

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ  
ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**



**ΦΟΙΤΗΤΡΙΕΣ :ΑΡΑΠΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ 84/04  
ΚΕΡΑΜΥΔΑ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ 42/03**

**Επιβλέπων καθηγητής  
Παλάτος Γεώργιος  
Καθηγητής Εφαρμογών**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ  
ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Η υποβολή της πτυχιακής διατριβής αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του πτυχίου, στο τμήμα Φυτικής Παραγωγής της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης.

**ΦΟΙΤΗΤΡΙΕΣ :ΑΡΑΠΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Α.Μ. 84/04  
ΚΕΡΑΜΥΔΑ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ Α.Μ. 42/03**

**Επιβλέπων καθηγητής  
Παλάτος Γεώργιος  
Καθηγητής Εφαρμογών**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστούμε θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή Εφαρμογών κ. Παλάτο Γεώργιο για τον χρόνο που διέθεσε και τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και τις οικογενειές μας και τους φίλους μας για την συμπαράστασή τους.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ενημέρωσή μας για τα Γενετικά Τροποποιημένα Φυτά (Γ.Τ.Φ.), την υπάρχουσα κατάσταση και τις προοπτικές. Στόχος μας ήταν η κατανόηση της έννοιας των Γ.Τ.Φ. με αναφορά στις μεθόδους γενετικής τροποποίησης καθώς και στην βελτίωση των φυτών. Μας απασχόλησαν ιδιαίτερα οι σταθμοί στην ιστορία της Γενετικής για την καλύτερη κατανόηση της υπάρχουσας κατάστασης, όπως επίσης περιέχονται και παραδείγματα Γενετικής Τροποποίησης Φυτών με διάφορες μεθόδους και τα οφέλη από την χρήση Γ.Τ.Φ. Τέλος σημαντικό θεωρείται και το μέλλον των Γενετικά Τροποποιημένων Τροφίμων, τα προβλήματα, οι ανησυχίες και οι πιθανοί κίνδυνοι που περιέχουν .

## **ABSTRACT**

This study aims to inform us about Genetically Modified Plants (G.M.P.), the current situation and the perspectives. Our goal was the understanding of the meaning of G.M.P with references to the methods of genetically modifying as well as plants improvement. We were specifically interested by the great moments in the history of Genetics in order to fully understand the present condition. Additionally we mentioned cases of Genetically Modified Plants using different methods and also the benefits by the use of G.M.P. Finally it is important to wonder about the future of Genetically Modified Foods, the problems, the concerns and the possible dangers they may have.

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>6</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ</b>	<b>8</b>
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ	11
1.2 ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ	13
1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	17
1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ.	19
1.5 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ.	20
1.6 Η «ΒΙΟ-ΒΑΛΛΙΣΤΙΚΗ» ΜΕΘΟΔΟΣ	34
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΧΟΥΣΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ.</b>	<b>35</b>
2.1 ΣΤΑΘΜΟΙ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ	37
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΦΥΤΩΝ.</b>	<b>39</b>
3.1 ΜΙΚΡΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΙ-ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΥΑΔΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ	41
3.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΕΓΧΥΣΗ	43
3.3 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΒΟΜΒΑΡΔΙΣΜΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	44
3.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ	45
3.5 ΕΦΗΜΕΡΗ ΕΚΦΡΑΣΗ	46
3.6 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΒΟΜΒΑΡΔΙΣΜΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	47
3.7 ΑΜΕΣΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ DNA	50
3.7.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	56
3.8 ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ GM ΦΥΤΩΝ	60
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ ΤΩΝ ΓΤ ΤΡΟΦΙΜΩΝ</b>	<b>64</b>
4.1 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ	65
4.2 ΑΝΗΣΥΧΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ	66
4.3 ΟΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	68
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>77</b>

## 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<sup>ο</sup> 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)<sup>1</sup>.

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 επιλεγεί 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 παρακάτω<sup>2</sup>:

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

---

<sup>1</sup> Μπατρίνου, Α.(2006), *Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον*, Σαββάλας, σελ. 12

<sup>2</sup> Morgan S.(2004), *Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα*, Σαββάλας, σελ. 22



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».

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 οργανισμό<sup>3</sup>.

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.

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.

---

<sup>3</sup> Μπατρίνου, Α.(2006),*Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον*, Σαββάλας, σελ. 12-14

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 DNA<sup>4</sup>.

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

---

<sup>4</sup> Μπατρίνου, Α.(2006),*Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον*, Σαββάλας, σελ. 12

## 1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Τα Γενετικά Τροποποιημένα Φυτά (ΓΤΦ) είναι οργανισμοί που προέκυψαν από άμεση επέμβαση στο γενετικό τους υλικό με τεχνικές της μοριακής βιολογίας σε αντίθεση με εκείνα τα φυτά που παρήχθησαν με κλασικές μεθόδους διασταυρώσεων συγγενών οργανισμών, επιλογής και επαναδιασταυρώσεων. Περιλαμβάνει αυτή η τεχνική την αφαίρεση ή την εισαγωγή ενός ή λίγων γονιδίων και των σημαντών του, επιτρέπει δηλαδή την εισαγωγή γονιδίων από οργανισμούς που απέχουν σημαντικά κατά την ταξινόμηση, ανήκουν σε άλλες ομάδες ή και βασιλεία (φυτά, ζώα, μύκητες, μονοκύτταροι οργανισμοί). Με αυτές τις μεθόδους επιτυγχάνονται ενδεχομένως ταχύτερες γενετικές αλλαγές.

Η Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής ασχολήθηκε, στα όρια των δυνατοτήτων της και του επιστημονικού εξοπλισμού των μελών της, σε σειρά συνεδριάσεων, με το θέμα των γενετικά τροποποιημένων φυτών (με μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA, ΓΤΦ) και των προϊόντων που παράγονται από αυτά. Στο παρόν κείμενο παρουσιάζονται συνοπτικά τα κυριότερα συμπεράσματα, όπως αυτά διατυπώθηκαν στην εισήγηση της Επιτροπής.

Η παραγωγή φυτών γεωργικού ενδιαφέροντος με βιοτεχνολογικές μεθόδους και η διάθεση των προϊόντων τους έχει προκαλέσει έντονες συζητήσεις και αντιδράσεις. Οι υπέρμαχοι της χρήσης της τεχνολογίας αυτής προβάλλουν το επιχείρημα της παραγωγής τροφίμων με βελτιωμένη θρεπτική αξία, καλλιεργουμένων φυτών με αυξημένη ανθεκτικότητα σε παράσιτα και έντομα (με συνακόλουθη ελάττωση χρήσης εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων κτλ), φυτών ανθεκτικών σε ζιζανιοκτόνα που ως εκ τούτου δεν απαιτούν καλλιεργητικές φροντίδες (σκαφής) αλλά από την άλλη μεριά απαιτούν την χρήση ηυξημένων ποσοτήτων ζιζανιοκτόνων (όπως η ποικιλία σόγιας Roundup Ready της Monsanto. Προβάλλουν επίσης την δυνατότητα παραγωγής νέων

προϊόντων, όπως εμβολίων που χορηγούνται μέσω των τροφών. Με τη μέθοδο αυτή ισχυρίζονται ότι, μερικά τουλάχιστον, μπορεί να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα της ανεπάρκειας τροφίμων στον λεγόμενο τρίτο κόσμο. Αντιθέτως όσοι προβάλλουν αντιρρήσεις στην καλλιέργεια ΓΤΦ επισημαίνουν ότι τα φυτά αυτά σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό διαφέρουν από τα άγρια και τα εξημερωμένα και ως εκ τούτου αποτελούν επικίνδυνα στοιχεία διασάλευσης μιας φυσικής τάξεως, που επεκράτησε μετά από μακρόχρονες φυσικές διαδικασίες.

Ότι εν τέλει ο γεωργός δεν απολαμβάνει μια ουσιαστική οικονομική βελτίωση ούτε αύξηση της απόδοσης αλλά ότι ο τελικά επωφελούμενος είναι η παραγωγός των σπόρων εταιρεία ιδιωτικών συμφερόντων, η οποία με την προώθηση των ΓΤΦ οδηγεί στην εξαφάνιση των τοπικών ποικιλιών και στη παντελή εξάρτηση των παραγωγών από την εν λόγω εταιρεία (ιδίως με την χρήση βιολογικών μεθόδων που απαγορεύουν την παραγωγή σπόρων των ΓΤΦ από τον γεωργό, όπως το terminator γονίδιο της Monsanto).

Έτσι φθάνουμε στην εξάρτηση όλης της γεωργικής οικονομίας ενός κράτους από την ή τις εταιρείες αυτές. Προβάλλουν επίσης τους ενδεχόμενους κινδύνους για την δημόσια υγεία, κινδύνους που μπορούν να προβλεφθούν (αλλεργίες) καθώς και άλλους που δεν μπορούν να προβλεφθούν.

Η εισαγωγή μαζί με τα ευνοϊκά γονίδια των σημαντών δημιουργεί επιπρόσθετα προβλήματα, λόγω της φύσης αυτών των σημαντών (ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, άγνωστες άλλες επιπτώσεις). Τέλος επισημαίνουν τις πιθανές αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις της καλλιέργειας των ΓΤΦ στο άμεσο και στο απώτερο μέλλον. Ισχυρίζονται επίσης ότι κατ'αυτόν τον τρόπο δεν επιλύεται το πρόβλημα της πείνας στον τρίτο κόσμο, τονίζοντας ότι η γεωργική υπερπαραγωγή των χωρών του πρώτου κόσμου δεν διοχετεύεται στις χώρες του τρίτου κόσμου αλλά συχνά καταστρέφεται.

Τα μέχρι σήμερα επιστημονικά δεδομένα είναι περιορισμένα τόσο ως προς τα αναμενόμενα οφέλη όσο και ως προς τους ενδεχόμενους κινδύνους. Δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα σαφή αποτελέσματα ώστε να στηριχθούν οι ισχυρισμοί των υποστηρικτών της χρήσης ΓΤΦ ή να απαντηθούν τα ερωτήματα και οι κριτικές που προβάλλονται από τους αντιτιθεμένους προς την άποψη της χρήσης τους.

Το αποτέλεσμα είναι ότι οι συζητήσεις για τα ΓΤΦ και τα προϊόντα τους είναι συναισθηματικά φορτισμένες και δημιουργούν σύγχυση στους πολίτες για τα οφέλη και τους κινδύνους τους. Ανακύπτει επί πλέον το θέμα της κατοχύρωσης των πολιτών να έχουν σωστή ενημέρωση ώστε με επίγνωση να επιλέγουν τη χρήση και κατανάλωση ή την αποχή από τρόφιμα προερχόμενα από ΓΤΦ.

## **1.2 ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ**

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.

Το *Agro bacterium* περιέχει ένα ειδικό πλασμίδιο μεγέθους περίπου 200 kb (kb = αλληλουχία DNA που αποτελείται από 1000 ζευγάρια βάσεων), το οποίο ονομάζεται Ti 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 Ti πλασμιδίου, η οποία ονομάζεται T-DNA (Transfer DNA) μεταφέρεται στον πυρήνα των κυττάρων και είναι υπεύθυνη για την δημιουργία όγκου.

Το Ti 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).
2. Το τμήμα που περιέχει γονίδια για τον καταβολισμό των οπινών.

Επομένως το *Agrobacterium tumefactions* μπορεί να θεωρηθεί ως ένα φυτικό παράσιτο που χρησιμοποιεί γενετική μηχανική για να δημιουργήσει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του<sup>5</sup>.

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.

---

<sup>5</sup> Λεκανίδου, Ρ. (1996) Διαγονιδιακοί Οργανισμοί, Ειδικά Κεφάλαια Μοριακής Βιολογίας Ενότητα 111, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας

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 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 ζωική, 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.

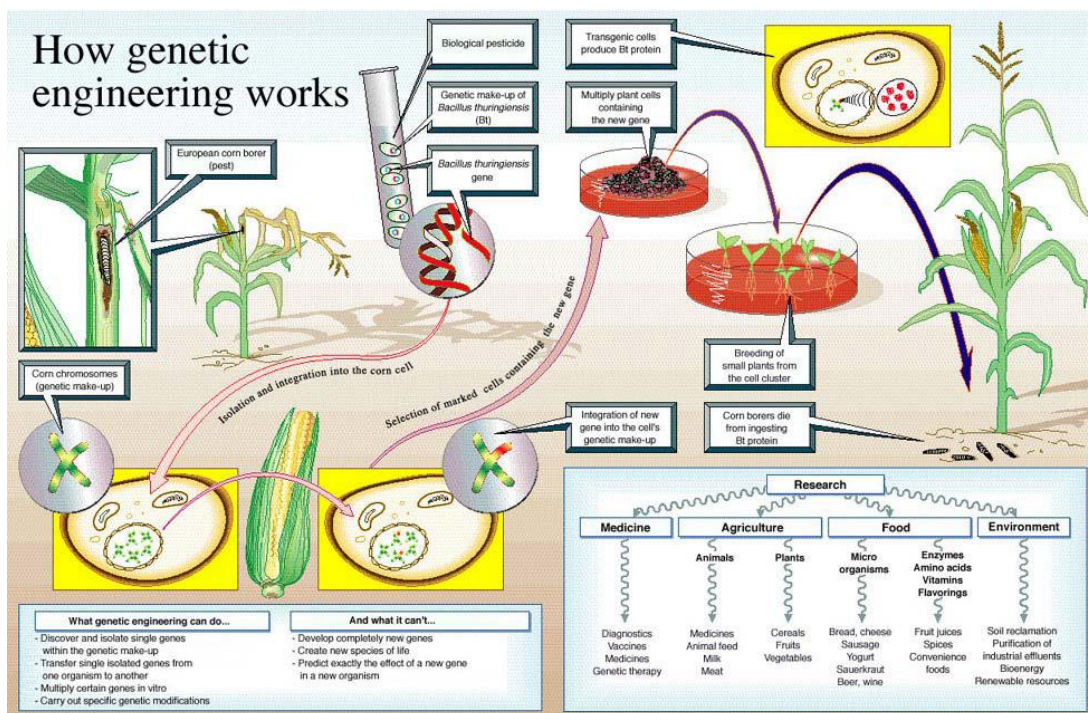
Μία άλλη βασική προϋπόθεση για την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών είναι το μεταφερόμενο DNA να ενσωματωθεί σε ένα από τα χρωμοσώματα του φυτικού κυττάρου ώστε να αναπαράγεται με τον μηχανισμό του κυττάρου και να μεταφέρεται και στα θυγατρικά κύτταρα κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

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





Εικόνα 1.Απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας της γεννητικής μηχανικής

### 1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

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 περισσοτέρων 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:

α) Εκείνους που δημιουργούνται για να παραμείνουν αποκλειστικά μέσα στα εργαστήρια, με τις ανάλογες προδιαγραφές ασφαλείας. Αυτοί οι ΓΤ οργανισμοί χρησιμοποιούνται τόσο στην προαγωγή της έρευνας, όσο και στην παραγωγή χρήσιμων βιοτεχνολογικών προϊόντων (π.χ. φαρμάκων, εμβολίων κ.α.).

β) 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).

#### **1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ.**

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.

## **1.5 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΑΓΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ.**

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 *bionar 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 φυτού<sup>6</sup>.

---

<sup>6</sup> 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 .

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.

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 βιότυπους, που καθορίζονται με βάση διαφορές σε υδατάνθρακες. Οι διαφορές μεταξύ των βιοτύπων ελέγχονται από γονίδια που εδρεύουν στο 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 *Agro bacterium*, 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 Ti 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 Ti 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 Ti 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 Ti (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 αλληλεπιδράσεων<sup>7</sup>.

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, διαμεσολαβούν 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, συριγκαλδεΰδη, 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.

Όπως φαίνεται και την Εικόνα 4.3, το T-DNA, αφού αποκοπεί, μεταφέρεται εντός του φυτικού κυττάρου και ενσωματώνεται τυχαία

---

<sup>7</sup> Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία φυτών, εκδ. Έμβρυο, Αθήνα

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 *Ti* πλασμίδιο.

Επιγραμματικά η μεταφορά και ένθεση του T-DNA στο φυτό από το *Agro bacterium* 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 περμεασών οπινών που κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στο πλασμίδιο *Ti* έξω από τις περιοχές *onc*, *vir*<sup>8</sup>. 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 εκκινήτες 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

---

<sup>8</sup> Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία φυτών, εκδ. Έμβρυο, Αθήνα

ταυτόχρονη απελευθέρωση των πρωτεϊνών virD2 και virE3.

Είναι σημαντικό να γίνει σαφές ότι μόνο ένα μικρό τμήμα από το πλασμίδιο Ti, 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 Ti μπορούν να μεταφέρουν κατά τη διάρκεια της επαγωγής του όγκου στα φυτικά κύτταρα ένα συνεχές και ενιαίο τμήμα του πλασμωδιακού 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<sub>L</sub>-DNA). Το άλλο μέρος του τμήματος T-DNA του πλασμιδίου Ti, το οποίο μπορεί να μεταφερθεί, ονομάζεται δεξιό T-DNA μεγέθους 7kb (T<sub>R</sub>-DNA) χωρίς ογκογενετικές ιδιότητες με κωδικοποίηση των ενζύμων της βιοσύνθεσης της αγραοπίνης.

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 αγραοπίνες 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 Ti πλασμιδίου. Τα πιο κοινά Ti 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 *vir* εντοπίζονται στο *Agrobacterium* μονόκλωνα μόρια (αντιπροσωπεύουν την κάτω αλυσίδα του T-DNA) αλλά και δίκλωνα T-DNA μόρια.

Ο σχηματισμός των μορίων αυτών εξαρτάται από τη δραστηριότητα δύο πρωτεϊνών που ονομάζονται *vir* D1 *vir* D2 που κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *vir*D.

Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μια ενδονουκλεολυτική δράση, ικανή για μονόκλωνη 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 μονόκλωνες αλυσίδες μετά θα απελευθερωθούν με τη διαδικασία της αντιγραφής από τις DNA πολυμεράσες με την εκτόπιση αλυσίδας<sup>9</sup>.

Τα μοναδικά σημαντικά μέρη του T-DNA σε σχέση με τη διαδικασία της ΓΤ φυτών είναι τα δύο άκρα του (μεγέθους 25 ζευγών

---

<sup>9</sup> Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία φυτών, εκδ. Έμβρυο, Αθήνα

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 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 ενδονουκλεάσης<sup>10</sup>. 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

---

<sup>10</sup> Peters P.(1993), Biotechnology: A Guide to Genetic Engineering, Dubuque IA:Wm.C.Brown Publishers

φυτικό γονιδίωμα.

Στη συνέχεια, αυτό το πλασμίδιο εισάγεται σε ένα «γυμνό» από το πλασμίδιο του βακτήριο *A.tumefactions* και με την σειρά του, το μετασχηματισμένο αυτό βακτήριο *A.tumefactions* εισάγεται σε μια καλλιέργεια φυσιολογικών *A.tumefactions*. Εκεί, το ένθεμα εισάγεται και σε άλλα πλασμίδια φυσιολογικών *A.tumefactions*, μέσα από τη διαδικασία του «ομόλογου μετασχηματισμού» (υπενθυμίζεται ότι υπάρχει ομολογία ανάμεσα στα φυσιολογικά T-DNA μόρια και στα μετασχηματισμένα, αφού και τα δύο 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.tumefactions* για να ενεργήσει ως όχημα για την εισαγωγή ενός μετασχηματισμένου με το επιθυμητό ένθεμα («αφοπλισμένου») πλασμιδίου.

B) Ένα πλασμίδιο *Ti* λειτουργικό όσον αφορά τα *vir* 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 ένθεμα<sup>11</sup>.

Η διαδικασία του μετασχηματισμού των φυτών μπορεί να γίνει είτε με μόλυνση πρωτοπλαστών, απομόνωση των μετασχηματισμένων κυττάρων και παραγωγή από αυτά διαγονιδιακών 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

---

<sup>11</sup> Alberts B. Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Watson J.D. Molecular Biology of the Cell, Third Edition,

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 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 των οποίων το T-DNA είχαν γίνει μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια, τα οποία ήταν υπεύθυνα για την αυξίνη. 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.

## **1.6 Η «ΒΙΟ-ΒΑΛΛΙΣΤΙΚΗ» ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η βιο-βαλλιστική μέθοδο που συχνά ονομάζεται και βομβαρδισμός σωματιδίων, έχει σαν βασική αρχή για τη μεταφορά γονιδίων, τη χρήση επιταχυνόμενων με μεγάλες ταχύτητες σωματιδίων με μικροπροεξοχές, ώστε να περάσουν τις κυτταρικές στοιβάδες ή τα κυτταρικά τοιχώματα και να εισχωρήσουν στο κύτταρο

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα επιτυχούς μεταφοράς του ανασυνδυασμένου DNA είναι :

A. Ο βαθμός των κυττάρων που έχουν νεκρωθεί εξαιτίας του βομβαρδισμού.

B. Η σύσταση το μέγεθος και η επιτάχυνση των σωματιδίων.

Γ. Ο τρόπος που συνδέεται το ανασυνδυασμένο DNA με τα σωματίδια.

Σαν παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί ότι αύξηση της ποσότητας του DNA ανά βομβαρδισμό κατά 1000 φορές, μπορεί απλά να διπλασιάσει το ποσοστό επιτυχίας (Χατζόπουλος, 2001).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΧΟΥΣΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ.**

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 υπαρχόντων 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 συγκρατούνται 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.

## **2.1 ΣΤΑΘΜΟΙ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

Οι σταθμοί στην ιστορία της γενετικής είναι οι ακόλουθοι:

1694 : Ανακάλυψη της αναπαραγωγής των φυτών.

1719 : Πρώτη καταγραφή υβριδίου και πρώτη αναφορά υβριδίου σιδηρού.

1866 : Ο mendel δημοσιοποιεί τα αποτελέσματα των πειραμάτων του πάνω στο μπιζέλι, αποδεικνύοντας ότι τα κληρονομικά χαρακτηριστικά φέρονται από κάποιου είδους σωματία.

1900 : Αρχίζει η βελτίωση υβριδίων καλαμποκιού στις Η.Π.Α.

1927 :Οι ακτίνες Χ είναι σε θέση να μεταλλάσσουν τα γονίδια.

1953 : Ανακάλυψη της δομής της διπλής έλικας του DNA, από τους Watson και Crick.

1970 : Το DNA μεταφέρεται σε μη συγγενείς οργανισμούς.

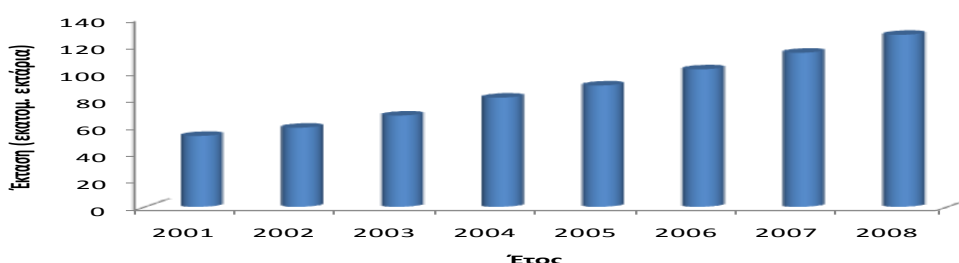
1983 : Πρώτο γενετικά τροποποιημένο φυτό: ο καπνός.

1990 :Πρώτο γενετικά τροποποιημένο σιτηρό.

1994 : διάθεση στο εμπόριο του πρώτου γενετικά τροποποιημένου φυτού, μιας αμερικανικής ποικιλίας τομάτας, με μεγάλο χρόνο συντήρησης.

1996 : Αναπαραγωγή με τη μέθοδο της κλωνοποίησης (το πρόβατο dolly).

2000 : Παρουσίαση της πρώτης χαρτογράφησης του ανθρωπίνου γονιδιώματος καθώς και παρουσίαση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA ορισμένων φυτών, όπως το φυτό arabidopsis που είναι ένα φυτό-πρότυπο.



Σχήμα 2.1. Παγκόσμια έκταση γενετικά τροποποιημένων φυτών κατά το χρονικό διάστημα 2001-2008.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ 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.

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 Ti (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 Ti μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί σε φυσικός φορέας μεταφοράς και έκφρασης ξένων γονιδίων σε φυτικά κύτταρα.

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.<sup>12</sup>

### **3.1 ΜΙΚΡΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΙ-ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΥΑΔΙΚΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ**

Οι ερευνητές, εκμεταλλεόμενοι την παρατήρηση ότι το μετασχηματισμένο 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 Τι πλασμίδια από το *Agrobacterium* έχουν μεγάλο μέγεθος και έτσι η μεταχείρισή τους με τα κατάλληλα ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες) 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

---

<sup>12</sup> Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Εκδόσεις Έμβριο, 2006

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 Ti 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 Ti 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 Ti πλασμίδιο του Agrobacterium (σύστημα «δυναμικού πλασμιδιακού φορέα»). Το πλασμίδιο Ti στο δυναμικό σύστημα περιέχει τα γονίδια της τοξικότητας vir και μια αχή αντιγραφής (oriA) 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 Ti 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<sup>13</sup>.

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 αραβόσιτος 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.

### **3.2 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 υψηλούς κόστους εξοπλισμό για τη μεταχείριση μικρών κυτταρικών

---

<sup>13</sup> <http://helios.bto.ed.a.uk>

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.

### **3.3 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 καλλιέργειας [Cummins, 1999].

### **3.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ**

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 [PEG (Polyethylene glycol)], 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 ηλεκτρικού ρεύματος, οι οποίοι διαπερνούν καλλιέργειες πρωτοπλαστών που βρίσκονται σε ένα διάλυμα, το οποίο περιέχει και το ενθεματικό DNA.

Οι παλμοί τροποποιούν τη φυσικοχημεία των συστατικών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των πρωτοπλαστών,

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 πρωτοπλαστών, 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 πρωτοπλαστών, είναι δυνατή η απομόνωση πολλών κυτάρων, από τα οποία τελικά ένα μεγάλο ποσοστό αποτελεί σταθερά τροποποιημένα προϊόντα.

### **3.5 ΕΦΗΜΕΡΗ ΕΚΦΡΑΣΗ**

Ο όρος εφήμερη έκφραση χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις εκείνες όπου μόρια DNA που εισάγονται μέσα στο κύτταρο μεταφράονται 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<sup>14</sup>.

Παραπάνω παρουσιάστηκαν οι βασικές αρχές της

---

<sup>14</sup> <http://helios.bto.ed.a.uk>

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.

### **3.6 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 καλλιέργειας (Cummins:1999).

Υπάρχουν δύο μέθοδοι μετασχηματισμού πρωτοπλάστων 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 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 πρωτοπλαστών, 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 πρωτοπλαστών, είναι δυνατή η απομόνωση πολλών κυττάρων, 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 μεταφράγονται 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.

### 3.7 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:

7. Μεταφορά γονιδίων μέσω του αγροβακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*.
8. Μεταφορά με ηλεκτροχημικές μεθόδους.
9. Το γενετικό υλικό που εισάγεται μπορεί να είναι:
  10. γονίδια από φυτά του ίδιου ή άλλου είδους
  11. γονίδια από άλλους οργανισμούς (π.χ. βακτήρια, ζώα)
  12. 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) (Chilton et al:1977). 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 Tι πλασμιδίου, η οποία ονομάζεται T-DNA (Transfer DNA) μεταφέρεται στον πυρήνα των κυττάρων και είναι υπεύθυνη για την δημιουργία όγκου.

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

3. 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.
4. 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.

5. Το τμήμα που περιέχει γονίδια για τον καταβολισμό των οπινών.

Επομένως το *Agrobacterium tumefactions* μπορεί να θεωρηθεί ως ένα φυτικό παράσιτο που χρησιμοποιεί γενετική μηχανική για να δημιουργήσει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του (Λεκανίδοι: 1996).

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 γονίδια (Hooykaas & Schilperoot:1992).

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 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 2.1**

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

Αφού κατασκευαστεί *in vitro* το ξένο DNA, που θα περιέχει όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την δράση του, όπως φαίνονται στον παρακάτω 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 καναμυκίνη<sup>15</sup>.

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 μονοκοτυλήδονα φυτά μεγάλης οικονομικής σημασίας (δημητριακά, ρύζι, κ.λπ.). Πρόσφατα, βρέθηκε κάποιο στέλεχος του αγροβακτηρίου που μπόρεσε να δώσει διαγονιδιακά φυτά ρυζιού (Hiei et al:1994).

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).

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 μονοκοτυλήδονα 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

---

<sup>15</sup> (Herrera-Estrella et al, 1983, Zambryski, et al, 1983).

πρωτοπλάστες να έχουν τη δυνατότητα να αναγέννιούνται σε ολόκληρα φυτά.

Σύμφωνα με την τεχνική της ηλεκτροπόρωσης (electroporation), 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.

### **3.7.1 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 DNA (Gachet et al:1999]

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 ακάθατο DNA τρέχει μέσα από μία κλώνα 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 GMOs (Gachet et al, 1999):

- 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.

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

**Πίνακας 2.2-** Οι Εκκινητές και οι Αλληλουχίες – Στόχοι για τις Δοκιμασίες Ανίχνευσης Γενετικά Τροποποιημένης Σόγιας και Καλαμποκιού

Δοκιμασία	Εκκινητές	DNA αλληλουχία-στόχος	Μέγεθος PCR προϊόντος
“Roundup Ready” σόγια	RR01/RR02	EPSPS γονίδιο	508 bp
	RR04/RR05	EPSPS γονίδιο	179 bp
	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 et al: 1999)

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.

### **3.8 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 2.1).

Πίνακας 2.1. 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. ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη ινσουλίνη που παράγεται από βακτήρια, ανασυνδυσασμένη 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 προϊόντα.

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 2.2).

## Πίνακας 2.2. 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 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 χώρες<sup>16</sup>.

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 τροφίμων<sup>17</sup>.

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

---

<sup>16</sup> (Tangley:2000, Χαραλαμπίδης:1999)

<sup>17</sup> Mitsch & Mitchell:1999, Σακελλάρης:1998, Ευρωβαρόμετρο:2000)

στον 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 τυχαίνει 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.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> 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 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 δισχιδούς ράχης και σιτάρι με περισσότερες φυτικές ίνες για τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου του εντέρου.

#### **4.1 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.

## **4.2 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 (Washington Times:1997, The vilage voice: 1998).

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.

#### **4.3 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 κρίση<sup>18</sup>.

Οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι στην φύση από την καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων φυτών είναι από τους πιο ευρέως αποδεκτούς, εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι τα GM αληλεπιδρούν με

---

<sup>18</sup> (Kappeli & Auberson 1998, Butler et al 1999, Conner et al:1999)

το περιβάλλον τους και κανείς δεν μπορεί να εγγυηθεί ότι θα παραμείνουν «γονιδιακά» σταθερά με το πέρασμα του χρόνου<sup>19</sup>.

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 3.1. - Πιθανοί Βιολογικοί Κίνδυνοι

Κίνδυνος	Περιγραφή
Κατάργηση φυσικών γενετικών φραγμών	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.
Ενσωμάτωση «ξένου» γενετικού υλικού σε τυχαίες θέσεις στο γονιδίωμα ενός φυτού ή ζώου	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.

<sup>19</sup> (Klinger:1998)

<p>Εισαγωγή ρυθμιστικών αλληλουχιών</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 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. 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 ιών που βρίσκονται στο γονιδίωμα των φυτών και δημιουργία μολυσματικών ιών.</p>
<p>Χρήση φορέων για τη μεταφορά γονιδίων</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>

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 αντίστοιχα (European Commission 2000a, Mitten et al 1999). 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 καλλιέργειες αναφέρονται στον Πίνακα 2.4. και αναλύονται στις επόμενες παραγράφους.

Πίνακας 3.2. Πιθανοί Περιβαλλοντικοί Κίνδυνοι



Κίνδυνοι	Περιγραφή
<p>Μεταφορά γονιδίων στο περιβάλλον</p> <p>Δημιουργία Bt-ανθεκτικών εντόμων</p> <p>Επίδραση της Bt-τοξίνης σε έντομα μη-στόχους</p> <p>Αύξηση στη χρήση ζιζανιοκτόνων</p>	<p>Μεταφορά των γονιδίων των γενετικά τροποποιημένων φυτών σε συγγενή φυτά ή σε ζιζάνια μέσω της γύρης και δημιουργία «υπέρ-ανθεκτικών» παρασίτων.</p> <p>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.</p> <p>Πιθανές απρόβλεπτες επιδράσεις της τοξίνης Bt σε έντομα που δεν είναι επιβλαβή για την γεωργία.</p> <p>Πιθανή κατάχρηση χημικών ζιζανιοκτόνων λόγω της δημιουργίας γ.τ. φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα.</p>

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 διαγονιδίων<sup>20</sup>.

Ανάλογες έρευνες έδειξαν δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων μεταξύ καλλιεργημένου τεύτλου (beet) και του άγριου συγγενούς φυτού *Beta vulgaris*<sup>21</sup>.

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% (Masood:1998a).

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 χιλιόμετρα<sup>22</sup>.

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

---

<sup>20</sup> (Chevre et al:1997)

<sup>21</sup> (Bartsch et al:1999)

<sup>22</sup> Masood: 1998b

Θεωρείται ότι τα χλωροπλαστιδιακά διαγονίδια δεν μεταδίδονται με την γύρη<sup>23</sup>. Όπως δείχθηκε σε φυτά καπνού και ελαιοκράμβης οι χλωροπλάστες κληρονομούνται από το μητρικό φυτό (maternal inheritance).

Πολλοί όμως ερευνητές αμφισβητούν το γεγονός ότι οι χλωροπλάστες κληρονομούνται με αυτόν τον τρόπο σε όλα τα είδη φυτών<sup>24</sup>. Η προοπτική της εισαγωγής γονιδίων στους χλωροπλάστες έχει το επιπλέον πλεονέκτημα ότι το ξένο γονίδιο μπορεί να εισαχθεί σε πολλά αντίγραφα (ως και 10.000 αντίγραφα) που οδηγούν σε μεγάλες ποσότητες διαγονιδιακών προϊόντων<sup>25</sup>.

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

---

<sup>23</sup> Daniel et al, 1998

<sup>24</sup> (Cummins, 1998, Stewart & Prakash:1998]

<sup>25</sup> (Scott & Wilkinson:1998)

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 προϋπήρχαν 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.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Καλπικής Π. (1989). Βελτίωση φυτών, αρχές και μέθοδοι. Εκδ. Α.Σταμούλης. Πειραιάς
2. Σακελάρης Γ.(2003). Ευθύνη από τυχόν πρόκληση βλαβών από χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών και γενετικά τροποποιημένων προϊόντων. Ε.Κ.Δ.Δ., 11/4/2003. Αθήνα.
3. Γιαννοπολίτης Κ.(1999).Γενετικά τροποποιημένα φυτά. Μια πρώτη εικόνα της σημερινής κατάστασης. Γεωργία και Κτηνοτροφία. 1/1999, σ.18-20.
4. Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης, Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Εκδόσεις Έμβριο, 2006
5. Λεκανίδου, Ρ., 1996, Διαγονιδιακοί Οργανισμοί, Ειδικά Κεφάλαια Μοριακής Βιολογίας Ενότητα 111, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας
6. Morgan S.(2004), *Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα*, Σαββάλας
7. Μπατρίνου, Α. , 2006,*Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα, Παρόν και μέλλον*, Σαββάλας,Αθήνα σελ. 12-14
8. Χατζόπουλος Π., 2001, Βιοτεχνολογία φυτών, εκδ. Έμβριο, Αθήνα
9. Peters P.(1993), *Biotechnology: A Guide to Genetic Engineering*, Dubuque IA:Wm.C.Brown Publishers. Washington
10. ΕΘΙΑΓΕ.(2001).Γεωργική βιοτεχνολογία. Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικών Ερευνών.Αθήνα.
- 11.Ευρωβαρόμετρο 52.1 ,Οι Ευρωπαίοι και η βιοτεχνολογία ,15-3-2000
- 12.Ε.Ε.Β. (2001). Απόφαση για τα γενετικά τροποποιημένα φυτά. Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής
13. Kappeli O. & Auberson L. Zurich 1998, Butler et al 1999, Conner et al:1999
14. Halford n. , 2012, *Genetically Modified crops*, London
15. 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 .
16. Hansen M. (2001). Genetic engineering is non an extension of conventional plant breeding .Consumer Union
  17. Alberts B. Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., & Watson J.D. Molecular Biology of the Cell, Third Edition
  18. Tangley:2000, Χαραλαμπίδης:1999
  19. Klinger:1998
  20. Ecologist.(2003). Special report, genetically modified crops. July/Aug. 2003.p.27-38.
  21. Bacer H.(1967). Characteristics and modes of origin of weeds.Academic Press.New York and London,147-172.
  22. Bartsch et al:1999
  23. Chevre AM. et al:1997
  24. Cummins, 1998, Stewart & Prakash:1998
  25. Daniel et al, 1998
  26. Herrera-Estrella et al, 1983, Zambryski, et al, 1983.
  27. <http://helios.bto.ed.a.uk>
  27. www.BIO.org. Biotechnology Industry Organization