



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ στην

'ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ'
με κατεύθυνση:

«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΣΕ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ
ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ**

ΣΤΑΥΡΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΚΟΥΚΟΥΤΙΑΝΟΣ

ΠΤΥΧΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΑΠΘ

2011



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ στην

**‘ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ’
με κατεύθυνση:**

«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΣΕ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ
ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ**

ΣΤΑΥΡΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΚΟΥΚΟΥΤΙΑΝΟΣ

ΠΤΥΧΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΑΠΘ

2011

Η τριμελής επιτροπή:

**Ι.Σ. ΑΡΒΑΝΙΤΟΓΙΑΝΝΗΣ
ΑΘ. ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ
Χ. ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ**

*Στους γονείς μου
Αντώνη και Κούλα.*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα συνιστούν μια επανάσταση στο χώρο της τεχνολογίας. Αφού εξετάσουμε ορισμένες έννοιες προχωρούμε στις γενετικές τροποποιήσεις –σταθμούς στον τομέα των οπωροκηπευτικών. Αναφέρονται οι μέθοδοι παραγωγής και οι σημαντικότερες εξελίξεις στο χώρο της ιατρικής, με ιδιαίτερη έμφαση στα εδώδια εμβόλια και τα μονοκλωνικά αντισώματα. Οι κυριότερες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία είναι η πρόκληση αλλεργίας, οι τοξικές επιδράσεις των μεταλλαγμένων συστατικών, η οριζόντια μεταφορά γονιδίων στην εντερική χλωρίδα και η πρόκληση αντοχής στα αντιβιοτικά. Οι τρέχουσες μέθοδοι ανίχνευσής τους είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA. Στη συνέχεια ερμηνεύονται τα αποτελέσματα ενός ερωτηματολογίου όσον αφορά την ενημέρωση της κοινής γνώμης για τα διαγονιδιακά προϊόντα. Τέλος εξετάζονται τα αποτελέσματα ενός πειράματος που βασίστηκε στη ανίχνευση της παρουσίας γενετικά τροποποιημένων συστατικών σε προϊόντα τομάτας.

ABSTRACT

Genetically modified foods represent a revolution in technology. After looking at some of the concepts we move on genetic modifications in plants, fruit and vegetables. We describe the production methods and major developments in medicine, with particular emphasis on edible vaccines and monoclonal antibodies. The major impacts on human health is the challenge of allergy, toxic effects of GM ingredients, horizontal gene transfer (HGT) in the intestinal flora and challenge of antibiotic resistance. Current detection methods are polymerase chain reaction (PCR) and immunoenzymatic method ELISA. It then interpret the results of a questionnaire on public information on transgenic products finally examined the results of an experiment based on the presence of genetically modified ingredients in tomato products.

Ευτυχισμένος όποιος τη γνώση
της επιστήμης κατέκτησε
και δεν επιδιώκει των συμπολιτών του
τη συμφορά ή πράξεις άδικες,
μα ατενίζει την αγέραστη αρμονία
της αθάνατης φύσης,
πώς και από πού συστάθηκε'
αυτούς ποτέ δεν τους αγγίζει
σκέψη για έργα άτιμα

Ευριπίδης

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	i
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑ - ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ - ΒΙΟΑΣΦΑΛΕΙΑ	4
ΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΣΤΑ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΑ	7
Ποιότητα Οπωροκηπευτικών	9
Μηχανισμός της ωρίμανσης – Ρόλος του αιθυλενίου	11
Αλλαγές στη γεύση και στο άρωμα	12
Αλλαγές στην υφή.....	12
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ.....	16
ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ	29
ΕΜΒΟΛΙΑ	29
ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	32
ΑΛΛΟΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	33
ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΣΤΗΝ	
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ.	35
Πιθανά αλλεργιογόνα.....	35
Προσδιορισμός της αλλεργιογόνου δράσης.	35
Τοξικότητα και πρόκληση υπερευριχαιμίας	36
Άλλες πιθανές τοξικές δράσεις-καρκινογένεση.	36
Οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal gene transfer – HGT)	36
Αντοχή στα αντιβιοτικά	36
Επιδράσεις στα ζώα και στην ανθρώπινη υγεία από την αύξηση των αντιδιατροφικών	
ουσιών.	37
1)Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction).....	38
2. ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΣΥΝΔΕΣΗ	
ΕΝΖΥΜΟΥ (ELISA).....	40
ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ - ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΟΙΝΗΣ ΓΝΩΜΗΣ ΣΤΟΥΣ ΝΟΜΟΥΣ	
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ - ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ – ΛΑΡΙΣΑΣ.	42
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	48
1. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....	48
2. Υλικά.....	49
3. Μέθοδοι απομόνωσης γενετικού υλικού	52
3.1 Πρωτόκολλα μεθόδων	52
3.2 Βήματα της μεθόδου.....	52
Συμπεράσματα Πειραματικού μέρους	58
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ –ΣΚΕΨΕΙΣ	60
Βιβλιογραφία	61

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1	9
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά της ποιότητας των οπωροκηπευτικών	9
Πίνακας 3. Κατάταξη νωπών οπωροκηπευτικών σε κλιμακτηρικά και μη κλιμακτηρικά είδη ανάλογα με την ικανότητα τους να παράγουν αιθυλένιο και την αναπνευστική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.....	10
Πίνακας 4: Παραδείγματα γενετικά τροποποιημένων οπωροκηπευτικών	14
Πίνακας 6 Τελευταίες εξελίξεις Γενετικά τροποποιημένων φυτών στο χώρο των εμβολίων.....	31
Πίνακας 7 Τύποι Μονοκλωνικών αντισωμάτων σε διαγονιδιακά φυτά.....	32

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανακάλυψη του τροχού, της τυπογραφίας, της μηχανής εσωτερικής καύσης, του ηλεκτρονικού υπολογιστή, υπήρξαν σταθμοί που επηρέασαν σε ανυπολόγιστο βαθμό τη ζωή μας. Η Γενετική Μηχανική έφερε τη βιοτεχνολογική επανάσταση, που προκάλεσε και προκαλεί σεισμική αλλαγή της ανθρώπινης ζωής.

Υπάρχει μια ουσιώδης διαφορά ανάμεσα στις άλλες τεχνολογικές εξελίξεις και τη Γενετική Μηχανική. Ενώ τις άλλες εξελίξεις τις παρατηρήσαμε και τις χρησιμοποιήσαμε, τη Γενετική Μηχανική (πέρα από τις επιπτώσεις στα έμβια όντα) κυριολεκτικά την τρώμε!

Τι είναι όμως η Γενετική Μηχανική και πώς μπήκε στη ζωή μας; Για πολλά χρόνια ο άνθρωπος προσπάθησε να επηρεάσει την ανάπτυξη των φυτών και των ζώων με όποια μέσα διέθετε και ιδιαίτερα με τη γενετική βελτίωση. Έτσι αναπτύχθηκαν καλύτερες ποικιλίες φυτών, καλύτερες φυλές ζώων. Η συμβατική γενετική βελτίωση φυτών και ζώων είναι μια μακροχρόνια διαδικασία και υπόκειται σε κάποιους περιορισμούς που έχουν τεθεί από την ίδια τη φύση. Αντίθετα, με τη Γενετική Μηχανική η έκταση και η ταχύτητα των γενετικών μεταβολών μπορούν να αυξηθούν δραματικά, αφού μπορούμε να προσθέσουμε ή να αφαιρέσουμε ένα ή περισσότερα γονίδια «κόβοντας και ράβοντας» γενετικό υλικό από δύο ή περισσότερα είδη. Έτσι, οι επιδιωκόμενες βελτιώσεις μπορούν να επιτευχθούν σε πολύ συντομότερο χρόνο.

Επιπλέον, η Γενετική Μηχανική προσφέρει τη δυνατότητα να ξεπεράσουμε τους φραγμούς που μας βάζει η φύση και να συνδυάσουμε γονίδια από πολύ διαφορετικά είδη, τα οποία ποτέ δε θα μπορούσαν να βρεθούν στον ίδιο πυρήνα κάτω από φυσικές συνθήκες. Με άλλα λόγια, γονίδια από ένα επίπεδο ζωής (π.χ. ζώα) μπορούν να εισαχθούν σε κάποιο άλλο (π.χ. φυτά). Αυτό από μία άποψη ακούγεται υπέροχο. Από την άλλη μεριά όμως, μιλάμε για μια νέα επανάσταση. Η επανάσταση της βιοτεχνολογίας θρυμματίζει την εικόνα μας για τη ζωή και τη φύση με ένα πολύ προσωπικό και άμεσο τρόπο, δημιουργώντας πολλά θεμελιώδη ερωτηματικά. Γιατί, τελικά, θέλουμε να μεταφέρουμε ένα γονίδιο ψαριού σε κάποιο φυτό ή να ανταλλάξουμε γονίδια ανάμεσα σε εντελώς διαφορετικά είδη φυτών; Γιατί να εφαρμόσουμε Γενετική Μηχανική;

Η απάντηση των εταιρειών που επένδυσαν στην τεχνολογία αυτή είναι:

- λύση προβλημάτων,
- προστασία από ασθένειες χωρίς ή με λιγότερα φάρμακα,
- όφελος για το περιβάλλον, τον παραγωγό, τον καταναλωτή.
- αύξηση της παραγωγής για να χορτάσουμε τους πεινασμένους στις τρίτες χώρες.

Αν και όλα αυτά είναι θεωρητικά μέσα στις δυνατότητες της νέας αυτής τεχνολογίας, το ποιες δυνατότητες τελικά θα αξιοποιηθούν θα εξαρτηθεί από τις επιλογές και τα συμφέροντα των εταιρειών που ελέγχουν το χώρο αυτό. Και τα συμφέροντα των εταιρειών συχνά δε συμβαδίζουν με εκείνα του παραγωγού, του καταναλωτή ή του περιβάλλοντος.

Όσο για το πρόβλημα της παγκόσμιας πείνας, αυτό δεν είναι απλά ένα πρόβλημα έλλειψης τροφίμων, αλλά ένα πρόβλημα άνισης κατανομής τους (αγαθά υπάρχουν αλλά σε «λάθος θέση»). Παράλληλα, θα ήταν αφελές να πιστέψουμε ότι οι εταιρείες Γενετικής Μηχανικής αποφάσισαν τελικά να επενδύσουν πακτωλούς

χρημάτων για να επιλύσουν ένα πρόβλημα σαν αυτό. Και εδώ είναι που ελλοχεύει ο κίνδυνος. Γιατί άσχετα από τη σχετική σπουδαιότητα των δυνατών εφαρμογών για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, οι τελικές επιλογές μπορεί να έρθουν στο επίπεδο της κερδοφορίας.

Η βιοτεχνολογία μπήκε ήδη στα χρηματιστήρια ως ο επόμενος προπομπός της οικονομίας. Δισεκατομμύρια δολάρια και ευρώ πέφτουν στην έρευνα της βιοτεχνολογίας και οι επενδυτές προσδοκούν γρήγορα και μεγάλα κέρδη. Σε γενικές γραμμές οι επενδύσεις αφορούν δύο τομείς: τη γεωργία και την ιατρική.

Στην ιατρική έχουμε ήδη κάποια σημαντικά θετικά αποτελέσματα (φθηνότερη, περισσότερη, καθαρότερη ινσουλίνη για τους διαβητικούς), αλλά και σοβαρές προοπτικές επίλυσης δισεπίλυτων προβλημάτων υγείας (δυνατότητα διάγνωσης δύσκολων ασθενειών, δυνατότητα γονιδιακής θεραπείας επάρατων ασθενειών, γονιδιακή θεραπεία καρκίνου, AIDs, κ.λ.π.). Ποιος, αλήθεια, μπορεί να κριτικάρει τέτοιες εφαρμογές;

Εκεί που υπάρχει σκεπτικισμός και ανησυχία είναι σε εφαρμογές όπου τα μεν οφέλη για τον καταναλωτή είναι ανύπαρκτα ή ασήμαντα, ενώ οι πιθανοί και ορατοί κίνδυνοι για σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στον άνθρωπο, στις ανθρώπινες κοινωνίες και στο περιβάλλον είναι πολλοί και συχνά υπερβαίνουν τις γνωστές κλίμακες κινδύνων. Πρόκειται για εφαρμογές στη γεωργία. Οι λόγοι είναι προφανείς. Οι γενετικά τροποποιημένες πρώτες ύλες χρησιμοποιούνται για ζωοτροφή ή για παραγωγή τροφίμων. Τα τρόφιμα τα τρώμε και επηρεάζουν άμεσα την υγεία μας!

Από την άλλη μεριά, η διασπορά στη φύση γενετικού υλικού σε πολλούς, διαφορετικούς, νέους και απρόβλεπτους (από τη φύση) συνδυασμούς, συνιστά μια σοβαρή απειλή για τη βιοποικιλότητα και την ισορροπία, που τόσο σοφά αναπτύχθηκε και τόσο αρμονικά λειτούργησε για εκατομμύρια χρόνια.

Είναι φανερό, επομένως, ότι η εφαρμογή Γενετικής Μηχανικής για παραγωγή τροφίμων είναι μια υπόθεση με πολλές και σημαντικές διαστάσεις, πέρα από την ασφάλεια των τροφίμων και την υγεία του καταναλωτή. Αυτές οι διαστάσεις πρέπει να διερευνηθούν σε ικανοποιητικό πλάτος και βάθος, προκειμένου να μπορέσουμε να αποφανθούμε για τις θετικές και αρνητικές επιπτώσεις της νέας αυτής τεχνολογίας.

Τελικά ποιο είναι το κόστος της υποσχόμενης αφθονίας; Τι επιπτώσεις έχουν οι νέες αυτές τεχνολογίες στην ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων; Ποιες είναι οι συνέπειες της εφαρμογής τους στο περιβάλλον και τα οικοσυστήματα; Ποιοι είναι οι κίνδυνοι και ποια τα οφέλη; Ποιος ωφελείται και ποιος κινδυνεύει; Ποιες είναι οι προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπίσει σήμερα και στο μέλλον ο παραγωγός, ο βιομήχανος, ο καταναλωτής; Ποιες είναι οι ανάγκες σήμανσης της νομοθεσίας; Ποια είναι τα μέτρα που πρέπει να ληφθούν για την προστασία του καταναλωτή και του περιβάλλοντος;

Πώς, όμως, φτάσαμε στα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα; Αν και η χρήση της μοριακής βιολογίας για βελτίωση των χαρακτηριστικών των ζώντων οργανισμών υπήρξε σημαντικό μέρος της ραγδαίας ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας κατά τις τελευταίες δεκαετίες, μόλις πριν από 3-4 χρόνια άρχισε να ενσωματώνεται με τη μορφή νέων, γενετικά τροποποιημένων συστατικών ή οργανισμών σε κοινά τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης.

Πώς όμως φτάσαμε ως εδώ; Ποιος ζήτησε γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα;

Φαίνεται πως η Γενετική Μηχανική ήρθε στη γεωργία, για να βγάλει τη γεωργική παραγωγή από αδιέξοδα στα οποία μας οδήγησαν οι αντι-αιμοφορικές πρακτικές της βιομηχανοποιημένης (εντατικής) γεωργίας. Τα αδιέξοδα της εντατικής γεωργίας έγιναν αναπόφευκτα αδιέξοδα των αγροχημικών εταιρειών.

Πιο συγκεκριμένα, η αγροχημική επανάσταση των τελευταίων 70 χρόνων φαίνεται ότι έφτασε στο τέρμα της. Με τη συνεχώς αυξανόμενη ανθεκτικότητα των παρασίτων και των ζιζανίων στις φυτοπροστατευτικές ουσίες και την αυξανόμενη ανησυχία των πολιτών για τα υπολείμματα, τη ρύπανση του νερού και την καταστροφή του περιβάλλοντος, το κόστος έγκρισης και εισαγωγής (στην αγορά) νέων φυτοπροστατευτικών ουσιών αυξήθηκε απαγορευτικά. Καθώς οι εταιρείες αγροχημικών πιέζονται να αποδείξουν την ασφάλεια και την περιβαλλοντικά φιλική συμπεριφορά των προϊόντων τους, δυσκολεύονται αφάνταστα να παραμείνουν κερδοφόρες και καταφεύγουν σε λύσεις ανάγκης (π.χ. εξαγορές και συγχωνεύσεις εταιρειών). Πριν από 10 μόλις χρόνια, 20 εταιρείες κατείχαν το 90% της παγκόσμιας αγοράς. Σήμερα το ίδιο ποσοστό ελέγχεται από 10 μόνο εταιρείες. Με τη δυναμική αυτή μπορεί εύκολα να προβλεφτεί η εξέλιξη των συγχωνεύσεων, αλλά και η προοπτική ελέγχου της τεράστιας αυτής αγοράς.

Η Γενετική Μηχανική προσφέρει στις εταιρείες αυτές ένα καινούργιο δρόμο για εύκολη κερδοφορία, αφού προσφέρει τη δυνατότητα για γρήγορη παραγωγή «λύσεων» σε σχέση με τη συμβατική γενετική βελτίωση.

Έτσι για παράδειγμα, με τη δημιουργία φυτών ανθεκτικών σε συγκεκριμένα ζιζανιοκτόνα, οι εταιρείες Γενετικής Μηχανικής πιάνουν «μ' ένα σμπάρο δύο τρυγόνια». Πουλάνε σπόρο και φάρμακο μαζί. Γι' αυτό και εταιρείες αγροχημικών έτρεχαν πρόσφατα να εξαγοράσουν εταιρείες παραγωγής γενετικά τροποποιημένων σπόρων, καταβάλλοντας υπέρογκα ποσά, ιδιαίτερα όταν οι εξαγοραζόμενες εταιρείες Γενετικής Μηχανικής διέθεταν τεχνολογίες αποκλειστικής εμπορίας σπόρου.

ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑ - ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ - ΒΙΟΑΣΦΑΛΕΙΑ

Ας γνωρίσουμε, όμως, κάποιες προκαταρκτικές έννοιες που σχετίζονται με την παραγωγή και τη διάθεση στην κατανάλωση Γενετικά Τροποποιημένων προϊόντων. Αυτές είναι οι αρχές της επικινδυνότητας, της ιχνηλασιμότητας και της βιοασφάλειας.

Η επικινδυνότητα και η αξιολόγησή της, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, είναι η επιστημονική εκτίμηση γνωστών ή πιθανών αρνητικών επιδράσεων στην υγεία, που προέρχονται από την ανθρώπινη έκθεση σε τροφιμογενείς κινδύνους. (Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης, Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα)

Η αιτιολόγηση της επικινδυνότητας μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλούς τομείς της ζωής μας. Η βιομηχανία υιοθετεί την ανάλυση της επικινδυνότητας για την αιτιολόγηση των συνεπειών των σχετικών διεργασιών (συμπεριλαμβανομένου και τη χρήση HACCP). Οι κυβερνήσεις ακόμα υιοθετούν την ανάλυση της επικινδυνότητας τόσο για να λάβουν αποφάσεις όσο και για τον έλεγχο των διαδικασιών.

Στο επίπεδο τροφίμων / συστατικών τροφίμων, η επιτροπή του Codex Alimentarius αποτελεί τη βάση για την ισχύουσα προσέγγιση της επικινδυνότητας.

Έτσι σύμφωνα με τους ορισμούς των γενικών αρχών του Codex Alimentarius η ανάλυση της επικινδυνότητας περιλαμβάνει: πρώτον την αξιολόγηση της επικινδυνότητας (αναγνώριση και χαρακτηρισμός κινδύνου), δεύτερον την επικοινωνία της επικινδυνότητας, δηλαδή την ανταλλαγή γνωματεύσεων μεταξύ των ενδιαφερομένων για το συγκεκριμένο κίνδυνο και τρίτον και τελευταίο την αντιμετώπιση της επικινδυνότητας (διαχείριση της κατάστασης του κινδύνου). (Notermans et al., 1996)

Πέραν όμως από την ανθρώπινη υγεία που ασφαλώς είναι ο πρώτος παράγοντας η επιστημονική οργανωτική Ευρωπαϊκή Επιτροπή διαπίστωσε ότι υπάρχουν κι άλλες αξίες που ακόμη δεν έχουν ενσωματωθεί στην επιστημονική διαδικασία αξιολόγησης της επικινδυνότητας οι οποίες όμως πρέπει να ληφθούν υπόψη όπως: I) η ευζωία των ζώων II) η σταθερότητα III) ποιότητα παραμέτρων ζωής των ανθρώπων IV) αντίληψη επικινδυνότητας V) ηθική και VI) κοινωνικο οικονομικά οφέλη. Η επιτροπή αυτή πρότεινε ένα γενικό πρόγραμμα για την ανάλυση της επικινδυνότητας που θα λαμβάνει υπόψη του την αξιολόγηση αυτών των παραμέτρων για την ποιότητα ζωής. Σύμφωνα με την επιτροπή, οι νέες παράμετροι, που θα πρέπει να συνεκτιμηθούν για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας, περιλαμβάνουν πιθανές αρνητικές επιδράσεις στους ανθρώπους, διατροφική αξία για τους ανθρώπους, μέτρα για την προστασία της ανθρώπινης υγείας, περιβαλλοντικές και οικολογικές επιδράσεις (γεωργία, αλιεία, βιομηχανία), θέματα υγείας σε σχέση με την εργασία στη γεωργία και τη βιομηχανία, θέματα σχετικά με την υγεία των ζώων, εθνικά και παγκόσμια θέματα σταθερότητας, οικονομικές επιδράσεις, θέματα ηθικής και θέματα αντίληψης καταναλωτών.

Όσον αφορά την ιχνηλασιμότητα των ΓΤ τροφίμων, σύμφωνα με τον κανονισμό 1830/2003/EK, καθιερώνεται ένα πλαίσιο για την ιχνηλασιμότητα των προϊόντων, που αποτελούνται από ή περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (ΓΤΟ) και των τροφίμων και ζωοτροφών που παράγονται από ΓΤΟ. Η θέσπιση της ανωτέρω νομοθεσίας έχει ως στόχο να διευκολύνει: α) την επακριβή επισήμανση β) την παρακολούθηση και τον έλεγχο των επιπτώσεων στο περιβάλλον και, κατά περίπτωση, στην υγεία και γ) την εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων διαχείρισης των κινδύνων

συμπεριλαμβανομένης εάν είναι απαραίτητο και της ανάκλησης/ απόσυρσης των προϊόντων.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή ένωση, η ιχνηλασιμότητα ορίζεται ως η ικανότητα να ανιχνεύονται οι μεταλλαγμένοι οργανισμοί και τα παραγόμενα προϊόντα από αυτούς σε όλα τα στάδια της παραγωγικής και τροφικής αλυσίδας, διευκολύνοντας τους ελέγχους και τη δυνατότητα απόσυρσης των προϊόντων, αν καταστεί αναγκαίο. Το σύστημα της ιχνηλασιμότητας έχει σχεδιαστεί, για να διευκολύνει την ακριβή σήμανση των τελικών προϊόντων, με σκοπό να παρέχει τα μέσα για εποπτεία και ελέγχους της σήμανσης. Αποτελεί άμεση απάντηση στις φωνές των καταναλωτών, οι οποίοι έχουν δηλώσει σαφώς τι θέλουν και έχουν το δικαίωμα να επιλέξουν. (Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης, Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα)

Οι κανόνες ιχνηλασιμότητας για τους μεταλλαγμένους οργανισμούς αποτελούν αντικείμενο συζήτησης και του Codex Alimentarius, του Οργανισμού για τα πρότυπα τρόφιμα, του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας, και του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων. Μέχρι στιγμής δεν έχει επιτευχθεί συμφωνία για την ιχνηλασιμότητα, παρά μόνο συμφωνήθηκαν κάποια ελάχιστα μέτρα για την αξιολόγηση των κινδύνων σχετικά με την υγεία. Οι κανόνες αυτοί διέπονται από τις παρακάτω αρχές: έλεγχος πριν από την εμπορία των μεταλλαγμένων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένης και της αξιολόγησης των άμεσων και έμμεσων επιπτώσεών τους. Παρόλο που οι αρχές του Codex δεν θα έχουν νομικά δεσμευτικό χαρακτήρα για τις εθνικές νομοθεσίες, μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως σημείο αναφοράς σε περίπτωση διενέξεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, επί του παρόντος, οι ισχύοντες κανονισμοί των ΗΠΑ δε διέπονται απόλυτα από αυτές τις αρχές, ιδιαίτερα όσον αφορά τον έλεγχο πριν από την εμπορία των μεταλλαγμένων προϊόντων.

Ο κανονισμός 1830/2003/ΕΚ εφαρμόζεται σε όλα τα στάδια διάθεσης στην αγορά

- α) προϊόντων που αποτελούνται ή περιέχουν ΓΤΟ,
- β) τροφίμων που παράγονται από ΓΤΟ,
- γ) ζωοτροφών που παράγονται από ΓΤΟ.

Οι διατάξεις της ιχνηλασιμότητας των ΓΤΟ εφαρμόζονται σε ΓΤΟ που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή τροφίμων ή σε προϊόντα που προορίζονται για την ανθρώπινη διατροφή και τα οποία περιέχουν, αποτελούνται ή παράγονται από αυτόν τον ΓΤΟ. Πρόσθετα και αρωματικές ύλες που χρησιμοποιούνται από τρόφιμα και περιέχουν, αποτελούνται ή παράγονται από ΓΤΟ ακολουθούν επίσης τις διατάξεις της ιχνηλασιμότητας. Αντίθετα, τα τεχνολογικά βοηθήματα που χρησιμοποιούνται μόνο κατά τη διεργασία παραγωγής τροφίμων και δεν είναι παρόντα στα τρόφιμα, δεν καλύπτονται από τον ορισμό των τροφίμων και επομένως δεν ακολουθούν τις σχετικές διατάξεις. (Θ.Χ.Βαρζάκας Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης, Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα)

Τέλος, η βιοασφάλεια σε επίπεδο γενετικά τροποποιημένου προϊόντος (φυσικού) αναφέρεται στο σύνολο των ελέγχων που διενεργούνται στο προϊόν πριν την εμπορευματοποίησή του, που μπορεί να περιλαμβάνει από απλή διάθεση αυτού στον καταναλωτή ως και εκτεταμένη μεταποίηση. Στον έλεγχο της βιοασφάλειας γίνεται προσπάθεια να συμπεριληφθούν όλες οι πιθανές αλληλεπιδράσεις του φυσικού προϊόντος με το περιβάλλον, ώστε να αποτιμηθούν οι συνέπειες. Στον αντίποδα, η παρακολούθηση μετά την εμπορευματοποίηση συνίσταται στην εκτίμηση της πορείας του προϊόντος, όταν αυτό πλέον γίνει εμπορικά διαθέσιμο. (Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης, Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα)

Όσον αφορά την εκτίμηση των οικολογικών κινδύνων, αυτή είναι μια διαδικασία που αποτιμά την πιθανότητα να συμβούν αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον ως αποτέλεσμα έκθεσης σε έναν ή περισσότερους στρεσογόνους παράγοντες. Έχουν αναγνωριστεί τέσσερις βασικές αρχές οι οποίες διέπουν την εκτίμηση οικολογικών κινδύνων. Πρώτα από όλα συλλέγονται οι πληροφορίες από όλες τις διαθέσιμες πηγές. Δίνεται μεγάλη σημασία στη συγκέντρωση στοιχείων από διαφορετικές πηγές που αφορούν στην έρευνα σε προγράμματα παρακολούθησης καθώς και στην άποψη των ειδικών επί του θέματος. Η δεύτερη αρχή είναι ότι η εκτίμηση οικολογικών κινδύνων είναι συστηματική. Υπάρχουν οδηγίες σχετικά με τη διαδικασία και τα βήματα που θα πρέπει να ακολουθηθούν. Τρίτον, ότι οι εκτιμήσεις αυτές πρέπει να είναι επαναλήψιμες. Οι υποθέσεις και τα συμπεράσματα θα πρέπει να επανεξετάζονται κάθε φορά που προκύπτουν νέα στοιχεία. Τέταρτον, τέλος, οι εκτιμήσεις πρέπει να έχουν επιστημονική βάση.

Αφού, όμως, αναλύσαμε αυτές τις θεωρητικές αρχές όσον αφορά την ανίχνευση και τους κινδύνους των GMO ,ας προχωρήσουμε σε πιο πρακτικά και ουσιώδη ζητήματα, ξεκινώντας από τις τελευταίες εξελίξεις στο χώρο των οπωροκηπευτικών.

ΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΣΤΑ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΑ

Πριν ξεκινήσουμε να κάνουμε λόγο για τα γενετικά τροποποιημένα προϊόντα στον τομέα των οπωροκηπευτικών, αξίζει να αναφέρουμε μερικά ενδεικτικά στοιχεία για την εμπορική διακίνηση και αξία των τελευταίων σε παγκόσμια και ευρωπαϊκή κλίμακα.

Κατ' αυτήν την έννοια στη γραφική παράσταση 1 απεικονίζεται η ποικιλομορφία και το μέγεθος της παραγωγής οπωροκηπευτικών στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η συνολική παραγωγή λαχανικών στην ΕΕ των Δεκαπέντε ανήλθε το 2001/2002 σε περίπου 55 εκατ. τόνους. Κορυφαία κράτη-μέλη παραγωγής λαχανικών ήταν η Ιταλία, η Ισπανία και η Γαλλία (αντίστοιχα με 15,12 και 8 εκατ. τόνους). Η παραγωγή νωπών φρούτων ανήλθε σε 57 εκατ. τόνους. Ξανά η Ιταλία ήταν το κορυφαίο κράτος μέλος (18 εκατ. τόνοι), ακολουθούμενη από την Ισπανία (15 εκατ. τόνοι) και τη Γαλλία (11 εκατ. τόνοι).

Με παραγωγή 15 εκατ. τόνων, οι τομάτες αποτελούν το πλέον παραγόμενο λαχανικό. Από τον όγκο αυτό, τα 7 εκατ. τόνοι παράχθηκαν στην Ιταλία, σχεδόν 4 εκατ. τόνοι στην Ισπανία, 2 εκατ. τόνοι στην Ελλάδα και πάνω από 1 εκατ. τόνοι στην Πορτογαλία. Τα μήλα αποτελούν το κορυφαίο φρούτο στην ΕΕ των Δεκαπέντε, με παραγωγή ελάχιστα ανώτερη από 9 εκατ. τόνους. Η παραγωγή πραγματοποιείται κυρίως στη Γαλλία (2,5 εκατ. τόνοι), στην Ιταλία (2,3 εκατ. τόνοι) και στη Γερμανία (1,8 εκατ. τόνοι).

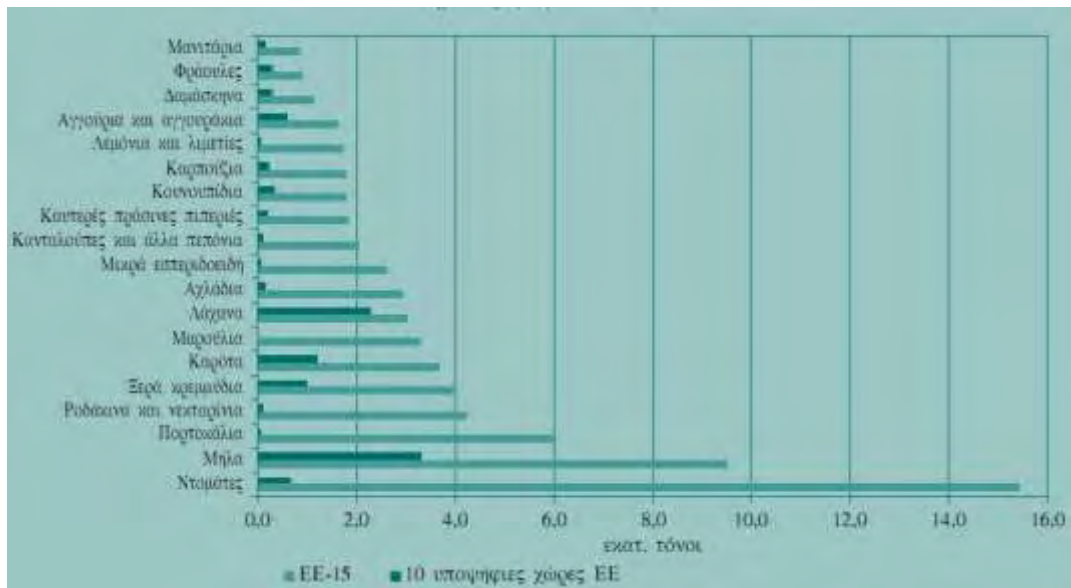
Μεταξύ της συνολικής παραγωγής εσπεριδοειδών, ύψους 20 εκατ. τόνων, τα πορτοκάλια αντιπροσωπεύουν 6 εκατ. τόνους και τα μικρά εσπεριδοειδή (μανταρίνια, κλημεντίνια και σατσούμια) 2,6 εκατ. τόνους. Η Ισπανία αποτελεί τον κυριότερο παραγωγό εσπεριδοειδών (5,6 εκατ. τόνοι), ακολουθούμενη από την Ιταλία (3 εκατ. τόνοι) και την Ελλάδα (1,3 εκατ. τόνοι). Τα ροδάκινα και τα νεκταρίνια (4,2 εκατ. τόνοι), τα ξερά κρεμμύδια (3,9 εκατ. τόνοι), τα καρότα (3,7 εκατ. τόνοι), τα μαρούλια (3,2 εκατ. τόνοι), τα λάχανα (3 εκατ. τόνοι) και τα αχλάδια (2,9 εκατ. τόνοι) παράγονται επίσης ευρέως στο έδαφος της ΕΕ.

Όσο αφορά τη συνεισφορά των οπωροκηπευτικών στο εμπόριο και το μερίδιο αγοράς στην ΕΕ ενδεικτική είναι η γραφική παράσταση 2.

Η ΕΕ αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο εξαγωγέα και το μεγαλύτερο εισαγωγέα οπωροκηπευτικών. Την περίοδο 2000/2001 το παγκόσμιο εμπόριο ήταν αξίας περίπου 50 δις. USD. Οι Ηνωμένες Πολιτείες ήταν ο κορυφαίος εξαγωγέας του κόσμου, με μερίδιο 17%, ακολουθούμενες από την ΕΕ (11%), την Κίνα (8%), το Μεξικό (7%), την Τουρκία και τον Καναδά (4% η κάθε χώρα). Την ίδια περίοδο, ο κορυφαίος εισαγωγέας ήταν η ΕΕ με ποσοστό 85% του συνόλου, ακολουθούμενη από τις ΗΠΑ (80%), την Ιαπωνία (12%) και τον Καναδά (6%). Η γραφική παράσταση 2 δίνει περαιτέρω λεπτομέρειες.

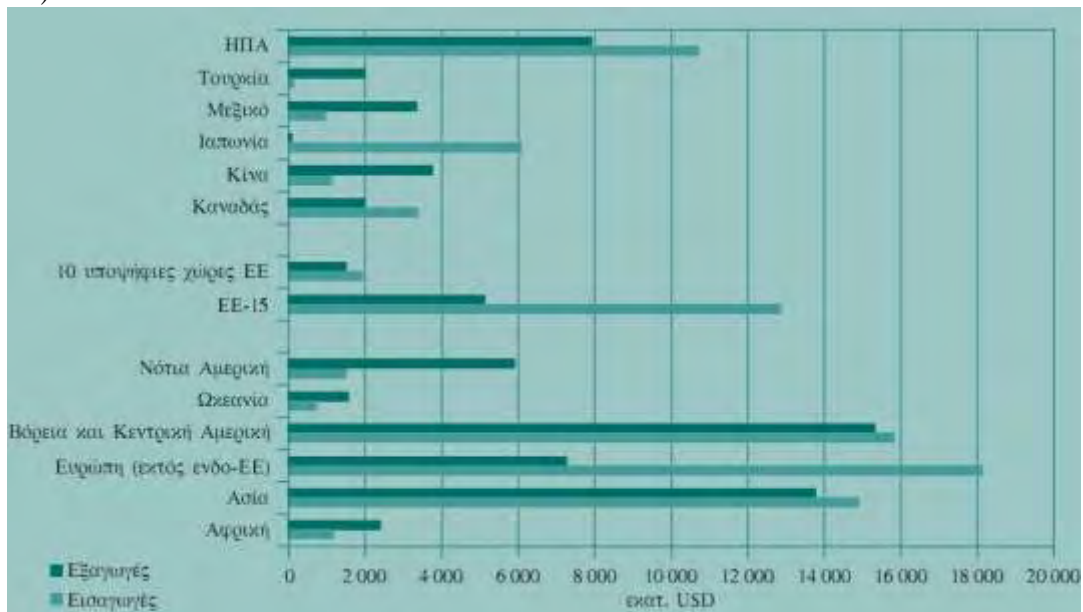
Τα κορυφαία προϊόντα που αποτέλεσαν αντικείμενο εμπορίας ήταν τα εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια, κλημεντίνες) με 7 εκατ. τόνους, τα μήλα (5 εκατ. τόνους), οι ντομάτες (4 εκατ. τόνους) και τα κρεμμύδια (3,7 εκατ. Τόνοι).

Γραφ. Παράσταση 1: Παραγωγή οπωροκηπευτικών στην ΕΕ. (μέσος όρος 2000-2001)+



Πηγή FAO

Γραφ. Παράσταση 2: Παγκόσμιο εμπόριο οπωροκηπευτικών (μέσος όρος 2000-2001)



Πηγή FAO

Αφού, όμως, σκιαγραφήσαμε τη σπουδαιότητα των οπωροκηπευτικών στο διεθνές και ευρωπαϊκό εμπόριο (τόσο σε μέγεθος όσο και σε οικονομικό κέρδος), μπορούμε να δούμε τη σημασία που έχει η γενετική τροποποίηση στο χώρο αυτών των καταναλωτικών αγαθών.

Ως σκοπό η γενετική μηχανική έχει τη βελτίωση των φυτών και της γεωργίας για την παραγωγή ποιοτικότερων και θρεπτικότερων προϊόντων. Οι χαρακτήρες που μπορούν να τροποποιηθούν με γενετική μηχανική (ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά) και που βρίσκονται στο επίκεντρο ερευνητικών δραστηριοτήτων φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα 1

Πίνακας 1

Βελτίωση απόδοσης, ποιότητας και διατροφικής αξίας. Προσαρμογή της αρχιτεκτονικής του φυτού σε παραγωγικές ανάγκες. Αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες. Αντοχή σε ζιζανιοκτόνα. Μετασυλλεκτική διατήρηση της ποιότητας. Αντοχή στις καταπονήσεις.

Ποιότητα Οπωροκηπευτικών

Ως ποιότητα στα οπωροκηπευτικά ορίζουμε τα χαρακτηριστικά του προϊόντος που αναφέρονται στη βροσιμότητά του, την εμφάνισή του και γενικά τη χρησιμότητά του.

Η διακύμανση της ποιότητας διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες:

- Σταθερή ποιότητα (δημητριακών).
- Μείωση της ποιότητας στα ευπαθή.
- Βελτίωση και μετά υποβάθμιση (μήλα).

Οι χειρισμοί της ποιότητας (συμπεριλαμβανομένης και της γενετικής μηχανικής) αποβλέπουν στη διατήρησή της.

Τα κριτήρια της ποιότητας διαμορφώνονται είτε από τον καταναλωτή είτε από τη βιομηχανία.

Έτσι, τα χαρακτηριστικά της ποιότητας κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στη γενική και αισθητική εμφάνιση και στη θρεπτική αξία.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά της ποιότητας των οπωροκηπευτικών

Αισθητική αξία

Μέγεθος
Σχήμα
Χρώμα
Υφή
Γεύση
Άρωμα

Θρεπτική αξία

Βιταμίνη
Βασικά στοιχεία (K, Mg, Ca, Fe, Zn)
Φυτικές ίνες
Οργανικά οξέα

**Πηγή Agro-fst.web.auth.gr-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΟΠΩΡΟΛΑΧΑΝΙΩΝ.pdf*

Αναλυτικότερα:

Όσον αφορά τη γενική εμφάνιση, τα χαρακτηριστικά περιγράφονται ως εξής:

α) Μέγεθος: περιλαμβάνει τη διάμετρο, την περίμετρο, τον όγκο και το βάρος του καρπού. Το μέγεθος εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία και τη διαλογή. Τα μεγάλα μεγέθη είναι πιο ελκυστικά, ενώ τα μικρά πιο χυμώδη.

β) Σχήμα: Καρποί παραμορφωμένοι απορρίπτονται κατά τη διαλογή.

γ) Χρώμα: Το χρώμα εξαρτάται από την ποικιλία (κυρίως), την ωριμότητα του καρπού, καθώς και τις καλλιεργητικές συνήθειες.

δ) Υφή-σκληρότητα, τραγανότητα: η υφή εξαρτάται από τη σπαργή και την κατάσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων.

ε) Γεύση: η γεύση διακρίνεται σε γλυκύτητα, αλμυρότητα, πικρότητα, οξύτητα και στυφότητα.

στ) Άρωμα: το άρωμα μπορεί να είναι ευχάριστο ή δυσάρεστο.

Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά που απαρτίζουν την ποιότητα οφείλουν τη βιογένεση τους στις διαδικασίες της ωρίμανσης. Με τον όρο ωρίμανση εννοούμε το σύνολο των φυσιολογικών, βιοχημικών και μοριακών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στους καρπούς σε μια ορισμένη στιγμή της ανάπτυξής τους και τους μετατρέπει σε ελκυστικούς και εύγεστους καρπούς σε μια ποικιλία έμβιων οργανισμών, χρήσιμων για τη διασπορά τους. (Gionannoni, J. 2001)

Τα νωπά οπωροκηπευτικά είναι ζωντανοί ιστοί, οι οποίοι αφενός υπόκεινται σε συνεχείς αλλαγές μετά τη συγκομιδή και αφετέρου διαφέρουν μεταξύ τους, όσον αφορά τη μορφολογία, τη σύσταση και τη φυσιολογία. Για κάθε είδος, οι απαιτήσεις και οι προτεινόμενες λύσεις για μέγιστη μετασυλλεκτική ζωή διαφέρουν. Επομένως, διαφορετικές βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις θα πρέπει να ακολουθούνται για τη δημιουργία νέων ποικιλιών οπωροκηπευτικών με τροποποιημένα ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Γενικά, ανάλογα με τη φυσιολογία ωρίμανσης τους, τα νωπά οπωροκηπευτικά κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα κλιμακτηρικά και μη-κλιμακτηρικά (Gionannoni 2001). Παραδοσιακά, κριτήριο για την κατάταξη αυτή ήταν η αύξηση της αναπνοής κατά την έναρξη της ωρίμανσης. Ερευνητικά αποτελέσματα βασισμένα α) σε εφαρμογή χημικών παρεμποδιστών της βιοσύνθεσης και της αίσθησης του αιθυλενίου και β) στην εξερεύνηση μεταλλάξεων που είχαν σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη ή μηδενική παραγωγή και αίσθηση αιθυλενίου και γ) στην παραγωγή διαγονιδιακών φυτών με τροποποιημένη ικανότητα παραγωγής και αίσθησης αιθυλενίου δείχνουν ότι το κύριο χαρακτηριστικό των κλιμακτηρικών ειδών είναι η ικανότητα τους να παράγουν αιθυλένιο το οποίο στη συνέχεια προκαλεί, συντονίζει και ολοκληρώνει την ωρίμανση σε βραχύ χρονικό διάστημα (Gionannoni 2001). Σ' αυτήν την κατηγορία υπάγονται η τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), το πεπόνι (*Cucumis melo*), τα μήλα (*Malus pumila*), τα αχλάδια (*Pyrus communis*), η μπανάνα (*Musa Cavendish*), τα αβοκάντο (*Persea americana*) κ.λ.π. (Πίνακας 3).

Αντίθετα, οι μη-κλιμακτηρικοί καρποί, όπως είναι τα εσπεριδοειδή (*citrus* sp), η φράουλα (*Fragaria ananasa*), τα σταφύλια (*Vitis vinifera*), το αγγούρι (*Cucumis sativus*) κ.λ.π. (Πίνακας 3), χαρακτηρίζονται από βραδεία ωρίμανση λόγω μη παραγωγής αιθυλενίου και κλιμακτηρικής αύξησης της αναπνοής.

Πίνακας 3. Κατάταξη νωπών οπωροκηπευτικών σε κλιμακτηρικά και μη κλιμακτηρικά είδη ανάλογα με την ικανότητα τους να παράγουν αιθυλένιο και την αναπνευστική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Κλιμακτηρικά είδη

Αβοκάντο
Αχλάδι-Μήλο
Βερίκοκο
Μπανάνα
Ροδάκινο
Πεπόνι
Τομάτα

Μη-κλιμακτηρικά είδη

Εσπεριδοειδή
Ελιές
Σταφύλι
Φράουλα
Ανανάς
Αγγούρι
Πιπεριές

Μηχανισμός της ωρίμανσης – Ρόλος του αιθυλενίου

Το αιθυλένιο επιταχύνει την ωρίμανση και γήρανση των φυτών, οδηγώντας σε περιορισμένη μετασυλλεκτική διάρκεια ζωής του προϊόντος στο «ράφι» (Shelf life).

Επιπλέον, προάγει την ομοιόμορφη και ταχεία ωρίμανση καρπών που πρόκειται να διατεθούν στην αγορά.

Η αύξηση της παραγωγής αιθυλενίου οφείλεται στη δράση των ενζύμων συνθάση του αμινο-κυκλοπροπανο-καρβοξυλικού οξέος (ACC) και οξειδάση του ACC.

Το αιθυλένιο έρχεται σε επαφή με έναν υποδοχέα (receptor) για το σχηματισμό ενός ενεργού συμπλόκου και την εκκίνηση μιας σειράς αντιδράσεων που είναι απαραίτητες για την ωρίμανση των καρπών.

(www.cp.teithe.gr/pdf)

Το αιθυλένιο στη μετασυλλεκτική φυσιολογία)

Όσον αφορά τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου, η σημασία της στην ωρίμανση αναδείχθηκε ως εξής: Γενετικά τροποποιημένα φυτά τομάτας στα οποία παρεμποδιζόταν η γονιδιακή έκφραση και συνεπώς, η βιοσύνθεση των δύο κυριότερων ενζύμων που υπεισέρχονταν στη βιοσύνθεσή του έδειξαν τον κεντρικό ρόλο του αιθυλενίου στην ωρίμανση *in vivo*. Αυτά τα ένζυμα είναι, όπως αναφέραμε, η συνθάση του αμινο-κυκλοπροπανο-καρβοξυλικού οξέος (ACC) και η οξειδάση του ACC. Τα γενετικά μετασχηματισμένα φυτά παρήγαγαν καρπούς, οι οποίοι δεν ωρίμαζαν ή ωρίμαζαν πολύ αργά. Έκθεση των καρπών αυτών σε ατμόσφαιρα αιθυλενίου είχε σαν αποτέλεσμα την κανονική ωρίμανση. Άρα, οι καρποί αυτοί είχαν χάσει την ικανότητα να βιοσυνθέτουν αιθυλένιο και συνεπώς την αυτοωρίμανσή τους, όμως διατηρούσαν ανέπαφους τους μηχανισμούς αφενός της αίσθησης του αιθυλενίου και αφετέρου των διεργασιών της ωρίμανσης (Hobson and Grierson, 1993).

Επίσης, γενετική τροποποίηση έγινε και ως προς την αίσθηση του αιθυλενίου και την ωρίμανση των φυτών. Έτσι, ανάλυση μεταλλαγμένων φυτών *Arabidopsis* και της τομάτας *Nr* σε συνδυασμό με άλλα είδη, όπως τα κολοκυνθοειδή και τα ροδάκινα, επέτρεπε τη συγκριτική ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα του αιθυλενίου. Η μετάλλαξη του γονιδίου *NR* (NEVER RIPE – μη ωρίμανσης) της τομάτας έχει ως αποτέλεσμα τη γενική μη ευαισθητοποίηση των ιστών συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της ωρίμανσης (Lahanan et al, 1994).

Η αίσθηση του αιθυλενίου από τον ιστό προκαλεί αλυσιδωτές αντιδράσεις σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο. Έτσι, παρατηρείται συγχρόνως παύση έκφρασης μερικών γονιδίων (μετατροπή χλωροπλαστών σε χρωμοπλάστες), δραστηριοποίηση βιοχημικών μονοπατιών (π.χ. αύξηση αναπνοής) και επαγωγή νέων γονιδίων τα προϊόντα των οποίων προκαλούν αυξημένη σύνθεση αιθυλενίου (αυτοκαταλυτική

σύνθεση αιθυλενίου), διαλυτοποίηση κυτταρικών τοιχωμάτων (αλλαγή υφής και βιοσύνθεση νέων χρωστικών και αρωματικών ουσιών.

Αλλαγές στη γεύση και στο άρωμα

Η αίσθηση της γεύσης των ώριμων οπωροκηπευτικών είναι αποτέλεσμα της παρουσίας σακχάρων και οργανικών οξέων σε συνδυασμό πάντοτε με την παρουσία χαρακτηριστικών για κάθε καρπό αρωματικών ουσιών. Αν και αρκετές από τις ουσίες αυτές είναι πολύπλοκες, εν τούτοις το χαρακτηριστικό άρωμα οφείλεται σε απλά οργανικά μόρια η συγκέντρωση των οποίων δεν υπερβαίνει το επίπεδο των ppm. Για παράδειγμα το άρωμα του πεπονιού αποτελείται από περισσότερα από 100 ενώσεις. Πιστεύεται όμως ότι το χαρακτηριστικό άρωμα οφείλεται σε μερικές θειούχες ενώσεις που παράγονται σε ελάχιστες ποσότητες κατά την ωρίμανση. Επιπλέον, μέρος των αρωματικών ουσιών του πεπονιού είναι φαινολικής φύσης που προέρχονται από το βιοχημικό μονοπάτι που καταλύεται από το ένζυμο αμμωνιαλύση της φαινυλαλανίνης (PAL)(Homatidou et al., 1992). Το ανασυνδυασμένο DNA του ενζύμου αυτού έχει κλωνοποιηθεί σε συνδυασμό με την εύρεση της αλληλουχίας των βάσεων που κωδικοποιούν την αντίστοιχη πρωτεΐνη. Βρέθηκε λοιπόν, ότι η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου αυτού αυξάνεται κατά την ωρίμανση του πεπονιού. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση αυτή οφειλόταν στην αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου της PAL. Επειδή, το ένζυμο αυτό υπεισέρχεται στις διάφορες διεργασίες άμυνας των φυτών σε διάφορα είδη «stress» όπως ο τραυματισμός και οι προσβολές από παθογόνα, η μελέτη σύνθεσης της PAL μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών άμυνας των φυτών. Στα πλαίσια αυτά, παρατηρήθηκε ότι οι νεαροί καρποί πεπονιού έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα να συνθέτουν PAL, απ' ότι οι ώριμοι καρποί όταν υποστούν τη δοκιμασία τραυματισμού (Diallinas and Kanellis, 1994).

Αλλαγές στην υφή

Η υφή των νωπών οπωροκηπευτικών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης αλλάζει με αποτέλεσμα οι περισσότεροι καρποί να εμφανίζονται μαλακοί, όταν είναι έτοιμοι να καταναλωθούν. Το μαλάκωμα των οπωροκηπευτικών οφείλεται συνήθως σ'έναν από τους παρακάτω μηχανισμούς: αλλαγή σπαργής, διαλυτοποίηση αμύλου, αποδόμηση κυτταρικών τοιχωμάτων.

Η εφαρμογή των τεχνικών μοριακής γενετικής στα φυτά επέτρεψε την απομόνωση και κλωνοποίηση των γονιδίων των υδρολυτικών ενζύμων των κυτταρικών τοιχωμάτων (Giovannoni 2001, Seymour et al. 1993). Έτσι έχουν κλωνοποιηθεί τα ανασυνδυασμένα DNA και τα γονίδια των υδρολυτικών ενζύμων: εστεράση της πηκτίνης (Ray et al. 1988), πολυγαλακτουρονάση, (Grierson et al, 1986), β-γλουκανάση ή κυτταρινάση (Christoffersen et al, 1984), και άλλων υδρολυτικών ενζύμων των κυτταρικών τοιχωμάτων.

Παρά τη συσσώρευση σημαντικής πληροφόρησης, τα τελευταία χρόνια σχετικά με τη ρύθμιση της σύνθεσης των παραπάνω ενζύμων σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο, εν τούτοις, ο μηχανισμός της αλλαγής της υφής (μαλάκωμα καρπών) κατά την ωρίμανση δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Ενώ π.χ. πριν μερικά χρόνια πιστευόταν ότι η πολυγαλακτουρονάση ήταν το κύριο ένζυμο υπεύθυνο για το μαλάκωμα της τομάτας, νεότερες μελέτες έδειξαν ότι το μαλάκωμα εξελισσόταν κανονικά σε φυτά τομάτας στα οποία η σύνθεση πολυγαλακτουρονάσης παρεμποδιζόταν κατά 99% κατά τη διάρκεια

της ωρίμανσης (Smith et al, 1988, 1990). Συνεπώς, η πολυγαλακτουρονάση δεν είναι ο πρωταρχικός παράγοντας που προκαλεί την αλλαγή της υφής σε μερικά είδη οπωροκηπευτικών, αλλά μάλλον είναι μέρος ενός πολύπλοκου μηχανισμού όπου η δράση των διάφορων υδρολυτικών ενζύμων, σε συνδυασμό με τις παρατηρούμενες φυσικοχημικές αλλαγές των κυτταρικών τοιχωμάτων και της παρουσίας ή μη διάφορων ιόντων και κατιόντων π.χ. Ca^{++} , προκαλεί το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Οι εκτασίνες είναι ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος των φυτικών κυττάρων, που ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε μελέτες για την αύξηση του φυτικού κυττάρου. Νέα δεδομένα σε διαγονιδιακά φυτά τομάτας, στα οποία η ενζυμική δραστηριότητα των εκτασινών (expansins) τροποποιήθηκε με γενετική μηχανική, υποστηρίζουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση της συνεκτικότητας των καρπών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Civello et al., 1999).

Άλλα παραδείγματα παραγωγής γενετικά τροποποιημένων οπωροκηπευτικών είναι τα εξής:

1. η παραγωγή φυτών ανθεκτικών στα νηματώδη.

Τα παρασιτικά νηματώδη μπορούν να προσβάλλουν μια μεγάλη ποικιλία φυτών και είναι υπεύθυνα για σημαντικές απώλειες καλλιεργειών. Επίσης τα αυγά τους επιβιώνουν στο έδαφος σε αντίξοες συνθήκες για πολλά χρόνια.

Έχουν βρεθεί ορισμένα φυτά που είναι ανθεκτικά στα νηματώδη. Για την ανθεκτικότητα αυτή είναι υπεύθυνα ορισμένα γονίδια, τα οποία έχουν απομονωθεί. Παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο Gro 1 της πατάτας, που προσδίδει ανθεκτικότητα στο *Globodera rostochiensis*. Έτσι, έχει ανοίξει ο δρόμος για την ενδεχόμενη εισαγωγή των γονιδίων αυτών σε καλλιέργειες, με σκοπό την αντιμετώπιση της προσβολής από τα νηματώδη. (Jung et al, 1986).

2. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η παραγωγή σόγιας ανθεκτική στο ζιζανιοκτόνο Round up.

Η εταιρεία Monsanto κυκλοφόρησε στην αγορά, το 1996, τη γενετικά τροποποιημένη σόγια, η οποία είναι ανθεκτική στο ευρέως χρησιμοποιούμενο ζιζανιοκτόνο Round up. Στη γενετικά τροποποιημένη σόγια έχει εισαχθεί το βακτηριακό γονίδιο CP4-EPSPS (emolpyruvylsikinase-phosphate synthase) το οποίο παράγει ένα ένζυμο ανθεκτικό στη δράση του ζιζανιοκτόνου. Το Round up καταστέλλει τη δράση του φυτικού φυσικού ενζύμου EPSPS και καταστρέφει τα φυτά. Τα γενετικά τροποποιημένα όμως φυτά, που παράγουν το «ανθεκτικό» ένζυμο, δεν επηρεάζονται από τη δράση του Round up.

Η γενετικά τροποποιημένη σόγια έχει προκαλέσει θύελλα αντιδράσεων στην Ευρώπη. Η σόγια είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμα επεξεργασμένα τρόφιμα, όπως η λεκιθίνη της σόγιας που χρησιμοποιείται στη σοκολατοποιία και ζαχαροπλαστική. Το 1998 το ένα τρίτο περίπου της συνολικής καλλιέργειας σόγιας στις ΗΠΑ ήταν γενετικά τροποποιημένη, ενώ κατά το 1999 πάνω από το μισό. (Mitten, DH et al, 1999.)

3. Ένα άλλο παράδειγμα γενετικά τροποποιημένου προϊόντος είναι η πατάτα Amflora, που δημιουργήθηκε από τη γερμανική εταιρεία BASF και προορίζεται μόνο για ζωοτροφή και για βιομηχανική χρήση. Μετά την απόφαση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής να εγκρίνει την καλλιέργεια της γενετικά τροποποιημένης πατάτας, η καλλιέργεια της αναμένεται να αρχίσει στην Τσεχία και στη Γερμανία, ενώ θα ακολουθήσουν τα επόμενα χρόνια η Σουηδία και η Ολλανδία. Η Amflora είναι ο δεύτερος γενετικά τροποποιημένος οργανισμός, η καλλιέργεια του οποίου επιτρέπεται

στην Ευρωπαϊκή Ένωση μετά το καλαμπόκι MON SIO του αμερικανικού κολοσσού Monsanto που καλλιεργείται στην Ισπανία, την Τσεχία, τη Ρουμανία, την Πορτογαλία και τη Σλοβακία. Οι Ευρωπαίοι οικολόγοι, πάντως, δήλωσαν «σοκαρισμένοι» σχετικά μ' αυτήν την υπόθεση σταθμό για την εισαγωγή και καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων στην Ευρώπη, καθώς αναφέρουν μεταξύ των άλλων ότι υπάρχουν «σοβαρές ανησυχίες» για ένα γονίδιο της Amflora που είναι ανθεκτικό στα αντιβιοτικά.

Άλλα παραδείγματα παραγωγής γενετικά τροποποιημένων καρπών, που παρουσιάζουν αλλαγές στην ποιότητα ή παρεμπόδιση στην πορεία ωρίμανσης, αναφέρονται:

4. Η παραγωγή φυτών τομάτας, οι καρποί των οποίων δεν παράγουν αιθυλένιο, αλλά μπορούν να ωριμάσουν σε παρουσία αιθυλενίου (Gray et al, 1992).

5. Η παραγωγή φυτών τομάτας οι καρποί των οποίων έχουν χρώμα «πορτοκαλί» (Bird et al. 1988).

6. Η παραγωγή φυτών πεπονιού οι καρποί των οποίων δεν παράγουν αιθυλένιο και παρουσιάζουν αυξημένη μετασυλλεκτική ζωή (Agub et al. 1996).

7. Η εφαρμογή μεταβολικής μηχανικής σε καρπούς τομάτας είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του β-καροτενίου (προβιταμίνη Α) στο ρύζι, στην κανόλα και στην τομάτα (Gialiano et al. 2000).

Τέλος, πληθώρα άλλων παραδειγμάτων γενετικής τροποποίησης αναφέρονται στο χρώμα, γεύση, άρωμα κ.λ.π. των καρπών και των φυτών.

Πίνακας 4: Παραδείγματα γενετικά τροποποιημένων οπωροκηπευτικών

Προϊόν	Χαρακτηριστικά	Ερευνητική ομάδα
Τομάτα	Παρεμπόδιση της έκφρασης των ενζύμων συνθάση ACC και οξειδάση ACC για τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου.	Hobson and Grierson, 1993.
Τομάτα NR	Μη αίσθηση των ιστών τομάτας στο αιθυλένιο	Lahanan et al, 1994
Πεπόνι	Έκφραση του ενζύμου PAL (αμμωνιαλυάση της φαινυλαλανίνης) που είναι υπεύθυνο για το άρωμα του πεπονιού	Diallinas and Kanellixs, 1994
Τομάτα	Διάγνωση του ρόλου του ενζύμου πολυγαλακτορουνάση σε μαλάκωμα των καρπών	Smith et al, 1988, 1990.
Τομάτα	Ρόλος των εκτασινών (expansions) στο μαλάκωμα των ιστών του καρπού	Civello et al, 1999.
	Παραγωγή φυτών ανθεκτικών στα νηματώδη	Jung et al. 1999

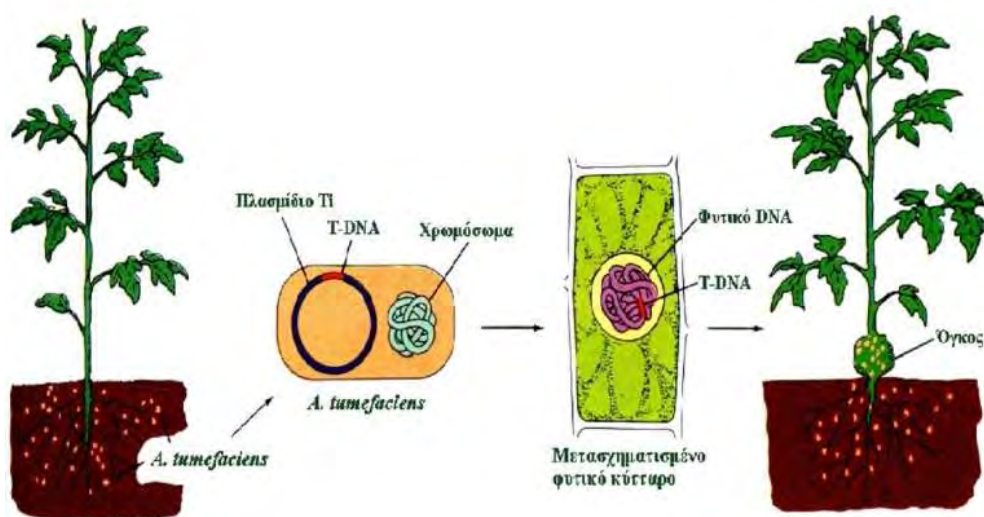
Σόγια	Παραγωγή σόγιας ανθεκτικής στο ζιζανιοκτόνο Round up	Mitten et al, 1999
Πατάτα	Παραγωγή της πατάτας Amflora για βιομηχανική χρήση και ζωοτροφή	Εταιρεία BASF
Τομάτα	Παραγωγή φυτών τομάτας, οι καρποί των οποίων δεν παράγουν αιθυλένιο, αλλά μπορούν να ωριμάσουν παρουσία αιθυλενίου	Gray et al, 1992.
Τομάτα	Παραγωγή φυτών τομάτας οι καρποί των οποίων έχουν χρώμα πορτοκαλί	Bird et al, 1988
Πεπόνι	Παραγωγή φυτών πεπονιού, οι καρποί των οποίων δεν παράγουν αιθυλένιο και έχουν αυξημένη μετασυλλεκτική ζωή	Ayub et al, 1996.
Τομάτα	Αύξηση β-καροτενίου (προβιταμίνη Α)	Guliano et al, 2000

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Οι τεχνικές που εφαρμόζονται για τη γενετική τροποποίηση γενικότερα περιλαμβάνουν α)τεχνικές ανασυνδυασμένων DNA στις οποίες χρησιμοποιούνται συστήματα φορέων β)τεχνικές που περιλαμβάνουν την άμεση εισαγωγή σε ένα μικροοργανισμό γενετικού υλικού που παρασκευάζεται εκτός αυτού και οι οποίες υποδιαιρούνται στη μικροέγχυση, μακροέγχυση και μικροέγκλιση γ)τεχνικές σύντηξης κυττάρων ή υβριδισμού με τις οποίες σχηματίζονται ζώντα κύτταρα με νέους συνδυασμούς DNA χάρη στη σύντηξη δύο ή περισσότερων κυττάρων , μέσω μεθόδων που δεν υπάρχουν στη φύση.

Η μετάλλαξη των φυτών, όσον αφορά την παραγωγή GMO μπορεί αδρά να διαιρεθεί σε δύο στάδια: την εκτόξευση του DNA και την επιλογή των φυτών για την αναπαραγωγή.

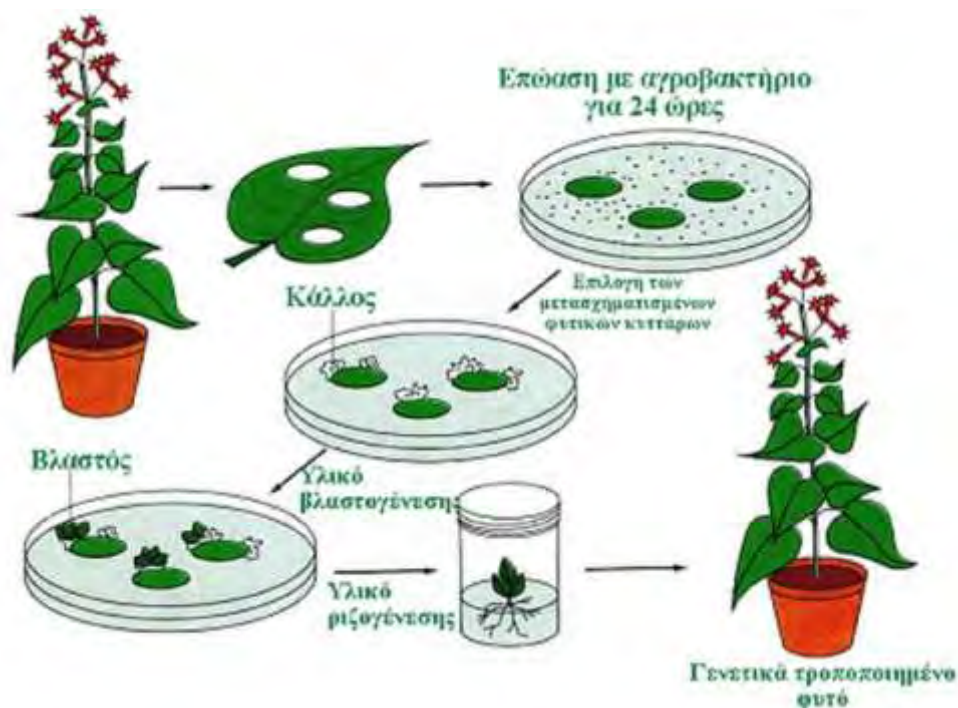
Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκτόξευση του DNA μέσα στα φυτικά κύτταρα. Η πρώτη εκμεταλλεύεται τη Γενετική Μηχανική της ίδιας της φύσης, το βακτήριο Αγροβακτήριο *Tumefaciens* που φυσιολογικά βρίσκεται στο χώμα και το οποίο επιμολύνει πληγές σε κάποια φυτά ώστε να σχηματίζει ένα ογκώδες σχήμα καλούμενο « a crown gall». Οι ογκώδεις σχηματισμοί προκαλούνται από την ενσωμάτωση τμήματος DNA (το T- DNA) από το αγροβακτήριο στο γένωμα των φυτών. Έτσι, με τη δημιουργία των ογκωδών σχηματισμών τα γονίδια που υπάρχουν στα TDNA προκαλούν τα κύτταρα των σχηματισμών αυτών να παράγουν συστατικά με τα οποία τρέφονται τα βακτήρια. Το T-DNA είναι παρόν σε ένα πλασμίδιο (Το Ti ή ογκογόνο πλασμίδιο), που είναι ένα κυκλικό εξωχρωματοσωμικό DNA παρά μέσα στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Αυτό σημαίνει ότι αυτό μπορεί να απομονωθεί και να χειριστεί κατάλληλα, έτσι ώστε να αφαιρέσουμε τα γονίδια τα οποία εισάγονται στα φυτά από το Αγροβακτήριο και να τα αντικαταστήσουμε με νέα γονίδια. Μετά τον εμβολισμό του φυτικού υλικού με το τροποποιημένο Αγροβακτήριο, το φυτό μπορεί να αναπαράγεται με τη βοήθεια φυτικών ορμονών. (Nigel et al ,2000)



Εικόνα 1. Μόλυνση φυτού με το αγροβακτήριο



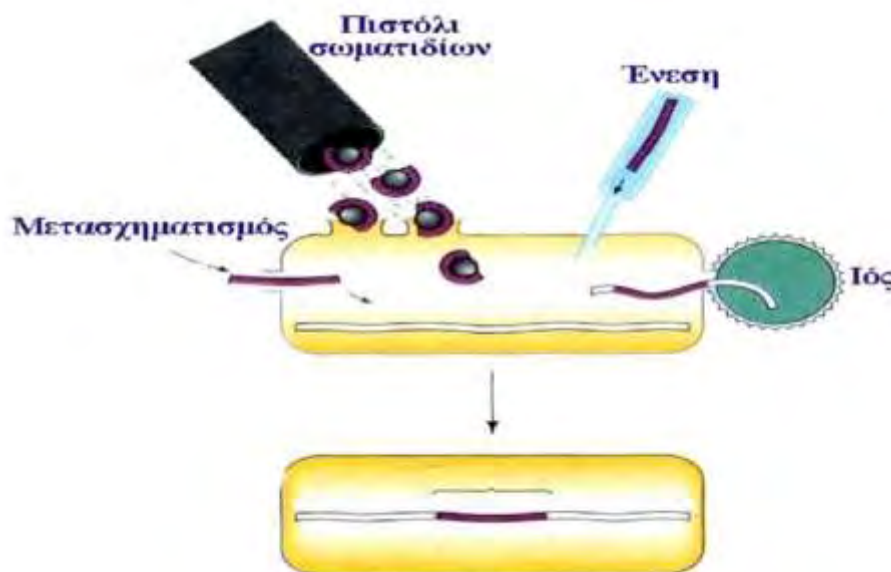
Εικόνα 2. ΤΟ πλασμίδιο Ti



Εικόνα 3. Γενετική τροποποίηση σε αγροβακτήριο

Ο δεύτερος κύριος τρόπος είναι ο μοριακός βομβαρδισμός. Σύμφωνα μ' αυτόν το DNA καλύπτεται στην επιφάνεια μικροσκοπικών χρυσών σωματιδίων, τα οποία βάλλονται στα φυτικά κύτταρα, χρησιμοποιώντας εκτοξευτήρες από ήλιον. Κάποια τμήματα του DNA αποπλένονται από τα σωματίδια και συγχωνεύονται με το φυτικό γονιδίωμα. Όπως και με την προηγούμενη μέθοδο, το φυτό μαζί με τα γενετικά

τροποποιημένα κύτταρα αναπαράγεται με τη βοήθεια φυτικών ορμονών.(Nigel et al,2000)



Εικόνα 4. Μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού

Σημείωση:

Ένας περιορισμός στη γενετική τροποποίηση των φυτών είναι ότι μόνο μερικά από τα κύτταρα του ιστού του φυτού μεταλλάσσονται, άσχετα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται. Είναι ανάγκη επομένως να καταστρέψουμε όλα τα άλλα κύτταρα που δεν είναι τροποποιημένα γενετικά. Αυτό κάνει αναγκαίο το γονίδιο που εισάγουμε να συνοδεύεται από ένα τουλάχιστον δεύτερο γονίδιο που θα δράσει σαν δείκτης επιλογής. Πρακτικά, αυτό είναι συνήθως ένα γονίδιο, το οποίο κάνει τα μεταλλαγμένα κύτταρα ανθεκτικά σε ένα αντιβιοτικό (π.χ. στην καναμυκίνη) ή σε ένα ζιζανιοκτόνο (π.χ. φωσφινोटριχίνη, το ενεργό συστατικό του Basta) το οποίο είναι τοξικό για τα μη μεταλλαγμένα κύτταρα.(Nigel et al,2000)

Μια άλλη φυσική μέθοδος πέρα από το βομβαρδισμό σωματιδίων είναι η τροποποίηση φυτών με μικροέγχυση. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται γυάλινες μικροπιπέτες για τη μεταφορά DNA σε πρωτοπλάστες. Τα κύτταρα αποδέκτες ακινητοποιούνται σε στερεό υπόστρωμα. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η άμεση εισαγωγή, ενώ στα μειονεκτήματα πρέπει να συγκαταλέξουμε το γεγονός ότι η όλη τεχνική θεωρείται δύσκολη, αφού απαιτεί υψηλά εξειδικευμένο προσωπικό και υψηλούς κόστους εξοπλισμό για τη μεταχείριση μικρών κυτταρικών ομάδων, την εισαγωγή σε αυτά του ενθεματικού DNA υπό μορφή διαλύματος και την σταθεροποίηση των φυτικών κυττάρων κάτω από το μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που έχουν γίνει αποδέκτες του ενθεματικού DNA αναπτύσσονται σε κανονικά φυτά με τεχνικές ιστοκαλλιέργειας.(Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ. Αρβανιτογιάννης Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα)

Εκτός από τις παραπάνω τρεις μεθόδους που χρησιμοποιούν το πυρηνικό DNA για τη γενετική τροποποίηση φυτών, τελευταία έχουν αναπτυχθεί συστήματα τα οποία τροποποιούν το DNA των χλωροπλάστων στα φυτά και τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε κληρονομούμενες αλλαγές της πρωτεϊνικής έκφρασης. Οι χλωροπλάστες

των φυτών μπορούν να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στο μέλλον των γενετικά τροποποιημένων. Αυτά τα οργανύλια παραγωγής ενέργειας εμφανίζουν πλεονεκτήματα συγκριτικά με την πυρηνική μετατροπή, ειδικά αν ληφθεί υπόψη ότι το κάθε φυτικό κύτταρο έχει εκατοντάδες ή ακόμα και χιλιάδες χλωροπλάστες, με αποτέλεσμα την ικανότητα να παράγουν πολύ υψηλό αριθμό λειτουργικών αντιγράφων των γονιδίων.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι μετασχηματισμού χλωροπλαστών, η χημική και η ηλεκτρική μέθοδος. Η χημική μέθοδος επιτυγχάνεται με υψηλές συγκεντρώσεις της πολυαιθυλενογλυκόλης PEG που ενεργοποιεί την πρόσληψη του ενθεματικού DNA από τα φυτικά κύτταρα. Η μέθοδος επιβαρύνει σημαντικά τα κύτταρα με αποτέλεσμα το ποσοστό των τροποποιημένων κυττάρων που τελικά επιβιώνουν να είναι μικρότερο του 1% του αρχικού πληθυσμού. (D.A.Goldstein et al,2004)

Με την ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιούνται παλμοί ηλεκτρικού ρεύματος, οι οποίοι διαπερνούν καλλιέργειες χλωροπλαστών που βρίσκονται σε ένα διάλυμα, το οποίο περιέχει και το ενθεματικό DNA. Οι παλμοί δημιουργούν μικρές οπές στην μεμβράνη των χλωροπλαστών, διαμέσου των οποίων διέρχεται το ενθεματικό DNA. Σε κάποιους χλωροπλάστες το DNA θα ενσωματωθεί στο γενωμικό DNA του πυρήνα. Η ηλεκτροδιάτρηση είναι πιο ήπια μέθοδος από τη χημική και εφόσον υπάρχουν καλλιέργειες χλωροπλαστών, είναι δυνατή η απομόνωση πολλών κυττάρων από τα οποία τελικά ένα μεγάλο ποσοστό θα αποτελέσει τα σταθερά τροποποιημένα προϊόντα. (Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα)

Σημείωση.

Πρέπει να εξεταστεί πού μέσα στο φυτό πρέπει να παραχθεί η επιθυμητή πρωτεΐνη. Η σύγχρονη τεχνολογία επιτρέπει τη γονιδιακή έκφραση και την παραγωγή πρωτεϊνών είτε στο πράσινο μέρος του φυτού ή επιλεκτικά μέσα στους σπόρους ή άλλους ιστούς διαμέσου επιλεκτικών προαγωγικών συστημάτων. Η παραγωγή μέσα στην πράσινη μάζα μπορεί να αποδώσει μεγάλα ποσά πρωτεΐνης. Για την παραγωγή πράσινου υλικού ο καπνός είναι συνήθως το φυτό επιλογής κυρίως εξαιτίας της υψηλής αποτελεσματικότητας, αν και φυτά όπως το τριφύλλι υπόσχονται πολλά. (D.A.Goldstein et al,2004).

Αντίθετα από το πράσινο υλικό, οι σπόροι γενικά περιέχουν λιγότερα φαινολικά συστατικά και ένα λιγότερο σύνθετο μίγμα πρωτεϊνών και ειδικά χρησιμοποιούνται, για να προμηθεύουν ένα σταθερό αποθήκευμα πρωτεϊνών και άλλα υλικά, με σκοπό να εξασφαλίσουν μια επιτυχημένη βραδεία βλάστηση. Οι σπόροι είναι επομένως υπερβολικά ελκυστικό μέσο παραγωγής GMO το οποίο μπορεί επιπλέον να προμηθεύσει την ευλυγισία της αποθήκευσης προϊόντων για επιβραδυνόμενες διαδικασίες. Αυτό κάνει τις καλλιέργειες τροφίμων υψηλά ελκυστικές, με τη σόγια και το καλαμπόκι να είναι οι φανερές επιλογές. (D.A.Goldstein et al,2004).

Τέλος, έχουμε και τη μεταφορά γενετικού υλικού μέσω ιών. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι ιοί είναι οι βακτηριοφάγοι φορείς λ και MB. Και οι δύο πολλαπλασιάζουν το DNA τους σε υψηλά επίπεδα κατά τη μόλυνση του ξενιστή και παράγουν ιοσώματα, τα οποία ελευθερώνονται στο θρεπτικό μέσο και έτσι η συλλογή τους για την παρασκευή DNA είναι ιδιαίτερα εύκολη. Έχουν το πλεονέκτημα ότι η παρουσία τους είναι από μόνη της εμφανής (πλάκα σε βακτηριακή χλόη) και δεν χρειάζονται γενετικοί δείκτες, όπως στην περίπτωση των πλασμιδίων. Ο ιός λ έχει γονιδίωμα 50kb, 20kb, από τις οποίες είναι περιττές για την αύξησή του στην E.coli. Αυτές μπορούν να αντικατασταθούν με ξένο DNA. Αντίθετα με τον ιό λ, το γονιδίωμα του MB είναι μονόκλωνο. Έτσι παράγει και το ένθετο DNA σε μονόκλωνη μορφή,

ιδανική για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του (τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA)

Πίνακας 5 Μέθοδοι παραγωγής γενετικά τροποποιημένων φυτών

Μέθοδοι	Περιγραφή μεθόδου	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογή	Βιβλιογραφία
I. Ιική, γονιδιακή μεταφορά					
II. Γονιδιακή μεταφορά μέσω <i>Agrobacterium</i>	α) Βακτηριακή αποικιοποίηση β) Πρόκληση βακτηριακής μολυσματικότητας γ) Δημιουργία T-DNA δ) T-DNA μεταφορά ε) Ενσωμάτωση T-DNA στο γονιδίωμα φυτού	Σχετικά μεγάλα τμήματα DNA μπορούν να μεταφερθούν με μικρή επανατοποθέτηση, η ενσωμάτωση μικρού αριθμού γονιδιακών αντιγράφων στα χρωμοσώματα φυτών	Βασίζεται κυρίως στα: -στάδιο ανάπτυξης ιστών -αρχικό επίπεδο χρήσης <i>A.tumefaciens</i> -Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των φυτών μετά τον μετασχηματισμό - Κατασκευαστές για την επιλογή των φορέων μετασχηματισμού. -Οι φορείς που χρησιμοποιούνται και ο γενότυπος των φυτών	Ζαχαρότευτλο Αραβόσιτος	De la Riva et al., 1998

I2. <i>Bacillus thuringiensis</i>		<ul style="list-style-type: none"> -Μη τοξικό - ειδική δράση Bt -μη θανάτωση ευεργετικών εντόμων -Μειωμένη χρήση συμβατικών εντομοκτόνων -Χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις 	<ul style="list-style-type: none"> -Ευαίσθητη σε αλλοίωση από το ηλιακό φως - Υψηλή δραστηριότητα εντόμων ίσως περιορίσει τη χρήση της -Bt προϊόντα έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής σε σχέση με άλλα εντομοκτόνα -Περιβαλλοντικά πλεονεκτήματα 	<ul style="list-style-type: none"> -Ψεκασμός για τον έλεγχο των κάμπιων σε φυτό συγκομιδής - Έλεγχος κάμπιων κουνουπιών - Διαχείριση δέντρων 	www.ext.colostate.edu/pubs/insect05556.html Saraswathy & Kumar, 2004
------------------------------------------	--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Μέθοδοι	Περιγραφή μεθόδου	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογή	Βιβλιογραφία
Π. Μη-υκές μέθοδοι Πα. Φυσικές μέθοδοι Πα1. Ηλεκτροδιάτρηση	-Χαμηλός ηλεκτρικός παλμός πεδίου (υψηλό δυναμικό) - Αναδιοργάνωση μεμβράνης -Διάχυση πολικών μορίων DNA σε κύτταρα-ξενιστές	-Πολλαπλές εφαρμογές -Αποδοτικότητα -Μικρή κλίμακα -In vivo	-Καταστροφή κυττάρων -Μη εξειδικευμένη μεταφορά	-DNA διαμόλυνση -Άμεση πλασμιδιακή μεταφορά -Προκαλούμενη σύντηξη κυττάρων -Γονιδιακή θεραπεία	www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio Tsujie <i>et al.</i> , 2001 Mitrovic, 2003

Πα2. Βομβαρδισμός σωματιδίων	Επιτάχυνση DNA - επικαλυμμένων σωματιδίων απευθείας σε ανέπαφα κύτταρα ή ιστούς	-Σχεδόν σε όλα τα κύτταρα -Εύκολη λειτουργία - Απλή πλασμιδιακή κατασκευή -Αποφυγή ψευδών θετικών αποτελεσμάτων - Απαιτείται μικρή ποσότητα πλασμιδιακού DNA -Η μεταβατική γονιδιακή έκφραση εξετάζεται σε διάστημα λίγων ημερών	-Χαμηλή αποδοτικότητα μετασχηματισμού -Υψηλού κόστους αναλώσιμα -Για εμπορική χρήση απαιτείται δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (πατέ- ντα)	Πιο συνήθη χρήση	Hagio, 1998
------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------	-------------

Μέθοδοι	Περιγραφή μεθόδου	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογή	Βιβλιογραφία
Πα3. Μικροέγχυση	-Γυάλινες μικροπιπέττες χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά DNA σε πρωτοπλάστες -Τα κύτταρα -αποδέκτες ακινητοποιούνται σε στερεό υπόστρωμα	-Άμεση εισαγωγή -Αποφυγή πιθανών μη επιθυμητών κυτταρικών τμημάτων (χαμηλού pH)	-Εκτεταμένη εκπαίδευση -εξειδικευμένο προσωπικό και υψηλού κόστους εξοπλισμός -Ακατάλληλη για μεγάλο αριθμό δια(επι)μολυσμένων κυττάρων	Αποτελεσματική σε πρωτοπλάστες φυτών και ιστών	www.tnau.ac.in/notesbscag/notestry/abt401 dragon.zao.utoronto.ca/~jlm-gmf/T0301C/technology/microinjection www.promega.com/_guides/ransfxn_guide/chapter_one

IIb. Χημικές μέθοδοι IIb1. Βασισμένες στη DEAE*-δεξτράνη	<p>-Θετικά φορτισμένα πολυμερή, όπως DEAE - δεξτράνη, πολυβρένιο, πολυαιθυλενιμίνιο και δενδριμέριο, σύμπλοκο με αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA</p> <p>-η αυξημένη ιονική έλξη μεταξύ του καθαρού θετικού φορτίου στο πολυκατιόν DNA σύμπλοκο και του αρνητικού φορτίου στην κυτταρική επιφάνεια καθιστά ικανή τη δέσμευση του DNA και την είσοδο στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση.</p>		<p>- Αρκετές παράμετροι, όπως:ο αριθμός κυττάρων, η συγκέντρωση πολυμερούς, η συγκέντρωση διαμολυσμένου DNA και η διάρκεια της διαμόλυνσης θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν για συγκεκριμένη κυτταρική γραμμή.</p> <p>Σύμπλοκη παράδοση DNA με DEAE-δεξτράνη θα μπορούσε να βελτιωθεί με οσμωτικό σοκ με χρήση DMSO ή γλυκερόλης ή με χρήση χλωροκίνη</p>	<p>Περιορισμένη χρήση σε μεταβατικές δια(επί)μολύνσεις</p>	<p>Mitrovic, 2003</p>
-----------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------	-----------------------

Μέθοδοι	Περιγραφή μεθόδου	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογή	ΒιβλιογραφίαI
Πb2. Φωσφορικό ασβέστιο	-Ανάμειξη DNA με χλωριούχο ασβέστιο - Προσθήκη σύμπλοκου σε ουδέτερη σαλίνη /φωσφορικό - Επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου -Διασπορά του	- Ικανοποιητική διάθεση των τμημάτων -Λογική τιμή -Εύκολη χρήση πρωτοκόλλου -Εφαρμόσιμη σε διάφορους τύπους κυττάρου -Προστασία σε ενδοκυτταρικές και νουκλεάσες ορού		Εφαρμόζεται σε μεταβατική και σταθερή διαμόλυνση ποικιλίας κυτταρικών τύπων	www.promega.com/i_guides/transfxn_guide/chapter_one
Πb3. Γονιδιακή μεταφορά μέσω λιποσωμάτων	Σύντηξη με πρωτοπλάστες με χρήση PEG*	-Προστασία DNA από πέψη με νουκλεάση - χαμηλή κυτταρική ή τοξικότητα -σταθερότητα & αποθήκευση νουκλεϊκού οξέος -υψηλή επαναληψιμότητα -δυνατότητα εφαρμογής σε όλους	-Πιο αποτελεσματική από άλλες χημικές μεθόδους (DEAE δεξτράνη και φωσφορικό ασβέστιο] -Απαιτούνται μικρές ποσότητες DNA -Απλή για εκτέλεση σε μεγάλο εύρος κυτταρικών τύπων	-Στοχευμένη πληροφορία συσχετισμένη με την επιφάνεια αποτελεσματικά στοχευμένη γονιδιακή παράδοση	www.tnau.ac.in/notesbscag/notestry/abt40 Mitrovic; 2003

Ιικές πρωτεΐνες σύντηξης Τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA	-Απομόνωση του προς μελέτη γονιδίου - Εισαγωγή γονιδίου σε φορέα και κλωνοποίηση -Ολοκλήρωση DNA σε πλασμίδιο			-Απομόνωση μεγάλων ποσοτήτων καθαρής πρωτεΐνης -Αναγνώριση μεταλλάξεων - Μεταφορά γονιδίων από τον ένα οργανισμό στον άλλο	
--------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Πηγή: Θ.Χ. Βαρζάκας, Ι.Σ. Αρβανιτογιάννης Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα.

ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ

ΕΜΒΟΛΙΑ

Έχει δημιουργηθεί ένα αξιοσημείο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη χαμηλού κόστους εμβολίων που μπορούν να λαμβάνονται από το στόμα. Τα παραδοσιακά εμβόλια, όπως αυτά έναντι του ιού της πολιομυελίτιδας, χρησιμοποιούν ολόκληρο τον οργανισμό ή ημικαθαρμένα υλικά, προκειμένου να προκληθεί συστηματική (IgG) και τοπική (IgA) ανοσία. (D.A.Goldstein et al,2004).

Τα εμβόλια από φυτά μπορούν να εκφράσουν ολόκληρες τις επιλεγμένες πρωτεΐνες, αλλά η χρήση DNA κωδικοποιεί μόνο τις επιθυμητές αντιγονικές σειρές από παθογόνους ιούς, βακτήρια και παράσιτα.(Θ.Χ.Βαρζακας ,Ι.Σ.Αρβανιτογιαννης Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα). Οι ανοσογεννητικές πρωτεΐνες ή οι αντιγονικές σειρές που αποτελούν σημεία κλειδιά μπορούν να συντεθούν στα φυτά και στη συνέχεια να καταναλωθούν ως εδώδιμα εμβόλια.(D.A.Goldstein et al,2004).

Έχει γίνει θέμα συζήτησης ότι οι ωφέλειες από τα εδώδιμα εμβόλια είναι ποικίλες. Τα ενέσιμα παραδοσιακά εμβόλια είναι ακριβά, απαιτούν ιατρικό προσωπικό για τη χορήγηση και συνήθως απαιτούν συνεχή ψύξη κατά τη διάρκεια της μεταφοράς και της αποθήκευσης, γεγονός που δημιουργεί πολλές δυσκολίες ιδίως σε αναπτυσσόμενες χώρες. Η χρήση βελονών, επίσης, προκαλεί τον κίνδυνο διασποράς λοιμώξεων.(Kristina Hug,2008)

Τέτοια πρωτότυπα εμβόλια για λοιμώξεις ενάντια σε παθογόνα που μεταφέρονται με τον εντερικό σωλήνα έχουν αναπτυχθεί και περιλαμβάνουν εμβόλια ενάντια στο εντεροτοξινογόνο E. Coli, το δονάκιο της χολέρας και τους νοροϊούς.

E. Coli

Μερικά στελέχη E. Coli, τα οποία ονομάζονται εντεροτοξινογόνα (Enterotoxigenic strains - ETEC) παράγουν εντεροτοξίνη (Labile toxin-LT) θερμοευαίσθητη ή θερμοανθεκτική ή και τα δύο. Η παραγωγή της θερμοευαίσθητης εντεροτοξίνης (Labile-toxin-LT) ρυθμίζεται από την ύπαρξη πλασμιδίων στο μικρόβιο. Η τοξίνη έχει μοριακό βάρος 80000 daltons και αποτελείται από πεπτίδια. Διακρίνονται δύο υποομάδες της εντεροτοξίνης, η A και η B. Η B προσκολλά στη γαγγλιοσίδη GM1 των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου και διευκολύνει την είσοδο της υποομάδας A στο κύτταρο, όπου ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Έτσι, αυξάνεται η συγκέντρωση της cAMP (κυκλικής 3,5-μονοφωσφορικής αδενοσίνης), με αποτέλεσμα την έντονη απέκκριση ύδατος και χλωρίου. Κατ' αυτόν τον τρόπο προκαλείται υπερκινητικότητα του εντέρου και διάρροια.(Παπαπαναγιώτου ,Δαλαΐνα, Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία)

Το εμβόλιο έναντι στο εντεροτοξινογόνο E. Coli βασίστηκε στην υψηλή ανοσογεννητικότητα της θερμοευαίσθητης αυτής εντεροτοξίνης (LT) του E. Coli. Η τοξίνη αποτελείται, όπως αναφέραμε, από μια ενζυμική ενεργό – A υπομονάδα και πέντε υπομονάδες, γνωστές ως LT-B που είναι ανοσογεννητικές.(Carol O.Tacket,2005)

Γονίδια που κωδικοποιούν την LT-B μεταφέρθηκαν δια μέσου του A. Tumefaciens στον καπνό και στην πατάτα και στη συνέχεια ποντίκια ταΐστηκαν με φύλλα καπνού και πατάτες. Ποντίκια που κατανάλωσαν πολλαπλές δόσεις των 5g από αυτές τις πατάτες ανέπτυξαν IgG αντισώματα στον ορό, καθώς και τοπικές εκκρίσεις

IgA ενάντια στην LT-B (παρόμοια με ζώα που ανοσοποιήθηκαν με 20μg κεκαθαρμένης LT-B από βακτήρια.(Carol O.Tacket,2005)

Ένα άλλο μέσο έκφρασης LT-B είναι το διαγονιδιακό καλαμπόκι. Είναι φτηνό και μπορεί να αυξηθεί γρήγορα με μέσο χρόνο αναπαραγωγής τους 3-4 μήνες.(Carol O.Tacket, 2005)

Δονάκιο της χολέρας

Η χολέρα είναι μια διαρροϊκή ασθένεια με παθογένεια παρόμοια με αυτή των εντεροτοξινογόνων στελεχών E. Coli, αφού τόσο στη μία όσο και στην άλλη απαιτούνται εντερικές αποικίες με παραγωγή εκκριτικών τοξινών. Πέρα όμως από την παθογένεια, η Lt τοξίνη του εντεροτοξινογόνου E. Coli είναι παρόμοια προς την εντεροτοξίνη του δονακίου της χολέρας, η οποία είναι μια ισχυρή εξωτοξίνη που καταστρέφεται στους 56°C και αποτελείται από τις υπομοναδες A και B.(Παπαπαναγιώτου,Δαλαίνα, Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία)

Ωστόσο, η επιδημιολογία της χολέρας είναι διαφορετική από αυτή του ETEC στο ό,τι τα δονάκια της χολέρας 01 και 0139 είναι αιτίες υδατογενών λοιμώξεων που μπορούν να καταλήξουν σε πανδημία.(Carol O. Tacket, 2005)

Μια διαγονιδιακή πατάτα που εκφράζει την τοξίνη-υπομονάδα B του δονακίου της χολέρας (ανάλογη, όπως αναφέραμε, με την LT-B του ETEC) προκάλεσε ορολογικές και τοπικές – εντερικές εκκρίσεις αντί CT-B αντισφαιρινών ύστερα από χορήγηση από το στόμα σε ποντίκια σε τέσσερις δόσεις.(Carol O. Tacket,2005)

Νοροϊοί

Οι νοροϊοί είναι εντερικοί ιοί της οικογένειας των Caliciviridae – αιτία επιδημικών γαστρεντερίτιδων. Σωματίδια γυμνών Norwalk ιών είναι ανοσογεννητικά, όταν χορηγούνται από το στόμα σε εθελοντές και αποτελούν ενδεχόμενα εμβόλια.(Carol O. Tacket, 2005)

Δοκιμάστηκαν, επίσης, εμβόλια κατά της ιλαράς, της λύσσας και του άνθρακα.(P.Lall et al,2007)

Ιλαρά

Για την προφύλαξη από την ιλαρά υπάρχει εμβόλιο που παρασκευάζεται από ζώντα εξασθενημένο ιό. Σε χώρες όπου ενδημεί η νόσος και προσβάλλει τα παιδιά σε πολύ μικρή ηλικία (όπως συμβαίνει στις αναπτυσσόμενες χώρες) το εμβόλιο χορηγείται προ της συμπλήρωσης του 1ου έτους της ηλικίας, (τον 9ο μήνα), γιατί η νόσος είναι επικίνδυνη, όταν συμβαίνει στην ηλικία αυτή. Στην περίπτωση αυτή συνιστάται η χορήγηση και δεύτερης δόσης στην ηλικία 12 – 15 μηνών.

Σε χώρες όπου η ιλαρά δεν εμφανίζεται σε εκτεταμένες επιδημίες ο εμβολιασμός γίνεται μετά τον 15ο μήνα της ηλικίας και αυτό ισχύει και για την Ελλάδα.

Στην Ελλάδα το 1989 καθιερώθηκε ο εμβολιασμός κατά της ιλαράς σε συνδυασμό με τα εμβόλια της παρωτίτιδας και ερυθράς (το σχήμα MMR) ως υποχρεωτικός στην ηλικία των 15 μηνών. Το 1991 το υπουργείο υγείας συνέστησε και δεύτερη δόση του εμβολιασμού MMR στην ηλικία των 11-12 χρονών και το 1999 τροποποίησε το σχήμα και συνέστησε η δεύτερη δόση να γίνεται στην ηλικία των 4-6 χρονών.(Παπαπαναγιώτου,Δαλαίνα, Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία σελ.259)

Αξίζει λοιπόν να αναφέρουμε ότι διαγονιδιακό ρύζι ως παιδική τροφή ενάντια στην ιλαρά έχει αναπτυχθεί. Όταν δίνεται μαζί με το εμβόλιο της χολέρας (CT-B, 35-50

gr MV-H (αιμογλουτίνη από ιό της ιλαράς), είναι αρκετή. Ωστόσο, μια αυξημένη δόση είναι αναγκαία όπου χορηγείται μόνης της.(P.Lall et al ,2007)

Ηπατίτιδα Β

Για την ηπατίτιδα Β τα πρώτα πειράματα σε άνθρωπο από διαγονιδιακή πατάτα έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Το ποσό του HBsAg που χρειάζεται εμπεριέχεται σε μια απλή πατάτα.(P Lall et al ,2007)

Άνθρακας

Τέλος να επισημάνουμε ότι φύλλα καπνού «βομβαρδισμένα» με γονίδια του άνθρακα παρήγαγαν την κύρια πρωτεΐνη που υπάρχει στα ήδη χρησιμοποιούμενα εμβόλια. Δισεκατομμύρια μονάδες αντιγόνου του βακίλου του άνθρακα μπορούν να παραχθούν. Επιπρόσθετα μπορεί να αποφευχθεί ο οίδηματικός και θανατηφόρος παράγοντας. Το ίδιο μπορεί να γίνει με διαγονιδιακή ντομάτα και σπανάκι.(P.Lall et al 2007)

Πίνακας 6 Τελευταίες εξελίξεις Γενετικά τροποποιημένων φυτών στο χώρο των εμβολίων.

Εμβόλια		
Μικροοργανισμός	Αντιγονική ουσία	Προϊόν
Esh Coli ETEC	Θερμοαναισθητή εντεροτοξίνη LT υπομονάδα LT-B	Καπνός Καλαμπόκι
Δυνάκιο της χολέρας	Υπομονάδα – B της χολερικής τοξίνης	Πατάτα
Νοροϊοί	Ανοσογεννητικά ιικά σωματίδια	
Ιός της ιλαράς	Αιμογλουτίνη από ιό της ιλαράς	Ρύζι
Ιός ηπατίτιδας Β	Αυστραλιανό αντιγόνο HBsAg	Πατάτα
Βάκιλος του άνθρακα	Αντιγόνο του χρησιμοποιούμενου εμβολίου Οίδηματικός, θανατηφόρος παράγοντας	Καπνός τομάτα σπανάκι

ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) είναι σημαντικά τόσο για την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας της ίδιας, όσο και σαν προϊόντα για θεραπευτικούς και διαγνωστικούς λόγους. Η πρώτη παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων έγινε από τους Kohler και Milsterin (1975) οι οποίοι μετά τη σύζευξη σωματικών κυττάρων παρήγαγαν συνεχείς κυτταρικές σειρές (υβριδώματα) που εκκρίνουν αντίσωμα με ομοιογενή σύσταση (μονοκλωνικό).

Τα παραδοσιακά θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα προέρχονται από ποντίκια. Οι ανασυνδυαστικές τεχνολογίες έχουν επιτρέψει τα αντισώματα που προέρχονται από ποντίκια να αντικατασταθούν με εν μέρει εξανθρωπισμένα ή χιμαιρικά αντισώματα ή, τελευταία, με πλήρως ανθρώπινα αντισώματα..

Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία αντισώματα εκφρασμένα στα φυτά έχουν δείξει το ενδεχόμενο πιθανής θεραπευτικής χρήσης. Ένα χιμαιρικό εκκριτικό IgG/IgA αντίσωμα το οποίο είναι αποτελεσματικό έναντι στο επιφανειακό αντιγόνο του *Streptococcus mutans* και παράγεται στον καπνό, είναι προστατευτικό σε παθήσεις των δοντιών.

Η σόγια μπορεί να εκφράσει το εξανθρωπισμένο αντι-ικό αντίσωμα κατά του ιού του απλού έρπητα (HSV), το οποίο **προλαμβάνει** τη μετάδοση του ιού HSV-2 στα ζώα.

Το ρύζι και το καλαμπόκι μπορούν να παράγουν αντισώματα ενάντια στα καρκινοεμβρυϊκά αντιγόνα, χρήσιμα για τη διάγνωση του καρκίνου. (D.A.Goldstein, et al, 2004)

Πίνακας 7 Τύποι Μονοκλωνικών αντισωμάτων σε διαγονιδιακά φυτά

ΦΥΤΟ	ΑΝΤΙΣΩΜΑ (ΣΤΟΧΟΣ)	ΣΚΟΠΟΣ
ΚΑΠΝΟΣ	IgG (χαμηλού MB φωσφορικοί εστέρες)	Καταλυτικά αντισώματα
ΚΑΠΝΟΣ	IgG (νηματοειδή)	Αντίσταση σε ασθένειες των φυτών
ΚΑΠΝΟΣ	sIgA/IgG (Str. Mutans)	Θεραπεία δοντιών
ΣΟΓΙΑ, ΡΥΖΙ	IgG (HSV)	Θεραπεία κόλπου
ΚΑΠΝΟΣ	IgG (Ca του κόλου)	Συστηματική θεραπεία
ΤΡΙΦΥΛΛΙ	IgG (ανθρώπινη IgG)	Διαγνωστική
ΚΑΠΝΟΣ	IgG (ιός της λύσσας)	Θεραπευτική
ΚΑΠΝΟΣ	IgG (HBV)	Ανοσογεννητική
ΚΑΠΝΟΣ	IgG (HBV)	Θεραπευτική

Πηγή K.Ko Koprowski / *Virus Research III* (2005) 93-100.

ΑΛΛΟΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Περαιτέρω, μια ευρεία ποικιλία από άλλους θεραπευτικούς παράγοντες προέρχονται από φυτά, όπως ορμόνες (σωματοτροπίνη), ένζυμα, εντερλευκίνες, ιντερφερόνες.

Οι ιντερφερόνες τύπου Ι αποτρέπουν την ιική αναπαραγωγή και την κυτταρική ανάπτυξη και ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Επομένως, έχουν πολλές κλινικές εφαρμογές. Οι INF-a2b βρίσκονται στην τρίτη θέση της παγκόσμιας αγοράς των βιοφαρμακευτικών, αμέσως μετά την ινσουλίνη και την ερυθροποιητίνη. Ο μέσος όρος των εξόδων ανά έτος για INF-a2b για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C είναι 26.000 δολάρια και είναι επομένως δύσκολα ή καθόλου προσιτή για την πλειονότητα των ασθενών κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Επομένως, η έκφραση INF-a2b έγινε στους χλωροπλάστες φύλλων καπνού και η διαγονιδιακή καλλιέργεια έγινε κατά περιοχές μετά την έγκριση του Υπουργείου Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών και την Υπηρεσία Ελέγχου της Υγείας Φυτών (USDA – APHIS).

Στις καλλιέργειες διαγονιδιακής INF-a2b η πρωτεΐνη είχε όμοια *in vitro* βιολογικά αποτελέσματα με την εμπορική αντίστοιχή της, όταν δοκιμάστηκε για τις ικανότητες της στο να προστατέψει κύτταρα ενάντια σε κυττοπαθογόνους ιούς (ιός της φλυκταινώδους στοματίτιδας VSV CPE), καθώς και στην πρόληψη της μόλυνσης από τον ιό HIV.

Οι αντικαρκινικές και ανοσοτροποποιητικές ικανότητες της INF-a2b δοκιμάστηκαν επίσης *in vivo*. INF-a2b προερχόμενη από χλωροπλάστες αύξησε την έκφραση του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας κλάσης I (MHC I) στα σπληνοκύτταρα και το συνολικό αριθμό των κυττάρων NK. Πιο συγκεκριμένα, ιντερφερόνη a2b καθαρμένη, προερχόμενη από χλωροπλάστες με διαγονιδιακά συστήματα (cp INF-a2b) προστάτεψε τα ποντίκια από υψηλά μεταστατικούς καρκίνους (Philip A. Arlem et al, 2007). Το γεγονός αυτό της έκφρασης υψηλών επιπέδων INF-a2b διαγονιδιακής προέλευσης και βιολογικά ενεργούς εγκαθιδρύει το πρώτο βήμα παραγωγής πρωτεΐνης του αίματος προερχόμενης από φυτά. Ένα κρίσιμο στάδιο για ανθρώπινη εφαρμογή και εμπορευματοποίηση

Δύο λόγια για την παραγωγή ερυθροποιητίνης στα φύλλα του καπνού.

Η ερυθροποιητίνη είναι μια ετερόλογος πρωτεΐνη του αίματος που συγχρόνως χρησιμοποιείται σε παγκόσμια κλίματα σαν εμπορικό υποκατάστατο για τη θεραπεία της αναιμίας. Είναι το περισσότερο πολύτιμο βιοφαρμακευτικό στην αγορά.

Η ερυθροποιητίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της αναιμίας, έχει κυκλοφορήσει στο εμπόριο από καλλιέργειες ζωικών κυττάρων εδώ και 20 χρόνια. Μια αδρή εκτίμηση των επιπτώσεων χρήσης ερυθροποιητίνης ως εμπορικό υποκατάστατο του αίματος και κατ' επέκταση των εκτεταμένων αναγκών παραγωγής της είναι:

- α) Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ιδιαίτερα τελικού σταδίου.
- β) Μυελοδυσπλαστικά νοσήματα του αίματος.
- γ) Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, πολλαπλούν μυέλωμα, λεμφώματα, και άλλοι συμπαγείς όγκοι.
- δ) Σε περιπτώσεις αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών.
- ε) Στην αναιμία από λοίμωξη από τον ιό HIV.
- στ) Σε θαλασσαιμικά σύνδρομα. (Ι.Επ.Γεωργούλης, Αιματολογία: διαγνωστικές προσεγγίσεις).

Πειράματα διαγονιδιακής παραγωγής ερυθροποιητίνης σε φύλλα καπνού έδειξαν ότι η συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μειώθηκε σημαντικά σε κάθε φύλλο του καπνού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του. Η μείωση των επιπέδων της ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης στα φύλλα συνδυάστηκε με μια πρωτεολυτική διεργασία (σχετιζόμενη με τη γήρανση των φυτών), αφού σίγαση των διαγονιδίων δεν ανιχνεύτηκε.(Conley A.J.et al,2010)

ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ.

Παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα της χρήσης βιοτεχνολογίας στον τομέα της γεωργίας, υπάρχουν αρκετοί ενδοιασμοί ως προς το αν πρέπει να εφαρμοστεί μια παρεμβατική μέθοδος στην παραγωγή τροφίμων, καθώς υπάρχουν πολλοί φόβοι και ενδεχόμενοι κίνδυνοι.

Πιθανά αλλεργιογόνα

Αλλεργία μπορεί να προκληθεί κατευθείαν από τις νέες πρωτεΐνες που παράγουν νέα αλλεργιογόνα. Η δομή των γλυκοπρωτεϊνών που παράγονται στα φυτά είναι τέτοια που έχουν δύο υδρογονάνθρακες που βρίσκονται στις N-γλυκάνες των φυτών και των ασπώνδουλων, αλλά όχι και στα θηλαστικά. Αυτοί είναι η ξυλόζη (ένα σάκχαρο που παράγεται στα θηλαστικά, αλλά βρίσκεται κυρίως στα φυτά σαν β (1,2) – ξυλόζη και συνδέεται με τη β-μαννόζη και δεύτερον η α (1,3) – φουκόζη που συνδέεται με τη γλυκοζαμίνη.

Αυτές οι δομές είναι αρκετές για να επιτρέψουν στις ζωικές πρωτεΐνες, όπως είναι οι ανοσοσφαιρίνες, να παραχθούν σε επαρκείς ποσότητες και έχουν εξακριβωθεί ως αλλεργιογόνα. Ακόμα μπορούν να συνεισφέρουν σε διασταυρωμένη αντίδραση μεταξύ άσχετων γλυκοπρωτεϊνών, καθώς επίσης, πιθανόν αντιδρούν με IgE σε ατοπικά άτομα.

Το παραπάνω μπορούμε να το έχουμε υπόψη, όταν σχεδιάζουμε κλινικές μελέτες για γλυκοπρωτεΐνες από φυτά. Βρέθηκε ότι IgG ανοσοσφαιρίνες που παράχθηκαν σε φύλλα καπνού είναι αλλεργιογόνες σε ποντίκια. Ωστόσο, δεν υπάρχουν σχετικές έρευνες στον άνθρωπο.(Stain and Webbert,2001)

Μερικά άλλα παραδείγματα πιθανής αλλεργιογόνου δράσης είναι τα εξής:

Η Brassica juncea, ένα γενετικά τροποποιημένο φυτό, το οποίο εκφράζει το γονίδιο της οξειδάσης της χολίνης, προκάλεσε χαμηλή IgE απάντηση στους μυς και η ανίχνευση για διασταυρούμενους επίτοπους, έδειξε μια περιοχή παρόμοια με αυτή της πρωτεΐνης Hevea brasiliensis (Hevh6), με μερικές αντιγονικές ιδιότητες, αν και δεν είχε αλλεργιογόνο δράση. Τα ευρήματα αυτά θα πρέπει να αξιολογηθούν πιο προσεκτικά και να επαναληφθούν σε άλλα είδη πειραματόζωων, ώστε να μπορεί να διερευνηθεί αν η IgG απάντηση μπορεί να παίζει ρόλο στην πρόκληση αλλεργίας.(Α.Α.Ντονά, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης,2009)

Ένας άλλος μηχανισμός αλλεργιογόνου ή τοξικής δράσης των γενετικά μεταλλαγμένων συστατικών ενός τροφίμου είναι η ενδεχόμενη πλειοτροπική δράση από την εισαγωγή των γονιδίων. Τα μέσα μαζικής ενημέρωσης έχουν ασχοληθεί επισταμένως μ' αυτό το ζήτημα. Για παράδειγμα, η εισαγωγή ενός γονιδίου, σε συνδυασμό με τον εκκινητή του, στο γενετικό υλικό ενός φυτού, θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της έκφρασης ενός γειτονικού γονιδίου για μια τοξίνη ή ένα αλλεργιογόνο, το οποίο υπήρχε και προηγουμένως, χωρίς όμως να εκφράζεται.(Rowland,2002)

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 τοξικότητα 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 τη 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.

Τοξικότητα και πρόκληση υπερουριχαιμίας

Δύο λόγια όσον αφορά πιθανή τοξικότητα των νουκλεοτιδίων μεταλλαγμένων τροφών. Γύρω στο 20% των ενηλίκων του δυτικού κόσμου υποφέρει από υπερουριχαιμία, 5-10% από τους οποίους έχει εμπλακεί με αρθρίτιδα. Πέρα από γενετική προδιάθεση, τα νουκλεϊκά οξέα που λαμβάνονται με την τροφή παίζουν σημαντικό ρόλο στα επίπεδα του ουρικού οξέος. Κρέας και εντόσθια ζώων που τρέφονται με πανίδα είναι οι πηγές-κλειδιά νουκλεοτιδίων στην Ευρώπη.(Jonas et al,2001)

Το DNA που βρέθηκε σε τοπικές δίαιτες ανθρώπου δεν είναι τοξικό. Εφόσον το ανασυνδυασμένο DNA και το DNA μη μεταλλαγμένων φυτών έχουν την ίδια δομή, δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι το πρώτο έχει πιθανές τοξικολογικές ιδιότητες. Έτσι, δεν υπάρχει καμία διαφορά στον κίνδυνο αρθρίτιδας σε ανθρώπους που τρέφονται με μεταλλαγμένες ή συμβατικές καλλιέργειες ή με την κατανάλωση ζώων που τράφηκαν αντίστοιχα με συμβατικές ή μεταλλαγμένες καλλιέργειες.(Jonas et al,2001).

Άλλες πιθανές τοξικές δράσεις-καρκινογένεση.

Ο κίνδυνος πρόκλησης καρκίνου μπορεί να εμφανιστεί, γιατί οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες έχουν υψηλότερα επίπεδα υπολειμμάτων εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων από τις συμβατικές και το κύριο συστατικό των ζιζανιοκτόνων, η γλυκοφωσφατάση, έχει ενοχοποιηθεί για non Hodgkin λεμφώματα.(D.A.Goldstein et al,2004)

Οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal gene transfer – HGT)

Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε εάν τα διαγονίδια γενετικά μεταλλαγμένων τροφών προσλαμβάνονται από τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου και με την οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT) μετακινούνται στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου ή άλλα σωματικά κύτταρα. Σχετικά πειράματα in vitro έδειχναν ότι αυτή η ροή γονιδίων είναι πιθανό να είναι το αποτέλεσμα μακρόχρονης έκθεσης σε γενετικά τροποποιημένες τροφές. Οι συνέπειες για τη λειτουργία του εντέρου ή για τη σωστή λειτουργία των εντερικών βακτηρίων είναι προς το παρόν άγνωστες και χρειάζεται να εξερευνηθούν περισσότερο. Για παράδειγμα, είναι σημαντικό να εξακριβώσουμε τον οργανισμό και τη θέση όπου έχει εισαχθεί το νέο γονίδιο. Βασισμένοι σε μαθηματικά μοντέλα, άλλοι επιστήμονες έχουν υποθέσει ότι σπάνια βακτήρια που έχουν αποκτήσει νεοεισελθέντα γονίδια μέσω της HGT χρειάζονται χρόνια ανάπτυξης, για να μετατραπούν σε πλήρη-άγριο τύπο βακτηρίων. Οι σύγχρονες προσεγγίσεις ελέγχου και διαπίστωσης είναι ανεπαρκείς, για να μπορέσουμε ή να διαψεύσουμε ή να επαληθεύσουμε την οριζόντια μεταφορά γονιδίων.(Mathers,2006)

Αντοχή στα αντιβιοτικά

Η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι σχετική με τον προηγούμενο μηχανισμό. Γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά μπορούν να μεταφερθούν με HGT από γενετικά τροποποιημένα φυτά στα βακτήρια του εντέρου μέσω της τροφικής αλυσίδας, καθώς

επίσης και στα βακτήρια του εδάφους και των φυτών. Ωστόσο, η διάσπαση του DNA των τροφών μειώνει τον κίνδυνο. Το ίδιο και σ' αυτήν την περίπτωση, η HGT γονιδίων αντοχής σ' ένα αντιβιοτικό από τα φυτά στα βακτήρια δεν έχει αναφερθεί και εισάγεται απλώς η πιθανότητα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και η Επιτροπή Διατροφής και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών έχουν αποφανθεί ότι αυτό το γεγονός δεν μπορεί να αποκλειστεί και πρέπει να εκτιμηθεί με άλλους συνυπάρχοντες παράγοντες κινδύνου για αντοχή στα αντιβιοτικά.(D.A.Goldstein et al,2004)

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 στα ζιζανιοκτόνα Roundup ready σόγια, που μπορεί να παρουσιάσει αύξηση των αντιδιατροφικών ουσιών. Οι θερμοανθεκτικές αντιδιατροφικές ουσίες, όπως τα φυτοοιστρογόνα, οι γλυκίνες και το φυτικό οξύ, έχει βρεθεί ότι προκαλούν προβλήματα στη γονιμότητα σε πρόβατα και βοοειδή, αλλεργικές αντιδράσεις και δέσμευση του φωσφόρου και του ψευδαργύρου, με αποτέλεσμα αυτά να μην είναι πλέον διαθέσιμα για τα ζώα.

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι από την ανασκόπηση των δοκιμαστών τοξικότητας των ΓΤ τροφίμων πιθανό κάποιος να διαπιστώσει ότι η διάρκεια της έκθεσης είναι πολύ μικρή, για να βγουν τα οποιαδήποτε συμπεράσματα. (Α.Δ. Ντονά, Ι.Σ. Αρβανιτογιάννης.) Παρόμοια, πρέπει να υπάρχουν εντατικοί πειραματικοί έλεγχοι για την αξιολόγηση της πρωτεϊνικής αλλεργιογόνου δράσης στον άνθρωπο. (Οι μελέτες πρέπει να γίνουν σε άτομα ανοσοκατεσταλμένα ή με ιστορικό αλλεργίας).

Είναι όμως η στιγμή να δούμε πώς μπορούμε να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στα τρόφιμα.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων: η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και η ανοσοπροσοφητική ανάλυση στερεάς φάσης με σύνδεση ενζύμου (ELISA).

1) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια τεχνική βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Η PCR είναι μια *in vitro* μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιημένου DNA και μπορεί να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση πολλών μεθόδων γενετικής επέμβασης. Συγκεκριμένα DNA θραύσματα μπορούν να κλωνοποιηθούν σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (απουσία ζωντανών κυττάρων) με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Τα στάδια της αντίδρασης

Η τεχνική PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων, οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια: (εικόνα1)

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA.
2. Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο (primer annealing).
3. Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της tag πολυμεράσης (primer extension).

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αναδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92°C και 96°C. Με αυτόν τον τρόπο οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA απομακρύνονται.

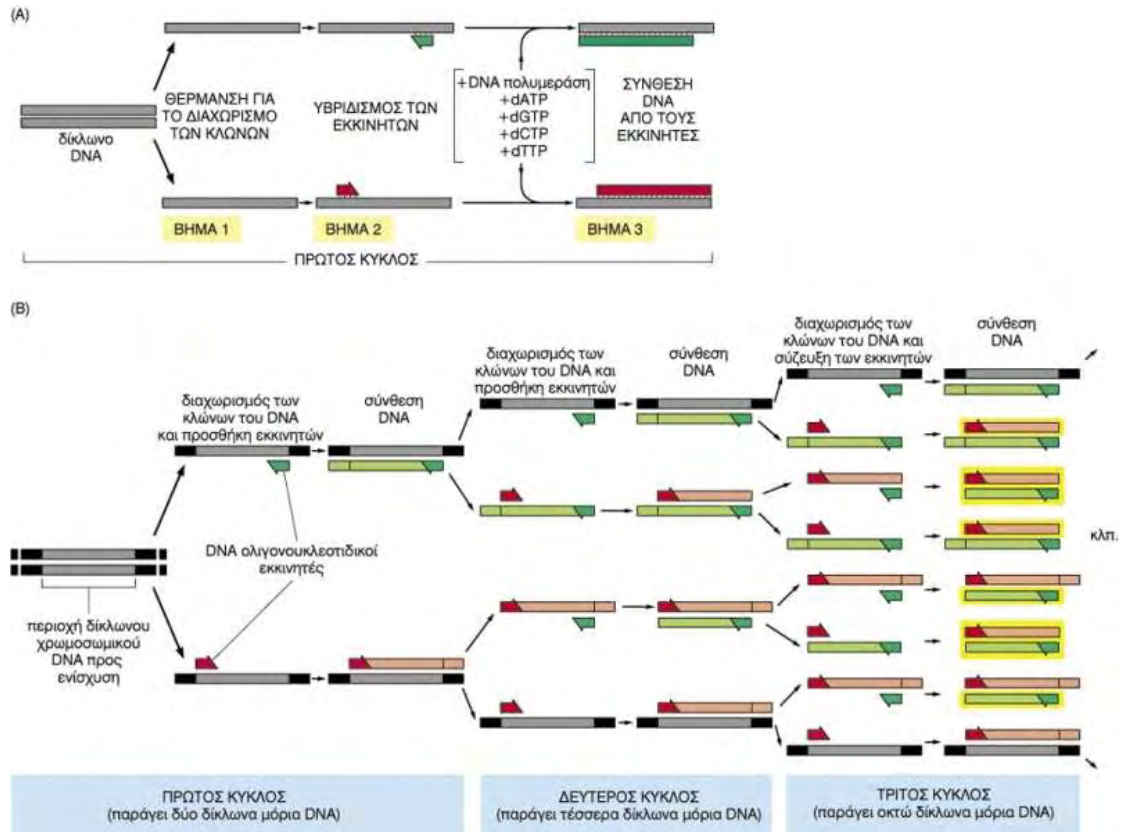
Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης (50°C–65°C) επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία αφορούν την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.

Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72°C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση, που επιτρέπει τη σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοανθεκτικού ενζύμου πολυμεράσης του βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* (Tan Polymerase). Η Tan Polymerase συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό. Ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA – στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.

Σε μια τυπική ανάλυση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και άνθισης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, συνήθως 30 ή 40, καταλήγοντας στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο, ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Η αξιολόγηση του προϊόντος της PCR δίνεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή αгарόζης χρησιμοποιείται πιο συχνά

στο διαχωρισμό τμημάτων DNA μήκους από λίγες εκατοντάδες έως και 20000 βάσεις. Το DNA γίνεται ορατό με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου. Το πολυακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρότερων τμημάτων DNA. Το μήκος του προϊόντος συγκρίνεται με το μήκος γνωστού μάρτυρα (DNA Ladder), το οποίο ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα.

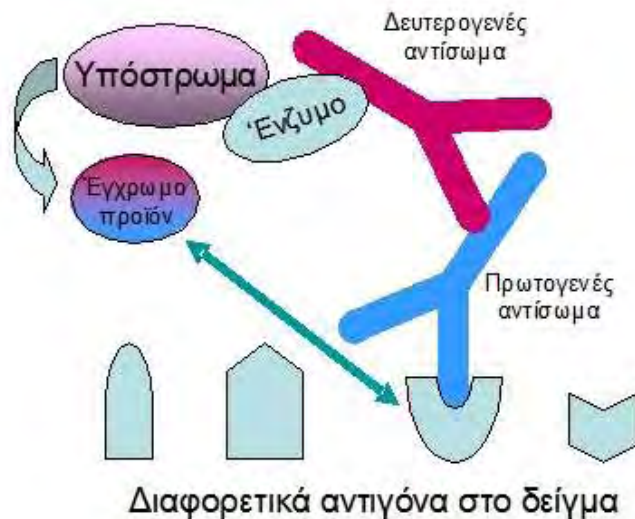


Εικόνα 5. Τα βήματα της μεθόδου PCR

2. ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ (ELISA).

Στις τεχνικές των ανοσοδοκιμασιών χρησιμοποιούνται σεσημασμένα αντισώματα για την ανίχνευση αντιγόνων και αντισωμάτων και είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και πολύ οικονομικές στην κατανάλωση αντιδραστηρίων.

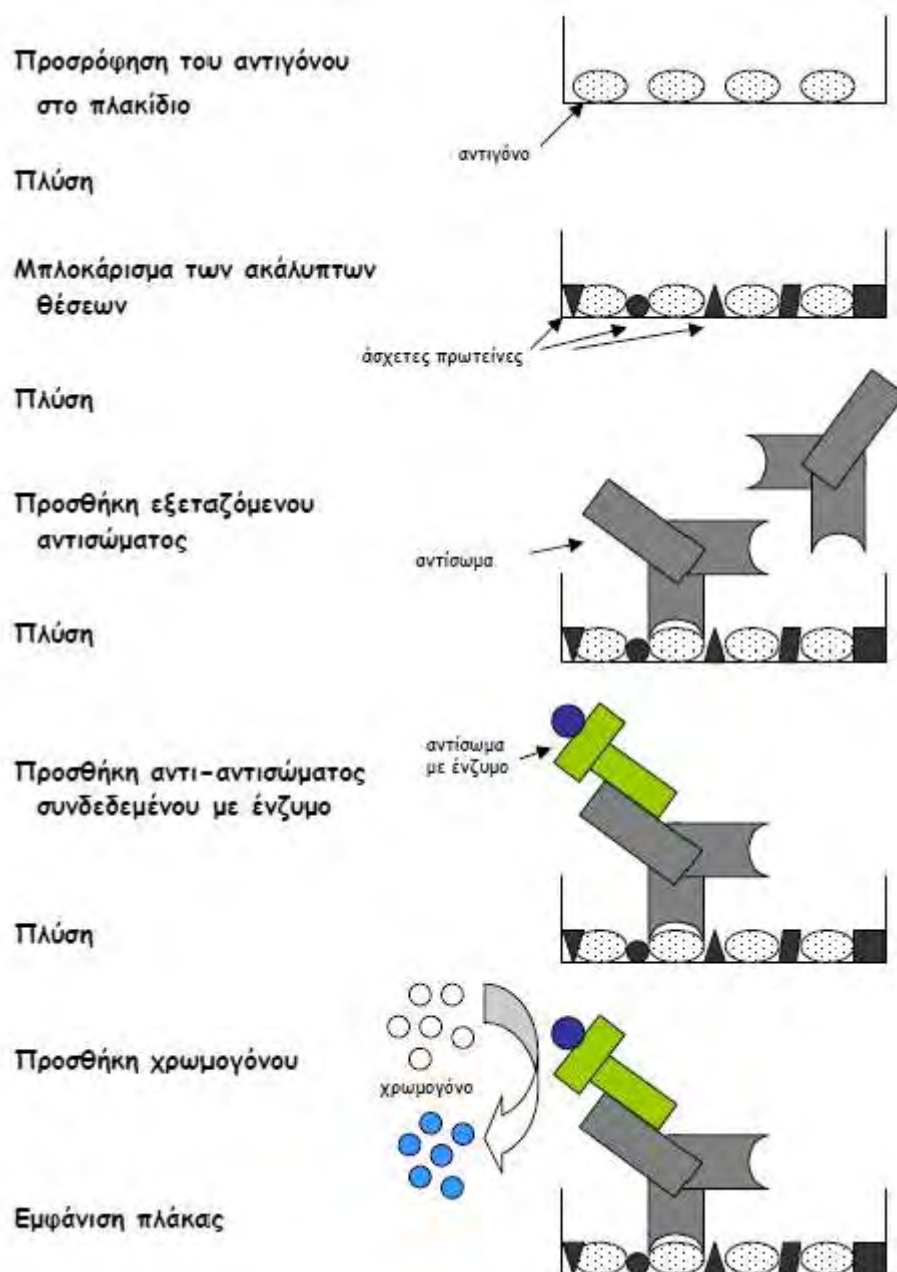
Στην ELISA γίνεται χημική σύνδεση ενός ενζύμου με το αντίσωμα ή αντιγόνο.



Εικόνα 6. Μέθοδος ELISA

Ανοσοδοκιμασία για αντισώματα

Αντιγόνα επωάζονται σε ισότονο διάλυμα αλάτων, μέσα σε πλαστικά πλακίδια ή σωληνάρια. Μικρές ποσότητες προσροφώνται επάνω στην πλαστική επιφάνεια. Το ελεύθερο αντιγόνο απομακρύνεται με πλύση. Προστίθεται το εξεταζόμενο αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με το αντιγόνο. Οι μη προσδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται με πλύση. Το αντίσωμα ανιχνεύεται από ένα σημασμένο πρόσδεμα / αντίσωμα. Το μη συνδεδεμένο πρόσδεμα απομακρύνεται με πλύση. Μετράται το σήμα που βρίσκεται προσδεμένο στα πλακίδια



Εικόνα 7. Τα βασικά βήματα της μεθόδου ELISA

**ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ - ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΟΙΝΗΣ ΓΝΩΜΗΣ ΣΤΟΥΣ ΝΟΜΟΥΣ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ - ΚΑΡΑΙΤΣΑΣ – ΛΑΡΙΣΑΣ.**

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος είναι τα εξής:

		Συχνότητα	%
Φύλο	Άνδρας	23	(40,4)
	Γυναίκα	35	(59,6)
	Σύνολο	58	(100,0)
Ηλικία	15-24 ετών	19	(32,8)
	25-45 ετών	21	(36,2)
	46 ετών και άνω	18	(31,0)
	Σύνολο	58	(100,0)
Εκπαίδευση	Απόφοιτος Δημοτικού	0	(0,0)
	Απόφοιτος Γυμνασίου	0	(0,0)
	Απόφοιτος Λυκείου	24	(41,4)
	Ανώτερη/Ανώτατη εκπαίδευση	34	(58,6)
	Σύνολο	58	(100,0)

Οι απαντήσεις των συμμετεχόντων στο ερωτηματολόγιο είναι οι εξής :

		Συχνότητα	%
Γνωρίζετε τι είναι τα Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα (ΓΤΤ);	Ναι	52	(89,7)
	Όχι	6	(10,3)
	Σύνολο	58	(100,0)
Τι στάση έχετε απέναντι στα ΓΤΤ;	Θετική	1	(1,7)
	Αρνητική	47	(81,0)
	Αδιάφορη	10	(17,2)
	Σύνολο	58	(100,0)
Γνωρίζετε ότι κάποια από τα τρόφιμα που καταναλώνετε είναι ΓΤΤ;	Ναι	26	(44,8)
	Όχι	32	(55,2)
	Σύνολο	58	(100,0)
Ελέγχετε τις ετικέτες των προϊόντων όταν ψωνίζετε;	Πάντα	10	(17,2)
	Μερικές φορές	41	(70,7)
	Ποτέ	7	(12,1)
	Σύνολο	58	(100,0)
Αν γνωρίζατε ότι ένα προϊόν είναι ΓΤΤ θα το αγοράζατε;	Ναι	3	(5,2)
	Όχι	42	(72,4)
	Ίσως	13	(22,4)
	Σύνολο	58	(100,0)
Θα σκεφτόσασταν να αγοράσετε ΓΤΤ αν ήταν φθηνότερα ή καλύτερης εμφάνισης;	Ναι	3	(5,5)
	Όχι	39	(70,9)
	Ίσως	13	(23,6)

	Σύνολο	55	(100,0)
Πιστεύετε ότι έχετε αρκετή πληροφόρηση για τα ΓΤΤ;	Ναι	4	(7,1)
	Όχι αρκετή	43	(76,8)
	Καθόλου	9	(16,1)
	Σύνολο	56	(100,0)
Θα σας ενδιέφερε να συμμετάσχετε σε μια ημερίδα ενημέρωσης για τα ΓΤΤ;	Ναι	33	(58,9)
	Όχι	5	(8,9)
	Ίσως	18	(32,1)
	Σύνολο	56	(100,0)
Γνωρίζετε τι είναι τα βιολογικά ή οργανικής καλλιέργειας τρόφιμα;	Ναι	46	(82,1)
	Όχι	10	(17,9)
	Σύνολο	56	(100,0)

** Ως προς το Φύλο ενδιαφέρουσα είναι η παρακάτω ερώτηση

Θα σας ενδιέφερε να συμμετάσχετε σε μια ημερίδα ενημέρωσης για τα ΓΤΤ;

		Ναι - Ίσως		Όχι	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Φύλο	Άνδρας	18	(77,3)	5	(22,7)
	Γυναίκα	35	(100,0)	0	(0,0)

p-value=0.007

Οι γυναίκες είναι πιο πιθανό ($p=0.007$) να ενδιαφέρονται να συμμετάσχουν σε ημερίδα ενημέρωσης για τα ΓΤΤ.

** Ως προς την Ηλικία οι απαντήσεις στις ερωτήσεις ταξινομούνται αναλυτικά ως εξής και προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα.

1. Γνωρίζετε τι είναι τα Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα (ΓΤΤ);

		Ναι		Όχι	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	14	(73,7)	5	(26,3)
	25-45 ετών	21	(100,0)	0	(0,0)
	46 ετών και άνω	17	(94,4)	1	(5,6)

p-value=0.011

τα άτομα ηλικίας 15-24 έχουν μεγαλύτερη άγνοια σχετικά με τα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας ($p=0.011$) για το τι είναι γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα.

2. Τι στάση έχετε απέναντι στα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα;

		Θετική - Αδιάφορη		Αρνητική	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	5	(26,3)	14	(73,7)
	25-45 ετών	4	(19,0)	17	(81,0)
	46 ετών και άνω	2	(11,1)	16	(88,9)

$p\text{-value}=0.488$

και στις τρεις ομάδες ηλικιών η πλειοψηφία των ερωτηθέντων δηλώνει πως έχει αρνητική στάση απέναντι στα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα.

3. Γνωρίζετε ότι κάποια από τα τρόφιμα που καταναλώνετε είναι ΓΤΤ;

		Ναι		Όχι	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	8	(42,1)	11	(57,9)
	25-45 ετών	12	(57,1)	9	(42,9)
	46 ετών και άνω	6	(33,3)	12	(66,7)

$p\text{-value}=0.316$

όπως παρατηρούμε ένα σημαντικό ποσοστό και στις τρεις ομάδες δηλώνει πως δεν γνωρίζει αν κάποιο από τα τρόφιμα που καταναλώνει είναι γενετικά τροποποιημένο.

4. Ελέγχετε τις ετικέτες των προϊόντων όταν ψωνίζετε:

		Πάντα - Μερικές φορές		Ποτέ	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	18	(94,7)	1	(5,3)
	25-45 ετών	20	(95,2)	1	(4,8)
	46 ετών και άνω	13	(72,2)	5	(27,8)

$p\text{-value}=0.062$

η συντριπτική πλειοψηφία δεν ελέγχει τις ετικέτες των προϊόντων που αγοράζει.

5. Αν γνωρίζατε ότι ένα προϊόν είναι ΓΤΤ θα το αγοράζατε;

		Ναι - Ίσως		Όχι	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	10	(52,6)	9	(47,4)
	25-45 ετών	5	(23,8)	16	(76,2)
	46 ετών και άνω	1	(5,6)	17	(94,4)

p-value=0.005

παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η ηλικία τόσο μειώνεται το ποσοστό των ατόμων που δηλώνουν ότι θα αγόραζε ένα προϊόν ΓΤΤ ακόμη κι αν το γνώριζε. Συγκεκριμένα, θα το αγόραζε το 52,6% των ατόμων ηλικίας 15-24, το 23,8% των ατόμων ηλικίας 25-45 και μόλις το 5,6% των ατόμων ηλικίας 46 ετών και άνω.

6. Θα σκεφτόσασταν να αγοράσετε ΓΤΤ αν ήταν φτηνότερα ή καλύτερης εμφάνισης;

		Ναι - Ίσως		Όχι	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	9	(50,0)	9	(50,0)
	25-45 ετών	6	(28,6)	15	(71,4)
	46 ετών και άνω	1	(6,3)	15	(93,8)

p-value=0.020

οι απαντήσεις δείχνουν ότι τα άτομα μεγάλης ηλικίας δείχνουν μια επιφυλακτικότητα (ποσοστό 93,8) στο να αγοράσει γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα σε αντίθεση με τα άτομα ηλικίας 15_24 ετών και 25-45 ετών όπου τα αρνητικά ποσοστά δεν είναι τόσο μεγάλα(50,0 και 71,4 αντίστοιχα).

7. Πιστεύετε ότι έχετε αρκετή πληροφόρηση για τα ΓΤΤ;

		Ναι-λίγη		Καθόλου	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	15	(78,9)	4	(21,1)
	25-45 ετών	18	(85,7)	3	(14,3)
	46 ετών και άνω	14	(87,5)	2	(12,5)

p-value=0.764

όπως παρατηρούμε χωρίς στατιστική σημαντική διαφορά (p=0.764) τα άτομα όλων των ηλικιακών ομάδων δηλώνουν πως έχουν ενημέρωση για τα ΓΤΤ (ποσοστά 78,9 , 85,7 και 87.5 για τις τρεις ομάδες αντίστοιχα)

8. Θα σας ενδιέφερε να συμμετάσχετε σε μια ημερίδα για τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα;

		Ναι - Ίσως		Όχι	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	16	(84,2)	3	(15,8)
	25-45 ετών	21	(100,0)	0	(0,0)
	46 ετών και άνω	14	(87,5)	2	(12,5)

p-value=0.079

και στη ερώτηση αυτή οι ερωτηθέντες όλων των ηλικιακών ομάδων δηλώνουν στην πλειοψηφία τους (84,2 100,0 , 87,5 αντίστοιχα) και χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά (p-value=0,079) ότι επιθυμούν να ενημερωθούν για τα ΓΤΤ.

9.Γνωρίζετε τι είναι τα βιολογικά ή οργανικής καλλιέργειας τρόφιμα;

		Ναι		Όχι	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Ηλικία	15-24 ετών	15	(78,9)	4	(21,1)
	25-45 ετών	19	(90,5)	2	(9,5)
	46 ετών και άνω	12	(75,0)	4	(25,0)

p-value=0.408

όπως παρατηρούμε τα άτομα ηλικίας 25-45 ετών δηλώνουν πως γνωρίζουν τι είναι βιολογικά τρόφιμα σε ποσοστό 90,5. Αντίθετα στους συμμετέχοντες ηλικίας 15-24 ετών και 46 και άνω τα ποσοστά είναι μικρότερα (78.9 και 75.0 αντίστοιχα)

*Τελικά ως προς την Εκπαίδευση ενδιαφέρουσα είναι η ακόλουθη ερώτηση:

Αν γνωρίζατε ότι ένα προϊόν είναι γενετικά τροποποιημένο θα το αγοράζατε;

		Ναι - Ίσως		Όχι	
		Συχνότητα	%	Συχνότητα	%
Εκπαίδευση	Απόφοιτος Λυκείου	10	(41,7)	14	(58,3)
	Ανώτερη/Ανώτατη εκπαίδευση	6	(17,6)	28	(82,4)

p-value=0.044

οι απόφοιτοι Λυκείου δηλώνουν σε μεγαλύτερο ποσοστό πως θα αγόραζαν ένα προϊόν αν γνώριζαν πως είναι γενετικά τροποποιημένο (ποσοστό 41,7). Αντίθετα τα άτομα ανώτερης και ανώτατης εκπαίδευσης δείχνουν μεγαλύτερη επιφυλακτικότητα. (ποσοστό 17,6).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι να γίνει διερεύνηση για την ύπαρξη τυχόν γενετικής τροποποίησης στα παράγωγα και στα μεταποιημένα προϊόντα της τομάτας (ψιλοκομμένο τοματάκι και χυμούς τομάτας). Ο έλεγχος για γενετική τροποποίηση έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), μετά από απομόνωση του DNA, με τη βοήθεια εξειδικευμένου kit (First Magnetic Food Kit) για εντοπισμό συγκεκριμένων γενετικών τροποποιήσεων GMO.

2. Υλικά

Εργαστηριακά Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν υλικά και αναλώσιμα του εργαστηρίου Γενετικής Βελτίωσης φυτών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Συγκεκριμένα πιπέτες erpendorf, tubes erpendorf διαφόρων μεγεθών, ζυγαριά ακριβείας, θερμαντήρας (hot place), υδατόλουτρο, θερμοθάλαμος, στατήρες, λαβίδες, φυγόκεντροι, απεσταγμένο νερό, καθώς και τα επιμέρους διαλύματα που αναφέρονται στις μεθόδους.

Υλικά δειγματοληψίας

Το γενετικό υλικό απομονώθηκε από συσκευασίες τοματοπολτού που λήφθηκαν δειγματοληπτικά από τρία supermarkets της πόλης του Βόλου.

1. Κύκνος, ψιλοκομμένες τομάτες σε χυμό τομάτας (Greek Canning Company).

Συστατικά: Τομάτες, ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας, διορθωτικό οξύτητας κιτρικό οξύ (προστίθεται, όταν το φυσικό περιεχόμενο στην τομάτα δεν επαρκεί).

Θρεπτική αξία για 100gr

Ενεργειακή αξία	89 kJ (21 Kcal)
Πρωτεΐνες	1,3 gr
Υδατάνθρακες	3,5 gr
Λιπαρά	0,2 gr

2. Κονκασέ (τενεκεδάκι), ψιλοκομμένες αποφλοιωμένες τομάτες (Ζαναέ).

Συστατικά: Τομάτες

Θρεπτική αξία για 100gr

Ενεργειακή αξία	19 Kcal / 82 KJ
Πρωτεΐνες	1,2 gr
Υδατάνθρακες	3,2 gr
Λιπαρά	0,2 gr

3. Τοματίνια (τενεκεδάκι), ψιλοκομμένες αποφλοιωμένες τομάτες χωρίς συντηρητικά, φυτικό προϊόν 100% (Ομοσπονδία, Ένωση αγροτικών συνεταιρισμών Θεσσαλονίκης).

Συστατικά: Ψιλοκομμένη αποφλοιωμένη τομάτα, ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας.

Θρεπτική αξία για 100gr

Ενεργειακή αξία	21 Kcal / 90 KJ
-----------------	-----------------

Πρωτεΐνες	1,3 gr
Υδατάνθρακες	4,0 gr
Λιπαρές ύλες	< 0,1 gr

4. Pommaro από κτήμα (χαρτόνι), ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας (Βιολογικό προϊόν γεωργίας).

Συστατικά: Ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας (στερεά συστατικά 6% κατ' ελάχιστον) διορθωτικό οξύτητας κιτρικό οξύ.

Μέση θρεπτική αξία για 100gr

Ενεργειακή αξία	31 Kcal / 131 KJ
Πρωτεΐνες	1,25 gr
Υδατάνθρακες	6 gr
Λιπαρές ύλες	0,1 gr

5. Ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας (χαρτόνι), Προντάκτα Α.Ε.

Συστατικά: Ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας, αλάτι (7%, υλικά στερεά κατ' ελάχιστον), κιτρικό οξύ σαν ρυθμιστής οξύτητας.

Θρεπτική αξία για 100gr

Ενεργειακή αξία	22 Kcal / 92 KJ
Πρωτεΐνες	1,5 gr
Υδατάνθρακες	3 gr
Λιπαρές ύλες	0,1 gr

6. Pommaro Ελαίς, ψιλοκομμένες κλασσικές (τενεκεδάκι) χωρίς συντηρητικά, Ψιλοκομμένες αποφλοιωμένες τομάτες σε ελαφρά συμπυκνωμένο χυμό τομάτας.

Θρεπτική αξία για 100gr

Ενεργειακή αξία	25 Kcal / 95 KJ
Πρωτεΐνες	1,2 gr
Υδατάνθρακες	2 gr
εκ των οποίων σάκχαρα	1,7 gr
Λιπαρά	0,8 gr
εκ των οποίων κορεσμένα	0,1 gr
Φυτικές ίνες	1,3 gr
Νάτριο	0,01 gr
Λυκοπένιο	9,5 mg

Συστατικά: Ψιλοκομμένες αποφλοιωμένες τομάτες 70%, ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας 30%, διορθωτικό οξύτητας κιτρικό οξύ.

7. Primo Gusto κλασικό (χαρτόνι), ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας, Φυτικό προϊόν χωρίς συντηρητικά

Συστατικά: Ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας, αλάτι (στερεά συστατικά 7% κατ' ελάχιστον), διορθωτικό οξύτητας κιτρικό οξύ.

Μέση θρεπτική αξία ανά μερίδα 100gr

Ενέργεια	23 Kcal / 97 KJ
Πρωτεΐνες	1,6 gr
Υδατάνθρακες	3,9 gr
Σάκχαρα	3,9 gr
Λιπαρά	0,1 gr
Κορεσμένα	0 gr
Φυτικές ίνες	0,7 gr
Νάτριο	0,01 gr

8. Primo Gusto (τενεκεδάκι), ψιλοκομμένο τοματάκι κλασικό σε ελαφρά συμπυκνωμένο χυμό τομάτας.

Συστατικά: Ψιλοκομμένες αποφλοιωμένες τομάτες (70%) σε ελαφρά συμπυκνωμένο χυμό τομάτας (30%), διορθωτικό οξύτητας κιτρικό οξύ.

Θρεπτική αξία ανά μερίδα 100gr

Ενέργεια	19 Kcal / 82 KJ
Πρωτεΐνες	1,1 gr
Υδατάνθρακες	3,5 gr
Σάκχαρα	3,5 gr
Λιπαρά	0,1 gr
Κορεσμένα	0 gr
Φυτικές ίνες	0,7 gr
Νάτριο	0,01 gr

9. Ψιλοκομμένη αποφλοιωμένη τομάτα, Σέρκο Α.Ε.

Συστατικά: Ψιλοκομμένη αποφλοιωμένη τομάτα, χυμός τομάτας, Ρυθμιστής οξύτητας κιτρικό οξύ (όταν απαιτείται).

10. Τομάτα ψιλοκομμένη αποφλοιωμένη, από ελληνικές τομάτες χωρίς συντηρητικά (Carrefour).

Συστατικά: Ψιλοκομμένη αποφλοιωμένη τομάτα σε χυμό τομάτας, ρυθμιστής οξύτητας κιτρικό οξύ (όταν απαιτείται).

Θρεπτική αξία ανά μερίδα 100gr

Ενέργεια	19 Kcal
Πρωτεΐνες	1,3 gr
Υδατάνθρακες	3,2 gr
Λιπαρά	0,2 gr

3. Μέθοδοι απομόνωσης γενετικού υλικού

Ανάλογα με το είδος του δείγματος επιλέγεται ο κατάλληλος τρόπος ομογενοποίησης, όπως και λήψης δείγματος εξέτασης και αποθήκευσης ενός τμήματος κατεργασμένου δείγματος. Η απομόνωση του φυτικού DNA γίνεται με τη μέθοδο First-Magnetic Food Kit method (ειδική για εξαγωγή DNA από τρόφιμα και προϊόντα γάλακτος).

Ο χαρακτηρισμός των απομονωμένων δειγμάτων DNA, όπως και η ποσοτική προσέγγισή τους, γίνεται με ηλεκτροφόρηση με πηχτή αгарόζης. Ο έλεγχος των απομονωμένων δειγμάτων ως προς τη δυνατότητα ανίχνευσης φυτικού DNA γίνεται με τον πολλαπλασιασμό με τη βοήθεια της PCR γονιδιακών περιοχών, χαρακτηριστικών για το φυτικό γονιδίωμα.

Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος στον έλεγχο αυτό (υπάρχει φυτικό DNA επαρκούς ποσότητας και ποιότητας), ακολουθεί η ανάλυση ως προς την ανίχνευση της γενετικής τροποποίησης. Αν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό (όχι πολλαπλασιασμός), γίνεται έλεγχος για την παρουσία αναστολέων δράσης της πολυμεράσης (PCR με εμβολιασμένο δείγμα). Στην περίπτωση μη ύπαρξης αναστολέων, συμπεραίνεται πως στο συγκεκριμένο δείγμα δεν ανιχνεύεται φυτικό DNA.

3.1 Πρωτόκολλα μεθόδων

Η απομόνωση DNA με τη μέθοδο First Magnetic Food Kit είναι εύκολη και γρήγορη. Το DNA είναι υπερβολικά κατάλληλο για ανάλυση με τη μέθοδο PCR. Η μέθοδος είναι βασισμένη στη χημική λύση των κυττάρων ακολουθούμενη από βιομαγνητικό διαχωρισμό του DNA, το οποίο πλένεται, καθώς προσκολλάται στα μαγνητικά σωματίδια.

3.2 Βήματα της μεθόδου

1. Απομόνωση του DNA (μέθοδος κατάλληλη για υγρά)

- Φυγοκεντρούμε 2ml από το χυμό τομάτας (ή υγρό) για 5 λεπτά στις 10.000 στροφές.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό και αναμειγνύουμε 200mg ομογενοποιημένου δείγματος (ιζήματος) με 600ml Lysis buffer και 100μl διαλύματος ενζύμου.
- Επωάζουμε το μείγμα στους 65° C (υδατόλουτρο) για μία ώρα.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές .
- Μεταφέρουμε 400μl από το υπερκείμενο υγρό σε καθαρό φιαλίδιο.
- Προσθέτουμε 50μl από το διάλυμα μαγνητικών σωματιδίων και 200μl αλκοόλης και αναμειγνύουμε καλά.
- Αφήνουμε το διάλυμα για 2 λεπτά.

- Ετοιμάζουμε τα φιαλίδια με 800μl Washing buffet 1, 800μl Washing buffer 2 και 400μl Washing buffer 3.
- Ετοιμάζουμε και ένα φιαλίδιο με 50μl απεσταγμένο νερό.
- Συλλέγουμε το μαγνήτη, το μεταφέρουμε στο φιαλίδιο με το Washing buffer 1 και αφαιρούμε.
- Συλλέγουμε το μαγνήτη, το μεταφέρουμε στο φιαλίδιο με το Washing buffer 2 και αφαιρούμε.
- Το ίδιο κάνουμε και με το φιαλίδιο με το Washing buffer 3.
- Τέλος μεταφέρουμε το μαγνήτη στο φιαλίδιο με το απεσταγμένο νερό και επωάζουμε στους 65° C για 10 λεπτά.
- Συλλέγουμε το μαγνήτη και το διάλυμα με το απομονωμένο DNA είναι έτοιμο.

2. Προετοιμασία Gel ηλεκτροφόρησης

Ετοιμάζουμε το gel ηλεκτροφόρησης ως εξής: Τοποθετούμε σε μια κωνική φιάλη 130ml TAE 1x και ακολούθως ζυγίζουμε $(0,9 \times 130/100) = 0,9$ g Agarose και την εισάγουμε στη φιάλη. Θερμαίνουμε το διάλυμα μέχρι να βράσει, το κατεβάζουμε από το θερμαντήρα (hot place) και το αφήνουμε για λίγο να κρυώσει. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 5μl βρωμιούχο αιθίδιο, πετούμε αμέσως το tip της πιπέτας λόγω τοξικότητας, αναδεύουμε ελαφρά το μείγμα και το ρίχνουμε μέσα στις πλακέτες με τα χτενάκια (καλούπια για πηγαδάκια), τις οποίες προηγουμένως έχουμε συναρμολογήσει και τοποθετούμε το μείγμα στο ψυγείο. Αφήνουμε το υγρό να στερεοποιηθεί σε gel για τουλάχιστον 20 λεπτά στο ψυγείο.

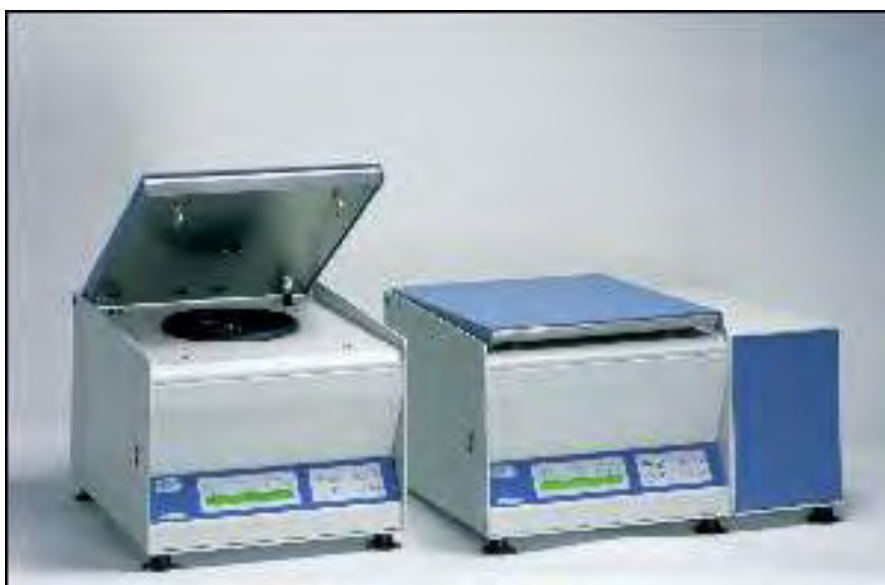
Αφού είναι έτοιμο το gel, εισάγουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και βγάζουμε προσεκτικά τα καλούπια από τα πηγαδάκια. Προσθέτουμε 1X TAE (ηλεκτρολύτης), έως ότου σκεπαστεί το gel εντελώς και ανοίξουν τα πηγαδάκια.

3. Προετοιμασία δείγματος για Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Αφού αναδεύσουμε τα δείγματα, παίρνουμε 10μl από το κάθε δείγμα και τα αναμειγνύουμε με 5μl από το loding buffer (μπλε χρώματος) σε ειδικά μικρά tubes για PCR. Φορτώνουμε τα δείγματα στα πηγαδάκια, σκεπάζουμε τη συσκευή με ειδικό κάλυμμα, τοποθετούμε τα ηλεκτρόδια, ανοίγουμε το διακόπτη και πατάμε start. Περιμένουμε μέχρι η μπλε γραμμή από κάθε δείγμα να φτάσει τουλάχιστον στη μέση της συσκευής. (Τάση 80-90 Volt). Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται σε ειδική συσκευή υπεριώδους φωτισμού.



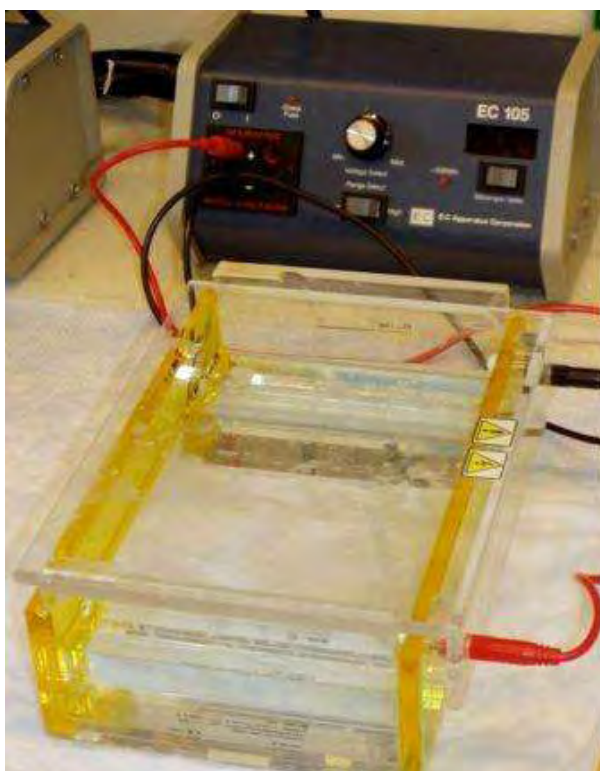
Εικόνα 8. Πιπέτες



Εικόνα 9. Φυγόκεντρος



Εικόνα 10. Υδατόλουτρο



Εικόνα 11. Συσκευή παρασκευής gel ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 12. Gel ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 13.Συσκευή PCR

Συμπεράσματα Πειραματικού μέρους

Οι προσπάθειες μας στο εργαστήριο δεν επέφεραν θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την ανίχνευση φυτικού DNA, που να φέρει γενετική τροποποίηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και μια παράλληλη πειραματική έρευνα που έγινε στο ίδιο εργαστήριο και κατά την ίδια χρονική περίοδο. Στην εργασία αυτή τα δείγματα επιλέχτηκαν από συγκεκριμένη λαϊκή της Λάρισας και από τρία supermarkets της περιοχής της Λάρισας.(Κουλούλα , 2010)

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την προσπάθειά μας είναι τα εξής:

α) Με δεδομένο ότι το προϊόν τομάτας μπορεί να δημιουργηθεί από την ανάμειξη έξι ή και περισσότερων διαφορετικών ποικιλιών, προκύπτει ως συνέπεια ότι η ποσότητα των συστατικών που είναι ύποπτα για γενετική τροποποίηση είναι πολύ χαμηλή, ώστε να απομονωθεί επαρκής ποσότητα γενετικού υλικού από αυτά.

β) Η διαδικασία απομόνωσης (kit) και οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες πιθανόν θα πρέπει να επαναπροσδιοριστούν.

γ) Πιθανόν, μετά την επεξεργασία και τη μεταποίηση των προϊόντων τομάτας το γενετικό υλικό (DNA) των κυττάρων κατά τη θερμική επεξεργασία του τοματοπολτού έχει καταστραφεί.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύγκριση ετικετών

Οι συσκευασίες τομάτας τις οποίες επιλέξαμε για την ανίχνευση τροποποιημένου γενετικού υλικού κατά την εκτέλεση του πειράματος χωρίστηκαν σε δυο βασικές κατηγορίες για την αντικειμενικότερη αξιολόγησή τους και για να είναι εφικτή η σύγκρισή τους .

Ειδικότερα, από τις συσκευασίες που επιλέχτηκαν οι επτά περιείχαν ψιλοκομμένο τοματάκι (Κύνκος ,Κονκασέ, Τοματίνα , Pummato Ελαίς ,Primo Gusto, Ψιλοκομμένη αποφλοιωμένη τομάτα (ΣΕΡΚΟ Α.Ε.) και Ψιλοκομμένη αποφλοιωμένη τομάτα (Carrefour)).Οι υπόλοιπες περιείχαν συμπυκνωμένο χυμό τομάτας (Pummato από κτήμα , Ελαφρά συμπυκνωμένος χυμός τομάτας (Προντάκτα Α.Ε.), Primo Gusto κλασικό).

Από την καταγραφή των συστατικών και τη λεπτομερή παρατήρησή τους καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα:

1. Οι ετικέτες στις συσκευασίες στο ψιλοκομμένο τοματάκι ήταν ίδιες και περιείχαν όλες τα συστατικά και τις αναλογίες της θρεπτικής αξίας ανά μερίδα των 100γρ, εκτός από μία η οποία δεν περιείχε τον πίνακα με την αναλογία των θρεπτικών συστατικών.
2. Οι ετικέτες στις συσκευασίες των συμπυκνωμένων χυμών ντομάτας είναι , παρόμοια, ίδιες τόσο ως προς τα συστατικά που περιέχουν όσο και ως προς την αναλογία σε θρεπτική αξία στα 100γρ.
3. Αντίθετα οι ετικέτες των παραπάνω προϊόντων δεν αναγράφουν τον τόπο την περιοχή και τη χώρα προέλευσης (εκτός από ένα προϊόν).
4. Τέλος, οι ετικέτες δεν αναφέρουν την ποικιλία ή τις ποικιλίες της τομάτας.

Σ' αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφέρουμε ότι κατά το έτος που έγινε η έρευνα (2008-2009), σύμφωνα με μια παράλληλη έρευνα καμιά συσκευασία από τα προϊόντα ντομάτας δεν περιείχε πίνακες με την αναλογία σε θρεπτικά συστατικά (ενέργεια , υδατάνθρακες , λίπη , πρωτεΐνες). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι υπάρχει αξιολόγηση πρόοδος όσον αφορά την έγκυρη και αποτελεσματική ενημέρωση των καταναλωτών για το τι τρώνε και για το πώς αυτό που τρώνε επηρεάζει την υγεία τους . (Κουλούλα ,2010).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ –ΣΚΕΨΕΙΣ

Κλείνοντας αυτή τη σύντομη αναφορά στο πρόβλημα των γενετικά μεταλλαγμένων, θα ήθελα να αναφέρω κάποιες περισσότερες προσωπικές σκέψεις, παρά συμπεράσματα για το απώτερο κοντινό ή μακρινό μέλλον.

Ο πληθυσμός της γης που πριν 40 χρόνια ήταν 2 δισεκατομμύρια σήμερα φτάνει τα 7 δισεκατομμύρια. Ας ελπίσουμε ότι δε θα αδρανήσουμε για άλλα 50 χρόνια, όταν ο πληθυσμός της θα είναι 10-12 δισεκατομμύρια.

Έτσι, λοιπόν, τα γενετικά μεταλλαγμένα δίνουν ουσιαστικές υποσχέσεις στην αύξηση του ποσοστού κέρδους και της σοδειάς και στη δραστική μείωση των εργατικών χεριών. Από την άλλη, στο χορό υπεισέρχονται βροντερά και οι εταιρείες με τα σχέδιά τους για την πώληση μεταλλαγμένων σπόρων και την κατοχύρωση δικαιωμάτων, αλλά και τη συνεισφορά στη μείωση της παγκόσμιας πείνας των λαών.

Όπως, όμως, κάθε επανάσταση στο χώρο της ανθρώπινης πολιτισμικής εξέλιξης, έτσι και η συγκεκριμένη είναι ένα δίκοπο μαχαίρι στα χέρια της ανθρωπότητας. Η κοινωνικοπολιτική και εκπαιδευτική συνεισφορά, η ενημέρωση και υπευθυνότητα, η αυτοεπίγνωση και αυτοσυνείδηση παίζουν δραματικό ρόλο. Τουτέστιν, ο άνθρωπος πρέπει να αντιμετωπίσει την ιστορία με περισσότερη ταπείνωση και περισσότερο σκεπτικισμό. Πρέπει να διδαχτούμε από τα αμέτρητα και συντριπτικά ναυάγια και να οδηγήσουμε σταθερότερα το πλοίο της ανθρωπότητας. Μήπως, εντέλει, τα γενετικά μεταλλαγμένα είναι η κορυφή του παγόβουνου...; Μήπως οδηγούμαστε σ' ένα νέο ναυάγιο...;

Βιβλιογραφία

A.A Ντονά, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης *Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα και επιπτώσεις στην υγεία* Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής 2009, 26(6): 727-740

Κουλούλα Ι. Βασιλική, *Καταγραφή και έλεγχος για τη γενετική τροποποίηση (GMO) σε νωπές ντομάτες και μεταποιημένα προϊόντα τους. Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών. Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή*, Λάρισα, 2010

Arlem Philip A, Regina Falconer, Sri Cherukumili, Amy Cole , Alexander M. Cole , Katen A.Oishi, Henry Daniel, "*Field Production and functional evaluation of chloroplasts derived interferon $\alpha 2b$* ", **Plant biotechnol.**, (2007) , July :511-525

Ayub, R., Guis, M., Ben Amor, M., Gillot, L., Roustan, J.P., Latche, A., Bouzayen, M. and Pech, J.C, "*Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits*", 1996, **Nat.Biotech.** 14: 862-866.

Bird, C.R., Smith, C.J.S., and Ray, J.A., "*The tomato polygalacturonase gene and ripening specific expression in transgenic plants*". **Plant Mol. Biol**, 1988, 11: 651-662.

Carol O. Tacket, "*Plant-derived vaccines against diarrheal diseases*", **Vaccine** 23 (2005) 1866-1869

Christoffersen, R.E. Tucker. M.L.. and Laties G.G., "*Cellulase gene expression in ripening avocado (Persea Americana cv Hass) fruit. The accumulation of cellulose mRNA and protein as demonstrated by cDNA hybridization and immunodetection*". **Plant. Mol. Biol**, 1984, 3: 385-392.

Civello, P.M., Powell. A.L.T. Sabchat. A. and Bennett. A.B., "*An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit*", **Plant Physiol.** 1999, 121:1273-79..

Conley A.J., Jenvikat A.M., Menassa R. , Brandle J.E., "*Temporal and spatial distribution of erythropoietin in transgenic tobacco plants*", **Transgenic Res.** 2010 Apr.

D.A.Goldstein, J.A.Thomas, "*Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants* "

Diallinas, G., Kanellis, A.K. "*A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding*." **Plant Mol. Biol.** 1994. 26:473-479

Fabienne B. Bouche, Estelle Marquet –Blouin, Yusuke Yanagi, Andre Steinmetz, Claude P.Muller, **Vaccine** 21(2003) 2065-2072

Giovannonni, J, 2001 "*Molecular biology of fruit maturation and ripening*". **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 2001, 52:725-49

Giuliano, G., Aquilani, R. and Dharmapuri, S. "*Metabolic engineering of plant carotenoids* ". **Trendw Plant Sci.** 2000, 5:406-409

Gray J. E. Picton, S. Shabbeer, J., Schuch, W. and Grierson, D., "*Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes*". **Plant Mol. Biol.** 1992

Grierson. D., Tucker, G.A., Keen, J., Ray, J., Bird, C.R. and Schuch, W., "*Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase*". **Nucleic Acid Res.** 1986, 14: 8595-8603

- Hobson, G, Grierson, D.** "Tomato", In Seymour, 1993
- Horhatidou, V., Karvounis I, Dourtoglou, V.G. and Poulos, C.N.,** " *Determinants of total volatile components of Cucumis melo*" L. Var. *Cantaloupensis*. **J. Agric. Food Chem**, 1992, 40:1385-1388
- Hug Kristina** , " *Genetically modified organisms :do the benefits outweigh the risks?*", **Medicina (Kaunas)** 2008, 44(2)
- Jonas D.A., I. Elmadfa ,K.H.Engel, K.J.Heller, G.Korianofski, A.Koning, D.Muller, J.Narbonne, W.Wackernagel, J.Kleiner,** " *Safety Consideration of DNA in Food* ", **Ann Nutr Metab** (2001), 45:235-254
- Jung C., Cai D., Kleine M.,** " *Engineering nematode resistance in crop species*", **Trends in Plant Science** , 1986, 3:266-271)
- Kisung Ko , Hilary Koprowski,** " *Plant biopharming of monoclonal antibodies*", **Virus research** 111 (2005) 93-100
- Lahanan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J, and Klee, H.J.:** " *The Never Ripe mutation blocks ethylene perception in tomato.*" **Plant Cell**, 1994, 6:521-30.
- Lall P., V.G.Ramachandran, R.Goyall, R.Sharma** , " *Edible vaccines: Current status and future*", **Indian Journal of medicine** 25 (2007) 93-102
- Mathers John C,** " *Plant foods for human health: research challenges* ", **Proceedings of the Nutrition Society** (2006), 65, 198-203
- Mitten, DH, McDonald, R, Klonus, D** *Regulations of food derived from genetically engineered crops*, **Current opinion in Biotechnology** (1999) 10:298-302
- Moser, O. and Kanellis A.K.,** " *Ascorbate oxidase of Cucumis melo L. var reticulatus: Purification, characterization and antibody production*". **J., Exp. Bot** , 1994, 275:717-724.
- Nigel G Halford, Peter R Shewry** , " *Genetically Modified Crops: methodology, benefits, regulation, and public concerns*", **British Medical Bulletin** (2000), 5662-73
- Notermans S., Mead G.C. and Jouve, J.L.** " *Food Products and consumer protection, a conceptual approach and a glossary of terms*", **International Journal of Foods Microbiology** , 1996, 30(1-2)
- Ray, J., Knapp, J.E., Grierson, D., Bird, C, and Schuch, W.,** " *Identification and Sequence determination of a cDNA clone for tomato pectin esterase*". **Eur. J. Biochem**, 1988, 174:119-124.
- Robert Sevenier , Phd , Ingrid M. Van der Meer, PhD, Raoul Bino , PhD and Andries J. Koops, PhD,** " *Increased Production of Nutriment by Genetically Engineered Crops*", **Journal of the American College of Nutrition**, Vol. 21, No 90003(2002) 199s-204s
- Rowland I.R.,** " *Genetically Modified Foods and the Media*" , **Proceedings of the Nutrition Society** , 2002
- Seymour, G.B., Taylor, J.E. and Tucker G.A., (eds), 1993. *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman and Hall, London.
- Smith, C.J., Watson, C. Ray, J., Bird C.R., Morris, P.C., Schuch, W. and Grierson. D.,** " *Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes*". **Nature**, 1988, 334:724-726
- Smith, C.J.S., Watson, C.F., Morris, P.C., Bird, C.R., Seymour, G.B., Gray, J.E., Arnold, C Tucker, G.A., Schuch, W., and Grierson, P.** " *Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes*". **Plant Mol. Biol.** 1990, 14: 369-379.

Stein Kathryn E.and Keith O Webbert," *The regulation of biologic products derived from bioengineered plants*", **Current Opinion in Biotechnology** (2001)12:308-311

Theologis, A., 1992." *One rotten apple spoils the whole, bushel: the role of ethylene in fruit ripening.*" **Cell** ,1992,70: 181-184

Warzecka, Heribert Hugh S.Mason," *Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants* ", **J. Plant Physiol.**160 (2003) 755-764

Ιωάννης Κ.Παπαπαναγιώτου, Βασιλική Κυριαζοπούλου-Δαλαίνα (Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία) ,UNIVERSITY STUDIO PRESS, Θεσσαλονίκη Ελλάδα 2004 σελ 93,259

Θ.Χ.Βαρζάκας, Ι.Σ.Αρβανιτογιάννης, *Γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα, Ανίχνευση, Παρασκευή, Νομοθεσία, Βιοασφάλεια (μελέτη αστοχίας),*ΕΜΒΡΥΟ, Αθήνα Ελλάδα 2006 σελ 52,358,361,395,443,445

Ιωάννης Επ. Γεωργούλης , *Αιματολογία , διαγνωστικές προσεγγίσεις* ,ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ,2001,σελ 169

<http://www.Agro-fst.web.auth.gr>