριακά σε συγκεκριμένες και ακριβείς θέσεις. Οι θέσεις των εγκοπών δρουν ως σημεία έναρξης για σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5' προς 3'. Οι μονόκλιωνες αλυσίδες μετά θα απελευθερωθούν με τη διαδικασία της αντιγραφής από τις DNA πολυμεράσες με την εκτόπιση αλυσίδας⁵⁵.

Τα μοναδικά σημαντικά μέρη του T-DNA σε σχέση με τη διαδικασία της ΓΤ φυτών είναι τα δύο άκρα του (μεγέθους 25 ζευγών βάσεων), που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Έτσι, από ένα φυσιολογικό μόριο T-DNA αφαιρούνται τα γονίδια που ελέγχουν τη σύνθεση («κωδικοποιούν») των φυτικών ορμονών και στη θέση τους εισάγονται τόσο η αλληλουχία ενός γονιδίου αναφοράς όσο και ενός γονιδίου με τις ιδιότητες

⁵⁵ Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία φυτών, εκδ. Έμβρυο, Αθήνα

που είναι επιθυμητό να έχει το διαγονιδιακό φυτό, καθώς και τα ρυθμιστικά τους στοιχεία. Από εδώ και στο εξής στο κείμενο το όλο γενετικό κατασκεύασμα θα ονομάζεται ένθεμα.

Το ένθεμα περιέχει επίσης και την αλληλουχία αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης⁵⁶. Αυτή η ενσωμάτωση είναι δυνατή με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών και της λιγάσης. Όταν μια συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει την αλληλουχία που αυτή αποκόπτει (π.χ. η ενδονουκλεάση EcoRI αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-GAATTC-3' και τη διασπά στη γουανίνη G και στη γειτονική αδενονίνη A), θα διασπάσει σε ένα συγκεκριμένο σημείο την αλληλουχία, δημιουργώντας ένα νέο εκτεθειμένο άκρο στο μόριο που την περιέχει. Αν ένα άλλο μόριο DNA αποκοπεί από την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, εφόσον φυσικά περιέχει την αλληλουχία αναγνώρισής της, δημιουργείται ακόμη ένα άκρο, το οποίο είναι συμπληρωματικό του προηγούμενου.

Συνεπώς, αν προστεθεί ένα ένζυμο όπως για παράδειγμα η λιγάση, που μπορεί να συνενώσει αυτά τα δύο άκρα, θα έχει επιτευχθεί η δημιουργία ενός «χιμαιρικού» μορίου DNA, το οποίο θα αποτελείται από δύο περιοχές που υπήρχαν στα δύο αρχικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους μόρια DNA. Στην περίπτωση του συνθετικού μορίου T-DNA, το χιμαιρικό μόριο που παράγεται περιέχει τα δύο άκρα μεγέθους 25 ζευγών βάσεων, που παίζουν καταλυτικό ρόλο στη διαδικασία ενσωμάτωσης του μορίου στο φυτικό γονιδίωμα.

Στη συνέχεια, αυτό το πλασμίδιο εισάγεται σε ένα «γυμνό» από το πλασμίδιο του βακτήριο *A.tumefaciens* και με την σειρά του, το μετασχηματισμένο αυτό βακτήριο *A.tumefaciens* εισάγεται σε μια καλλιέργεια φυσιολογικών *A.tumefaciens*. Εκεί, το ένθεμα εισάγεται και σε άλλα πλασμίδια φυσιολογικών *A.tumefaciens*, μέσα από τη διαδικασία του «ομόλογου μετασχηματισμού» (υπενθυμίζεται ότι υπάρχει ομολογία ανάμεσα στα φυσιολογικά T-DNA μόρια και στα μετασχηματισμένα, αφού και τα δύο

⁵⁶ Peters P., 1993, *Biotechnology: A Guide to Genetic Engineering*, Dubuque IA:Wm.C.Brown Publishers

περιέχουν τις δύο επάκριες, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, μήκους 25 ζευγών βάσεων).

Συνοψίζοντας, λοιπόν, μπορεί να ειπωθεί γενικά ότι για την τροποποίηση των φυτών με τη μέθοδο του *A.tumefaciens* απαιτούνται:

A) Ένα κύτταρο *A.tumefaciens* για να ενεργήσει ως όχημα για την εισαγωγή ενός μετασχηματισμένου με το επιθυμητό ένθεμα («αφοπλισμένου») πλασμιδίου.

B) Ένα πλασμίδιο Tι λειτουργικό όσον αφορά τα νιγ γονίδια για να είναι εφικτή η αναγνώριση των φυτών από το βακτήριο και για την αποκοπή του T-DNA και

Γ) Το T-DNA που, αφού πρώτα έχει «αφοπλιστεί», στη συνέχεια ενσωματώνεται σε αυτό το κατάλληλο ένθεμα⁵⁷.

Η διαδικασία του μετασχηματισμού των φυτών μπορεί να γίνει είτε με μόλυνση πρωτοπλάστων, απομόνωση των μετασχηματισμένων κυττάρων και παραγωγή από αυτά δια-γονιδιακών φυτών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας, είτε απευθείας με ιστοκαλλιέργεια. Στη δεύτερη περίπτωση, η διαδικασία έχει ως εξής: φυτικά τμήματα αποκόπτονται από φύλλα και επωάζονται σε τριβλία Petri, μαζί με μετασχηματισμένα βακτήρια. Τα φυτικά τμήματα απελευθερώνουν ουσίες ίδιες με αυτές που προσελκύουν τα βακτήρια κατά τη φυσιολογική διαδικασία μόλυνσης.

Συνεπώς, σε κάποια από αυτά τα φυτικά κύτταρα θα ενσωματωθεί τελικά το ένθεμα και αφού το θρεπτικό μέσο των τριβλίων επιτρέπει μόνο στα μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα να αναπτυχθούν ταχύτατα, θα σχηματιστούν όγκοι από αυτά. Στον σχηματισθέντα όγκο προστίθενται αυξητικοί παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη βλαστών προερχόμενων από τροποποιημένα κύτταρα. Αυτά τα βλαστίδια μεταφέρονται στη συνέχεια

⁵⁷ Alberts B. Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Watson J.D. Molecular Biology of the Cell, Third Edition,

σε ένα θρεπτικό μέσο, όπου υποβοηθείται η έκπτυξη ριζών και στη συνέχεια το βλαστίδιο μεταφυτεύεται, για να δώσει ένα πλήρως μετασχηματισμένο φυτό.

Κατά την προσβολή των πρωτοπλαστών με *Agrobacterium*, μερικά μόνο κύτταρα θα τροποποιηθούν γενετικά. Συνεπώς, πρέπει να αναπτυχθούν τρόποι επιλογής αρχικά των τροποποιηθέντων πρωτοπλαστών από αυτούς που δεν έχουν τροποποιηθεί.

Αφού επιλεγούν οι τροποποιημένοι πρωτοπλάστες, θα πρέπει ένα άλλο σύστημα να επιτρέπει την παραγωγή τροποποιημένων φυτών στο σύνολο των κυττάρων τους. Στα πρώτα στάδια εφαρμογής της μεθόδου είχαν επιλεγεί πλασμίδια-φορείς στον οποίων το T-DNA είχαν γίνει μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια, τα οποία ήταν υπεύθυνα για την αυξήνη. Αυτοί οι φορείς ευνοούν τη δημιουργία μη κανονικών όγκων, οι οποίοι μπορούν να βλαστήσουν, δίνοντας έτσι ένα ΓΤ φυτό, αφού θα έχει προέλθει από ένα τροποποιημένο κύτταρο του σχηματισμένου όγκου.

Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως, γονίδια που υπάρχουν φυσιολογικά στο T-DNA δεν είναι επιθυμητά. Σήμερα χρησιμοποιούνται πλήρως «αφοπλισμένοι» φορείς οι οποίοι περιέχουν, εκτός από τα επιθυμητά προς έκφραση γονίδια, και τα ρυθμιστικά τους στοιχεία δηλαδή γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά όπως η καναμυκίνη.

Συνεπώς, η όλη διαδικασία του μετασχηματισμού, της επιλογής των μετασχηματισμένων πρωτοπλαστών και της αναβλάστησής τους σε πλήρως τροποποιημένα φυτά γίνεται με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού μέσα στο θρεπτικό μέσο. Ένα δεύτερο αντιβιοτικό, συνήθως η στρεπτομυκίνη ή η καρβενικιλίνη, χρησιμοποιείται για να ελέγξει τον πληθυσμό των βακτηρίων που σε αντίθετη περίπτωση θα οδηγήσουν σε υπερβολική αύξηση των φυτικών κυττάρων της ιστοκαλλιέργειας.

Συνήθως, οι φορείς που περιέχουν δύο διαφορετικά γονίδια-μάρτυρες που παρουσιάζουν αντίσταση σε δύο διαφορετικά αντιβιοτικά, περιέχουν τα γονίδια αυτά στα άκρα του ενθεματικού μορίου, ενώ η αλληλουχία του επιθυμητού λειτουργικού γονιδίου κλωνοποιείται ενδιάμεσα αυτών, εξασφαλίζοντας έτσι την ασφαλή διάκριση των τροποποιημένων κυττάρων.

Ένα σύστημα διαχωρισμού και επιλογής των γενετικά τροποποιημένων φυτών από μη τροποποιημένα, βασισμένο στην ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά, δεν αποτελεί εγγύηση ότι τα φυτά που θα επιλεγούν τελικά θα είναι πραγματικά τροποποιημένα, αφού δεν συνεπάγεται ότι ανθεκτικές στα αντιβιοτικά θα είναι μόνο οι σειρές που περιέχουν τα γονίδια ανθεκτικότητας στο T-DNA τους.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε βακτήρια έναντι των αντιβιοτικών μπορεί να οφείλεται και σε τυχαίες μεταλλάξεις, καθώς και στο γεγονός ότι η δράση των αντιβιοτικών επηρεάζεται από το περιβάλλον.

Γι' αυτό και συνήθως επιλέγονται συγκεκριμένα γονίδια-μάρτυρες (γονίδια αναφοράς) που κωδικοποιούν ένζυμα, όπως τα GUS (Beta-glucuronidase) και GAT. Τα συγκεκριμένα ένζυμα καταλύουν χημικές αντιδράσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από εμφάνιση χρώματος στους ιστούς που τελικά μετασχηματίζονται. Με την προσθήκη του κατάλληλου ενζυμικού υποστρώματος στα φυτά και με την αλλαγή του χρώματος, γίνεται εύκολη η αναγνώριση των μετασχηματισμένων ιστών του φυτού. Επίσης, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι φασματοφωτομετρίας για να μετρηθεί ο βαθμός αλλαγής του χρώματος και να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του βαθμού μετασχηματισμού του εκάστοτε φυτικού ιστού. Μια παραπλήσια μέθοδος είναι η εισαγωγή και χρήση ενός γονιδίου ως γονίδιο αναφοράς που κωδικοποιεί την παραγωγή μιας φθορίζουσας πρωτεΐνης, η οποία θα προσδώσει αυτή την ικανότητα στους ιστούς που θα μετασχηματιστούν, ενώ και εδώ ισχύει ότι η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη του βαθμού τροποποίησης του εκάστοτε ιστού.

Η πλέον αξιόπιστη μέθοδος ελέγχου του μετασχηματισμού ενός φυτικού ιστού βασίζεται στην ανάλυση του μήκους των αλληλουχιών DNA μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (ενδονουκλεάσες). Η ανάλυση γίνεται σε φυτικό γενωμικό DNA που έχει απομονωθεί και ο διαχωρισμός των τμημάτων διαφορετικού μεγέθους γίνεται με την τεχνική Southern blot, χρησιμοποιώντας κατάλληλες επισημασμένες αλληλουχίες DNA, οι οποίες είναι συμπληρωματικές αλληλουχιών του μεταφερόμενου DNA.

Η ανάγκη για την ανάπτυξη μιας τέτοιας μεθόδου προήλθε από τη διαπίστωση ότι τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται, μπορεί να πολλαπλασιαστούν και να παραμείνουν μέσα στους φυτικούς ιστούς, χωρίς να μετασχηματίσουν τα φυτικά κύτταρα.

Έτσι, θα προκύψουν εσφαλμένα συμπεράσματα τόσο για το βαθμό μετασχηματισμού των φυτικών ιστών, όσο και για την επιλογή αυτών για τη δημιουργία πλήρως μετασχηματισμένων φυτών. Όμως, η ανάλυση RFLP που είναι η ανάλυση τροποποιημένου DNA το οποίο προήλθε από φυτικό κύτταρο με τη χρήση επισημασμένων μορίων DNA, συμπληρωματικών των άκρων του T-DNA, θα δώσει τμήματα DNA διαφοροποιημένα τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Αυτό οφείλεται στο ότι οι θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων στο DNA ενός φυτού διαφέρουν από τις θέσεις αναγνώρισης των ίδιων ενζύμων ενός βακτηρίου.

Επίσης, η RFLP ανάλυση θέτει τις βάσεις για τον προσδιορισμό του αριθμού εισαγωγής του T-DNA σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο. Συχνά, το *Agrobacterium* εισάγει πολλαπλά αντίγραφα του T-DNA στο γένωμα ενός φυτικού κυττάρου, με αποτέλεσμα το κάθε αντίγραφο να παράξει διαφορετικού μήκους αλληλουχίες, αφού έχει εισαχθεί σε διαφορετικά μέρη του φυτικού γενώματος.

2.2 ΜΙΚΡΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΙ-ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΥΑΔΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

Οι ερευνητές, εκμεταλλευόμενοι την παρατήρηση ότι το μετασηματισμένο T-DNA και τα γονίδια *vir* δεν είναι απαραίτητο να εδρεύουν στο ίδιο πλασμίδιο, οδηγήθηκαν στην ανάπτυξη μιας παραπλήσιας μεθόδου για την τροποποίηση με *Agrobacterium* που είναι γνωστή ως αυτή των δυαδικών πλασμιδιακών φορέων.

Τα φυσιολογικά Τί πλασμίδια από το *Agrobacterium* έχουν μεγάλο μέγεθος και έτσι η μεταχείρισή τους με τα κατάλληλα ένζυμα για την εισαγωγή ξένων γονιδίων, είναι αδύνατη λόγω της ύπαρξης πολλών αλληλουχιών αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών.

Το βακτήριο *E.coli* έχει ένα πλασμίδιο του οποίου το μέγεθος είναι ιδανικό για μεταχείριση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και την παραγωγή «χιμαιρικών» μορίων DNA.

Έτσι, αυτό που γίνεται είναι η εισαγωγή ενός «αφοπλισμένου» μορίου T-DNA σε ένα πλασμίδιο από το *E.coli*. Τα κατ' αυτόν τον τρόπο παρασκευασθέντα μικρού μεγέθους Τί πλασμίδια μεταφέρονται στη συνέχεια από το *E.coli* στο *Agrobacterium*.

Για να μπορέσει να γίνει εφικτή η μεταφορά του T-DNA από το βακτήριο στο φυτό, όπως ειπώθηκε, θα πρέπει τα γονίδια τύπου *vir* να εκδηλώσουν την δράση τους, που μεταξύ άλλων περιλαμβάνει την παραγωγή συγκεκριμένης ενδονουκλεάσης, η οποία θα αποκόψει το T-DNA από το Τί πλασμίδιο, για να μπορέσει αυτό να εισαχθεί και να ενσωματωθεί στο φυτικό γένωμα. Τα *vir* γονίδια συνήθως δεν ενσωματώνονται στο *Coli* πλασμίδιο αλλά παραμένουν ενεργά, αφού υπάρχουν στο Τί πλασμίδιο του *Agrobacterium* (σύστημα «δυαδικού πλασμιδιακού φορέα»).

Το πλασμίδιο T_i στο δυαδικό σύστημα περιέχει τα γονίδια της τοξικότητας vir και μια αχή αντιγραφής αλλά δεν περιέχει τα T-DNA επαναλαμβανόμενα συνοριακά.

Αυτό το σύστημα δίνει και τη δυνατότητα στα γονίδια που εισάγονται ξεχωριστά στον Coli πλασμιδιακό φορέα και στο κανονικό T_i πλασμίδιο, να μπορούν να εισαχθούν ταυτόχρονα στο γένωμα του ίδιου φυτικού κυττάρου, σε διαφορετικές θέσεις «Συνεργατικός Μετασχηματισμός».

Αν τα ενθέματα απομονωθούν γενετικά κατά την εισαγωγή τους στο φυτικό γένωμα (με άλλα λόγια αν εισαχθούν σε μη ομόλογα χρωμοσώματα), τότε θα διαχωριστούν μεταξύ τους στις επόμενες γενεές. Συνεπώς, εάν τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών εισαχθούν στο ένα πλασμίδιο και τα κύρια γονίδια του μετασχηματισμού στο άλλο, τότε θα είναι δυνατός ο έλεγχος των μετασχηματισμένων φυτών αλλά και ο γενετικός διαχωρισμός των δύο ομάδων γονιδίων, κάτι που είναι πολύ σημαντικό, αφού δεν είναι επιθυμητή η απελευθέρωση στο περιβάλλον οργανισμών με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι το περιορισμένο εύρος προσβολής του *A.tumefaciens*. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ικανό να προσβάλλει (και συνεπώς να τροποποιήσει γενετικά) μια πληθώρα δικότυλων φυτών, αδυνατεί όμως να τροποποιήσει μονοκότυλα φυτά σημαντικά για την διατροφή του ανθρώπου όπως το ρύζι, ο αραβόσιπος και το σιτάρι. Επίσης, μειονέκτημα της μεθόδου είναι και η τυχαία ενσωμάτωση (συνεπώς και η τυχαία αδρανοποίηση γονιδίων του φυτού) του ενθεματικού DNA στο φυτικό γένωμα, αλλά και η πιθανότητα τα δύο ενθέματα στη περίπτωση του δυαδικού πλασμιδιακού φορέα, αυτό με το επιθυμητό προς εισαγωγή γονίδιο και αυτό με το γονίδιο ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό, να ενσωματωθούν σε ομόλογα χρωμοσώματα και σε γειτονικές θέσεις, με συνέπεια να μην είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους ούτε μέσω των χιασμάτων της μείωσης. Στην πράξη, τέτοιου είδους ενσωμάτωση έχει αποδειχθεί πολύ πιθανή. Γι' αυτούς τους λόγους αναπτύχθηκαν και άλλες μέθοδοι τροποποίησης των φυτών, που παρουσιάζονται στη συνέχεια.

2.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΕΓΧΥΣΗ

Έχουν αναφερθεί πολλές μέθοδοι που επιτρέπουν την απευθείας έγχυση ΓΤ DNA στον πυρήνα μεριστωματικών φυτικών κυττάρων, τόσο για δικοτυλήδονα όσο και για μονοκότυλα φυτά.

Αν αυτά τα κύτταρα τύχουν κατάλληλης μεταχείρισης και τελικά παράξουν ολόκληρα φυτά, ένα ποσοστό από αυτά θα είναι ΓΤ, αφού θα έχουν προέλθει από μεριστωματικά κύτταρα στα οποία όχι μόνο θα έχει ενσωματωθεί το ενθεματικό DNA, αλλά και τα συγκεκριμένα θα έχουν σταθεροποιηθεί ως προς την ιδιότητα του μετασχηματισμού. Η όλη τεχνική θεωρείται δύσκολη, αφού απαιτεί υψηλού κόστους εξοπλισμό για τη μεταχείριση μικρών κυτταρικών ομάδων, την εισαγωγή σε αυτά του ενθεματικού DNA υπό μορφή διαλύματος με μια τριχοειδή γυάλινη μικροπιπέττα και τη σταθεροποίηση των φυτικών κυττάρων κάτω από το μικροσκόπιο. Τα κύτταρα που έχουν γίνει αποδέκτες του ενθεματικού DNA, αναπτύσσονται σε κανονικά φυτά με τεχνικές ιστοκαλλιέργειας.

2.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΒΟΜΒΑΡΔΙΣΜΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Ο βομβαρδισμός σωματιδίων είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή μιας σειράς μεθόδων για το μετασχηματισμό φυτικών κυττάρων. Τον βασικό ρόλο παίζουν μικροσωματίδια, συνήθως από βαρέα μέταλλα, τα οποία περιβάλλονται από το ενθεματικό DNA. Τα τελευταία είναι τα σωματίδια που βομβαρδίζουν τα κύτταρα και εισάγουν το DNA στους πυρήνες τους. Τροποποιώντας την ταχύτητα και το μέγεθος των σωματιδίων, κύτταρα που βρίσκονται στα ενδότερα στρώματα των φυτικών ιστών μπορούν να αποτελέσουν στόχο.

Συνεπώς, αν βομβαρδιστούν μεριστωματικά κύτταρα και στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά αναπτυχθούν μέσα σε ιστοκαλλιέργεια, τότε ένα μέρος των

φυτών που θα παραχθούν θα είναι ΓΤ. Υπάρχουν αρκετοί τύποι «γενετικών πιστολιών» που χρησιμοποιούνται στο βομβαρδισμό. Η βασική αρχή είναι ότι μικροσωματίδια μεγέθους 4 μm από βολφράμιο επικαλύπτονται από το ενθεματικό DNA. Τα μικροσωματίδια αυτά προσαρμόζονται διαδοχικά πάνω σε ένα μεγαλύτερο σωματίδιο, το οποίο τελικά επιταχύνεται, με τη βοήθεια μιας κατασκευής που ομοιάζει με κάνη πιστολιού. Στην άκρη της κατασκευής υπάρχει ένα εμπόδιο που δεν επιτρέπει την εκτόξευση του μεγάλου σωματιδίου, ενώ μια οπή επιτρέπει την εκτόξευση μόνο μικροσωματιδίων που θα βομβαρδίσουν κατ' αυτόν τον τρόπο τα φυτικά κύτταρα.

Η μέθοδος φαίνεται να λειτουργεί ικανοποιητικά τόσο σε δικότυλα όσο και σε μονοκότυλα φυτά, δεδομένου ότι υπάρχουν επιτυχημένα παραδείγματα εφαρμογής της μεθόδου τόσο στον αραβόσιτο όσο και στο σιτάρι. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι: α) η έλλειψη ενός ικανοποιητικού συστήματος μεριστωματικής καλλιέργειας στα μονοκότυλα φυτά, που να μπορεί να βομβαρδιστεί για να προκύψουν διαγονιδιακά φυτά και β) ότι ο βομβαρδισμός μπορεί να αποδειχθεί καταστροφικός για πολλά από τα κύτταρα της καλλιέργειας⁵⁸.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι μετασχηματισμού πρωτοπλαστών με ενθεματικό DNA που βρίσκεται είτε σε γραμμική είτε σε ελικοειδή μορφή, η χημική και η ηλεκτρική μέθοδος. Η χημική μέθοδος επιτυγχάνεται με υψηλές συγκεντρώσεις της πολυαιθυλενογλυκόλης, η οποία ενεργοποιεί την πρόσληψη του ενθεματικού DNA από τα φυτικά κύτταρα (υπενθυμίζεται ότι οι πρωτοπλάστες δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα αλλά μόνο κυτταρική μεμβράνη). Η μέθοδος επιβαρύνει σημαντικά τα φυτικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τα ποσοστά τροποποιημένων κυττάρων που τελικά επιβιώνουν να είναι μικρότερα του 1% του αρχικού πληθυσμού κυττάρων.

Μια πιο αποδοτική και λιγότερο απαιτητική για τα κύτταρα μέθοδος είναι η ηλεκτροδιάτρηση. Με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται παλμοί

⁵⁸ Cymmins J., 1999, Evolutionary forces behind human infertility. *Nature* 397 (6720), pp 557-558

ηλεκτρικού ρεύματος, οι οποίοι διαπερνούν καλλιέργειες πρωτοπλάστων που βρίσκονται σε ένα διάλυμα, το οποίο περιέχει και το ενθεματικό DNA.

Οι παλμοί τροποποιούν τη φυσικοχημεία των συστατικών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των πρωτοπλάστων, δημιουργώντας μικρές οπές στην επιφάνεια αυτής, μέσα από τις οποίες διέρχονται τα ενθεματικά μόρια του DNA. Σε κάποιους πρωτοπλάστες το ενθεματικό DNA θα ενσωματωθεί τελικά στο γενωμικό DNA του πυρήνα και αφού τα γονίδια αναφοράς υποδηλώσουν την παρουσία τέτοιων πρωτοπλάστων, αυτοί αφήνονται να ανακάμψουν και να σχηματίσουν εκ νέου κυτταρικό τοίχωμα. Τα πλήρως δια-γονιδιακά φυτά θα προκύψουν από αυτούς τους μετασχηματισμένους πρωτοπλάστες. Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια πιο ήπια μέθοδος από τη χημική και εφόσον υπάρχουν καλλιέργειες πρωτοπλάστων, είναι δυνατή η απομόνωση πολλών κυτάρων, από τα οποία τελικά ένα μεγάλο ποσοστό αποτελεί σταθερά τροποποιημένα προϊόντα.

Ο όρος εφήμερη έκφραση χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις εκείνες όπου μόρια DNA που εισάγονται μέσα στο κύτταρο μεταφράζονται και μεταφράζονται, αλλά χωρίς να ενσωματωθούν ποτέ στο γενετικό υλικό του πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, η μεταγραφή και η μετάφραση γίνονται στο κυτταρόπλασμα και επειδή με την πάροδο του χρόνου το DNA αυτό αποσυντίθεται σταδιακά, η συγκεκριμένη έκφραση χαρακτηρίζεται ως εφήμερη. Αν το ενθεματικό DNA περιέχει γονίδια αναφοράς (γονίδια-μάρτυρες που κωδικοποιούν ένζυμα), με τη χορήγηση του κατάλληλου ενζυμικού υποστρώματος είναι δυνατόν να διαπιστωθεί αν το DNA εισήχθη στο πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα, αλλά και το χρώμα που θα διαμορφωθεί τελικά αποτελεί ένδειξη του βαθμού έκφρασης του γονιδίου.

Παραπάνω παρουσιάστηκαν οι βασικές αρχές της μεθοδολογίας της ΓΤ που αναπτύχθηκαν αρχικά κατά τη δεκαετία του '70. Ωστόσο, στα χρόνια που ακολούθησαν, η εφαρμογή τους αποκάλυψε όλα τα προβλήματα αναφορικά με την τυχαία ενσωμάτωση του ενθέματος στο χρωμοσωμικό DNA, καθώς και της διασποράς με τη γύρη των σταθερά ενσωματωμένων ενθεματικών γονιδίων. Προκειμένου να ξεπεραστούν τα προαναφερόμενα

προβλήματα αναζητήθηκαν εναλλακτικές μέθοδοι ΓΤ. Η νέα τάση είναι η ενσωμάτωση του ενθέματος στο DNA του χλωροπλάστη.

2.5 ΑΜΕΣΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA

Η μεταφορά ξένου DNA σε φυτικά κύτταρα δηλαδή ο μετασχηματισμός (transformation) των φυτικών κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους βιολογικούς, φυσικούς ή χημικούς τρόπους, όπως:

1. Μεταφορά γονιδίων μέσω του αγροβακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*.
2. Μεταφορά με ηλεκτροχημικές μεθόδους.
3. Το γενετικό υλικό που εισάγεται μπορεί να είναι:
4. γονίδια από φυτά του ίδιου ή άλλου είδους
5. γονίδια από άλλους οργανισμούς (π.χ. βακτήρια, ζώα)
6. αντί-νοσηματικές αλληλουχίες (αλληλουχίες DNA που είναι αντίστροφες των αλληλουχιών ενός κανονικού γονιδίου και όταν εισέλθουν στο κύτταρο καταστέλλουν την δράση του κανονικού γονιδίου).

Οι βιολογικοί τρόποι μεταφοράς γονιδίων σε φυτά για την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών εκμεταλλεύονται φυσικούς μηχανισμούς μεταφοράς γονιδίων σε φυτά. Ένας τέτοιος φυσικός μηχανισμός παρατηρείται στο βακτήριο εδάφους *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο προσβάλλει τραυματισμένα δικοτυλήδονα φυτά μεταφέροντας δικό του γενετικό υλικό στα χρωμοσώματα των φυτών προκαλώντας τους ένα είδος καρκίνου που ονομάζεται crown gall.

Το *Agrobacterium* περιέχει ένα ειδικό πλασμίδιο μεγέθους περίπου 200 kb (kb = αλληλουχία DNA που αποτελείται από 1000 ζευγάρια βάσεων), το οποίο ονομάζεται Tι πλασμίδιο και έχει την ιδιότητα να μετασχηματίζει τα

φυτικά κύτταρα (δηλαδή εισάγει το DNA του στο γονιδίωμα των κυττάρων). Η διαδικασία μετασχηματισμού μοιάζει με τη βακτηριακή σύζευξη κατά την οποία μεταφέρεται γενετικό υλικό από ένα βακτήριο σε ένα άλλο με την μεταφορά πλασμιδίων.

Το πλασμίδιο δεν μεταφέρεται ολόκληρο στα φυτικά κύτταρα αλλά μόνο μια περιοχή (μήκους περίπου 20 kb) του T_i πλασμιδίου, η οποία ονομάζεται T-DNA (Transfer DNA) μεταφέρεται στον πυρήνα των κυττάρων και είναι υπεύθυνη για την δημιουργία όγκου.

Επομένως, το T_i πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας φυσικός φορέας (vector) μεταφοράς και έκφρασης ξένων γονιδίων σε φυτικά κύτταρα. Το T_i πλασμίδιο περιέχει τα εξής βασικά τμήματα:

1. Το τμήμα T-DNA που έχει στα άκρα του δύο οριακές αλληλουχίες 23 βάσεων η καθεμία (T border sequences). Είναι το τμήμα που μεταφέρεται στον πυρήνα του ξενιστή και περιέχει γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή αυξητικών φυτοορμονών (αυξίνη, κυτοκίνη), οι οποίες προκαλούν ανεξέλεγκτες κυτταρικές διαιρέσεις με αποτέλεσμα την δημιουργία όγκου. Επίσης υπάρχουν γονίδια για την παραγωγή οπινών (όπως αγροπίνη, οκτοπίνη), οι οποίες είναι παράγωγα αμινοξέων και χρησιμοποιούνται από τα αγροβακτήρια ως πηγή άνθρακα, αζώτου, φωσφόρου και ενέργειας. Τα φυσιολογικά κύτταρα του ξενιστή δεν παράγουν ούτε μπορούν να μεταβολίσουν τις οπίνες αλλά η βακτηριακή μόλυνση αλλάζει τον μεταβολισμό του φυτού έτσι ώστε να συντίθενται οι ουσίες αυτές που χρησιμοποιούνται μόνο από τα βακτήρια.
2. Το τμήμα της «μολυσματικότητας» (virulence) που περιέχει τα vir γονίδια. Οι πρωτεΐνες Vir που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά, είναι υπεύθυνες για την αποκοπή του T-DNA και την μεταφορά του στο χρωμόσωμα του φυτικού κυττάρου, όπου ενσωματώνεται σε τυχαίες θέσεις.

3. Το τμήμα που περιέχει γονίδια για τον καταβολισμό των σπινών.

Επομένως το *Agrobacterium tumefactions* μπορεί να θεωρηθεί ως ένα φυτικό παράσιτο που χρησιμοποιεί γενετική μηχανική για να δημιουργήσει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του⁵⁹.

Ο φυσικός μηχανισμός μεταφοράς γενετικού υλικού σε φυτικά κύτταρα από τα αγροβακτήρια χρησιμοποιείται για την κατασκευή διαγονιδιακών φυτών (φυτών που περιέχουν ξένο γενετικό υλικό) αφού γίνουν οι κατάλληλες γενετικές επεμβάσεις ώστε να εισαχθούν τα ξένα γονίδια⁶⁰.

Κατ' αρχήν τα λοιμογόνα γονίδια της περιοχής T-DNA αφαιρούνται ή «παροπλίζονται» και τοποθετούνται ανάμεσα στις οριακές αλληλουχίες του T-DNA τα ξένα γονίδια που θα μεταφερθούν από το βακτήριο στο πυρήνα των φυτικών κυττάρων.

Η μεταφορά όμως DNA σε ένα κύτταρο ακόμη και στον πυρήνα δεν σημαίνει υποχρεωτικά ότι θα οδηγήσει στην έκφραση του δηλαδή στην σύνθεση της πρωτεΐνης για την οποία περιέχει την πληροφορία. Για να γίνει η έκφραση του γονιδίου πρέπει να περιέχονται στην αλληλουχία του και ρυθμιστικές περιοχές που αναγνωρίζονται από τον κυτταρικό μηχανισμό του δέκτη. Τέτοιες περιοχές είναι οι υποκινητές (promoters) που αναγνωρίζονται από την RNA πολυμεράση, το ένζυμο που καταλύει την μεταγραφή του DNA σε RNA και οι ενισχυτές (enhancers) που αναγνωρίζονται από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του πυρήνα και ενισχύουν την μεταγραφή.

Πρέπει στη συνέχεια, τα mRNA που θα σχηματιστούν να αναγνωρίζονται από τα ριβοσωμάτια που είναι υπεύθυνα για την μετάφραση των μεταγραφών σε πρωτεΐνες. Τέλος πρέπει οι πρωτεΐνες που θα συντεθούν να είναι λειτουργικές στο κατάλληλο τμήμα του φυτού. Οι

⁵⁹ Λεκανίδου Ρ (1996) Διαγονιδιακοί Οργανισμοί, Ειδικά Κεφάλαια Μοριακής Βιολογίας Ενότητα 111, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας

⁶⁰ Hooykaas PJJ, Schilperoot R (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38

μηχανισμοί αυτοί δεν είναι ίδιοι στους προκαρυωτικούς οργανισμούς (που δεν διαθέτουν πυρήνα, όπως τα βακτήρια) και στους ευκαρυωτικούς (που διαθέτουν πυρήνα όπως τα φυτά και τα ζώα). Όμως, μία πρωτεΐνη, ακόμη και ζωϊκή, μπορεί να συντεθεί σε ένα φυτό με την προϋπόθεση ότι η αλληλουχία που την κωδικοποιεί περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες που επιτρέπουν την έκφραση της στα φυτικά κύτταρα.

Επομένως, πρέπει να συντεθεί *in vitro* ένα γονίδιο που εκτός από την κωδικοποιούσα αλληλουχία (αυτή που θα μεταφραστεί σε πρωτεΐνη και μπορεί να είναι βακτηρίασης, φυτικής ή ζωικής προελεύσεως) θα περιέχει και τις κατάλληλες ρυθμιστικές αλληλουχίες που θα επιτρέπουν την έκφραση του στα φυτικά κύτταρα.

Μία άλλη βασική προϋπόθεση για την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών είναι το μεταφερόμενο DNA να ενσωματωθεί σε ένα από τα χρωμοσώματα του φυτικού κυττάρου ώστε να αναπαράγεται με τον μηχανισμό του κυττάρου και να μεταφέρεται και στα θυγατρικά κύτταρα κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Έτσι προκύπτει ένα διαγονιδιακό φυτό όπου το ξένο γονίδιο υπάρχει σε όλα τα φυτικά κύτταρα. Επομένως απαιτείται η δημιουργία ενός ολόκληρου φυτού από ένα κύτταρο που έχει αρχικά μετασχηματιστεί.

Τέλος, η μεταφορά δεν είναι ποτέ 100% επιτυχής. Πρέπει να ανιχνευτούν από όλα τα φυτά που αναγεννήθηκαν ποια είναι διαγονιδιακά. Αν η έκφραση του διαγονιδίου δεν είναι αρκετή για να εντοπιστούν τα διαγονοδιακά φυτά τότε πρέπει να μεταφέρεται μαζί με το γονίδιο και ένα γονίδιο-δείκτης αναγνώρισης που χρησιμεύει για την αναγνώριση των φυτών που έχουν ενσωματώσει και εκφράζουν το ξένο γενετικό υλικό.

Τα διαγονοδιακά φυτά επιλέγονται με βάση την έκφραση του γονιδίου αυτού. Τα πιο συνηθισμένα γονίδια-δείκτες είναι γονίδια που δίνουν ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό.

Πίνακας 8 Απαραίτητες αλληλουχίες που πρέπει να φέρει το «ξένο» DNA που μεταφέρεται

Απαραίτητες αλληλουχίες που πρέπει να φέρει το «ξένο» DNA που μεταφέρεται	Παράδειγμα
<p>Έναν ισχυρό υποκινητή</p> <p>Την κωδικοποιούσα αλληλουχία που θα δώσει την επιθυμητή νέα ιδιότητα στο φυτό</p> <p>Ένα γονίδιο-δείκτη αναγνώρισης</p>	<p>Ο υποκινητής CaMV 35S (του ιού της μωσαϊκής του κουνουπιδιού)</p> <p>Γονίδιο EPSPS που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνο</p> <p>Γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό</p>

Αφού κατασκευαστεί *in vitro* το ξένο DNA, που θα περιέχει όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την δράση του, όπως φαίνονται στον παραπάνω Πίνακα, τοποθετείται στο T-DNA του αγροβακτηρίου.

Κατά την μόλυνση των φυτών με *Agrobacterium* μεταφέρεται το T-DNA και ενσωματώνεται στα χρωμοσώματα των φυτικών κυττάρων όπου κληρονομείται σταθερά στα επόμενα κύτταρα. Το νέο γονίδιο εκφράζεται και προσδίδει τις επιθυμητές ιδιότητες στα διαγονιδιακά φυτά που προκύπτουν.

Συνοπτικά, η επιτυχία της κατασκευής διαγονιδιακών φυτών εξαρτάται από πολλές συνθήκες που πρέπει να ισχύουν ταυτόχρονα:

- διείσδυση του ξένου DNA στα φυτικά κύτταρα
- ενσωμάτωση στο γονιδίωμα των φυτικών κυττάρων
- δυνατότητα των διαγονιδίων να εκφραστούν στον ξενιστή

- επιλογή και δημιουργία ολόκληρων φυτών από κύτταρα που έχουν γενετικά τροποποιηθεί.

Το 1983 όλες αυτές οι συνθήκες μπόρεσαν να εκπληρωθούν ταυτόχρονα με την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καπνού που εξέφραζαν ένα γονίδιο που τους προσέδιδε ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό την καναμυκίνη⁶¹.

Το φυσικό σύστημα μεταφοράς γονιδίων σε φυτικά κύτταρα με το αγροβακτήριο έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για τον μετασχηματισμό δεκάδων ειδών δικοτυλήδων φυτών (καπνός, πατάτες κ.λπ.). Ένα όμως βασικό μειονέκτημα του *Agrobacterium* είναι ότι δεν προσβάλλει εύκολα τα μονοκοτυλήδωνα φυτά μεγάλης οικονομικής σημασίας (δημητριακά, ρύζι, κ.λπ.). Πρόσφατα, βρέθηκε κάποιο στέλεχος του αγροβακτηρίου που μπόρεσε να δώσει διαγονιδιακά φυτά ρυζιού⁶².

Παράλληλα με τις έρευνες στα αγροβακτήρια, μελετήθηκε και η μεταφορά DNA σε κύτταρα με μεθόδους χημικές, φυσικές ή ηλεκτρικές. Οι μέθοδοι αυτοί είχαν αποδειχτεί αποτελεσματικές στην μεταφορά γενετικού υλικού σε ζωικά κύτταρα και δοκιμάστηκαν για την μεταφορά επίσης σε φυτικά κύτταρα χωρίς το κυτταρικό τους τοίχωμα, τους πρωτοπλάστες (από τα κύτταρα αυτά έχει αφαιρεθεί με ειδικές κυτταροκινάσες το «σκληρό» κυτταρικό τους τοίχωμα που αποτελείται από κυτταρίνη και έχει παραμείνει μόνο η κυτταρική μεμβράνη).

⁶¹ Herrera-Estrella I, Deblock M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J, (1983) Chimeric genes at dominant selectable markers in plant cells, *EMBO J* 2:987-995

Zambrynski P, Joss H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J, (1983) *Ti* plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity, *EMBO J* 2:2143-215

⁶² Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza Sativa* L) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant Journal* 6:271- 282

Με αυτές τις τεχνικές επιτυγχάνεται η μεταφορά γενετικού υλικού στον πυρήνα των κυττάρων και έκφραση του δηλαδή παραγωγή της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί με την προϋπόθεση βέβαια πάντοτε ότι τα γονίδια μπορούν να εκφραστούν στο κύτταρο δέκτη. Με τις μεθόδους αυτές προέκυψαν τα πρώτα μονοκυτλήδονα διαγονιδιακά φυτά.

Γενετικό υλικό μπορεί να μεταφερθεί σε πρωτοπλάστες φυτικών κυττάρων με μικροενέσεις, ή βομβαρδισμό σωματιδίων με ειδικά πιστόλια (gene guns) ή με την τεχνική της ηλεκτροπόρωσης. Οι μέθοδοι αυτές είναι οικονομικές αλλά είναι απαραίτητο οι πρωτοπλάστες να έχουν τη δυνατότητα να αναγέννιουνται σε ολόκληρα φυτά.

Σύμφωνα με την τεχνική της ηλεκτροπόρωσης (electro poration), μίγμα πρωτοπλαστών και πλασμιδιακού DNA υφίσταται ηλεκτρικούς παλμούς. Η υψηλή ένταση καθιστά τις κυτταρικές μεμβράνες των φυτικών κυττάρων διαπερατές σε μεγάλα μόρια και έτσι μπαίνουν στα κύτταρα τα πλασμιδιακά μόρια DNA. Τα φυτικά κύτταρα στην συνέχεια επανασυνθέτουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και εξελίσσονται σε βιώσιμα μετασχηματισμένα κύτταρα που εκφράζουν το πλασμιδιακό DNA που έχουν.

2.5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

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 και να απομονωθεί (DNA extraction). Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA⁶³.

⁶³ Gachet, E., Martin, GG, Vigneau, F and Meyer, G. (1999) Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available, Trends in Food Science and technology 9:380-388

1. Τεμαχισμός του DNA με περιοριστικά ένζυμα: Τα τμήματα του DNA αποδιατάσσονται (αποχωριστούν οι δύο έλικες) με θέρμανση, διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος.
2. Από την πλάκα ηλεκτροφόρησης οι ζώνες με τα τμήματα του DNA μεταφέρονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διατηρώντας τις ίδιες θέσεις.
3. Στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται ραδιοσημασμένος ανιχνευτής ο οποίος υβριδοποιείται με το συμπληρωματικό του τμήμα DNA και η θέση του υβριδίου εντοπίζεται με αυτοραδιογραφία.

Η μέθοδος CTAB, επίσημη μέθοδος για την ανίχνευση GMOs στην Γερμανία, η οποία χαρακτηρίζεται από τα εξής βήματα:

- Διαλυτοποίηση του DNA με προσθήκη διαλύματος που περιέχει το απορρυπαντικό CTAB σε τελική συγκέντρωση 20g/L.
- Αποικοδόμηση των περισσότερων πρωτεϊνών που περιέχονται στο δείγμα.
- Πρώτη καθίζηση του DNA με το δεύτερο διάλυμα CTAB (σε τελική συγκέντρωση μικρότερη από 5 g/L).
- Δεύτερη αποικοδόμηση των υπολειπόμενων πρωτεϊνών.
- Δεύτερη καθίζηση του «καθαρού» DNA με προσθήκη αλκοόλης.

Η μέθοδος Wizard που ακολουθεί 3 βήματα (αποτελεί την επίσημη μέθοδο που εφαρμόζεται στην Ελβετία):

- Διαλυτοποίηση του DNA με προσθήκη ενός διαλύματος απομόνωσης και πρωτεϊνάσης K (ένα ένζυμο που αποικοδομεί τις πρωτεΐνες με μη ειδικό τρόπο κόβοντας τον ομοιοπολικό δεσμό που συνδέει τα αμινοξέα).

- Το ακάθαυτο DNA τρέχει μέσα από μία κολώνα που περιέχει μία ρητίνη που έχει υψηλή συγγένεια για μόρια DNA και τα δεσμεύει.
- Το «καθαρό» DNA εκλύεται από την ρητίνη και απομονώνεται.

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 GMOs⁶⁴:

- 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).
- Γονίδια-δείκτες αναγνώρισης: Ακολουθούν το διαγονίδιο σε όλη την διαδικασία γενετικής τροποποίησης γιατί επιτρέπουν την επιλογή των διαγονιδιακών φυτών από τα μη διαγονιδιακά. Είναι συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή ζιζανιοκτόνα.
- Τα διαγονίδια: Τα γονίδια που εισάγονται στο φυτό με σκοπό να του δώσουν μία επιθυμητή ιδιότητα. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την φωσφινοθρισίνο-ακετυλοτρανσφεράση που δίνει ανθεκτικότητα σε ορισμένα ζιζανιοκτόνα, ή το γονίδιο *cryIA(b)* που κωδικοποιεί μία δ-ενδοτοξίνη ειδική για ορισμένα είδη εντόμων, τα οποία υπάρχουν σε φυτά που κυκλοφορούν στην Ευρωπαϊκή αγορά.

⁶⁴ Gachet, E., Martin, GG, Vigneau, F and Meyer, G. (1999) Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available, Trends in Food Science and technology 9:380-388

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 9. αναφέρονται οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται και οι αλληλουχίες-στόχοι για την ανίχνευση ορισμένων γονιδίων που περιέχονται σε γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα.

Πίνακας 9 Οι Εκκινητές και οι Αλληλουχίες – Στόχοι για τις Δοκιμασίες Ανίχνευσης Γενετικά Τροποποιημένης Σόγιας και Καλαμπόκιου

Δοκιμασία	Εκκινητές	DNA αλληλουχία-στόχος	Μέγεθος PCR προϊόντος
"Roundup Ready" σόγια	RR01/RR02	EPSPS γονίδιο	508 bp
	RR04/RR05	EPSPS γονίδιο	179 bp
	GM05/GM09	EPSPS γονίδιο	447 bp
	GM07/GM08	EPSPS γονίδιο	169 bp
	P35s-f2/petu-r1	EPSPS γονίδιο	171 bp
"Maximizer" καλαμπόκι			420 bp
	CRYIA1/CRYIA2	Γονίδιο ενδοτοξίνης	189 bp
	CRYIA3/CRYIA4	Γονίδιο ενδοτοξίνης	211 bp
	Cry03/Cry04	Γονίδιο ενδοτοξίνης	

Πηγή: Gachet, E., Martin, GG, Vigneau, F and Meyer, G. (1999) Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available, Trends in Food Science and technology 9:380-388

Όπως φαίνεται EPSPS που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο RoundUp, μπορεί να γίνει με διάφορα ζεύγη εκκινητών. Η ανίχνευση αυτή είναι κατάλληλη για την RoundUp Ready γενετικά τροποποιημένη σόγια της εταιρίας Monsanto.

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR είναι επίσης απαραίτητο να γίνουν πολλαπλοί έλεγχοι της ίδιας της τεχνικής. Αυτοί οι έλεγχοι συνήθως περιλαμβάνουν τα «θετικά κοντρόλ» 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 συναντάτε στο τρόφιμο υπό ανάλυση είτε είναι γενετικά τροποποιημένο είτε όχι, όπως π.χ. το γονίδιο που κωδικοποιεί την αζαΐνη ή την ινβερτάση, πρωτεΐνες που χαρακτηρίζουν το καλαμπόκι (διαγονιδιακό και μη). Η δοκιμασία θα πρέπει να δώσει θετικό αποτέλεσμα σε οποιοδήποτε δείγμα καλαμποκιού, 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.

Αντίστοιχα για την σόγια, ανιχνεύεται το γονίδιο της λεκτίνης που υπάρχει και στην διαγονιδιακή και στην μη διαγονιδιακή σόγια.

Το «αρνητικό κοντρόλ» 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 μία τέτοια δοκιμασία δώσει θετικό αποτέλεσμα, τότε σημαίνει ότι υπάρχει κάπου μόλυνση στα αντιδραστήρια ή στα διαλύματα που χρησιμοποιούνται.

Επίσης, μπορεί να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα, το DNA υπό ανάλυση να μην πολλαπλασιαστεί επαρκώς, εάν είναι αρκετά κατεστραμμένο. Τότε, στο αποτέλεσμα της πρώτης PCR, εφαρμόζεται μία δεύτερη PCR, με άλλους

συμπληρωματικούς εκκινητές, ειδικούς για την αλληλουχία DNA που είναι υπό πολλαπλασιασμό. 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:

Πλεονεκτήματα Ανίχνευσης DNA

- Οι πρωτεΐνες καθώς είναι θερμό-ευαίσθητα μόρια, αποικοδομούνται με την επεξεργασία των τροφίμων και δεν μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν. Το DNA απεναντίας καταστρέφεται ελάχιστα με την 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 GMO 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 είναι παρούσα 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 την μέθοδο PCR, όπως προϊόντα καλαμποκιού (αλεύρι, πάστα, φύτρα, δημητριακά από αλεύρι, ποπκόρν,

πατατάκια αλευριού, γλυκίσματα) και προϊόντα σόγιας (φασόλια σόγιας, κρέμα ή γάλα σόγιας, τοφού, προϊόντα «κρέατος» σόγιας, λεκιθίνη σόγιας και ακόμη λάδι σόγιας σε ορισμένες περιπτώσεις που δεν έχει υποστεί 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 104-310 ΕΥΡΩ ανά τεστ σε σχέση με περίπου 10 ΕΥΡΩ ανά τεστ της ELISA)⁶⁵.

2.5.2.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

1. Η ιδιότητα του γενετικού κώδικα να είναι γενικευμένος σε όλα τα είδη επιτρέπει την εισαγωγή «ξένου» γενετικού υλικού προερχόμενο από οποιοδήποτε οργανισμό (ιό, βακτήριο, μύκητα, φυτό, ζώο), σε φυτά και την έκφρασή του. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ενσωμάτωση μιας νέας γενετικής πληροφορίας (ενός γονιδίου δηλαδή) σε ένα φυτό με σκοπό να του προσδώσει μια νέα ιδιότητα.
2. Αφού γίνει η επιλογή και η απομόνωση ενός κατάλληλου γονιδίου από κάποια πηγή με τις μεθόδους του ανασυνδυασμένου DNA, το γονίδιο αυτό πρέπει να μεταφερθεί στα φυτικά κύτταρα για να ενσωματωθεί στο γονιδίωμά τους και να εκφραστεί για να δώσει στο φυτό μία νέα

⁶⁵ European Commission (2000e), Economic Impacts of Genetically Modified Grops on the Agri-Food sector, chapter 5: Markets: Segregation, Identity Preservation and Labeling, <http://europa.eu.int/comm/dg06/publi/gmolfullrep/ch5.htm>

επιθυμητή ιδιότητα (όπως παραγωγή βιο-εντομοκτόνου, ή αντοχή σε ζιζανιοκτόνο, ή νέα βελτιωμένη διατροφική αξία, κ.α.).

3. Οι τρόποι μεταφοράς γονιδίων σε φυτά για την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών είτε: α) εκμεταλλεύονται φυσικούς μηχανισμούς μεταφοράς γονιδίων σε φυτά, όπως παρατηρείται στο βακτήριο εδάφους *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο προσβάλλει τραυματισμένα δικοτυλήδονα μεταφέροντας τους ένα τμήμα από το πλασμίδιο που περιέχει, είτε β) είναι χημικές, φυσικές ή ηλεκτρικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στους πρωτοπλάστες (κύτταρα όπου έχει αφαιρεθεί το «σκληρό» κυτταρικό τους τοίχωμα και έχει παραμείνει μόνο η κυτταρική μεμβράνη). Γενετικό υλικό μπορεί να μεταφερθεί σε πρωτοπλάστες φυτικών κυττάρων με μικροενέσεις, ή βομβαρδισμό σωματιδίων με ειδικά πιστόλια (gene guns) ή με την τεχνική της ηλεκτροπόρωσης.
4. Στην αυξανόμενη ανάγκη να αναπτυχθούν κατάλληλες μέθοδοι για την αποτελεσματική ανίχνευση των τροφίμων εκείνων που περιέχουν συστατικά από γενετικά τροποποιημένα φυτά, δηλαδή για την ανίχνευση της «ξένης» γενετικής πληροφορίας (των ξένων DNA αλληλουχιών) εφαρμόζεται η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (ή PCR = Polymerase Chain Reaction), η οποία αναπαράγει σε μεγάλες ποσότητες και με μεγάλη ταχύτητα μία συγκεκριμένη μικρή αλληλουχία DNA που βρίσκεται μέσα σε ένα πολύπλοκο μίγμα και έτσι επιτρέπει την ανίχνευσή του.

2.6.ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΤ-ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

Ο κίνδυνος αυτός αφορά τις διαγονιδιακές καλλιέργειες που φέρουν το γονίδιο Bt, όπως οι καλλιέργειες Bt-καλαμποκιού που καταλαμβάνουν ιδιαίτερα μεγάλη έκταση στις ΗΠΑ. Οι καλλιέργειες αυτές είναι εντομοανθεκτικές

εφόσον παράγουν την τοξίνη Bt που εξοντώνει επιλεκτικά ορισμένα είδη εντόμων, όπως το European corn borer (*Ostrinia nubilalis*).

Εργαστηριακές μελέτες αλλά και πρόσφατες ενδείξεις από καλλιέργειες Bt φυτών σε πεδία έχουν δείξει ότι η εντατική καλλιέργεια Bt φυτών μπορεί να οδηγήσει στην εξελικτική επιλογή και επικράτηση στελεχών εντόμων ανθεκτικών στην τοξίνη Bt⁶⁶. Τα στελέχη των εντόμων αυτών υφίστανται μία τυχαία μετάλλαξη σε κάποιο γονίδιο το οποίο τους προσδίδει ανθεκτικότητα στην τοξίνη Bt.

Η δημιουργία ανθεκτικών εντόμων σε εντομοκτόνα είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει σε μεγάλη έκταση σε όλες τις περιοχές της γης. Υπολογίζεται ότι πάνω από 500 είδη αρθροπόδων έχουν δημιουργήσει ανθεκτικότητα σε ένα ή περισσότερα εντομοκτόνα⁶⁷. Η δημιουργία Bt-ανθεκτικών εντόμων σε μεγάλη κλίμακα μπορεί να οδηγήσει στην αχρήστευση του Bt ως εντομοκτόνου (το οποίο παράγεται από φυσική πηγή και θεωρείται ότι «σέβεται» περισσότερο το περιβάλλον) και στην αναπόφευκτη εφαρμογή πιο δραστικών και ίσως περισσότερο επιβλαβών χημικών εντομοκτόνων.

Ένας τρόπος να αντιμετωπιστεί ο κίνδυνος της δημιουργίας Bt-ανθεκτικών εντόμων είναι να δημιουργηθεί γύρω από την καλλιέργεια Bt φυτών, μια περιοχή με μη Bt ίδια φυτά (φυτά φυσικού τύπου δηλαδή "wild type") με σκοπό να λειτουργεί ως «καταφύγιο γονιδίων» (gene refuge). Εάν υπάρξουν έντομα που δεν θα εξοντωθούν από την Bt τοξίνη και επιβιώσουν στις Bt

⁶⁶ Shelton AM & Zhao JZ (2000), Insect resistance and the future of Bt transgenic plants, Information Systems for Biotechnology News Report, May 2000, <http://www.isb.vt.edu> deMaagd, RA, Bosch D, Stiekema W (1999) Bacillus thuringiensis toxin-mediated insect resistance in plants, Trends in Plant Science, 4:9-13

⁶⁷ Shelton AM & Zhao JZ (2000), Insect resistance and the future of Bt transgenic plants, Information Systems for Biotechnology News Report, May 2000, <http://www.isb.vt.edu>

καλλιέργειες, θα διασταυρωθούν με τα πολυάριθμα μη ανθεκτικά έντομα που θα συχνάζουν στις καλλιέργειες που δεν παράγουν Bt τοξίνη.

Ο στόχος είναι τα έντομα που φέρουν τα γονίδια της ανθεκτικότητας που πιθανόν να προκύψουν, να διασταυρωθούν με τα μη ανθεκτικά έντομα και έτσι τα γονίδια ανθεκτικότητας να «πνιγούν» σε μια μεγαλύτερη δεξαμενή γονιδίων μη-ανθεκτικότητας⁶⁸.

Για τον λόγο αυτό στις ΗΠΑ επιβάλλεται από την EPA (Environmental Protection Agency ή Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας) ειδικό πρόγραμμα «καταφυγίου» στις Bt καλλιέργειες για την αποφυγή δημιουργίας ανεπιθύμητης ανθεκτικότητας (resistance management plans). Το καταφύγιο θεωρείται ότι πρέπει να καταλαμβάνει ένα ποσοστό 20-40% της συνολικής Bt καλλιέργειας.

Η αποτελεσματικότητα του «καταφυγίου» βασίζεται στην αρχή ότι το γονίδιο της Bt ανθεκτικότητας είναι υπολειπόμενο και επομένως δεν θα εκφράζεται στα έντομα που έχουν προέλθει από την διασταύρωση Bt-ανθεκτικών και μη ανθεκτικών εντόμων. Πρόσφατες έρευνες όμως έχουν δείξει ότι σε εργαστηριακές συνθήκες το γονίδιο της ανθεκτικότητας κληρονομείται ως ατελώς επικρατές αυτοσωμικό γονίδιο. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η εμφάνιση ή μη της ανθεκτικότητας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όπως το είδος των εντόμων που εξετάζονται και ο τύπος της Bt-τοξίνης. Η χρήση των «καταφυγίων», επομένως, θα πρέπει να γίνεται σε συνδυασμό και με εναλλακτικές στρατηγικές.

⁶⁸ Butler, D, Reichhardt, T, Abbot, A, Dickson, D and Saegusa, A (1999) Long-term effects of GM crops serves up food for thought, *Nature* 398:651-656

Τέλος ενδεικτικό για τη σημασία που δίνεται στην λύση των καταφυγίων είναι το γεγονός ότι η εταιρία Novartis ξόδεψε περίπου 250.000 δολάρια στην έρευνα "Bt-ανθεκτικότητας" το 1997⁶⁹.

Μία άλλη στρατηγική για την καταπολέμηση του προβλήματος της δημιουργίας Bt ανθεκτικότητας είναι η εισαγωγή γονιδίων διαφορετικών Bt τοξινών στα φυτά. Σε καλλιέργειες φυτών που παράγουν διαφορετικές Bt τοξίνες, είναι πολύ πιο δύσκολο να προκύψουν έντομα ανθεκτικά για όλες τις τοξίνες.

Παρόλα αυτά η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής δεν είναι εγγυημένη εφόσον μπορεί να παρατηρηθεί δημιουργία ανθεκτικότητας σε πολλαπλούς τύπους της Bt τοξίνης⁷⁰. Παράλληλα, μελετάται η χρήση εναλλακτικών γονιδίων εντομοτοξινών από άλλες πηγές, όπως αναστολείς πρωτεασών, λεκτίνες, αναστολείς α-αμυλάσης κ.α.⁷¹.

Προκειμένου να εφαρμοστεί ένα αποτελεσματικό πρόγραμμα για την αντιμετώπιση του προβλήματος της πιθανής δημιουργίας ανθεκτικών Bt-εντόμων από την χρήση Bt φυτών, είναι απαραίτητο να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί δημιουργίας ανθεκτικότητας και να γίνουν εφαρμογές των παραπάνω λύσεων σε μεγάλη κλίμακα και για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να μελετηθεί διεξοδικά το πρόβλημα.

⁶⁹ Wadman, M (1997b) Dispute over insect resistance to crops, Nature 388: 817

⁷⁰ Huang F, Buschman LL, Higgins RA, McGaughey WH (1999) Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (DIPΘI ES) in the European corn borer, Science 284: 965-967 , deMaagd, RA, Bosch D, Stiekema W (1999) *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants, Trends in Plant Science, 4:9-13

⁷¹ deMaagd, RA, Bosch D, Stiekema W (1999) *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants, Trends in Plant Science, 4:9-13

2.6.1. ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΤ ΤΟΞΙΝΗΣ ΣΕ ΎΕΝΤΟΜΑ ΜΗ ΣΤΟΧΟΥΣ

Ένας από τους οικολογικούς κινδύνους της απελευθέρωσης Βt γενετικά τροποποιημένων φυτών είναι οι απρόβλεπτες συνέπειες της τοξίνης Βt σε οργανισμούς (κυρίως αρθρόποδα) που δεν είναι βλαβεροί για τις καλλιέργειες και που ίσως είναι ακόμη και ωφέλιμοι για την γεωργία. Μια τέτοια επίδραση θα ήταν αιτία για διατάραξη της βιοποικιλότητας τα φυσικά οικοσυστήματα.

Μία πρόσφατη πολυσυζητημένη ανακοίνωση στο περιοδικό Nature (20-5-1999) στις ΗΠΑ αναφέρει ότι σε εργαστηριακές συνθήκες η γύρη Βt καλαμπόκι είχε αρνητικές επιδράσεις στην βιωσιμότητα της προνύμφης της όμορφης, ακίνδυνης και υπό προστασία πεταλούδας μονάρχης (*Danaus plexippus*).

Στο συγκεκριμένο πείραμα αναφέρεται 44% θνησιμότητα σε προνύμφες 3 ημερών που έλαβαν ως τροφή φύλλα milkweed με κόκκους γύρης Βt καλαμπόκιού⁷². Τα αποτελέσματα αυτά παρ' όλο που ακόμη και ο ίδιος ο ερευνητής παραδέχτηκε ότι θέλουν περισσότερη έρευνα, διόγκωσαν τις ήδη υπάρχουσες διαμαρτυρίες και επιφυλάξεις που υπάρχουν για την χρήση των Βt φυτών, διότι υπογραμμίζουν τον κίνδυνο της διαταραχής της βιοποικιλότητας⁷³.

Πολλοί επιστήμονες υποστηρίζουν ότι σε αντίθεση με τις εργαστηριακές συνθήκες, στο φυσικό περιβάλλον οι πιθανότητες να επηρεαστεί η πεταλούδα από τις Βt καλλιέργειες καλαμπόκιού είναι ελάχιστες και αυτό γιατί⁷⁴:

⁷² Losey, JE, Rayor LS, Carter ME (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae, Nature 399:214

⁷³ Hodgson, J (1999) uk interest groups take all sides of GM issue, Nature Biotechnology 17:630-631

⁷⁴ Mikesell I, (1999) BIO Food & Ag Press Release, June 10:Academic researchers and industry agree οπ Β! crop impact οπ monarch butterflies

1. Οι πεταλούδες μονάρχης προτιμούν να γεννούν σε φύλλα milkweed που σπάνια θα βρεθούν στη μέση μιας καλλιέργειας καλαμποκιού και αν βρίσκονται απλώς κοντά τότε οι πιθανότητες μεταφοράς της Bt γύρης στα φύλλα αυτά είναι πολύ μικρές (λόγω του σχετικού μεγάλου βάρους των κόκκων της γύρης του καλαμποκιού). Οι έρευνες σε φυτείες Bt καλαμποκιού δείχνουν μικρή συγκέντρωση κόκκων γύρης σε κοντινά φύλλα milkweed.
2. Η περίοδος επώασης των προνυμφών δεν συμπίπτει συνήθως χρονικά με την περίοδο που διασπείρεται η γύρη του καλαμποκιού (διάρκειας 7-10 ημερών).
3. Η δόση της γύρης του καλαμποκιού που συναντάται σε φυσικές συνθήκες στα φύλλα milkweed είναι κατά πάσα πιθανότητα μικρότερη από εκείνη που δόθηκε στο πείραμα.

Οι πιθανότητες να εκτεθούν οι πεταλούδες στην συγκεκριμένη Bt γύρη στην φύση θεωρούνται ελάχιστες. Όμως υπάρχει κοινή αντίληψη ότι οι έρευνες πρέπει να συνεχιστούν ώστε να γίνει μία πιο αντικειμενική εκτίμηση των κινδύνων και των ωφελειών των Bt καλλιεργειών.

2.6.2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΒΤ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Πολλοί επιστήμονες πλέον δέχονται ότι οι θετικές επιδράσεις της καλλιέργειας Bt καλαμποκιού, όπως η μείωση της χρήσης χημικών εντομοκτόνων που έχει ήδη παρατηρηθεί, είναι περισσότερο σημαντικές για πολλά είδη εντόμων, συμπεριλαμβανομένης και της πεταλούδας μονάρχης⁷⁵.

overblown, The Biotechnology Industry Organization:

<http://www.bio.org/food&ag/Bt061D.htm>

⁷⁵ Rice M (1999) Monarchs and Bt corn: Questions and answers, Integrated Crop Management, <http://www.ipm.iastate.edu/ipmlcm/1999/6-14-1999/monarchBt.htm/>

Παρατηρείται σε όλο και περισσότερες περιπτώσεις ότι η βιοποικιλότητα των εντόμων είναι καλύτερη σε καλλιέργειες Bt καλαμποκιού παρά σε καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται τα κλασσικά χημικά εντομοκτόνα⁷⁶.

Επίσης, ορισμένες έρευνες έδειξαν ότι ο μετασχηματισμός του καλαμποκιού με το γονίδιο Bt, ενισχύει την διατροφική ασφάλεια του σπόρου, καθιστώντας το λιγότερο ευάλωτο σε μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες (όπως τα γένη *Aspergillus* και *Fusarium* που παράγουν τις αφλατοξίνες και φουμονισίνες αντίστοιχα). Οι ισχυρές αυτές τοξίνες αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στις καλλιέργειες καλαμποκιού καθώς μπορεί να προκαλέσουν τον θάνατο ζώων αν περιέχονται σε ζωτροφές και έχουν επίσης πιθανά καρκινογόνα δράση στον άνθρωπο⁷⁷.

Η έρευνα από τις εταιρίες παραγωγής Bt καλαμποκιού έχει στραφεί προς την παραγωγή της νέας γενιάς Bt φυτών που θα εκφράζουν τα γονίδια Bt στα μέρη του φυτού που καταναλώνονται από τα συγκεκριμένα έντομα πάχους, όπως το corn coger που τρώει μόνο τα corn stalks, καθώς επίσης και να μην εκφράζονται στην γύρη. Μια τέτοια ποικιλία θα ελαχιστοποιούσε τους κινδύνους από την διασπορά της Bt γύρης σε έντομα μη-στόχους, ενώ θα διατηρούσε το πλεονέκτημα της αποφυγής των χημικών εντομοκτόνων.

⁷⁶ Food & Ag Biotech (1999), Backgrounder on Monarch Butterflies and Bt Crops, <http://www.bio.org/food&ag/monarch.htm>

⁷⁷ Thomson JA (2000), Report on GMOs at World Economic Forum, Information Systems for Biotechnology News Report, April 2000, <http://www.isb.vt.edu>, Munkvold GP, Desjardins AE (1997) Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Diseases*, 81 :556-565
Munkvold GP, Hellmich RL, Rice LG (1999) Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic B maize hybrids and non-transgenic hybrids, *Plant Diseases*, 83:130-138

Συνοπτικά, ο Πίνακας 10. παρουσιάζει τους περιβαλλοντικούς κινδύνους των Βt-φυτών, τις επιπτώσεις τους και την αντιμετώπισή τους.

Πίνακας 10 Πιθανοί Κίνδυνοι από Βt-Φυτά

Κίνδυνοι	Επιπτώσεις	Αντιμετώπιση
A. Δημιουργία Βt-ανθεκτικών εντόμων		
Η συνεχής έκθεση στην τοξίνη Βt που παράγουν ορισμένα γ.τ. φυτά μπορεί να οδηγήσει μέσω της φυσικής επιλογής στην επικράτηση στελεχών εντόμων ανθεκτικών στην τοξίνη αυτή.	Μπορεί να οδηγήσει στην μείωση της αποτελεσματικότητας της Βt τοξίνης ως φυσικό εντομοκτόνο και στην ανάγκη για εφαρμογή πιο δραστικών και ίσως περισσότερο επιβλαβών χημικών εντομοκτόνων	Κατασκευή καταφυγίων από μη Βt-φυτά γύρω από τις καλλιέργειες των Βt-φυτών. Εισαγωγή πολλών διαφορετικών γονιδίων τοξίνης Βt στα φυτά.
B. Επίδραση της Βt-τοξίνης σε έντομα μη-στόχους		
Πιθανές απρόβλεπτες επιδράσεις της τοξίνης Βt σε έντομα που δεν είναι επιβλαβή για την γεωργία	Διατάραξη της βιοποικιλότητας	Δημιουργία Βt-φυτών που εκφράζουν τα γονίδια Βt μόνο στα μέρη του φυτού που καταναλώνονται από τα συγκεκριμένα έντομα-στόχους και δεν εκφράζονται στη γύρη των φυτών.

2.6.3.ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΗ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ

Υπάρχουν επιφυλάξεις ότι η καλλιέργεια διαγονιδιακών φυτών, π.χ.σόγια, που είναι ανθεκτικά στην χρήση χημικών ζιζανιοκτόνων όπως το

Roundup θα οδηγήσει στην ανεξέλεγκτη αύξηση της χρήσης των χημικών αυτών ουσιών⁷⁸.

Υπενθυμίζεται ότι η γενετικά τροποποιημένη σόγια (της εταιρίας Monsanto) περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο ζιζανιοκτόνο Roundup (από τα πιο διαδεδομένα ζιζανιοκτόνα που παράγεται επίσης από την Monsanto), έτσι ώστε να μην επηρεάζεται από την χρήση του εν λόγω ζιζανιοκτόνου στις καλλιέργειες σόγιας. Ωστόσο, σύμφωνα με μία αναφορά που συντάχθηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, έχει παρατηρηθεί μείωση της χρήσης χημικών σε καλλιέργειες γενετικά τροποποιημένης σόγιας⁷⁹.

2.7.ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΥΓΕΙΑΣ

Ο τομέας της ανθρώπινης υγείας και ασφάλειας των τροφίμων είναι εξαιρετικά ευαίσθητος, κυρίως στην Ευρώπη που έχει υποφέρει από πολλά πρόσφατα σκάνδαλα (ασθένεια των τρελών αγελάδων, διοξίνες κ.λπ.) και η εμπιστοσύνη των πολιτών απέναντι στις αρχές και στους επιστήμονες δείχνει να έχει κλονιστεί. Τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα έχουν μπει στο στόχαστρο πολλών ευαισθητοποιημένων ομάδων (καταναλωτών, παραγωγών βιολογικών προϊόντων, οικολογικών οργανώσεων κ.α.) και κάθε εξέλιξη στον τομέα αυτό παρακολουθείται στενά.

⁷⁸ Wadman, M (1996) Genetie resistance spreads to consumers, Nature 383: 564

Kahn, A (1996) Analyse par la Commision du Genie Biomoleculaire des risques associes a la culture au champ des plantes transgeniques, Ιπ: "Les plantes transgeniques en agriculture-Dix ans d'experiences de la Commission du Genie Biomoleculaire", John Libbey Eurotext, 1996, P 43-47.

⁷⁹ European Commission (2000c), Economic Impacts of Genetically Modified Grops on the Agri-Food sector, chapter 3: Farmers: strong profitability expectations, mixed outcome

Πρωταρχικό ρόλο όμως στην διαμόρφωση της κοινής γνώμης παίζουν τα μέσα μαζικής ενημέρωσης που δεν διστάζουν να ενισχύσουν την φοβία του κόσμου με υπερβολικά δημοσιεύματα για τερατώδεις εφαρμογές της βιοτεχνολογίας και ανατριχιαστικούς κινδύνους που θα προκύψουν από την κατανάλωση των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων. Στην πραγματικότητα όμως εκείνο που λείπει είναι μία αντικειμενική ενημέρωση του κόσμου για τα οφέλη και τους πιθανούς κινδύνους της νέας τεχνολογίας.

Οι πιθανοί κίνδυνοι υγείας από την κατανάλωση σχετικά τροποποιημένων τροφών μπορεί να προκύψουν όταν τα «νέα» γονίδια ή τα προϊόντα τους καταλήξουν μέσω της τροφικής αλυσίδας στον άνθρωπο. Η επίδραση στην ανθρώπινη υγεία και ανάπτυξη των νέων πρωτεϊνών που προκύπτουν από την έκφραση των νεοεισαγόμενων γονιδίων στα φυτά, δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, αλλά είναι πιθανό ορισμένες από τις νέες πρωτεΐνες να έχουν αλλεργιογόνο δράση ή άλλες αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.

Μέχρι το τέλος του 2000 δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά κατά τα οποία η κατανάλωση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων είχε αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (εκτός από την περίπτωση αλλεργίας από τις πρωτεΐνες φυσικού-γνωστού αλλεργιογόνου- που είχαν εκφραστεί σε φυτά σόγιας). Βέβαια, κανείς δεν αμφισβητεί ότι το διάστημα κυκλοφορίας των προϊόντων αυτών στην αγορά είναι μικρό (περίπου 4-5 χρόνια) και ότι ακόμη είναι νωρίς για να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Επίσης, δεν έχουν γίνει ακόμη επιδημιολογικές μελέτες σε μεγάλη κλίμακα και για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Η ασθένεια των «τρελών αγελάδων» που έπληξε πρόσφατα την Ευρώπη, μας διδάξε ότι μπορεί σε κάποια τρόφιμα να μην ανιχνεύεται καθόλου εύκολα ο παράγοντας τοξικότητας και παράλληλα αυτό το τρόφιμο

να προκαλεί βλάβες στην υγεία οι οποίες να εκδηλώνονται μετά από μακρά χρονικά διαστήματα⁸⁰.

Επομένως, είναι σίγουρο ότι χρειάζεται συνεχής παρακολούθηση και έλεγχος των εφαρμογών της νέας τεχνολογίας, εφόσον φαίνεται πως η εξέλιξη είναι αναπόφευκτη και νέα γενετικά τροποποιημένα προϊόντα (και τα παράγωγά τους) κατακλύζουν σιγά-σιγά την αγορά.

Πίνακας 11 Πιθανοί Κίνδυνοι Υγείας

Κίνδυνοι	Περιγραφή Κινδύνου
Πρόκληση αλλεργιών	Οι νέες πρωτεΐνες που δημιουργούνται στα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα πιθανό να έχουν απρόβλεπτη αλλεργιογόνο δράση.
Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	Το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που φέρουν τα περισσότερα γ.τ. φυτά μπορεί να «περάσει» σε βακτήρια του πεπτικού συστήματος καθιστώντας τα πιο ανθεκτικά σε αντιβιοτικά
Απρόβλεπτοι	

Είναι χαρακτηριστικό ότι χιλιάδες επεξεργασμένα προϊόντα περιέχουν γενετικά τροποποιημένα συστατικά (π.χ.λεκιθίνη σόγιας σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής). Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι περίπου το 60% των επεξεργασμένων τροφίμων έχουν κάποιο συστατικό που έχει προέλθει από γενετικά τροποποιημένο φυτό⁸¹.

⁸⁰ Nature (1999) GM foods debate needs a recipe for restoring trust, Nature 398: 639

⁸¹ The Lancet (1999) Health Risks of Genetically Modified Foods, 353 (9167), 29 May 1999, <http://www.biotech-info.net/lancefJisks.htm/>

Συνοπτικά οι πιθανοί κίνδυνοι υγείας από την κατανάλωση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων αναφέρονται στον Πίνακα 3.5. και αναλύονται στις επόμενες παραγράφους.

2.7.1.ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΩΝ

Ορισμένες γενετικές επεμβάσεις στα φυτά όπως η εισαγωγή νέων γονιδίων που δεν προϋπήρχαν στο φυτό μπορεί να επηρεάσουν την αλλεργιογόνο δράση τους. Η εισαγωγή νέων γονιδίων σε ένα φυτό μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση νέων πρωτεϊνών οι οποίες όταν καταναλώνονται από ανθρώπους ή ζώα πιθανό να προκαλέσουν αλλεργίες.

Το πρόβλημα είναι σημαντικότερο όταν μεταφέρονται γονίδια πρωτεϊνών άγνωστης αλλεργικής δράσης. Η δυσκολία αφορά στο να καθοριστεί αν αυτές οι πρωτεΐνες είναι αλλεργιογόνες καθώς δεν υπάρχει μία γενικά αποδεκτή, καθιερωμένη διαδικασία για την πρόβλεψη της αλλεργικής δράσης μιας πρωτεΐνης⁸².

Παράδειγμα αποτελεί η εισαγωγή σε φασόλια σόγιας γονιδίου από φιστίκια Βραζιλίας που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη πλούσια σε θειούχα αμινοξέα, προκειμένου να αυξήσει την περιεκτικότητα της σόγιας σε θείο. Η πρωτεΐνη αυτή είναι βασικό αλλεργιογόνο των φιστικιών και βρέθηκε να διατηρεί την αλλεργιογόνο της δράση και στην σόγια (και για αυτό τον λόγο δεν προχώρησε η κυκλοφορία του προϊόντος στην αγορά).

Το πρόβλημα της αλλεργικότητας περιορίζεται όταν η πηγή των ξένων γονιδίων είναι γνωστή (όπως στις περισσότερες περιπτώσεις στα διαγονιδιακά φυτά) διότι τότε είναι σχετικά πιο εύκολο να γίνουν οι δοκιμασίες ανίχνευσης αλλεργικότητας. Εάν είναι γνωστή η αλλεργιογόνος δράση μιας

⁸² Astwood, JD, Leach, JN, Fuchs, RL (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro, *Nature Biotechnology* 1 0: 1269-1273

πρωτεΐνης που υπάρχει σε ένα γενετικά τροποποιημένο τρόφιμο μπορεί να επισημανθεί η παρουσία της με κατάλληλη σήμανση στην ετικέτα του τροφίμου και να αποφευχθεί η κατανάλωση της από τους ανθρώπους που πάσχουν από την συγκεκριμένη αλλεργία.

Γενικότερα, όμως, δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα είναι περισσότερο αλλεργιογόνες από ότι οι φυσικές πρωτεΐνες⁸³.

Παραμένει όμως και εδώ το πρόβλημα της αξιοπιστίας των υπαρχουσών μεθόδων εκτίμησης της αντιαλλεργικής ασφάλειας των τροφίμων. Ορισμένες επιστημονικές αναφορές ζητούν αναθεώρηση των διαδικασιών εκτίμησης της ασφάλειας των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων από τις αρχές των διαφόρων κρατών (π.χ.Καναδάς)⁸⁴. Επίσης, ορισμένοι επιστήμονες αμφισβητούν τις μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί από τις εταιρίες-παραγωγούς π.χ. από την εταιρία Monsanto για την απόδειξη της ασφάλειας της Roundup Ready σόγιας (που καλλιεργείται ευρύτατα στις ΗΠΑ) και ζητούν να διεξαχθούν περαιτέρω έρευνες από ανεξάρτητους μελετητές⁸⁵.

⁸³ Lehrer SB et al (1996) Why are some proteins allergenic?, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36: 553-564 , Metcalfe, 00 (1996) Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36: S165-S186

⁸⁴ Clark, EA (2000) Food Safety of GM crops in Canada: toxicity and allergenicity, <http://www.plant.uoguelph.ca/faculty/eclark/safety.html>

⁸⁵ Carman, J (1999) The problem with the safety of Roundup Ready Soybeans, http://www.biotech-info.net/prob/em_with_soy2.html/

2.7.2.Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ «ΔΗΛΗΤΗΡΙΩΔΩΝ» ΠΑΤΑΤΩΝ

Χαρακτηριστικό της υπερβολής που χαρακτηρίζει οτιδήποτε δημοσιεύεται σχετικά με τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα, είναι η περίπτωση του Dr.Pusztai, ερευνητή του Rowett Research Institute, στο Aberdeen της Σκωτίας. Τον Αύγουστο του 1998, ο Dr.Pusztai ανακοίνωσε ότι κατά την διάρκεια πειραμάτων του, ποντίκια που είχαν τραφεί με γενετικά τροποποιημένες πατάτες υπέστησαν βλάβες στο ανοσοποιητικό τους σύστημα και παρουσίασαν επιπλοκές στην ανάπτυξή τους. Η ανακοίνωση έγινε σε μία δημοφιλή τηλεοπτική εκπομπή στην Βρετανία και όχι σε κάποιο επιστημονικό συνέδριο⁸⁶.

Όπως είναι επόμενο, ακολούθησε ένα πανδαιμόνιο αντιδράσεων και κατακραυγής για τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα και ο συγκεκριμένος επιστήμονας (ο οποίος απολύθηκε από το Ινστιτούτο), σχεδόν ηρωποιήθηκε από μία μερίδα του κοινού, αφού ακόμη και ο πρίγκιπας Κάρολος της Αγγλίας τον δικαίωσε. Ένα μέρος, όμως της επιστημονικής κοινότητας τέθηκε εναντίον του λαμβάνοντας υπόψη τα εξής:

- Ο Dr.Pusztai ανακοίνωσε τα αποτελέσματα της έρευνας προτού η έρευνα ολοκληρωθεί ή δημοσιευθεί ή ελεγχθεί από κάποια επιστημονική επιτροπή και χωρίς την έγκριση του Ινστιτούτου. Οι λόγοι αυτοί οδήγησαν και στην απόλυση του.
- Σύμφωνα με την αναφορά της Royal Society που συντάχθηκε από τους Professor L.Donaldson και τον Sir R.May, τον Μάιο 1999 για λογαριασμό του Βρετανικού Υπουργείου Υγείας, τα αποτελέσματα της

⁸⁶ The Lancet (1999) Health Risks of Genetically Modified Foods, 353 (9167), 29 May 1999, <http://www.biotech-info.net/lancefJisks.htm/>

συγκεκριμένη έρευνας αμφισβητούνται έντονα ως προς την εγκυρότητα τους⁸⁷.

- Η ενέργεια του Dr.Pusztai να επιλέξει μία τηλεοπτική εκπομπή μεγάλης ακροαματικότητας για να ανακοινώσει αμφισβητούμενα αποτελέσματα θεωρήθηκε αντιεπιστημονική από μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας.
- Οι πατάτες περιείχαν γονίδια των λεκτικών (φυτικής προέλευσης τοξίνες) που έχουν γνωστή τοξική δράση σε έντομα. Ο στόχος του πειράματος ήταν να μελετηθεί η επίδραση των πρωτεϊνών αυτών και σε ζώα. Οι συγκεκριμένες πατάτες δεν επρόκειτο να διατεθούν στο εμπόριο για ανθρώπινη κατανάλωση.
- Τα «αρνητικά» αποτελέσματα της έρευνας τροφοδότησαν τις υπάρχουσες φοβίες του κοινού που πιστεύει ότι δηλητηριώδεις πρωτεΐνες βρίσκονται σε όλα τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα. Στην πραγματικότητα, όμως, τα τρόφιμα αυτά περνούν από πολύ αυστηρούς ελέγχους ασφαλείας και δεν υπήρχε περίπτωση να εγκριθεί ένα προϊόν όπως η εν λόγω γενετικά τροποποιημένη πατάτα.

Πάντως, η διαμάχη που έχει ξεσπάσει για το θέμα δεν φαίνεται να βρίσκει λύση καθώς διάφοροι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι η δουλειά του Dr.Pusztai έχει κάποια βάση και θα έπρεπε να οδηγήσει σε προσεκτικότερη εξέταση των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων⁸⁸.

Παρόλο που δεν φαίνεται να υπάρχουν αρνητικές επιδράσεις στους ανθρώπους από την μέχρι σήμερα κατανάλωση των γενετικά

⁸⁷ Donaldson, I, May, R (1999) Health Implications of Genetically Modified Foods, UK National Department of Health, May 1999, <http://www.biotech-info.net/healthJisks.html>

⁸⁸ Firth, P (1999) Leaving a bad taste, Scientific American, May 1999, <http://www.biotech-info.net/bad taste.html>

τροποποιημένων τροφίμων, αυξάνεται ο αριθμός των επιστημόνων που διατηρεί επιφυλακτική στάση. Υποστηρίζουν ότι σε ένα τόσο νέο και ραγδαίο εξελισσόμενο τομέα δεν μπορεί να αποκλειστεί η δυνατότητα, οι «τροποποιήσεις» που υφίσταται η τροφική αλυσίδα σε επίπεδο μοριακό να δημιουργήσουν μακροχρόνια παρενέργειες στην υγεία του ανθρώπου.

Επομένως είναι απαραίτητο να υπάρχει περισσότερος έλεγχος κατά την διάρκεια της παραγωγής GM φυτών αλλά και αφού διατεθούν στο εμπόριο για αρκετό διάστημα ακόμη. Κάθε περίπτωση πρέπει να ελέγχεται ξεχωριστά (case-by-case basis), καθώς κάθε είδος γενετικά τροποποιημένου φυτού έχει τα δικά του ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και μπορεί να κρύβει διαφορετικούς κινδύνους. Επίσης, η σήμανση των προϊόντων αυτών είναι απαραίτητη για την ενημέρωση των καταναλωτών και για να μην στερηθούν το πολύτιμο δικαίωμα της επιλογής.

2.8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια είναι ευρέως διαδεδομένη η τεχνολογία της γενετικής τροποποίησης με τη χρήση διαφόρων μεθόδων, όπως αυτή του ανασυνδυασμένου DNA. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται εισαγωγή στα κύτταρα ενός φυτού η τροφίμου του DNA ενός άλλου οργανισμού, με αποτέλεσμα να μεταφέρεται στο φυτό ή το τρόφιμο μια συγκεκριμένη ιδιότητα που κωδικοποιείται από το DNA.

Στις ΗΠΑ και στον Καναδά τα γενετικά τροποποιημένα φυτά (ΓΤΦ) καλλιεργούνται ευρύτατα, ενώ τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα (ΓΤΤ) είναι σε μεγάλο ποσοστό αποδεκτά από τους καταναλωτές. Αντίθετα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση παρατηρείται έντονη επιφύλαξη από τους καταναλωτές για τα ΓΤΤ, ενώ οι αρμόδιες υπηρεσίες και οι κανονισμοί της ΕΕ επιβάλουν πληθώρα διαδικασιών για να εγκριθεί η καλλιέργεια ενός ΓΤΦ. Τα ερωτήματα που οδηγούν στη συγκεκριμένη στάση των ευρωπαίων είναι κατά πόσο είναι ασφαλή τα ΓΤΦ και τα ΓΤΤ, τί συνέπειες μπορεί να έχει η καλλιέργεια ΓΤΦ για

το περιβάλλον και τελικά τί συνέπειες μπορεί να έχει η κατανάλωση ΓΤΤ για την υγεία μας. Τα ερωτήματα αυτά δεν έχουν ακόμα απαντηθεί πλήρως από την επιστημονική κοινότητα και υπάρχει έντονη ανησυχία σχετικά με τις συνέπειες και τότε αυτές θα γίνουν ορατές.

Τον τελευταίο αιώνα παρατηρήθηκε μια ραγδαία αύξηση του πληθυσμού η οποία συνεχίζεται με έντονους ρυθμούς μέχρι σήμερα. Αυτή η πληθυσμιακή έκρηξη συνεπάγεται συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες παραγωγής φυτικών και ζωικών τροφίμων, αλλά και ζωοτροφών, ενώ παράλληλα αυξάνεται το κόστος των φυτοφαρμάκων, των εντομοκτόνων, των καλλιεργητικών φροντίδων και γενικά το κόστος παραγωγής αγροτικών προϊόντων. Ετέθη, λοιπόν, το αίτημα παραγωγής περισσότερων αγροτικών προϊόντων με καλύτερους οικονομικούς και περιβαλλοντικούς όρους. Στο αίτημα αυτό ήρθε να απαντήσει η βιοτεχνολογία, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των ΓΤΦ.

Έτσι, άρχισαν να δημιουργούνται φυτά που δεν απαιτούν φυτοφάρμακα, εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα, αντέχουν στον παγετό και την ξηρασία και απαιτούν μικρότερο κόστος καλλιεργητικών φροντίδων. Ένα παράδειγμα είναι τα φυτά που παράγουν το βιοεντομοκτόνο Bt. Το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* παράγει βιοδιασπώμενη, μη τοξική, δραστική εντομοκτόνο ουσία. Το γονίδιο του βακτηρίου που κωδικοποιεί την παραγωγή αυτής της ουσίας μεταφέρθηκε με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA και τη βοήθεια ενός πλασμιδίου εντός του DNA φυτών, όπως πατάτα, καλαμπόκι κτλ., με αποτέλεσμα τα φυτά αυτά να παράγουν βιοεντομοκτόνο και να μην απαιτούν χημικά εντομοκτόνα. Μια άλλη περίπτωση είναι η δημιουργία φυτών που είναι ανθεκτικά στην ουσία glyphosate, ενός συστατικού πολλών ζιζανιοκτόνων, που καταστρέφει τη χλωροφύλλη.

Από τα ΓΤΦ παράγονται ΓΤΤ. Πολλές εταιρείες στις ΗΠΑ έχουν ξεκινήσει ήδη την παραγωγή ΓΤΦ και ΓΤΤ. Αυτές παράγουν τροποποιημένους σπόρους, από τους οποίους προκύπτουν ανθεκτικά σε ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα φυτά, καθώς και ΓΤΤ, όπως η γλυκαντική ουσία

Nutrasweet, πατατάκια με βελτιωμένη γεύση, ρύζι εμπλουτισμένο σε βιταμίνη Α, βελτιωμένου χρώματος φρούτα και λαχανικά κτλ.

Ποια είναι όμως τα σημαντικότερα διλήμματα που προκύπτουν από την καλλιέργεια ΓΤΦ και την κατανάλωση ΓΤΤ? Πολλοί επιστήμονες θεωρούν ότι αν και τα ΓΤΦ σε κάποιες περιπτώσεις μειώνουν τη χρήση χημικών ουσιών, όπως στην περίπτωση των φυτών που παράγουν βιοεντομοκτόνο Bt, είναι πιθανόν να προκαλέσουν πληθώρα περιβαλλοντικών προβλημάτων. Αυτά μπορεί να σχετίζονται με τη διατάραξη της βιοποικιλότητας του οικοσυστήματος και την αποδιοργάνωση των ισορροπιών της τροφικής αλυσίδας. Για παράδειγμα μια καλλιέργεια ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα φυτών ψεκάζεται εκτεταμένα με ζιζανιοκτόνο χωρίς φόβο καταστροφής της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται ολοσχερώς τα φυτά ζιζάνια (φυτά που τρέφονται από τις ρίζες των καλλιεργούμενων φυτών) και να καταρρέει η αλυσίδα του οικοσυστήματος, αφού κάποια ζώα ή έντομα τρέφονται με αυτά τα ζιζάνια. Επίσης, θα μπορούσε να συμβεί μεταφορά γύρης από τα ΓΤΦ σε μία βιολογική καλλιέργεια συγγενικών ειδών, περνώντας έτσι τις τροποποιημένες ιδιότητες σε αυτήν την καλλιέργεια ή να μεταφερθεί γύρη από φυτά ανθεκτικά σε ζιζανιοκτόνα σε άλλα φυτά, τα οποία ίσως αποκτήσουν την ανθεκτικότητα και γίνουν ζιζάνια της ίδιας ή άλλων καλλιεργειών.

Αναφορικά με τις επιπτώσεις των ΓΤΤ στην ανθρώπινη υγεία τίποτα δεν είναι αποδεδειγμένο. Υπάρχουν, όμως επιστημονικά δεδομένα που αναφέρουν πιθανή, μακροπρόθεσμα, οριζόντια μεταφορά ενός γονιδίου του ΓΤΤ, δηλαδή να μεταφερθεί το γονίδιο από το ΓΤΤ σε επιβλαβή βακτήρια του πεπτικού συστήματος. Αν αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, τότε αυτή η ανθεκτικότητα θα μεταφερθεί και στα πεπτικά βακτήρια, με αποτέλεσμα αυτά να προκαλούν προβλήματα στην υγεία μας χωρίς εμείς να μπορούμε να τα αντιμετωπίσουμε, εάν δεν βρεθούν νέα αντιβιοτικά. Επιπρόσθετα, η εισαγωγή ξένων γονιδίων στα ΓΤΤ ενέχει σοβαρό κίνδυνο αυτά να περιέχουν κάποιες χημικές ουσίες ή μεγαλομοριακές πρωτεϊνικές δομές που δεν έχουν ταυτοποιηθεί επιστημονικά. Αυτές οι ουσίες

είναι πιθανόν να έχουν τοξική δράση εντός του οργανισμού ή αντιδρώντας με το ανοσοποιητικό σύστημα κάποιων ανθρώπων να προκαλούν αντιδράσεις αναφυλαξίας και αλλεργίες. Επίσης ενδέχεται να προκαλούν μακροπρόθεσμα μεταλλάξεις γονιδίων και καρκινογενέσεις.

Θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα ΓΤΦ φαίνεται ότι οδηγούν στην οικονομικότερη καλλιέργεια της γης και στην μειωμένη χρήση εντομοκτόνων, ενώ παράγονται τρόφιμα με βελτιωμένες ιδιότητες, όπως καλαμπόκι με μεγαλύτερη θρεπτική αξία, ρύζι εμπλουτισμένο με βιταμίνη Α, σιτάρι που παράγει ποιοτικότερο αλεύρι, φρούτα με καλύτερο άρωμα και χρώμα κτλ. Από την άλλη πλευρά, όμως, υπάρχουν επιστημονικές μελέτες που δείχνουν πιθανές αρνητικές επιπτώσεις των ΓΤΦ και των ΓΤΤ στον άνθρωπο και στο περιβάλλον. Οι μελέτες αυτές δεν έχουν καταλήξει σε ασφαλή συμπεράσματα, διότι λόγω της πρόσφατης εμφάνισης των ΓΤΦ και ΓΤΤ πιθανές αρνητικές επιπτώσεις τους θα φανούν σε εύρος χρόνου, που μπορεί να είναι κάποιες δεκαετίες.

Λόγω της υπάρχουσας αβεβαιότητας στο θέμα αυτό επιβάλλεται προσεκτική μελέτη από τους αρμόδιους φορείς των χωρών κάθε νέας περίπτωσης ΓΤΤ και ΓΤΦ, ώστε να αποφασίζεται να επιτραπεί η καλλιέργεια ενός ΓΤΦ ή είσοδος ενός ΓΤΤ στην αγορά μόνο εάν αποδειχθεί ότι αυτό δεν εγκυμονεί κανένα κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Για ΓΤΤ που εισέρχονται στην αγορά επιβάλλεται η αναγραφή στην ετικέτα του συστατικού που φέρει την τροποποίηση και η πλήρη ενημέρωση των καταναλωτών για τέτοιου είδους τρόφιμα, ώστε να μπορούν να καταλήξουν στο εάν θα τα εμπιστευτούν ή θα τα απορρίψουν. Στην Ελλάδα δεν καλλιεργούνται ΓΤΦ και οι κυβερνήσεις τα τελευταία χρόνια δεν επιτρέπουν την καλλιέργεια τους σε εταιρείες που το επιθυμούν. Στην ελληνική αγορά, όμως, κυκλοφορούν κάποια τρόφιμα που έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση και προέρχονται από το εξωτερικό. Τέτοια προϊόντα φαίνεται πως οι καταναλωτές τα απορρίπτουν σε ποσοστό πάνω από 65% του πληθυσμού, όπως δείχνουν κάποιες στατιστικές μελέτες.

Μερικά συμπεράσματα για το σπουδαίο θέμα των ΓΤΤ και ΓΤΦ, όπως προκύπτουν από κάποιες επιστημονικές μελέτες, είναι τα εξής :

- ✚ Χιλιάδες επεξεργασμένα τρόφιμα ήδη περιέχουν συστατικά από ΓΤΦ και καταναλώνονται από εκατομμύρια ανθρώπους.
- ✚ Η βιομηχανία της αγροτικής βιοτεχνολογίας βρίσκεται στο στόχαστρο μιας μεγάλης μερίδας καταναλωτών και επιστημόνων, οι οποίοι αντιμετωπίζουν με σκεπτικισμό και επιφύλαξη τα γενετικά τροποποιημένα προϊόντα.
- ✚ Μέχρι σήμερα δεν έχουν παρατηρηθεί βλαβερές επιπτώσεις στον άνθρωπο από την κατανάλωση ΓΤΤ. Οι πιθανοί κίνδυνοι εστιάζονται στις αλλεργίες που μπορεί να προκαλέσουν οι νέες πρωτεΐνες των ΓΤΤ και σε απρόβλεπτους κινδύνους.
- ✚ Το διάστημα που ο άνθρωπος καταναλώνει τέτοια τρόφιμα (περίπου 15 χρόνια) είναι μικρό, οπότε δεν έχουν ακόμα πραγματοποιηθεί επιδημιολογικές μελέτες σε μεγάλη κλίμακα και βάθος χρόνου, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.
- ✚ Μελετώνται οι επιπτώσεις της μεταφοράς γονιδίων μέσω της γύρης από ΓΤΦ σε παραδοσιακά φυτά και η επίδραση των ΓΤΦ στη βιοποικιλότητα.
- ✚ Κάθε είδος γενετικά τροποποιημένης καλλιέργειας πρέπει να μελετάται ξεχωριστά, ενώ απαιτούνται πολλά χρόνια μελέτης για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alberts B. Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Watson J.D. Molecular Biology of the Cell, Third Edition,
2. Apse, MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis, Science 285:1256-1258
3. Arakawa, T et al (1998a): Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine, Nature Biotechnology 16:292
4. Astwood, JD, Leach, JN, Fuchs, RL (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro, Nature Biotechnology 1 O: 1269-1273
5. Bartsch, D., M. Lehnen, J. Clegg, M. Pohl-Orf, I. Schupan and N.C. Ellstrand. 1999. Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild seed beet populations. Molecular Ecology 8:1733-1741.
6. Beard, JL, Burton, JW & Theil EC (1996) Purified ferritin and soybean meal can be sources of treating iron deficiency in rats, J. Nutr. 126: 154-160
7. Bowen, D, Rochelau, TA, Blackburn, M, Adreev, O, Golubeva, E, Bhartia, R, Ffrench-Constant, RH (1998) Insecticidal Toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*, Science 280: 2129
8. Butler, D (1997) Chair of GMO panel resigns over maize battle, Nature 385: 667
9. Butler, D, Reichhardt, T, Abbot, A, Dickson, D and Saegusa, A (1999) Long-term effects of GM crops serves up food for thought, Nature 398:651-656

10. Carman, J (1999) The problem with the safety of Roundup Ready Soybeans, http://www.biotech-info.net/problem_with_soy2.htm/
11. Chesley, M (1998) The impact of biotechnology on transatlantic trade, Speech presented during the Conference "Biotechnology and the future of Greek Agriculture", hosted by the Hellenic-American Chamber of Commerce, Intercontinental Hotel, Athens 6 May 1998.
12. Chevre AM, Barret P, Eber F, Dupuy P, Brun H, Tanguy X, Renard M (1997). Selection of stable Brassica napus-B. juncea recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1104- 1111
13. Clark, EA (2000) Food Safety of GM crops in Canada: toxicity and allergenicity, <http://www.plant.uoguelph.ca/faculty/eclark/safety.html>
14. Cummins, JE (1998) Chloroplast-transgenic plants are not a gene flow panacea, *Nature Biotechnology* 16:401
15. Cymmins J., 1999, Evolutionary forces behind human infertility. *Nature* 397 (6720), pp 557-558
16. Daniel, et al., 1998: Daniel, H., Levenes, C., and Crepel, F. (1998) "Cellular mechanisms of cerebellar LTD. " *Trends.Neurosci.* 21 (9), 401-407
17. De Maagd, R. A., D. Bosch, and W. Stiekema. 1999. "Bacillus Thuringiensis Toxin-Mediated Insect. Resistance in Plants." *Trends in Plant Science* 4 (1): 9-13
18. deMaagd, RA, Bosch D, Stiekema W (1999) Bacillus thuringiensis toxin-mediated insect resistance in plants, *Trends in Plant Science*, 4:9-13
19. Diehl, JH (1998) Genetically engineered vegetable oils, *General Foods World* 43: 17-19

20. Donaldson, I, May, R (1999) Health Implications of Genetically Modified Foods, UK
21. European Commission (2000a), Economic Impacts of Genetically Modified Crops on the Agri-Food sector, chapter 1: Areas shown to GM crops in the world: fast but uneven developments, <http://europa.eu.int/comm/dg06/publi/gmo!fullrep/ch1.htm> ,
22. European Commission (2000c), Economic Impacts of Genetically Modified Crops on the Agri-Food sector, chapter 3: Farmers: strong profitability expectations, mixed outcome
23. European Commission (2000e), Economic Impacts of Genetically Modified Crops on the Agri-Food sector, chapter 5: Markets: Segregation, Identity Preservation and Labeling, <http://europa.eu.int/comm/dg06/publi/gmo!fullrep/ch5.htm>
24. F. Estruch, M. A. Treitel, X. Yang and M. Carlson , 1996, Department of Genetics and Development and Institute of Cancer Research, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York
25. Firth, P (1999) Leaving a bad taste, Scientific American, May 1999, http://www.biotech-info.net/bad_taste.html
26. Food & Ag Biotech (1999), Backgrounder on Monarch Butterflies and Bt Crops, <http://www.bio.org/food&ag/monarch.htm>
27. Gachet, E., Martin, GG, Vigneau, F and Meyer, G. (1999) Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available, Trends in Food Science and technology 9:380-388
28. Goto, F, Yoshihara, T, Shigemoto, N, Toki, S, Takaiwa, F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene, Nature Biotechnology 17: 282-286

29. Han-Min Jung, Sanhwa Yuh, Chul-Min Sim, Taewan Kim, and Dong-I Park. 1998. A domain identifier using domain keywords from balanced web documents. In First International Conference on Language Resources & Evaluation, Granada, Spain
30. Herbers, K, Sonnewald, U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants, *Current opinion in Biotechnology* 10: 163-168
31. Herrera-Estrella I, Deblock M, Messens E, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schell J, (1983) Chimeric genes at dominant selectable markers in plant cells, *EMBO J* 2:987-995
32. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oriza Sativa* L) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant Journal* 6:271-282
33. Hirschberg. J (1999) Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E, *Current opinion in Biotechnology* 10: 186-191
34. Hodgson, J (1999) UK interest groups take all sides of GM issue, *Nature Biotechnology* 17:630-631
35. Hooykaas PJJ, Schilperoot R (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38
36. Huang F, Buschman LL, Higgins RA, McGaughey WH (1999) Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (D δ PI ES) in the European corn borer, *Science* 284: 965-967
37. Huang Y et al. (1999) Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol Cell Biol*, 19, 2986-2997
38. Juma, C. 2000. "Biotechnology and Sustainable Agriculture: Developing Country Perspectives", 21 January 2000

39. Kappeli O, Auberson L (1998) How safe is safe enough in plant genetic engineering? *Trends Plant Sci.* 3: 276-281
40. Klinger, T.S., Johnson, C.R. (1998). Spatial and temporal distribution of feeding of Aspidochirotida (Holothuroidea) on Heron Island, Great Barrier Reef, Proceedings of the Ninth International Echinoderm Conference, San Francisco, 467-471.
41. Lehrer SB et al (1996) Why are some proteins allergenic?, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 553-564 , Metcalfe, 00 (1996) Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: S165-S186
42. Losey, JE, Rayor LS, Carter ME (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae, *Nature* 399:214
43. Ma, J., Hikmat, BY, Wykoff, K, Vine, NO, Chargelegue, O., Yu, L., Hein, M.B., Lehrer, T (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans, *Nature Biotechnology* 4(5): 601-606
44. MacLain, C (1996) Bollworms chew hole in gene engineered cotton, *Nature* 382:289
45. Masood, E. 1998. Biodiversity body 'needs more science'. *Nature* 391: 215 (News).
46. Masood, S. 1998b. Organic farmer takes gene battle to court. *Nature*. (Lond.) 394:8
47. Mikesell I, (1999) BIO Food & Ag Press Release, June 10: Academic researchers and industry agree on B! crop impact on monarch butterflies overblown, The Biotechnology Industry Organization: <http://www.bio.org/food&ag/Bt061D.htm>

48. Mitsch, F.J. and Mitchell, J.S. (1999), AgBiotech: Thanks, but no thanks? Deutsche Banc Alex. Brown. <http://www.biotech-info.net/Deutsche.pdf>
49. Mitten, OH, MacDonald, R, Klonus, O (1999) Regulations of foods derived from genetically engineered crops, Current opinion in Biotechnology 10:298-302
50. Mol, J, Cornish, E, Mason, J, Koes, R (1999) Novel coloured flowers, Current opinion in Biotechnology 10: 198-201
51. Murphy, DJ (1999) Production of novel oils in plants, Current opinion in Biotechnology 10: 175-180
52. Peters P., 1993, Biotechnology: A Guide to Genetic Engineering, Dubuque IA:Wm.C.Brown Publishers
53. Raskin, I. (1996) Plant genetic engineering may help with environmental cleanup, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 3164-3166
54. Rice M (1999) Monarchs and B! corn: Questions and answers, Integrated Crop Management, <http://www.ipm.iastate.edu/ipmlicm/1999/6-14-1999/monarchBt.htm/>
55. Sally Morgan, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Εκδόσεις Σαββάλας, 2004
56. Scott, SE and Wilkinson, MJ (1999) Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (Brassica napus) into wild Brassica rapa, Nature Biotechnology, 17:390-392
57. Shelton AM & Zhao JZ (2000), Insect resistance and the future of B! transgenic plants, Information Systems for Biotechnology News Report, May 2000, <http://www.isb.vt.edu>
58. Sommer, A (1997) Vitamin A deficiency, child health and survival, Nutrition 1997, 13:484-485

59. Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlitter M, Carroll JA, Spatola I, Ward O, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts, *Nature Biotechnology* 18 (3): 333-338
60. Stewart Jr., C.N., and C.S. Prakash. 1998. Chloroplast-transgenic plants are not a gene flow panacea. *Nature Biotechnology* 16(May):401
61. The Lancet (1999) Health Risks of Genetically Modified Foods, 353 (9167), 29 May 1999, <http://www.biotech-info.net/lancefJisks.htm/>
62. Thomson JA (2000), Report on GMOs at World Economic Forum, Information Systems for Biotechnology News Report, April 2000, <http://www.isb.vt.edu>
63. Tsaftaris A. S., Polidoros A. N., Karavangeli M., Nianou-Obeidat I., Madesis P. Goudoula C. (2000). Transgenic crops: recent developments and prospects. In Balazs, E., Galante, E., Lynch, J.M., Schepers, J.S., Toutant, J.-P., Werner, D., Werry, P.A.T.J., (Eds.). *Biological Resource Management-Connecting Science and Policy*. Pp 187-203. Springer, Berlin .
64. VanKranenburg, R, Boels, IC, Kleerebezem, M, DeVos WM (1999) Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides, *Current opinion in biotechnology* 10: 498-504
65. Wadman M., 1997, Journals joust over policy on authors' interests, *Nature* 386 (1997) (6626), p. 634
66. Wadman, M (1996) Genetic resistance spreads to consumers, *Nature* 383: 564
67. Wadman, M (1997a) US farmers warm to bioengineered crops, *Nature* 387: 221

68. Wadman, M (1997b) Dispute over insect resistance to crops, *Nature* 388: 817
69. Zambrynski P, Joss H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Sehell J, (1983) Tí plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity, *EM-B0 J 2*:2143-215
70. Ανθιμία Μπατρίνου, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον, Εκδόσεις Σαββάλας
71. Βαρζάκας Θ.Χ., Αρβανιτογιάννης Ι.Σ., Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Εκδόσεις Έμβριο, 2006
72. Ευρωβαρόμετρο 1997: European Commission: "Les Europeens et la Biotechnologie Moderne" Euro-barometre 46.1, Luxemburg: Direetorate-General Research
73. Λεκανίδου Ρ (1996) Διαγονιδιακοί Οργανισμοί, Ειδικά Κεφάλαια Μοριακής Βιολογίας Ενότητα 111, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας
74. Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία φυτών, εκδ. Έμβριο, Αθήνα
75. Holmberg, N, Bulow, I (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer, *Trends in Plant Science* 3: 61-66
76. Kahn, A (1996) Analyse par la Commision du Genie Biomoleculaire des risques associes a la culture au champ des plantes transgeniques, Ιπ: "Les plantes transgeniques en agriculture-Dix ans d'experi-ences de la Commission du Genie Biomoleculaire", John Libbey Eurotext, 1996, P 43-47.
77. Munkvold GP, Hellmich RL, Rice LG (1999) Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic B maize hybrids and non-transgenic hybrids, *Plant Diseases*, 83:130-138