

**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**



**ΣΧΟΛΗ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ»**

ΠΑΠΑΙΩΑΝΝΟΥ ΑΦΕΝΔΡΑ

A.M. 2000065

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΡΑΪΚΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μετά την έκρηκτική ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και της βιοτεχνολογίας που ξεκίνησε περίπου 30 χρόνια πριν, η γενετική μηχανική τείνει να αντικαταστήσει ολοκληρωτικά τις κλασσικές μεθόδους γενετικής βελτίωσης και επιλογής, προκειμένου να προσδώσει επιθυμητούς χαρακτήρες σε φυτά, ή και ολότελα νέους μη φυσικά απαντώμενους χαρακτήρες για συγκεκριμένα είδη. Επίσης, έδωσε την δυνατότητα βελτίωσης σε φυτικά είδη που μέχρι πρότενος ήταν υπερβολικά χρονοβόρο και αμφίβολης αποτελεσματικότητας (πχ. δένδροκομικά φυτά). Πλέον, ένα μεγάλο ποσοστό των φυτών μεγάλης καλλιέργειας και άλλων παγκοσμίως αποτελείται από γενετικά τροποποιημένα φυτά (ΓΤΦ). Η τόσο σύντομη επικράτησή τους έναντι των κλασσικών μεθόδων, σε συνδυασμό με την εισαγωγή γενετικού υλικού από άλλους οργανισμούς, έχει προκαλέσει ανησυχία για τις πιθανές επιπτώσεις των ΓΤΦ, τόσο στην ανθρώπινη υγεία και διατροφή, όσο και στο περιβάλλον με την διατάραξη της βιοποικιλότητας. Γι'αυτό το σκοπό, ιδιαίτερα στην Ευρωπαϊκή Ένωση, έχει θεσπιστεί ένα αυστηρό πλαίσιο διακίνησης και χρήσης ΓΤΦ για αγροτικές και διατροφικές/φαρμακευτικές χρήσεις. Προς αυτό το σκοπό είναι αναγκαία η αξιόπιστη και γρήγορη ανίχνευση των ΓΤΦ τόσο μέσα σε τρόφιμα, όσο και στο περιβάλλον. Η ανίχνευση αυτή συνίσταται στον εντοπισμό του εξωγενούς DNA/γονιδίου που έχει εισαχθεί στο ΓΤΦ, ή στο προϊόν του εξωγενούς γονιδίου (ανασυνδουασμένη πρωτεΐνη) που παράγει το ΓΤΦ. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί μια βιβλιογραφική ανασκόπηση, όπου παρουσιάζονται οι κυριότερες μέθοδοι δημιουργίας ΓΤΦ με παραδείγματα ευρέως καλλιεργούμενων ΓΤΦ, καθώς και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αυτών. Τέλος, παρουσιάζονται οι κυριότερες μέθοδοι ανίχνευσης και εντοπισμού των ΓΤΦ σε επίπεδο DNA και πρωτεϊνών και αναλύεται η αρχή της κάθε μεθόδου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
Πρόλογος	5
Τι είναι οι Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί.	5
Που χρησιμοποιούνται και γιατί υπάρχει ανάγκη ανίχνευσης.	6
Σκοπός – επιμέρους στόχοι της εργασίας	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.	12
ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ	12
Πρόλογος	12
Δημιουργία Γενετικά Τροποποιημένων Φυτών	16
ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ	18
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ	19
ΓΟΝΙΔΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	21
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	24
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΠΝΟΥ ΜΕ ΔΙΣΚΙΑ ΦΥΛΛΩΝ	24
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΛΛΟΥ	25
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΚΕΝΟΥ	26
ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ	27
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΤΑ ΦΥΤΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΒΟΜΒΑΡΔΙΣΜΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	29
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	34
Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ STARLING	35
ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΑΤΑΤΑ	36
Σημασία - πλεονεκτήματα της Διαγονιδιακής Τεχνολογίας	38
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ	38
Πιθανοί Κίνδυνοι των Γενετικά Τροποποιημένων Φυτών	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.	53
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ	53
Ανίχνευση τμημάτων DNA	54
Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης της PCR	55
ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN	62
Ανίχνευση πρωτεϊνών	66

ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA
Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN

66
72

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόλογος

Τι είναι οι Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί.

Οι **Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί (ΓΤΟ)** είναι οργανισμοί που έχουν υποστεί αλλαγή στο γενετικό τους υλικό (DNA) με μη φυσικό τρόπο. Άλλη ονομασία των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών είναι “διαγονιδιακοί οργανισμοί”, ενώ στους καταναλωτές είναι περισσότερο γνωστοί με τον όχι ορθό όρο, “μεταλλαγμένοι”.

Η γενετική τροποποίηση του DNA ενός οργανισμού επιτυγχάνεται με την προσθήκη DNA από κάποιο άλλο οργανισμό ή με την τροποποίηση του γενετικού υλικού του ίδιου του οργανισμού (π.χ. αφαίρεση ή τροποποίηση ενδογενών γονιδίων του οργανισμού) και έχει ως στόχο την δημιουργία οργανισμών με νέα και επιθυμητά χαρακτηριστικά (π.χ. φυτά με ανθεκτικότητα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, μικρόβια που συνθέτουν νέους μεταβολίτες) (Galun and Breiman, 1997). Γενετική τροποποίηση μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους ζώντες οργανισμούς όπως φυτά, ζώα, μικροοργανισμούς (π.χ. βακτήρια, ζύμες) και ιούς. Η κατασκευή γενετικά τροποποιημένων οργανισμών γίνεται με τις μεθόδους της Γενετικής Μηχανικής (τεχνολογία ανασυνδιασμένου DNA) και γενικότερα της Μοριακής Βιοτεχνολογίας. Σε αντίθεση με την κλασική γενετική, με την οποία είναι δυνατή η ανταλλαγή γενετικού υλικού μόνο μεταξύ συγγενών ειδών ή οργανισμών του ίδιου είδους, η τεχνολογία της γενετικής τροποποίησης μας δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς “ετερόλογου” γενετικού υλικού (DNA) μεταξύ οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικές ποικιλίες ή ακόμα και μεταξύ οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικά είδη (Old and Primrose, 1994).

Ορισμένες τεχνικές με τις οποίες μπορεί να εισαχθεί DNA σε οργανισμούς είναι: 1) η χρήση φορέων κλωνοποίησης, 2) η μικροέγχυση ή μακροέγχυση DNA και 3) η ηλεκτροδιάτρηση (Sambrook et al., 1989).

Ο πρώτος γενετικά τροποποιημένος μικροοργανισμός (βακτήριο) επιτεύχθηκε το 1973 (Cohen et al., 1973), ενώ γενετική τροποποίηση φυτών επιτεύχθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του '80 (Zambryski et al., 1980).

Που χρησιμοποιούνται και γιατί υπάρχει ανάγκη ανίχνευσης.

Οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί είτε είναι φυτά, ζώα ή μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών. Χρησιμοποιούνται στον χώρο της έρευνας, της αγροτικής και περιβαλλοντικής βιοτεχνολογίας και της ιατρικής, με σκοπό την παραγωγή φαρμάκων, εμβολίων, βελτιωμένων τροφίμων και βελτιωμένων ποικιλιών φυτών.

Οι γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται συνήθως στην ιατρική, την αγροτική βιοτεχνολογία καθώς και στην παραγωγή τροφίμων. Ορισμένα παραδείγματα τέτοιων μικροοργανισμών είναι: βακτήρια που παράγουν πρωτεΐνες απαραίτητες στον άνθρωπο όπως η ινσουλίνη (αντιμετώπιση διαβήτη) (Singer, 2010) και η ιντερφερόνη καθώς και ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριού (π.χ. χυμοσίνη) αλλά και σε πολλές άλλες δραστηριότητες. Άλλα βακτήρια χρησιμοποιούνται (πειραματικά) για την απορρύπανση του εδάφους και την διευκόλυνση της ανάπτυξης καλλιέργειας αλλά δεν έχουν χρησιμοποιηθεί εκτός εργαστηρίου (Gadd, 2010)

Η γενετική τροποποίηση στα ζώα γίνεται με στόχο την ταχύτερη ανάπτυξη (π.χ. ΓΤ σολωμός), την ανθεκτικότητα σε ασθένειες και την επιβίωση σε αντίξοες συνθήκες (π.χ. υπερβολικό ψύχος) (Garvin et al., 1998), ενώ γενετικά τροποποιημένα

ζώα χρησιμοποιούνται στην έρευνα της ιατρικής για την κατανόηση και θεραπεία ασθενειών όπως ο καρκίνος και για την παραγωγή φαρμάκων (π.χ. μέσω των πρωτεϊνών στο γάλα) (Garvin et al., 1998).

Οι πιο γνωστοί όμως γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί είναι τα φυτά που παράγονται με την βοήθεια της αγροτικής βιοτεχνολογίας, για την παραγωγή τροφίμων με μεγαλύτερη θρεπτική αξία (π.χ. το golden rice), για καλύτερη ποιότητα και αυξημένη ποσότητα παραγωγής, ανθεκτικότητα σε εντομολογικούς εχθρούς και ιούς, επιβράδυνση της μετασυλλεκτικής ωρίμανσης ή καλύτερη ανάπτυξη σε ακραίες συνθήκες (π.χ. ψύχος) (Χατζόπουλος, 2001; Jones, 2011). Με τα γενετικά τροποποιημένα φυτά μπορούμε να επιτύχουμε μείωση του κόστους καλλιέργειας, με μείωση της χρήσης εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων ή μυκητοκτόνων. Τα φυτά αυτά χρησιμοποιούνται εκτός από την ανθρώπινη διατροφή και ως ζωοτροφές. Γενετικά τροποποιημένα φυτά που κυκλοφορούν εμπορικά ως ζωοτροφές είναι κυρίως η σόγια, το βαμβάκι, η ελαιοκράμβη, ο αραβόσιτος (McGloughlin, 2010), με σκοπό την παραγωγή φαρμάκων, εμβολίων, βελτιωμένων τροφίμων και βελτιωμένων ποικιλιών φυτών.

Η τεχνολογία της γενετικής τροποποίησης διάφορων οργανισμών έχει δημιουργήσει μεγάλη ανησυχία τόσο στην επιστημονική κοινότητα όσο και στο ευρύ κοινό. Η ανασφάλεια των καταναλωτών σχετίζεται με την μέθοδο της γενετικής τροποποίησης, την ελευθερωσή τους στο εξω-εργαστηριακό περιβάλλον και τον ελλιπή έλεγχο των ενδεχόμενων επιπτώσεών τους από κρατικούς οργανισμούς. Ο φόβος των καταναλωτών σχετίζεται με επιπτώσεις, ιδιαίτερα μακροχρόνιες, στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

Κάποιες από αυτές τις επιπτώσεις τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στο περιβάλλον είναι:

- Η δημιουργία τοξινών σε τρόφιμα (Chassy, 2010)
- Η εμφάνιση νέων αλλεργιών, εξαιτίας της παραγωγής νέων πρωτεϊνών (Ντόνα και Αρβανιτογιάννης, 2009).
- Η ενδεχόμενη μείωση της θρεπτικής αξίας των τροφίμων (χωρίς αυτό συνήθως να εξειδικεύεται) (Chassy, 2010)
- Η πιθανή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά λόγω μεταφοράς βακτηριακών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια επιλογής στην γενετική τροποποίηση (Ντόνα και Αρβανιτογιάννης, 2009).
- Οι επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα (μεταφορά γονιδίων από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά σε άλλα φυτά) (Χατζόπουλος, 2001).
- Η δημιουργία νέων ανθεκτικών ζιζανίων και συγχρόνως η ανάγκη χρήσης νέων αγροχημικών για την καταπολέμησή τους (Warwick et al., 2009).
- Επιπτώσεις σε οργανισμούς μη-στόχους (Warwick et al., 2009).

Η φοβία του κόσμου προς τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς καθώς και η ζήτηση για καλύτερη αξιολόγηση τόσο της μεθόδου της γενετικής τροποποίησης όσο και των οργανισμών που προκύπτουν, αλλά και η απαίτηση για δυνατότητα επιλογής μεταξύ ενός συμβατικού οργανισμού και ενός γενετικά τροποποιημένου οργανισμού έχουν οδηγήσει στην ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων για την ανίχνευση της πιθανής παρουσίας των οργανισμών αυτών (π.χ., προσμίξεις σε συμβατικό πολλαπλασιαστικό υλικό ή προϊόντα διατροφής) από το στάδιο της παραγωγής μέχρι την διάθεσή τους στην αγορά. Με την ανίχνευση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών μπορεί να παρακολουθείται η πιθανότητα ύπαρξης επιπτώσεων και είμαστε σε θέση να επιλέξουμε αν θα καταναλώσουμε ένα γενετικά τροποποιημένο τρόφιμο ή ένα τρόφιμο που περιέχει συστατικά από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς ή όχι. Αυτοί οι λόγοι οδήγησαν την Ευρωπαϊκή

Ένωση, την διεθνή κοινότητα αλλά και την κάθε χώρα ξεχωριστά, στην θέσπιση νομοθεσίας και κανονισμών που θα καλύπτουν τον τρόπο παραγωγής ενός γενετικά τροποποιημένου οργανισμού, τις απαιτήσεις που πρέπει να πληρεί για να εγκριθεί, την ανίχνευσή του και μετά την έγκριση, αλλά και τους κανόνες διακίνησής τους μεταξύ χωρών.

Υπάρχουν πολλοί οργανισμοί και εργαστήρια που ασχολούνται με την ανίχνευση και γενικά την παρακολούθηση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών ή συστατικών τους, όπως είναι η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) για την Ενωμένη Ευρώπη, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων για τις ΗΠΑ (FDA) και ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ) για την Ελλάδα (Βαρζάκας και Αρβανιτογιάννης, 2006).

Σκοπός – επιμέρους στόχοι της εργασίας

Η παρούσα εργασία έχει ως κύριο στόχο την επίκαιρη βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την δημιουργία των γενετικά τροποποιημένων φυτών και τις κυριότερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους. Επίσης αναλύονται τα πλεονεκτήματα και η σημασία της διαγονιδιακής τεχνολογίας, καθώς και οι πιθανοί κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία και την βιοποικιλότητα από την χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών, τόσο για τροφή, όσο και για βιομηχανική χρήση.

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 1830/2003/ΕΚ και τον Κανονισμό 1829/2003 της Ευρωπαϊκής Ένωσης καθιερώνεται η ανίχνευση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών και των προϊόντων που παράγονται από αυτούς τόσο κατά την παραγωγή τους όσο και κατά την διακίνησή τους στην αγορά (Akritidis et al, 2008).

Ένας τρόπος παρακολούθησης των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών

είναι η καταγραφή αυτών των οργανισμών σε ένα διεθνές σύστημα με την βοήθεια κωδικών (**Unique Identifiers**) (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2001). Με αυτούς τους κωδικούς διευκολύνεται η καταγραφή των πληροφοριών σε διαφορετικές βάσεις δεδομένων. Κάθε κωδικός αντιστοιχεί σε μια περίπτωση γενετικής τροποποίησης και ένα παράδειγμα τέτοιου κωδικού είναι ο κωδικός CGN- 89564-2. Ο κωδικός αποτελείται από τρία διαφορετικά στοιχεία που χωρίζονται από παύλες. Το πρώτο στοιχείο (π.χ. CGN για την εταιρεία Calgene) αφορά την εταιρεία που κάνει την αίτηση, το δεύτερο (π.χ. 89564) είναι κωδικός της γενετικής τροποποίησης (το είδος της γενετικής τροποποίησης) ενώ το τρίτο και τελευταίο στοιχείο (π.χ. 2) είναι ένα ψηφίο που βοηθάει απλά στην επαλήθευση (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004). Ο κωδικός αυτός δεν μπορεί όμως να μας αποκαλύψει το είδος του οργανισμού που έχει υποστεί την γενετική τροποποίηση (Lezaun, 2006).

Η ανίχνευση που γίνεται μπορεί να αφορά την ύπαρξη ή όχι γενετικής τροποποίησης σε έναν οργανισμό (με ποιοτική μέθοδο) αλλά και την μέτρηση της συγκέντρωσης ενός γενετικά τροποποιημένου οργανισμού σε ένα προϊόν (με ποσοτική μέθοδο). Οι μέθοδοι ανίχνευσης στηρίζονται στην ανίχνευση DNA, RNA ή πρωτεϊνών. Οι περισσότερες μέθοδοι εφαρμόζονται για την ανίχνευση DNA, ενώ ελάχιστες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πρωτεϊνών (Auer, 2003)

Μια απλή μέθοδος ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένων οργανισμών είναι η μέθοδος που στηρίζεται στην ανίχνευση των ρυθμιστικών αλληλουχιών (regulatory sequences) (Lezaun, 2006). Οι αλληλουχίες αυτές, αφορούν ρυθμιστικό DNA που χρησιμοποιείται στη μεθοδολογία της γενετικής τροποποίησης φυτών όπως είναι ο προαγωγέας (promoter) 35S και η ληκτική αλληλουχία pos (terminator). Οι αλληλουχίες αυτές είναι τμήματα DNA που περικλείουν το γονίδιο που θέλουμε να

εισάγουμε και χρησιμεύουν στην αναγνώριση του εισαχθέντος ξένου γονιδίου από τα ένζυμα του φυτού που εμπλέκονται στην μεταγραφή του για την παραγωγή μιας λειτουργικής πρωτεΐνης.

Η μέθοδος αυτή μας δίνει την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ ενός οργανισμού που έχει υποστεί γενετική τροποποίηση (επειδή θα περιέχει τις υπό εξέταση ρυθμιστικές αλληλουχίες) και ενός συμβατικού οργανισμού (που δεν τις περιέχει), αλλά δεν παρέχει την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ διαφορετικών γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, εφόσον και οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται συχνά για την δημιουργία διαφορετικών γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (Lezaun, 2006).

Για την εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου ανίχνευσης εφαρμόζεται πιο συχνά είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR), η οποία απαιτεί την χρήση εξειδικευμένων εκκινητών και με την οποία μπορεί να γίνει ποιοτική αλλά και ποσοτική ανίχνευση (Bubner et al., 2004)

Η ενζυμο-συνδεδεμένη μέθοδος ανοσοαπορρόφησης (Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) και η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blot) χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πρωτεϊνών (Auer, 2003). Οι ανοσοχημικές αυτοί μέθοδοι χρησιμοποιούνται για ποιοτική ανίχνευση και στηρίζονται στην σύνδεση των πρωτεϊνών με μόρια αντισωμάτων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες. Η μέθοδος ELISA μπορεί να δώσει εκτός από ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα (Berg et al., 2004)

Η ανίχνευση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών πρέπει να γίνεται από διαπιστευμένα εργαστήρια που θα παρέχουν εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσωπικό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΦΥΤΑ

Πρόλογος

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. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την αφαίρεση ή την εισαγωγή ενός ή λίγων γονιδίων και των σημαντών του, επιτρέπει δηλαδή την εισαγωγή γονιδίων από οργανισμούς που πιθανόν απέχουν σημαντικά ταξονομικά, ανήκοντας σε άλλες ομάδες ή ακόμη και βασιλεία (φυτά, ζώα, μύκητες, μονοκύτταροι οργανισμοί). Με αυτές τις μεθόδους επιτυγχάνονται ενδεχομένως ταχύτερες γενετικές αλλαγές.

Η γενετική τροποποίηση ενός οργανισμού συνίσταται στην εισαγωγή γενετικού υλικού σε αυτόν, τέτοιου που του προσδίδει διαφορετικές ιδιότητες, όπως ανθεκτικότητα σε φυσικές απειλές ή βελτίωση των οργανοληπτικών του ιδιοτήτων. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι τα γονίδια αλλάζουν καθημερινά με τη διαδικασία της φυσικής μετάλλαξης και του γενετικού ανασυνδυασμού, δημιουργώντας, τελικά, νέες βιολογικές ποικιλίες. Οι άνθρωποι εκμεταλλεύονται τη μετακίνηση γονιδίων εδώ και αιώνες με όλο και περισσότερους τρόπους, χρησιμοποιώντας εκτεταμένες διασταυρώσεις και τεχνητές επιλογές, προκειμένου να δημιουργήσουν πολλούς συνδυασμούς, οι οποίοι σε καμία άλλη περίπτωση δεν θα είχαν προκύψει. Σχεδόν οτιδήποτε τρώμε προέρχεται από την κτηνοτροφία και από καλλιέργειες και μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται ειδικά για να παρέχουν τροφή. Επίσης, οι άνθρωποι έχουν αναδιανείμει τα γονίδια γεωγραφικά. Συνεπώς, το

DNA δεν υπήρξε ποτέ «στατικό», είτε φυσικά είτε στα χέρια των ανθρώπων. Η γενετική τροποποίηση είναι μία προέκταση της κατάστασης που ήδη περιγράφηκε. Ωστόσο, αντίθετα με τη συμβατική ανάπτυξη, στην οποία νέες ποικιλίες γονιδίων δημιουργούνται περισσότερο ή λιγότερο τυχαία, η γενετική τροποποίηση επιτρέπει σε συγκεκριμένα γονίδια να ταυτοποιηθούν, να απομονωθούν, να αντιγραφούν και να εισαχθούν σε άλλους οργανισμούς με περισσότερο άμεσες και ελεγχόμενες διαδικασίες, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω. Η περισσότερο εμφανής διαφορά από το συμβατικό πολλαπλασιασμό είναι ότι η γενετική τροποποίηση επιτρέπει τη μεταφορά γονιδίων μεταξύ των ειδών.

Τα πρώτα ΓΤΦ δημιουργήθηκαν στις ΗΠΑ το 1983 και ήταν δενδρύλλια καπνού, ιδιαίτερα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Σήμερα πολλά εκατομμύρια στρεμμάτων καλλιεργούνται με γενετικά τροποποιημένα φυτά, όπως σόγια, καλαμπόκι, βαμβάκι, πατάτες, ελαιοκράμβη, κολοκυθίες, ραδίκια και ντομάτες. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι υπάρχει μία σειρά καλλιεργειών που βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο. Πρόκειται για μπανάνες που θα μπορούν να παράγουν εμβόλια για χρήση στον άνθρωπο εναντίον μολυσματικών ασθενειών, όπως η Ηπατίτιδα Β, ρύζι με αυξημένη περιεκτικότητα σε σίδηρο ή λυσίνη, γλυκοπατάτες ανθεκτικές σε ιούς που τις καταστρέφουν, ψάρια που θα αναπτύσσονται ταχύτερα, δένδρα που θα μπορούν να παράγουν φρούτα και ξηρούς καρπούς σε πολύ λιγότερα χρόνια, πατάτες ειδικά σχεδιασμένες ώστε να απορροφούν λιγότερο λάδι στο τηγάνισμα, φρούτα και λαχανικά με υψηλή περιεκτικότητα στις βιταμίνες C και E και φυτά ανθεκτικά στην ξηρασία και σε καταστροφικά έντομα και ζιζάνια (Χατζόπουλος, 2001). Προς το παρόν, οι περισσότερες εφαρμογές της γενετικής μηχανικής εντοπίζονται στις φυτικές καλλιέργειες και γίνονται για εμπορικά σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά, τα οποία κυρίως σχετίζονται με

την ανοχή σε φυτοφάρμακα και την αντίσταση στα ζιζάνια. Αυτά τα αγρονομικά χαρακτηριστικά καθορίζονται από συγκεκριμένα γονίδια και έτσι είναι ευκολότερος ο χειρισμός τους. Αντίθετα, χαρακτηριστικά όπως το άρωμα, η γεύση, η υφή και ποιοτικά χαρακτηριστικά τείνουν να καθορίζονται από πολυάριθμα γονίδια και επομένως είναι πολύ πιο δύσκολος ο χειρισμός τους.

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, καλλιεργούμενων 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 αυξημένων 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 ιδιωτικών συμφερόντων παραγωγός εταιρεία των σπόρων, η οποία με την προώθηση των ΓΤΦ οδηγεί στην εξαφάνιση των τοπικών ποικιλιών και στην 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 γονίδιο terminator 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 γονιδίων-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 αντιτιθέμενους προς την χρήση 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. Προς τούτο είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση των ΓΤΦ που διατίθενται στην αγορά, καθώς και η τυχόν επιμόλυνση καλλιεργειών αγρίου τύπου με γενετικό υλικό από ΓΤΦ, έτσι ώστε να δίνεται η

δυνατότητα επιλογής στον καταναλωτή αλλά και να ελέγχεται η διασπορά των ΓΤΦ για την διατήρηση της βιοποικιλότητας.

Δημιουργία Γενετικά Τροποποιημένων Φυτών

Η γενετική τροποποίηση είναι δυνατή μόνο επειδή τα γονίδια όλων των οργανισμών είναι φτιαγμένα από το ίδιο DNA. Αυτό σημαίνει ότι το DNA δύο διαφορετικών οργανισμών μπορεί να κοπεί και να ανασυνδυαστεί. Περιοριστικά ένζυμα κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες προκειμένου να δημιουργήσουν «κολλώδη άκρα», τα οποία, λόγω των συμπληρωματικών αλληλουχιών βάσεων που διαθέτουν, τείνουν να κολλούν σε άλλα άκρα που έχουν δημιουργηθεί από τα ίδια ένζυμα. Η DNA λιγάση χρησιμοποιείται για την επανένωση της σπονδυλικής στήλης του DNA όταν τα κολλώδη άκρα ζευγαρώνουν μεταξύ τους.

Τα πλασμίδια, μικρές σπείρες DNA και φυσικά προκύπτοντα στα βακτήρια, χρησιμοποιούνται για τη γενετική τροποποίηση των βακτηρίων. Το πλασμίδιο ανοίγει με ένα περιοριστικό ένζυμο και αναμιγνύεται με το γονίδιο στόχο, το οποίο έχει ομοίως ανοίξει. Η DNA λιγάση χρησιμοποιείται για να ράψει το γονίδιο που ενδιαφέρει στο πλασμίδιο. Αυτό το «ανασυνδυασμένο» πλασμίδιο αναμιγνύεται στη συνέχεια με βακτήρια, τα οποία, υπό κατάλληλες συνθήκες το δεσμεύουν. Τα βακτηριακά κύτταρα είναι γενετικά τροποποιημένα και μπορούν να καλλιεργηθούν, να απομονωθούν, να υποκαλλιεργηθούν και εάν είναι κατάλληλο, να αναπτυχθούν με ζύμωση σε βιομηχανική κλίμακα (Χατζόπουλος, 2001). Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, το πλασμίδιο αντιγράφεται πιστά σε κάθε κύκλο της κυτταρικής διαίρεσης, κατά τρόπο τέτοιο, ώστε η τελική βακτηριακή καλλιέργεια να περιέχει πολλά αντίγραφα από το πλασμίδιο και το γονίδιο που έχει εισαχθεί σε αυτό. Προκειμένου να τροποποιηθούν γενετικά φυτά ή ζώα, το πλασμίδιο αποσπάται από το βακτήριο και το κλωνοποιημένο γονίδιο αποκόπτεται με ένα περιοριστικό ένζυμο.

Το γονίδιο μπορεί τότε να εισαχθεί σε μεμονωμένα φυτικά και ζωικά κύτταρα. Για τα ζώα, αυτό γίνεται συνήθως με εισαγωγή πολλών εκατομμυρίων αντιγράφων του γονιδίου στον πυρήνα ενός ωαρίου υπό γονιμοποίηση. Σε περίπου 1% των περιπτώσεων το κλωνοποιημένο γονίδιο θα ενωθεί με τα χρωμοσώματα του ζυγώτη και, κατά την κυτταρική διαίρεση, θα περάσει σε κάθε κύτταρο του εμβρύου (Χατζόπουλος, 2001; Galun and Breiman, 1997).

Για τα φυτά, υπάρχουν πολυάριθμοι τρόποι εισαγωγής του γονιδίου στα κύτταρα. Μία κοινή μέθοδος είναι η σύνδεση του γονιδίου σε πλασμίδιο του βακτηρίου *Agrobacterium*, ενός φυσικά προκύπτοντος παθογόνου των φυτών. Όταν τα φυτικά κύτταρα προσβάλλονται από ένα μη-τοξικό στέλεχος του βακτηρίου, το πλασμίδιο μεταφέρεται στα φυτικά κύτταρα και το DNA του ενώνεται με αυτό των κυττάρων ξενιστών. Τα γονίδια που ενδιαφέρουν μπορούν να ενσωματωθούν σε αυτό το πλασμίδιο, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως όχημα/φορέας (vector), για τη μεταφορά των γονιδίων στα φυτικά κύτταρα. Τα κύτταρα στη συνέχεια, καλλιεργούνται για την παραγωγή μιας αδιαφοροποίητης κυτταρικής μάζας, του κάλλου, η οποία όταν αναπτυχθεί σε κατάλληλο μέσο καλλιέργειας, παράγει ρίζες και εξελίσσεται σε φυτό. (Χατζόπουλος, 2001; Old and Primrose, 2000). Σημειώνεται ότι κάθε κύτταρο του φυτού αυτού προέρχεται από ένα μόνο πατρικό κύτταρο και, επομένως, περιέχει το γονίδιο που έχει εισαχθεί. Η γενετική τροποποίηση επιτρέπει επίσης την επλεκτική διακοπή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων. Τέλος, με την ίδια διαδικασία είναι δυνατό να εισαχθούν ξένα γονίδια -διαγονίδια- σε φυτικές καλλιέργειες και να εκφραστούν αυτά σε συγκεκριμένους ιστούς, όπως οι ρίζες και τα φύλλα, και όχι σε άλλους, όπως οι σπόροι και τα φρούτα. Αυτό είναι πιθανό να βελτιώνει σημαντικά την προστασία της καλλιέργειας έναντι ζιζανίων τα οποία επιτίθενται για παράδειγμα, μόνο στις ρίζες ή τα φύλλα (Χατζόπουλος, 2001).

ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ

Αν και κανένα άλλο τμήμα του πλασμιδίου T_i του *Agrobacterium* εκτός του T-DNA δεν κινητοποιείται και δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των φυτών, για πολύ καιρό υπήρχε η άποψη ότι ολόκληρο το πλασμίδιο T_i εισερχόταν μέσω του *Agrobacterium* στο φυτικό κύτταρο. Μετά από αναλύσεις βρέθηκε ότι μόνο η περιοχή T-DNA του πλασμιδίου T_i ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των φυτών. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται με επιπρόσθετα αποτελέσματα από την αλληλουχία του DNA στις γειτνιάσεις μεταξύ του T-DNA που έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα και του φυτικού DNA, από διαφορετικά καρκινικά κύτταρα. Το τμήμα αυτό προσδίδει νέες φυσιολογικές λειτουργίες και χαρακτηριστικά στα φυτικά κύτταρα. Είναι όντως αξιοπερίεργο το γεγονός ότι ένα τόσο μικρό τμήμα DNA σε σχέση με το γονιδίωμα του φυτού να εξουσιάζει όλο τον βιολογικό μηχανισμό του κυττάρου και να αλλάζει ριζικά τη φυσιολογία και την οντότητα του κυττάρου αυτού (Χατζόπουλος, 2001).

Οι γειτονικές αλληλουχίες του γονιδιωματικού DNA στις οποίες γίνεται η ενσωμάτωση του T-DNA στο γονιδίωμα του φυτού φαίνεται να είναι τυχαίες. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι μόνο οι καθορισμένες και συντηρημένες συνοριακές αλληλουχίες του T-DNA είναι αναγκαίες για την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα των φυτών. Τότε, οποιοδήποτε DNA το οποίο περιβάλλεται από αυτά τα συντηρημένα συνοριακά, μπορεί να ενσωματωθεί στο φυσικό γονιδίωμα μια και μεταλλάξεις που αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων που κωδικοποιούνται από τα γονίδια μέσα στο T-DNA δεν παρεμβαίνουν στη διαδικασία της μεταφοράς.

Οι πρώτοι φορείς προέκυψαν από πλασμίδια T_i με μεταλλάξεις των γονιδίων βιοσύνθεσης των ορμονών στην περιοχή T-DNA. Η δυνατότητα εισαγωγής συγκεκριμένων γονιδιακών στοιχείων στα φυτά είναι μια ουσιαστική παράμετρος των

μοριακών προσεγγίσεων της βιολογίας των φυτών. Ο απώτερος σκοπός τέτοιων προσεγγίσεων κυμαίνεται από την ανάλυση φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου ή του οργανισμού μέχρι την ανάκτηση αναγεννημένων κανονικών και γόνιμων φυτών, τα οποία όχι μόνο έχουν το γενετικό αυτό στοιχείο, αλλά μεταβιβάζουν το εισαγόμενο γονίδιο στις επόμενες γενιές. Ο μετασχηματισμός μπορεί να οριστεί λειτουργικά σαν την εισαγωγή γενετικού υλικού στο φυτικό κύτταρο, οδηγώντας σε πυρηνική ή οργανιδιακή ένθεση και σε σταθερή κληρονομικότητα του υλικού αυτού. Ο ορισμός αυτός διαχωρίζει το μετασχηματισμό από την παροδική έκφραση κατά την οποία το γενετικό υλικό εισάγεται μέσω φυσικής λήψης και μπορεί να δείχνει μια βραχυπρόθεσμη μιτωτική σταθερότητα στα κύτταρα, κυρίως λόγω του μεγάλου αριθμού μορίων που εισάγονται στο κύτταρο και όχι λόγω της ένθεσής του στο φυτικό γονιδίωμα (Χατζόπουλος, 2001).

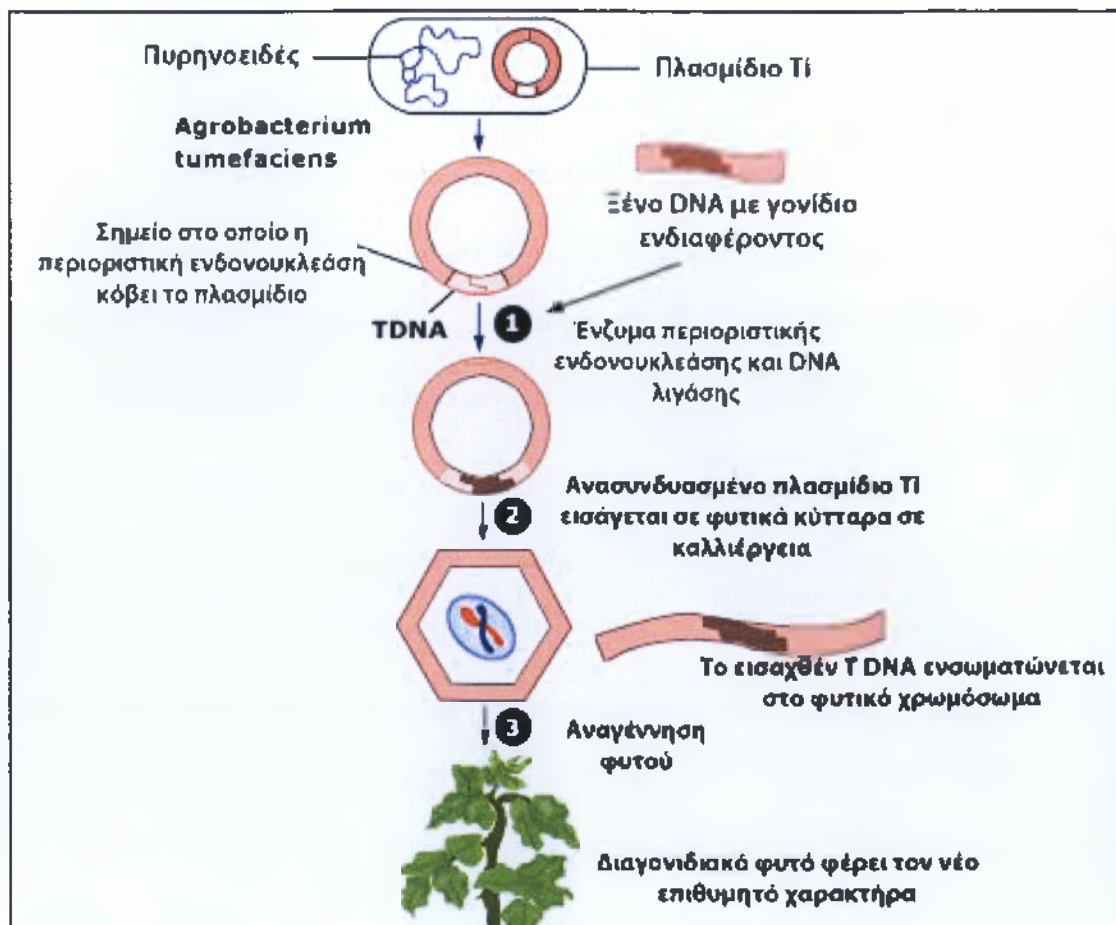
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ

Ο μετασχηματισμός και ακολούθως η παραγωγή διαγονιδιακών φυτών γίνεται χρησιμοποιώντας κάποιο σύστημα μη ογκογονικών φορέων. Η επιλογή του συστήματος των φορέων και του στελέχους στην αρχή γίνεται εμπειρικά. Μεγάλα και ετερογενή έκφυτα από τομές οργάνων περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων. Τέτοιες τομές από φύλλα, στήμονες, κονδύλους, ρίζες, μίσχους και τμήματα φυταρίων περιέχουν συνήθως διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που είναι δεκτικοί στο μετασχηματισμό και αποκρίνονται στην κυτταροκαλλιέργεια με αποδιαφοροποίηση και κυτταροδιαίρεση. Μετά τη μόλυνση με *Agrobacterium* γίνεται επιλογή σωματικών εμβρύων που αναπτύσσονται πάνω σε κάλλο, σε ένα θρεπτικό μέσο που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής και μια ποσότητα βακτηριοστατικού (Old and Primrose, 2000).

Εναλλακτικά, μετασχηματισμένοι και αναγεννημένοι βλαστοί που

αναπτύσσονται είτε απ'ευθείας πάνω στο έκφυτο, είτε από κάλλο που δημιουργήθηκε στο έκφυτο σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα, επιλέγονται με κατάλληλα αντιβιοτικά. Συνήθως η αναγέννηση χωρίζεται σε δύο στάδια, όπου στο πρώτο υπάρχει η πίεση της επιλογής με τη χρησιμοποίηση κατάλληλης χημικής ένωσης στο θρεπτικό μέσο, ενώ το δεύτερο στάδιο γίνεται απουσία της επιλεκτικής πίεσης. Ακολουθεί ριζογένεση όταν η διαδικασία γίνεται δια μέσω της στρατηγικής της οργανογένεσης.

Ο μεγάλος αριθμός αναγεννημένων βλαστών επηρεάζει δραστικά το χρόνο και την ταυτοποίηση των διαγονιδικών φυτών. Ταυτόχρονη επιλεκτική πίεση με διάφορα αντιβιοτικά ή χημικές ενώσεις είναι αναγκαία αλλά με τη σημερινή εξέλιξη των διαφόρων φορέων που χρησιμοποιούνται για μετασχηματισμό μέσω *Agrobacterium* δεν είναι αναγκαστική για τα μετέπειτα στάδια επιλογής των διαγονιδιακών φυτών. Στην περίπτωση αυτή τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (γονίδια επιλογής) αποβάλλονται από το γονιδίωμα των τελικά επιλεγμένων διαγονιδιακών φυτών (Old and Primrose, 2000).



Εικόνα 1. Βασικές αρχές δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων φυτών. Ti plasmid: πλασμίδιο Ti. 1: Το Ti πλασμίδιο και το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει κόβονται με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο (restriction endonuclease enzyme). Το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει συγκολλάται με τη χρήση του ενζύμου DNA λιγάση με το Ti πλασμίδιο, το οποίο επανακυκλοποιείται δημιουργώντας ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (recombinant Ti plasmid). 2: Το ανασυνδυασμένο Ti πλασμίδιο εισέρχεται σε φυτικά κύτταρα σε καλλιέργεια και το T DNA ενσωματώνεται στο φυτικό γονιδίωμα. 3: Τα μεταλλαγμένα, διαγονιδιακά φυτά που φέρουν τον επιθυμητό χαρακτήρα, επιλέγονται και αναγεννώνται (Old and Primrose, 2000).

ΓΟΝΙΔΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

Τα μετασηματισμένα φυτικά κύτταρα ή τα διαγονιδιακά φυτά ταυτοποιούνται συνήθως με θετική επιλογή. Η επιλογή του γονιδίου μάρτυρα που μεταφέρεται στο γονιδίωμα των φυτών προκαθορίζεται από το είδος της χημικής ουσίας που χρησιμοποιείται για επιλογή, παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα την ανάπτυξη των μη μετασηματισμένων φυτών. Επιπλέον, η έκθεση των μετασηματισμένων κυττάρων στη χημική ουσία πρέπει να επηρεάζει ελάχιστα τον πολλαπλασιασμό των

κυττάρων και την αναγέννηση και ανάπτυξη σ' ένα ολοκληρωμένο και γόνιμο φυτό.

Η έκφραση του γονιδίου επιλογής δεν θα πρέπει να τροποποιεί τη φυσιολογία του κυττάρου, ούτε να διακόπτει τη μεταβολική δραστηριότητα του κυττάρου, θα πρέπει όμως να προστατεύει αποτελεσματικά το κύτταρο από την επιλεκτική πίεση της χημικής ουσίας και να παρέχει μια σαφή διάκριση ανάμεσα στα μετασηματισμένα και στα μη μετασηματισμένα κύτταρα. Το γονίδιο NPTII που κωδικοποιεί τη φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης είναι από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες επιλογής για το αντιβιοτικό καναμυκίνη, κυρίως στα δικότυλα φυτά όπως *Arabidopsis*, καπνός, ντομάτα κ.α. δεν είναι όμως τόσο αποδοτικό στα ψυχανθή. Το αντιβιοτικό αυτό δεν εφαρμόζεται με επιτυχία στα μονοκότυλα, γιατί αυτά τα φυτά και ιδίως τα Gramineae δείχνουν μια φυσική ανθεκτικότητα και είναι ανεπηρέαστα σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις καναμυκίνης, επιτρέποντας έτσι την αναγέννηση μη μετασηματισμένων φυτών σε θρεπτικό μέσο που περιέχει καναμυκίνη. Η καναμυκίνη είναι το γνωστότερο μέλος των αντιβιοτικών αμινογλυκοσιδίων. Άλλα μέλη είναι η γκενταμυκίνη, το G418 και η νεομυκίνη. Όλα τα γνωστά αμινογλυκοσιδία αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση στους προκαρυώτες (Χατζόπουλος, 2001).

Η καναμυκίνη, η γκενταμυκίνη, η νεομυκίνη και η πουρομομυκίνη συνδέονται με την 30S υπομονάδα του ριβοσώματος αναστέλλοντας την έναρξη της μετάφρασης. Τα ριβοσώματα των οργανιδίων του χλωροπλάστη και του μιτοχονδρίου είναι επίσης επιρρεπή σ' αυτά τα αντιβιοτικά. Το αποτέλεσμα της εφαρμογής των αντιβιοτικών αυτών στα φυτά είναι η χλώρωση και αποχρωματισμός των φύλλων λόγω έλλειψης σύνθεσης χλωροφύλλης. Η φωσφορυλιωμένη μορφή του αντιβιοτικού είναι ανενεργή και αποτρέπεται η σύνδεσή του με το ριβόσωμα. Αποτοξίνωση της καναμυκίνης γίνεται και με το ένζυμο 3-N ακετυλοτρανσφεράση της γκενταμυκίνης

με την ακετυλίωση της αμινομάδας του δακτυλίου II. Η αποτοξίνωση της γκενταμυκίνης μπορεί να γίνει μόνο από το ένζυμο. Η υγρομυκίνη απενεργοποιείται με την φωσφορυλίωση της υδροξυλικής ομάδας από το ένζυμο που ονομάζεται επίσης HPT. Η καναμυκίνη που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο μεταφέρεται μέσω διάχυσης στους φυτικούς ιστούς διαμέσω των μεσοκυττάρων χώρων. Η διάχυση αυτή γίνεται μόνο σε σχετικά μικρές αποστάσεις που σημαίνει ότι στα ευμεγέθη έκφυτα μόνο τα μέρη που έρχονται σε άμεση επαφή με το θρεπτικό μέσο έχουν ανασταλτική ποσότητα αντιβιοτικού. Στο ρύζι η καναμυκίνη επηρεάζει αρνητικά την αναγέννηση ακόμη και των μετασχηματισμένων φυτών. Το G418 έχει αρκετά καλή δραστηριότητα αναστολής της ανάπτυξης και στα μονοκότυλα. Η υγρομυκίνη είναι επίσης ένα άλλο χρήσιμο αντιβιοτικό στα μονοκότυλα και δικότυλα φυτά. Το αντιβιοτικό μπλεομυκίνη αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και τη μίτωση. Η επίδραση του αντιβιοτικού αυτού γίνεται σε ιστούς με έντονη κυτταρική διαίρεση όπως μεριστώματα (Χατζόπουλος, 2001; Pena, 2005).

Επιπλέον των αντιβιοτικών, τα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρύτατα σαν χημικές ουσίες επιλογής στα πρωτόκολα μετασχηματισμού φυτών. Αυτά είναι η φωσφινοθρισίνη και το gryphosate. Τα γονίδια επιλογής που χρησιμοποιούνται έναντι της επιλεκτικής πίεσης των ζιζανιοκτόνων βρίσκονται κάτω από την επίδραση του συστατικού προαγωγέα 35S του ιού CaMV. Άλλα ζιζανιοκτόνα είναι το χλωροσουλφουρόν, βρωμοξυνίλιο, ατραζίνη και το ανάλογο της αυξίνης 2,4 -D. Το methotrexate δημιουργεί ελλείψεις θυμιδικού με την αναστολή του ενζύμου ρεδουκτάσης του διυδροφορικού. Το θυμιδικό είναι πρόδρομο μόριο της βάσης θυμίνη του DNA. Έτσι η βιοσύνθεση του νουκλεοτιδίου αναστέλλεται, με άμεσο αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Το αντίστοιχο ένζυμο από το ποντίκι παρέχει ανθεκτικότητα γιατί έχει ελαττωμένη συγγένεια στο methotrexate. Το γονίδιο dhfr

έχει χρησιμοποιηθεί στη *Petunia hybrida* στο *Brassica napus*, στο *Panicum maximum*, κ.α. με ικανοποιητική επιτυχία στην επιλογή μετασχηματισμένων φυτών (Χατζόπουλος, 2001).

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΦΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Γενικά, για ένα φυτό που πρόκειται να μετασχηματιστεί, πρέπει να ταυτοποιηθούν τα ακόλουθα: 1) καθορισμός του θρεπτικού μέσου που επάγει αναγέννηση μέσω οργανογένεσης ή σωματικής εμβρυογένεσης, 2) εύρεση του δεκτικού εκφύτου, του μεγέθους του και των συνθηκών ανάπτυξης, 3) ταυτοποίηση των επιπέδων των βακτηριοστατικών που επιτρέπουν την ανάπτυξη κάλλου ή βλαστού αλλά παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό του *Agrobacterium*, 4) εύρεση της ελάχιστης συγκέντρωσης της χημικής ένωσης επιλογής η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη μη μετασχηματισμένου κάλλου ή αναγεννημένου βλαστού, 5) χρόνος συγκαλλιέργειας εκφύτου *Agrobacterium*, πυκνότητα και γενετικό υπόβαθρο βακτηρίων καθώς και τύπος φορέων (Χατζόπουλος, 2001; Pena, 2005).

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΠΝΟΥ ΜΕ ΔΙΣΚΙΑ ΦΥΛΛΩΝ

Ο τρόπος αυτός είναι αρκετά επιτυχής για μερικά είδη *Solanaceae* όπως ο καπνός, η ντομάτα, η *Petunia hybrida* αλλά δεν είναι και τόσο ικανοποιητικός για άλλα είδη όπως η πατάτα. Τα φυτά δότες είναι προτιμότερο να αναπτύσσονται *in vitro* σε επωαστήρα ή σε θερμοκήπιο. Επάγεται η βλαστική αναγέννηση και ακολούθως δημιουργείται ρίζα σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα πάντα παρουσία καναμυκίνης. Τα *Agrobacterium* που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκαλλιέργεια με τα δισκία φύλλων απομακρύνονται με τη χρήση βακτηριοστατικών – αντιβιοτικών, όπως σεφοταξίμη μη τοξική στις δεδομένες συγκεντρώσεις για τα φυτά. Η πλειονότητα των επιγενών βλαστών που

σχηματίζονται στα σημεία τομής πρέπει να προέρχονται από αποδιαφοροποιημένα κύτταρα, επιρρεπή στο μετασχηματισμό δια μέσου *Agrobacterium*. Είναι κατανοητό ότι μόνο φυτά που μπορούν να δώσουν τέτοια οργανογένεση από κύτταρα φύλλου μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

Η επιλογή των μετασχηματισμένων βλαστών σε θρεπτικό μέσο με αντιβιοτικό είναι σχετικά πιο δύσκολη από αυτή του κάλλου, διότι είναι δυνατό να επιζήσουν παρουσία αντιβιοτικού και οι μη μετασχηματισμένοι βλαστοί. Γενικά όμως οι ρίζες είναι πιο ευαίσθητες στα αντιβιοτικά. Έτσι η ικανότητα του βλαστού να ριζοβολήσει κάτω από την επιλεκτική πίεση του αντιβιοτικού είναι μια πολύ καλή ένδειξη της πραγματοποίησης του μετασχηματισμού. Ο πολλαπλασιασμός των μετασχηματισμένων βλαστών ακολουθεί τη πορεία της δημιουργίας ενός φάσματος ταυτοποιημένων διαγονιδιακών απογόνων που προέρχονται από ανεξάρτητα γεγονότα μετασχηματισμού (Χατζόπουλος, 2001).

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΦΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΛΛΟΥ

Ο μετασχηματισμός και η παραγωγή διαγονιδιακών φυτών τις περισσότερες φορές καθίσταται αδύνατος, εάν δεν υπάρχει ένα κατάλληλο έκφυτο για να αναγεννήσει δια μέσω κάποιου πρωτοκόλλου ιστοκαλλιέργειας ένα ολοκληρωμένο φυτό. Ο κάλλος που σχηματίζεται στις τομές του εκφύτου και τείνει σε ένα μεγάλο ποσοστό προς ανάπτυξη καταβολών βλαστών, είναι συνήθως ικανός για αναγέννηση. Τέτοιοι κάλλοι μπορούν να αναγεννήσουν νέους κάλλους μετά τον πολλαπλασιασμό τους και τη μεταφορά τους σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα για τουλάχιστον μερικές ανακαλλιέργειες. Η ικανότητα αναγέννησης τέτοιων κάλλων κάτω από συνθήκες επιλογής ελαττώνει δραστικά τη πιθανότητα της δημιουργίας αναγεννημένων βλαστών από προϋπάρχουσες καταβολές οργάνων χωρίς την κυτταρική

αποδιαφοροποίηση. Έτσι, οι βλαστοί που προκύπτουν προέρχονται από μετασχηματισμένα και αποδιαφοροποιημένα κύτταρα. Ακολουθείται η μέθοδος της συγκαλλιέργειας *Agrobacterium*. Τα έκφυτα αυτά θα δημιουργήσουν κάλλο στις τομές σε θρεπτικό μέσο που επάγει είτε σωματική ενβρυογένεση, είτε οργανογένεση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ολοκληρωμένων διαγονιδιακών φυτών τα οποία διατηρούνται και πολλαπλασιάζονται κανονικά. Εναλλακτικά ακολουθείται συγκαλλιέργεια κάλλου με *Agrobacterium* και επιλογή των μετασχηματισμένων κάλλων μετά από ανάπτυξη αυτών σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τη χημική ένωση επιλογής (Galun and Braiman, 1997).

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΚΕΝΟΥ

Πολύ λίγα είδη φυτών είναι δεκτικά στο μετασχηματισμό με τον τρόπο αυτό. Παρ' όλα αυτά όμως είναι ένας «καθαρός» τρόπος μετασχηματισμού και δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών. Το φυτό *Arabidopsis* χρησιμοποιείται κατ' εξοχήν για *in planta* μετασχηματισμό. Όμως, η μέθοδος αυτή επιδέχεται τροποποιήσεις και εξελίξεις ώστε να είναι δυνατόν να εφαρμοστεί και σε άλλα φυτά με εμπορική και οικονομική σημασία. Το ποσοστό αποδοτικότητας του μετασχηματισμού ποικίλει από το μέγεθος και το αναπτυξιακό στάδιο του άνθους, την ανάπτυξη του φυτού και τις συνθήκες ανάπτυξης.

Ο τρόπος της μόλυνσης μη πληγωμένων φυτών από το *Agrobacterium* σε κυτταρικό επίπεδο είναι άγνωστος, ενώ για τον μετασχηματισμό μέσω *Agrobacterium* δεν είναι απαραίτητη η δημιουργία τραύματος στο φυτό. Το φυτό αναπτύσσονται κανονικά σε συνθήκες τέτοιες ώστε να γίνουν αρκετά σθεναρά. Όταν τα φυτά έχουν σχηματίσει τα πρώτα τους άνθη είναι σχεδόν έτοιμα να χρησιμοποιηθούν. Τα άνθη αυτά αποκόπτονται και τα φυτά τοποθετούνται ανάποδα και εμβαπτίζονται μέσα σε ένα διάλυμα που περιέχει αρκετά μεγάλη πυκνότητα *Agrobacterium*, και ακολούθως

εφαρμόζεται κενό για ορισμένα λεπτά. Τα φυτά, αφού στεγνώσουν, μεταφέρονται σε επωαστήρα με ελεγχόμενες συνθήκες και αναπτύσσονται μέχρι να κλείσουν τον κύκλο ζωής τους και δημιουργήσουν σπέρματα. Τα σπέρματα συλλέγονται και τοποθετούνται σε απλά θρεπτικά μέσα που περιέχουν την επιλεκτική πίεση, ώστε μετά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, να μεγαλώνουν μόνο αυτά στα οποία έχει γίνει ο μετασχηματισμός (Old and Primrose, 2000; Χατζόπουλος, 2001; Pena, 2005).

Το ποσοστό αποδοτικότητας του μετασχηματισμού κυμαίνεται από 0.1-1% των συνολικών σπόρων, όμως οι εργατοώρες που απαιτούνται για το μετασχηματισμό με τον τρόπο αυτό, καθώς και για τη διαδικασία της επιλογής είναι πολύ λίγες. Επιπλέον, με τη μεθοδολογία αυτή που στην ουσία είναι *in planta* δεν απαιτείται κάποιο στάδιο κυτταροκαλλιέργειας και αναγέννησης μέσω κάλλου ή απ'ευθείας οργανογένεσης (Χατζόπουλος, 2001).

ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η ιστοκαλλιέργεια δεν είναι μια θεωρητική προϋπόθεση στο μετασχηματισμό των φυτών αλλά εφαρμόζεται σε όλες σχεδόν τις σύγχρονες πρακτικές του μετασχηματισμού, ώστε να επιτευχθεί ικανή αποδοτικότητα σε όλα τα επίπεδα του πρωτοκόλλου, από τη γονιδιακή μεταφορά και επιλογή, μέχρι την αναγέννηση των μετασχηματισμένων φυτών. Στα συστήματα της ιστοκαλλιέργειας που χρησιμοποιούνται στο μετασχηματισμό, το σημαντικότερο είναι η παροχή μεγάλου αριθμού αναγεννήσιμων κυττάρων που είναι προσιτά στην κατεργασία της γονιδιακής μεταφοράς και τα οποία θα διατηρήσουν την ικανότητά τους για αναγέννηση καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Για τη παραγωγή διαγονιδιακών φυτών δεν υπάρχει κάποιος ιδιαίτερος λόγος που να προτιμάται η σωματική εμβρυογένεση από την οργανογένεση. Η επιλογή της μιας μεθόδου από την άλλη βασίζεται απλά σε παράγοντες που επηρεάζουν την ευκολία και την αποδοτικότητα

της μεθόδου, τη διαθεσιμότητα εκφύτων και την ελάχιστη χρονική διάρκεια που απαιτείται η ιστοκαλλιέργεια. Μια άλλη προσέγγιση είναι ο βομβαρδισμός σωματιδίων των μεριστωματικών ιστών, της σόγιας, βαμβακιού, φασολιού, και φυστικιού, ώστε με την ανάπτυξη του βλαστού να παραχθούν κυτταρικές σειρές με μετασχηματισμένο γενότυπο. Η επιλογή γίνεται με σάρωση των απογόνων που δημιουργούνται με εγγενή πολλαπλασιασμό. Η ανάπτυξη μεθόδων μετασχηματισμού φυτών έχει παραλληλιστεί με την ανάπτυξη αποδοτικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων *in vitro*, την επιλογή συγκεκριμένων εκφύτων και των πρωτοκόλλων αναγέννησης διαφόρων φυτικών ειδών. Σχεδόν πάντα, η εφαρμογή της υπάρχουσας μεθοδολογίας μετασχηματισμού για ένα δύστροπο είδος, εμπεριέχει ένα ή περισσότερα προβλήματα σε συνάρτηση με την *in vitro* καλλιέργεια. Καθώς αναπτύσσονται αποδοτικά πρωτόκολλα αναγέννησης, οι ερευνητές θέτουν και άλλες προϋποθέσεις για μετασχηματισμό, όπως την επιλογή υπέρ των μετασχηματισμένων κυττάρων. Ο συνδυασμός της επιλεκτικής πίεσης με τις τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας επιτρέπουν την κανονική οντογενετική ανάπτυξη από φυτό σε σπέρμα και τη μετάδοση του νεοεισαγόμενου γονιδίου στις επόμενες γενιές. (Yeoman, 1986; Galun and Braiman, 1997).

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΤΑ ΦΥΤΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΒΟΜΒΑΡΔΙΣΜΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Η τεχνική του βομβαρδισμού σωματιδίων έχει αναπτυχθεί από τους φυτοπαθολόγους στη δεκαετία του '60 στην προσπάθειά τους να τραυματίσουν φυτικά κύτταρα και να διευκολύνουν τη μόλυνση και την εισαγωγή ιϊκών σωματιδίων ή νουκλεϊκών οξέων. Αργότερα, ερευνητές του Πανεπιστημίου του Cornell ανέπτυξαν μηχανισμούς που επιτάχυναν σωματίδια βολφραμίου (διαμέτρου 1-4 μm) με ταχύτητα 250 m/s, ικανή να διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα και τις μεμβράνες του κυττάρου. Τα πρώτα πειράματα σε επιδερμικά κύτταρα κρεμμυδιού με σωματίδια βολφραμίου έδειξαν ότι, όταν χρησιμοποιήθηκαν σωματίδια καλυμμένα με ιϊκό RNA του ιού του μωσαϊκού του καπνού (TMV-RNA), το 40% των κυττάρων ανέπτυξαν ευδιάκριτα κρυσταλλικά εγκλείσματα υποδεικνύοντας την έκφραση του ιϊκού νουκλεϊνικού οξέος. Έτσι, αναγνωρίστηκε από την πρώτη κιόλας στιγμή ότι ο μηχανισμός του βομβαρδισμού σωματιδίων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και για την μεταφορά άλλων βιομορίων όπως πρωτεϊνών, ενζύμων, γενετικού υλικού ή και συνθετικών μακρομορίων (Old and Primrose, 2000; Oksman – Caldentey and Barz, 2002).

Από τότε μέχρι σήμερα ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών δεδομένων έχει δείξει ότι γονίδια - μάρτυρες, κυρίως β -γλουκουρονιδάση, εκφράζονται παροδικά σε βομβαρδισμένα κύτταρα *Arabidopsis*, καπνού, καλαμποκιού, σιταριού, ρυζιού, ελαιοκράμβης, κριθαριού κ.α. Η παροδική έκφραση των γονιδίων-μαρτύρων αλλά και των γονιδίων των φυτών που βομβαρδίστηκαν σε φυτά εξαρτιόνταν άμεσα από τον τύπο των κυττάρων, το αναπτυξιακό στάδιο των κυττάρων, καθώς και τον προαγωγέα που χρησιμοποιήθηκε στο εκάστοτε πείραμα. Έτσι, τα βομβαρδισμένα κύτταρα παρ'όλο που εξ ορισμού υφίστανται ένα ισχυρό τραυματισμό ή τουλάχιστον

κάποιο σοκ, εν τούτοις ανταποκρίνονται φυσιολογικά, αποδεικνύοντας την δυναμικότητα αλλά και την αποτελεσματικότητα των πειραμάτων βομβαρδισμού σωματιδίων σε ολόκληρα φυτά ή μεμονωμένους ιστούς ή κύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων - μαρτύρων εξαρτιόνταν άμεσα από την παρουσία του μετάλλου του μικροσωματιδίου είτε στον πυρήνα είτε πολύ κοντά σ' αυτόν. Έτσι η τελική θέση του μικροσωματιδίου μέσα στο κύτταρο είναι πολύ ουσιαστική (Χατζόπουλος, 2001).

Σήμερα ο βομβαρδισμός σωματιδίων χρησιμοποιείται ευρύτατα για την εισαγωγή DNA για παραγωγή και διάθεση κάποιου προϊόντος ή για μελέτη σε βακτήρια, μύκητες, φύκη, ανώτερα φυτά και ζώα. Στα φυτά ο σταθερός μετασχηματισμός και η παραγωγή διαγονιδιακών φυτών έχει επιτευχθεί σε διάφορους ιστούς και όργανα ενώ η παραγωγή διαγονιδιακών φυτών έχει επιτευχθεί σε τελείως διαφορετικά φυτά και δένδρα όπως σακχαρότευτλο, σιτάρι, ρύζι, παπάγια, λευκή και καλαμπόκι (Oksman – Caldentey and Barz, 2002).

Το τελικό αποτέλεσμα του βομβαρδισμού σωματιδίων είναι η μεταφορά και έκφραση του γονιδίου ή γονιδίων. Στην τεχνική του βομβαρδισμού σωματιδίων το πρώτο μέρος είναι η φυσική παράμετρος ενώ το δεύτερο μέρος είναι η βιολογική διάσταση της μεθοδολογίας. Η επιτάχυνση των μικροσωματιδίων επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους όπως με παλμούς αερίου, με ηλεκτρική εκκένωση υψηλής τάσης ή με πυρίτιδα. Η επιτάχυνση πρέπει να είναι τέτοια ώστε τα μικροσωματίδια να αποκτήσουν μια ταχύτητα περίπου 300m/s ώστε να εισχωρήσουν μέσω κυτταρικών τοιχωμάτων στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (Oksman – Caldentey and Barz, 2002).

Σήμερα, έχουν σχεδιαστεί φορητές συσκευές με παλμούς αερίων οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά DNA ακόμη και στον αγρό. Γενικά, οι συνθήκες βομβαρδισμού πρέπει να είναι ασφαλείς μια και τα σωματίδια

επιταχύνονται με μεγάλες ταχύτητες που ισοδυναμούν με σφαίρες. Ο σχεδιασμός των συσκευών θα πρέπει να γίνεται με ασφαλή τρόπο, ώστε η λειτουργία τους να αποκλείει οποιοδήποτε ατύχημα. Η ταχύτητα των σωματιδίων πρέπει να είναι ρυθμιζόμενη μια και οι συνθήκες για τον άριστο βομβαρδισμό εξαρτώνται από το είδος των κυττάρων ή του ιστού που θα τραυματιστούν. Η ακρίβεια των παραμέτρων, κυρίως της ταχύτητας όταν η συσκευή έχει οριστεί στις συγκεκριμένες θέσεις, είναι πολύ ουσιαστική.

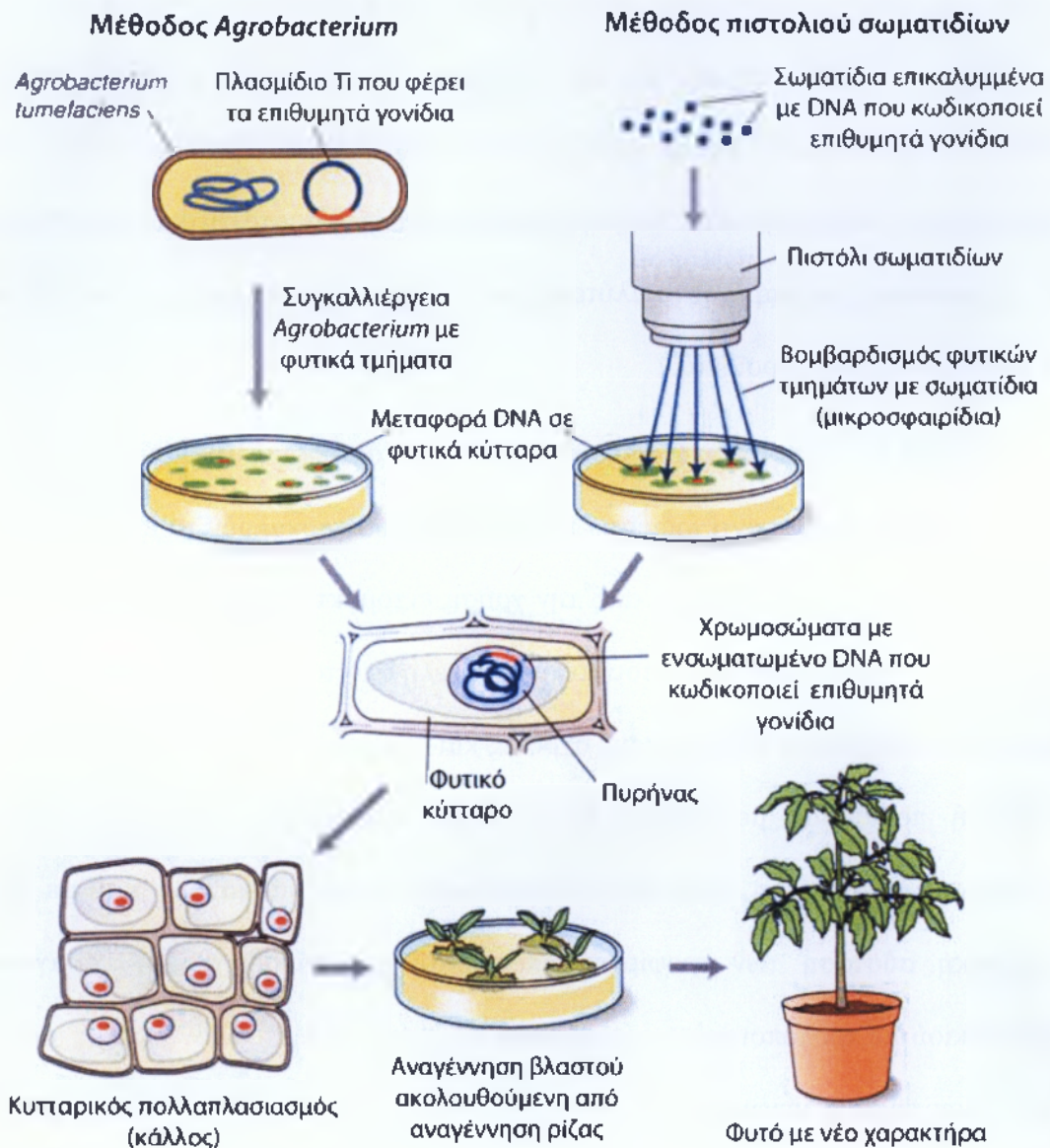
Είναι γνωστό ότι τα αποτελέσματα του βομβαρδισμού σωματιδίων ποικίλουν μεταξύ τους όταν επαναλαμβάνονται βομβαρδισμοί στις ίδιες συνθήκες. Ο σταθερός μετασχηματισμός κάποιων ιστών ή κυττάρων σε συνδυασμό με την αναγέννηση δύναται να οδηγήσει σε διαγονιδιακά φυτά με μια σταθερή επαναληψιμότητα. Το ποσοστό των φυτών αυτών μπορεί να διαφέρει και αυτό μπορεί να οφείλεται και στη μεταχείριση των κυττάρων ή ιστών στη περαιτέρω διαδικασία που μπορεί να συμπεριλαμβάνει και τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας. Είναι κατανοητό ότι έστω και μερικές προσμίξεις με ξένο προς το επιθυμητό DNA μεταφοράς ή μολύνσεις από άλλα σωματίδια μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα. Άρα, θα πρέπει να λαμβάνεται αρκετά καλή φροντίδα στην 'καθαρότητα' της συσκευής. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις απαιτείται γονιδιακή μεταφορά σε μεγάλο ποσοστό αλλά ταυτόχρονα ελαττωμένη κυτταρική θνησιμότητα (Old and Primrose, 2000).

Η νέκρωση των κυττάρων μετά το βομβαρδισμό, φυσικά δεν είναι ανεξάρτητη της ταχύτητας, του μεγέθους και της χημικής σύστασης των μικροσωματιδίων. Όμως, αυτές οι παράμετροι θεωρούνται «ανεξάρτητες». Γενικά, τα κύτταρα μπορούν να ανταπεξέλθουν και να «επισκευάσουν» το τραυματισμό που προέρχεται από τη διείσδυση ενός σωματιδίου κατά τη διάρκεια του βομβαρδισμού. Όμως, ορισμένες συνθήκες βομβαρδισμού για ένα συγκεκριμένο ιστό ή κυτταρική

σειρά μπορούν να δημιουργήσουν αποδιοργάνωση και κυτταρικό θάνατο. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε λόγω θρυμματισμού των σωματιδίων είτε λόγω των ωστικών κυμάτων. Το αποτέλεσμα είναι η νέκρωση της κεντρικής περιοχής, της περιοχής του ιστού που δέχεται τη μεγαλύτερη «πίεση» και που ορισμένες φορές ονομάζεται ζώνη θνησιμότητας. Ορισμένες τροποποιήσεις των συσκευών και τοποθετήσεις ορισμένων δικτυωτών πλεγμάτων περιορίζουν κατά πολύ τον κυτταρικό θάνατο. Η σύσταση οποιουδήποτε ιστού ενός φυτού είναι διαφορετική. Έτσι, η σύσταση αυτή απαιτεί αλλαγές στις ταχύτητες των σωματιδίων για βέλτιστο ποσοστό μετασχηματισμού που εξαρτάται κυρίως από το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος και τη διαπερατότητα αρκετών κυτταρικών επιπέδων μέχρι του κυττάρου που θα μπορέσει να αναγεννήσει το φυτό. Η ταχύτητα ρυθμίζεται από την επιτάχυνση, την απόσταση του στόχου και από το κενό. Η χημική σύσταση των σωματιδίων θα πρέπει να ελαχιστοποιεί τις αντιδράσεις με τη συσκευή αλλά και με το DNA και με το κύτταρο. Οι αντιδράσεις που δημιουργούνται προέρχονται από τις αλληλεπιδράσεις του ιστού με τα σωματίδια του βομβαρδισμού και είναι φυσικής, χημικής και βιολογικής σύστασης. Το DNA αλλά και οι άλλες χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται δεν θα πρέπει να αντιδρούν με το υλικό των σωματιδίων το οποίο θα πρέπει να είναι βιολογικά – βιοχημικά ανενεργό και μη τοξικό. Επίσης, το μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζει το μετασχηματισμό και τη γονιδιακή μεταφορά. Η μικρή διάμετρος συνεπάγει υψηλότερη πυκνότητα ώστε να επιτευχθεί η ορμή που απαιτείται για τη διείσδυση του κυτταρικού τοιχώματος (Χατζόπουλος, 2000; Old and Primrose, 2000; Oksman – Caldentey and Barz, 2002).

Ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών που αφορούν τη βελτίωση των φυτών με γονιδιακό μετασχηματισμό τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί εντυπωσιακά. Η μεθοδολογία του γονιδιακού χειρισμού δεν πρέπει να θεωρηθεί σαν αντικατάσταση

της κλασικής γενετικής βελτίωσης φυτών, αλλά συμπληρωματικής της παρ' όλο που και αυτή έχει περιορισμούς, οι οποίοι πηγάζουν από την ίδια τη μεθοδολογία, την ηθική και την ασφάλεια, καθώς επίσης και από τους επιστήμονες που ασχολούνται με το θέμα. Στην κλασική γενετική βελτίωση ο αριθμός των επιθυμητών χαρακτηριστικών που μπορούν να ανασυνδυαστούν είναι δυνητικά απεριόριστος ενώ στο μετασχηματισμό, ο αριθμός των γονιδίων που μπορούν να μεταφερθούν είναι περιορισμένος. Επίσης, οι βελτιωτές έχουν μια ευρεία εικόνα της καλλιέργειας με την οποία ασχολούνται και γνωρίζουν τη φυσιολογία και τη γενετική από αγρονομική σκοπιά, ενώ ο μετασχηματισμός από την άλλη μεριά, σχεδιάζεται και πραγματοποιείται από μοριακούς βιολόγους που συχνά έχουν μικρή εμπειρία στα αγρονομικά χαρακτηριστικά της καλλιέργειας. Η επιτυχία και η βελτίωση της καλλιέργειας εξαρτάται από τη συνδυασμένη προσπάθεια των κλασικών βελτιωτών με τους ειδικούς της μοριακής βιολογίας και βιοτεχνολογίας.



Εικόνα 2. Δημιουργία διαγονιδιακών φυτών από καλλιέργεια κάλλου έπειτα από μετασχηματισμό με *Agrobacterium* και από βομβαρδισμό σωματιδίων. Στη μέθοδο με *Agrobacterium*, το βακτήριο που φέρει το πλασμίδιο με το επιθυμητό γονίδιο, συγκαλλιιεργείται με κομμάτια φυτικού ιστού και το DNA έτσι μεταφέρεται και ενσωματώνεται στο φυτικό γένωμα. Θετικά μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και δημιουργούνται γενετικά τροποποιημένα έκφυτα από την φάση του κάλλου. Στον βομβαρδισμό σωματιδίων, σωματίδια καλυμμένα με το επιθυμητό DNA, βομβαρδίζουν κομμάτια φυτικού ιστού. Τα θετικά μετασχηματισμένα φυτικά κύτταρα σχηματίζουν έκφυτα από την φάση του κάλλου (Mirkon, 2003).

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Οι νέες επιστημονικές ανακαλύψεις σχετικά με την αγροτική βιοτεχνολογία χρησιμοποιούνται για να αυξήσουν την παραγωγικότητα των σπόρων, κυρίως με την

μείωση του κόστους παραγωγής ή με την μείωση των δαπανών για εντομοκτόνα και φυτοφάρμακα σε καλλιέργειες σε πιο εύκρατες περιοχές. Νέες ποικιλίες φυτών αναπτύσσονται με σκοπό την μεγαλύτερη αποδοτικότητα με μικρότερο κόστος, την δυνατότητα να καλλιεργούνται σε μεγαλύτερη ποικιλία κλιματολογικών συνθηκών, και την ικανότητα να παρέχουν καλύτερα (από διατροφικής πλευράς) και πιο φθηνά για τους καταναλωτές προϊόντα.

Πολλά από τα γενετικά τροποποιημένα φυτικά τρόφιμα (βαμβάκι, κριθάρι) έχουν σχεδιαστεί για να αντέχουν από την μόλυνση που προκαλούν τα έντομα, άλλα (κριθάρι, σόγια) για να αντέχουν από την χρήση εντομοκτόνων, ενώ κάποια για να καθυστερεί το «σάπισμα» τους (ντομάτες). Τα οφέλη από τα γενετικά τροποποιημένα σχετίζονται κατά κύριο λόγο με τους αγρότες και την αγροτική παραγωγή, αν και η παραγωγή προϊόντων με χαμηλό κόστος έχει και πιθανά οφέλη και στους καταναλωτές. Τα οφέλη προς τους καταναλωτές έχουν να κάνουν και με την διατροφική σύσταση των τροφίμων, όπως είναι για παράδειγμα η παραγωγή καλαμποκιού με τροποποιημένο περιεχόμενο σε λίπος. Ένα επιπλέον όφελος για το περιβάλλον είναι η μειωμένη χρήση παρασιτοκτόνων, ενώ η δοκιμασμένη χρήση ανθεκτικών ειδών πεπονιού, παπάγιας, πατάτας, ντομάτας, γλυκιάς πιπεριάς, ρυζιού, σόγιας και τσίλι έχουν βοηθήσει σε σημαντικό βαθμό τις αναπτυσσόμενες χώρες (Ντονά και Αρβανιτογιάννης, 2009).

Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ STARLING

Το καλαμπόκι Starling είναι ένα γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι το οποίο δημιουργήθηκε από την Aventis CropScience προκειμένου να εκφράζει μια εντομοκτόνα πρωτεΐνη. Αυτή η πρωτεΐνη προέρχεται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* (Bt) και έχει στόχο την καταπολέμηση των λεπιδόπτερων και των κολεόπτερων. Το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* (Bt) είναι ένα gram θετικό

βακτήριο, το οποίο βρίσκεται στο χώμα και έχει τοξική δράση σε μερικές κατηγορίες εντόμων, ενώ δεν έχει καμία επίδραση στα θηλαστικά και στα έντομα. Έτσι, η τοξική επίδραση αυτών των βακτηρίων χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει καλλιέργειες φυτών οι οποίες θα αντιστέκονται σε μια μεγάλη γκάμα εντόμων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τοξίνες εισάγονται στο γονιδίωμα του καλαμποκιού μέσω υποδοχέων, έτσι ώστε να παράγεται η τοξίνη από το ίδιο το καλαμπόκι. Το καλαμπόκι αυτό περιέχει επίσης γονίδια από το *Streptomyces hygroscopicus*, που το καθιστούν ανθεκτικό σε συγκεκριμένα παράσιτα. Το 1998, η υπηρεσία προστασίας περιβάλλοντος των ΗΠΑ ενέκρινε τη χρήση του καλαμποκιού Starling ως ζωοτροφή.

Το Σεπτέμβριο του 2000, η ομάδα καταναλωτών «Φίλοι της Γης», ανακοίνωσε ότι ίχνη από το DNA του καλαμποκιού αυτού βρέθηκαν σε τρόφιμα που παρασκευάστηκαν για τον άνθρωπο από τη βιομηχανία Kraft Foods. Αυτό πυροδότησε την απόσυρση πολλών εκατοντάδων προϊόντων καλαμποκιού από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ, καθώς και πολλές ανησυχίες για το πώς αυτό το γενετικά τροποποιημένο τρόφιμο πέρασε στις τροφικές προμήθειες του ανθρώπου (Sutton, 2003). Όταν βρέθηκαν ίχνη Γενετικά Τροποποιημένου καλαμποκιού στα τρόφιμα που προορίζονταν για τον άνθρωπο, παρατηρήθηκε ένας περιορισμένος αριθμός ασθενειών. Τότε το CDC (Centers for Disease Control) δεν βρήκε αποδείξεις ότι τα προϊόντα καλαμποκιού ήταν υπεύθυνα, αλλά μεθοδολογικοί περιορισμοί κατέστησαν τα αποτελέσματα μη αξιόπιστα γι' αυτό και το καλαμπόκι Starling αποσύρθηκε από την αγορά (Mehendale, 2004).

ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΑΤΑΤΑ

Η πατάτα, που δημιουργήθηκε από επιστήμονες στο πανεπιστήμιο Jawaharlal Nehru, στο Νέο Δελχί (Modur, 2003) εκφράζει 40% περισσότερη πρωτεΐνη από τις άγριες ή καλλιεργήσιμες πατάτες. Στην πατάτα εισήχθηκε ένα γονίδιο, το AmA1, από

το φυτό αμάρανθος, ένα δημητριακό που καταναλώνεται για αιώνες στην Αμερική και την Ασία. Η πατάτα είναι το πιο ευρέως καταναλισκόμενο μη δημητριακής φύσεως τρόφιμο στον κόσμο, αλλά περιέχει μικρές ποσότητες απαραίτητων αμινοξέων όπως λυσίνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη και τρυπτοφάνη. Η AmA1 πρωτεΐνη είναι μη αλλεργιογόνα και πλούσια σε απαραίτητα αμινοξέα. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα της σε απαραίτητα αμινοξέα είναι μεγαλύτερη από αυτή που συστήνει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ως απαραίτητη καθημερινή πρόσληψη για τον άνθρωπο. Παρ' όλα αυτά επειδή η πατάτα περιέχει μικρή ποσότητα πρωτεΐνης ακόμα και μια αύξηση στην έκφραση των πρωτεϊνών της τάξης του 40%, θα έχει σαν αποτέλεσμα μια αύξηση στην περιεκτικότητα της πατάτας σε πρωτεΐνη από 2% σε 2,8%. Σαν αποτέλεσμα δε θα έχει σημαντική επίπτωση στην υγεία.

Παρ' όλα αυτά, άλλα μέσα τα οποία θα ήταν πιο αποτελεσματικά για αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, όπως η σόγια ή το ψάρι, αφ' ενός είναι πιο ακριβά για τροποποίηση και αφ' ετέρου ο πληθυσμός που εικάζεται ότι πάσχει από υποπρωτεϊναιμία θα αγόραζε πατάτες παρά κάποιο από τα παραπάνω τρόφιμα, πιθανότατα λόγω κόστους (Modur, 2003).

Σημασία - πλεονεκτήματα της Διαγονιδιακής Τεχνολογίας

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

Η χρήση ζιζανιοκτόνων αποτελεί σήμερα μια αναπόφευκτη εφαρμογή στη γεωργία. Επιτρέπει, ταυτόχρονα, καλύτερο οικονομικό έλεγχο των ζιζανίων και αποτελεσματικότερο τρόπο καταπολέμησής τους σε μεγάλη κλίμακα. Η απώλεια της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής λόγω των ζιζανίων υπερβαίνει το 10 τοις εκατό, παρ'όλο που το κόστος χρήσης των 100 περίπου διαφορετικών ζιζανιοκτόνων ανέρχεται σε δισεκατομμύρια ευρώ. Αν και αρκετές χημικές ενώσεις που είναι χρήσιμες στη γεωργία είναι σχετικά ασφαλείς λόγω της βιοαποικοδόμησής τους ή είναι μη τοξικές στα ζώα, μερικές μολύνουν το περιβάλλον ή έχουν την ίδια επίδραση στα ζιζάνια όπως και στα καλλιεργούμενα φυτά. Η στρατηγική της δημιουργίας καλλιεργούμενων φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα δεν αντιμετωπίζει ολοκληρωμένα το πρόβλημα των ζιζανιοκτόνων, αλλά παρέχει μια λύση, ιδιαίτερα από τη μεριά των φυτών, ενάντια στις χημικές αυτές ενώσεις.

Λύση στο πρόβλημα αυτό έχουν δώσει οι μέχρι τώρα διαθέσιμες πληροφορίες που διευκρινίζουν τον τρόπο δράσης αρκετών ζιζανιοκτόνων, μαζί με τις ερευνητικές δραστηριότητες ταυτοποίησης οργανισμών ανθεκτικών στις χημικές αυτές ενώσεις. Το παραπάνω, σε συνδυασμό με την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στη μοριακή ανάλυση των γονιδιωμάτων των φυτών και της ικανότητας της μεταφοράς γονιδίων, ακόμη και από διαφορετικούς οργανισμούς στα φυτά, όπως επίσης και το γεγονός ότι αρκετά «γονιδιακά προϊόντα» έχουν επικρατή κληρονομικά χαρακτηριστικά, έχουν βοηθήσει στη δημιουργία φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα (Χατζόπουλος, 2001).

Μερικά από τα ζιζανιοκτόνα μολύνουν το περιβάλλον, παραμένουν και αυξάνονται προσθετικά στο έδαφος και στο νερό, ενώ άλλα είναι τοξικά για τα ζώα.

Η διευρυμένη χρήση χημικών ενώσεων, φιλικών προς το περιβάλλον, με σκοπό την καταπολέμηση ευρύτερου φάσματος ζιζανίων, θα αποτελέσει μια εναλλακτική και ελπιδοφόρα λύση. Μια άλλη εναλλακτική προσέγγιση στο πρόβλημα είναι δυνητικά ο μοριακός χειρισμός νέων 'γονιδιακών προϊόντων' ανθεκτικών σε μία νέα, ευρέως φάσματος, ομάδα ζιζανιοκτόνων. Η παροχή ανθεκτικότητας στα καλλιεργούμενα φυτά σε ευρέως φάσματος ζιζανιοκτόνα επιτρέπει τη χρήση και την επιλογή χημικών ενώσεων που είναι περιβαλλοντικά αποδεκτές και δεν επιδεικνύουν καμία τοξικότητα.

Πολλά ζιζανιοκτόνα ασκούν τη δράση τους απενεργοποιώντας πρωτεΐνες (συνήθως ένζυμα) φυτικών βιοσυνθετικών μονοπατιών ή φωτοσύνθεσης, που εν γένει είναι λειτουργίες ζωτικής σημασίας για τα φυτά. Για το λόγο αυτό, μερικά ζιζανιοκτόνα είναι μη επιλεκτικά ως προς τη δράση τους σε καλλιεργούμενα φυτά και σε ζιζάνια. Άλλα ζιζανιοκτόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιλεκτικά σε «ανθεκτικά φυτά». Η «ανθεκτικότητα» αυτή προέρχεται, κυρίως, από διαφορετική λήψη ή διαφορετικό μεταβολισμό του ζιζανιοκτόνου από το καλλιεργούμενο φυτό ή από την ακριβή χρονική εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου.

Σήμερα έχουν αναπτυχθεί δύο στρατηγικές που παρέχουν στα φυτά ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα: 1) Η εισαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα ή ενζυμικά συστήματα που αποικοδομούν ή αποτοξινώνουν τη χημική ένωση, πριν τη δράση μέσα στο φυτικό κύτταρο, και 2) η τροποποίηση γονιδίου που κωδικοποιεί ένζυμα φυτών ή άλλα ευαίσθητα βιοχημικά προϊόντα – στόχους του ζιζανιοκτόνου, ελαττώνοντας την ικανότητα του ζιζανιοκτόνου να συνδεθεί με την πρωτεΐνη – στόχο προσδίδοντας έτσι ανθεκτικότητα στη χημική ένωση. Μια εναλλακτική προσέγγιση της στρατηγικής αυτής είναι η υπερπαραγωγή της φυσιολογικής μη τροποποιημένης πρωτεΐνης (ενζύμου), επιτρέποντας έτσι το μεταβολισμό του φυτού σε ικανοποιητικά

επίπεδα, ανεξάρτητα της παρουσίας ή απουσίας του ζιζανιοκτόνου. Δυνητικά η στρατηγική της δημιουργίας φυτών που βιολογικά αναστέλλουν την εισαγωγή του ζιζανιοκτόνου στο φυτικό κύτταρο είναι μια άλλη εναλλακτική λύση. Τα διαγονιδιακά φυτά που έχουν τα χαρακτηριστικά αυτά μπορούν να επιλεγούν, λόγω ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιβιοτικά. Η δεύτερη όμως προσέγγιση δεν προσθέτει κανένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που να χρησιμοποιείται ή να αξιοποιείται από τη γεωργία. Αντίθετα προσθέτει επιπλέον γονιδιακό φορτίο.

Η πρώτη στρατηγική για την ανάπτυξη και δημιουργία φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα είναι η ταυτοποίηση ενζύμων που κωδικοποιούνται από γονίδια που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση ζιζανιοκτόνων. Η χρήση των γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπίδια που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση του ζιζανιοκτόνου, μπορεί να αποδειχθεί αρκετά ελπιδοφόρα, διότι τα ένζυμα αυτά όταν συντίθενται μέσα σε ευαίσθητα φυτά μπορούν να απενεργοποιούν το ζιζανιοκτόνο πριν την αναστολή του βιοχημικού «στόχου». Η προσέγγιση της αποτοξίνωσης έχει περισσότερα πλεονεκτήματα έναντι της στρατηγικής ανθεκτικότητας λόγω «τροποποιημένου στόχου» και προτιμάται όταν είναι άγνωστη η βιοχημική θέση δράσης ενός δεδομένου ζιζανιοκτόνου ή ακόμη όταν υπάρχει κάποια δυσκολία στη μοριακή μηχανική τροποποίησης του ενζύμου – στόχου. Όμως, τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα με τη δυνητική αποτοξίνωση ζιζανιοκτόνων θα πρέπει να τηρούν κάποιους κανόνες. Τα ένζυμα αποτοξίνωσης πρέπει να επιδεικνύουν απόλυτη εξειδίκευση για το ζιζανιοκτόνο ώστε όλες οι άλλες χημικές ενώσεις του φυτού που απαιτούνται για τη φυσιολογία και ανάπτυξη του φυτού να μη τροποποιούνται. Το ένζυμο θα πρέπει να κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, να μην απαιτεί πολύπλοκα συνένζυμα για δράση ή αν απαιτεί βιομόρια, αυτά να βρίσκονται στο φυτικό κύτταρο, να επιδεικνύει καλή ενζυμική κινητική και το προϊόν της αντίδρασης να ασκεί

ελάχιστη έως καθόλου τοξικότητα. Τα γονίδια αυτά μπορεί να προέρχονται από διάφορες πηγές όπως μικροοργανισμούς (βακτήρια , μύκητες, κ.λ.π) ή διάφορα είδη φυτών ανθεκτικών στα δεδομένα ζιζανιοκτόνα.

Ο γενετικός και μοριακός χειρισμός είναι ευκολότερος στα βακτήρια απ' ότι στα φυτά και στις περισσότερες περιπτώσεις η αποσαφήνιση του μεταβολικού μονοπατιού και της βιοχημικής ταυτοποίησης και απομόνωσης ενός ενζύμου που αποικοδομεί ή αποτοξινώνει το ζιζανιοκτόνο, τον καθιστά ευκολότερο. Έτσι, η ανάκτηση γονιδίων ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα προσεγγίζεται μέσω της απομόνωσης τέτοιων γονιδίων από βακτήρια που αποικοδομούν τα ζιζανιοκτόνα. Είναι γνωστό ότι πολλά ζιζανιοκτόνα βιομετατρέπονται πολύ γρήγορα σε περιβάλλον που έχει μολυνθεί από ζιζανιοκτόνα, προϋποθέτοντας την εμπλοκή μικροοργανισμών εδάφους. Έχει αναφερθεί και αποδειχθεί ότι τα ένζυμα που κωδικοποιούνται από γονίδια βακτηρίων αυτούσια ή μετά από τροποποιήσεις, είναι λειτουργικά και στα διαγονιδιακά φυτά. Έτσι, οι θεωρήσεις αυτές δημιουργούν μια κατάλληλη βάση για τη χρήση βακτηριακών γονιδίων αποτοξίνωσης σαν καθοριστικοί παράγοντες για την ανθεκτικότητα των φυτών στα ζιζανιοκτόνα. Ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων έχει σαρωθεί για την εξεύρεση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα αποικοδόμησης ή αποτοξίνωσης ζιζανιοκτόνων. Το γονίδιο *tfdA* από το *Alcaligenes eutrophus* στέλεχος JMP134 κωδικοποιεί τη 2,4-διχλωροφαινολοξική μονοξυγενάση (DPAM) που αποικοδομεί το ζιζανιοκτόνο 2,4-D. Το ένζυμο αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα και καταλύει την απομάκρυνση του φαινολοξικού τμήματος του 2,4-D δημιουργώντας τον μεταβολίτη 2,4-διχλωροφαινόλη, που επιδεικνύει περιορισμένη φυτική τοξικότητα σε συγκεντρώσεις 10mg/l. Τα διαγονιδιακά φυτά καπνού που έχουν ενσωματώσει το χμαιρικό γονίδιο με τον προαγωγέα του ιού CaMV 35S:*tfdA*, επιδεικνύουν τρεις έως πέντε φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο 2,4-D. Η χρήση

γονιδίων που απομονώνονται από μικροοργανισμούς, μεταφέρονται, ενσωματώνονται και εκφράζονται σε διαγονιδιακά φυτά, αποτελεί μια πολύ καλή στρατηγική διότι παρέχει στον αγρό πλήρη ανθεκτικότητα στα διάφορα ζιζανιοκτόνα.

Αρκετά είδη αγρονομικού ενδιαφέροντος είναι φυσιολογικά ανεκτικά σε εξειδικευμένα ζιζανιοκτόνα. Αυτή η ανεκτικότητα επιτρέπει τη χρήση των συγκεκριμένων ζιζανιοκτόνων στον επιλεκτικό έλεγχο των ζιζανίων, αξιοποιώντας έτσι τη διαφορική τοξικότητα, όπου ταυτόχρονα η παραγωγή παραμένει σε ικανοποιητικά επίπεδα. Η επιλεκτικότητα του ζιζανιοκτόνου στα αγρονομικά φυτά καθορίζεται από αρκετούς παράγοντες όπως τη μετακίνηση, τους ρυθμούς απορρόφησης από το φυτό, την υποκυτταρική εναπόθεση, την ποικιλομορφία στην ευαισθησία του στόχου και τη βιοχημική αποτοξίνωση σε μη τοξικούς μεταβολίτες ή και από το συνδυασμό όλων των ανωτέρω. Η βιοχημική αποτοξίνωση αποτελεί ενδεχομένως τον πιο σπουδαίο παράγοντα, διότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τέτοια ένζυμα μπορούν να διερευνηθούν και να μεταφερθούν σ' άλλα ευαίσθητα φυτά οικονομικού ενδιαφέροντος. Ένζυμα όπως οξειδάσες, αμιδάσες, αποκαρβοξυλάσες, και ενζυμικά συστήματα συζευγμένα με διάφορες ομάδες έχουν πιστοποιηθεί σε φυτικά είδη ανεκτικά στα ζιζανιοκτόνα (Ντονά και Αρβανιτογιάννης, 2009).

Ένα γνωστό παράδειγμα είναι η αποτοξίνωση της ατραζίνης και του αλαχλώρ από σειρές καλαμποκιού από το ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Το προϊόν της αντίδρασης δεν είναι τοξικό για το φυτικό κύτταρο και τελικά μεταβολίζεται περαιτέρω. Το ένζυμο βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά μέσα στο κύτταρο. Στις ανεκτικές ντομάτες στο *metribuzin*, η αποτοξίνωση εμπλέκει τη σύζευξη με τη UDP-γλυκόζη από μια N-γλυκοζυλοτρανσφεράση. Το ένζυμο στις ανεκτικές ποικιλίες έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα απ' ό,τι στις ευαίσθητες. Σε ορισμένες περιπτώσεις η αποτοξίνωση γίνεται μέσω πολύπλοκων ενζυμικών αντιδράσεων ή πολυενζυμικών

συστημάτων. Έτσι, στις περιπτώσεις που η αποτοξίνωση δεν εξαρτάται από ένα γονίδιο ή ένα ένζυμο, δημιουργεί τουλάχιστον μέχρι σήμερα, ένα βαθμό δυσκολίας στη χρήση των συστημάτων αυτών.

Υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους η βιοτεχνολογία μπορεί να βοηθήσει τους καταναλωτές των αναπτυσσόμενων χωρών. Πρώτον, η βιοτεχνολογία παρέχει ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για την βελτίωση της γεωργικής παραγωγής, με το να επιταχύνει τον παραδοσιακό υβριδισμό των σπόρων αλλά και με το να εισάγει νέα είδη μέσα από την γενετική. Δεύτερον, η χρήση εντομοκτόνων μπορεί να μειωθεί με την χρήση σπόρων ανθεκτικών στις μολύνσεις. Αυτή η εξέλιξη θα βοηθήσει την υγεία των αγροτών, θα μειώσει το κόστος παραγωγής και θα προστατέψει το περιβάλλον. Τρίτον, η βιοτεχνολογία μπορεί να βοηθήσει την διατροφή και την υγεία των καταναλωτών στις αναπτυσσόμενες χώρες με το να αυξήσει το περιεχόμενο σε βιταμίνες και μέταλλα των ειδών πρώτης ανάγκης. Πολλά από αυτά τα προϊόντα είναι υπό μελέτη, χωρίς κάποιο από αυτά να είναι έτοιμο για κατανάλωση.

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά μπορούν να έχουν ευεργετική δράση σε διάφορους άλλους τομείς, πέρα από την εκπλήρωση του στόχου στον οποίο βασίστηκε η παραγωγή τους. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες ασκούν πλέον ευεργετική δράση στο περιβάλλον σε σχέση με τις συμβατικές καλλιέργειες οδηγούν στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας προϊόντων, με χαμηλότερο κόστος παραγωγής και βελτιωμένη περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά.

- Ευεργετική δράση των ΓΤΦ στο περιβάλλον

Η χρήση γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών μπορεί να επιφέρει πολλά πλεονεκτήματα στο περιβάλλον όπως σημαντικές μειώσεις στη χρήση παρασιτοκτόνων και σε ψεκασμούς (συνεπώς και περιορισμό της χρήσης καυσίμων

που χρησιμοποιούνται από τα τρακτέρ, μείωση των αναθυμιάσεων, χαμηλότερο εργατικό κόστος αλλά και ζημιά στη γη από συμπίεση του εδάφους) οδηγώντας σε ενδεχόμενες αποδοτικότερες σοδειές και μειωμένο κόστος παραγωγής με αποτέλεσμα το χαμηλότερο κόστος των προϊόντων και το υψηλότερο εισόδημα των αγροτών (Moses, 2002).

- Παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας τροφίμων

Οι γενετικά τροποποιημένες σοδειές έχουν την πιθανότητα να ελαχιστοποιήσουν την πείνα σε εκατομμύρια ανθρώπους, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες, επειδή μέσω γενετικής τροποποίησης είναι εφικτή η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων τροφίμων που είναι και πιο θρεπτικά. Μεγάλες ποσότητες παράγονται επειδή τα Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα είναι πιο ανθεκτικά στα παράσιτα, σε χαμηλές θερμοκρασίες και την ξηρασία.

- Συμβολή στην αντιμετώπιση διατροφικών ανεπαρκειών

Στις αναπτυσσόμενες χώρες προβλήματα πολιτικά, διανομής και φτώχειας οδηγούν σε ελλείψεις τροφίμων και υποσιτισμό. Πολλοί πληθυσμοί ακολουθούν διατροφή βασισμένοι σε φυτικά τρόφιμα με ελάχιστα ή καθόλου γαλακτοκομικά προϊόντα και κρέας. Η αποκλειστική κατανάλωση δημητριακών, ριζών και βολβών εις βάρος ζωικών τροφών, οδηγεί σε ανεπαρκή πρόσληψη των απαραίτητων βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Η βελτίωση της σύστασης των φυτικών τροφίμων σε μικροθρεπτικά συστατικά μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική στρατηγική για την αντιμετώπιση ανεπαρκειών στον ανθρώπινο πληθυσμό αντικαθιστώντας ή συμπληρώνοντας άλλες στρατηγικές όπως η χρήση συμπληρωμάτων θρεπτικών συστατικών και ο εμπλουτισμός των τροφίμων.

Υπάρχουν πολλές απόψεις σχετικά με την ηθική και την κοινωνικοοικονομική

πλευρά της ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας πάνω στην γεωργική παραγωγή. Ειδικότερα οι συζητήσεις αφορούν την ανάπτυξη γενετικά τροποποιημένων φυτών και μικροοργανισμών, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους.

Πιθανοί Κίνδυνοι των Γενετικά Τροποποιημένων Φυτών

Η επικινδυνότητα των ΓΤ τροφίμων για τα ζώα και για τους πληθυσμούς που μπορεί να εκτεθούν σε αυτά μέσω της διατροφής περιλαμβάνει την πιθανότητα εκδήλωσης πλειοτρόπων ενεργειών και ενσωμάτωσης γονιδίων, τις επιδράσεις στα ζώα και στην ανθρώπινη υγεία από την αύξηση των αντιδιατροφικών ουσιών (anti-nutrients), τις επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία που οφείλονται στη χρήση ιικού DNA στα φυτά, την πιθανή μεταφορά γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά στα βακτήρια που βρίσκονται στο γαστρεντερικό και τη δυνητική συμμετοχή των ΓΤ τροφίμων στις αλλεργικές αντιδράσεις.

Η πιθανότητα εκδήλωσης πλειοτρόπων ενεργειών και ενσωμάτωσης γονιδίων.

Υπάρχει ανησυχία σχετικά με την παραπάνω δράση, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την σίγαση (silencing) γονιδίων, την πρόκληση μεταβολών στο επίπεδο έκφρασής τους ή την ενδεχόμενη ενεργοποίηση υπαρχόντων γονιδίων, τα οποία μέχρι τώρα παραμένουν μέσα στα κύτταρα ανενεργά. Αυτή η αλληλεπίδραση των υπαρχόντων γονιδίων και των βιοχημικών οδών μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή του μεταβολισμού με απρόβλεπτους τρόπους και στη δημιουργία νέων τοξικών ουσιών ή σε αύξηση των ήδη υπαρχόντων, όπως συνέβη ήδη με δύο ΓΤ τρόφιμα, την τρυπτοφάνη και το γ-λινολεϊκό οξύ. Επιπρόσθετα, η έρευνα της επιγενετικής σήμερα, δείχνει ότι τα γονίδια ασκούν μερικό έλεγχο στη βιοχημεία των οργανισμών και οι οργανισμοί διαθέτουν ένα επίπεδο ελέγχου πάνω από τα γονίδια, το οποίο αλληλεπιδρά με τα γονίδια. Το γεγονός αυτό εξηγεί γιατί η γενετική

μηχανική είναι τόσο απρόβλεπτη και με διαφορετικά αποτελέσματα σε κάθε προσπάθεια τροποποίησης που γίνεται, καθώς και γιατί τα προϊόντα αυτά δεν είναι πάντα σταθερά. Η πιθανότητα να υπάρχει μια άγνωστη ουσία στο ΓΤ τρόφιμο καθιστά αναγκαίο τον έλεγχο της τοξικότητας κάθε ΓΤ τροφίμου στα πειραματόζωα ως ολικό τρόφιμο και όχι ως απομονωμένη πρωτεΐνη, αν και υπάρχουν περιορισμοί στην εύρεση σχέσεων δόσης-αποτελέσματος (Hill et al., 1993).

Επιδράσεις στα ζώα και στην ανθρώπινη υγεία από την αύξηση των αντιδιατροφικών ουσιών.

Η εισαγωγή ενός νέου γονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της υπάρχουσας συγκέντρωσης των αντιδιατροφικών ουσιών, ορισμένες από τις οποίες δεν μπορούν να μειωθούν με τη θερμική κατεργασία. Ένα από τα περισσότερο παγκοσμίως διαθέσιμα εμπορικά ΓΤ προϊόντα σήμερα είναι η ανθεκτική στο ζιζανιοκτόνο Roundup ready σόγια, που μπορεί να παρουσιάσει αύξηση των αντιδιατροφικών ουσιών. Οι θερμοανθεκτικές αντιδιατροφικές ουσίες, όπως τα φυτοοιστρογόνα, οι γλυκινίνες και το φυτικό οξύ, έχει βρεθεί ότι προκαλούν προβλήματα στη γονιμότητα σε πρόβατα και σε βοοειδή, αλλεργικές αντιδράσεις και δέσμευση του φωσφόρου και του ψευδαργύρου, με αποτέλεσμα αυτά να μην είναι πλέον διαθέσιμα για το ζώο. Μια πιθανή αύξηση στη συγκέντρωση των αντιδιατροφικών ουσιών σε ένα ΓΤ τρόφιμο δεν θα έπρεπε να γίνει αποδεκτή, δεδομένου ότι μπορεί να καταναλωθεί ωμό (χωρίς να έχει υποστεί θερμική κατεργασία).

Πιθανές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία που οφείλονται στη χρήση ιικού DNA στα φυτά.

Οι περισσότερες ΓΤ καλλιέργειες χρησιμοποιούν τον ιό της ελαιοκράμβης

(cauliflower) 35S (CaMV35S) ως υποκινητή για την ενεργοποίηση του εισηγμένου γονιδίου. Υπάρχει διχογνωμία σχετικά με την πιθανότητα οριζόντιας μετάδοσης του ισχυρά λοιμογόνου CaMV35S και πρόκλησης ασθενειών, καρκινογένεσης, μεταλλαξιογένεσης, καθώς και ενεργοποίησης των ιών που βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση ή, τέλος, ακόμη και δημιουργίας νέων ιών. Ο ιός CaMV που βρίσκεται στα μη ΓΤ τρόφιμα δεν είναι ισχυρά λοιμογόνος και δεν μπορεί να απορροφηθεί από το γαστρεντερικό των θηλαστικών, σε αντίθεση με τον CaMV35S που βρίσκεται στα ΓΤ τρόφιμα και ενέχεται για ειδικούς κινδύνους (Ho et al., 2000). Αντίθετα, σύμφωνα με άλλους ερευνητές, αν και ο άνθρωπος λαμβάνει τον ιό CaMV και τον επαγωγέα του 35S σε υψηλές δόσεις, δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδηλώνουν ότι προκαλεί ασθένεια στον άνθρωπο ή ότι μπορεί να ανασυνδυαστεί με άλλους ανθρώπινους ιούς. Ωστόσο, σύμφωνα με ευρήματα η παροδική έκφραση στα κύτταρα των θηλαστικών διαγονιδίων που έχουν μεταγραφεί από τον επαγωγέα CaMV35S δείχνει ότι υπάρχει η πιθανότητα τα γονίδια που ελέγχονται από τον επαγωγέα 35S να εκφραστούν στα ζώα. Αντίθετα, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες δεν ανιχνεύτηκε μεταφορά DNA στους μυς και αντιγραφή του CaMV35S με την τεχνική PCR, αν και τονίζεται ότι θα πρέπει να διεξαχθούν και άλλες μελέτες.

Πιθανή μεταφορά γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά στα βακτήρια που βρίσκονται στο γαστρεντερικό.

Υπάρχει ανησυχία σχετικά με την πιθανότητα τα γονίδια αντίστασης στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες για τη σήμανση των ΓΤ καλλιεργειών να μεταφερθούν οριζόντια στα παθογόνα βακτήρια του γαστρεντερικού, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής θεραπείας. Αν και αυτή η πιθανότητα θεωρείται μικρή, έχουν χρησιμοποιηθεί άλλα γονίδια ιχνηθέτες, όπως η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)

της τσούχτρας (jelly fish). Η μόνη μελέτη που έχει γίνει αναφορικά με την τοξικότητα και την αλλεργιογόνο δράση της GFP σε αρσενικούς επίμυες για 26 ημέρες έδειξε ότι η GFP παρουσιάζει χαμηλό κίνδυνο για αλλεργιογόνο δράση. Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι μόνο ένα διαγονιδιακό φυτό, η ελαιοκράμβη (canola), που περιέχει GFP έχει ελεγχθεί ως προς την τοξικότητα. Όλοι οι διαγονιδιακοί οργανισμοί που περιέχουν ένα νέο γονίδιο ιχνηθέτη θα πρέπει να ελεγχθούν ως προς την τοξικότητα σε χρόνιες μελέτες, δεδομένου ότι τα ΓΤ τρόφιμα θα λαμβάνονται εφ' όρου ζωής.

Πιθανή απορρόφηση των γονιδίων που έχουν εισαχθεί σε ένα γενετικά τροποποιημένο φυτό από το γαστρεντερικό.

Μια από τις ανησυχίες σχετικά με τα ΓΤ τρόφιμα είναι η πιθανότητα τα γονίδια που εισάγονται σε ένα φυτό να προσληφθούν από το γαστρεντερικό και να ενσωματωθούν στο γενετικό υλικό του καταναλωτή. Πρόσφατες μελέτες δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν θραύσματα της ανθεκτικής στο glyphosate σόγιας σε διάφορους ιστούς που είχαν ληφθεί από χοίρους, οι οποίοι είχαν τραφεί με σόγια ανθεκτική στο glyphosate, και διαγονιδιακού και ενδογενούς φυτικού DNA στους μύς του στήθους στα κοτόπουλα. Επιπρόσθετα, μικρά θραύσματα από ΓΤ φυτά έχουν ανιχνευτεί στα λευκά αιμοσφαίρια και στο γάλα των βοοειδών καθώς και στους ιστούς των πουλερικών και των μυών που είχαν τραφεί με ΓΤ καλαμπόκι και σόγια, αντίστοιχα. Ακόμη, θραύσματα ανασυνδυασμένου cry1Ab γονιδίου έχουν ανιχνευτεί στο γαστρεντερικό χοίρων που είχαν τραφεί με ΓΤ καλαμπόκι, το οποίο περιείχε το βάκιλο *Bacillus thuringiensis* (Bt), ενώ δεν έχουν ανιχνευτεί στο αίμα. Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι μικρή ποσότητα από το DNA που έχει ληφθεί από το στόμα δεν διασπάται με τη φυσιολογική διαδικασία της πέψης. Το γεγονός ότι θραύσματα διαγονιδίων δεν ανιχνεύονται στο αίμα, αλλά μπορεί να ανιχνευτούν στους ζωικούς ιστούς με την PCR, υποδηλώνει ότι βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στην

κυκλοφορία και απαιτούνται περισσότερο ευαίσθητες μέθοδοι ανίχνευσής τους. Τέλος, έχειδειχθεί ότι όλες οι δοκιμασίες PCR δεν μπορούν να ανιχνεύσουν DNA σε εκχυλίσματα καλαμποκιού που έχει μαγειρευτεί για λίγο χρόνο, γεγονός που σημαίνει ότι η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR είναι ακόμη πιο δύσκολη. Λόγω αυτών των περιορισμών αναφορικά με την ανίχνευση ΓΤ DNA, θα πρέπει να επανεκτιμηθεί η άποψη ότι δεν μπορεί να συμβεί μεταφορά γονιδίων, γεγονός που άλλωστε συμφωνεί και με άλλα ευρήματα που έδειξαν ότι το διαγονίδιο από τη ΓΤ σόγια επέζησε κατά τη διάβασή του από το λεπτό έντερο ατόμων που είχαν υποστεί ειλεοτομή. Η πρόσληψη ΓΤ DNA από τα κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, φυσιολογικά, δεν θα πρέπει να έχει βιολογικές επιπτώσεις, επειδή το DNA θα διασπαστεί μέσα στο κύτταρο. Το ερώτημα είναι αν μπορεί να διασπαστεί σε ασθενείς με σοβαρές παθήσεις του γαστρεντερικού. Στην περίπτωση όπου το DNA ενσωματωθεί στα χρωμοσώματα του ξενιστή, το ενδεχόμενο να αποκτήσει οποιαδήποτε βιολογική επίδραση στο κύτταρο παραμένει άγνωστο (Ντονά και Αρβανιτογιάννης, 2009).

Πιθανή συμμετοχή των γενετικά τροποποιημένων φυτών στην αλλεργιογόνο αντίδραση

Η εισαγωγή νέων πρωτεϊνών σε φυτά, όπως η ποικιλία της ΓΤ σόγιας που εκφράζει τη μεθειονίνη από τα βραζιλιάνικα καρύδια και η ποικιλία ΓΤ καλαμποκιού που έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε να παράγει μια Bt ενδοτοξίνη, την *cry9c*, μπορεί να επιφέρει επικίνδυνες ανοσολογικές αντιδράσεις, όπως αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Επιπρόσθετα, η εισαγωγή ενός γονιδίου που εκφράζει μια μη αλλεργιογόνο πρωτεΐνη, όπως το ΓΤ ρεβύθι, το οποίο εκφράζει τον αναστολέα της α-αμυλάσης, δεν σημαίνει ότι θα δημιουργήσει κι ένα προϊόν χωρίς αλλεργιογόνο δράση. Η μελέτη αυτή δείχνει την ανάγκη εκτίμησης κάθε νέας ΓΤ καλλιέργειας κατά περίπτωση και βελτίωσης

των απαιτήσεων του προδοκιμαστικού ελέγχου των ΓΤ φυτών.

Η *Brassica juncea*, ένα άλλο ΓΤ φυτό, το οποίο εκφράζει το γονίδιο της οξειδάσης της χολίνης, προκάλεσε χαμηλή IgE απόκριση στους μύς και η ανίχνευση για διασταυρούμενους επιτόπους έδειξε μια περιοχή παρόμοια με αυτή της πρωτεΐνης *Hevea brasiliensis* (Hevb6) με μερικές αντιγονικές ιδιότητες, αν και πιθανότατα δεν είχε αλλεργιογόνο δράση. Τα ευρήματα αυτά θα πρέπει να αξιολογηθούν πιο προσεκτικά και να επαναληφθούν σε άλλα είδη πειραματοζώων, ώστε να μπορεί να διερευνηθεί αν η IgE απόκριση μπορεί να παίζει ρόλο στην τοξικότητα. Όσον αφορά στην έκφραση του Bt σε πολλές καλλιέργειες, έχει βρεθεί ότι οι αγρότες που εκτίθενται στο παρασιτοκτόνο Bt μπορεί να εμφανίσουν ευαισθητοποίηση του δέρματος και να αναπτύξουν αντισώματα IgG στο εκχύλισμα των Bt σπόρων (Ντονά και Αρβανιτογιάννης, 2009).

Προσδιορισμός της αλλεργιογόνου δράσης.

Η μέθοδος αξιολόγησης της αλλεργιογόνου δράσης των ΓΤ τροφίμων σχεδιάστηκε το 1996 και στη συνέχεια τροποποιήθηκε. Ο προσδιορισμός της επικινδυνότητας ενός ΓΤ φυτού ως σύνολο θα πρέπει να μπορεί να εκτιμήσει αν η αλλεργιογόνος δράση ή η τοξικότητά του έχει αυξηθεί. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν το μη ΓΤ φυτό-ξενιστής είναι γνωστό για την παρουσία αλλεργιογόνων ή τοξινών. Οι δοκιμασίες τοξικότητας συνήθως περιλαμβάνουν την υποχρόνια δοκιμασία 90 ημερών σε τρωκτικά, ενώ ο έλεγχος για αλλεργιογόνο δράση γίνεται με σύγκριση των αλλεργιογόνων ουσιών του ΓΤ φυτού με αυτού της συμβατικής ποικιλίας. Ένα άλλο σημείο που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη μεταφορά των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών τοξικότητας και αλλεργιογόνου δράσης της ολικής ΓΤ καλλιέργειας/τροφίμου ή ζωοτροφής με τις μεμονωμένες ΓΤ τροποποιήσεις στις ΓΤ τροποποιήσεις που αφορούν σε περισσότερα από ένα γονίδια,

είναι η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των νεοεισηγμένων γονιδίων με τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και πρωτεΐνες – ή τα προϊόντα βιομετατροπής – με το γονιδίωμα του ξενιστή που περιέχει τροποποιήσεις, οι οποίες αφορούν σε περισσότερα από ένα γονίδια (το GT stacked event). Δεδομένου ότι οι διαγονιδιακές DNA αλληλουχίες/πρωτεΐνες βρίσκονται σε ένα διαφορετικό γενετικό υπόστρωμα, το οποίο ονομάζεται stacked γενετικό υπόστρωμα, η αλληλεπίδρασή τους με το γονιδίωμα μπορεί να μεταβληθεί και ιδιαίτερα στην περίπτωση που συμμετέχουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως αυτές στις πειραματικές, ανθεκτικές στο stress καλλιέργειες που περιγράφονται στη βιβλιογραφία. Η κριτική σε αυτή τη μέθοδο προσέγγισης της αλλεργιογόνου δράσης περιλαμβάνει την περιορισμένη προγνωστική ικανότητα της ανάλυσης της αλληλουχίας αμινοξέων για εύρεση ομοιοτήτων στην αλληλουχία με γνωστά αλλεργιογόνα. Η προσέγγιση της αξιολόγησης της αλλεργιογόνου δράσης περιλαμβάνει και τη συσχέτιση της *in vitro* δοκιμασίας προσδιορισμού της ικανότητας διάσπασης του GT με την αλλεργιογόνο δράση, η οποία αμφισβητείται και αντί αυτής έχει προταθεί η αντικατάστασή της με *in vivo* δοκιμασία στα ζώα και στον άνθρωπο. Επίσης, έχει τονιστεί η αναγκαιότητα αξιολόγησης των μοντέλων των πειραματοζώων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της αλλεργιογόνου δράσης των GT τροφίμων. Σε μια μελλοντική προσέγγιση του προβλήματος θα πρέπει να περιληφθούν τα ευρήματα από τις κλινικές μελέτες σε άτομα όχι μόνο με ιστορικό αλλεργίας αλλά και με προβλήματα ανοσοανεπάρκειας. Επίσης, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η κατανάλωση ορισμένων GT φυτών που εκφράζουν ένα γνωστό αλλεργιογόνο θα μπορούσε να βοηθήσει τα αλλεργικά άτομα, δεδομένου ότι στους επίμυες το GT λούπινο διεγείρει τη δημιουργία μιας προστατευτικής ρυθμιστικής απόκρισης των T-κυττάρων και καταστέλλει την ανάπτυξη αλλεργίας στις αναπνευστικές οδούς. Θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο να μην ενεργοποιηθεί ο

προστατευτικός αυτός μηχανισμός σε αλλεργικά ανοσοκατασταλμένα άτομα. Επιπρόσθετα, δεν είναι γνωστό αν η έκφραση της αλλεργικής αντίδρασης παίζει προστατευτικό ρόλο έναντι άλλων ασθενειών που θα μπορούσαν να είχαν προκληθεί από την έκθεση σε αυτό το αλλεργιογόνο (Ντονά και Αρβανιτογιάννης, 2009).

Κίνδυνοι για το περιβάλλον.

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά παρ'όλο που τυπικά δεν αποτελούν με την παραδοσιακή έννοια «νέα είδη» καθώς είναι σε θέση συχνά να διασταυρώνονται ελεύθερα με φυτά αγρίου τύπου, εντούτοις το ξένο DNA που φέρουν δεν είναι αποτέλεσμα φυσικής επιλογής. Το γεγονός αυτό αλλάζει τις ιδιότητες του ΓΤΦ σε σχέση με τα συγγενή του είδη και σε συνδυασμό με συγκεκριμένες (τυχαίες) συνθήκες μπορεί να οδηγήσει στην επικράτηση του ΓΤΦ σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου, οδηγώντας έτσι σε απώλεια της δεξαμενής γονιδίων (gene pool) που φέρουν τα φυτά αγρίου τύπου και την απώλεια σημαντικών χαρακτηριστικών που θα ήταν χρήσιμα στην κλασσική βελτίωση φυτών. Επιπλέον, ΓΤΦ μπορεί να αποδειχθεί ότι μακροπρόθεσμα έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία ωφέλιμων ζώων και εντόμων βασικών οικοσυστημάτων, όπως οι μέλισσες και τα οποία επηρεάζουν με τη σειρά τους την ανάπτυξη και παραγωγή πολλών άλλων φυτικών ειδών με σημαντική αξία για τον άνθρωπο. Καθίσταται σαφές λοιπόν, ότι η καλλιέργεια ΓΤΦ πρέπει να είναι αυστηρά οριοθετημένη χωρικά με συνεχείς ελέγχους για την διασπορά των ΓΤΦ ώστε να αποφευχθούν τυχόν σοβαρές διαταραχές σε ζωτικά οικοσυστήματα στο μέλλον λόγω της ελλειπούς έρευνας τυχόν επιπτώσεων των ΓΤΦ στο περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Από τα παραπάνω κεφάλαια, παρατηρούμε ότι είναι αναγκαίο να μπορούμε να ανιχνεύσουμε και να ταυτοποιήσουμε τα ΓΤΦ αρχικά στο στάδιο της δημιουργίας τους, ώστε να επιβεβαιώσουμε τον επιτυχή μετασχηματισμό τους και συνακόλουθα την επιτυχή έκφραση της διαγονιδιακής πρωτεΐνης που θέλουμε αυτά να παράγουν και μάλιστα στην ποσότητα που μας ενδιαφέρει. Επιπρόσθετα, πρέπει σε αυτό το στάδιο να είμαστε σε θέση να εξακριβώσουμε εάν η ένθεση του νέου διαγονιδίου δεν έχει επηρεάσει δυσμενώς το γενετικό υλικό του φυτού απενεργοποιώντας άλλα γονίδια και προσδίδοντάς του μη επιθυμητές ιδιότητες. Επιπλέον, πρέπει να είμαστε σε θέση να πιστοποιήσουμε ακριβώς ποιες αλληλουχίες έχουν εισαχθεί στο φυτικό γονιδίωμα ώστε εάν επιθυμούμε να τις αφαιρέσουμε (πχ γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά). Τέλος, στο επίπεδο της καλλιέργειας του γενετικά τροποποιημένου φυτού στον αγρό και εν συνεχεία στη διάθεσή του στον καταναλωτή θέλουμε να έχουμε ακριβείς μεθόδους ανίχνευσης των ΓΤΦ, φθηνές και επαναλήψιμες, οι οποίες μάλιστα να μπορούν να μας ενημερώνουν και ποια γονίδια έχουν εισαχθεί στο ΓΤΦ. Η ανίχνευση των ΓΤΦ σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητη τόσο για την ασφάλεια των καταναλωτών και την δυνατότητα επιλογής σε συμφωνία με την νομοθεσία για τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς στην ευρώπη, καθώς και για την παρακολούθηση της διασποράς των ΓΤΦ ώστε να εξασφαλισθεί η διατήρηση της βιοποικιλότητας και η μη διασπορά του γενετικού υλικού των ΓΤΦ σε άλλα συγγενή είδη. Η ανίχνευση των ΓΤΦ επομένως μπορεί να γίνει τόσο με την ανίχνευση τμημάτων DNA των διαγονιδίων που μεταφέρθηκαν στα ΓΤΦ (βλ. PCR, Southern

παρακάτω), όσο και με την ανίχνευση των νέων διαγονιδιακών πρωτεϊνών που παράγουν τα ΓΤΦ με την χρήση των τεχνικών ανοσοαποτύπωσης κατά Western και της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσοφητικής μεθόδου (ELISA) (βλ. Παρακάτω).

Ανίχνευση τμημάτων DNA

Το DNA από μόνο του (π.χ η αλληλουχία των βάσεων του DNA μεταξύ των συνοριακών) δεν έχει κανένα αποτέλεσμα στην αποδοτικότητα της μεταφοράς και της ένθεσης. Έτσι, μη-ογκογενετικά (αφοπλισμένα) πλασμίδια T_i, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της εσωτερικής αλληλουχίας του T-DNA έχει αντικατασταθεί με DNA που μας ενδιαφέρει, χρησιμοποιούνται ευρέως σαν φορείς για γενετικό μετασχηματισμό και δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. Ο τρόπος ένθεσης του T-DNA από το *Agrobacterium* διαμορφώνει μια ενδιαφέρουσα διαδικασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εργαλείο για τον μετασχηματισμό και τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών. Το πρότυπο ένθεσης είναι γενικά αρκετά απλούστερο, συγκρινόμενο με αυτό που προκύπτει κατά τη μεταφορά «γυμνού» DNA. Η πρώτη ταυτοποίηση των διαγονιδιακών φυτών γίνεται στα στάδια της επιλογής των μετασχηματισμένων φυτών – εκφύτων από τα μη μετασχηματισμένα. Συνήθως, η επιλογή αυτή γίνεται με κάποιο αντιβιοτικό όπως καναμυκίνη, υγρομυκίνη και άλλα. Το T-DNA του πλασμιδίου T_i έχει αντικατασταθεί και εκτός των συνοριακών έχει ενσωματωθεί τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικότητας με προαγωγείς και ληκτικές ακολουθίες που αναγνωρίζονται από τα φυτά. Τα μετασχηματισμένα γονιδιώματα έχουν τροποποιηθεί είτε με το αλλαγμένο T-DNA όταν ο μετασχηματισμός γίνεται μέσω *Agrobacterium*, είτε με κάποιο DNA όταν ο μετασχηματισμός γίνεται με μια από τις μεθόδους που χρησιμοποιούν «γυμνό» DNA όπως βομβαρδισμός σωματιδίων, ηλεκτροπόρωσης κ.τ.λ.

Τα γονιδιώματα αυτά πρέπει κατ' αρχήν να εκφράσουν τα γονίδια τα οποία

εισάγονται. Το σημείο ένθεσης είναι γνωστό ότι είναι τυχαίο, όπως τυχαίος είναι και ο αριθμός των αντιγράφων των ενθέσεων. Τα διαγονιδιακά φυτά που επιλέγονται συνήθως προέρχονται από ανεξάρτητα γεγονότα μετασχηματισμού. Τα ανεξάρτητα γεγονότα μετασχηματισμού στην ουσία επιτρέπουν την επιλογή του καταλληλότερου διαγονιδιακού φυτού. Το σημείο ένθεσης είναι δυνατόν να δημιουργήσει κάποια μετάλλαξη εάν η ένθεση γίνει μέσα σε κωδική περιοχή κάποιου φυτικού γονιδίου. Ο μεγαλύτερος αριθμός ενθέσεων στο φυτικό γονιδίωμα αυξάνει την πιθανότητα αυτή. Έτσι, θα πρέπει να επιλέγονται διαγονιδιακά φυτά που στο γενετικό τους υλικό έχει εισέλθει μόνο ένα αντίγραφο και φαινοτυπικά δεν έχουν καμία μετάλλαξη ή καμία διαφορά με την «πατρική» γενιά. Τα διαγονιδιακά φυτά αναλύονται με διάφορες μοριακές μεθοδολογίες όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ο υβριδισμός κατά Southern. Αν και η πρώτη μεθοδολογία είναι πολύ πιο απλή και ταχεία, εν τούτοις η δεύτερη είναι ποιοτικά καλύτερη. Και με τις δύο μεθοδολογίες είναι δυνατόν να βρεθεί ο αριθμός των αντιγράφων. Για την τεχνική του ποσοτικού PCR είναι απαραίτητη η ύπαρξη κάποιου μάρτυρα με γνωστό αριθμό αντιγράφων ανά γονιδίωμα. Κατά την ανάλυση αυτή θα πρέπει να είναι γνωστή η αλληλουχία του DNA ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές. Η ένταση της ζώνης στη πηχτή ηλεκτροφόρησης στο ποσοτικό PCR εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων (Peña, 2005).

Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης της PCR

Η **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)** είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο

Kerry Mullis, ο οποίος ανακοίνωσε την εφευρεσή του το 1984 και τιμήθηκε γι'αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993.

Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο.

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου, 3) Επιμήκυνση εκκινητών (extension).

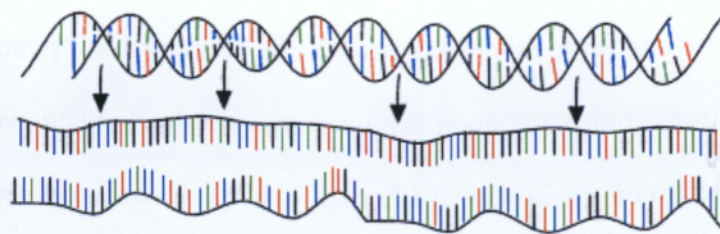
Κατά την διάρκεια του **πρώτου σταδίου** το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει θερμαίνεται σε θερμοκρασία 94 °C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Εικ. 3).

Στο **δεύτερο στάδιο** η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60 °C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing, Εικ. 3).

Στο **τρίτο και τελευταίο στάδιο** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3' (Εικ. 3).

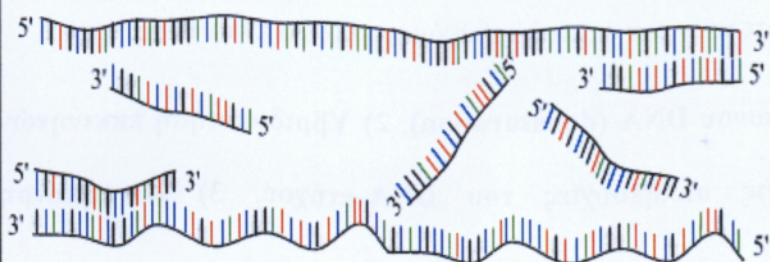
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 κύκλοι 3 βημάτων:



Βήμα 1: αποδιάταξη

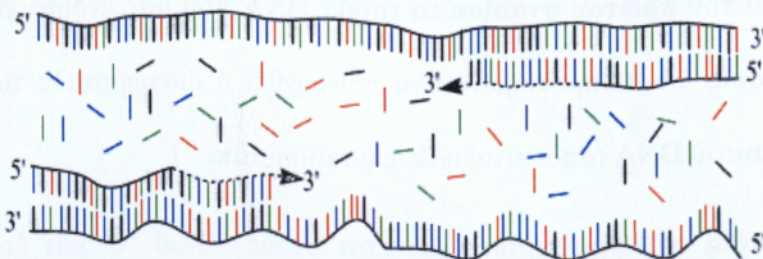
1 λεπτό 94 °C



Βήμα 2: υβριδοποίηση

45 δευτερ. 54 °C

**Ορθοί και ανάστροφοι
εκκινητές!!!**



**Βήμα 3: σύνθεση-
επέκταση**

2 λεπτά 72 °C

Μόνο dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

Εικόνα 3. Τα βήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Βήμα 1: αποδιάταξη (denaturation). Βήμα 2: υβριδοποίηση (annealing). Βήμα 3: σύνθεση-επέκταση αλυσίδας DNA (extension). (από users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html).

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- **Εκθετική (exponential) φάση:** Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA (Εικ. 4).
- **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των

αντιδραστηρίων.

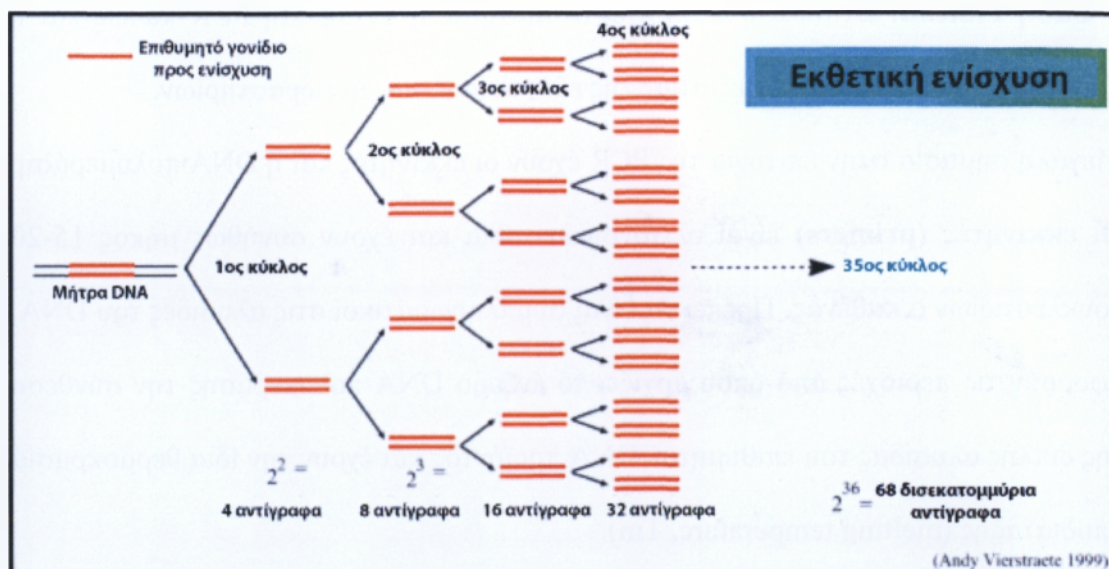
• **Φάση Plateau:** Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων.

Μεγάλη σημασία στην επιτυχία της PCR έχουν οι εκκινητές και η DNA πολυμεράση. Οι **εκκινητές (primers)** είναι ολιγονουκλεοτίδια και έχουν συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων ο καθένας. Πρέπει να είναι συμπληρωματικοί στις αλυσίδες του DNA, αφορούν τις περιοχές από όπου αρχίζει το ένζυμο DNA πολυμεράσης την σύνθεση της διπλής αλυσίδας του επιθυμητού DNA προϊόντος και έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m).

Η DNA πολυμεράση (Taq polymerase) είναι ένζυμο που βοηθάει στην σύνθεση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας που θα είναι συμπληρωματική της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τα νουκλεοτίδια από την αρχική αλληλουχία DNA και η DNA πολυμεράση δημιουργεί τους δεσμούς που τα ενώνει μεταξύ τους. Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται από το 3' άκρο του εκκινητή (Berg et al, 2002). Η DNA πολυμεράση απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72-80 °C, διατηρώντας επαρκή ενζυματική δραστηριότητα στις συνθήκες της αντίδρασης.

Σήμερα με την βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3' προς 5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι'αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες

αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα).



Εικόνα 4. Εκθετική αύξηση (exponential amplification) των DNA αντιγράφων ανα κύκλο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. (από users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html).

Ορισμένα από τα παράγωγα της Taq πολυμεράσης είναι:

- **Klenow fragment:** προέρχεται από την αρχική DNA πολυμεράση I από το βακτήριο *Escherichia coli* και είναι το πρώτο ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην PCR. Σταματούσε όμως η δράση της, κατά το στάδιο της αποδιάταξης του DNA και χρειαζόταν να συμπληρώνεται σε κάθε κύκλο (Sambrook et al., 1989).
- **Stoffel fragment:** έχει παραχθεί από γονίδιο της Taq πολυμεράσης που εκφράζεται στο βακτήριο *E. coli* και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αντιγραφή μεγαλύτερων τμημάτων DNA (Sambrook et al., 1989).
- **Faststart polymerase:** είναι μια χημικώς τροποποιημένη μορφή της Taq πολυμεράσης με θερμοανθεκτική ιδιότητα, που έχει παρασκευάσει από την εταιρεία Roche ειδικά για χρήση στο τυποποιημένο εμπορικό πρωτόκολλο Hotstart PCR της εταιρείας (Promega, 2009). Η Faststart polymerase ενεργοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 75 °C, αποφεύγοντας την σύνθεση προϊόντων σε μικρότερες θερμοκρασίες, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί γρήγορα με επώαση στους 95 °C για 2

με 4 λεπτά. Με την Faststart polymerase στην Hotstart PCR παρουσιάζεται μεγαλύτερη αποδοτικότητα και δεν χρειάζεται παραπάνω χειρισμούς π.χ. επώαση για μεγάλο χρονικό διάστημα.

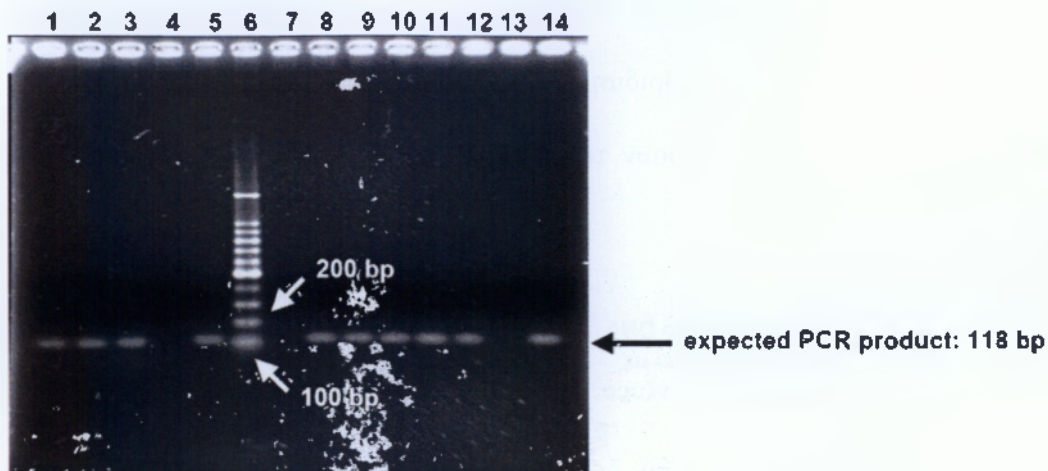
- **Pfu DNA polymerase:** είναι μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που έχει απομονωθεί από τον οργανισμό *Pyrococcus furiosus* και έχει την 3' προς 5' επιδιορθωτική ικανότητα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA μέχρι 5kb ή να αναμιχθεί με DNA πολυμεράσες που δεν έχουν την επιδιορθωτική ικανότητα και να χρησιμοποιηθούν για τον πολλαπλασιασμό μεγαλύτερων τμημάτων DNA (Promega, 2009).

- **Vent polymerase:** είναι μία επίσης θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που έχει απομονωθεί από το *Thermococcus litoralis* και ονομάζεται αλλιώς Tli polymerase. Διαθέτει επίσης την 3' προς 5' επιδιορθωτική ικανότητα και χρησιμοποιείται συνήθως στην συμβατική PCR και στην RT-PCR (Promega, 2009).

- **Tth polymerase:** είναι θερμοανθεκτική πολυμεράση και έχει απομονωθεί από το *Thermus thermophilus*. Η Tth polymerase βοηθάει στην σύνθεση τμήματος DNA με την προσθήκη νουκλεοτιδίων με 5' προς 3' κατεύθυνση υπό την παρουσία MgCl₂., αλλά δεν διαθέτει την 3' προς 5' επιδιορθωτική ικανότητα. Μπορεί να χρησιμοποιήσει αλληλούχια RNA για την σύνθεση cDNA ή για RT-PCR (Promega, 2009).

Μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης που αφορά την PCR εκτός από τους εκκινητές, τις πολυμεράσες και το τμήμα DNA, υπάρχουν επίσης και: τα dNTP's τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates) που είναι απαραίτητα νουκλεοτίδια (ATP, TTP, CTP και GTP) για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων, τα ιόντα μαγνησίου (Mg⁺⁺) που απαιτούνται για την ενζυματική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα

(buffer) για την διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.0 (Sambrook et al., 1989). Η διαδικασία της PCR μπορεί να ολοκληρωθεί σε αρκετούς κύκλους, συνήθως όμως 30 με 40 κύκλοι είναι αρκετοί για να συντεθούν εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA. Σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται διπλασιασμός του αριθμού των αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA και τα αντίγραφα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο (Εικ. 3). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων, εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη θα είναι γνωστά (molecular markers). Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με βαφή του Βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide) το οποίο φθορίζει έντονα κάτω από υπεριώδεις ακτίνες UV όταν συγκεντρώνεται στις περιοχές DNA προϊόντων της PCR, εφόσον παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών των βάσεων του διπλόκλωνου DNA (Hunt, 2006). Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να ενσωματωθεί στη πηκτή αγαρόζης πριν την ηλεκτροφόρηση ή να εμβαπτιστεί η πηκτή σε διάλυμα του μετά την ηλεκτροφόρηση.

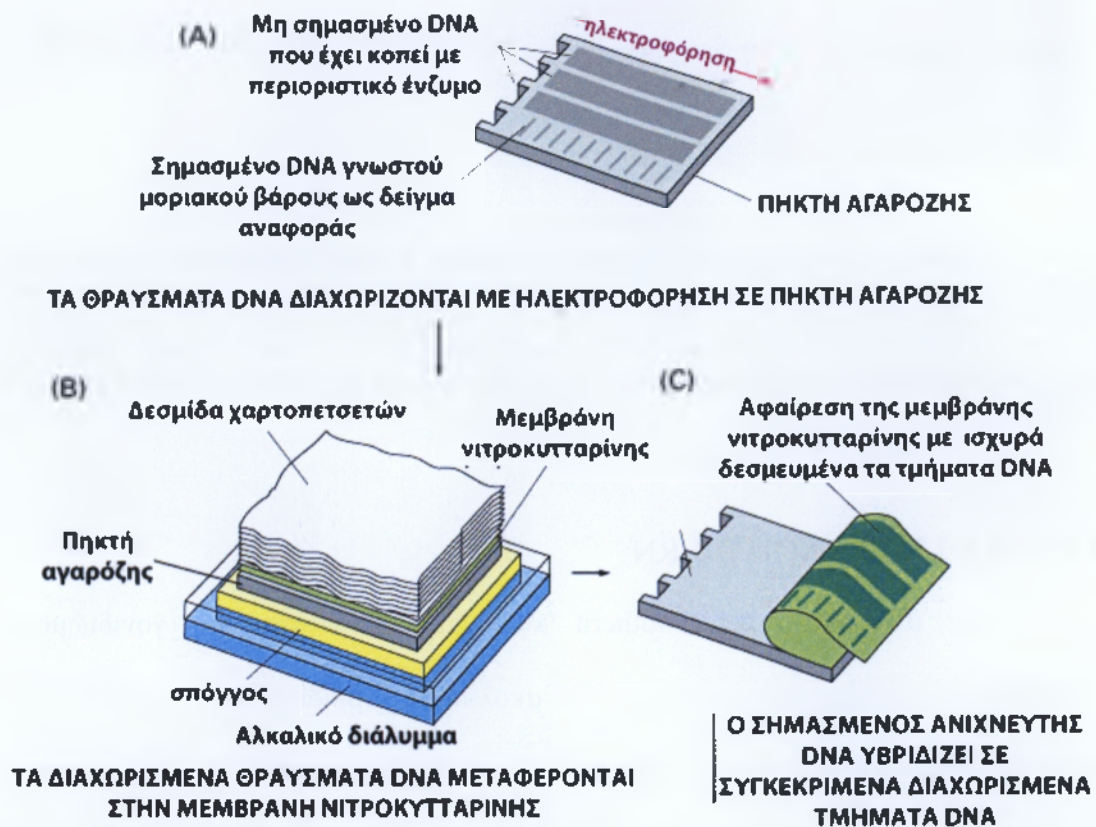


Εικόνα 5. Ανάλυση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης για την ανίχνευση ΓΤΦ. Η ύπαρξη ζώνης μεγέθους 118bp υποδηλώνει ότι στο συγκεκριμένο φυτικό δείγμα υπάρχει η προς εξέταση διαγονιδιακή αλληλουχία, άρα είναι γενετικά τροποποιημένο (σειρές 1-3, 5, 8-12, 14). Αντίθετα, η μη εμφάνιση ζώνης υποδηλώνει ότι το προς εξέταση δείγμα δεν φέρει την αλληλουχία αυτή (σειρές 3, 7, 13). (Greiner and Konietzny, *World of Food Sci.*, 2007).

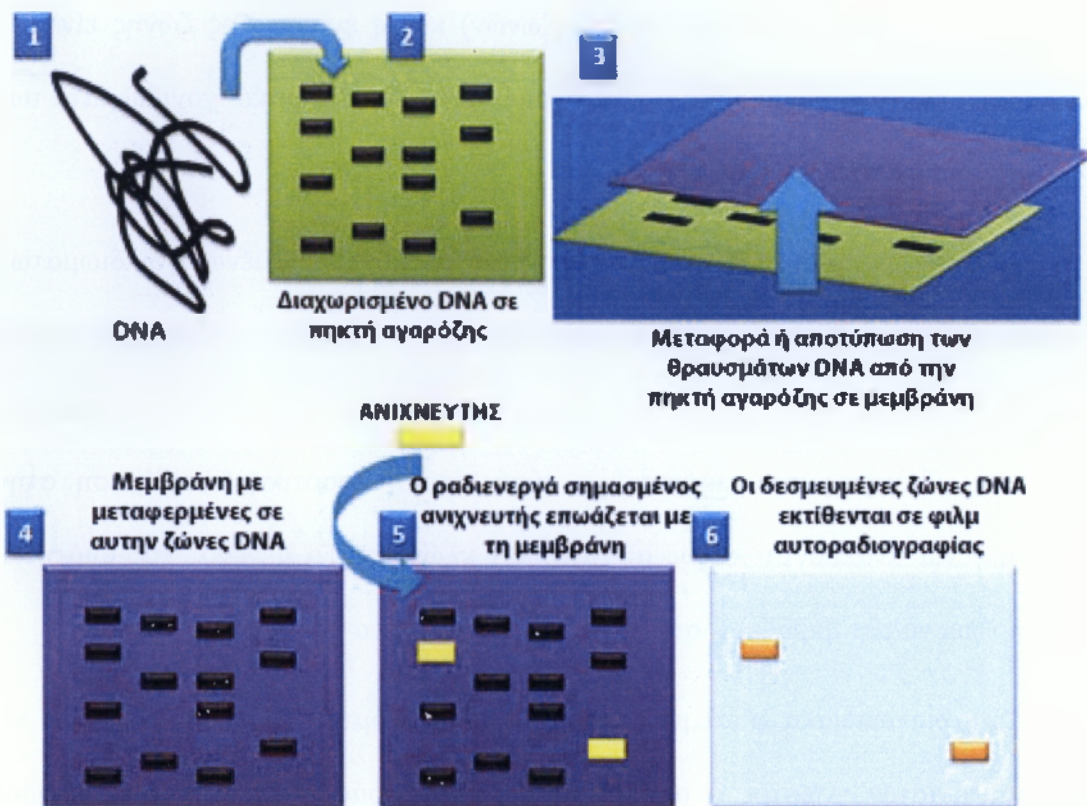
ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ SOUTHERN

Στην ανάλυση κατά Southern ισοδύναμη ποσότητα του γονιδιώματος τεμαχίζεται με ένζυμα περιορισμού και ακολούθως υβριδίζει με τον ραδιενεργό ανιχνευτή που αποτελεί τμήμα DNA που αντιστοιχεί στο γονίδιο ή στη ρυθμιστική ακολουθία αυτού που εισήχθη στο γονιδίωμα του φυτού αγρίου τύπου. Ο ανιχνευτής δεν βρίσκεται στο γονιδίωμα των κανονικών φυτών. Μετά από ανάλυση του τεμαχισμένου γονιδιώματος σε πηκτή αγαρόζης, το σύνολο των νουκλεϊκών οξέων μεταφέρεται και σταθεροποιείται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Σε συγκεκριμένη θερμοκρασία γίνεται επώαση του ραδιενεργού ανιχνευτή πάνω στην μεμβράνη που φέρει τεμαχισμένο το σύνολο του γονιδιώματος του φυτού προς ταυτοποίηση. Μετά από συγκεκριμένο χρόνο που επιτρέπει τον υβριδισμό (πρόσδεση) του ανιχνευτή στην συμπληρωματική του (διαγονιδιακή) αλληλουχία στο γονιδίωμα του φυτού εφόσον αυτή υπάρχει, θα πιστοποιηθεί η ύπαρξή της από την εμφάνιση σήματος (ζώνης) σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Ο οποιοσδήποτε υβριδισμός που θα προκύψει και

θα εμφανιστεί εξαρτάται από την παρουσία της συγκεκριμένης ακολουθίας στο γονιδίωμα. Το πρότυπο του υβριδισμού, ο αριθμός των ζωνών και το ποσό της υβριδιζόμενης ζώνης υποδεικνύουν τον αριθμό των αντιγράφων (Sambrook et al., 1989).



Εικόνα 6. Μέθοδος αποτύπωσης νουκλεϊνικών οξέων κατά Southern. (A). Το μή σημασμένο DNA κόβεται με μία περιοριστική ενδονουκλεάση (restriction endonuclease) και υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel). Σημασμένα τμήματα DNA γνωστού μεγέθους χρησιμοποιούνται ως δείκτες μεγέθους. (B). Τα διαχωρισμένα τμήματα DNA μεταφέρονται από την πηκτή αγαρόζης με την χρήση αλκαλικού διαλύματος (alkali solution) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose paper). (C). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης απομακρύνεται από την πηκτή αγαρόζης και επώαζεται με τον σημασμένο DNA ανιχνευτή (labeled DNA probe), ο οποίος υβριδίζει με συγκεκριμένα τμήματα διαχωρισμένου DNA. (Wikipedia, 2009).



Εικόνα 7. Αρχή μεθόδου ανάλυσης κατά Southern. 1. Πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού. 2. Διαχωρισμός των τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel). 3,4. Μεταφορά των νουκλεϊκών οξέων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. 5. Επώαση της μεμβράνης με ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή (radiolabeled probe). 6. Έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ αυτοραδιογραφίας και εμφάνιση ζωνών υβριδισμού. (από www.molecularstation.com/dna/southernblot)

Πρόσφατα έχει εξελιχθεί μια άλλη μέθοδος ταυτοποίησης διαγονιδιακών φυτών η οποία βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η μεθοδολογία αυτή είναι σχετικά απλή και ταχεία. Η διακριτική της ικανότητα ποσοτικά και ποιοτικά είναι μεταξύ των δύο μεθόδων που αναφέρθηκαν. Επίσης, είναι δυνατόν να βρεθεί ο αριθμός των αντιγράφων που έχουν εισαχθεί καθώς και το πρότυπο ένθεσής τους στο χρωμοσωμικό DNA του φυτού. Και στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να είναι γνωστή η αλληλουχία του DNA που εισάγεται, ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για την έναρξη του πολυμερισμού. Όμως δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη κάποιου μάρτυρα με γνωστό αριθμό αντιγράφων ανά

γονιδίωμα. Το πρότυπο (ο αριθμός των ζωνών) και η ένταση της ζώνης είναι οι παράμετροι για το προσδιορισμό των αντιγράφων στα διαγονιδιακά γονιδιώματα των φυτών (Reña, 2005).

Με τον τρόπο αυτό γίνεται η επιλογή των μετασχηματισμένων γονιδιωμάτων με ένα αντίγραφο. Η απώλεια ή η απόκτηση της επιθυμητής ιδιότητας που έχει εισαχθεί καταγράφεται στους απογόνους των διαγονιδιακών φυτών. Το μέγεθος της επιθυμητής ιδιότητας που εισάγεται, ο τύπος και η ποσοτική μεταβίβαση στην επόμενη γενιά αναλύονται στους απογόνους - κλώνους. Το μέγεθος της ιδιότητας αυτής πρέπει να μεταβιβάζεται στις επόμενες γενιές και να παραμείνει σταθερό .

Στα διαγονιδιακά φυτά με εμπορική και οικονομική σημασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον γνωστός ο ακριβής αριθμός αντιγράφων όπως και το πλήρες τμήμα του DNA που έχει εισαχθεί. Θα πρέπει επίσης να είναι γνωστή η αλληλουχία του DNA καθώς και ο απόλυτος αριθμός των γονιδίων, προαγωγέων και επιπλέον τμημάτων η προέλευση τους και η δυναμική έκφρασή τους στους ευκαρυώτες ή στους προκαρυώτες. Η ανάλυση της επιθυμητής ιδιότητας γίνεται πρώτα σε εργαστηριακό χώρο (επωαστήρες), ακολούθως σε αυστηρά ελεγχόμενο και περιορισμένο θερμοκήπιο και τέλος σε διάφορους πειραματικούς αγρούς ανά την υφήλιο. Μετά από αυτή την καταγραφή και την άδεια από διάφορους φορείς, οι σπόροι των διαγονιδιακών φυτών είναι ελεύθεροι να κυκλοφορήσουν στο εμπόριο.

Ανίχνευση πρωτεϊνών

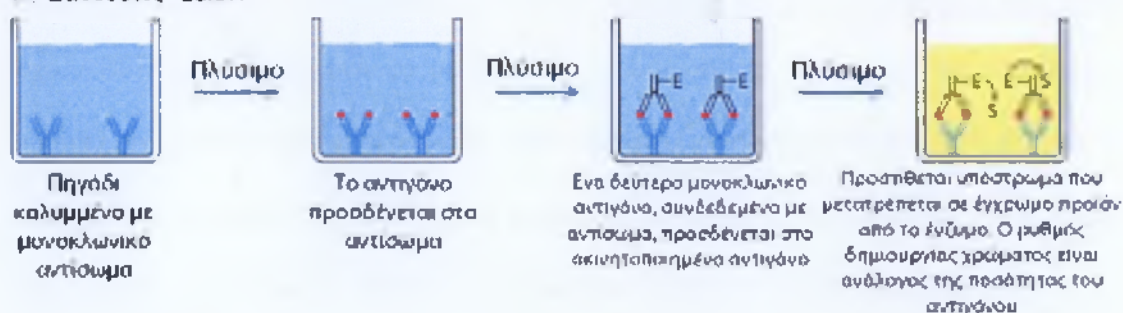
ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA

Η ενζυμο-συνδεδεμένη ανοσοπροσροφητική μέθοδος, γνωστή και ως ELISA, είναι μια βιοχημική τεχνική χρησιμοποιούμενη κυρίως στην ανοσολογία για να ανιχνεύσει την παρουσία αντισώματος ή αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική και στην παθολογία, καθώς επίσης και στον ποιοτικό έλεγχο στις διάφορες βιομηχανίες. Με απλούς όρους, στην ELISA ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου προσκολλάται σε μια επιφάνεια, και έπειτα ένα συγκεκριμένο αντίσωμα επωάζεται στην επιφάνεια έτσι ώστε μπορεί να δεσμευτεί στο αντιγόνο. Το αντίσωμα αυτό συνδέεται με ένα ένζυμο και στο τελικό βήμα προστίθεται μία ουσία την οποία το ένζυμο μπορεί να μετατρέψει σε ανιχνεύσιμο σήμα. Κατά συνέπεια, στην περίπτωση του φθορισμού ELISA, όταν ανιχνεύεται φως επάνω στο δείγμα, οποιαδήποτε σύνδεση αντιγόνων/αντισωμάτων φθορίζει, έτσι ώστε το ποσό αντιγόνου στο δείγμα να μπορεί να μετρηθεί.

(Α) Έμμεση ELISA



(Β) «Σάντουιτς» ELISA



Εικόνα 8. Αρχή μεθόδου «έμμεσης» (indirect) ELISA (Α) και «σάντουιτς» (sandwich) ELISA (Β). (Α): Στην έμμεση ELISA, το πηγάδι είναι καλυμμένο με το αντιγόνο (antigen-coated well). Εν συνεχεία προστίθεται το ειδικό αντίσωμα (antibody) το οποίο προσδένεται στο αντιγόνο. Έπειτα ένα «δευτερογενές» αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο (enzyme-linked antibody) αναγνωρίζει ειδικά και προσδένεται στο ειδικό αντίσωμα. Τέλος, προστίθεται χρομογόνο υπόστρωμα (substrate) το οποίο μετατρέπεται από το ένζυμο σε χρωμοφόρο προϊόν. Ο ρυθμός δημιουργίας χρώματος είναι ανάλογος της ποσότητας του ειδικού (πρωτογενούς) αντισώματος. (Β): Στην «σάντουιτς» ELISA ο πυθμένας του πηγαδιού είναι καλυμμένος με μονοκλωνικό αντίσωμα (monoclonal antibody-coated well). Εν συνεχεία προστίθεται αντιγόνο το οποίο προσδένεται στο αντίσωμα. Έπειτα, ένα δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα (monoclonal antibody), συνδεδεμένο με ένζυμο προστίθεται και προσδένεται στο ακινητοποιημένο αντιγόνο. Τέλος, προστίθεται υπόστρωμα (substrate), το οποίο μετατρέπεται από το ένζυμο σε έγχρωμο προϊόν. Ο ρυθμός δημιουργίας χρώματος είναι ανάλογος της ποσότητας του ειδικού (πρωτογενούς) αντισώματος. Να σημειωθεί ότι και στις δύο μεθόδους, μεταξύ των επιμέρους βημάτων γίνεται ξέπλυμα (wash) με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αντιγόνου/αντισώματος και να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση (Berg et al., 2002).

Η εκτέλεση μιας ELISA περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με ειδικότητα για ένα ιδιαίτερο αντιγόνο. Το δείγμα, με ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου είναι ακινητοποιημένο σε μια στερεά επιφάνεια (συνήθως ένα πιάτο τιτλοδότησης από πολυστυρόλιο), είτε μη-συγκεκριμένα (μέσω προσρόφησης στην επιφάνεια), είτε συγκεκριμένα (μέσω της δέσμευσης από ένα άλλο αντίσωμα συγκεκριμένο για το ίδιο αντιγόνο, σε ένα «σάντουιτς» ELISA). Αφότου ακινητοποιείται το αντιγόνο, το αντίσωμα αντίχενυσης προστίθεται, διαμορφώνοντας ένα σύμπλεγμα με το αντιγόνο.

Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να συνδεθεί ομοιοπολικά με ένζυμο, ή μπορεί το ίδιο να ανιχνευθεί από το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με ένα ένζυμο απευθείας. Μεταξύ κάθε βήματος, το πιάτο πλένεται με ένα διάλυμα που περιέχει ήπιο απορρυπαντικό για να αφαιρέσει οποιεσδήποτε πρωτεΐνες και αντισώματα που δεν είναι ειδικά συνδεδεμένα. Μετά από το τελικό στάδιο πλυσίματος το πιάτο επωάζεται με την προσθήκη ενός ενζυματικού υποστρώματος για να παραγάγει ένα ορατό σήμα, το οποίο δείχνει την ποσότητα αντιγόνου στο δείγμα. Παλαιότερες ELISAs χρησιμοποιούσαν χρωμογενή υποστρώματα, αν και οι νεώτερες μέθοδοι υιοθετούν υποστρώματα φθορισμού με πολύ υψηλότερη ευαισθησία.

Εφαρμογές

Επειδή η μέθοδος ELISA μπορεί να εκτελεσθεί για να αξιολογήσει είτε την παρουσία αντιγόνου είτε την παρουσία αντισώματος σε ένα δείγμα, είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τον καθορισμό του ορού σε συγκεντρώσεις αντισωμάτων (όπως με δοκιμή για τον ιό HIV ή τον ιό του δυτικού Νείλου) και επίσης για την ανίχνευση της παρουσίας αντιγόνου. Έχει βρεί επίσης εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων στην ανίχνευση της δυνατότητας τροφίμων να δράσουν ως αλλεργιογόνα όπως στο γάλα, φυστίκια, ξύλα καρδιάς, αμύδαλα, και αυγά. Η μέθοδος ELISA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην τοξικολογία ως μέθοδος γρήγορης σάρωσης για ορισμένες κατηγορίες φαρμάκων. Για την ποσοτική χρήση της μεθόδου είναι απαραίτητη η σύγκριση με γνωστά πρότυπα.

Στην περίπτωση των ΓΤΦ, είναι δυνατή η ανίχνευση διαγονιδιακών πρωτεϊνών που εκφράζουν τα ΓΤΦ, μέσα σε ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα που προέρχεται από συγκεκριμένο τμήμα του φυτού (πχ καρπός). Κατ'αυτόν τον τρόπο, μπορούμε να δούμε την αποδοτικότητα της έκφρασης μιας πρωτεΐνης (πχ ενζύμου

που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα ή έντομα) σε συγκεκριμένα φυτικά μέρη. Η μέθοδος ELISA προϋποθέτει την ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τις διαγονιδιακές πρωτεΐνες που παράγουν τα ΓΤΦ. Τέλος, μπορεί, όπως προαναφέρθηκε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των νέων πρωτεϊνών των ΓΤΦ ως αλλεργιογόνων παραγόντων.

Ιστορία

Πριν από την ανάπτυξη της ELISA, η μόνη επιλογή ανοσολογικής μεθόδου ήταν η ραδιοανοσολογική μέθοδος, μια τεχνική που χρησιμοποιούσε ραδιενεργά σημασμένα αντιγόνα ή αντισώματα. Στην ραδιοανοσολογική μέθοδο (radioimmunoassay), η ραδιενέργεια παρέχει το σήμα που δείχνει εάν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο ή ένα αντίσωμα είναι παρόν στο δείγμα. Επειδή η ραδιενέργεια επιβαρύνει σοβαρά την υγεία, επιδιώχθηκε μια ασφαλέστερη εναλλακτική λύση. Μια κατάλληλη εναλλακτική λύση θα αντικαθιστούσε το ραδιενεργό σήμα με ένα μη-ραδιενεργό. Όταν ορισμένα ένζυμα (όπως η υπεροξειδάση-peroxidase) αντιδρούν με τα κατάλληλα υποστρώματα (όπως ABTS ή 3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidine), μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στο χρώμα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σήμα. Εντούτοις, το σήμα πρέπει να συνδεθεί με την παρουσία αντισώματος ή αντιγόνου και αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο το ένζυμο πρέπει να συνδεθεί με ένα κατάλληλο αντίσωμα. Δεδομένου ότι είναι απαραίτητο να αφαιρεθεί οποιοδήποτε μη ειδικά συνδεδεμένο αντίσωμα ή αντιγόνο με το πλύσιμο, το αντίσωμα ή το αντιγόνο πρέπει να ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του τρυβλίου, δηλ. πρέπει να προετοιμαστεί με ανοσοπροσρόφηση. Το 1971, δημόσιευθηκαν ανεξάρτητα δύο εργασίες που περιγράφουν αναλυτικά την ευρέως σήμερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο ELISA.

Τύποι:

«Έμμεσο» ELISA

Τα βήματα του γενικού, «έμμεσου» ELISA για τον καθορισμό των συγκεντρώσεων αντισωμάτων ορών είναι:

Εφαρμόζεται ένα δείγμα γνωστού αντιγόνου, γνωστής συγκέντρωσης σε μια επιφάνεια, συχνά στην βάση ενός πιάτου μικροτιλοδότησης. Το αντιγόνο ακινητοποιείται στην επιφάνεια. Η απλή προσρόφηση της πρωτεΐνης στην πλαστική επιφάνεια είναι συνήθως ικανοποιητική. Αυτά τα δείγματα των γνωστών συγκεντρώσεων αντιγόνων θα αποτελέσουν την τυποποιημένη καμπύλη που θα χρησιμοποιηθεί για να υπολογίσει τις συγκεντρώσεις αντιγόνων των άγνωστων δειγμάτων. Να σημειωθεί ότι το ίδιο το αντιγόνο μπορεί να είναι ένα αντίσωμα.

Στις βάσεις των πιάτων η επιφάνεια καλύπτεται με δείγματα ορρού άγνωστης συγκέντρωσης αντιγόνων, που αραιώνονται στο ίδιο διάλυμα που χρησιμοποιείται για τα πρότυπα αντιγόνων. Δεδομένου ότι η ακινητοποίηση αντιγόνων σε αυτό το βήμα οφείλεται στη μη συγκεκριμένη προσρόφηση, είναι σημαντικό η συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης να είναι παρόμοια με αυτή των προτύπων αντιγόνων.

Ένα διάλυμα συγκεντρωμένης μη-αλληλεπιδρώσας πρωτεΐνης, όπως της λευκωματίνης ορού βοοειδών (BSA) ή καζεΐνης, προστίθεται σε όλες τις βάσεις των πιάτων. Αυτό το βήμα είναι γνωστό όπως φράξιμο (blocking), επειδή οι πρωτεΐνες του ορρού εμποδίζουν τη μη ειδική απορρόφηση άλλων πρωτεϊνών στο πιάτο.

Το πιάτο πλένεται, και ένα αντίσωμα ανίχνευσης συγκεκριμένο για το αντιγόνο ενδιαφέροντος εφαρμόζεται σε όλα τα πιάτα. Αυτό το αντίσωμα θα δεσμευτεί μόνο στο ακινητοποιημένο αντιγόνο και όχι σε άλλες πρωτεΐνες ορών ή τις εμποδίζουσες πρωτεΐνες.

Τα δευτερογενή αντισώματα, που θα δεσμευτούν σε αντισώματα ανίχνευσης, προστίθενται στα πιάτα. Αυτά τα δευτερογενή αντισώματα δεσμεύονται στο υπόστρωμα με το συγκεκριμένο ένζυμο. Αυτό το βήμα μπορεί να παρακαμφθεί, εάν το αντίσωμα ανίχνευσης συζεύγνυται με το ένζυμο.

Το πιάτο πλένεται, έτσι ώστε να αφαιρεθεί η περίσσεια ενζύμου και αντισωμάτων. Εφαρμόζεται ένα υπόστρωμα που μετατρέπεται από το ένζυμο ώστε να παράξει ένα χρωμογενές ή φθοριογενές ή ηλεκτροχημικό σήμα.

Το αποτέλεσμα ποσοτικοποιείται χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο, φθοριόμετρο, ή άλλη οπτική/ηλεκτροχημική συσκευή.

Οι ενζυμικές πράξεις δρουν ως ενισχυτής ακόμα κι αν μόνο λίγα ένζυμο-συνδεδεμένα αντισώματα παραμένουν συνδεδεμένα, τα ενζυμικά μόρια θα παραγάγουν πολλά μόρια σημάτων. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της έμμεσης ELISA, είναι ότι η μέθοδος ακινητοποίησης αντιγόνων είναι μη συγκεκριμένη. Οποιοσδήποτε πρωτεΐνες στο δείγμα θα κολλήσουν στο πιάτο καλά, έτσι ώστε μικρές συγκεντρώσεις του καταλοίπου στον ορό πρέπει να ανταγωνιστούν με άλλες πρωτεΐνες ορών κατά τη δέσμευση στην επιφάνεια των φρεατίων. Η μέθοδος “σάντουιτς” ELISA παρέχει μια λύση σε αυτό το πρόβλημα.

Η μέθοδος ELISA μπορεί να δώσει ποιοτικό ή ποσοτικό αποτέλεσμα. Τα ποιοτικά αποτελέσματα παρέχουν ένα απλό θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα για ένα δείγμα. Σε ποσοτικό ELISA, η οπτική πυκνότητα ή οι μονάδες φθορισμού του δείγματος αντιπαραβάλλονται με μια τυποποιημένη καμπύλη, η οποία είναι χαρακτηριστική για συγκεκριμένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης-στόχου.

Σάντουιτς ELISA

Μια λιγότερο κοινή παραλλαγή αυτής της τεχνικής, αποκαλούμενη

«σάντουιτς» ELISA, χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει το αντιγόνο δειγμάτων. Τα βήματα είναι τα ακόλουθα:

Προετοιμάζεται μια επιφάνεια στην οποία μια γνωστή ποσότητα αντισώματος είναι συνδεδεμένη.

Εμποδίζονται οποιεσδήποτε μη συγκεκριμένες περιοχές συνδέσεων στην επιφάνεια.

Εφαρμόζεται το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο στο πιάτο.

Πλένεται το πιάτο, έτσι ώστε το περισσευούμενο αντιγόνο αφαιρείται.

Εφαρμόζονται τα πρωτογενή αντισώματα που δεσμεύονται ειδικά στο αντιγόνο.

Εφαρμόζονται τα ένζυμο-συνδεδεμένα δευτερογενή αντισώματα που είναι ειδικά για τα αρχικά αντισώματα.

Πλένεται το πιάτο, έτσι ώστε να αφαιρεθεί η περίσσεια αντισώματος-ενζύμου.

Εφαρμόζεται μια χημική ουσία που μετατρέπεται από το ένζυμο σε χρώμα ή σήμα φθορισμού ή ηλεκτροχημικό σήμα.

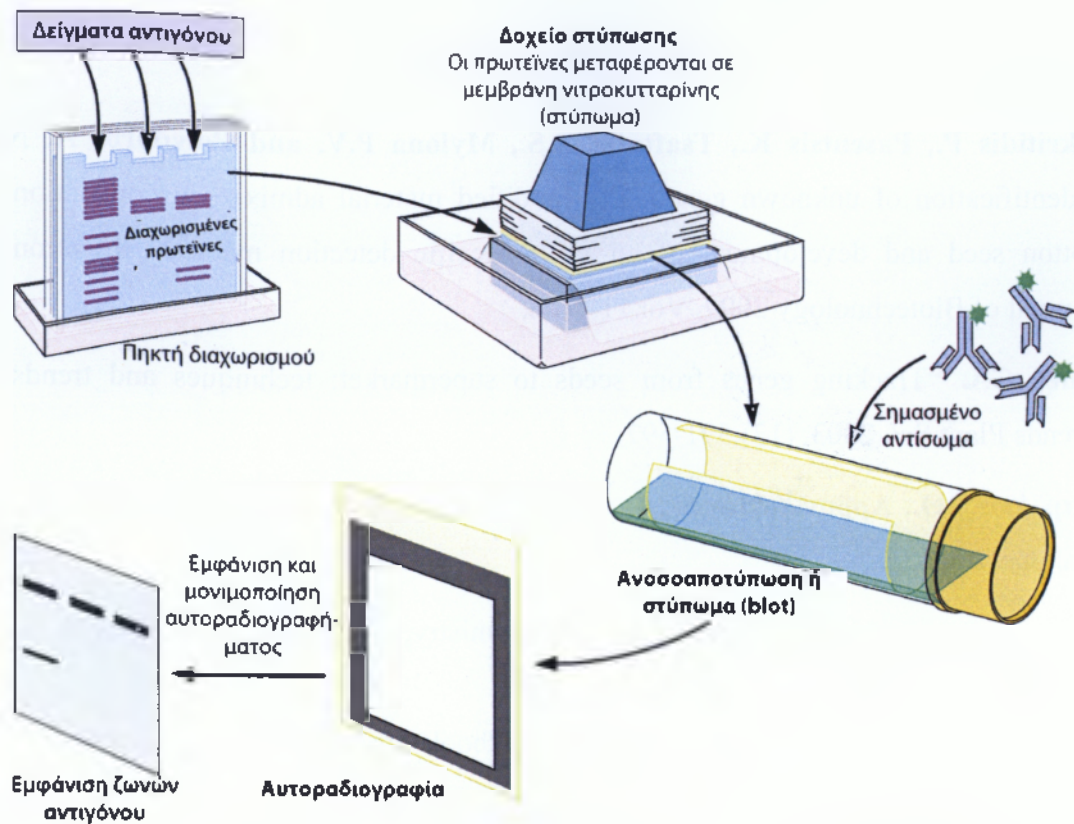
Μετράται η απορροφητικότητα ή ο φθορισμός ή το ηλεκτροχημικό σήμα των πιάτων για να καθοριστεί η παρουσία και η ποσότητα αντιγόνου.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα ενός σάντουιτς ELISA είναι η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ακατέργαστα ή μη καθαρά δείγματα και παρ'όλα αυτά να δεσμευθεί επιλεκτικά οποιοδήποτε αντιγόνο που μπορεί να είναι παρόν. Χωρίς το πρώτο στρώμα του αντισώματος «σύλληψης», οποιεσδήποτε πρωτεΐνες στο δείγμα (συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών ορών) μπορούν ανταγωνιστικά να προσροφηθούν στην επιφάνεια του πιάτου, γεγονός που χαμηλώνει την ποσότητα αντιγόνου που ακινητοποιείται.

Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΚΑΤΑ WESTERN

Συχνά απαιτείται η ανίχνευση μικρής ποσότητας πρωτεΐνης μέσα από ένα

πλήθος άλλων πρωτεϊνών, όπως στην περίπτωση ύπαρξης κάποιας ιικής πρωτεΐνης στο αίμα. Πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει σε ένα κύτταρο ή κυτταρικό υγρό μπορούν να ανιχνευθούν με μία τεχνική ανοσομέτρησης που λέγεται ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση Western (Western blotting). Ένα δείγμα ηλεκτροφορείται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου. Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται στην πηκτή μεταφέρονται με αποτύπωση (συνήθως ηλεκτροαποτύπωση) σε μία επιφάνεια που τις κάνει να αντιδρούν πιο εύκολα με το αντίσωμα που προστίθεται μετά και είναι ειδικό για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο (π.χ. αντίσωμα αίγας που αναγνωρίζει αντίσωμα ποντικού). Μια ραδιενεργός σήμανση του δεύτερου αντισώματος δημιουργεί μία σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιογράφημα). (Berg, 2004). Εναλλακτικά, ένα ένζυμο προσδεδεμένο στο δεύτερο αντίσωμα δημιουργεί ένα έγχρωμο (και αδιάλυτο στο νερό, στην περίπτωση αυτή) προϊόν, όπως στην ELISA. Η αποτύπωση Western καθιστά δυνατή την ανεύρεση μιας πρωτεΐνης σε ένα πολύπλοκο μείγμα. Αυτή η τεχνική μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί, κατά τον ίδιο σχεδόν τρόπο με την μέθοδο ELISA για την ταυτοποίηση διαγονιδιακών πρωτεϊνών από γενετικά τροποποιημένα φυτά.



Εικόνα 9. Αρχή μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blot). Αρχικά, τα δείγματα που φέρουν τις πρωτεΐνες-αντιγόνα (antigen samples), διαχωρίζονται σε μία πηκτή διαχωρισμού (πολυακρυλαμίδης) (separation gel). Έπειτα, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose). Εν συνεχεία, προστίθεται σημασμένο (ραδιενεργά ή μή) αντίσωμα (labeled antibody) ειδικό για συγκεκριμένο αντιγόνο, το οποίο υβριδίζει με το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει (immunostaining of blot). Τέλος, οι ζώνες των πρωτεϊνών-αντιγόνων που μας ενδιαφέρουν, γίνονται ορατές σε φιλμ αυτοραδιογραφίας έπειτα από την έκθεση της μεμβράνης στο φιλμ και την εμφάνισή του (Berg et al., 2002).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akritidis P., Pasentsis K., Tsaftaris A.S., Mylona P.V. and Polydoros A. N., “Identification of unknown genetically modified material admixed in conventional cotton seed and development of an event-specific detection method”. *Electronic Journal of Biotechnology* 2009, Vol.11, No.2

Auer CA. “Tracking genes from seeds to supermarket: techniques and trends”. *Trends Plant Sci.* 2003, (12):591-597.

Βαρζάκας, Θ., Αρβανιτογιάννης Ι. «Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα». Εκδόσεις Έμβρυο, 2006.

Berg J., Tymoczko J. and Stryer L., “Biochemistry, 5th edition”. W.H. Freeman and Company, New York, 2002. Διαθέσιμο on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer&part=A3769>.

Berg JM., Tymoczko, JL., Stryer L., «Βιοχημεία». Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2004.

Bubner B., Baldwin IT., “Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants”. *Plant Cell Rep.* 2004, (5):263-271.

Chassy BM., “Food safety risks and consumer health”. *N. Biotechnol.* 2010, 27(5):534-544.

Cohen SN., Chang AC., Boyer HW., Helling RB., “Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro”. *Proc. Natl. Acad. USA* 1973, 70(11):3240-3244.

Fresco LO., «Genetically modified organisms in food and agriculture:where are we? Where are we going?». Keynote address, Conference on crop and Forest Biotechnology for the Future, Royal Swedish Academy of Agriculture and Forestry, Falkenberg, Sweden, 16-18 September 2001.

Gadd GM., “Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation.” *Microbiology*, 2010, 156:609-643.

Galun E., Breiman A., “Transgenic Plants”. Imperial College Press, 1997.

Garvin W., Harms U., Shearer C. and Simmoneaux L., “Transgenic animals, unit

11". European Initiative for Biotechnology Education (EIBE). 1998 Unit 11, Σελ 1-29. Διαθέσιμο on line: <http://www.ut.ee/biodida/eibe/pdf/Unit11EN.pdf>.

Greiner R., Konietzny U., "Modern Molecular Methods (PCR) in Food Control: GMO, Pathogens, Specoes Identification, Allergens." The World of Food Science, from: 7th Simposio Latino Americano de Ciencia de Alimentos (SLACA), Brazil, 4-7 November 2007. Διαθέσιμο online:

<http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1003869>

Hill RH Jr, Caudill SP, Philen RM, Bailey SL, Flanders WD, Driskell WJ et al., "Contaminants in L-tryptophan associated with eosinophilia myalgia syndrome." Arch Environ Contam Toxicol 1993, 25:134–142

Ho MW, Ryan A, Cummins J., "Hazards of transgenic plants containing the cauliflower mosaic virus promoter." Microb Ecol Health Dis 2000, 12:6–11

Hunt M., "Real Time PCR Tutorial". University of South Carolina, 2006. Διαθέσιμο online: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>.

Jones JD., "Why genetically modified crops?". Philos. Transact. A Math. Phys Eng. Sci. 2011, 369(1942):1807-1816.

Λαζανάκη Β., «Η χρήση της Real-Time PCR (RT-PCR) για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων στελεχών βακτηρίου (*Escherichia coli*)». Πτυχιακή εργασία. ΤΕΙ Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, 2010.

Lezaun J., "Creating a New Object of Government: Making Genetically Modified Organisms Traceable". Social Studies of Science 2006, 36(4), pp. 499–531.

McGloughlin MN., "Modifying agricultural crops for improved nutrition." N. Biotechnol. 2010, 27(5):494-504.

Mehendale H., "Genetically Modified Foods get bad Rap." Department of Toxicology, School of Pharmacy, The University of Louisiana at Monroe, USA, 2004.

Modur G., "Controversy grows over India's genetically modified potato." BMJ, 2003, 326:1351.

Moses V., "Agricultural biotechnology and the UK public". Trends in Biotechnology 2002, 20: 9.

Ντονά ΑΑ., Αρβανιτογιάννης, ΙΣ., «Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα και οι επιπτώσεις τους στην υγεία». Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής 2009, 26(6):727-740

Oksman – Caldentey KM., Barz W., “Plant Biotechnology and Transgenic Plants”, Marcel Dekker Inc., 2002.

Old RW., Primrose SB., “Principles of Gene Manipulation-An introduction to Genetic Engineering”, 5th edition, Blackwell Science Ltd, 1994.

Organisation for Economic Co-operation and Development, “Guidance for the Designation of a Unique Identifier for Transgenic Plants”, Environment Directorate. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, 2004, No. 23.

Peña L., “Transgenic Plants: Methods and Protocols”, Humana Press, 2005.

Promega, “Protocols & Applications Guide”. Εκδόσεις Promega corporation, Έδρα Madison, USA. Κεφάλαιο 1: “PCR Applications”, 2009. Διαθέσιμο online: <http://www.promega.com/paguide/>.

Sambrook J., Fritsch E. K. and Maniatis T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Singer E., “Biotech bacteria could help diabetics”. Technology Review, MIT, 2009. Διαθέσιμο on line: <http://www.technologyreview.com/biomedicine/23302/>.

Sutton S., A negative, double- blind, placebo-controlled challenge to genetically modified corn. American Academy of Allergy, November 2003.

Warwick SI., Beckie HJ., Hall LM., “Gene flow, invasiveness, and ecological impact of genetically modified crops.” Ann. N Y Acad. Sci. 2009, 1168:72-99.

Whitman, D. «Genetically modified foods: harmful or helpful?», CSA discovery guides, April 2000. <http://www.csa.com/discoveryguides/discoveryguides-main.php>.

Χατζόπουλος, Π. «Βιοτεχνολογία Φυτών». Εκδόσεις Έμβρο, 2001.

Yeoman, M.M. «Plant cell culture technology». Blackwell Scientific Publications, 1986.

Zambryski P, Holsters M, Kruger K, Depicker A, Schell J, Van Montagu M, Goodman HM., “Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*.” Science 1980, 209(4463):1385-1391.