



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ  
ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ (GMO'S)  
ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ  
ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ ΚΑΙ ΣΟΓΙΑ**

**ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ ΠΑΝ. ΜΠΑΣΕΑΣ  
ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**

Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπασέα Διονυσίου: 22-1-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 497α/1-4-2003

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Στεφάνου –Λεβειδιώτου Σταματίνα Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Χρήστου Λεωνίδας Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27-5-2003**

*«Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών(GMOs) σε τρόφιμα και ζωτροφές που περιέχουν καλαμπόκι και σόγια»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 648<sup>α</sup>/18-11-2008**

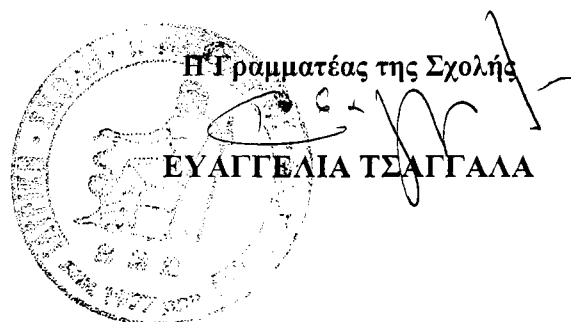
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαυρίδης Ανέστης	Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεβειδιώτου –Στεφάνου Σταματίνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαδοπούλου Χρυσάνθη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαλιάσος Νικόλαος	Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χρήστου Λεωνίδας	Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 18-12-2008

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



**Στον αείμνηστο και πολυαγαπημένο μου Πατέρα  
Πρωτοπρεσβύτερο Παναγιώτη Μπασέα,  
στην αγαπημένη μου Μητέρα  
Πρεσβυτέρα Χρυσούλα Μπασέα  
και στα αδέρφια μου Νίκο, Γιάννη και Νατάσσα,  
Άννα και Μαρία .**

Η εκπόνηση διδακτορικής διατριβής αποτελεί έργο ζωής, το όφελος του οποίου δεν περιορίζεται μόνο στον επιστημονικό ή και στον επαγγελματικό χώρο, αλλά αντανακλάται σε όλες τις δραστηριότητες της ζωής του διδάκτορος.

Έχοντας επίγνωση αυτού, καθώς και του μεγέθους της τιμής που μου γίνεται με την αγόρευσή μου ως Διδάκτορας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, αφιερώνω το παρόν πόνημα με ευγνωμοσύνη σε όλους όσους συνετέλεσαν με οποιονδήποτε τρόπο στην ανάληψη και στην ολοκλήρωσή του, και στην καταξίωσή μου για την τιμή αυτή.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η επέμβαση στο γενετικό υλικό των οργανισμών και των μικρο-οργανισμών με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA αποτελεί, το τελευταίο χρονικό διάστημα, μια βιολογική επανάσταση με πάμπολλες και αφάνταστες δυνατότητες για το μέλλον της ανθρωπότητας. Η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γενώματος, σε συνδυασμό με την πρόοδο της βιοτεχνολογίας, έχει κάνει δυνατή την επέμβαση στο γένωμα φυτών και ζώων. Αυτό πραγματοποιείται με προσθήκη ή αφαίρεση γονιδίων που καθορίζουν τις διάφορες λειτουργίες του οργανισμού.

Η καινούργια τεχνολογία βρίσκει μεγάλο πεδίο εφαρμογής στον αγροτικό τομέα με τη δημιουργία τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση, από φυτά τα οποία έχουν τροποποιηθεί γενετικά, ώστε να αποκτήσουν νέες επιθυμητές ιδιότητες. Τα προϊόντα αυτών των φυτών αποτελούν τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα.

Η παραγωγή γενετικά τροποποιημένων φυτών και τροφίμων εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Οι καλλιέργειες μπορούν να γίνουν περισσότερο ανθεκτικές σε παθογόνους μικρο-οργανισμούς και σε ακραίες καιρικές συνθήκες και συνεπώς αποδοτικότερες. Τα προϊόντα τους αποκτούν βελτιωμένες ιδιότητες και χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη διατροφική αξία.

Οι δυνατότητες αυτές υπόσχονται ότι η παραγωγή γενετικά τροποποιημένων τροφίμων θα αποτελεί στο εγγύς μέλλον τη σωτηρία των υπανάπτυκτων χωρών από την πείνα και την εξαθλίωση.

Παρ' όλα αυτά όμως υπάρχει μια ανησυχία για τους κινδύνους που κρύβει η παραγωγή και η κατανάλωση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων. Πολλοί τα έχουν χαρακτηρίσει ως «Frankenstein Food» και έχει δημιουργηθεί ένα αρνητικό

κλίμα και μεγάλη σύγχυση από τις αντικρουόμενες απόψεις. Οι καταναλωτές και οι επιστήμονες αδυνατούν να σχηματίσουν σαφή γνώμη για το θέμα μέσα από τις αλληπάλληλες ανεπίσημες και επίσημες ανακοινώσεις και σχόλια.

Η σύγχυση επιδεινώνεται και από το γεγονός ότι η Ευρώπη και το ευρωπαϊκό κοινό αντιμετωπίζουν με φόβο τα τρόφιμα αυτά και συζητούν αν το επιτρεπτό όριο μόλυνσης των τροφίμων με γενετικά τροποποιημένα συστατικά θα είναι 0,5 ως 1%. Ταυτόχρονα οι Αμερικανοί, έχοντας εμπιστοσύνη στις αρμόδιες κρατικές υπηρεσίες της χώρας τους, που επιτρέπουν την ελεύθερη παραγωγή και εμπορία των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων, καταναλώνουν τόνους από 100% γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα εδώ και μια δεκαετία τουλάχιστον.

Η εξαγωγή συμπερασμάτων για τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων είναι δύσκολη. Αυτή γίνεται ακόμη πιο δύσκολη λόγω της μικρής πείρας, των νέων δεδομένων που συνεχώς προκύπτουν και της πολυπλοκότητας που παρουσιάζει το θέμα. Η υπόθεση των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων έχει τεράστιο οικονομικοκοινωνικό και επιστημονικό ενδιαφέρον που προδικάζει σημαντική εξέλιξη στο μέλλον.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's – Genetic Modified Organisms) σε ακατέργαστα ή επεξεργασμένα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη ή και ζωϊκή κατανάλωση (ζωοτροφές), τα οποία περιέχουν καλαμπόκι και σόγια. Για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας παρακινήθηκα από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κας Χρυσάνθης Παπαδοπούλου.

Επιθυμώ να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου τόσο για την ανάθεση αυτής της εργασίας, όσο και για τις πολύτιμες υποδείξεις της, το απεριόριστο ενδιαφέρον και την ακούραστη συμπαράστασή της σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας.

Εκφράζω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στα μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου - Στεφάνου και στον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας κ. Λεωνίδα Χρήστου για το ενδιαφέρον που επέδειξαν κατά την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Επίσης, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Μαυρίδη Ανέστη, τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Ευαγγέλου Άγγελο, την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Βεζυράκη Πατρώνα και τον Επίκουρο Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Χαλιάσο Νικόλαο για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους.

Ακόμη ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους μου διδάκτορες κ.κ. Γεώργιο Φιλιούση, Αικατερίνη Σαλαμούρα, Γεώργιο Ζάκα, Ηρακλή Σακκά, Ευάγγελο Οικονόμου και Παναγιώτα Γούσια για την καλή και φιλική συνεργασία που είχαμε όλο το διάστημα εκπόνησης της διατριβής μου και για τη βοήθεια που, ανιδιοτελώς και με ζήλο, μου προσέφεραν.

Στην οικογένειά μου και ιδιαίτερος στον αείμνηστο και πολυαγαπημένο Πατέρα μου Πρωτοπρεσβύτερο Παναγιώτη Μπασέα και στην αγαπημένη μου Μητέρα Πρεσβυτέρα Χρυσούλα Μπασέα οφείλω ευγνωμοσύνη για τη συμπαράστασή τους στην προσπάθειά μου.

Τέλος, ευχαριστώ όλο το επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και όλους όσους μου παρείχαν βοήθεια με οποιοδήποτε τρόπο, που έστω και αν δεν τους μνημονεύω, τους διαβεβαιώνω ότι δεν τους λησμονώ.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο άνθρωπος είχε και έχει πάντα ως στόχο να βελτιώνει την ποιότητα και την αποδοτικότητα των φυτικών καλλιεργειών και των εκτροφών των ζώων τα οποία αποτελούν τη βάση της διατροφής του. Στη γεωργία επιλέγονται τα καλύτερα στελέχη από τα διάφορα φυτά με επιθυμητά χαρακτηριστικά και εφαρμόζονται πολλαπλές διασταυρώσεις με στόχο τη δημιουργία καλύτερων και περισσότερων φυτικών τροφών. Στην κτηνοτροφία επίσης γίνεται συνεχώς προσπάθεια για τη δημιουργία και επιλογή ζώων που έχουν τα καλύτερα και τα περισσότερο παραγωγικά χαρακτηριστικά (π.χ. περισσότερο κρέας ή γάλα).

Ως εκ τούτου, πολλά από τα τρόφιμα που καταναλώνονται σήμερα από τον άνθρωπο διαφέρουν κατά πολύ από τα αρχικά που υπήρχαν στη φύση.

Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε μια νέα μέθοδος βελτίωσης της ποιότητας και της ποσότητας των τροφίμων. Πρόκειται για τη νέα τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, η οποία εμπλούτισε τις γνώσεις για τη γενετική των οργανισμών με τη δυνατότητα πρόσβασης στα γονίδια και μελέτης της δομής, της οργάνωσης και της λειτουργίας τους, καθώς και της λειτουργίας των πρωτεϊνών που αυτά κωδικοποιούν.

Επιπρόσθετα, η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA έδωσε στον άνθρωπο τη δυνατότητα χειρισμού των γονιδίων. Με τη μέθοδο αυτή, απομονώνονται τα κατάλληλα γονίδια από διάφορους οργανισμούς, όπως βακτήρια, μύκητες, φυτά, ζώα, και εισάγονται σε φυτά ή ζώα (ή και στον άνθρωπο στα πλαίσια γονιδιακής θεραπείας) με σκοπό να προσδώσουν στους οργανισμούς αυτούς κατάλληλα και επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται πιο γρήγορη, εύκολη και κατευθυνόμενη τροποποίηση του γενώματος των φυτών ή των ζώων με σκοπό τη

δημιουργία νέων αγροτικών ή κτηνοτροφικών προϊόντων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και ιδιότητες που τα καθιστούν ανθεκτικότερα π.χ σε ζιζάνια, έντομα, ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και σε ακραίες καιρικές συνθήκες. Με τον τρόπο αυτό συντελείται μείωση της ζημίας και των εργατικών κοστών, αύξηση της παραγωγής σε μικρότερο χρονικό διάστημα και γενικότερα υψηλό οικονομικό όφελος.

Οι οργανισμοί (ζώα, φυτά, μύκητες, βακτήρια) που έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση με την εισαγωγή στο DNA τους ξένου γενετικού υλικού ονομάζονται **Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί** (Genetically Modified Organisms) και αναφέρονται διεθνώς με τα αρχικά GMO's. Επίσης, οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί αναφέρονται και ως διαγονιδιακοί (transgenic) οργανισμοί.

Οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί βρίσκουν μεγάλο πεδίο εφαρμογής στον Αγροτικό τομέα με τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών, των οποίων το γενετικό υλικό (DNA) έχει υποστεί τροποποίηση ύστερα από εισαγωγή μέσα σ' αυτό γενετικού υλικού που προέρχεται από άλλους οργανισμούς, μικρο- και μεγαλο-οργανισμούς (GMMO's ή GMO's), ώστε να αποκτήσουν επιθυμητές ιδιότητες. Τα τρόφιμα που λαμβάνονται από τα φυτά αυτά ονομάζονται γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα (GM τρόφιμα ή GMO τρόφιμα). Τα αγροτικά προϊόντα μπορεί να είναι είτε τα ίδια GMO φυτά (π.χ. γενετικά τροποποιημένες ντομάτες, καλαμπόκι, σόγια), είτε προϊόντα επεξεργασίας των GMO φυτών (π.χ. λάδι από γενετικά τροποποιημένη σόγια ή καλαμπόκι, λεκιθίνη σόγιας).

Τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά προέρχονται από γενετικά τροποποιημένα φυτά. Στον κτηνοτροφικό τομέα αναμένεται στο μέλλον να δημιουργηθούν τροφές από γενετικά τροποποιημένα ζώα. Αντίστοιχες γενετικές επεμβάσεις γίνονται ήδη και σε μικροοργανισμούς

(βακτήρια, μύκητες) για την παραγωγή προϊόντων (πρωτεΐνες, αντιβιοτικά, ορμόνες κτλ), με εφαρμογές στη φαρμακευτική και στη βιομηχανία τροφίμων.

Η ανάπτυξη στον τομέα των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων είναι τόσο ραγδαία και πραγματοποιείται με τόσο ταχείς ρυθμούς που δεν υπολείπεται χρόνος για την εκτίμηση των οικονομικο-κοινωνικών, ιατρικών, περιβαλλοντικών, νομικών και ηθικών επιπτώσεων που επακολουθούν της παραγωγής και της κατανάλωσης των τροφίμων αυτών.

A.6.1. Καθυστερημένη ωρίμανση καρπών (Τομάτα Flavr Savr)

A.6.2. Ενίσχυση φυτών σε λυσίνη και μεθειονίνη

A.6.3. Αύξηση περιεκτικότητας σιδήρου στο ρύζι

A.6.4. Γενετική τροποποίηση ελαιόδενδρων

A.6.5. Παραγωγή βιταμινών από διαγονιδιακά φυτά

#### A.7. Άλλες εφαρμογές διαγονιδιακών φυτών

### **B. Πιθανοί κίνδυνοι των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων**

B.1. Βιολογικοί κίνδυνοι

B.2. Περιβαλλοντικοί κίνδυνοι

B.3. Κίνδυνοι δημόσιας υγείας

B.3.1 Πρόκληση αλλεργιών

B.3.2 Μεταφορά μικροβιακής αντοχής με γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα

### **Γ. Οικονομική σημασία των GMO's**

Γ.1. Μειονεκτήματα από την ανάπτυξη των αγροβιοτεχνολογικών εταιρειών

Γ.2. Εξάπλωση γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών

Γ.2.1. Εξάπλωση γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ανά είδος καλλιέργειας

Γ.2.2. Εξάπλωση γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ανά χώρα

Γ.2.3. Εξάπλωση γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ανά είδος γενετικής τροποποίησης

Γ.3. Δοκιμές πεδίου (FIELD TESTS)

## **Δ. Νομοθεσία για τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα**

Δ.1. Εισαγωγή

Δ.2. Τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα στην ευρωπαϊκή κοινότητα

Δ.2.1. Κανονισμοί, επιτροπές και εγκρίσεις

Δ.2.1.1. Κανονισμοί

Δ.2.1.2. Επιτροπές και εγκρίσεις

Δ.2.1.3. Έκτακτα μέτρα

Δ.3. Συχνές ερωτήσεις

## **Ε. Γενετικά τροποποιημένα (διαγονιδιακά) φυτά**

Ε.1. Στάδια παραγωγής γενετικά τροποποιημένων φυτών

Ε.1.1. Επιλογή επιθυμητού γονιδίου

Ε.1.2. Κλωνοποίηση γονιδίου

Ε.1.3. Μεταφορά γονιδίων σε φυτικά κύτταρα

Ε.1.4. Φυσικοί και χημικοί τρόποι μεταφοράς γονιδίων

## **ΣΤ. Ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε φυτά**

ΣΤ.1. Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

ΣΤ.1.1. Στάδια της PCR

ΣΤ.1.2. Αποτελέσματα της PCR

ΣΤ.1.3. Δοκιμασίες ελέγχου της PCR

ΣΤ.1.4. Παραλλαγές τύπων PCR και εφαρμογές τους

ΣΤ.1.4.1. Nested PCR

ΣΤ.1.4.2. Multiplex PCR

ΣΤ.1.4.3. Antigen Capture PCR

ΣΤ.1.4.4. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

ΣΤ.1.4.5. Real Time PCR

ΣΤ.2. Μέθοδος Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

ΣΤ.3. Μικροσυστοιχίες DNA (DNA Microarrays)

ΣΤ.4. Ligase Chain Reaction (LCR)

ΣΤ.5. Άλλες μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών

ΣΤ.5.1. Υβριδισμός αλληλουχιών DNA ή RNA

ΣΤ.6. Απομόνωση DNA από δείγματα

ΣΤ.7. Επιλογή DNA αλληλουχιών – στόχων για PCR

ΣΤ.8. Πλεονεκτήματα ανίχνευσης DNA έναντι ανίχνευσης πρωτεϊνών

## **Z. Εφαρμογές και σημασία της διαγονιδιακής τεχνολογίας**

Z.1. Σκοπός της διαγονιδιακής τεχνολογίας

Z.1.1 Ανάγκη για αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **A. Σκοπός**

### **B. Υλικά και μέθοδοι**

B.1 Δείγματα προϊόντων που προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση και ζωοτροφές

B.2 Δειγματοληψία

B.3 Μοριακά κιτ και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's)

B.4 Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's)

### **Γ. Μεθοδολογία**

Γ.1 Ομογενοποίηση των δειγμάτων

Γ.2 Προετοιμασία των δειγμάτων – Απομόνωση και εξαγωγή του DNA

Γ.3 Ανάλυση του DNA – Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's) με τη μέθοδο RT-PCR

### **Δ. Αποτελέσματα**

### **Ε. Συζήτηση - Συμπεράσματα**

### **Περίληψη**

### **Summary**

### **Βιβλιογραφία**

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## **A. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

### **A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί (Genetically Modified Organisms, GMO's) καλούνται οι ζωντανοί οργανισμοί το γονιδίωμα των οποίων έχει τροποποιηθεί με την εισαγωγή κάποιου γονιδίου υπεύθυνου για την έκφραση μιας πρωτεΐνης, η οποία προσδίδει νέες ιδιότητες στον οργανισμό (Gotham, 2000, Mariotti, 2002).

Αγροτικά προϊόντα, όπως ντομάτες, πατάτες και βαμβάκι, έχουν τροποποιηθεί γενετικά με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας της παραγωγής και την αύξηση της σοδειάς. Με την εισαγωγή νέων γονιδίων στα αγροτικά προϊόντα επιτυγχάνεται η βελτίωση των ιδιοτήτων τους, όπως στην περίπτωση της πατάτας που παράγεται χωρίς αμυλόζη και της ντομάτας που παράγεται χωρίς πηκτινολυτικά ένζυμα. Επίσης, με την εισαγωγή κατάλληλου γονιδίου μπορεί να επιτευχθεί ανάπτυξη φυτικών στελεχών ανθεκτικών σε ζιζάνια, όπως στην περίπτωση της σόγιας (Roundup Ready Soya) και του καλαμποκιού (Bt resistant Maize), ή φυτών ικανών να αναπτύσσονται σε άγονα εδάφη (Duijn, 1999).

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά είναι φυτά των οποίων το γενετικό υλικό (DNA) έχει υποστεί τροποποίηση ύστερα από εισαγωγή μέσα σ' αυτό γενετικού υλικού που προέρχεται από άλλους οργανισμούς, μικρο- και μεγαλο-οργανισμούς (GMMO's ή GMO's). Τα τρόφιμα που λαμβάνονται από τα φυτά αυτά ονομάζονται γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα (GM τρόφιμα). Τα αγροτικά προϊόντα μπορεί να είναι είτε τα ίδια γενετικά τροποποιημένα φυτά (π.χ. γενετικά τροποποιημένες ντομάτες, καλαμπόκι, σόγια), είτε προϊόντα επεξεργασίας των

γενετικά τροποποιημένων φυτών (π.χ. λάδι από γενετικά τροποποιημένη σόγια ή καλαμπόκι, λεκιθίνη σόγιας) (Gotham, 2000).

Αυτή η τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή ορισμένων ιδιοτήτων και φυσικών χαρακτηριστικών των φυτών απ' τα οποία προέρχονται τα τρόφιμα και οι ζωοτροφές, έτσι ώστε αυτά να καθίστανται π.χ ανθεκτικά στους ψεκασμούς με ζιζανιοκτόνα και σε ακραίες καιρικές συνθήκες, γεγονός που συντελεί στη μείωση της ζημίας και των εργατικών κοστών, στην αύξηση της παραγωγής σε μικρότερο χρονικό διάστημα και γενικότερα στα υψηλότερα οικονομικά οφέλη (Gotham, 2000).

### A.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Οι εταιρείες Monsanto, Agravo Plant Genetic Systems δημοσίευσαν το 1987 τη δημιουργία φυτών που ήταν ανθεκτικά στα έντομα με την έκφραση μιας τοξίνης, που παράγεται φυσιολογικά από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*. Παράλληλα διάφορες στρατηγικές αναπτύχθηκαν για τη δημιουργία φυτών ανθεκτικών σε ιούς, που είχαν ως στόχο να παρεμποδίσουν τον κύκλο ανάπτυξης του ιού με την παρουσία ενός RNA ή μιας ιικής πρωτεΐνης. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το πρώτο προϊόν που περιείχε γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς ήταν τοματοπολτός και εμφανίστηκε στην αγορά της Αγγλίας το 1996 (Bonfini, 2002).

Το 1986, η ομάδα του Roger Beachy σε συνεργασία με τη Monsanto έδειξαν ότι διαγονιδιακά φυτά καπνού, παρήγαγαν μια πρωτεΐνη του περιβλήματος του ιού της μωσαϊκής του καπνού, προκαλώντας καθυστέρηση στην εκδήλωση συμπτωμάτων μετά τη μόλυνση από τον ιό. Από τότε, συνέχισε να μεγαλώνει η

ποικιλία των φυτών που έγιναν ανθεκτικά σε ιούς με αυτήν την τεχνική ή και με άλλες τεχνικές (Casse-Delbart, 1996).

### **A.1.2 «ΧΡΗΣΙΜΕΣ» ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ**

Πολλά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο διεξάγουν έρευνες για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με επιθυμητές ιδιότητες. Δεκάδες διατροφικά προϊόντα που περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο ή αναμένουν έγκριση προκειμένου να διατεθούν στην αγορά.

Οι βασικότερες χρήσιμες ιδιότητες στις οποίες στοχεύει η διαγονιδιακή τεχνολογία στα φυτά (Τσαυτάρης, 1998, Paragini και Romano-Spica, 2004), είναι:

α) Αυξημένη αντοχή σε ασθένειες (π.χ. ιούς, μύκητες), σε κλιματολογικές συνθήκες (π.χ. ξηρασία, κρύο, ζέστη), σε έντομα, παράσιτα, αγριόχορτα, τοξικά μέταλλα, σε χημικές ουσίες, όπως π.χ. ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα.

β) Βελτιωμένη διατροφική αξία και ποιότητα, ενίσχυση της θρεπτικής αξίας (π.χ. αύξηση περιεκτικότητας του σιδήρου στο ρύζι), βελτίωση ποιότητας των καρπών (π.χ. περισσότερο άμυλο και πρωτεΐνες, λιγότερο λίπος, περισσότερες βιταμίνες και μέταλλα), βιολογικός έλεγχος της ωρίμανσης των φρούτων και των λαχανικών, απομάκρυνση βλαβερών ουσιών από τρόφιμα (πρωτεϊνών που προκαλούν αλλεργίες), ενίσχυση σε χρήσιμες ουσίες (παραγωγή από φυτά αντικαρκινογόνων ουσιών, όπως η σουλφοραφάνη).

γ) Νέες ιδιότητες και χρήσεις, ικανότητα παραγωγής «φυτικών εμβολίων» (όπως ικανότητα έκφρασης του αντιγόνου της ηπατίτιδας Β ή μιας βακτηριακής εντεροτοξίνης), αντιβιοτικών, σπάνιων χρήσιμων πρωτεϊνών.

δ) Βελτιωμένες ιδιότητες φωτοσύνθεσης, ικανότητα παραγωγής μεγαλύτερων ποσοτήτων αυξητικών ορμονών, ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου. (Day, 1996a, 1996b, Duan και συν., 1996).

### **A.1.3. ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ**

Τα πλεονεκτήματα της παραγωγής GM φυτών είναι η βελτίωση της παραγωγής τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο με τη δημιουργία νέων φυτών με βελτιωμένες ιδιότητες, καλύτερη ποιότητα και μεγαλύτερη διατροφική αξία. (Bertoni και Marsan, 2005).

Τα οφέλη που αναμένονται από τη χρήση γενετικά τροποποιημένων φυτών (Bertoni και Marsan, 2005) είναι:

α) Ελάττωση της χρήσης χημικών εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων, τα οποία έχουν βλαβερές συνέπειες στο οικοσύστημα, αλλά και στην υγεία των ανθρώπων.

β) Αύξηση της αποδοτικότητας και της ανθεκτικότητας των καλλιεργειών σε ακραίες συνθήκες, γεγονός που θα βοηθήσει στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας τροφίμων σε χώρες του τρίτου κόσμου.

γ) Αύξηση της θρεπτικής αξίας ορισμένων τροφίμων, που αποτελούν τη βασικότερη τροφή σε ορισμένες χώρες (αύξηση της περιεκτικότητας σε σίδηρο στους σπόρους ρυζιού).

δ) Λιγότερη επιβάρυνση στο περιβάλλον με τη μείωση της χρήσης χημικών τοξικών ουσιών.

#### A.1.4. ΑΜΦΙΣΒΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΤΩΝ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

Οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί δεν έχουν κερδίσει την αποδοχή όλων των καταναλωτών, λόγω επιφυλάξεων που υπάρχουν σχετικά με θέματα που αφορούν στο περιβάλλον και στη δημόσια υγεία (Paragini και Romano-Spica, 2004). Συγκεκριμένα, υπάρχουν επιφυλάξεις για τη δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων σε άλλους οργανισμούς, κυρίως μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά σε παθογόνους οργανισμούς, που θα έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση αυτών των οργανισμών ακόμα και παρουσία αντιβιοτικών. Επιπλέον, επιφυλάξεις υπάρχουν για την καταστροφή της γεωργικής ποικιλίας, την πρόκληση αλλεργιών, καθώς και γαστρεντερολογικών προβλημάτων που μπορεί να προκληθούν από τις πρωτεΐνες που εκφράζονται από τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Τα πρώτα προϊόντα της διαγονιδιακής τεχνολογίας των φυτών, όπως η «μεταλλαγμένη» σόγια, η ντομάτα και το καλαμπόκι, δέχθηκαν από την πρώτη στιγμή αμφισβήτηση και κύμα αντιδράσεων, κυρίως όταν πρωτοδιατέθηκαν στην ευρωπαϊκή αγορά. Στις ΗΠΑ, τα γενετικά τροποποιημένα προϊόντα εγκρίθηκαν από το Food and Drug Administration (FDA) ως ισοδύναμα των συμβατικών, με αποτέλεσμα να γίνουν αποδεκτά (Ahmed, 2002).

Αντίθετα, στην Ευρώπη υπάρχουν αντιρρήσεις για τη δημιουργία διαγονιδιακών τροφίμων, σχετικά με το αν τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα είναι ασφαλή και τι είδους κίνδυνοι μπορούν να προκύψουν μακροπρόθεσμα από τη γενετική επέμβαση στα φυτά (Tanglely, 2000,).

Το προϊόν που έχει δεχτεί τις περισσότερες επιθέσεις είναι η γενετικά τροποποιημένη σόγια της εταιρείας Monsanto. Η λεγόμενη διαγονιδιακή «Roundup

Ready σόγια» έχει δημιουργηθεί από την εταιρεία για να είναι ανθεκτική στο ζιζανιοκτόνο Roundup, ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα διεθνώς, που παρασκευάζει η ίδια εταιρεία.

## **A.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**

Ένας σημαντικός τομέας της αγροτικής βιοτεχνολογίας ερευνά τρόπους αντικατάστασης των χημικών στις αγροτικές καλλιέργειες, τόσο για οικονομικούς λόγους, όσο και για λόγους πίεσης από περιβαλλοντικές οργανώσεις διεθνώς για τον περιορισμό της χρήσης τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η σύγχρονη βιοτεχνολογία μπορεί να μειώσει τη χρήση χημικών, με τη δημιουργία φυτών πιο ανθεκτικών σε παθογόνους οργανισμούς, πιο ανταγωνιστικών σε σχέση με τα ζιζάνια των καλλιεργειών και πιο ικανών να προσλαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά από το έδαφος (Gotham, 2000).

Η εισαγωγή γονιδίων σε φυτά στα οποία προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διάφορους παθογόνους οργανισμούς ήταν από τις πρώτες σημαντικότερες εφαρμογές. Οι οργανισμοί αυτοί συνήθως αποτελούν τους φυσικούς εχθρούς των καλλιεργειών και είναι υπεύθυνοι για την καταστροφή μεγάλων τμημάτων τους, προκαλώντας και αντίστοιχες οικονομικές απώλειες.

Η πιο σημαντική εφαρμογή σε αυτόν τον τομέα είναι η παραγωγή των «εντομοανθεκτικών» φυτών που παράγουν τη δική τους φυσική εντομοκτόνο τοξίνη. Τα φυτά αυτά ονομάζονται Bt φυτά από το όνομα του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis* από το οποίο παράγεται η τοξίνη (Amarger, 2002).

## **A.2.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ στη ΔΡΑΣΗ ΕΝΤΟΜΩΝ (Bt-φυτά)**

Η θεραπεία των καλλιεργειών με χημικά εντομοκτόνα εξουδετερώνει πολλά είδη εντόμων και επιβαρύνει το περιβάλλον, διαταράσσοντας την οικολογική ισορροπία. Η διαγονιδιακή τεχνολογία στοχεύει στη δημιουργία φυτών που παράγουν τα δικά τους «βιο-εντομοκτόνα» (Paragini και Romano-Spica, 2004).

Το πιο καλά μελετημένο γονίδιο με φυσική εντομοκτόνο δράση έχει απομονωθεί από το βακτήριο εδάφους *B. thuringiensis*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια δ-ενδοτοξίνη, η οποία είναι τοξική σε περιβάλλον με pH 7,5-8, που παρατηρείται στα έντομα (Amarger, 2002, Danson και συν., 2006).

### **A.2.1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ Bt ΣΕ ΦΥΤΑ**

Με τη διαγονιδιακή τεχνολογία επιτυγχάνεται η μεταφορά σε φυτά του γονιδίου της δ-ενδοτοξίνης, που προστατεύει τα φυτά από την καταστρεπτική δράση ορισμένων εντόμων της τάξης των λεπιδόπτερων. Υπάρχουν διάφορα στελέχη του *B. thuringiensis* και κάθε στέλεχος παράγει μια διαφορετική ενδοτοξίνη που δρα σε ένα συγκεκριμένο είδος εντόμων (Estruch και συν., 1996, Danson και συν., 2006). Τα γονίδια αυτά (που ονομάζονται γενικά Bt), όταν μεταφέρονται στο γονιδίωμα φυτών, εκφράζουν τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη προσφέροντας προστασία από τη δράση των εντόμων (Belzile, 2002).

### **A.2.1.2. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ Bt**

Ένας από τους στόχους των Bt φυτών είναι η καταπολέμηση του *Ostrinia nubilalis*, που αποτελεί το βασικότερο εχθρό των καλλιεργειών καλαμποκιού στις ΗΠΑ και υπεύθυνο για απώλειες της τάξεως του ενός δισεκατομμυρίου δολαρίων

ετησίως (Huang και συν., 1999). Γενετικά τροποποιημένα φυτά καλαμποκιού, που φέρουν το γονίδιο Bt παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο έντομο (Belzile, 2002).

Σύμφωνα με τη Monsanto, πλεονέκτημα της παραγωγής των Bt φυτών που είναι «εντομο-ανθεκτικά» είναι ότι δεν θα είναι πλέον αναγκαία η χρήση περίπου ενός εκατομμυρίου λίτρων χημικών εντομοκτόνων το χρόνο (Wadman, 1997b).

### **A.2.1.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ Bt ΦΥΤΩΝ ΣΤΙΣ ΗΠΑ**

Το πρώτο διαγονιδιακό φυτό που φέρει το γονίδιο Bt, δημιουργήθηκε από την εταιρεία Monsanto και είναι η ποικιλία βαμβακιού Bt, η οποία περιέχει γονίδια από το βακτήριο *B. thuringiensis* υπεύθυνα για την παραγωγή μιας τοξίνης που εξουδετερώνει τρία είδη εντόμων που προσβάλλουν το βαμβάκι. Η ποικιλία βαμβακιού Bt διατέθηκε στο εμπόριο το 1996 και αποτέλεσε το 1997 το 15% της συνολικής καλλιέργειας βαμβακιού στις ΗΠΑ, ενώ το 1999 πάνω από το 50% (Μπατρινού, 2001, Ahmed, 2002).

Στη συνέχεια αναπτύχθηκε η ποικιλία καλαμποκιού Bt από την εταιρεία Ciba-Geigy που αποτέλεσε το 1997 το 9% της συνολικής καλλιέργειας καλαμποκιού στις ΗΠΑ. Κάθε χρόνο σημειώνεται σημαντική αύξηση των καλλιεργειών που αποτελούνται από Bt καλαμπόκι (Kaiser, 1996, Wadman, 1997b).

### **A.2.1.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ Bt ΦΥΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ**

Στα τέλη του 1996, επιτράπηκε η «μετ' εμποδίων» εισαγωγή του καλαμποκιού-Bt, στην Ευρώπη, το οποίο είναι ανθεκτικό στο έντομο *Ostrinia nubilalis*, (υπεύθυνο για την καταστροφή του 5-10% της ετήσιας σοδειάς).



Οι καλλιέργειες του γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού αποτελούν ακόμη θέμα έντονης διαμάχης ανάμεσα στις εταιρείες, στους αρμόδιους κρατικούς φορείς, στις ενώσεις των περιβαλλοντολόγων και στους επιστήμονες. Σε πολλές περιπτώσεις, έχουν προκληθεί από οικολογικές οργανώσεις σημαντικές καταστροφές καλλιεργειών που βρίσκονταν σε πειραματικό στάδιο (Masood, 1998c).

### **A.2.2. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΝΗΜΑΤΩΔΗ ΠΑΡΑΣΙΤΑ**

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

Έχουν βρεθεί όμως ορισμένα φυτά που είναι ανθεκτικά στα νηματώδη και έχουν απομονωθεί τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα αυτή (Danson και συν., 2006), όπως το γονίδιο *Gro1* της πατάτας, που προσδίδει ανθεκτικότητα στο *Globodera rostochiensis* (Jung και συν., 1998).

## **A.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ**

### **A.3.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΟ Roundup (σόγια)**

Η γενετικά τροποποιημένη σόγια δημιουργήθηκε για πρώτη φορά από την εταιρεία Monsanto και κυκλοφόρησε στην αγορά το 1996 (Andersen και συν., 2006). Στις ΗΠΑ, το 1997 το 12% των καλλιεργειών σόγιας ήταν GM σόγια (Wadman, 1997a), το 1998 το ένα τρίτο περίπου της συνολικής καλλιέργειας σόγιας ήταν γενετικά τροποποιημένη και το 1999 πάνω από το μισό (Mitten και

συν., 1999, Ahmed, 2002). Η σόγια είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμα επεξεργασμένα τρόφιμα (όπως η λεκιθίνη σόγιας που χρησιμοποιείται στη σοκολατοποιία και στη ζαχαροπλαστική).

Στα γενετικά τροποποιημένα φασόλια σόγιας έχει εισαχθεί το βακτηριακό γονίδιο CP4-EPSPS, το οποίο παράγει ένα ένζυμο ανθεκτικό στη δράση του ζιζανιοκτόνου. Το Roundup καταστέλλει τη δράση του φυσικού φυτικού ενζύμου EPSPS και καταστρέφει τα φυτά. Τα γενετικά τροποποιημένα όμως φυτά, που παράγουν το «ανθεκτικό» ένζυμο δεν επηρεάζονται από τη δράση του Roundup (Μπατρινού, 2001, Moriuchi και συν., 2007).

Σήμερα, στις Η.Π.Α και παγκοσμίως το 71% των καλλιεργούμενων γενετικά τροποποιημένων φυτών, όπως η σόγια, το καλαμπόκι και το βαμβάκι, είναι ανθεκτικά στα ζιζανιοκτόνα και παράγονται και προωθούνται από μεγάλες εταιρίες χημικών (Aslaksen, 2007).

Οι ΗΠΑ εξάγουν στην Ευρώπη ετησίως προϊόντα σόγιας αξίας τριών δισεκατομμυρίων δολαρίων και η υπερβολική καθυστέρηση της έγκρισης της γενετικά τροποποιημένης σόγιας από την Ευρωπαϊκή Ένωση τις οδήγησε σε σημαντικές οικονομικές απώλειες (Chesley, 1998).

#### **Α.4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ**

Η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών χρησιμεύει και στην παραγωγή πρωτεϊνών υψηλής αξίας, που είναι δύσκολο να παραχθούν και να εξαχθούν με άλλους τρόπους, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες που προορίζονται για θεραπευτικούς σκοπούς (Gotham, 2000).

Η έρευνα για την παραγωγή χρήσιμων φαρμακευτικών πολυπεπτιδίων από διαγονιδιακά φυτά προχωράει με όλο και αυξανόμενους ρυθμούς. Το ενδιαφέρον της έρευνας εστιάζεται στην παραγωγή ανθρώπινων αυξητικών παραγόντων, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, στην παραγωγή ορμονών, όπως η ιντερφερόνη, η ερυθροποιητίνη και άλλων. Πρόσφατα, επιτεύχθηκε η παραγωγή βιολογικά ενεργούς ανθρώπινης σωματοτροπίνης από χλωροπλάστες φυτών καπνού (Staub και συν., 2000).

Καλλιέργειες ντομάτας, πατάτας και μπανάνας μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά έτσι ώστε να αποτελέσουν φορείς εμβολίων. Παραγωγή φυτών με φαρμακευτικές ιδιότητες έχει επίσης επιτευχθεί με γενετική τροποποίηση σε μπρόκολο και τσάι, τα οποία εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά και φλαβονοειδή, αντίστοιχα. Από τα πρώτα εμπορικά προϊόντα τα οποία διατέθηκαν από γενετικά τροποποιημένα φυτά είναι η β-γλυκουρονιδάση της *E. coli* και η αβιδίνη των αυγών της κότας (Σκαράκης, 2007).

## **A.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ**

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

α) είναι διαγονιδιακά, παράγοντας μια πρωτεΐνη που δρα ως αντιγόνο, όμοιο με το αντιγόνο κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού, είτε

β) είναι προσβεβλημένα με ένα γενετικά τροποποιημένο ιό, έτσι ώστε το περίβλημά τους να είναι το αντιγόνο ενός παθογόνου παράγοντα για ζώα ή ανθρώπους.

Τέτοιου είδους εμβόλια έχουν το πλεονέκτημα ότι παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και είναι πιο οικονομικά σε σύγκριση με εκείνα που παρασκευάζονται σε καλλιέργειες ζωικών κυττάρων ή σε ζύμες (Σκαράκης, 2007).

Σε πειραματικό επίπεδο φάνηκε ότι ποντικοί που είχαν τραφεί με διαγονιδιακές πατάτες, που παρήγαγαν το αντιγόνο της β υπομονάδας της τοξίνης της χολέρας, όταν εκτέθηκαν στην τοξίνη της χολέρας, παρουσίασαν 60% μείωση στο ποσό διαρροϊκού υγρού που συσσωρεύτηκε στο λεπτό έντερο (Arakawa και συν., 1998a).

## **A.6. ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ**

Με τη γενετική μηχανική είναι δυνατόν να γίνει παρέμβαση στη σύνθεση των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης στο σπόρο του φυτού για να βελτιωθεί η διατροφική του αξία. Επίσης, η γεύση ενός φυτικού προϊόντος μπορεί να βελτιωθεί με την εισαγωγή και έκφραση ορισμένων γονιδίων, όπως της μονελλίνης που δίνει πιο γλυκιά γεύση (Gotham, 2000).

Έχουν εφαρμοστεί διάφορες στρατηγικές για τη βελτίωση της διατήρησης των φρούτων, όπως καταστολή του ενζύμου πολυγαλακτουρονάση, των δύο τελευταίων ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού του αιθυλενίου ή της υπερέκφρασης ενός γονιδίου που συνθέτει κυτταροκίνη (Μπατρινού, 2001, Σκαράκης, 2007).

### **A.6.1. ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΜΕΝΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΚΑΡΠΩΝ (Τομάτα Flavr Savr)**

Χαρακτηριστική είναι η παραγωγή της βιοτεχνολογικής ντομάτας με την επωνυμία “Flavr Savr”, η οποία διατέθηκε στην αγορά το 1994 από την εταιρεία Calgene (Καλιφόρνια, ΗΠΑ) (Baeumler και συν., 2006, Yang και συν., 2006).

Χρειάστηκε παραπάνω από μια δεκαετία έρευνας για την ανάπτυξη της ντομάτας αυτής, η οποία ήταν από τα πρώτα διαθέσιμα για κατανάλωση τρόφιμα που έχουν παραχθεί με τη γενετική τεχνολογία. Οι ντομάτες “Flavr Savr” ωριμάζουν πιο αργά και πιο ομοιόμορφα, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής τους από τη συγκομιδή έως τη διάθεσή τους στην αγορά (Baeumler και συν., 2006).

Οι αγρότες μπορούν να αφήσουν τις ντομάτες αυτές στα φυτά για ορισμένες μέρες παραπάνω από τις κανονικές ντομάτες των super markets, οι οποίες συλλέγονται όταν είναι ακόμη άγουρες και αργότερα εκτίθενται σε αέριο αιθυλένιο για να κοκκινίσουν. Οι επιπλέον ημέρες επιτρέπουν στα σάκχαρα του φυτού να μεταφερθούν στον καρπό, κάνοντας τις ντομάτες πιο νόστιμες. Επιπλέον, οι ντομάτες “Flavr Savr” δεν μαλακώνουν εύκολα και διατηρούνται ακέραιες κατά τη μεταφορά τους στα σημεία πώλησης (Luthy, 1999). Αυτό επιτυγχάνεται με την καταστολή της δράσης του υδρολυτικού ενζύμου πολυγαλακτονουράση σε φυτά ντομάτας, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων που εμφανίζουν καθυστέρηση στην ωρίμανση και στην αποσύνθεση, και παράγουν χυμούς με υψηλό ιξώδες και αυξημένη περιεκτικότητα σε στερεά (Σκαράκης, 2007).

Για τη δημιουργία των ντοματών “Flavr Savr” εισάγεται μέσω ενός φορέα στο γονιδίωμα των φυτών, ένα γονίδιο που αναστέλλει τη δράση του ενζύμου πολυγαλακτουρονάση, υπεύθυνου για την ωρίμανση της ντομάτας (το γονίδιο που εισάγεται είναι η αντι-νοηματική αλληλουχία του γονιδίου της πολυγαλακτουρονάσης) και ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό που χρησιμεύει ως δείκτης αναγνώρισης (Luthy, 1999).

## **A.6.2. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΛΥΣΙΝΗ ΚΑΙ ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ**

Ένας από τους στόχους της βιοτεχνολογίας είναι να δημιουργήσει καλλιέργειες φυτών που θα παράγουν καρπούς με ανώτερη διατροφική αξία για τους ανθρώπους και τα παραγωγικά ζώα. Από τις βασικότερες καλλιέργειες είναι τα δημητριακά και τα όσπρια, τα οποία αποτελούν σημαντικές πηγές πρωτεΐνης για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η ιδανική πηγή πρωτεΐνης πρέπει να περιέχει ένα ισορροπημένο ισοζύγιο και από τα 20 αμινοξέα που χρειάζονται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και ιδιαίτερα από τα 10 αμινοξέα που δεν μπορούν να συντεθούν από τον άνθρωπο και τα ζώα (απαραίτητα αμινοξέα). Τα δημητριακά περιέχουν 10-15% πρωτεΐνη, αλλά είναι φτωχά στο αμινοξύ λυσίνη, ενώ τα όσπρια περιέχουν 20-30% πρωτεΐνη, αλλά έχουν χαμηλή περιεκτικότητα στο αμινοξύ μεθειονίνη. Προς το παρόν, η έλλειψη των δύο αυτών αμινοξέων στις ζωοτροφές μπορεί να αντισταθμιστεί με την προσθήκη πλούσιων σε μεθειονίνη ιχθυοτροφών και πλούσιων σε λυσίνη σόγιας.

Όμως, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον και για τη βελτίωση της διατροφικής αξίας των ίδιων των σπόρων, ενισχύοντας την περιεκτικότητά τους σε λυσίνη και μεθειονίνη με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής (Tabe και Higgins, 1998, Herbers και Sonnewald, 1999).

## **A.6.3. ΑΥΞΗΣΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΟ ΡΥΖΙ**

Η έλλειψη σιδήρου είναι ένα από τα σημαντικά προβλήματα διατροφής που επηρεάζει περίπου το 30% του παγκόσμιου πληθυσμού. Η πρόσληψη σιδήρου με δισκία είναι μεν αποτελεσματική, αλλά είναι δύσκολο να εφαρμοστεί στις

αναπτυσσόμενες χώρες, λόγω του αυξημένου κόστους. Η περιεκτικότητα του σιδήρου σε ορισμένες καλλιέργειες μπορεί να αυξηθεί με τις κατάλληλες επεμβάσεις στο έδαφος (εμπλουτισμό με σίδηρο), διαδικασία όμως που είναι επίσης οικονομικά ασύμφορη (Pararini και Romano-Spica, 2004).

Μια από τις εφαρμογές της γενετικής μηχανικής εστιάζεται στην παραγωγή διαγονιδιακών φυτών, και κυρίως ρυζιού, με ενισχυμένη περιεκτικότητα σε σίδηρο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την εισαγωγή στο φυτό του ρυζιού (*Oryza sativa*) του γονιδίου της φερριτίνης (από ένα άλλο φυτό, όπως η σόγια) με τη βοήθεια του βακτηρίου *Agrobacterium* (που χρησιμεύει ως «όχημα» μεταφοράς γονιδίων στα φυτά). Η φερριτίνη είναι μια πρωτεΐνη που συναντάται σε ζώα, φυτά και βακτήρια και χρησιμεύει στην αποθήκευση του σιδήρου. Η στοματική χορήγηση φερριτίνης μπορεί να αποτελέσει πηγή σιδήρου για την αντιμετώπιση αναιμίας (Beard και συν., 1996, Pararini και Romano-Spica, 2004).

Το γονίδιο της φερριτίνης, που προέρχεται από φυτά σόγιας, μπορεί να εισαχθεί με επιτυχία σε φυτά ρυζιού και να εκφραστεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ενδοσπέρμιο των διαγονιδιακών φυτών (Goto και συν., 1999).

#### **A.6.4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΛΑΙΟΔΕΝΔΡΩΝ**

Υπάρχουν δύο βασικοί στόχοι στη γενετική τροποποίηση των ελαιόδενδρων (Diehl, 1998, Murphy 1999):

α) Να βελτιωθεί η αναλογία πολυακόρεστων προς κορεσμένων λιπαρών οξέων, ώστε να επικρατήσουν τα πιο «υγιεινά» πολυακόρεστα και να αποφευχθεί η ανάγκη για χημική υδρογόνωση των ελαίων, που οδηγεί στη δημιουργία των ανεπιθύμητων trans-λιπαρών οξέων.

β) Να δημιουργηθούν έλαια με υψηλή περιεκτικότητα σε «ευεργετικές» ενώσεις, όπως τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, το δωδεκαεξανοϊκό οξύ (DHA) και το εικοσιδυοπεντανοϊκό οξύ (EPA), που είναι πρόδρομα μόρια για την παραγωγή ορισμένων προσταγλανδινών και παραγόντων που μειώνουν τη χοληστερίνη (Μπατρινού, 2001).

#### **A.6.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΦΥΤΑ**

Μια ακόμη χρήσιμη εφαρμογή της διαγονιδιακής τεχνολογίας στη βελτίωση της αναλογίας των θρεπτικών στοιχείων στα φυτά είναι η παραγωγή βιταμινών, όπως τα καροτενοειδή (δρουν ως πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης Α και ως αντιοξειδωτικά) και οι τοκοφερόλες (π.χ. η βιταμίνη Ε, απαραίτητο στοιχείο στη διατροφή του ανθρώπου, που παράγεται μόνο από φυτά) (Hirschberg, 1999).

Υπάρχουν πληθυσμοί, κυρίως στον αναπτυσσόμενο κόσμο, που υποφέρουν από έλλειψη βιταμινών και ιχνοστοιχείων στη διατροφή τους. Εκτιμάται ότι περίπου 124 εκατομμύρια παιδιά στον κόσμο πάσχουν από έλλειψη βιταμίνης Α και ότι μια βελτιωμένη διατροφή σε βιταμίνη Α μόνο θα μπορούσε να αποτρέψει ετησίως 1,3 έως 2,5 εκατομμύρια θανάτους παιδιών (Sommer, 1997).

#### **A.7. ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ**

Σήμερα βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο πολλές ακόμη εφαρμογές για την δημιουργία διαγονιδιακών φυτών, καθώς η νέα αυτή τεχνολογία προσφέρει τη δυνατότητα εισαγωγής ξένων γονιδίων σε φυτά δημιουργώντας νέα βελτιωμένα χαρακτηριστικά, όπως :



α) Αύξηση ανθεκτικότητας των φυτών σε ακραίες κλιματολογικές συνθήκες (ξηρασία, καύσωνας, παγωνιά, κτλ) (Holmberg και Bulow, 1998).

β) Παραγωγή σε μεγάλες ποσότητες προϊόντων μεγάλης βιομηχανικής αξίας, όπως ελαστομερή και βιοαποικοδομήσιμες πλαστικές ύλες (Murphy 1999).

γ) Παραγωγή από τα φυτά ενζύμων, που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων (π.χ. υδρολάσες που βοηθούν στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, α-αμυλάση για τη ρευστοποίηση του αμύλου, φυτάση για τη βελτίωση της διατροφικής αξίας των ζωοτροφών) (Herbers και Sonnwald, 1999).

δ) Παραγωγή λουλουδιών με νέα χρώματα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (Μοί και συν., 1999).

## **B. ΠΙΘΑΝΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

### **B.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ**

Οι κίνδυνοι της κατηγορίας αυτής αφορούν κυρίως στο στάδιο της δημιουργίας διαγονιδιακών οργανισμών (Kappeli και Auberson, 1998, Butler και συν., 1999, Conner και συν., 1999, Παπαδοπούλου, 2006). Κάποιοι από τους βιολογικούς κινδύνους είναι:

α) Η **κατάργηση φυσικών γενετικών φραγμών**. Κατά τη μεταφορά γονιδίων με τη γενετική μηχανική από έναν οργανισμό σε έναν άλλο καταργούνται οι φυσικοί γενετικοί φραγμοί που υπάρχουν εδώ και αιώνες μεταξύ των ειδών και επιτελούνται αλλαγές στα γονιδιώματα των οργανισμών, που πιθανόν να έχουν απρόβλεπτες αρνητικές επιπτώσεις.

**β) Η ενσωμάτωση «ξένου» γενετικού υλικού σε τυχαίες θέσεις στο γονιδίωμα ενός φυτού ή ζώου.** Η διαδικασία αυτή μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή ή αλλαγή του γενετικού προγράμματος του οργανισμού, με αποτέλεσμα να προκληθούν αλλαγές στη μορφολογία ή στα χαρακτηριστικά του. Το «ξένο» DNA, όταν ενσωματωθεί σε μια περιοχή του γονιδιώματος, μπορεί να επηρεάσει τη ρύθμιση της έκφρασης γειτονικών γονιδίων με πιθανές αρνητικές συνέπειες, όπως ενεργοποίηση ενός ανενεργού γονιδίου και παραγωγή κάποιας τοξίνης ή αλλαγή στη σύσταση των θρεπτικών συστατικών ενός φυτού (Bertoni και Marsan, 2005).

**γ) Η εισαγωγή ρυθμιστικών αλληλουχιών.** Σχεδόν σε όλα τα γενετικά τροποποιημένα φυτά που βρίσκονται στο εμπόριο ή σε πειραματικές καλλιέργειες επισημαίνεται ο κίνδυνος από την εισαγωγή στη ρυθμιστική αλληλουχία του DNA του υποκινητή CAMV 35S. Ο υποκινητής εισάγεται μαζί με το ξένο γονίδιο στα γενετικά τροποποιημένα φυτά προκειμένου να ρυθμίσει την έκφραση του ξένου γονιδίου. Είναι ένας ισχυρός υποκινητής που προέρχεται από τον ιό της μωσαϊκής του κουνουπιδιού (*Cauliflower mosaic virus*, CAMV). Θεωρείται ότι μπορεί να ενεργοποιήσει και άλλα γονίδια μέσα στα φυτά με πιθανές απρόβλεπτες συνέπειες στη γονιδιακή έκφραση, όπως ενεργοποίηση «κοιμισμένων» γονιδίων ιών που βρίσκονται στο γονιδίωμα των φυτών και δημιουργία μολυσματικών ιών (Ho και συν., 1998 και 1999).

**δ) Η χρήση φορέων για τη μεταφορά γονιδίων.** Υπάρχουν επιφυλάξεις σχετικά με την ασφάλεια της χρήσης των φορέων που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά των γονιδίων στους οργανισμούς-ξενιστές και κυρίως για τους φορείς που προέρχονται από ιούς, οι οποίοι πιθανόν να αποκτήσουν ξανά τη λοιμογόνο δράση τους.

## B.2. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ

Οι κίνδυνοι που προβληματίζουν περισσότερο σήμερα την επιστημονική κοινότητα από την καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων φυτών είναι οι περιβαλλοντικοί, γιατί υπάρχουν ενδείξεις ότι τα γενετικά τροποποιημένα φυτά αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους και κανείς δεν μπορεί να εγγυηθεί ότι θα παραμείνουν «γονιδιακά» σταθερά με το πέρασμα του χρόνου (Klinger, 1998). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει περίπτωση τα γονίδια που έχουν εισαχθεί στα γενετικά τροποποιημένα φυτά να μεταφερθούν με κάποιους τρόπους είτε σε άλλα φυτά (μέσω της γύρης), είτε ακόμη και, σε ακραίες συνθήκες, σε άλλους οργανισμούς του οικοσυστήματος (π.χ. βακτήρια) (Klinger, 1998).

Το γεγονός αυτό δεν σημαίνει ότι τα γενετικά τροποποιημένα φυτά είναι επικίνδυνα για τα οικοσυστήματα στα οποία εισάγονται, αλλά υποδηλώνει ότι υπάρχει κάποιος βαθμός επικινδυνότητας για απρόβλεπτες μακροχρόνιες επιπτώσεις στο περιβάλλον.

Ήδη το 1999 στις ΗΠΑ, το γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (εντομο-ανθεκτικό) καταλαμβάνει περίπου το 30% της καλλιέργειας καλαμποκιού, ενώ η γενετικά τροποποιημένη σόγια (ανθεκτική σε ζιζανιοκτόνο) και το γενετικά τροποποιημένο βαμβάκι (εντομο-ανθεκτικό) καταλαμβάνουν πάνω από το 50% των συνολικών καλλιεργειών σόγιας και βαμβακιού αντίστοιχα (Mitten και συν., 1999, European Commission, 2000a). Επίσης, αυξάνονται και οι εκτάσεις καλλιέργειας γενετικά τροποποιημένων φυτών στη Νότια Αμερική, Καναδά, Κίνα, Νότια Αφρική και Αυστραλία.

Οι περισσότερο πιθανοί περιβαλλοντικοί κίνδυνοι είναι:

**α) Μεταφορά γονιδίων στο περιβάλλον.** Η μεταφορά των γονιδίων των γενετικά τροποποιημένων φυτών σε συγγενή φυτά ή σε ζιζάνια μέσω της γύρης μπορεί να δημιουργήσει «υπερανθεκτικά» παράσιτα (Mikkelsen και συν., 1996). Στην Ελλάδα, ο κίνδυνος της διασποράς διαγονιδίων από τα γενετικά τροποποιημένα φυτά στο φυσικό φυτικό πληθυσμό περιορίζεται μόνο σε είδη που είναι γηγενή, δηλαδή προϋπήρχαν στην Ελλάδα και για τα οποία υπάρχουν και συγγενή φυτά. Τέτοιο φυτό είναι η ελαιοκράμβη, η οποία μπορεί να διασταυρωθεί με το φυσικό φυτικό πληθυσμό. Για το λόγο αυτό απορρίφθηκε ομόφωνα από την Ελληνική Εθνική Επιτροπή η αίτηση καλλιέργειας γενετικά τροποποιημένης ελαιοκράμβης που φέρει ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνο, προφανώς για να αποφευχθεί ο κίνδυνος δημιουργίας ανθεκτικών συγγενών φυτών στην Ελλάδα. Υπάρχουν όμως άλλα είδη, όπως το καλαμπόκι, η ντομάτα και η σόγια, που είναι μη γηγενή φυτά, αναγκάζοντας τους καλλιεργητές να αγοράζουν κάθε χρόνο νέο σπόρο για να φυτέψουν. Θεωρητικά, σε αυτήν την περίπτωση δεν υπάρχει κίνδυνος μεταφοράς γονιδίων από το γενετικά τροποποιημένο φυτό σε συγγενή φυτά (Daniell και συν., 1998, Τσαυτάρης 1998, Τύπας 1999).

**β) Δημιουργία Bt ανθεκτικών εντόμων.** Η συνεχής έκθεση στην τοξίνη Bt, που παράγουν ορισμένα γενετικά τροποποιημένα φυτά, μπορεί να οδηγήσει, μέσω της φυσικής επιλογής, στην επικράτηση στελεχών εντόμων ανθεκτικών στην τοξίνη αυτή. Η αλόγιστη χρήση Bt φυτών μπορεί να προκαλέσει την αχρήστευση της Bt τοξίνης ως φυσικού εντομοκτόνου και την αναπόφευκτη ανάγκη για εφαρμογή πιο δραστικών και ίσως περισσότερο επιβλαβών χημικών εντομοκτόνων (deMaagd και συν., 1999, Shelton και Zhao, 2000).

**γ) Επίδραση της Bt-τοξίνης σε έντομα μη-στόχους.** Ένας ακόμη περιβαλλοντικός κίνδυνος είναι οι πιθανές απρόβλεπτες επιδράσεις της τοξίνης Bt

σε έντομα, που είναι ωφέλιμα στη γεωργία, προκαλώντας μείωση της βιοποικιλότητας και διατάραξη της ισορροπίας του φυσικού οικοσυστήματος. Μία πολυσυζητημένη δημοσίευση στο περιοδικό *Nature* στις ΗΠΑ αναφέρει ότι σε εργαστηριακές συνθήκες, η γύρη από Bt καλαμπόκι είχε αρνητικές επιδράσεις στη βιωσιμότητα της προνύμφης της υπό προστασία πεταλούδας μονάρχης (*Danaus plexippus*). Το συγκεκριμένο πείραμα αναφέρεται σε 44% θνητότητα σε προνύμφες τριών ημερών που έλαβαν ως τροφή φύλλα milkweed με κόκκους γύρης Bt καλαμποκιού (Hodgson, 1999, Losey και συν., 1999).

Υποστηρίζεται όμως ότι στο φυσικό περιβάλλον, σε αντίθεση με τις εργαστηριακές συνθήκες, οι πιθανότητες να επηρεαστεί η πεταλούδα από τις Bt καλλιέργειες καλαμποκιού είναι ελάχιστες (Mikesell, 1999) και αυτό γιατί:

1. Οι πεταλούδες *Danaus plexippus* προτιμούν να γεννούν τα αυγά τους σε φύλλα milkweed, που σπάνια θα βρεθούν στη μέση μιας καλλιέργειας, μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες μεταφοράς της Bt γύρης στα φύλλα, λόγω του σχετικού μεγάλου βάρους των κόκκων της γύρης του καλαμποκιού. Οι έρευνες σε φυτείες Bt καλαμποκιού δείχνουν μικρή συγκέντρωση κόκκων γύρης σε κοντινά φύλλα milkweed (Rice, 1999).

2. Η περίοδος επώασης των προνυμφών δεν συμπίπτει συνήθως χρονικά με την περίοδο που διασπείρεται η γύρη του καλαμποκιού.

3. Η ποσότητα της γύρης του καλαμποκιού που συναντάται σε φυσικές συνθήκες στα φύλλα milkweed είναι κατά πάσα πιθανότητα μικρότερη από εκείνη που δόθηκε στο πείραμα.

Πολλοί επιστήμονες πλέον δέχονται ότι οι θετικές επιδράσεις της καλλιέργειας Bt καλαμποκιού, όπως η μείωση της χρήσης χημικών εντομοκτόνων

που έχει ήδη παρατηρηθεί, είναι περισσότερο ωφέλιμες για πολλά είδη εντόμων, συμπεριλαμβανομένης και της πεταλούδας *Danaus plexippus* (Rice, 1999).

Παρατηρείται σε όλο και περισσότερες περιπτώσεις ότι η βιοποικιλότητα των εντόμων είναι μεγαλύτερη σε καλλιέργειες Βt καλαμποκιού, παρά σε καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται τα κλασικά χημικά εντομοκτόνα (Anonymous, 1999).

Επίσης, ορισμένες έρευνες έδειξαν ότι ο μετασχηματισμός του καλαμποκιού με το γονίδιο Βt, ενισχύει τη διατροφική ασφάλεια του σπόρου, καθιστώντας το ανθεκτικότερο σε μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες (όπως τα γένη *Aspergillus* και *Fusarium* που παράγουν τις αφλατοξίνες και τις φουμονισίνες, αντίστοιχα). Οι ισχυρές αυτές τοξίνες, εκτός του ότι μπορεί να προκαλέσουν το θάνατο ζώων, αν περιέχονται σε ζωοτροφές καλαμποκιού, έχουν πιθανόν καρκινογόνο δράση στον άνθρωπο (Munkvold και Desjardins, 1997, Munkvold και συν., 1999, Thomson, 2000).

Η έρευνα έχει στραφεί προς την παραγωγή της νέας γενιάς Βt φυτών που θα εκφράζουν τα γονίδια Βt μόνο στα μέρη του φυτού που καταναλώνονται από τα συγκεκριμένα έντομα - στόχους, όπως το *Ostrinia nubilalis* που τρώει μόνο τους μίσχους του καλαμποκιού, και όχι στη γύρη. Μια τέτοια ποικιλία θα ελαχιστοποιούσε τους κινδύνους από τη διασπορά της Βt γύρης σε έντομα μη-στόχους, ενώ θα διατηρούσε το πλεονέκτημα της αποφυγής των χημικών εντομοκτόνων.

δ) **Αύξηση στη χρήση ζιζανιοκτόνων.** Ένας ακόμη περιβαλλοντικός κίνδυνος είναι η πιθανή κατάχρηση χημικών ζιζανιοκτόνων λόγω της δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων φυτών ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η καλλιέργεια διαγονιδιακών φυτών, όπως σόγιας, που είναι ανθεκτικά

στη χρήση χημικών ζιζανιοκτόνων όπως το Roundup, θα οδηγήσει στην ανεξέλεγκτη αύξηση της χρήσης των χημικών αυτών ουσιών (Wadman 1996). Υπενθυμίζεται ότι η γενετικά τροποποιημένη σόγια (της εταιρείας Monsanto) περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο ζιζανιοκτόνο Roundup, έτσι ώστε να μην επηρεάζεται η καλλιέργειά της από τη χρήση του εν λόγω ζιζανιοκτόνου.

### **B.3. ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ**

Οι πιθανοί κίνδυνοι υγείας από την κατανάλωση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων μπορεί να προκύψουν όταν τα «νέα» γονίδια ή τα προϊόντα τους καταλήξουν μέσω της τροφικής αλυσίδας στον άνθρωπο. Η επίδραση στην ανθρώπινη υγεία και η ανάπτυξη των νέων πρωτεϊνών που προκύπτουν από την έκφραση των νεοεισαγόμενων γονιδίων στα φυτά, δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί, αλλά είναι πιθανόν ορισμένες από τις νέες πρωτεΐνες να έχουν αλλεργιογόνο δράση ή το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, που φέρουν τα περισσότερα γενετικά τροποποιημένα φυτά, να μπορεί να εισέλθει σε βακτήρια του πεπτικού συστήματος, καθιστώντας τα πιο ανθεκτικά σε αντιβιοτικά (Paragini και Romano-Spica, 2004, Bertoni και Marsan, 2005).

Γι αυτό το λόγο απαιτείται συνεχής παρακολούθηση και έλεγχος των εφαρμογών της νέας τεχνολογίας. Είναι χαρακτηριστικό ότι χιλιάδες επεξεργασμένα προϊόντα περιέχουν γενετικά τροποποιημένα συστατικά (π.χ. λεκιθίνη σόγιας σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής). Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι περίπου το 60% των επεξεργασμένων τροφίμων έχουν κάποιο συστατικό που έχει προέλθει από γενετικά τροποποιημένο φυτό (The Lancet, 1999).

### B.3.1 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΩΝ

Ορισμένες γενετικές επεμβάσεις στα φυτά, όπως η εισαγωγή νέων γονιδίων που δεν προϋπήρχαν στο φυτό, μπορεί να επηρεάσουν την αλλεργιογόνο δράση τους. Η εισαγωγή νέων γονιδίων σε ένα φυτό μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση νέων πρωτεϊνών, οι οποίες όταν καταναλώνονται από ανθρώπους ή ζώα πιθανόν να προκαλούν αλλεργίες (Bertoni και Marsan, 2005).

Παράδειγμα αποτελεί η εισαγωγή γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη πλούσια σε θειούχα αμινοξέα, από φυστίκια Βραζιλίας σε φασόλια σόγιας, προκειμένου να αυξήσει την περιεκτικότητα της σόγιας σε θείο. Η πρωτεΐνη αυτή είναι βασικό αλλεργιογόνο των φυστικιών και βρέθηκε να διατηρεί την αλλεργιογόνο της δράση και στη σόγια (και για αυτόν το λόγο δεν προχώρησε η διάθεση του προϊόντος στην αγορά). Επίσης, στην περίπτωση του *Bacillus thuringiensis*, αναφέρθηκαν περιστατικά αναπνευστικής αλλεργίας σε εργάτες που τον χρησιμοποιούσαν για ψεκασμούς (D'Angelo, 2005).

Το πρόβλημα της αλλεργίας περιορίζεται, όταν η πηγή των ξένων γονιδίων είναι γνωστή (όπως στις περισσότερες περιπτώσεις στα διαγονιδιακά φυτά), διότι τότε είναι σχετικά πιο εύκολο να γίνουν οι δοκιμασίες για την ανίχνευση πιθανής αλλεργίας. Αν είναι γνωστή η αλλεργιογόνος δράση μιας πρωτεΐνης που υπάρχει σε ένα γενετικά τροποποιημένο τρόφιμο, μπορεί να επισημανθεί η παρουσία της με κατάλληλη σήμανση στην ετικέτα του τροφίμου και να αποφευχθεί η κατανάλωσή της από τους ανθρώπους που πάσχουν από τη συγκεκριμένη αλλεργία. Τα βρέφη παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο με πάνω από το 7% των παιδιών να εμφανίζουν τροφικές αλλεργίες (D'Angelo, 2005).



Παραμένει όμως και εδώ το πρόβλημα της αξιοπιστίας των υπαρχουσών μεθόδων εκτίμησης της ασφάλειας των τροφίμων σχετικά με την πρόκληση αλλεργίας (Bertoni και Marsan, 2005).

Στην παρούσα φάση, δεν φαίνεται να υπάρχουν αρνητικές επιδράσεις στους ανθρώπους από τη μέχρι σήμερα κατανάλωση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων και δεν υπάρχουν στοιχειοθετημένες αποδείξεις για πρόκληση νέων αλλεργιών από τη χρήση και κατανάλωση διαγονιδιακών πρωτεϊνών (D'Angelo, 2005).

### **B.3.2 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

Από τότε που ξεκίνησε η παραγωγή Γενετικά Τροποποιημένων Τροφίμων (Genetically Modified Foods - GM foods) εκφράζονται έντονοι φόβοι ότι μερικά από αυτά τα τρόφιμα είναι δυνατόν να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης υπερανθεκτικών στελεχών μικροβίων στον άνθρωπο και στα παραγωγικά ζώα. Οι ανησυχίες αυτές βασίζονται στο γεγονός ότι συχνά χρησιμοποιούνται στη δημιουργία των GMO's, ως γονίδια ιχνηθέτες (marker genes), γονίδια που μεταφέρουν αντοχή ως προς ένα αντιβιοτικό. Τέτοια γονίδια ιχνηθέτες προσκολλώνται στο γονίδιο που μεταφέρεται για να ελεγχθεί εάν η μεταφορά ήταν επιτυχής. Τα περισσότερα γενετικά τροποποιημένα φυτά περιέχουν ένα γονίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό (π.χ καναμυκίνη), το οποίο χρησιμεύει για την ανίχνευση των μετασηματισμένων φυτικών κυττάρων από τα φυσιολογικά, στα αρχικά στάδια της δημιουργίας τους (D'Angelo, 2005).

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά παρουσία του αντιβιοτικού θα μεγαλώσουν και θα είναι αναγνωρίσιμα ανάμεσα στα φυτά, στα οποία η μεταφορά γονιδίων απέτυχε. Οι ανησυχίες αφορούν την πιθανή μετάδοση της αντοχής στα

αντιβιοτικά μέσω των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων στον ανθρώπινο ή στο ζωικό οργανισμό, κάνοντας ακόμη δυσκολότερη την αντιμετώπιση των λοιμωδών νοσημάτων (Παπαδοπούλου, 2006). Βέβαια το ανθρώπινο πεπτικό σύστημα αποικοδομεί το DNA που υπάρχει στις τροφές σε πολύ μικρά τμήματα που δεν είναι λειτουργικά και επομένως σχεδόν μηδενίζεται η πιθανότητα μια ακέραιη λειτουργική αλληλουχία ξένου DNA να περάσει από τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου σε άλλα κύτταρα ή σε άλλα βακτήρια του πεπτικού συστήματος. Όμως, παραμένει ο κίνδυνος να μεταφερθεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά των γενετικά τροποποιημένων φυτών προς τα βακτήρια που βρίσκονται στο πεπτικό σύστημα των ζώων ή ανθρώπων, με αποτέλεσμα τα βακτήρια αυτά να γίνουν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (D'Angelo, 2005).

Πρόσφατα (22 Φεβρουαρίου 2007) η Γενική Διεύθυνση Υγείας και Προστασίας Καταναλωτή της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Directorate General for Health and Consumer Protection) ενημέρωσε την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Φαρμάκων (European Medicines Agency - EMA) ότι η ΕΕ προβληματιζόταν σχετικά με την έκδοση άδειας κυκλοφορίας στην ευρωπαϊκή αγορά της νέας σειράς GMO πατάτας EH92-527-1, η οποία περιέχει μια γενετική τροποποίηση η οποία χρησιμοποιεί ως ιχνηθέτη το γονίδιο *hptIII*. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί την φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης, ένα ένζυμο το οποίο γενικά μεταβιβάζει αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά, από τα οποία τα πιο γνωστά είναι η καναμυκίνη, νεομυκίνη, παρομυκίνη, βουτυροσίνη, γενταμικίνη Β και γενετισίνη. Μάλιστα ο εκπρόσωπος της DG Health με επιστολή του προς τις δύο υπο-επιτροπές της EMA, την CHMP (Committee for Human Medicinal Products) και την CVMP (Committee for Veterinary Medicinal Products) ζήτησε τη γνώμη τους σχετικά με την προηγηθείσα γνωμοδότηση της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων

(European Food Safety Authority – EFSA). Η EFSA είχε εγκρίνει την κυκλοφορία της συγκεκριμένης σειράς GMO πατάτας με το σκεπτικό ότι «η χρήση του γονιδίου *hptII* δεν συνιστά κίνδυνο για το περιβάλλον ή τον άνθρωπο ή τα παραγωγικά ζώα» και μάλιστα η ειδική επί της ασφάλειας των GMO's υπο-επιτροπή της EFSA (EFSA GMO Panel) αποφάνθηκε ότι τα προαναφερόμενα αντιβιοτικά έχουν «ελάχιστη θεραπευτική αξία στην ιατρική και περιορισμένη χρήση στην κτηνιατρική».

Η EMEA απάντησε ότι καταρχήν χρειάζεται μια πιο «μακροχρόνια και μακρόθωρη θεώρηση, λαμβάνοντας σοβαρά υπόψη την πιθανή ανάπτυξη αντοχής σε όλη την ομάδα των αμινογλυκοσιδών, τις οποίες τόσο οι γιατροί όσο και οι κτηνίατροι θεωρούν σημαντικά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία σημαντικών λοιμώξεων του ανθρώπου και των ζώων .....». (EMEA/CVMP/56937/2007). Δυστυχώς αυτή δεν ήταν η πρώτη φορά που υπήρξε διάσταση απόψεων μεταξύ των Ευρωπαϊκών Επιτροπών που γνωμοδοτούν, νομοθετούν και είναι αρμόδιες για την ασφάλεια των τροφίμων που καταναλώνει ο κάτοικος των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης και για την προστασία της υγείας του ευρωπαίου πολίτη (προσωπική επικοινωνία με Χ. Παπαδοπούλου, EU Independent Expert-Thematic area Food Quality and Safety).

## **Γ. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ GMO's**

### **Γ.1. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΑΓΡΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ**

Οι αγρότες δεν μπορούν να παράγουν οι ίδιοι σπόρους από τις γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες, καθώς αυτές δεν είναι γόνιμες, αλλά πρέπει κάθε χρόνο να αγοράζουν νέους σπόρους, γεγονός που σημαίνει αυξημένο κόστος.

Οι λόγοι που οι βιοτεχνολογικές εταιρείες παράγουν άγονους γενετικά τροποποιημένους σπόρους, είναι για να μειωθεί η επίδραση των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών στο περιβάλλον (μείωση της μεταφοράς γονιδίων), αλλά και για να έχουν τον έλεγχο της διάθεσης των γενετικά τροποποιημένων σπόρων στην αγορά (European Commission, 2000c).

## **Γ.2. ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

### **Γ.2.1. ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

Η γενετικά τροποποιημένη σόγια αποτελούσε το 2000 το 55% της συνολικής έκτασης γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών και σχεδόν το ένα τρίτο της συνολικής παραγωγής σόγιας στον κόσμο. Το 2005 (European Commission 2000a), το 60% της παγκόσμιας αγοράς σόγιας αποτελούνταν από γενετικά τροποποιημένη σόγια. Το γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι, αντίστοιχα, αντιπροσώπευε το 23% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής καλαμποκιού και το 27,2% της παραγωγής της Αμερικανικής Ηπείρου, ενώ την ίδια στιγμή το γενετικά τροποποιημένο βαμβάκι αντιπροσώπευε το 11% (Margarit και συν., 2006). Οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες παγκοσμίως, έχουν αυξηθεί κατά πολύ σε μια δεκαετία και μόνο για το έτος 2005 το ποσοστό αύξησης ήταν 11%. Το γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι κατείχε το 2004, παγκοσμίως, 11,2 εκατομμύρια εκτάρια της καλλιεργούμενης έκτασης διαγονιδιακών φυτών, αντιπροσωπεύοντας το 14% αυτής (Margarit και συν., 2006). Τα πιο διαδεδομένα καλλιεργούμενα γενετικά τροποποιημένα φυτά είναι η σόγια, το καλαμπόκι και το βαμβάκι (Andersen και συν., 2006).

## Γ.2.2. ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΑ ΧΩΡΑ

Οι ΗΠΑ, το 2000 κατείχαν το μεγαλύτερο ποσοστό γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών στον κόσμο, με μεγάλη διαφορά από όλες τις υπόλοιπες χώρες. Πιο συγκεκριμένα, πάνω από το 40% του καλαμποκιού, πάνω από το 50% του βαμβακιού και πάνω από το 45% της καλλιεργούμενης σόγιας ήταν γενετικά τροποποιημένα και τουλάχιστον το 60% των τροφίμων που βρίσκονταν στα ράφια των Αμερικάνικων Supermarkets περιείχαν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (Ahmed, 2002). Στον Καναδά, στα μέσα του 2002, το 80% της ελαιοκράμβης, το 35% του καλαμποκιού και το 30% της σόγιας που καλλιεργούνταν, προέρχονταν από γενετικά τροποποιημένες ποικιλίες (Belzile, 2002). Σύμφωνα με το ίδιο άρθρο, η αναλογία των αγροτών που καλλιεργούσαν γενετικά τροποποιημένη ελαιοκράμβη, αυξήθηκε από 7% το 1995 σε 80% το 2000. Στην Αμερικανική Ήπειρο (ΗΠΑ, Αργεντινή, Καναδάς, Βραζιλία, Μεξικό) καλλιεργείται το 96% των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, παγκοσμίως (Ahmed, 2002). Πιο συγκεκριμένα, η Αργεντινή είναι η δεύτερη σε θέση χώρα που καλλιεργεί γενετικά τροποποιημένα φυτά, ανάμεσα σε εννέα χώρες (Margarit και συν., 2006).

Το 2005 καλλιεργήθηκαν σε παγκόσμιο επίπεδο, από 8,5 εκατομμύρια αγρότες, 90 εκατομμύρια εκτάρια με γενετικά τροποποιημένα φυτά (περίπου 50 φορές αύξηση από το 1996). Από τις 21 χώρες στις οποίες αφορά η παραπάνω καλλιέργεια, οι επτά είναι αναπτυγμένες και οι 14 υπό ανάπτυξη χώρες. Το 2005, οκτώ χώρες κάλυψαν το 99% της συνολικής έκτασης: ΗΠΑ (55%), Αργεντινή (19%), Βραζιλία (10%), Καναδάς (6%), Κίνα (4%), Παραγουάη (2%), Ινδία (1%), Νότιος Αφρική (1%), ενώ το υπόλοιπο 2% μοιράζεται σε 13 άλλες χώρες. Σε σχέση

με τη συνολική παγκόσμια έκταση καλλιέργειας των φυτών αυτών, το ποσοστό γενετικά τροποποιημένων ποικιλιών είναι 60% για τη σόγια, 14% για το καλαμπόκι, 28% για το βαμβάκι και 17% για την ελαιοκράμβη (Σκαράκης, 2007).

Σημαντική εξάπλωση των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών παρατηρείται και στην Κίνα (Cardarelli και συν., 2005).

Η Ευρώπη κατέχει πολύ μικρό ποσοστό (0,03%) της παγκόσμιας έκτασης γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, διότι η Ευρωπαϊκή Ένωση ουσιαστικά έχει θεσπίσει «μορατόριουμ» στην εξάπλωση των καλλιεργειών αυτών μέχρι να θεσπιστούν αυστηρά μέτρα ασφαλείας και να αποφασιστεί μια κοινή πολιτική. Τη θέση αυτή πήρε η Ευρωπαϊκή Κοινότητα έπειτα από εντονότερες αντιδράσεις που προκλήθηκαν από τους πολίτες και από διάφορες Μη Κυβερνητικές Οργανώσεις για την εισαγωγή γενετικά τροποποιημένων σπόρων από τις ΗΠΑ (European Commission 2000a). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, σημαντική έκταση καλλιέργησε μόνο η Ισπανία (54.000 εκτάρια), ενώ η Γαλλία, Γερμανία, Πορτογαλία και Τσεχία καλλιέργησαν μικρές εκτάσεις (κάτω των 1.000 εκταρίων) (Σκαράκης, 2007).

Στις ΗΠΑ, τη χώρα με τις μεγαλύτερες εκτάσεις γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, επικρατεί η καλλιέργεια της γενετικά τροποποιημένης σόγιας, η οποία παρουσίασε σημαντική αύξηση στα έτη 1996-1999. Οι ΗΠΑ έχουν τις μεγαλύτερες εξαγωγές σόγιας στον κόσμο, εξάγοντας το 10-15% της παραγωγής τους στην Ευρώπη. Οι Cardarelli και συν. (2005), αναφέρουν ότι το 2001 στις Η.Π.Α, καλλιεργούνταν πάνω από τα 2/3 της παγκόσμιας παραγωγής γενετικά τροποποιημένων φυτών. Παγκοσμίως, η συνολική έκταση των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών αυξήθηκε από 1,7 εκατομμύρια εκτάρια, που ήταν το 1996, σε 44,2 εκατομμύρια εκτάρια το 2000.

Σημαντική παραγωγή γενετικά τροποποιημένης σόγιας έχουν επίσης η Αργεντινή και η Βραζιλία. Πιο συγκεκριμένα, στη Βραζιλία, η πρώτη σε καλλιέργεια, και μακράν όλων των καλλιεργούμενων γενετικά τροποποιημένων φυτών, είναι η ανθεκτική στα ζιζανιοκτόνα “Roundup Ready” σόγια. Οι Βραζιλιάνοι αγρότες συγκόμισαν τέσσερα εκατομμύρια τόνους γενετικά τροποποιημένης σόγιας το έτος 2003/2004, ποσότητα που αντιπροσώπευε το 8% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής σόγιας για εκείνο το έτος (Brod και συν., 2007).

### **Γ.2.3. ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΑ ΕΙΔΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ**

Οι κυριότερες γενετικές τροποποιήσεις που έχουν γίνει στις παραδοσιακές καλλιέργειες σόγιας, καλαμποκιού, ελαιοκράμβης, κ.ά., αφορούν κυρίως σε γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα, όπως η πολύ διαδεδομένη πλέον Roundup Ready σόγια, και ανθεκτικότητα σε έντομα που προκαλούν ζημιές στις καλλιέργειες, όπως τα είδη Bt-καλαμποκιού και Bt-βαμβακιού. Οι γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες αφορούν στην πλειονότητά τους στη σόγια (60%), στο καλαμπόκι (24%), στο βαμβάκι (10%) και στην ελαιοκράμβη (5%), με τροποποιήσεις για αντοχή στα ζιζανιοκτόνα (71%), ανθεκτικότητα στα έντομα (18%), ή/και συνδυασμό των δύο (11%) (Σκαράκης, 2007).

### **Γ.3. ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΕΔΙΟΥ (FIELD TESTS)**

Στις ΗΠΑ, οι δοκιμές πεδίου σε νέα αγροτικά γενετικά τροποποιημένα προϊόντα συνεχίζονται με ραγδαίο ρυθμό (σχεδόν διπλασιάζονται κάθε χρόνο), με σκοπό την ανάπτυξη της αγροτικής παραγωγής και οικονομίας. Είδη που

συμμετέχουν σε δοκιμές πεδίου είναι το καλαμπόκι, η πατάτα, η ντομάτα, το μπρόκολο, η μελιτζάνα, το σταφύλι, το καρότο, το μπιζέλι, η πιπεριά, η φράουλα, το ζαχαροκάλαμο, το σιτάρι κ.ά. (APHIS, 1998).

Στην Ευρώπη, η Γαλλία πραγματοποιεί τις περισσότερες δοκιμές πεδίου. Είναι δεύτερη μετά τις ΗΠΑ και έχει περισσότερες δοκιμές πεδίου από όλες συνολικά τις άλλες χώρες της Ευρώπης (Stix, 1995, Stephenson & Warner, 1996).

## **Δ. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

### **Δ.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα έχουν αποτελέσει παγκοσμίως ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα ζητήματα των τελευταίων ετών στον επιστημονικό, εμπορικό, νομοθετικό και κοινωνικο-ηθικό τομέα.

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί παγκοσμίως δεκάδες εκδηλώσεις διαμαρτυρίας ενάντια στην καλλιέργεια και παραγωγή γενετικά τροποποιημένων φυτών και τροφίμων, προκαλώντας σύγχυση στις αρμόδιες αρχές των διάφορων χωρών, πολλές από τις οποίες αδυνατούν μέχρι στιγμής να εφαρμόσουν κατάλληλο πρόγραμμα ελέγχου για την έγκριση και την εμπορία των προϊόντων αυτών.

Χαρακτηριστικό είναι ότι ενώ έχει αποφασιστεί η σήμανση (labeling) των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων σε όλη την Ευρωπαϊκή Ένωση, ωστόσο δεν έχει ουσιαστικά εφαρμοστεί.



Στις ΗΠΑ, η εικόνα είναι αρκετά διαφορετική διότι δεν απαιτείται προς το παρόν σήμανση των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων, εφόσον το FDA θεωρεί ότι τα προϊόντα αυτά δεν διαφέρουν ουσιαστικά από τα αντίστοιχα παραδοσιακά. Όμως τελευταία, μετά το ευρωπαϊκό κύμα αντιδράσεων δημιουργήθηκαν έντονες πιέσεις και στις ΗΠΑ για τη σήμανση των συγκεκριμένων προϊόντων.

## **Δ.2. ΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΤΡΟΦΙΜΑ στην ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ**

### **Δ.2.1. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ, ΕΠΙΤΡΟΠΕΣ ΚΑΙ ΕΓΚΡΙΣΕΙΣ**

Στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα κάθε νέα γενετικά τροποποιημένη αγροτική ποικιλία αντιμετωπίζει τουλάχιστον τέσσερις επιστημονικές επιτροπές (δύο εθνικές και δύο ευρωπαϊκές) για να εγκριθεί όσον αφορά στην ασφάλειά της ως καλλιεργήσιμο είδος και ως καταναλωτικό προϊόν (Editorial Natural Biotechnology, 1998, Fox, 1998a).

Οι πρώτες εισαγωγές γενετικά τροποποιημένων τροφίμων από τις ΗΠΑ και οι πρώτες αιτήσεις για εγκρίσεις νέων γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών δημιούργησαν αρκετή ασυμφωνία και σύγχυση μεταξύ των αρμόδιων αρχών των κρατών και κάθε κράτος αντιμετώπιζε το θέμα των GMO's με διαφορετικό τρόπο (Abbot, 1996).

Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα όμως προσπάθησε να θεσπίσει ένα ενιαίο κανονισμό για όλες τις χώρες. Τα βασικότερα ζητήματα που κλήθηκε να ξεκαθαρίσει είναι οι εγκρίσεις για νέες καλλιέργειες GMO's και το ζήτημα της

σήμανσης (labeling) που θα φέρουν τα νέα προϊόντα (EU FOOD LAW Feb.1997, Mar.1997, Apr.1997, Jun.1997, Jul. 1997).

### **Δ.2.1.1. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ**

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1829/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για τα γενετικώς τροποποιημένα τρόφιμα και ζωοτροφές.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1830/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, σχετικά με την ιχνηλασιμότητα και την επισήμανση γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών και την ιχνηλασιμότητα τροφίμων και ζωοτροφών που παράγονται από γενετικώς τροποποιημένους οργανισμούς, και για την τροποποίηση της οδηγίας 2001/18/ΕΚ.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 65/2004 της Επιτροπής, για την καθιέρωση συστήματος σχηματισμού και απόδοσης αποκλειστικών αναγνωριστικών κωδικών για τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 641/2004 της Επιτροπής, σχετικά με τις λεπτομέρειες εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1829/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, όσον αφορά την αίτηση για έγκριση νέων γενετικώς τροποποιημένων τροφίμων και ζωοτροφών, την κοινοποίηση υφιστάμενων προϊόντων και την τυχαία ή τεχνικώς αναπόφευκτη παρουσία γενετικώς τροποποιημένου υλικού, που έτυχε ευνοϊκής αξιολόγησης κινδύνου.

Οδηγία 2001/18/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για τη σκόπιμη ελευθέρωση γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών στο περιβάλλον και

την κατάργηση της οδηγίας 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου. Η Οδηγία αυτή έχει τροποποιηθεί από τους Κανονισμούς 1829/2003 και 1830/2003.

#### **Δ.2.1.2. ΕΠΙΤΡΟΠΕΣ και ΕΓΚΡΙΣΕΙΣ**

2006/197/ΕΚ Απόφαση της Επιτροπής, για την έγκριση της διάθεσης στην αγορά τροφίμων που περιέχουν, αποτελούνται ή παράγονται από γενετικώς τροποποιημένο αραβόσιτο της σειράς 1507 (DAS-01507-1), σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1829/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.

2006/69/ΕΚ Απόφαση της Επιτροπής, για την έγκριση της διάθεσης στην αγορά τροφίμων και συστατικών τροφίμων από γενετικώς τροποποιημένο αραβόσιτο Roundup Ready της σειράς GA21 ως νέων τροφίμων ή νέων συστατικών τροφίμων, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ.258/97 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.

2006/68/ΕΚ Απόφαση της Επιτροπής για την έγκριση της διάθεσης στην αγορά τροφίμων και συστατικών τροφίμων από γενετικώς τροποποιημένο αραβόσιτο της σειράς MON 863 ως νέων τροφίμων ή νέων συστατικών τροφίμων σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 258/97 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.

2006/47/ΕΚ Απόφαση του Συμβουλίου σχετικά με την τοποθέτηση στην αγορά, σύμφωνα με την οδηγία 2001/18/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, προϊόντος αραβοσίτου (*Zea mays L., hybrid MON 863, MON810*) γενετικώς τροποποιημένου για αντοχή στο γραφιά του αραβοσίτου και σε ορισμένα λεπιδόπτερα επιβλαβή για τον αραβόσιτο.

2005/772/EK Απόφαση της Επιτροπής, για τη διάθεση στην αγορά, σύμφωνα με την οδηγία 2001/18/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, προϊόντος αραβοσίτου (*Zea mays L.*, σειρά 1507) που έχει υποστεί γενετική τροποποίηση, ώστε να αποκτήσει ανοχή σε ορισμένα επιβλαβή λεπιδόπτερα και ανοχή στο ζιζανιοκτόνο γλυφοσινικό αμμώνιο.

2005/635/EK Απόφαση της Επιτροπής, σχετικά με τη διάθεση στην αγορά, σύμφωνα με την οδηγία 2001/18/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, προϊόντος ελαιοκράμβης (*Brassica napus L.*, σειρά GT73) γενετικώς τροποποιημένης, προκειμένου να της προσδοθεί ανοχή στο φυτοφάρμακο glyphosate.

2005/637/EK Σύσταση της Επιτροπής, όσον αφορά στα μέτρα που οφείλει να λάβει ο κάτοχος της συγκατάθεσης για να αποφευχθεί κάθε ενδεχόμενο για την υγεία και το περιβάλλον, σε περίπτωση τυχαίας διαφυγής γενετικά τροποποιημένης ελαιοκράμβης (*Brassica napus L.*, σειρά GT73 - MON-00073-7), προκειμένου να βελτιωθεί η ανοχή της στο φυτοφάρμακο glyphosate.

2005/608/EK Απόφαση της Επιτροπής, σχετικά με τη διάθεση στην αγορά, σύμφωνα με την οδηγία 2001/18/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, προϊόντος αραβοσίτου (*Zea mays L.*, σειρά MON 863) που έχει τροποποιηθεί γενετικά, ώστε να είναι ανθεκτικό στο γραφιά του καλαμποκιού.

2005/448/EK Απόφαση της Επιτροπής για την έγκριση της διάθεσης στην αγορά τροφίμων και συστατικών τροφίμων από γενετικώς τροποποιημένο αραβόσιτο της σειράς NK 603 ως νέων τροφίμων ή νέων συστατικών τροφίμων, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 258/97 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.

2004/657/EK Απόφαση της Επιτροπής για έγκριση της διάθεσης στην αγορά γλυκού αραβοσίτου από γενετικώς τροποποιημένο αραβόσιτο της σειράς Bt11 ως νέου τροφίμου ή νέου συστατικού τροφίμου, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 258/97 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.

2004/643/EK Απόφαση της Επιτροπής, σχετικά με τη διάθεση στην αγορά, σύμφωνα με την οδηγία 2001/18/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, προϊόντος αραβοσίτου (*Zea mays L.*, γραμμή NK603), που έχει τροποποιηθεί γενετικά για αντοχή στο glyphosate.

98/294/EK Απόφαση της Επιτροπής για τη διάθεση στην αγορά γενετικώς τροποποιημένου αραβοσίτου (*Zea mays L.* σειρά MON 810), σύμφωνα με την οδηγία 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

98/293/EK Απόφαση της Επιτροπής, για τη διάθεση στην αγορά γενετικώς τροποποιημένου αραβοσίτου (*Zea mays L.* T25), σύμφωνα με την οδηγία 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

98/292/EK Απόφαση της Επιτροπής, για τη διάθεση στην αγορά γενετικώς τροποποιημένου αραβοσίτου (*Zea mays L.* σειρά Bt-11), σύμφωνα με την οδηγία 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

98/291/EK, Απόφαση της Επιτροπής, για τη διάθεση στην αγορά γενετικώς τροποποιημένης ελαιοκάμβης (*Brassica napus L. ssp. oleifera*), σύμφωνα με την οδηγία 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

97/393/EK Απόφαση της Επιτροπής, για τη διάθεση στην αγορά γενετικώς τροποποιημένης ελαιοκράμβης (*Brassica napus L. oleifera Metzg. MS1, RF2*), σύμφωνα με την οδηγία 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

97/392/EK Απόφαση της Επιτροπής, για τη διάθεση στην αγορά γενετικώς τροποποιημένης ελαιοκράμβης (*Brassica napus L. oleifera Metzg. MS1, RF1*), σύμφωνα με την οδηγία 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

97/98/EK Απόφαση της Επιτροπής, για τη διάθεση στην αγορά γενετικώς τροποποιημένου αραβοσίτου (*Zea mays L.*), που έχει υποστεί συνδυασμένη τροποποίηση, η οποία τον εφοδιάζει με τις εντομοκτόνες ιδιότητες που προσδίδονται από το γονίδιο κωδικοποίησης της ενδοτοξίνης Bt και με αυξημένη ανοχή του ζιζανιοκτόνου γλυφοσινικού αμμωνίου, δυνάμει της οδηγίας 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

96/281/EK Απόφαση της Επιτροπής σχετικά με τη διάθεση στην αγορά γενετικά τροποποιημένων σπόρων σόγιας (*Glycine max L.*) με αυξημένη ανοχή στο ζιζανιοκτόνο glyphosate, δυνάμει της οδηγίας 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

96/158/EK Απόφαση της Επιτροπής, για τη διάθεση στην αγορά προϊόντος που συνίσταται σε γενετικά τροποποιημένο οργανισμό, σπόρο υβρίδιου ζιζανιοανθεκτικής κράμβης (*Brassica napus L. oleifera Metzq. MS1Bn x RF1Bn*), δυνάμει της οδηγίας 90/220/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

### **Δ.2.1.3. ΕΚΤΑΚΤΑ ΜΕΤΡΑ**

2006/578/EK Απόφαση της Επιτροπής, σχετικά με τη λήψη έκτακτων μέτρων για τον μη εγκεκριμένο γενετικώς τροποποιημένο οργανισμό LL RICE 601 στα προϊόντα ρυζιού.

Απόφαση 2005/317/EK της Επιτροπής, σχετικά με τη λήψη έκτακτων μέτρων για το μη εγκεκριμένο γενετικώς τροποποιημένο οργανισμό «Bt10» στα προϊόντα αραβοσίτου.

### **Δ.3. ΣΥΧΝΕΣ ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ**

#### **Διαδικασία έγκρισης**

Ο Κανονισμός 1829/2003 εισάγει μια κεντρική, ενιαία και διαφανή διαδικασία έγκρισης, η οποία δίνει τη δυνατότητα, με την υποβολή μιας μόνο αίτησης, να εγκριθεί η χρήση ενός γενετικά τροποποιημένου υλικού σε διάφορα τρόφιμα και ζωοτροφές, χωρίς να χρειάζεται δεύτερη έγκριση.

Η αξιολόγηση του επιστημονικού κινδύνου για την Ασφάλεια των Τροφίμων θα πραγματοποιείται από την Ευρωπαϊκή Αρχή και με βάση τη γνώμη της, η Επιτροπή θα καταρτίζει σχέδιο πρότασης για τη χορήγηση ή μη της έγκρισης άδειας. Η πρόταση αυτή της Επιτροπής θα εγκρίνεται, όπως και σήμερα, από τα Κράτη Μέλη, στο πλαίσιο μιας κανονιστικής επιτροπής.

Τα προϊόντα που θα εξασφαλίζουν την άδεια, η οποία θα ισχύει για δέκα χρόνια, θα καταχωρίζονται σε ένα δημόσιο μητρώο γενετικώς τροποποιημένων τροφίμων και ζωοτροφών. Η συγκεκριμένη άδεια έγκρισης επιδέχεται ανανέωση

για περίοδο δέκα επιπλέον ετών, κατόπιν αιτήσεως που υποβάλλει στην Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων ο κάτοχος της έγκρισης.

Επιπλέον, εγκαταλείφθηκε η απλουστευμένη διαδικασία διάθεσης στην αγορά γενετικά τροποποιημένων τροφίμων, που θεωρούνταν "ουσιαστικά ισοδύναμα" με αντίστοιχα συμβατικά τρόφιμα.

### **Κανόνες επισήμανσης**

Σήμερα, σε αντίθεση με το παρελθόν, οι κανόνες επισήμανσης επεκτείνονται σε όλες τις γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές, καθώς και σε όλα τα τρόφιμα που περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το εάν ανιχνεύεται ή όχι στο τελικό προϊόν πρωτεΐνη ή DNA, που προέρχεται από γενετικά τροποποιημένο οργανισμό.

Μέχρι πρότινος υπήρχε η υποχρέωση να επισημαίνονται τα τρόφιμα που περιείχαν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, με την προϋπόθεση ότι ανιχνεύονταν ίχνη DNA ή πρωτεΐνης από γενετική τροποποίηση στο τελικό προϊόν. Όμως αυτοί οι κανόνες επισήμανσης δεν κάλυπταν ένα μεγάλο φάσμα τροφίμων (π.χ. ραφινρισμένο σογιέλαιο ή αραβοσιτέλαιο που παράγεται από γενετικά τροποποιημένη σόγια ή γενετικά τροποποιημένο αραβόσιτο). Η νέα νομοθεσία επεκτείνει τις απαιτήσεις επισήμανσης ώστε να καλύψει τρόφιμα και συστατικά τροφίμων που παράγονται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, αλλά δεν ανιχνεύεται στο τελικό προϊόν πρωτεΐνη ή DNA που προέρχεται από το γενετικά τροποποιημένο οργανισμό.

Η επισήμανση που θα φέρουν τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα, θα πρέπει να αναφέρει ότι "το προϊόν αυτό περιέχει γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς" ή "παράγεται από γενετικά τροποποιημένο (όνομα φυτού)".



**Προϊόντα στα οποία επιβάλλεται η επισήμανση ότι προέρχονται από ζώα που τρέφονται με γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές**

Δεν επιβάλλεται η επισήμανση προϊόντων, όπως κρέας, γάλα και αυγά, τα οποία προέρχονται από ζώα που τρέφονται με γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές ή που τους έχει εφαρμοστεί κάποια αγωγή με χρήση γενετικά τροποποιημένων φαρμακευτικών προϊόντων.

**Το κατώτατο όριο επισήμανσης για την τυχαία ή τεχνικώς αναπόφευκτη παρουσία εγκεκριμένου γενετικά τροποποιημένου υλικού**

Τα συμβατικά τρόφιμα που έχουν τυχαία ή τεχνικώς αναπόφευκτα επιμολυνθεί από εγκεκριμένο γενετικά τροποποιημένο υλικό σε ποσοστό κάτω από 0,9% για κάθε μεμονωμένο συστατικό του, εξαιρούνται της υποχρέωσης επισήμανσης. Άρα, το κατώτατο όριο επισήμανσης για την τυχαία ή τεχνικώς αναπόφευκτη παρουσία σε συμβατικά τρόφιμα εγκεκριμένου γενετικά τροποποιημένου υλικού προσδιορίζεται στο 0,9% για κάθε μεμονωμένο συστατικό τροφίμου. Θα πρέπει όμως ο παραγωγός να μπορεί να αποδείξει ανά πάσα στιγμή ότι η παρουσία του εγκεκριμένου γενετικά τροποποιημένου υλικού είναι τυχαία ή τεχνικώς αναπόφευκτη.

Είναι αποδεκτή η τυχαία ή τεχνικώς αναπόφευκτη παρουσία σε τρόφιμα και ζωοτροφές γενετικώς τροποποιημένου υλικού, το οποίο έχει θετική επιστημονική αξιολόγηση από τα αρμόδια όργανα της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, αλλά δεν έχει ακόμα τυπικά εγκριθεί η διάθεσή του στο εμπόριο. Το ποσοστό παρουσίας ενός τέτοιου γενετικά τροποποιημένου υλικού προσδιορίστηκε στο 0,5%. Οι υπεύθυνοι

οφείλουν να αποδείξουν στις αρμόδιες αρχές ότι έχουν λάβει όλα τα αναγκαία μέτρα για την αποφυγή της παρουσίας τέτοιων υλικών.

Το συγκεκριμένο μέτρο υιοθετήθηκε προκειμένου να αντιμετωπιστεί το μεγάλο πρόβλημα που παρουσιάζεται με την τυχαία ή τεχνικώς αναπόφευκτη επιμόλυνση των συμβατικών τροφίμων κατά το στάδιο της καλλιέργειας, της επεξεργασίας, της αποθήκευσης και της μεταφοράς τους, με γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, οι οποίοι δεν έχουν τυπικά εγκριθεί, αλλά έχουν αξιολογηθεί θετικά σε επιστημονικό επίπεδο.

### **Συστήματα ιχνηλασιμότητας**

Ο Κανονισμός 1830/2003 καθιερώνει ένα πλαίσιο για την ιχνηλασιμότητα των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, γενετικά τροποποιημένων τροφίμων και γενετικά τροποποιημένων ζωοτροφών, συμβάλλοντας στην παρακολούθηση της διακίνησης των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων μέσα στην αλυσίδα παραγωγής και διανομής, γεγονός που διευκολύνει την παρακολούθηση των πιθανών επιπτώσεων στο περιβάλλον και στην υγεία των καταναλωτών. Επιπλέον, αν το επιβάλλουν οι συνθήκες, ο Κανονισμός 1830/2003 συμβάλλει στην εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων διαχείρισης των κινδύνων, συμπεριλαμβανομένης και της απόσυρσης των προϊόντων.

Οι επιχειρήσεις πλέον θα πρέπει όταν χρησιμοποιούν ή διακινούν γενετικά τροποποιημένα προϊόντα να διαβιβάζουν και να λαμβάνουν πληροφορίες σε κάθε στάδιο της εμπορίας τους. Κατά συνέπεια θα πρέπει να αναπτύξουν ολοκληρωμένα συστήματα διαχείρισης της ποιότητας και τυποποιημένες διαδικασίες με σκοπό την ιχνηλασιμότητα και την ταυτοποίηση του φορέα από τον οποίο και στον οποίο

έχουν διατεθεί τα προϊόντα που περιέχουν ή παράγονται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.

**Οδηγίες και κανονισμοί που τροποποιούνται ή/και καταργούνται με το καινούργιο νομοθετικό πλαίσιο**

Από την ημερομηνία θέσης σε εφαρμογή του Κανονισμού 1829/2003, καταργούνται οι Κανονισμοί 1139/98/EK, 49/200/EK και 50/2000/EK, ενώ τροποποιείται ο Κανονισμός 258/97. Ο Κανονισμός 1830/2003 τροποποιεί την Οδηγία 2001/18.

**E. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ (ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ)**

**ΦΥΤΑ**

Η ανακάλυψη των τεχνικών της Γενετικής Μηχανικής, που χειρίζονται το βασικό μόριο της ζωής, το DNA, έδωσε τη δυνατότητα να δημιουργηθούν οι πρώτοι διαγονιδιακοί οργανισμοί, οι οποίοι φέρουν ξένο γενετικό υλικό, ενσωματωμένο με τεχνητό τρόπο στο γονιδίωμά τους. Κατά τη διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας τα γενετικά τροποποιημένα φυτά κατέλαβαν μεγάλη έκταση των καλλιεργειών και τα παραγόμενα προϊόντα εισήχθησαν αθρόα στην παγκόσμια αγορά (Chen, 2007).

Η αρχή στην οποία βασίζεται η δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών είναι η εισαγωγή, με τεχνητό τρόπο, τμήματος DNA ενός οργανισμού σε έναν άλλο οργανισμό διαφορετικού είδους. Το ξένο DNA του διαγονιδιακού οργανισμού έχει τη δυνατότητα να μεταγραφεί σε mRNA και να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη, δεδομένου ότι ο γενετικός κώδικας (δηλαδή η γενετική πληροφορία όπως κωδικοποιείται στις βάσεις του DNA) είναι γενικευμένος και ο ίδιος για όλα τα

είδη των οργανισμών. Αυτό σημαίνει ότι τα μηνύματα είναι γραμμένα στην ίδια «γλώσσα» ώστε να αναγνωρίζονται από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Η ιδιότητα αυτή του γενετικού κώδικα επιτρέπει την εισαγωγή «ξένου» γενετικού υλικού που προέρχεται από οποιοδήποτε οργανισμό (ιώ, βακτήριο, μύκητα, φυτό, ζώο), σε άλλο οργανισμό, π.χ. φυτά, και την έκφραση της γενετικής πληροφορίας που περιέχει αυτό το υλικό, δηλαδή τη μεταγραφή της σε mRNA και στη συνέχεια τη μετάφρασή της σε πρωτεΐνη από το φυτό που δέχθηκε το ξένο γονίδιο. Το τελικό προϊόν μπορεί να είναι μια βελτιωμένη ποικιλία ενός φυτού ή ενός ζώου, μια πρωτεΐνη που πιθανόν να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο, ή ένα φάρμακο που μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση της υγείας του ανθρώπου (Gotham, 2000).

Η διαδικασία της ενσωμάτωσης ξένων γονιδίων σε οργανισμούς ξεκίνησε αρχικά με εφαρμογές σε μικροοργανισμούς για την παραγωγή χρήσιμων ουσιών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή της ανθρώπινης ινσουλίνης σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, που για πρώτη φορά κυκλοφόρησε το 1982 και έλυσε τα προβλήματα και τις ελλείψεις που υπήρχαν στη διάθεση της ορμόνης αυτής. Οι οργανισμοί που προκύπτουν από αυτήν τη διαδικασία είναι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί ή GMO's (Genetically Modified Organisms), οι οποίοι αναφέρονται και ως διαγονιδιακοί (transgenic) ή και γενετικά ανασυνδυασμένοι (recombinant) (Gotham, 2000).

## **Ε.1. ΣΤΑΔΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ**

Η διαδικασία για την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων φυτών ακολουθεί τα βήματα που είναι απαραίτητα για τη γενετική τροποποίηση οποιουδήποτε

οργανισμού (μικροοργανισμού, φυτού, ζώου ή και του ανθρώπου) (Paragini και Romano-Spica, 2004) και τα οποία είναι τα εξής:

- A) Επιλογή του επιθυμητού γονιδίου
- B) Κλωνοποίηση του γονιδίου
- Γ) Μεταφορά του γονιδίου στα φυτικά κύτταρα.

### **E.1.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ**

Το γονίδιο που επιλέγεται να εισαχθεί σε έναν οργανισμό πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

α) Αρχικά απαιτείται να βρεθεί ένα κατάλληλο γονίδιο από κάποιον οργανισμό και να μελετηθούν καλά οι ιδιότητές του.

β) Το γονίδιο που θα επιλεγεί θα πρέπει να απομονώνεται εύκολα από την πηγή του, να έχει καλά μελετημένες και γνωστές ιδιότητες και να μπορεί να επιφέρει μια νέα επιθυμητή ιδιότητα στο φυτό (π.χ. να παράγει μια τοξίνη επιλεκτική για την εξόντωση των εντόμων που καταστρέφουν το φυτό) (Miraglia και συν., 2004).

### **E.1.2. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ**

Η κλωνοποίηση επιτυγχάνεται με τη γενετική μηχανική, η οποία χρησιμοποιεί την τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA. Με τον όρο ανασυνδυσμένο DNA εννοούμε τη δημιουργία τεχνητού μορίου DNA, που αποτελείται από τμήματα DNA διαφορετικών οργανισμών. Για τη δημιουργία ανασυνδυσμένου DNA απαιτείται η χρήση: α) φορέα κλωνοποίησης και β) κατάλληλων ενζύμων (περιοριστική ενδονουκλεάση, λιγάση). Για τον τεχνητό

ανασυνδυασμό χρειάζονται δύο μόρια DNA, στα οποία γίνεται διάσπαση με τα περιοριστικά ένζυμα, που αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ βάσεων σε διπλή έλικα DNA και διασπών είτε μέσα είτε έξω από αυτές τις αλληλουχίες, υδρολύοντας ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της διπλής έλικας. Στη συνέχεια, τα δύο μόρια DNA ενώνονται με τη DNA λιγάση, η οποία καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3'-OH ομάδας στο άκρο της μιας αλυσίδας DNA και της 5'- φωσφορικής ομάδας στο άκρο της άλλης. Τέλος, το νέο μόριο DNA που παρασκευάζεται εισάγεται σε ένα κύτταρο το οποίο έχει υποστεί συγκεκριμένη κατεργασία ώστε να μπορεί να το δεχθεί (Freifelder, 1987, Γλυνού, 2003).

Η διαδικασία της κλωνοποίησης έχει ως σκοπό:

- α) την απομόνωση ενός γονιδίου από (ολικό-γονιδιακό) γενωμικό DNA
- β) την παραγωγή RNA και πρωτεϊνικών μορίων σε μεγάλες ποσότητες με την έκφραση κλωνοποιημένων γονιδίων
- γ) τη διατήρησή του γονιδίου σε ένα συγκεκριμένο μόνο γενετικό στοιχείο, όπως είναι το πλασμίδιο, για μοριακές αναλύσεις ή για προετοιμασία για τη μεταφορά του σε κάποιον άλλο οργανισμό
- δ) τη βελτίωση στην παραγωγή βιοχημικών ενώσεων, όπως ένζυμα και φάρμακα
- ε) τη δημιουργία νέων πρωτεϊνών με αλλαγή των γονιδίων (μεταλλάξεις *in vitro*)
- στ) την παραγωγή φυτών με επιθυμητά χαρακτηριστικά
- ζ) την δημιουργία νέων οργανισμών, όπως βακτήρια που έχουν βιομηχανική σημασία (Freifelder, 1987, Καπούλας και Δημόπουλος, 1990, Γλυνού, 2003).

Οι διαδικασίες που ακολουθούνται για τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου DNA και την κλωνοποίησή του είναι οι εξής:

α) Κόψιμο του ξένου DNA φορέα κλωνοποίησης με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, ώστε να απομονωθεί το επιθυμητό γονίδιο.

β) Κόψιμο του φορέα κλωνοποίησης με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση σε ένα μόνο σημείο.

γ) Εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου στο φορέα κλωνοποίησης με τη βοήθεια της λιάσης.

δ) Μετασχηματισμός των κυττάρων ξενιστών.

ε) Κλωνοποίηση των κυττάρων.

στ) Επιλογή του επιθυμητού κλώνου.

Πιο αναλυτικά:

α) Κόψιμο του ξένου DNA φορέα κλωνοποίησης με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, ώστε να απομονωθεί το επιθυμητό γονίδιο.

Αφού βρεθεί το γονίδιο πρέπει να κλωνοποιηθεί σε κάποιο φορέα κλωνοποίησης, που είναι συνήθως ένα βακτηριακό πλασμίδιο (εξωχρωμοσωμικό αυτοαναπαραγόμενο κυκλικό μόριο DNA που περιέχεται συνήθως σε βακτήρια και ζύμες) ή DNA λ φάγων, που είναι επίσης κυκλικό μόριο DNA. Τα πλασμίδια διαθέτουν και γονίδια που τους παρέχουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

Για την κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου απαιτούνται επίσης ειδικά ένζυμα, που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Πρόκειται για ένζυμα που βρίσκονται φυσιολογικά σε βακτήρια και τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες δίκλωνες περιοχές DNA (θέσεις-στόχους), τις οποίες

κόβουν σε συγκεκριμένα σημεία, αφήνοντας ελεύθερα μονόκλωνα άκρα (Freifelder, 1987).

β) Κόψιμο του φορέα κλωνοποίησης με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση σε ένα μόνο σημείο.

Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιείται η ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση, προκειμένου να κόψει το φορέα κλωνοποίησης σε ένα μόνο σημείο, δημιουργώντας μονόκλωνα άκρα, συμπληρωματικά με εκείνα του γονιδίου που πρόκειται να εισαχθεί.

γ) Εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου στο φορέα κλωνοποίησης με τη βοήθεια της λιγάσης.

Για τη σύνδεση του επιθυμητού γονιδίου με το φορέα κλωνοποίησης χρησιμοποιείται μια άλλη κατηγορία ενζύμων, που ονομάζονται λιγάσες ή συνδετάσες. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ικανότητα να δημιουργούν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών νουκλεοτιδίων συνδέοντας τμήματα DNA. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται ανασυνδυσασμένα μόρια DNA, που προκύπτουν από τον τεμαχισμό και συνένωση τμημάτων DNA που προέρχονται από διαφορετικά είδη οργανισμών (Freifelder, 1987, Γλυνού, 2003).

δ) Μετασηματισμός των κυττάρων ξενιστών.

Μόνο τα φυτά που περιέχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας σε ένα αντιβιοτικό μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό, ενώ αν το γονίδιο ανθεκτικότητας δεν έχει ενσωματωθεί στο DNA των φυτικών κυττάρων, τότε τα φυτά δεν θα αναπτυχθούν. Επειδή το γονίδιο-δείκτης αναγνώρισης είναι συνδεδεμένο με το άλλο μεταφερόμενο γονίδιο (που δίνει την επιθυμητή ιδιότητα στο



φυτό), εκείνα τα φυτά που θα αναπτυχθούν στο θρεπτικό μέσο, θα περιέχουν επίσης και το μεταφερόμενο γονίδιο.

ε) Κλωνοποίηση των κυττάρων.

Όλοι οι απόγονοι ενός κυττάρου έχουν τις ίδιες κληρονομικές ιδιότητες με το μητρικό κύτταρο, αλλά και μεταξύ τους και μεταφέρουν το ίδιο ανασυνδυασμένο DNA που περιέχει το ξένο γονίδιο που έχει εισαχθεί στο κύτταρο. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται κλώνοι και πολλαπλασιάζονται συνεχώς μαζί με το ανασυνδυασμένο DNA. Με την κλωνοποίηση των μετασχηματισμένων κυττάρων-ξενιστών παράγονται μεγάλες ποσότητες από τα τμήματα DNA, που έχουν εισαχθεί σε αυτά (Καπούλας και Δημόπουλος, 1990, Γλυνού, 2003).

στ) Επιλογή του επιθυμητού κλώνου.

Στο κλωνοποιημένο DNA που απομονώνεται πλέον σε μεγάλες ποσότητες, πραγματοποιείται ανάλυση της δομής, της λειτουργίας και της έκφρασής του και προετοιμάζεται ώστε να μεταφερθεί στα φυτικά κύτταρα (Miraglia και συν., 2004).

### **E.1.3. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

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

α) Μεταφορά γονιδίων μέσω του αγροβακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*.

β) Μεταφορά με ηλεκτροχημικές μεθόδους.

Το γενετικό υλικό που εισάγεται μπορεί να είναι:

- α) γονίδια από φυτά του ίδιου ή άλλου είδους, ή
- β) γονίδια από άλλους οργανισμούς (π.χ. βακτήρια, ζώα).

Με τους βιολογικούς τρόπους μεταφοράς, τα γονίδια εισέρχονται με φυσικό μηχανισμό στα φυτά. Ένας τέτοιος φυσικός μηχανισμός παρατηρείται στο βακτήριο εδάφους *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο προσβάλλει τραυματισμένα δικοτυλήδωνα φυτά, μεταφέροντας δικό του γενετικό υλικό στα χρωμοσώματα των φυτών, προκαλώντας σε αυτά ένα είδος καρκίνου (Belzile F., 2002).

Η επιτυχία της κατασκευής διαγονιδιακών φυτών εξαρτάται από πολλές συνθήκες που πρέπει να ισχύουν ταυτόχρονα:

- α) διείσδυση του ξένου DNA στα φυτικά κύτταρα,
- β) ενσωμάτωση του ξένου DNA στο γονιδίωμα των φυτικών κυττάρων,
- γ) δυνατότητα των διαγονιδίων να εκφραστούν στον ξενιστή, και
- δ) επιλογή και δημιουργία ολόκληρων φυτών από κύτταρα που έχουν γενετικά τροποποιηθεί.

Το 1983 πραγματοποιήθηκε η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών καπνού, που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη (Herrera-Estrella και συν., 1983, Zambryski και συν., 1983).

Το πρώτο γενετικά τροποποιημένο φυτό με εμπορική αξία παράχθηκε το 1985. Στο γονιδίωμα του φυτού εισάχθηκε γονίδιο ανθεκτικότητας στο γλυφοζίτη. Ο γλυφοζίτης είναι ένα ζιζανιοκτόνο που παρεμποδίζει την έκφραση κάποιου ενζύμου σε πολλά φυτά, με αποτέλεσμα την καταστροφή τους. Ο γλυφοζίτης δεν χρησιμοποιούταν ευρέως λόγω της δράσης του όχι μόνο στα παρασιτικά βότανα

αλλά και στην ίδια τη σοδειά. Όμως, μετά την εισαγωγή στο φυτό γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο αυτό, αναπτύχθηκαν σοδειές καλαμποκιού, βαμβακιού και καπνού, που είναι δυνατόν να ψεκαστούν με το συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξής τους χωρίς αυτή να παρεμποδίζεται (Freifelder, 1987, Γλυνού, 2003).

#### **Ε.1.4. ΦΥΣΙΚΟΙ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ**

Παράλληλα με τις έρευνες στα αγροβακτήρια, μελετήθηκε και η μεταφορά DNA στα κύτταρα με μεθόδους χημικές, φυσικές ή ηλεκτρικές.

Γενετικό υλικό μπορεί να μεταφερθεί σε πρωτοπλάστες φυτικών κυττάρων με: α) μικροενέσεις, β) βομβαρδισμό σωματιδίων με ειδικά πιστόλια (gene guns) και γ) με την τεχνική της ηλεκτροπόρωσης (MaliyakaI, 1997).

Σύμφωνα με την τεχνική της ηλεκτροπόρωσης, μίγμα πρωτοπλαστών και πλασμιδιακού DNA υφίσταται ηλεκτρικούς παλμούς. Η υψηλή ένταση καθιστά τις κυτταρικές μεμβράνες των φυτικών κυττάρων διαπερατές σε μεγάλα μόρια και έτσι τα πλασμιδιακά μόρια DNA εισέρχονται στα κύτταρα. Τα φυτικά κύτταρα στη συνέχεια επανασυνθέτουν το κυτταρικό τους τοίχωμα και εξελίσσονται σε βιώσιμα μετασηματισμένα κύτταρα που εκφράζουν το ενσωματωμένο πλασμιδιακό DNA (Stryer, 1995).

Όσον αφορά στο βομβαρδισμό σωματιδίων με ειδικά πιστόλια (gene guns ή gene "cassette"), το ξένο DNA εισάγεται συνήθως με τη μορφή μονάδας διαδοχικών γενετικών στοιχείων, που αποτελείται από έναν προαγωγέα, το δομικό γονίδιο και μια αλληλουχία τερματισμού (Mannelli και συν., 2003).

Κοινά γενετικά στοιχεία (genetic elements) που εισάγονται σε φυτά είναι ο προαγωγέας του ιού της μωσαϊκής του κουνουπιδιού (*Cauliflower mosaic virus promoter*), το γονίδιο που κωδικοποιεί τη συνθετάση του 3-φωσφορικού εστέρα και του 5-ενολοπυροσταφυλοσικιμικού οξέος (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphate, EPSPS), το γονίδιο που κωδικοποιεί την τοξίνη CryI(Ab) του βακίλλου *Bacillus thuringiensis*, η οποία είναι γνωστή για την εντομοκτόνο δράση της, το γονίδιο που κωδικοποιεί την ακετυλοτρανσφεράση της φωσφινόθρισίνης (phosphinothricin acetyltransferase) του *Streptomyces* spp. και η αλληλουχία τερματισμού της συνθετάσης της νοπαλίνης (nopaline synthase terminator, T-NOS) του βακτηρίου του εδάφους *Agrobacterium tumefaciens*. Από τα παραπάνω γενετικά στοιχεία αυτά που απαντώνται στους περισσότερους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς είναι ο προαγωγέας της υπομονάδας 35S του ριβοσωμικού RNA του ιού της μωσαϊκής του κουνουπιδιού και η αλληλουχία τερματισμού της συνθετάσης της νοπαλίνης του *Agrobacterium tumefaciens* (Berdal και Holst-Jensen, 2001).

## ΣΤ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ

Με τη συνεχώς αυξανόμενη εισαγωγή στην ευρωπαϊκή αγορά γενετικά τροποποιημένων τροφίμων, κυρίως από την Αμερική, παρουσιάζεται η ανάγκη να αναπτυχθούν κατάλληλες μέθοδοι για την αποτελεσματική ανίχνευση των τροφίμων εκείνων που περιέχουν συστατικά από γενετικά τροποποιημένα φυτά. Στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα έχουν θεσπιστεί οι οδηγίες (Κανονισμοί 1829 και 1830/2003) για τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα, τα οποία πρέπει να φέρουν σήμανση.

Τα γενετικά τροποποιημένα φυτά περιέχουν επιπλέον γενετικές πληροφορίες σε σχέση με τα παραδοσιακά φυτά, εφόσον έχουν εισαχθεί σε αυτά ξένα γονίδια. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη ανίχνευσης της «ξένης» γενετικής πληροφορίας των γενετικά τροποποιημένων φυτών. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Saiki και συν., 1985).

Παράλληλα με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Bessenen και συν., 1990, Golsteyn-Thomas και συν., 1991, Fitter και συν., 1992), τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι πολλαπλασιασμού νουκλεϊνικών οξέων, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της λιγκάσης (Ligase Chain Reaction, LCR) (Wiedmann και συν., 1992, 1993), ο πολλαπλασιασμός νουκλεϊνικού οξέος βάσει αλληλουχίας RNA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA) (Uyttendaele και συν., 1995), ο πολλαπλασιασμός με αντικατάσταση κλώνου (Strand Displacement Amplification, SDA), με μικροσυστοιχίες DNA (Microarrays) (Churchill και συν., 2006), με τις οποίες επιτυγχάνεται εκθετικός πολλαπλασιασμός εξαιρετικά μικρών ποσοτήτων συγκεκριμένου DNA ή RNA από ένα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα (Schweitzer και Kingsmore, 2001).

Συγχρόνως, υπάρχει δυνατότητα σε ορισμένες περιπτώσεις να ανιχνευθεί και η πρωτεΐνη που παράγεται από το γενετικά τροποποιημένο DNA με κλασικές ανοσοενζυμικές μεθόδους (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

## **ΣΤ.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR είναι μια από τις επαναστατικές τεχνικές του DNA (Saiki και συν., 1985, Mullis και συν. 1986,

Mullis και Faloona 1987, Saiki και συν., 1988), η οποία διευκόλυνε εξαιρετικά τη μελέτη και τις εφαρμογές της Μοριακής Γενετικής. Η PCR λειτουργεί ως εναλλακτική μέθοδος κλωνοποίησης, διότι μπορεί να αναπαράγει σε μεγάλες ποσότητες και με μεγάλη ταχύτητα μια συγκεκριμένη μικρή αλληλουχία DNA από όλο το νουκλεϊνικό οξύ (Schweitzer και Kingsmore, 2001).

Η τεχνική είναι πολύ γρήγορη, προσφέρει υψηλή ακρίβεια και αποτελεσματικότητα και έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να απομονώσει μια αλληλουχία από ένα πολύ μικρό δείγμα και να την κλωνοποιήσει (Alary, 2002, Chen, 2007).

Για να επιτευχθεί η εκκίνηση της PCR, απαιτούνται οι «εκκινήτες» (primers), μονόκλωνες αλληλουχίες νουκλεϊνικών οξέων, που αναγνωρίζουν και προσδένονται στο 3<sup>ο</sup> άκρο της αλληλουχίας-στόχου που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί (Andersen και συν., 2006).

### **ΣΤ.1.1. ΣΤΑΔΙΑ της PCR**

Η PCR είναι μια ταχεία μέθοδος για την ανίχνευση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών. Στηρίζεται στην αντιγραφή του συγκεκριμένου στόχου του νουκλεϊνικού οξέος, με τη βοήθεια του θερμοάαντοχου ενζύμου Taq πολυμεράση, που αρχικά απομονώθηκε από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, ενώ σήμερα παράγεται συνθετικά (Tomblin και συν., 1996, Bustin, 2000).

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μια σειρά από επαναλαμβανόμενους κύκλους, προϊόν των οποίων είναι οι μεγάλες ποσότητες των αντιγράφων της επιλεγμένης αλληλουχίας.

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

1. Αποδιάταξη των δύο αλυσίδων του στόχου (denaturation).
2. Υβριδοποίηση των αλυσίδων με τους εκκινητές (primers) ή ανασύνδεση (annealing).
3. Σύνθεση νέου κλώνου με επέκταση με dNTPs (extension).

Οι κυκλικές εναλλαγές της θερμοκρασίας, που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια του κάθε κύκλου επιτυγχάνονται με τους *θερμοκυκλοποιητές* (thermocyclers).

Όταν ο πρώτος κύκλος της σύνθεσης έχει ολοκληρωθεί, έχουν παραχθεί δύο νέα δίκλινα μόρια με βάση το αρχικό μόριο. Το μίγμα ξαναθερμαίνεται ώστε να ξανααποδιαταχθούν τα δίκλινα μόρια, η θερμοκρασία χαμηλώνει και πραγματοποιείται ένας νέος κύκλος σύνθεσης DNA. Ο δεύτερος κύκλος παράγει τέσσερα νέα δίκλινα μόρια, αντίγραφα του αρχικού. Ο κάθε κύκλος διαρκεί περίπου πέντε λεπτά και διπλασιάζει την ποσότητα του DNA που συντέθηκε στον προηγούμενο κύκλο. Το αποτέλεσμα είναι ότι η συγκεκριμένη επιλεγμένη αλληλουχία πολλαπλασιάζεται  $2^n$  φορές, όπου  $n$  είναι ο αριθμός των κύκλων που έχουν προηγηθεί. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Έτσι, για παράδειγμα 30 κύκλοι της PCR, έχουν ως αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζουν μόνο την αλληλουχία-στόχο του DNA πάνω από ένα δισεκατομμύριο φορές (Saiki και συν., 1988, Burden και Whitney, 1995).

### **ΣΤ.1.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ της PCR**

Η ποιότητα του αποτελέσματος της PCR εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση του DNA και από το ποσοστό κατακερματισμού του (fragmentation). Η υψηλή αρχική συγκέντρωση του DNA και ο μικρός βαθμός κατακερματισμού του, συμβάλλουν στο γρήγορο και αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχου με την PCR. Το πρόβλημα του κατακερματισμένου DNA

παρουσιάζεται κυρίως όταν εξετάζονται τρόφιμα που έχουν παραχθεί μετά από μεγάλη διαδικασία μεταποίησης (Alary και συν., 2002).

Το προϊόν της PCR, ελέγχεται συνήθως με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης 1,5-2% με βρωμιούχο αιθίδιο (χρωστική που δεσμεύεται στο DNA και εμφανίζεται κάτω από υπεριώδες φως). Τα μόρια DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, κινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Όσα τμήματα έχουν το ίδιο μέγεθος σχηματίζουν μια ενιαία ζώνη. Η φωτογράφιση κάτω από υπεριώδες φως εμφανίζει μια έντονη ζώνη ορισμένου μήκους που αντιστοιχεί στην πολλαπλασιασμένη με PCR αλληλουχία. Με τον τρόπο αυτόν ελέγχεται η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης (Μπατρινού, 2001).

### **ΣΤ.1.3. ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ της PCR**

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR είναι απαραίτητο να γίνουν πολλαπλοί έλεγχοι της ίδιας της τεχνικής. Πρόκειται για δοκιμασίες ελέγχου ύπαρξης κατάλληλων παραμέτρων (επιλογή εκκινητών, θερμοκρασία, χρόνος, αριθμός κύκλων, κτλ.), που επιτρέπουν τη σωστή λειτουργία της PCR (Andersen και συν., 2006).

Συνήθως ελέγχεται η παρουσία ενός γονιδίου που συναντάται στο υπό ανάλυση τρόφιμο, είτε είναι γενετικά τροποποιημένο, είτε όχι, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί την αζαΐνη ή την ιμπερτάση, πρωτεΐνες που χαρακτηρίζουν το καλαμπόκι (διαγονιδιακό και μη διαγονιδιακό). Αντίστοιχα για τη σόγια ανιχνεύεται το γονίδιο της λεκτίνης, που υπάρχει και στη διαγονιδιακή και στη μη διαγονιδιακή σόγια. Σύμφωνα με τους Beumer και Hazeleger (2002), η μη σωστή λειτουργία της PCR μπορεί να οφείλεται στο ότι: α) δεν υπάρχει αρκετό DNA στο



δείγμα, β) δεν είναι σωστές οι παράμετροι της PCR, γ) υπάρχει κάποιος ανασταλτικός παράγοντας της όλης διαδικασίας.

Το «αρνητικό δείγμα ελέγχου» περιλαμβάνει δοκιμασίες για τον έλεγχο πιθανής «επιμόλυνσης» από γενετικά τροποποιημένο DNA στο εργαστήριο. Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιεί δείγματα που δεν περιέχουν DNA και θα πρέπει να δώσουν αρνητικό αποτέλεσμα. Αν μια τέτοια δοκιμασία δώσει θετικό αποτέλεσμα, τότε σημαίνει ότι υπάρχει κάποια επιμόλυνση στα αντιδραστήρια ή στα διαλύματα που χρησιμοποιούνται. Επίσης, υπάρχει περίπτωση να μην πολλαπλασιαστεί η αλληλουχία-στόχος, εξαιτίας κάποιας αλλοίωσης.

#### **ΣΤ.1.4. ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΥΠΩΝ PCR ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ**

Σήμερα υπάρχουν διάφοροι τύποι PCR (Brunnert και συν., 2001, Bonfini και συν., 2002, Σαλαμούρα, 2007), όπως:

- α) PCR δύο σταδίων ή φωλιασμένα (Nested PCR),
- β) Πολυπλεκτική PCR (Multiplex PCR),
- γ) Αντιγόνο-δεσμευτική PCR (Antigen Capture PCR),
- δ) PCR με τη χρήση ανάστροφης τρανσκριπτάσης (μεταγραφάση) (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR),
- ε) PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).

##### **ΣΤ.1.4.1. Nested PCR**

Σε αυτόν τον τύπο PCR, πραγματοποιείται ένα πρώτο στάδιο πολλαπλασιασμού με τη βοήθεια ενός ζεύγους εκκινητών, για 15-30 κύκλους. Στη συνέχεια, τα προϊόντα πολλαπλασιασμού υπόκεινται σε δεύτερο στάδιο πολλαπλασιασμού, με τη συμμετοχή ενός δεύτερου ζεύγους εκκινητών, που

προσδένεται σε μια εσωτερική αλληλουχία του προηγούμενου στόχου. Μετά από 15-30 κύκλους τα προϊόντα ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση.

Η nested PCR συμβάλλει στην αύξηση της ευαισθησίας της, με την αύξηση του αριθμού των κύκλων, σε σύγκριση με την κλασική PCR. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην απαιτούνται ιχνηθέτες για την υβριδοποίηση με το στόχο (Zhang και συν., 2007). Επιπλέον η μεταφορά των προϊόντων της αντίδρασης συμβάλλει στην αραίωση των αναστολέων της PCR, που πιθανόν να υπάρχουν στο αρχικό δείγμα (Brod και συν., 2007). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η συγκεκριμένη μέθοδος να παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση (Meyer, 1999, Zhang και συν., 2007).

#### **ΣΤ.1.4.2. Multiplex PCR**

Χρησιμοποιούνται μέσα στο ίδιο σωληνάριο δύο ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών, που επιτρέπουν την αντιγραφή ποικίλων αλληλουχιών-στόχων. Αυτή η τεχνική συμβάλλει στην ανίχνευση ποικίλων γονιδίων ή μικροοργανισμών στο ίδιο δείγμα. Είναι ιδιαίτερης σημασίας, τόσο η επιλογή των κατάλληλων ζευγών εκκινητών, τα οποία πρέπει να διαθέτουν παρόμοια θερμική σταθερότητα, όσο και η αποφυγή υβριδοποίησης των εκκινητών μεταξύ τους (Bej και συν., 1991, Feriotto και συν., 2003, Germini και συν., 2004, Forte και συν., 2005, Hong και συν., 2006). Παράλληλα, με τη μέθοδο αυτή εξοικονομείται χρόνος και χρήμα για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (Xu και συν., 2006).

#### **ΣΤ.1.4.3. Antigen Capture PCR**

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα στην εφαρμογή της PCR για την ανάλυση δειγμάτων τροφίμων είναι η συγκέντρωση και η καθαρότητα (purification) των νουκλεϊνικών οξέων από ανασταλτικούς παράγοντες (Hill και συν., 1991). Τα αντισώματα που είναι ακινητοποιημένα σε στερεές επιφάνειες,

μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δεσμεύσουν ειδικούς μικροοργανισμούς (Okrend και συν., 1992).

#### **ΣΤ.1.4.4. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)**

Χρησιμοποιεί ως αλληλουχία - στόχο RNA, είτε πρόκειται για το γενετικό υπόστρωμα ενός RNA-ιού είτε για RNA προκαρυωτικού ή ευκαρυωτικού κυττάρου. Το RNA με αντίστροφη μεταγραφή σχηματίζει συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA), το οποίο αντιγράφεται. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται το θερμοάντοχο ένζυμο αντίστροφη τρανσκριπτάση ή μεταγραφάση (rTth) (Hill, 1996).

#### **ΣΤ.1.4.5. Real Time PCR**

Η **real-time PCR** είναι μια αντίδραση PCR όπου ο πολλαπλασιασμός του στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σύνδεση του προϊόντος πολλαπλασιασμού, στη διάρκεια της αντίδρασης PCR με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή (π.χ. LightCycler), που χρησιμοποιείται για τη μέθοδο αυτή. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της αντίδρασης, και συγκεκριμένα η λογαριθμική φάση αυτής (κατά την οποία λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας - στόχου), μέσω της αύξησης της έντασης του σήματος του φθορισμού, που είναι ανάλογη του ποσού του συντιθέμενου νέου DNA. Εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, στο ίδιο όργανο μπορεί να γίνει και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis) (Alary και συν., 2002, Holst Jensen και συν., 2003, Hernandez και συν., 2004, Baeumler και συν. 2006, Cankar και συν., 2006, Σαλαμούρα, 2007).

Υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι για την ανίχνευση και την εκτίμηση του φθορίζοντος σήματος, από τις οποίες οι πιο συνηθισμένες κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες:

A) Τις ανεξάρτητες της αλληλουχίας που πολλαπλασιάζεται (Sequence-independent detection assays), και

B) Τις εξαρτώμενες της αλληλουχίας που πολλαπλασιάζεται (Sequence-specific probe binding assays).

#### A) Sequence-independent detection assays

Βασίζονται σε φθορίζουσες ουσίες (fluorophores) που συνδέονται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA, και επομένως και στο δίκλινο DNA της αλληλουχίας - στόχου που πολλαπλασιάζεται. Σε αυτές ανήκουν τα παρακάτω:

1. SYBR Green I, και
2. Βρωμιούχο αιθίδιο.

#### A1) Ανίχνευση με SYBR Green I

Μια απλή και φθηνή προσέγγιση στη Real-Time PCR είναι αυτή που βασίζεται στη SYBR Green I, μια φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται με το δίκλινο DNA (Andersen και συν., 2006). Όταν η χρωστική είναι ελεύθερη στο διάλυμα φθορίζει ελάχιστα ή σχεδόν καθόλου, σε αντίθεση με την περίπτωση που είναι συνδεδεμένη με το DNA, οπότε αυξάνεται αισθητά το φθορίζον σήμα. Η ένταση του φθορίζοντος σήματος, που εκπέμπεται στα 530 nm, εξαρτάται από το ποσό του προϊόντος που παράγεται κατά τη διάρκεια της PCR.

Όταν η SYBR Green I συνδέεται στο δίκλινο DNA, η εκπομπή του σήματος αυξάνεται πάνω από 100 φορές. Κατά τη διάρκεια των κύκλων της PCR, η ένταση του σήματος ποικίλλει, εξαρτώμενη από το ποσό του δίκλωνου DNA. Έτσι, κατά την αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA στο πρώτο στάδιο του κάθε κύκλου

της PCR, όλα τα μόρια του DNA είναι μονόκλωνα, και επομένως και το φθορίζον σήμα είναι σχεδόν ανύπαρκτο. Κατά την ανασύνδεση (annealing), οι εκκινητές (primers) ενώνονται με την αλληλουχία-στόχο, δημιουργώντας μικρές δίκλωνες περιοχές, στις οποίες συνδέεται η χρωστική, προκαλώντας αύξηση του παραγόμενου σήματος. Κατά τη φάση της επιμήκυνσης (elongation), αυξάνεται το μήκος των δίκλωνων μορίων DNA, με αποτέλεσμα να προσδένονται σε αυτά περισσότερα μόρια από τη χρωστική, εκπέμποντας το μέγιστο μέχρι εκείνη τη στιγμή φθορίζον σήμα (Hernandez και συν., 2003).

Το μειονέκτημα που παρουσιάζει η μέθοδος αυτή, είναι το γεγονός ότι η SYBR Green I δεν μπορεί να διακρίνει το ειδικό προϊόν από τα μη ειδικά προϊόντα και τα διμερή των primers που σχηματίζονται, οδηγώντας σε εσφαλμένη εκτίμηση για το ποσό του ειδικού προϊόντος. Για αυτόν το λόγο, όταν χρησιμοποιείται η χρωστική SYBR Green I, γίνεται μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve), η οποία συμβάλλει στην αναγνώριση του σήματος, που εκπέμπεται από τη σύνδεση της χρωστικής με τα προϊόντα αντιγραφής της αλληλουχίας-στόχου (Hernandez και συν., 2003, Σαλαμούρα, 2007).

## A2) Ανίχνευση με βρωμιούχο αιθίδιο

Σήμερα δεν χρησιμοποιείται συχνά, εξαιτίας της μικρής ευαισθησίας και της μικρής εξειδίκευσης που παρουσιάζει.

## B) Sequence-specific probe binding assays

Βασίζονται σε φθορίζουσες ουσίες (fluorophores), που είναι συνδεδεμένες με εξαρτώμενους της αλληλουχίας που πολλαπλασιάζεται ανιχνευτές (sequence-specific oligonucleotide hybridization probes). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το φθορίζον σήμα που λαμβάνεται, να αυξάνεται μόνο όταν παράγεται το κύριο προϊόν. Κατηγορίες ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

1. Ανιχνευτής μονής σήμανσης (Single labeled probes, Single Probe format).
2. Ανιχνευτές εκπομπής σήματος μετά από υβριδισμό τους (Hybridization probes, Hybprobe format).
3. Ανιχνευτές εκπομπής σήματος μετά από υδρόλυσή τους (Hydrolysis probes, “TaqMan” format).

#### B1) Single labeled probes

Οι ανιχνευτές μονής σήμανσης είναι ειδικοί τύποι απλοποιημένου ανιχνευτή υβριδοποίησης, οι οποίοι είναι δυνατόν να ανιχνεύουν μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς και ενός μόνο νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής σημασμένος με φλουορεσκεΐνη. Τυπικά, ένας τέτοιος ανιχνευτής σχεδιάζεται έτσι ώστε να υβριδίζεται με την αλληλουχία-στόχο, που περιέχει το SNP που ενδιαφέρει. Κάθε φορά που ο ανιχνευτής υβριδίζεται με την αλληλουχία-στόχο, εκπέμπει περισσότερο σήμα, σε σχέση με αυτό που εκπέμπεται όταν δεν είναι υβριδισμένος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι αλλαγές στο φθορισμό να βασίζονται αποκλειστικά και μόνο στην κατάσταση του ανιχνευτή (αν έχει υβριδιστεί ή όχι) (Mariotti, 2002).

#### B2) Hybridization probes

Σε αυτόν τον τύπο, η real-time PCR χρησιμοποιεί διπλά σημασμένους ανιχνευτές: το ένα φθοριόχρωμα λειτουργεί ως δότης και το άλλο ως δέκτης της ενέργειας, ως απόρροια του φαινομένου FRET (fluorescence resonanance energy transfer). Η ενέργεια του πρώτου δότη διεγείρει το δέκτη, ο οποίος στη συνέχεια εκπέμπει φθορίζον σήμα σε διαφορετικό μήκος κύματος. Η ενέργεια μεταφέρεται μόνο όταν βρίσκονται πολύ κοντά (1-5 νουκλεοτίδια) (δηλαδή έχει γίνει υβριδισμός

του probe) και η ένταση του σήματος εξαρτάται από το ποσό των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου κατά τη διάρκεια της PCR (Mariotti, 2002).

### B3) Hydrolysis probes

Οι ανιχνευτές αυτοί χαρακτηρίζονται και ως TaqMan probes. Ο ανιχνευτής αυτός σχεδιάζεται για να υβριδίζεται στο πρότυπο DNA μεταξύ των αφετηριών (primers) και όταν είναι υβριδισμένος δεν φθορίζει γιατί τα δύο μόρια στα άκρα του, δότης στο 5' άκρο (fluorescence reporter) και μόριο απόσβεσης στο 3' άκρο (fluorescence quencher) βρίσκονται κοντά. Κατά την αντίδραση της PCR με τη σύνθεση νέου DNA, η Taq πολυμεράση με την 5' - 3' εξωνουκλεοτιδική δράση της αποσπά το 5' άκρο του probe, αυτό ελευθερώνεται, απομακρύνεται από το μόριο απόσβεσης και φθορίζει έντονα (Andersen και συν., 2006). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος της PCR που παράγεται (Tomblin και συν., 1996, Lie και Πετρόπουλος, 1998, Σαλαμούρα, 2007).

Στην TaqMan real-time PCR δεν πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης, με αποτέλεσμα να απαιτείται διαφορετική πειραματική προσέγγιση για την ανίχνευση π.χ. μιας μετάλλαξης.

Κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, τα επίπεδα των προϊόντων της PCR σχετίζονται άμεσα με το ποσό του αρχικού στόχου (Ferre, 1992). Είναι σημαντικό να εφαρμόζεται το κατάλληλο πρωτόκολλο, να αποφεύγονται περιττοί κύκλοι της PCR και με την κατάλληλη επεξεργασία των δειγμάτων να περιορίζονται ικανοποιητικά οι αναστολές, που πιθανόν να μειώνουν την ικανότητα αντιγραφής της αλληλουχίας - στόχου.

Επίσης στη real-time PCR με τη χρησιμοποίηση σειράς αραιώσεων γνωστής συγκέντρωσης DNA δημιουργείται καμπύλη και με τη βοήθειά της προσδιορισμός

του αρχικού αριθμού μορίων DNA στο υπό εξέταση δείγμα (ποσοτική, quantitative PCR) (Sykes και συν., 1992, Nogva και συν., 2000).

## **ΣΤ.2. Μέθοδος Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)**

Πρόκειται για μια ισοθερμική τεχνολογία μεγέθυνσης που πολλαπλασιάζει RNA, χρησιμοποιώντας ως στόχο DNA ή RNA. Οι αλληλουχίες-στόχοι του νουκλεϊνικού οξέος επιμηκύνονται με τη χρήση σειράς ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων της Rnase H, της T7 RNA-πολυμεράσης και της αντίστροφης μεταγραφάσης (Churchill και συν., 2006). Αρχικά, χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), ειδικοί για την αλληλουχία-στόχο, καθώς και μίγμα από NTPs και dNTPs. Ο πρώτος εκκινητής (P1) συνδέεται στο RNA και με αντίστροφη μεταγραφή σχηματίζει συμπληρωματικό-DNA (cDNA). Με χρήση της Rnase H διασπάται το RNA που είναι συνδεδεμένο με το cDNA. Ο δεύτερος εκκινητής συνδέεται στο cDNA και η αντίστροφη μεταγραφάση σχηματίζει RNA. Με τη DNA-εξαρτώμενη δράση DNA-πολυμεράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης σχηματίζεται η συμπληρωματική αλυσίδα του cDNA. Από το δίκλωνο DNA, με τη χρήση της T7 RNA-πολυμεράσης, σχηματίζονται πολλά αντίγραφα RNA, καθένα από τα οποία αποτελεί μήτρα για την παραγωγή RNA αντιγράφων. Τα αντίγραφα αυτά ανιχνεύονται είτε με γέλη αгарόζης, είτε με υβριδισμό. Επειδή η διαδικασία πραγματοποιείται στους 41°C, το γενομικό DNA παραμένει δίκλωνο, με αποτέλεσμα να μην αποτελεί στόχο για τη δημιουργία αντιγράφων (Schweitzer και Kingsmore, 2001, Σαλαμούρα, 2007).



Σε περίπτωση που ο στόχος είναι DNA, η διαδικασία διαφέρει μόνο στο γεγονός ότι πριν την προσθήκη των ενζύμων στο μίγμα της αντίδρασης, υπάρχει ένα στάδιο αποδιάταξης στους 100°C για 5 min.

### **ΣΤ.3. Μικροσυστοιχίες DNA (DNA Microarrays)**

Οι μικροσυστοιχίες αποτελούνται από διάφορους DNA ανιχνευτές (probes), που είναι τοποθετημένοι σε στερεό υπόστρωμα, όπως γυαλί. Κάθε DNA ανιχνευτής είναι ολιγονουκλεοτίδιο ειδικό σε μια αλληλουχία-στόχο του DNA (Churchill και συν., 2006). Σε αυτήν τη μέθοδο, χρησιμοποιείται αρχικά PCR, η οποία αντιγράφει όλα τα 16S rRNA γονίδια που υπάρχουν στο δείγμα, με τη βοήθεια των κατάλληλων πρωταρχικών τμημάτων RNA (primers). Στη συνέχεια, συνδέονται με τους ανιχνευτές, μόνο εκείνα τα αντιγραφόμενα τμήματα DNA που έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες με αυτά. Στο σημείο σύνδεσης των ανιχνευτών με τα αντιγραφόμενα τμήματα DNA εκπέμπεται σήμα φθορισμού, επειδή σημαίνεται ένα από τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται στην PCR. Με αυτόν τον τρόπο ανιχνεύονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στη συστοιχία (Miraglia και συν., 2004, Xu και συν., 2006, Σαλαμούρα, 2007).

Οι Segreen και συν. (2004) ανίχνευσαν με τη μέθοδο της DNA μικροσυστοιχίας τέσσερα είδη *Campylobacter*, έξι είδη *Listeria*, 16 εντεροτοξίνες σταφυλοκόκκων και τοξίνες έξι στελεχών *Clostridium perfringens*.

Οι μικροσυστοιχίες είναι δυνατόν να ανιχνεύουν παθογόνους μικροοργανισμούς ή ακόμα και τους οροτύπους τους, αλλά απαιτούν ακόμα καλλιεργητικές μεθόδους εμπλουτισμού, καθώς και βήματα PCR για να βελτιώσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα ανίχνευσης (Miraglia και συν., 2004).

## **ΣΤ.4. Ligase Chain Reaction (LCR)**

Η LCR είναι μια τροποποίηση της PCR, που χρησιμοποιεί τέσσερις ανιχνευτές, λιγάση και dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια) σε θερμικό κυκλοποιητή, ανάλογο της PCR (Schweitzer και Kingsmore, 2001, Engel και συν., 2006). Βασίζεται στη συνένωση δύο γειτονικών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, που χρησιμοποιούνται ως αφετηρίες και ενώνονται με τη μια μόνο αλυσίδα του DNA στόχου. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται αντιγραφή του DNA-στόχου. Επίσης, η μέθοδος μπορεί να διακρίνει την ύπαρξη μετάλλαξης μεταξύ των δύο αλληλουχιών-στόχων, ακόμα και αν πρόκειται για αλλαγή σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο, χάρη στη μεγάλη ευαισθησία του ενζύμου DNA-λιγάση, που δεν μπορεί να συνδέσει (mismatches) το 5' άκρο του υποστρώματος (Σαλαμούρα, 2007). Οι αλλαγές της θερμοκρασίας σε κάθε κύκλο επιτρέπουν τον αποχωρισμό των προϊόντων από την αλληλουχία-στόχο και την υβριδοποίηση (anneal). Απαραίτητο συστατικό είναι η χρήση του θερμοάαντοχου ενζύμου DNA-λιγάση, που διατηρεί τη δραστηριότητά της κατά τις μεταβολές της θερμοκρασίας σε κάθε κύκλο (Barany, 1991, Peano και συν., 2005).

## **ΣΤ.5. ΑΛΛΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

### **ΣΤ.5.1. Υβριδισμός αλληλουχιών DNA ή RNA**

Για την ανίχνευση των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανιχνευτές (probes) νουκλεϊνικών οξέων. Οι ανιχνευτές σημαίνονται πριν τον υβριδισμό με ραδιοϊσότοπο ή μη ισοτοπικά, ώστε να μπορεί να αποκαλυφθεί ο υβριδισμός τους με την αντίστοιχη DNA περιοχή του δείγματος (Kim και συν., 1991). Από το 1987, οι ανιχνευτές των νουκλεϊνικών οξέων έχουν

γίνει σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση ιών, βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών σε τρόφιμα, και σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Σαλαμούρα, 2007). Οι στόχοι των ανιχνευτών είναι μονοκλωνικά τμήματα νουκλεϊνικών οξέων με συμπληρωματική δομή, που μπορεί να είναι ριβοσωμικό RNA (rRNA), μιτοχονδριακό DNA, πλασμιδιακό DNA ή χρωμοσωμικό DNA. Το κριτήριο επιλογής του στόχου είναι η ύπαρξη μιας περιοχής, που είναι μοναδική για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό (Schweitzer και Kingsmore, 2001).

## ΣΤ.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Προτού εφαρμοστεί η τεχνική της PCR για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, είναι απαραίτητο το DNA που υπάρχει μέσα στα δείγματα, να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα μακρομόρια (λίπη και υδατάνθρακες) και να απομονωθεί (DNA extraction). Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA (Gachet και συν., 1999, Meyer, 1999, Alary, 2002):

α) Η CTAB, και

β) Η επίσημη μέθοδος που εφαρμόζεται στην Ελβετία (Μέθοδος Wizard).

α) Η CTAB μέθοδος χαρακτηρίζεται από τα εξής βήματα:

1) Διαλυτοποίηση του DNA με προσθήκη διαλύματος που περιέχει το απορρυπαντικό CTAB σε τελική συγκέντρωση 20 g/L.

2) Αποικοδόμηση των περισσότερων πρωτεϊνών που περιέχονται στο δείγμα.

3) Πρώτη καθίζηση του DNA με το δεύτερο διάλυμα CTAB σε τελική συγκέντρωση μικρότερη από 5 g/L.

4) Δεύτερη αποικοδόμηση των υπολειπόμενων πρωτεϊνών.

5) Δεύτερη καθίζηση του «καθαρού» DNA με προσθήκη αλκοόλης.

β) Η μέθοδος Wizard ακολουθεί τα εξής βήματα:

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

2) Το «ακάθαρτο» DNA τρέχει μέσα από μια στήλη που περιέχει ρητίνη υψηλής συγγένειας με μόρια DNA και τα δεσμεύει.

3) Το «καθαρό» DNA εκλύεται από τη ρητίνη και απομονώνεται.

## **ΣΤ.7. ΕΠΙΛΟΓΗ DNA ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΓΙΑ PCR**

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

Τρεις βασικές κατηγορίες αλληλουχιών-στόχων μπορούν να επιλεγούν για την ανίχνευση των GMO's (Gachet και συν., 1999, Andersen και συν., 2006):

1) Ρυθμιστικές αλληλουχίες των διαγονιδίων: Αυτές μπορεί να είναι υποκινητές, όπως ο υποκινητής P35S (απομονώνεται από τον ιό της μωσαϊκής του κουνουπιδιού, *Cauliflower mosaic virus*) ή η ρυθμιστική αλληλουχία Tnos (ρυθμίζει το τέλος της μεταγραφής της συνθετάσης της νοπαλίνης στα αγροβακτήρια) (Meyer, 1999, Berdal και Holst-Jensen, 2001).

2) Γονίδια-δείκτες αναγνώρισης: Ακολουθούν το διαγονίδιο σε όλη τη διαδικασία γενετικής τροποποίησης και επιτρέπουν την επιλογή των διαγονιδιακών φυτών από τα μη διαγονιδιακά. Είναι συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή ζιζανιοκτόνα.

3) Τα διαγονίδια: Τα γονίδια που εισάγονται στο φυτό του προσδίδουν μια νέα επιθυμητή ιδιότητα. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την φωσφινοθρισινο-ακετυλοτρανσφεράση, που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ορισμένα ζιζανιοκτόνα, ή το γονίδιο *cryIA(b)*, που κωδικοποιεί μια δ-ενδοτοξίνη του *Bacillus thuringiensis*, γνωστή για την εντομοκτόνο δράση της σε ορισμένα είδη εντόμων που υπάρχουν σε φυτά της Ευρώπης (Berdal και Holst-Jensen, 2001).

## **ΣΤ.8. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ DNA ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

α) Οι πρωτεΐνες, καθώς είναι θερμοευαίσθητα μόρια, αποικοδομούνται με την επεξεργασία των τροφίμων και δεν μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν. Αντίθετα, το DNA, ως θερμοάαντοχο, καταστρέφεται ελάχιστα με τη θερμική επεξεργασία, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται ευκολότερα σε ένα δείγμα.

β) Η μέθοδος PCR, που ανιχνεύει DNA, είναι πιο ευαίσθητη από τις κλασικές ανοσοενζυμικές, όπως η ELISA, που βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

γ) Η μέθοδος PCR, μπορεί να ανιχνεύσει την ύπαρξη γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα (Miraglia και συν., 2004).

δ) Τέλος, το DNA βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα του φυτού και επομένως θα ανιχνεύεται σε οποιοδήποτε τμήμα του φυτού χρησιμοποιηθεί για τρόφιμο (σπόροι, καρποί, φύλλα, ρίζες, κτλ.), σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται μόνο σε ορισμένα τμήματα του φυτού (Kuiper, 1999, Ahmed, 2002, Bonfini, 2002).

ε) Στις μεθόδους ανίχνευσης πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται απλοί – μονοί μάρτυρες, σε αντίθεση με τις μεθόδους ανίχνευσης DNA, κατά τις οποίες πραγματοποιείται συνδυασμός πολλών και διαφορετικών θετικών μαρτύρων (Ahmed, 2002).

Επομένως, ένα πολύ μεγάλο φάσμα γενετικά τροποποιημένων τροφίμων μπορεί να αναλυθεί με τη μέθοδο PCR, όπως προϊόντα καλαμποκιού (αλεύρι, πάστα, φύτρα, δημητριακά από αλεύρι, ποπκόρν, πατατάκια αλευριού, γλυκίσματα) και προϊόντα σόγιας (φασόλια σόγιας, κρέμα ή γάλα σόγιας, προϊόντα «κρέατος» σόγιας, λεκιθίνη σόγιας και σε ορισμένες περιπτώσεις λάδι σόγιας) (Duijn, 1999).

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου PCR (Alary, 2002), είναι:

- α) Απαιτεί εξειδικευμένα μηχανήματα και προσωπικό,
- β) Δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε επεξεργασμένες τροφές, και
- γ) Είναι δαπανηρή σε σχέση με άλλες μεθόδους, όπως η ELISA.

## **Z. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

### **Z.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Η διαγονιδιακή τεχνολογία στα φυτά αποτελεί ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται ευρύτατα, αφενός στην έρευνα για τη μελέτη της ρύθμισης και της

έκφρασης των γονιδίων των φυτών, και αφετέρου για τη βελτίωση των φυτών. Συμπληρώνει τις κλασικές μεθόδους γενετικής και χρησιμοποιείται πλέον και για εμπορικούς σκοπούς για την παραγωγή φυτών με μεγαλύτερη αξία (Σκαράκης, 2007).

Η μεταφορά γονιδίων για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών επιτυγχάνεται με την εισαγωγή γενετικού υλικού (DNA) στο γονιδίωμα ενός κυττάρου και τη σταθερή του έκφραση και κληρονομηση. Επομένως είναι εφικτό αν εισαχθεί γενετικό υλικό σε ένα φυτικό κύτταρο να προκύψει ένα πλήρες φυτό του οποίου όλα τα κύτταρα φέρουν την ίδια γενετική πληροφορία που είχε εισαχθεί στο αρχικό μητρικό κύτταρο (Duijn, 1999).

Η γονιδιακή τεχνολογία επιτρέπει τη μεταφορά κατάλληλων γονιδίων τα οποία θα προσδώσουν στα φυτά νέες μοναδικές ιδιότητες, όπως την ικανότητα να προσαρμόζονται καλύτερα στους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Προβλέπεται ότι οι νέες καλλιέργειες θα είναι πιο αποδοτικές, θα χρειάζονται λιγότερους χημικούς ψεκασμούς, γιατί θα είναι πιο ανθεκτικές και θα έχουν καρπούς με μεγαλύτερη διατροφική αξία ή βελτιωμένες ιδιότητες (π.χ. θα παραμένουν φρέσκα για περισσότερο χρόνο) (Gotham, 2000).

### **Z.1.1 ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

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

Οι υποστηρικτές της νέας τεχνολογίας κατασκευής διαγονιδιακών φυτών με νέες βελτιωμένες ιδιότητες θεωρούν ότι ένας από τους βασικότερους στόχους είναι η δημιουργία φυτών που θα συμβάλλουν στην καταπολέμηση της πείνας (Aerni, 2005). Οι νέες καλλιέργειες θα έχουν καλύτερη απόδοση, βελτιωμένη διατροφική σύσταση και θα είναι πιο ανθεκτικές σε ακραίες κλιματικές συνθήκες, γεγονός που θα τις καθιστά ιδανικές για την κάλυψη των αναγκών στις αναπτυσσόμενες χώρες (Αφρική, Ασία). Παράδειγμα αποτελεί η δημιουργία γενετικά τροποποιημένου ρυζιού με ενισχυμένη σύνθεση σε βιταμίνη Α ή σίδηρο, και με δυνατότητα για αυξημένη απόδοση στην καλλιέργεια, με στόχο να βελτιωθεί η βασικότερη τροφή του μισού σχεδόν πληθυσμού της γης (Tanglely, 2000).

Οι αναπτυσσόμενες χώρες κυρίως στην Αφρική (που υποφέρουν από ξηρασία, φτωχά εδάφη, κτλ) μπορούν να επωφεληθούν από τις εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας, όσον αφορά στην αύξηση της αποδοτικότητας των καλλιεργειών, στην ενισχυμένη θρεπτική αξία των τροφίμων, κ.ά. (Aerni, 2005).

Πολλά από τα θέματα που έχουν τεθεί για τα γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα ισχύουν και για τα τρόφιμα που παράγονται με συμβατικούς τρόπους. Για παράδειγμα, πιθανές διατροφικές ανισορροπίες ή αλλεργικές επιδράσεις μπορούν να συμβούν και από τους δύο τύπους τροφίμων. Προς το παρόν δεν υπάρχουν ενδείξεις που να υποδηλώνουν ότι είναι βλαβερές οι τεχνολογίες γενετικής τροποποίησης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων (Bertoni και Marsan, 2005).

Η αυστηρότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ασφάλειας κάθε γενετικά τροποποιημένου τροφίμου είναι εφησυχαστική. Το βασικό συμπέρασμα είναι ότι: «ναι μεν δεν έχει φανεί κάποιο πρόβλημα από την κατανάλωση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων, αλλά πρέπει να είμαστε



επιφυλακτικοί, γιατί είναι ακόμη νωρίς για οριστικά συμπεράσματα». Τα φυτά που παράγονται με τη σύγχρονη βιοτεχνολογία δεν έχουν σημαντικές διαφορές από τα παραδοσιακά φυτά και ούτε θέτουν επιπλέον κινδύνους. Η σύγχρονη αγροτική βιοτεχνολογία προσφέρει πολύ μεγάλες δυνατότητες για την παραγωγή υγιεινών και θρεπτικών τροφίμων, ικανών να καλύψουν τις ανάγκες του αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού, ενώ παράλληλα μπορούν να προσφέρουν προστασία στο περιβάλλον, να βοηθήσουν τους αγρότες και να μειώσουν το κόστος για τους καταναλωτές (Smith, 2000, Paparini και Romano-Spica, 2004).

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## **A. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's) με τη χρήση νέας αυτοματοποιημένης μοριακής τεχνικής, που στηρίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε ακατέργαστα ή επεξεργασμένα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη και/ή ζωική κατανάλωση, τα οποία περιέχουν καλαμπόκι ή/και σόγια.

## **B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B.1 Δείγματα προϊόντων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και ζωοτροφές.**

Για το σκοπό αυτό εξετάστηκαν συνολικά 494 δείγματα προϊόντων καλαμποκιού και σόγιας, που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση ή/και ζωοτροφές ως εξής:

**B.1.1 224 δείγματα καλαμποκιού που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.** Αναλυτικότερα τα δείγματα αυτά αφορούσαν:

- α) 27 δείγματα νιφάδων καλαμποκιού
- β) 27 δείγματα βρεφικών κρεμών-τροφών-μπισκότων
- γ) 11 δείγματα ξηρού καρπού καλαμποκιού για καβούρντισμα
- δ) 39 δείγματα γλυκού καλαμποκιού
- ε) 35 δείγματα καλαμποκάλευρου για κρέμες και σάλτσες
- στ) 12 δείγματα χύμα καλαμποκάλευρου μπακαλικής
- ζ) 10 δείγματα φρέσκου γάλακτος
- η) 13 δείγματα φέτας
- θ) 11 δείγματα αυγών εντατικής εκτροφής ωοπαραγωγών ορνίθων
- ι) 14 δείγματα τσιπς-σνακς
- ια) 12 δείγματα φρυγανιάς
- ιβ) 13 δείγματα γιαούρτης-επιδορπίων και

**B.1.2 39 δείγματα καλαμποκιού που προορίζονταν για ζωοτροφές.**

Αναλυτικότερα τα δείγματα αυτά αφορούσαν:

- α) 29 δείγματα ακατέργαστου καλαμποκιού και
- β) 10 δείγματα καλαμποκάλευρου.

**B.1.3 175 δείγματα σόγιας που προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση.** Αναλυτικότερα, εξετάστηκαν:

- α) 11 δείγματα κιά σόγιας
- β) 13 δείγματα μπιφτεκιών-κεφτεδακίων σόγιας, εκ των οποίων τα πέντε δείγματα έφεραν αρνητική σήμανση (μη τροποποιημένη σόγια)
- γ) 18 δείγματα ζυμαρικών σόγιας, εκ των οποίων τα οκτώ δείγματα έφεραν αρνητική σήμανση (μη τροποποιημένη σόγια)
- δ) 13 δείγματα μπισκότων-σοκολατοειδών με σόγια
- ε) 12 δείγματα σάλτσας σόγιας
- στ) 10 δείγματα γάλακτος σόγιας
- ζ) 10 δείγματα φρέσκου γάλακτος
- η) 13 δείγματα φέτας
- θ) 11 δείγματα αυγών εντατικής εκτροφής ωοπαραγωγών ορνίθων
- ι) 15 δείγματα τσιπς-σνακς
- ια) 13 δείγματα φρυγανιάς
- ιβ) 12 δείγματα σογιέλαιου
- ιγ) 14 δείγματα γιαούρτης-επιδορπίων
- ιδ) 10 δείγματα χαπιών ισοφλαβονοειδών σόγιας genistein και daidzein

#### **B.1.4 56 δείγματα ακατέργαστης σόγιας που προορίζονταν για ζωοτροφή.**

Τα δείγματα φρέσκου γάλακτος, φέτας, αυγών και γιαούρτης-επιδορπίων αναλύθηκαν δοκιμαστικά με δεδομένο ότι τα αντίστοιχα παραγωγικά ζώα, από τα οποία προέρχονται τα συγκεκριμένα προϊόντα, (βοοειδή, κοτόπουλα) πιθανότατα καταναλώνουν GMO's ζωοτροφές.

### **B.2 Δειματοληψία**

Η δειματοληψία των παραπάνω τροφίμων και ζωοτροφών έγινε ως εξής:

**B.2.1** Τα δείγματα καλαμποκιού, που προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση ελήφθησαν από καταστήματα λιανικής πώλησης και σούπερ-μάρκετ της πόλης των Ιωαννίνων, της Αθήνας και της Θεσσαλονίκης.

**B.2.2** Τα δείγματα σόγιας, που προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση ελήφθησαν επίσης από καταστήματα λιανικής πώλησης, ειδικά καταστήματα πώλησης ειδών υγιεινής διατροφής και μεγάλα σούπερ-μάρκετ των προαναφερθεισών πόλεων.

**B.2.3** Τα δείγματα των ζωοτροφών καλαμποκιού και σόγιας, ελήφθησαν είτε από μεγάλες βιομηχανίες επεξεργασίας και παραγωγής ζωοτροφών, είτε από εταιρείες αποθήκευσης, συσκευασίας και διανομής ζωοτροφών των νομών Ιωαννίνων, Αττικής και Θεσσαλονίκης. Επίσης, αρκετά δείγματα ζωοτροφών ελήφθησαν από εκτροφές ζώων της Ηπείρου. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι σε σύνολο 56 δειγμάτων ακατέργαστης σόγιας, που προορίζονταν για ζωοτροφή, τα 42 δείγματα σόγιας που ελέγχθηκαν, προορίζονταν για πτηνοτροφή σε μεγάλες πτηνοτροφικές επιχειρήσεις της Ελλάδας και προέρχονταν από χώρες της Λατινικής Αμερικής (Βραζιλία, Αργεντινή).

Η συλλογή των παραπάνω δειγμάτων άρχισε τον Ιούλιο του 2003 και ολοκληρώθηκε το Νοέμβριο του 2006.

**B.3 Μοριακά κιτ και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's).**

**B.3.1** Για την απομόνωση του DNA των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το High Pure GMO Sample Preparation kit for isolation of DNA from raw material and food products of plant origin for PCR analysis (Cat. No. 03 267 202 001, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Nonnenwald 2, 82372 Penzberg, Germany), το οποίο αποτελείται από:

- α) Extraction Buffer
- β) Binding Buffer
- γ) Πρωτεϊνάση K
- δ) Wash Buffer working solution
- ε) Elution Buffer.

**B.3.2** Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στο καλαμπόκι χρησιμοποιήθηκε το Lightcycler GMO Maize Quantification kit for the quantitative detection of genetically modified Bt-176 Maize (Cat. No. 3 267 172, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany), το οποίο αποτελείται από:

- α) GMO Maize Calibrator DNA
- β) GMO Maize Dilution Buffer

- γ) PCR-grade
- δ) GMO Maize Detection Mix
- ε) GMO Maize Reference Gene Detection Mix
- στ) GMO Maize Enzyme Master Mix.

### **B.3.3 Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γενετικά**

τροποποιημένων οργανισμών στη σόγια χρησιμοποιήθηκε το Lightcycler GMO Soya Quantification kit for the quantitative detection of genetically modified Roundup Ready Soya (Cat. No. 3 267 164, Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany), το οποίο αποτελείται από:

- α) GMO Soya Calibrator DNA
- β) GMO Soya Dilution Buffer
- γ) PCR-grade
- δ) GMO Soya Detection Mix
- ε) GMO Soya Reference Gene Detection Mix
- στ) GMO Soya Enzyme Master Mix.

### **B.3.4 Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν:**

- α) Δισαπεσταγμένο νερό
- β) Υπερκάθαρη αιθανόλη
- γ) Υπερκάθαρη ισοπροπανόλη.



**B.4 Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's).**

**B.4.1** Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's) χρησιμοποιήθηκε το LightCycler® 2.0 System (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany). Αυτό είναι ένα ανοιχτό σύστημα Real Time PCR, που σημαίνει ότι εκτός από τα έτοιμα αντιδραστήρια που παρέχει η εταιρεία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και αντιδραστήρια (νουκλεοτίδια, εκκινητές, φθορίζουσες ουσίες), της επιλογής του ερευνητή. Είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή έτσι ώστε να μην απαιτούνται περαιτέρω επεξεργασίες των προϊόντων της αντιγραφής, αφού το αποτέλεσμα φαίνεται σε πραγματικό χρόνο στην οθόνη. Αποτελείται από δύο μέρη: το θερμοκυκλοποιητή (thermocycler) και το μετρητή σήματος (fluorimeter). Ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση των κύκλων είναι περίπου 70 λεπτά. Ο μετρητής επιτρέπει συνεχή απεικόνιση του σήματος, χωρίς απαραίτητα να έχει τελειώσει η PCR. Τα γραφήματα στην οθόνη απεικονίζουν φθορισμό σε σχέση με τη θερμοκρασία για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα, περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα.

Η χρησιμοποίηση θετικών μαρτύρων με γνωστές συγκεντρώσεις, καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του μικροοργανισμού στα δείγματα, επιτυγχάνοντας έτσι εκτός από τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό του μικροοργανισμού στο δείγμα.

**B.4.2** Μικροφυγόκεντρος (UEC, serial Nr: 01001, Fraunhofer Str. 11, D-82152 Martinsried, Germany).

**B.4.3** TECHNE DRI-BLOCK<sup>®</sup> DB20 (Model: FDB02DD, Serial N.: 106558-20, Duxford Cambridge U.K, ENGLAND).

**B.4.4** PCR work station.

**B.4.5** Αναδευτήρας (vortex) (Snijders Scientific, Model: 34524, Tilburg, Holland).

**B.4.6** Εργαστηριακός ζυγός ακριβείας της εταιρείας Kern (Germany), μοντέλο 434-23.

**B.4.7** Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου τύπου Clinipette (Clinicon Mannheim GMBH).

**B.4.8** Αποστειρωμένα πλαστικά ρύγχη μιας χρήσης.

**B.4.9** Σωληνάρια Eppendorf των 1,5 mL (Micro Test Tubes Order-No.: 0030 120.086, Germany).

## Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την εξέταση των δειγμάτων των τροφίμων και των ζωοτροφών, καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, εφαρμόστηκε η Real-Time PCR, με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, D-68298 Mannheim, Germany).

### Γ.1 Ομογενοποίηση των δειγμάτων

Η ομογενοποίηση των δειγμάτων τροφίμων και ζωοτροφών (εκτός των αλεύρων και των υγρών δειγμάτων) πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρικό μηχανικό ομογενοποιητή (mixer κουζίνας).

### Γ.2 Προετοιμασία των δειγμάτων – Απομόνωση και εξαγωγή του DNA

Ποσότητα 200 mg από το κάθε ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετούνταν μέσα σε αποστειρωμένο σωληνάριο (reaction tube) χωρητικότητας 1,5 mL. Στη συνέχεια προσθέτονταν 1 mL High Pure GMO Sample Preparation Kit Extraction Buffer και μετά από ανάδευση με vortex, ακολουθούσε επώαση των δειγμάτων σε θερμαντική - επωαστική πλάκα (θερμαινόμενο μπλοκ) (TECHNE DRI-BLOCK® DB20, Model: FDB02DD, Serial N.: 106558-20, Duxford Cambridge U.K, ENGLAND) στους 80°C για 30 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα δείγματα ανακινούνταν 2-3 φορές. Κατόπιν, ακολουθούσε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 12.000 x g για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε νέα αποστειρωμένα σωληνάρια (tubes) χωρητικότητας 1,5 mL, στα οποία είχαν προηγουμένως προστεθεί 400 µL High Pure GMO Sample Preparation Kit Binding Buffer. Το συνολικό περιεχόμενο αναμιγνυόταν ήπια με πιπέττα. Στη συνέχεια προσθέτονταν 80 µL High Pure GMO Sample Preparation Kit Πρωτεΐνάσης K.

Ακολουθούσε επώαση των σωληναρίων στη θερμαντική - επωαστική πλάκα στους 72°C για 10 λεπτά. Με την προσθήκη Πρωτεΐνάσης K πραγματοποιούταν πέψη και απορρόφηση των πρωτεϊνών και αδρανοποίηση των ενδογενών νουκλεασών και άλλων ακαθαρσιών. Κατόπιν, προσθέτονταν 200 µL καθαροποιημένης ισοπροπανόλης και το συνολικό περιεχόμενο ομογενοποιούταν με τη χρήση πιπέτας. Από κάθε σωληνάριο, μεταφέρονταν με πιπέτα 650 µL σε ένα σωληνάριο με ενσωματωμένο φίλτρο (High Pure filter tube), που ήταν τοποθετημένο στο εσωτερικό ενός σωληναρίου συλλογής και απομόνωσης υπολείμματος (High Pure collection tube). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 5.000 x g για 1 λεπτό. Κατόπιν, απορριπτόταν το υποκείμενο μίγμα από το σωληνάριο συλλογής, γυρνώντας το ανάποδα και χτυπώντας το σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και επαναλαμβάνονταν η φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 5.000 x g για 1 λεπτό. Απορριπτόταν και πάλι το υποκείμενο διάλυμα από το σωληνάριο συλλογής και προσθέτονταν 450 µL High Pure GMO Sample Preparation Kit Wash Buffer working solution - το οποίο είχε από πριν παρασκευαστεί καταλλήλως με προσθήκη 40 mL καθαρής αιθανόλης 96-100% - στο ανώτερο δοχείο του σωληναρίου με το υψηλής καθαρότητας φίλτρο. Στη συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρηση των σωληναρίων στα 5.000 x g για 1 λεπτό, απορριπτόταν και πάλι το υποκείμενο διάλυμα από το σωληνάριο συλλογής και προσθέτονταν ακόμα 450 µL High Pure GMO Sample Preparation Kit Wash Buffer working solution. Επαναλαμβάνονταν η φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 5.000 x g για 1 λεπτό, και αφού απορριπτόταν ξανά το υποκείμενο διάλυμα από το σωληνάριο συλλογής, γινόταν φυγοκέντρηση των σωληναρίων στη μέγιστη ταχύτητα (13.000 x g για 10 δευτερόλεπτα), για την απομάκρυνση ακόμα και της πιο μικρής ποσότητας από το High Pure GMO Sample Preparation Kit Wash Buffer working solution, που

πιθανόν δεν είχε απορριφθεί. Κατά το στάδιο της προσθήκης του Wash Buffer working solution και των διαδοχικών φυγοκεντρήσεων επιτυγχάνεται η εξυγίανση και ο καθαρισμός του DNA από άλατα, πρωτεΐνες και άλλα κυτταρικά υπολείμματα που μπορεί δυνητικά να λειτουργήσουν ως αναστολείς της PCR. Στη συνέχεια το σωληνάριο με το υψηλής καθαρότητας φίλτρο από ίνες γυαλιού αποσπώταν από το σωληνάριο συλλογής και τοποθετούταν μέσα σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο (tube) χωρητικότητας 1,5 mL. Μέσα στο σωληνάριο με το φίλτρο προσθέτονταν - προθερμασμένη για λίγο στους 70°C σε θερμοαντιβιοτική - επωαστική πλάκα - ποσότητα 50  $\mu$ L High Pure GMO Sample Preparation Kit Elution Buffer και τα δείγματα παρέμεναν για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (15 – 25°C) για 5 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 5.000 x g για 1 λεπτό, και αφού απορριπτόταν το σωληνάριο με το υψηλής καθαρότητας φίλτρο από ίνες γυαλιού, απέμενε πλέον, στο κατώτερο αποστειρωμένο σωληνάριο (tube) χωρητικότητας 1,5 mL, απομονωμένο και καθαρό το DNA του δείγματος.

Αξίζει και πρέπει να τονισθεί ότι αυτή η μέθοδος εξαγωγής και απομόνωσης του DNA των δειγμάτων είναι κατ' αρχήν απλή. Επίσης, δεν απαιτεί τη χρήση οργανικών διαλυτών για την εξαγωγή του DNA, γεγονός που προσδίδει τη δυνατότητα για ταχύτατη απομόνωση και εξαγωγή του DNA από πολλά δείγματα ταυτόχρονα.

Μετά τη διαδικασία αυτή το απομονωμένο DNA μπορούσε είτε να χρησιμοποιηθεί αμέσως για ανάλυση, είτε να διατηρηθεί σε ψύξη στους 2-8°C ή σε κατάψυξη στους -15 έως -25 °C, για μεταγενέστερη ανάλυση.

### **Γ.3 Ανάλυση του DNA – ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's) με τη μέθοδο RT-PCR**

Στη μέθοδο real-time PCR για την ποσοτικοποίηση του GMO περιεχομένου ενός δείγματος, απαιτείται η δημιουργία μιας σειράς αραιώσεων γνωστής συγκέντρωσης DNA (GMO Maize ή Soya Calibrator DNA in the GMO Maize ή Soya Dilution Buffer), με τη βοήθεια των οποίων δημιουργείται καμπύλη τήξης του προϊόντος (melting curve), η οποία συμβάλλει στον ποσοτικό προσδιορισμό του αρχικού αριθμού μορίων DNA, τόσο των GMO's, αν υπάρχουν, όσο και του γονιδίου αναφοράς (Reference Gene DNA) στο υπό εξέταση δείγμα.

Μετά την εξαγωγή του DNA, προσθέτονταν τα αντιδραστήρια, δηλαδή τα νουκλεοτίδια, η Taq-πολυμεράση, οι εκκινητές και το ζεύγος των ανιχνευτών. Τα τριχοειδή του LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, 11909339001, Mannheim, Germany) τοποθετούνταν σε κατάλληλους προ-ψυχόμενους υποδοχείς φυγοκέντρωσης (Roche Diagnostics GmbH, 1909312, Mannheim, Germany).

Στη συνέχεια προετοιμαζόταν το LightCycler Master Mix, το οποίο περιείχε για κάθε δείγμα: 11  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (PCR-grade), 2  $\mu\text{L}$  LightCycler GMO Maize ή Soya Detection Mix, ή 2  $\mu\text{L}$  LightCycler GMO Maize ή Soya Reference Gene Detection Mix και 2  $\mu\text{L}$  LightCycler GMO Maize ή Soya Enzyme Master Mix. Ο αριθμός των τριχοειδών που τοποθετούνταν στους προ-ψυχόμενους υποδοχείς φυγοκέντρωσης ήταν ο αριθμός των δειγμάτων X 2 (ένα τριχοειδές για την ανίχνευση του GMO DNA και ένα τριχοειδές για την ανίχνευση του DNA αναφοράς του υπό εξέταση δείγματος). Εκτός αυτών χρησιμοποιούνταν και 10 τριχοειδή που απαιτούνταν για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες [(4 αραιώσεις γνωστής συγκέντρωσης με θετικό μάρτυρα + 1 αραιώση με αρνητικό μάρτυρα) X 2] (δηλαδή ένα τριχοειδές για την ανίχνευση του GMO Calibrator DNA και ένα τριχοειδές για την ανίχνευση

του Reference Gene PCR DNA για κάθε μάρτυρα). Ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας υπήρχαν στα αντιδραστήρια της εταιρείας και χρησιμοποιούνταν για τον έλεγχο της σωστής διενέργειας της PCR. Αρχικά σε κάθε τριχοειδές τοποθετούνταν 15 μL από το Master Mix και στη συνέχεια 5 μL από κάθε σωληνάριο, που περιείχε το απομονωμένο DNA κάθε δείγματος. Κάθε φορά που προσθέτονταν το DNA κάθε δείγματος, τοποθετούνταν κατάλληλα πώματα. Στα οκτώ τριχοειδή με τους θετικούς μάρτυρες, στα 15 μL από το Master Mix προσθέτονταν 5 μL από κάθε διαδοχική αραιώσή τους, σύμφωνα με τα εγχειρίδια οδηγιών (Roche Molecular Biochemicals – Diagnostics, Lightcycler GMO Maize Quantification for the quantitative detection of genetically modified Bt-176 Maize και Lightcycler GMO Soya Quantification for the quantitative detection of genetically modified Roundup Ready Soya, Instruction Manuals, Version 1, 2002). Στα δύο τριχοειδή για τον αρνητικό μάρτυρα, στα 15 μL από το Master Mix προσθέτονταν 5 μL H<sub>2</sub>O (PCR-grade). Σε όλα τα τριχοειδή τοποθετούνταν κατάλληλα πώματα. Στη συνέχεια, οι υποδοχείς που περιείχαν τα τριχοειδή, φυγοκεντρούνταν στα 700 x g για 5 sec. Στο τέλος, τα τριχοειδή μεταφέρονταν στο carousel του οργάνου του LightCycler.

Η ρύθμιση του αριθμού των κύκλων της PCR, οι θερμοκρασίες που εφαρμόζονταν σε κάθε κύκλο, καθώς και τα σημεία λήψης μετρήσεων, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, το οποίο περιελάμβανε τρία προγράμματα, οι ρυθμίσεις των οποίων αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες:

**Πίνακας 1:** Ρύθμιση παραμέτρων πρώτου προγράμματος της PCR.

- Πρόγραμμα 1: Προ-επώαση (ενεργοποίηση ενζύμου), αποφυγή επιμόλυνσης και μετουσίωση του DNA στόχου.

Αριθμός κύκλων	1
Temperature targets	Segment 1
Θερμοκρασία στόχου	95°C
Χρόνος επώασης	10 min
Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας	20°C/sec
Μέτρηση τιμής σήματος	Καμιά

**Πίνακας 2:** Ρύθμιση παραμέτρων δεύτερου προγράμματος της PCR.

- Πρόγραμμα 2: Επιμήκυνση του DNA στόχου

Αριθμός κύκλων	45		
Temperature targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Θερμοκρασία στόχου	95°C	63°C (Maize) 60°C (Soya)	72°C
Χρόνος επώασης	10 sec	20 sec	10 sec
Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας	20°C/sec	20°C/sec	20°C/sec
Μέτρηση τιμής σήματος	Καμιά	Μια	Καμιά



**Πίνακας 3:** Ρύθμιση παραμέτρων τρίτου προγράμματος της PCR.

- Πρόγραμμα 3: Ψύξη του συστήματος

Αριθμός κύκλων	1
Temperature targets	Segment 1
Θερμοκρασία στόχου	40°C
Χρόνος επώασης	30 sec
Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας	20°C/sec
Μέτρηση τιμής σήματος	Καμιά

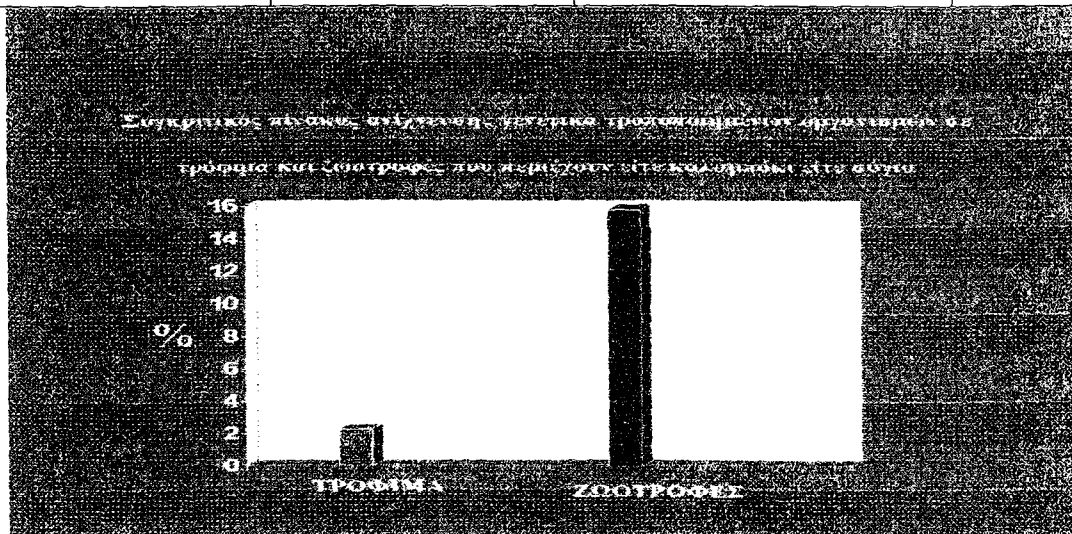
Ο χρόνος που απαιτούνταν για την ολοκλήρωση των κύκλων της PCR ήταν 70 min.

#### Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από το σύνολο των 494 δειγμάτων τροφίμων και ζωοτροφών που εξετάστηκαν βρέθηκαν συνολικά 24 δείγματα να περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (Genetically Modified Organism's). Πιο αναλυτικά, σε σύνολο 399 δειγμάτων τροφίμων που προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση ανιχνεύθηκαν εννέα δείγματα (2,25%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, ενώ από τα 95 δείγματα που προορίζονταν για ζωοτροφή βρέθηκαν 15 δείγματα (15,78%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1. Συχνότητα ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε τρόφιμα και ζωοτροφές που περιέχουν είτε καλαμπόκι είτε σόγια.**

Είδος δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός GMO δειγμάτων	Ποσοστό
Τρόφιμα	399	9	2,25%
Ζωοτροφές	95	15	15,78%
<b>Σύνολο</b>	<b>494</b>	<b>24</b>	<b>4,85%</b>



Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αποκαλύπτουν ότι το ποσοστό ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένων οργανισμών στα εξετασθέντα δείγματα τροφίμων ανέρχεται στο 2,25%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στα εξετασθέντα δείγματα ζωοτροφών ανέρχεται στο 15,78%.

Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας ανά κατηγορία δειγμάτων έχουν ως εξής:

1) Από το σύνολο των 263 δειγμάτων τροφίμων και ζωοτροφών που περιείχαν καλαμπόκι βρέθηκαν τέσσερα δείγματα (ποσοστό θετικών 1,52%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize):

α) Από τα 224 δείγματα τροφίμων που περιείχαν καλαμπόκι και προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση βρέθηκε ένα δείγμα θετικό, που αφορούσε σε καλαμπόκι ξηρό καρπό για καβούρντισμα, με ποσοστό γενετικής τροποποίησης 23,83% (ποσοστό θετικών 0,44%).

β) Από τα 39 δείγματα ζωοτροφών που περιείχαν καλαμπόκι βρέθηκαν τρία δείγματα θετικά, που αφορούσαν σε ακατέργαστο καλαμπόκι για ζωοτροφή, με ποσοστό γενετικής τροποποίησης 2,23%, 6,31% και 7,89%, αντίστοιχα (ποσοστό θετικών 7,69%).

Το ποσοστό της γενετικής τροποποίησης για κάθε δείγμα προκύπτει από τη διαίρεση του υπολογιζόμενου ποσού, από το Lightcycler, του GMO DNA ( Bt-176 Maize gene ή Roundup Ready soya gene) του δείγματος, προς το υπολογιζόμενο ποσό του συνολικού DNA του δείγματος (Reference Gene DNA), πολλαπλασιαζόμενο επί εκατό.

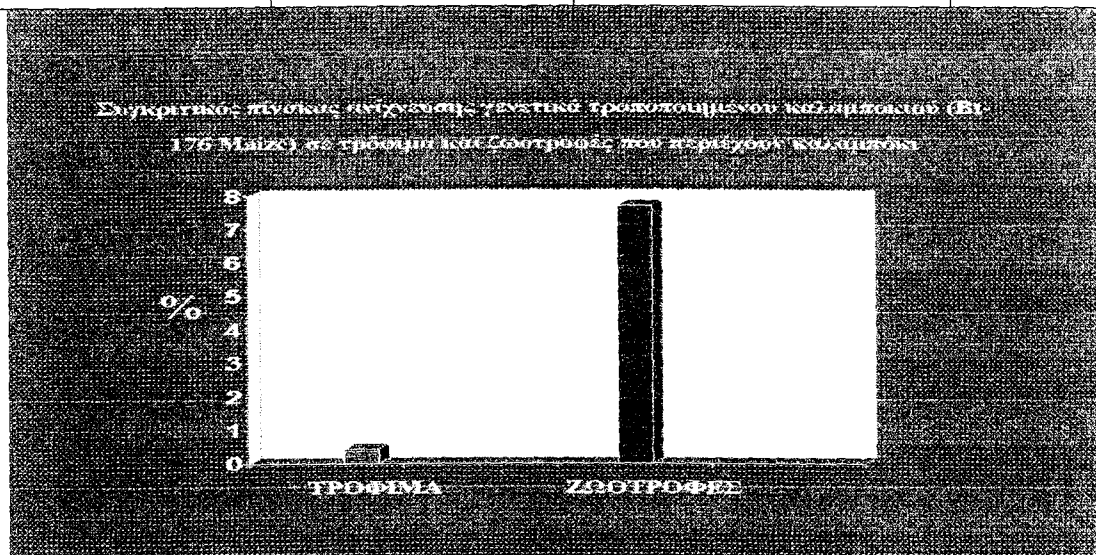
Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι το κατώτερο όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης μεθόδου είναι 0,1% και σύμφωνα με τις πρόσφατες οδηγίες και

κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Κοινότητας καθορίζεται και διευκρινίζεται ότι όλα τα τρόφιμα που προορίζονται και είναι κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και οι ζωοτροφές δεν πρέπει να περιέχουν πάνω από 0,9% γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2. Συχνότητα ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού (Bt-176 Maize) σε τρόφιμα και ζωοτροφές που περιέχουν καλαμπόκι.**

Είδος δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός Bt-176 Maize δειγμάτων	Ποσοστό θετικών
Τρόφιμα	224	1	0,44%
Ζωοτροφές	39	3	7,69%
<b>Σύνολο</b>	<b>263</b>	<b>4</b>	<b>1,52%</b>



Αναλύοντας τα παραπάνω αποτελέσματα και ανά είδος τροφίμου και ζωοτροφής που περιέχει καλαμπόκι, προκύπτουν τα εξής:

α1) Στα 27 δείγματα νιφάδων καλαμποκιού που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α2) Στα 27 δείγματα βρεφικών κρεμών-τροφών και μπισκότων που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α3) Από τα 11 δείγματα καλαμποκιού ξηρού καρπού για καβούρντισμα που εξετάστηκαν βρέθηκε ένα δείγμα (9,1%) να περιέχει γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι, σε ποσοστό 23,83%.

α4) Στα 39 δείγματα γλυκού καλαμποκιού που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α5) Στα 35 δείγματα καλαμποκάλευρου για κρέμες και σάλτσες που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α6) Στα 12 δείγματα καλαμποκάλευρου μπακαλικής χύμα που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α7) Στα 23 δείγματα φρέσκου γάλακτος-φέτας που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α8) Στα 11 δείγματα αυγών εντατικής εκτροφής ωοπαραγωγών ορνίθων που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α9) Στα 14 δείγματα τσιπς-σνακς που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α10) Στα 12 δείγματα φρυγανιάς που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

α11) Στα 13 δείγματα γιαουρτιών-επιδορπίων που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

β1) Από τα 29 δείγματα ακατέργαστου καλαμποκιού για ζωοτροφή που εξετάστηκαν βρέθηκαν τρία δείγματα (10,34%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι σε ποσοστό 2,23%, 6,31% και 7,89%, αντίστοιχα.

β2) Τέλος, στα 10 δείγματα καλαμποκάλευρων ζωοτροφών που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (0%).

Τα αποτελέσματα της έρευνας ανά είδος τροφίμου και ζωοτροφής που περιέχει καλαμπόκι παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3. Συγγότητα ανάγνωσης γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού (Bt-176 Maize) ανά είδος εξετασθέντων τροφίμων και ζωοτροφών που περιέχουν καλαμπόκι.**

Είδος δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός Bt-176 Maize δειγμάτων (ποσοστό γενετικής τροποποίησης)	Ποσοστό θετικών	
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΝ ΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ	Νιφάδες καλαμποκιού	27	0	0%
	Βρεφικές κρέμες-τροφές-μπισκότα	27	0	0%
	Καλαμπόκι ξηρός καρπός για καβούρντισμα	11	1 (23,83%)	9,1%
	Γλυκό καλαμπόκι	39	0	0%
	Καλαμποκάλευρο για κρέμες και σάλτσες	35	0	0%
	Καλαμποκάλευρο μπακαλικής χύμα	12	0	0%
	Φρέσκο γάλα-Φέτα	23	0	0%
	Αυγά εντατικής εκτροφής ωοπαραγωγών ορνίθων	11	0	0%
	Τσιπς-Σνακς	14	0	0%
	Ψωμί-Φρυγανιές	12	0	0%
	Γιαούρτια-Επιδόρπια	13	0	0%
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΝ ΓΙΑ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ	Ακατέργαστο καλαμπόκι για ζωοτροφή	29	3 (2,23%, 6,31%, 7,89%)	10,34%
	Καλαμποκάλευρα ζωοτροφών	10	0	0%
	<b>Σύνολο</b>	<b>263</b>	<b>4</b>	<b>1,52%</b>

2) Από το σύνολο των 231 δειγμάτων τροφίμων και ζωοτροφών που περιείχαν σόγια βρέθηκαν 20 δείγματα (ποσοστό θετικών 8,65%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya):

α) Από τα 175 δείγματα τροφίμων που περιείχαν σόγια βρέθηκαν οκτώ δείγματα θετικά, εκ των οποίων: ένα δείγμα (κιμάς σόγιας) να περιέχει γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,22%, τρία δείγματα (μπιφτέκι – κεφτεδάκια σόγιας) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,19% (Μ.Α.Σ)\*, 0,18% και 0,16% αντίστοιχα και τέσσερα δείγματα (σπαγγέτι-ζυμαρικά σόγιας) να περιέχουν GMO σόγια σε ποσοστό 0,31% (Μ.Α.Σ)\*, 0,22% (Μ.Α.Σ)\*, 0,19% (Μ.Α.Σ)\* και 0,26% (Μ.Α.Σ)\*, αντίστοιχα (ποσοστό θετικών 4,57%).

β) Από τα 56 δείγματα ζωοτροφών που περιείχαν σόγια βρέθηκαν 12 δείγματα θετικά, που αφορούσαν σε ακατέργαστη σόγια για ζωοτροφή, με ποσοστό γενετικής τροποποίησης 4,30% , 2,31% , 62,06% , 75,91%, 9,45%, 60,7%, 20,05%, 94,48%, 55,11%, 36,97%, 74,63% και 0,14%, αντίστοιχα (ποσοστό θετικών 21,42%).

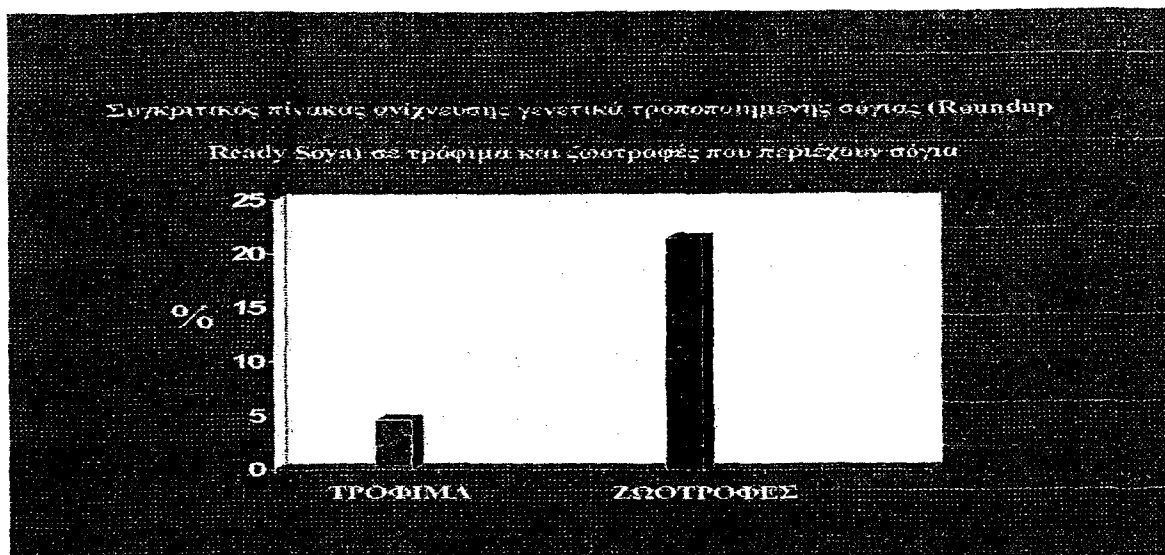
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

**Πίνακας 4. Συχνότητα ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένης σόγιας (Roundup Ready Soya) σε τρόφιμα και ζωοτροφές που περιέχουν σόγια.**

Είδος δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός Roundup Ready Soya δειγμάτων	Ποσοστό
Τρόφιμα	175	8	4,57%
Ζωοτροφές	56	12	21,42%
<b>Σύνολο</b>	<b>231</b>	<b>20</b>	<b>8,65%</b>

**\*(Μ.Α.Σ): Με Αρνητική Σήμανση (Μη Τροποποιημένη Σόγια)**





Αναλύοντας τα παραπάνω αποτελέσματα και ανά είδος τροφίμου και ζωοτροφής που περιέχει σόγια, προκύπτουν τα εξής:

α1) Στα 10 δείγματα γάλακτος σόγιας που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya). (0%).

α2) Από τα 11 δείγματα κινά σόγιας που εξετάστηκαν βρέθηκε ένα δείγμα (9,1%) να περιέχει γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,22%.

α3) Από τα 13 δείγματα μπιφτεκιών-κεφτεδακιών σόγιας που εξετάστηκαν βρέθηκαν τρία δείγματα (23,07%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,19% (Μ.Α.Σ)\*, 0,18% και 0,16% αντίστοιχα.

α4) Από τα 18 δείγματα σπαγγέτι-ζυμαρικών σόγιας που εξετάστηκαν βρέθηκαν τέσσερα δείγματα (22,22%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,31% (Μ.Α.Σ)\*, 0,22% (Μ.Α.Σ)\*, 0,19% (Μ.Α.Σ)\* και 0,26% (Μ.Α.Σ)\*, αντίστοιχα.

α5) Στα 10 δείγματα χαπιών ισοφλαβονοειδών σόγιας (genistein and daidzein) που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

α6) Στα 13 δείγματα μπισκότων-σοκολατοειδών με σόγια που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

α7) Στα 12 δείγματα σάλτσας σόγιας που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

α8) Στα 23 δείγματα φρέσκου γάλακτος-φέτας που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

α9) Στα 11 δείγματα αυγών εντατικής εκτροφής ωοπαραγωγών ορνίθων που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

α10) Στα 15 δείγματα τσιπς-σνακς που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

α11) Στα 13 δείγματα φρυγανιάς που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

α12) Στα 12 δείγματα σπορέλαιων-μαργαρινών που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

α13) Στα 14 δείγματα γιαουρτιού που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya) (0%).

β1) Τέλος, από τα 56 δείγματα ακατέργαστης σόγιας για ζωοτροφή που εξετάστηκαν βρέθηκαν 12 δείγματα (21,42%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 4,30% , 2,31% , 62,06% , 75,91%, 9,45%, 60,7%, 20,05%, 94,48%, 55,11%, 36,97%, 74,63% και 0,14%, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της έρευνας ανά είδος τροφίμου και ζωοτροφής που περιέχει σόγια παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Συχνότητα ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένης σόγιας (Roundup Ready Soya) ανά είδος εξετασθέντων τροφίμων και ζωοτροφών που περιέχουν σόγια.

Είδος δειγμάτων		Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός «Roundup Ready Soya» δειγμάτων (ποσοστό γενετικής τροποποίησης)	Ποσοστό θετικών
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΟΓΙΑΣ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΝ ΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ	Γάλα σόγιας	10	0	0%
	Κιμάς σόγιας	11	1 (0,22%)	9,1%
	Μπιφτέκι-κεφτεδάκια σόγιας	13	3 [0,19% (Μ.Α.Σ)*, 0,18% και 0,16%]	23,07%
	Σπαγγέτι-Ζυμαρικά Σόγιας	18	4 (0,31%, 0,22%, 0,19% και 0,26%) (Μ.Α.Σ)*	22,22%
	Χάπια ισοφλαβονοειδών σόγιας genistein και daidzein	10	0	0%
	Μπισκότα-Σοκολατοειδή με σόγια	13	0	0%
	Σάλτσα σόγιας	12	0	0%
	Φρέσκο γάλα-Φέτα	23	0	0%
	Αυγά εντατικής εκτροφής ωοπααραγωγών ορνίθων	11	0	0%
	Τσιπς-Σνακς	15	0	0%
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΟΓΙΑΣ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΝ ΓΙΑ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ	Ψωμί-Φρυγανιές	13	0	0%
	Σπορέλαιο-Μαργαρίνες	12	0	0%
	Γιαούρτια-Επιδόρπια	14	0	0%
	Σύνολο	231	20	8,65%
	Ακατέργαστη σόγια για ζωοτροφή	56	12 (4,30%, 2,31%, 62,06%, 75,91%, 9,45%, 60,7%, 20,05%, 94,48%, 55,11%, 36,97%, 74,63% και 0,14%)	21,42%

\*(Μ.Α.Σ): Με Αρνητική Σήμανση (Μη Τροποποιημένη Σόγια)

Αξίζει και πρέπει να τονισθεί ότι από τα 13 δείγματα μπιφτεκιών-κεφτεδακιών σόγιας που εξετάστηκαν, ενώ τα πέντε δείγματα έφεραν αρνητική σήμανση (μη τροποποιημένη σόγια), στο ένα από αυτά βρέθηκε να υπάρχει γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,19%. Επίσης, από τα 18 δείγματα σπαγγέτι-ζυμαρικών σόγιας που εξετάστηκαν, ενώ τα έξι δείγματα έφεραν αρνητική σήμανση, στα τέσσερα από αυτά βρέθηκε να υπάρχει γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,31%, 0,22%, 0,19% και 0,26%, αντίστοιχα. Μπορεί στις συγκεκριμένες περιπτώσεις τα ποσοστά της γενετικής τροποποίησης να είναι αρκετά μικρά και μέσα στα αποδεκτά όρια, δεν παύει όμως αυτή να υφίσταται και να ανιχνεύεται, έτσι ώστε να τίθεται μείζον θέμα παραπλάνησης του καταναλωτή.

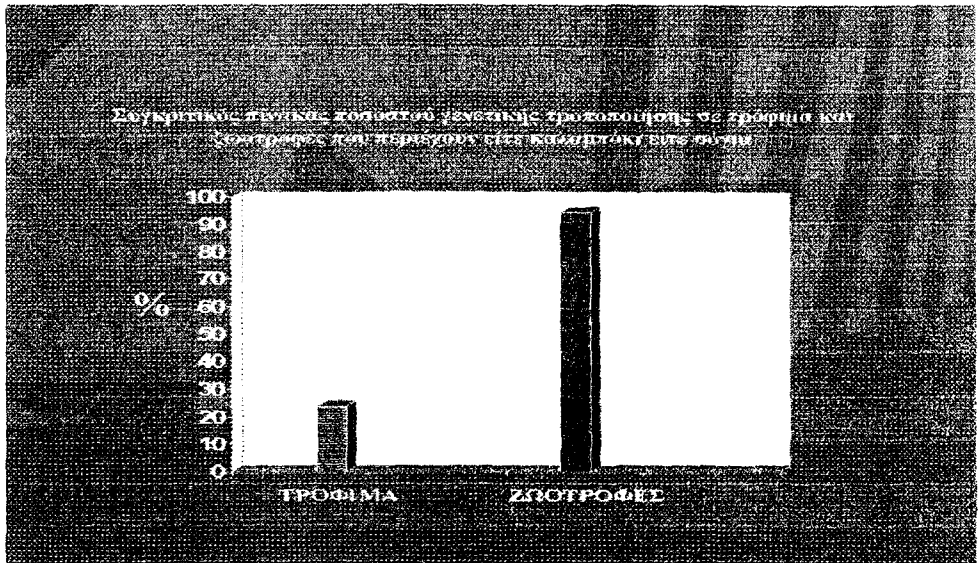
Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 6.

**Πίνακας 6. Συχνότητα ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένης σόγιας (Roundup Ready Soy) ανά είδος εξετασθέντων τροφίμων που περιέχουν σόγια και φέρουν αρνητική σήμανση (μη τροποποιημένη σόγια).**

Είδος δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων Μ.Α.Σ	Ποσοστό δειγμάτων Μ.Α.Σ	Αριθμός «Roundup Ready Soy» δειγμάτων Μ.Α.Σ	Ποσοστό «Roundup Ready Soy» δειγμάτων Μ.Α.Σ
Μπιφτέκι-κεφτεδάκια σόγιας	13	5	38,4%	1	20%
Σπαγγέτι-Ζυμαρικά Σόγιας	18	6	33,33%	4	66,66%
<b>Σύνολο</b>	<b>31</b>	<b>11</b>	<b>35,48%</b>	<b>5</b>	<b>45,45%</b>

## Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

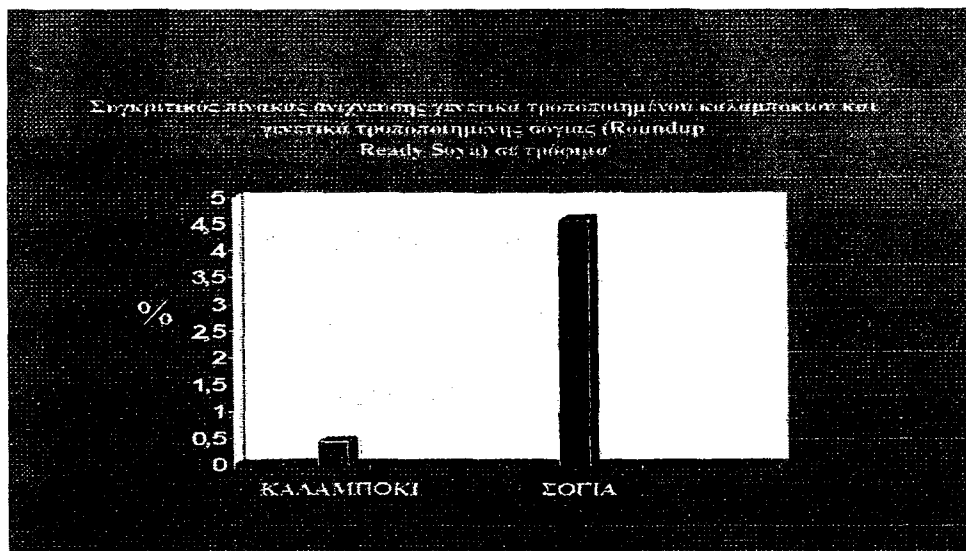
Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, η συχνότητα ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε διάφορα είδη τροφίμων που περιέχουν σόγια ή καλαμπόκι σε οποιαδήποτε μορφή, στη χώρα μας, είναι αρκετά χαμηλή. Ταυτόχρονα, και το ποσοστό στο οποίο αυτοί ανιχνεύονται μέσα στα συγκεκριμένα τρόφιμα είναι ελάχιστο. Αντίθετα, στις ζωοτροφές παρατηρείται μεγαλύτερη χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.



Συγκεκριμένα, από τα 399 δείγματα τροφίμων που εξετάστηκαν και περιείχαν είτε καλαμπόκι είτε σόγια, βρέθηκαν εννέα δείγματα να περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (ποσοστό 2,25%).

Το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένων οργανισμών εμφανίζεται στα τρόφιμα που περιέχουν σόγια, αφού βρέθηκαν οκτώ από τα 175 δείγματα (ποσοστό 4,57%) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya), ανεξαρτήτως αν το ποσοστό της γενετικής τροποποίησης στα συγκεκριμένα τρόφιμα ήταν ελάχιστο (κυμάνθηκε από 0,16% έως 0,31%). Τα

τρόφιμα αυτά αφορούσαν σε κιμά, μπιφτέκια, κεφτεδάκια, σπαγγέτι και ζυμαρικά σόγιας.



Αναλύοντας τα αποτελέσματα ανά είδος τροφίμου που περιείχε σόγια, γίνεται φανερό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης γενετικά τροποποιημένης σόγιας εμφανίζουν τα παρασκευάσματα κρέατος από σόγια (μπιφτέκια-κεφτεδάκια σόγιας), με τρία θετικά δείγματα από τα 13 που εξετάστηκαν (23,07%) και ακολουθούν πολύ κοντά τα ζυμαρικά σόγιας, με τέσσερα δείγματα θετικά από τα 18 που εξετάστηκαν (22,22%) και ο κιμάς σόγιας με ένα θετικό δείγμα στα 11 εξετασθέντα (9,1%). Είναι αξιοσημείωτο και προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι, παρόλο που ορισμένα τρόφιμα σόγιας έφεραν επισήμανση ότι περιέχουν μη γενετικά τροποποιημένη σόγια, εντούτοις ανιχνεύθηκε και σε αυτά γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya), σε πέντε από τα 11 συνολικά εξετασθέντα δείγματα που έφεραν τη συγκεκριμένη επισήμανση (ποσοστό 45,45%). Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς εμφανίζεται κρίσιμο θέμα παραπλάνησης του καταναλωτή.

Στη Βραζιλία, οι Brod και συν. (2007), αναφέρουν ότι δεν ανιχνεύθηκε Roundup Ready σόγια σε έξι δείγματα βρεφικών τροφών που ανέλυσαν με τη μέθοδο nested PCR και που περιείχαν 14% πρωτεΐνη σόγιας. Αντιθέτως, τέσσερα από τα έξι

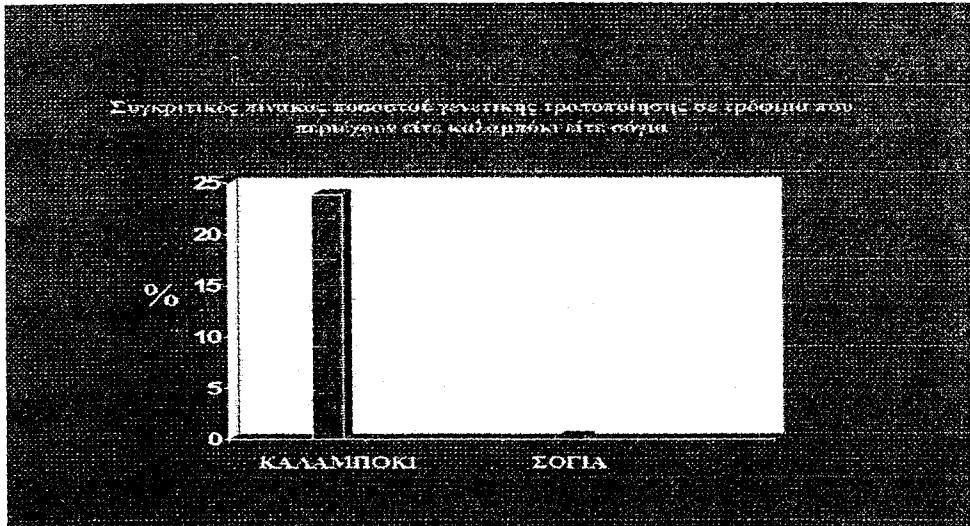
αναλυθέντα δείγματα αλεύρων σόγιας βρέθηκαν να περιέχουν Roundup Ready σόγια, όπως επίσης και σε 15 από τα 25 δείγματα σκόνης γάλακτος από σόγια, που αναλύθηκαν με την ίδια μέθοδο, ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένη σόγια. Εν τω μεταξύ οι Cardarelli και συν. (2005), ανέλυσαν 66 δείγματα τροφίμων που περιείχαν σόγια και 16 από αυτά χαρακτηρίστηκαν θετικά στην ανίχνευση γενετικά τροποποιημένης σόγιας (Roundup Ready σόγια). Τα 16 αυτά δείγματα αφορούσαν σε γάλα σόγιας (έξι δείγματα), ζυμαρικά σόγιας (ένα δείγμα), σάλτσες σόγιας (δύο δείγματα), ωμή σόγια (ένα δείγμα), αφυδατωμένες σούπες σόγιας (τέσσερα δείγματα) και τροφές σόγιας για κατοικίδια (δύο δείγματα). Ταυτόχρονα, ανέλυσαν και δείγματα για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού (Bt-176 Maize), στα οποία όμως δεν ανιχνεύθηκε γενετική τροποποίηση. Τέλος, οι Greiner και συν. (2005), ανέλυσαν δείγματα αλεύρων σόγιας, πρωτεϊνών σόγιας και βρεφικών τροφών που περιείχαν σόγια και διαπίστωσαν ότι καμιά από τις επτά βρεφικές τροφές δεν περιείχε γενετικά τροποποιημένη σόγια, καθώς την ίδια στιγμή ένα από τα τρία δείγματα πρωτεϊνών σόγιας και 13 από τα 30 δείγματα αλεύρων σόγιας βρέθηκαν θετικά στη γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready σόγια).

Στη Μαλαισία, οι Abdullah και συν. (2006), ανέλυσαν με τη μέθοδο PCR 85 δείγματα σόγιας και 18 από αυτά βρέθηκαν να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια. Από αυτά τα 18 δείγματα τα εννέα ήταν ωμή σόγια, τα οκτώ μαλακό μαλαισιανό τυρί από σόγια και το ένα δείγμα ήταν ένα παραδοσιακό μαλαισιανό φαγητό από σόγια, που ονομάζεται "tempe".

Όσον αφορά στα τρόφιμα που περιέχουν καλαμπόκι, βρέθηκε ένα μόνο δείγμα να περιέχει γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) από τα 224 συνολικώς εξετασθέντα (ποσοστό 0,44%), με σχετικά, όμως, υψηλό ποσοστό



γενετικής τροποποίησης (23,83%). Το τρόφιμο αυτό ήταν καλαμπόκι ξηρός καρπός για καβούρντισμα (pop corn).



Οι Varzakas και συν. (2007), αναφέρουν ότι ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (Ε.Φ.Ε.Τ.), ξεκίνησε το Δεκέμβριο του 2000 ένα πρόγραμμα ελέγχου και έρευνας των τροφίμων σε σχέση με την ανίχνευση και την παρουσία σ' αυτά γενετικά τροποποιημένων οργανισμών. Κατά τη διάρκεια αυτού του ελέγχου ελήφθησαν περίπου 300 δείγματα πρώτων υλών αλλά και τελικών προϊόντων από supermarkets, caterings, εστιατόρια και άλλα σημεία. Από τα 300 δείγματα τα 104 αφορούσαν δείγματα καλαμποκιού και προϊόντα από καλαμπόκι, όπως καλαμποκάλευρο, χοντραλεσμένο αλεύρι, ποπ κορν, μπισκότα από καλαμπόκι, σιμιγδάλι καλαμποκιού κ.α. Βρέθηκαν γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί από αυτά τα δείγματα καλαμποκιού, σε ποσοστό 5,7% και τα δείγματα αυτά δεν έφεραν την κατάλληλη σήμανση.

Ταυτόχρονα, ελήφθησαν δείγματα τροφίμων με σόγια (ανεπεξέργαστη σόγια, σογιάλευρα, οξινοποιημένη σόγια, πρωτεΐνες σόγιας και μπισκότα σόγιας), δείγματα τροφίμων καλαμποκιού (ανεπεξέργαστο καλαμπόκι, καλαμποκάλευρο, σιμιγδάλι καλαμποκιού), όπως επίσης και δείγματα τροφίμων που περιείχαν και καλαμπόκι και σόγια (βρεφικές τροφές, ανεπεξέργαστη πρώτη ύλη που προοριζόταν για

συμπληρώματα διατροφής και μπισκότα). Κατά την ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων διαπιστώθηκε η παρουσία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε τρόφιμα που προέρχονταν από σογιάλευρο, όπως κιμάς σόγιας, μπιφτέκια σόγιας, ζυμαρικά σόγιας και μαλακό τυρί από σόγια (tofu). Τέλος, σε δείγματα ποτών σόγιας που περιείχαν πρωτεΐνες σόγιας ανιχνεύθηκε γενετική τροποποίηση σε ποσοστό που κυμαινόταν από 7,2 έως 8,2%.

Επιπλέον αυτών των δειγμάτων βρέθηκαν επίσης:

α) Δύο διαφορετικά είδη μπισκότων να περιέχουν γενετικά τροποποιημένο σογιάλευρο.

β) Δύο διαφορετικοί τύποι πολύσπορου ψωμιού να περιέχουν γενετικά τροποποιημένους σπόρους σόγιας.

γ) Εισαγόμενες σάλτσες σόγιας που περιείχαν γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστά από 6% έως 36%.

δ) Ένα σκληρό κίτρινο τυρί βρέθηκε να περιέχει γενετικά τροποποιημένη σόγια.

ε) Τέλος, λεκιθίνη σόγιας που χρησιμοποιείται στην παρασκευή σοκολατών και μπισκότων, όπως επίσης και ως συμπληρώματα διατροφής σε χάπια βρέθηκε να είναι γενετικά τροποποιημένη.

Τα αποτελέσματα του προγράμματος ελέγχου του Ε.Φ.Ε.Τ. κατ' έτος, σύμφωνα με τους Varzakas και συν. (2007), είναι τα ακόλουθα:

α) Το έτος 2000, 194 (80%) από τα 241 δείγματα που ελέγχθηκαν, βρέθηκαν σύμφωνα με τη νομοθεσία. Τα 29 (12%) απ' αυτά βρέθηκαν να μην συμμορφώνονται με αυτή, ενώ για τα 18 (8%) απ' αυτά δεν βγήκε κανένα συμπέρασμα καθώς δεν μπορούσε να απομονωθεί DNA. Οι βρεφικές τροφές (σοκολάτες, ποπ κορν) που

ελέγχθηκαν, βρέθηκαν αρνητικές ως προς την παρουσία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.

β) Το έτος 2001, 15 (75%) από τα 20 δείγματα που ελέγχθηκαν, βρέθηκαν σύμφωνα με τη νομοθεσία και πέντε (25%) απ' αυτά βρέθηκαν μη σύμφωνα με αυτή.

γ) Το έτος 2002, 38 (95%) από τα 40 δείγματα που ελέγχθηκαν, βρέθηκαν σύμφωνα με τη νομοθεσία και δύο (5%) απ' αυτά βρέθηκαν μη σύμφωνα με αυτή. Τα μη συμμορφούμενα με τη νομοθεσία προϊόντα ήταν προϊόντα σόγιας (λεκιθίνη σόγιας και κιμάς σόγιας). Τα δείγματα λεκιθίνης σόγιας δεν συνοδεύονταν με τα απαραίτητα πιστοποιητικά που να αποδεικνύουν αν είναι γενετικά τροποποιημένα ή όχι, καθώς την ίδια στιγμή τα δείγματα κιμά σόγιας δεν συμμορφώνονταν με τους κανόνες επισήμανσης (μη σημασμένα ως γενετικά τροποποιημένα), αφού ανιχνεύθηκε σε αυτά γενετικά τροποποιημένη Roundup Ready σόγια σε ποσοστό μικρότερο του 1%. Αντ' αυτού τα τελευταία έφεραν και αρνητική επισήμανση (non-GMO), γεγονός που αποτελεί μείζον θέμα παραπλάνησης των καταναλωτών.

δ) Το έτος 2003, 25 δείγματα τροφίμων ελέγχθηκαν για την ύπαρξη γενετικά τροποποιημένων οργανισμών και βρέθηκαν όλα αρνητικά και σύμφωνα με τους κανονισμούς.

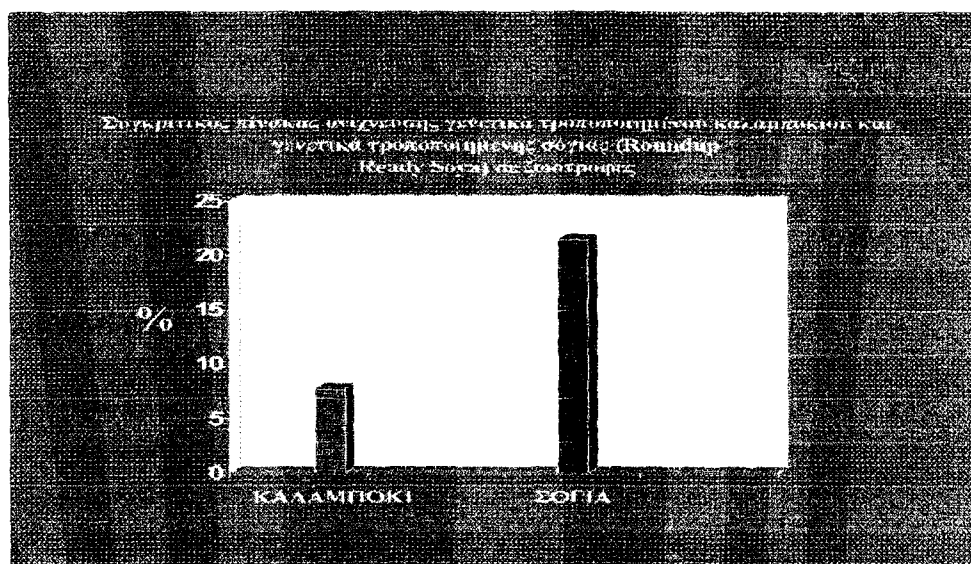
ε) Το έτος 2004, μόνο ένα δείγμα ζυμαρικού σόγιας (7%) από τα 14 δείγματα σόγιας (σογιάλευρα, ζυμαρικά σόγιας, κιμάς σόγιας) που ελέγχθηκαν, βρέθηκε μή σύμφωνο με τους κανονισμούς (μή σημασμένο ότι περιέχει γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς).

στ) Το έτος 2005 ελήφθησαν 200 δείγματα, που αφορούσαν σε δείγματα σόγιας (σογιάλευρα, σογιόσποροι, πρωτεΐνες σόγιας, κιμάς σόγιας και ζυμαρικά σόγιας) και σε δείγματα καλαμποκιού (καλαμποκάλευρα, σπόροι καλαμποκιού, κατεψυγμένα τρόφιμα με καλαμπόκι κ.τ.λ.). Τα αποτελέσματα της έρευνας των

δειγμάτων του έτους αυτού δεν αναφέρονται στη συγκεκριμένη δημοσίευση. (Varzakas και συν., 2007).

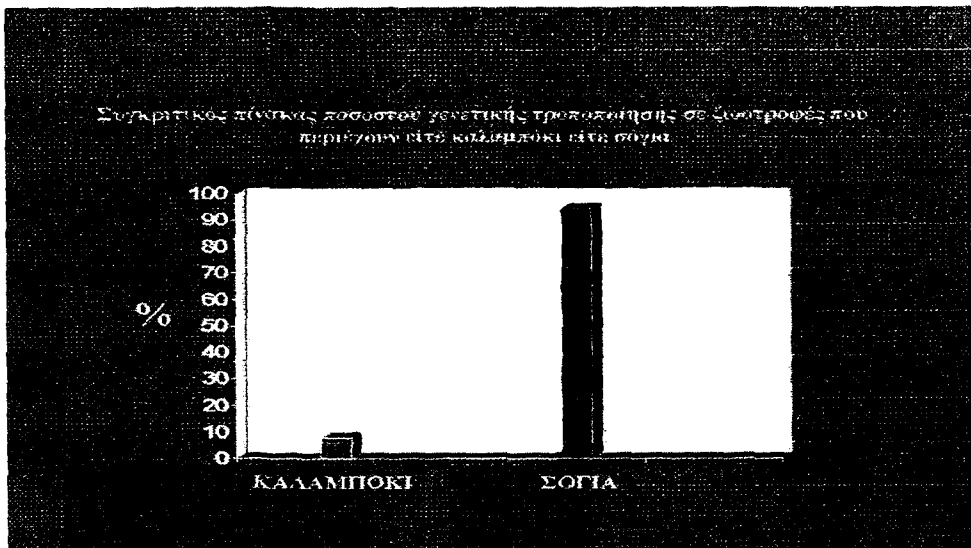
Σχετικά με την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε ζωοτροφές είτε σόγιας είτε καλαμποκιού που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, βρέθηκαν 15 από τις 95 που εξετάστηκαν να περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (ποσοστό 15,78%).

Το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσής τους εντοπίζεται και πάλι στις ζωοτροφές από σόγια, αφού βρέθηκαν 12 από τις 56 που συνολικά εξετάστηκαν (ποσοστό 21,42%), να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια (Roundup Ready Soya). Το ποσοστό της γενετικής τροποποίησης, μάλιστα, των συγκεκριμένων ζωοτροφών άγγιξε σε μια περίπτωση και το 100% (συγκεκριμένα 94,48%). Γενικά, αυτό κυμάνθηκε από πολύ χαμηλά (0,14%) έως, όπως προαναφέρθηκε, και πάρα πολύ υψηλά (94,48%) επίπεδα. Σημειώνεται ότι οι ζωοτροφές σόγιας που εξετάστηκαν, αφορούσαν στο σύνολό τους σε ακατέργαστη σόγια για ζωοτροφή.



Όσον αφορά στις ζωοτροφές από καλαμπόκι, βρέθηκαν τρεις από τις 39 εξετασθείσες να περιέχουν γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize), (ποσοστό 7,69%). Αναλύοντας τα αποτελέσματα ανά είδος ζωοτροφής καλαμποκιού,

γίνεται φανερό ότι οι τρεις αυτές ζωοτροφές αφορούσαν σε ακατέργαστο καλαμπόκι για ζωοτροφή, από τις 29 συνολικά που εξετάστηκαν (ποσοστό 10,34%). Επιπρόσθετα, το ποσοστό γενετικής τροποποίησής τους ήταν σχετικά χαμηλό (2,23%, 6,31% και 7,89%). Πλέον αυτών εξετάστηκαν και 10 καλαμποκάλευρα ζωοτροφών στα οποία όμως δεν ανιχνεύθηκε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt-176 Maize) (ποσοστό 0%).



Τέλος, αξίζει και πρέπει να τονισθεί ότι το όργανο Lightcycler μαζί με τα αντίστοιχα GMO Kits (ROCHE Diagnostics) που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την έρευνα, είναι απλά στη χρήση τους, προσδιορίζουν και δίνουν ποσοτικά αποτελέσματα ταχύτατα και το αυτοματοποιημένο όργανο είναι ικανό να επεξεργαστεί πολλά δείγματα ταυτόχρονα, διαδικασία η οποία βοηθάει στην εξοικονόμηση πολύτιμου χρόνου και υψηλής αξίας υλικών και αντιδραστηρίων.

## Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Η

Με τον όρο γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα και ζωοτροφές φυτικής προέλευσης εννοούμε τρόφιμα και ζωοτροφές των οποίων το γενετικό υλικό (DNA) έχει υποστεί τροποποίηση ύστερα από εισαγωγή μέσα σε αυτό γενετικού υλικού που προέρχεται από άλλους οργανισμούς, μικρο- και μεγαλο-οργανισμούς (GMMO's ή GMO's). Αυτή η τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή ορισμένων ιδιοτήτων και φυσικών χαρακτηριστικών των φυτών από τα οποία προέρχονται τα τρόφιμα και οι ζωοτροφές, έτσι ώστε αυτά να καθίστανται π.χ ανθεκτικά στους ψεκασμούς από ζιζανιοκτόνα και σε ακραίες καιρικές συνθήκες, γεγονός που συντελεί στη μείωση της ζημίας και των εργατικών κοστών, στην αύξηση της παραγωγής σε μικρότερο χρονικό διάστημα και γενικότερα στα υψηλότερα οικονομικά οφέλη. Πιο αναλυτικά στη συγκεκριμένη έρευνα μελετάται η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού, που έχει υποστεί γενετική τροποποίηση με το μικροοργανισμό *Bacillus thuringiensis* 176 (Bt-176 Maize), και γενετικά τροποποιημένης σόγιας, η οποία είναι ανθεκτική στο ζιζανιοκτόνο Roundup (Roundup Ready Soya).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

α) η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της παρουσίας γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's) σε ακατέργαστα ή επεξεργασμένα τρόφιμα που περιέχουν καλαμπόκι,

β) η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της παρουσίας γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's) σε ακατέργαστα ή επεξεργασμένα τρόφιμα που περιέχουν σόγια,

γ) η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της παρουσίας γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's) σε ζωοτροφές που περιέχουν καλαμπόκι,

δ) η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της παρουσίας γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMO's) σε ζωοτροφές που περιέχουν σόγια.

Για τη μελέτη αυτή εξετάστηκαν συνολικά 494 δείγματα από ακατέργαστα και επεξεργασμένα τρόφιμα και ζωοτροφές, που περιείχαν καλαμπόκι (263 δείγματα) και σόγια (231 δείγματα). Τα δείγματα καλαμποκιού ήταν νιφάδες καλαμποκιού, βρεφικές κρέμες, τροφές και μπισκότα, ακατέργαστο καλαμπόκι, καλαμπόκι ξηρός καρπός για καβούρντισμα, γλυκό καλαμπόκι, καλαμποκάλευρο για κρέμες και σάλτσες, καλαμποκάλευρο μπακαλικής χύμα, φρέσκο γάλα-φέτα, αυγά εντατικής εκτροφής ωοπαραγωγών ορνίθων, καλαμποκάλευρα ζωοτροφών, τσιπς - σνακς, ψωμί - φρυγανιές, γιαούρτια - επιδόρπια. Τα δείγματα σόγιας ήταν ακατέργαστη σόγια για ζωοτροφή, γάλα σόγιας, κιμάς σόγιας, μπιφτέκια-κεφτεδάκια σόγιας, σπαγγέτι-ζυμαρικά σόγιας, χάπια ισοφλαβονοειδών σόγιας (genistein-daidzein), μπισκότα - σοκολατοειδή με σόγια, σάλτσα σόγιας, φρέσκο γάλα-φέτα, αυγά, τσιπς - σνακς, ψωμί - φρυγανιές, σπορέλαια - μαργαρίνες και γιαούρτια - επιδόρπια.

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των GMO's στα δείγματα που εξετάστηκαν έγινε με Real Time PCR χρησιμοποιώντας το Lightcycler της εταιρείας ROCHE. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των GMO's στη σόγια και στο καλαμπόκι ήταν αντίστοιχα το GMO Soya Quantification Kit (ROCHE-Diagnostics) για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό της Roundup Ready Soya και το GMO Maize Quantification Kit (ROCHE-Diagnostics) για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό του γενετικά τροποποιημένου καλαμποκιού Bt-176.

Από τα 263 δείγματα καλαμποκιού σε ανεπεξέργαστη ή επεξεργασμένη μορφή, βρέθηκαν να περιέχουν καλαμπόκι Bt-176, τρία δείγματα ζωοτροφών σε ποσοστό 2,23%, 6,31% και 7,89% αντίστοιχα και ένα μόνο δείγμα για ανθρώπινη κατανάλωση (καλαμπόκι ξηρός καρπός για καβούρντισμα) σε ποσοστό 23,83%. Από τα 231 δείγματα σόγιας σε ανεπεξέργαστη ή επεξεργασμένη μορφή, βρέθηκαν 12 δείγματα ζωοτροφών να περιέχουν GMO σόγια σε ποσοστό 4,30%, 2,31%, 62,06%, 75,91%, 9,45%, 60,7%, 20,05%, 94,48%, 55,11%, 36,97%, 74,63% και 0,14% αντίστοιχα, ενώ από τα δείγματα για ανθρώπινη κατανάλωση, βρέθηκε ένα δείγμα (κιμάς σόγιας) να περιέχει γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,22%, τρία δείγματα (μπιφτέκι – κεφτεδάκια σόγιας) να περιέχουν γενετικά τροποποιημένη σόγια σε ποσοστό 0,19% (Μ.Α.Σ)\*, 0,18% και 0,16% αντίστοιχα και τέσσερα δείγματα (σπαγγέτι-ζυμαρικά σόγιας) να περιέχουν GMO σόγια σε ποσοστό 0,31% (Μ.Α.Σ)\*, 0,22% (Μ.Α.Σ)\*, 0,19% (Μ.Α.Σ) και 0,26% (Μ.Α.Σ) αντίστοιχα. Επισημαίνεται ότι το κατώτερο όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης μεθόδου είναι 0,1%.

Από τα αποτελέσματα συνάγεται ότι τόσο ο εξοπλισμός (Lightcycler), όσο και τα GMO Kits (ROCHE Diagnostics) που χρησιμοποιήθηκαν για αυτήν την έρευνα, είναι πολύ απλά στη χρήση τους, δίνουν ποσοτικά αποτελέσματα και επεξεργάζονται ταχύτατα πολλά δείγματα ταυτόχρονα.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται επίσης ότι στα τρόφιμα ανθρώπινης κατανάλωσης που περιέχουν σόγια ή καλαμπόκι σε οποιαδήποτε μορφή, το ποσοστό ανίχνευσης τροποποιημένων οργανισμών είναι ελάχιστο, αφού σύμφωνα με τις πρόσφατες οδηγίες και κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Κοινότητας καθορίζεται και διευκρινίζεται ότι όλα τα τρόφιμα που προορίζονται και είναι κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση δεν πρέπει να περιέχουν πάνω από 0,9%



γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Αντίθετα στις ζωοτροφές παρατηρείται μεγαλύτερη χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.

**\*(Μ.Α.Σ): Με Αρνητική Σήμανση (Μη Τροποποιημένη Σόγια)**

**DETECTION AND QUANTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED  
ORGANISMS (GMO's) IN FOODS AND FEEDSTUFFS CONTAINING  
MAIZE AND SOYA**

**Ph.D. THESIS**

**By**

**DIONYSIOS PAN. BASEAS**

**MILITARY VETERINARIAN**

**S U M M A R Y**

As genetically modified food and feedstuffs of plant origin, we mean food and feedstuffs with modified genetic material by insertion of genetic material from other organisms, micro- or mega- organisms (GMMO's or GMO's). This modification effects on plant characteristics in a way that they become resistant in weed killer spraying and in extreme weather conditions, in subsequence with reduction of damage and labor costs and increment of leverage and benefits. Specifically, in the present study is considered the detection and the quantification of genetically modified maize with the microorganism *Bacillus thuringiensis* 176 (Bt-176 Maize), and the detection and quantification of genetically modified soya resistant in weed killer Roundup (Roundup Ready Soya).

The aim of the present study was:

a) the detection and quantification of genetically modified organisms (GMO's) in raw or processed foods containing maize,

b) the detection and quantification of genetically modified organisms (GMO's) in raw or processed foods containing soya,

c) the detection and quantification of genetically modified organisms (GMO's) in feedstuffs containing maize,

d) the detection and quantification of genetically modified organisms (GMO's) in feedstuffs containing soya,

A total number of 494 samples of various raw and/or processed foods, containing either maize (263 samples) or soya (231 samples) were examined for this study. The maize samples were: corn flakes, baby foods, biscuits, raw corn, popcorn, canned sweet corn, corn flour for cooking, corn flour for grocery, fresh milk, eggs from an intensive breeding poultry farm, cornmeal feedstuffs, chips – snacks, bread – rusks and yogurts – desserts. The soya samples were: soya milk, minced soya, soya kebabs, isoflavones pills containing soya genistein and daidzein, biscuits - chocolates containing soya, soya sauce, fresh milk, raw soya used as animal feed, eggs from an intensive breeding poultry farm, soya spaghetti, chips – snacks, bread – rusks, seed oils – oleomargarines and yogurts – desserts.

The detection and quantification of GMOs in the collected samples was performed applying a Real Time PCR method using the Roche LightCycler instrument and accessories. For the detection of GMO soya and maize the LightCycler GMO Soya Quantification Kit (quantitative detection of Roundup Ready Soya) and the LightCycler GMO Maize Quantification Kit (quantitative detection of Bt-176 Maize) were used respectively (ROCHE Diagnostics).

From a total number of 263 tested food and feedstuff samples containing maize, three samples of cornmeal feedstuffs were found to contain GMO maize in percentage of 2,23%, 6,31% and 7,89% correspondingly and only one sample for

human consumption (popcorn) in percentage of 23,83%. Twenty out of the 231 tested food and feedstuff samples containing soya were found to contain GMO's. Twelve positive samples were all raw soya used as animal feedstuff and the GMO's content detected was 4,30%, 2,31%, 62,06%, 75,91%, 9,45%, 60,7%, 20,05%, 94,48%, 55,11%, 36,97%, 74,63% and 0,14%, correspondingly. Eight of the samples for human consumption (one minced soya, three soya kebabs and four soya spaghetti) were found positive in GMO's content in percentage of 0,22%, 0,19% (W.N.S), 0,18%, 0,16%, 0,31% (W.N.S), 0,22% (W.N.S), 0,19% (W.N.S), and 0,26% (W.N.S), correspondingly. It should be pointed that the detection limit of the employed method is 0,1%.

In addition, it should be pointed that the LightCycler Instrument and the LightCycler GMO kits used for this study are simple to use, they give quantitative results rapidly and the automated instrument is able to process many samples simultaneously.

The results indicate that the food samples examined are considered safe in accordance with the recent EC directives and regulations, defining that all foods appropriate for human consumption should contain no more than 0,9% GMO's. Unfavourably, in feedstuffs there is a wide range of GMO's use.

**\*(W.N.S) : With Negative Stamping (Non Modified Soya)**

## ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbot A. (1996). European debate on biotechnology highlights policy differences. *Nature* 379: 197.
2. Abdullah T., Radu S., Hassan Z., Hashim J.K. (2006). Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method. *Food Chemistry* 98: 575–579.
3. Aerni P. (2005). Stakeholder attitudes towards the risks and benefits of genetically modified crops in South Africa. *Environmental Science & Policy* 8 464-476.
4. Ahmed F. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology* 20(5): 215-223.
5. Alary R., Serin A., Maury D., Jouira H., Sirven J.P., Gautier M.F, Joudrier P. (2002). Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. *Food Control* 13: 235–244.
6. Amarger N. (2002). Genetically modified bacteria in agriculture. *Biochimie* 84: 1061–1072.
7. Andersen C., Jensen A., Berdal K., Thorstensen T., Tengs T. (2006). Equal Performance of TaqMan, MGB, Molecular Beacon, and SYBR Green-Based Detection Assays in Detection and Quantification of Roundup Ready Soybean. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9658-9663.
8. Anonymous (1999). Background on Monarch Butterflies and Bt crops.
9. APHIS (1998).
10. Arakawa T., Yu J., Chong DKX., Hough J., Engen PC., Langridge WHR. (1998). Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnology* 16: 292.
11. Aslaksen I., Myhr A. (2007). “The worth of a wildflower”: Precautionary

- perspectives on the environmental risk of GMO's. *Ecological Economics* 60: 489-497.
12. Baeumler S., Wulff D., Tagliani L., Song P. (2006). A Real-Time Quantitative PCR Detection Method Specific to Widestrike Transgenic Cotton (Event 281-24 236/3006-210-23). *J. Agric. Food Chem.* 54: 6527-6534.
  13. Barany F. (1991). Genetic disease detection and DNA amplification using cloned therostable ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-193.
  14. Beard J.L., Burton J.W., Theil E.C. (1996). Purified ferritin and soybean meal can be sources of treating iron deficiency in rats. *J. Nutrition* 126: 154-160.
  15. Bej A.K., McCarthy S.C., Atlas R.M. (1991). Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrates and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2429-2432.
  16. Belzile F. (2002). Transgenic, transplastomic and other genetically modified plants: a Canadian perspective. *Biochimie* 84: 1111-1118.
  17. Berdal K.G., Holst-Jensen A. (2001). Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *European Food Res. Technology*, 213(6): 432-438.
  18. Bertoni G., Marsan P.A. (2005). Safety Risks for Animals Fed Genetic Modified (GM) Plants. *Veterinary Research Communications*, 29 (Suppl. 2): 13-18.
  19. Bessenen M.T., Luo Q., Rotbart H.A., Blaser M.J., Ellison R.T., (1990). Detection of *Listeria monocytogenes* by using the Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2930-2932.
  20. Beumer R.R., Hazeleger W.C. (2002). *Listeria monocytogenes*: diagnostic

- problems. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 1466:1-7.
21. Bonfini L., Heinze P., Kay S., Van den Eede G. (2002). Review of GMO detection and quantification techniques. European Commission Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods, Unit I-21020 Ispra (VA), 1-67.
  22. Brod F., Ferrari C., Valente L., Arisi A. (2007). Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. *LWT* 40: 748–751.
  23. Brunnert H.J., Spener F., Borchers T. (2001). PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. *European Food Res. Technology*, 213: 366-371.
  24. Burden D.W., Whitney D.B. (1995). *Biotechnology, Proteins to PCR*, Birkhausen editions.
  25. Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol*, 25: 169-193.
  26. Butler D. (1997). Chair of GMO panel resigns over maize battle. *Nature* 385:667.
  27. Butler D., Reichhardt T., Abbot A., Dickson D., Saegusa A. (1999). Long terms effects of GM crops serves up food for thought. *Nature* 398: 651-656.
  28. Cankar K., Štebih D., Dreo T., Žel J., Gruden K. (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 2006, 6:37.
  29. Cardarelli P., Branquinho M.R., Ferreira R.T.B., P. da Cruz F., Gemal A. (2005). *Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience*. *Food Control* 16: 859–866.

30. Casse-Delbart F. (1996). La transgenese vegetale, Les plantes transgeniques en agriculture.
31. Chen H., Wu YH., Song DY., Zhang W., Dong XY., Li PW., Lu CM. (2007). On-line pre-concentration and UV determination of DNA fragments by dynamic coating capillary electrophoresis and its application to detection of genetically modified oilseed rape based on PCR. *Microchemical Journal* 86: 17-22.
32. Chesley M. (1998). The impact of biotechnology on transatlantic trade. (speech).
33. Churchill R.L., Lee H., Hall J.C. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J. Microbiol. Methods* 64: 141-170.
34. Conner A., Jacobs J. (1999). Genetic engineering of crops as potential source of genetic hazard in the human diet. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1-2): 223-234.
35. D'Agno G. (2005). GMO: Human Health Risk Assessment. *Veterinary Research Communications*, 29(Suppl. 2): 7-11
36. Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S. (1998). Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology* 16: 345-349.
37. Danson J., Kimani M., Mbogori M. (2006). Detection of *Bacillus thuringiensis* genes in transgenic maize by the PCR method and FTA paper technology. *African Journal of Biotechnology* 5 (22): 2345-2349.
38. Day PR. (1996a). Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success, *Clinical Nutrition* 63:651S-656S.
39. Day PR. (1996b). Genetic modifications of proteins in food. *Critical Review Food Science Nutrition* 36: S49-S67.



40. deMaagd R., Bosch D., Stiekema W. (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 4: 9-13.
41. Diehl J. (1998). Genetically engineered vegetable oils. *Cereal Foods World* 43: 17-19.
42. Duan X., Li X., Xue Q., Abo-El-Saad M., Xu D., Wu R. (1996). Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology* 14: 494-498.
43. Duijn G., Biert P., Bleeker-Marcelis H., Peppelman H., Hessing M. (1999). Detection methods for genetically modified crops. *Food Control* 10: 375-378.
44. Editorial (1998). Label this science science-free. *Nature Biotechnology* 16: 1.
45. Engel K.H., Moreano F., Ehlert A., Busch U. (2006). Quantification of DNA from genetically modified organisms in composite and processed foods. *Trends in Food Science and Technology* 17: 490-497.
46. Estruch J., Warren G., Mullins M., Nye G., Graig J., Koziel M. (1996). A novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *National Academic Science USA* 93: 5389-5394.
47. European Commission (2000a). Economic impacts of Genetically Modified Crops on the Agri-Food sector, chapter 1: Areas shown to GM crops in the world.
48. European Commission (2000c). Economic impacts of Genetically Modified Crops on the Agri-Food sector, chapter 3: farmers: strong profitability expectations, mixed outcome.
49. EU Food Law, April 1997, Number 64, pages 2-5, 15.
50. EU Food Law, February 1997, Number 62, pages 28-29.
51. EU Food Law, July 1997, Number 67, pages 2-6, 18.

52. EU Food Law, June 1997, Number 66, pages 2-7.
53. EU Food Law, March 1997, Number 63, pages 12-15.
54. Feriotto G., Gardenghi S., Bianchi N., Gambari R. (2003). Quantitation of Bt-176 maize genomic sequences by surface plasmon resonance-based biospecific interaction analysis of multiplex polymerase chain reaction (PCR). *J. Agric. Food Chem.* 51: 4640-4646.
55. Fitter S., Heuzenroeder M., Thomas C.J. (1992). A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes* J. *Appl. Bacteriol.* 73: 53-59.
56. Forte V.T., Di Pinto A., Martino C., Tantillo G.M., Grasso G., Schena F.P. (2005). A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize. *Food Control* 16: 535-539.
57. Fox J. (1998a). Maize faces new hurdle in EU. *Nature Biotechnology* 16: 7.
58. Freifelder D. (1987). *Microbial genetics*, Jones and Bartlett Publishers.
59. Gaceht e., Martin GG., Vigneau F., Meyer G. (1999). Detection of genetically modified organisms (GMO's) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science and Technology* 9:380-388.
60. Germini A., Zanetti A., Salati C., Rossi S., Forrea C., Schmid S., Marchelli R. (2004). Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3275-3280.
61. Golsteyn-Thomas E.J., King R.K., Burchak J., Gannon V.P.J. (1991). Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2576-2580.
62. Gotham Elaine (2000). *Agricultural Biotechnology (Questions and Answers)*

Cornell University.

63. Goto F., Yoshihara T., Shigemoto N., Toki S., Takaiwa F. (1999). Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* 17: 282-286.
64. Greiner R., Konietzny U., Villavicencio A. L. C. H. (2005). Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control* 16, 753-759.
65. Herbers K., Sonnewald U. (1999). Production of new modified proteins in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 163-168.
66. Hernandez M., Rodriguez-Lazaro D., Esteve T., Prat S., Pla M. (2003). Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry* 323: 164-170.
67. Hernandez M., Duplan M., Berthier M., Tilingom M., Hauser W., Freyer R., Pla M., Bertheau Y. (2004). Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4632-4637.
68. Herrera-Estrella L., Deblock M., Messens E., Hernalsteens JP., Van Montagu M., Schell J. (1983). Chimeric genes at dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J* 2: 987-995.
69. Hill W.E., Keasler S.P., Truckess M.W., Feng P., Kaysner C.A., Lamper K.A. (1991). Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 707-711.
70. Hill W.E. (1996). The polymerase chain reaction: Applications for the detection of foodborne pathogens. *C.R.C. Rev. Food Sci. Nutri.* 36: 123-173.

71. Hirschberg J. (1999). Production of high value compounds: carotenoids and vitamin E. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 186-191.
72. Ho MW., Traavik T., Olsvik O., Tappeser B., Vyvyan C. vWeizacker C., McGavin C. (1998). Gene technology and gene ecology of infectious diseases. *Microbial Ecology in Health and Disease* 10: 33-59.
73. Ho MW., Ryan A., Cummins J. (1999). Cauliflower mosaic viral promoter A recipe for disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease* 11(4).
74. Hodgson J. (1999). Monarch Bt-corn paper questioned. *Nature Biotechnology* 17: 627.
75. Holmberg N., Bulow L. (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science* 3: 61-66.
76. Holst-Jensen A., Rønning S.B., Løvseth A., Berdal K. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal. Chem.* 375 : 985–993.
77. Hong E., Doumith M., Duperrier S., Giovannacci I., Morvan A., Glaser P., Buchrieser C., Jacquet C., Martin P. (2006). Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001. *Int. J. Food Microbiol.* 114(2): 187-194.
78. Huang F., Buschman LL., Higgins RA., McGaughey WH. (1999). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in the European corn borer. *Science* 284:965-967.
79. Jung C., Cai D., Kleine M. (1998). Engineering nematode resistance in crop species. *Trends in plant science* 3: 266-271.
80. Kaiser J. (1996). Pests overwhelm Bt cotton. *Science* 273: 423.

81. Kappeli O., Auberson L. (1998). How safe is safe enough in plant genetic engineering? *Trends in Plant Science* 3(7): 276-281.
82. Kim C., Graves L.M., Swaminathan B., Mayer L.W., Weaver R.E. (1991). Evaluation of hybridization characteristics of a cloned pRF 106 probe for *Listeria monocytogenes* detection and development of a nonisotopic colony hybridization assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 289-294.
83. Klingler T. (1998). Biosafety assessment of genetically engineered organisms in the environment. *Trends in Ecology and Evolution* 13(1): 5-6.
84. Ku M. (2000). Metabolically modified rice exhibits superior photosynthesis and yield.
85. Kuiper H.A. (1999). Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control* 10: 339-349.
86. Lie Y.S., Petropoulos C.J. (1998). Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current Opinion Biotechnology* 9: 43-48.
87. Losey J., Rayer L., Carter M. (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399: 214.
88. Luthy J. (1999). Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control* 10, 359-361.
89. Macilwain C. (1996). Bollworms chew hole in gene engineered cotton. *Nature* 382: 289.
90. Maliyakal E.J., (1997). Cotton crop improvement through genetic engineering. *Critical Reviews in Biotechnology* 17:185.
91. Mannelli I., Minunni M., Tombelli S., Mascini M. (2003). Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms

- detection. *Biosens. Bioelectron.* 18: 129-140.
92. Margarit E., Reggiardo M., Vallejos R., Permingeat H. (2006). Detection of BT transgenic maize in foodstuffs. *Food Research International* 39: 250–255.
93. Mariotti E., Minunni M., Mascini M. (2002). Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection. *Anal. Chim. Acta* 453: 165-172.
94. Massood E. (1998). Crop trials speed up as eco-warriors strike. *Nature*.
95. Meyer R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10: 391-399.
96. Mikesell L. (1999). Bio food and Ag press release. Academic researchers and industry agree on Bt crop impact on monarch butterflies overblown.
97. Mikkelsen T., Andersen B., Jorgensen R. (1996). The risk of crop transgene spread. *Nature* 380:31.
98. Miraglia M., Berdal K.G., Brera C., Corbisier P., Holst-Jensen A., Kok E.J., Marvin H.J.P., Schimmel H., Rentsch J., van Rie J.P.P.F., Zagon J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1157–1180.
99. Mitsch F.J., Mitchell J.S. (1999). AgBiotech: Thanks, but no thanks?
100. Mitten D.H., MacDonald R., Klonus D. (1999). Regulations of foods derived from genetically engineered crops. *Current opinion in Biotechnology* 10: 298-302.
101. Mol J., Cornish E., Mason J., Koes R. (1999). Novel coloured flowers. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 198-201.
102. Moriuchi R., Monma K., Sagi N., Uno N., Kamata K. (2007). Applicability of quantitative PCR to soy processed foods containing Roundup Ready Soy. *Food Control* 18, 191–195.

103. Mullis KB., Faloona S., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
104. Mullis KB., Faloona S. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-350.
105. Munkvold G., Desjardins A. (1997). Fumonisin in maize. Plant diseases 81: 556-565.
106. Munkvold G., Hellmich R., Rice L. (1999). Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. Plant Diseases 83: 130-138.
107. Murphy D. (1999). Production of novel oils in plants. Current Opinion in Biotechnology 10: 175-180.
108. Nogva H.K., Rudi K., Naterstad K., Holck A., Lillehaug D. (2000). Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and unpasteurized whole milk. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4266-4271.
109. Okrend A.J.G., Rose B.A., Latuada C.P. (1992). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads. J. Food Prot. 55: 214-217.
110. Papparini A. and Romano-Spica V. (2004). Public health issues related with the consumption of food obtained from genetically modified organisms. Biotechnology annual review, 10: 1387-2656.
111. Peano C., Bordoni R., Gulli M., Mezzelani A., Samson M.C., De Bellis G., Marmiroli N. (2005). Multiplex polymerase chain reaction and ligation detection reaction/universal array technology for the traceability of genetically modified

- organisms in foods. *Analytical Biochemistry* 346: 90–100.
112. Rasmussen Ra (2000) Quantification on the Lightcycler. *Methods and Applications for Rapid Cycle Real-Time PCR* , 1:1-14.
113. Rice M. (1999). Monarchs and Bt-corn: questions and answers. *Integrated Crop Management*.
114. Roche Applied Science (2000), *Lightcycler System, Second Edition*.
115. Roche Molecular Biochemicals (Version 3.5, 2000), *Lightcycler Software Short Guide*.
116. Roche Molecular Biochemicals – Diagnostics, *High Pure GMO Sample Preparation kit for isolation of DNA from raw material and food products of plant origin for PCR analysis, Instruction Manual, Version 3, 2004*.
117. Roche Molecular Biochemicals – Diagnostics, *Lightcycler GMO Maize Quantification kit for the quantitative detection of genetically modified Bt-176 Maize, Instruction Manual, Version 1, 2002*.
118. Roche Molecular Biochemicals – Diagnostics , *Lightcycler GMO Soya Quantification kit for the quantitative detection of genetically modified Roundup Ready Soya, Instruction Manual, Version 1, 2002*.
119. Saiki RK., Scharf S., Faloona F., Mullis KB., Horn GT., Erlich HA., Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
120. Saiki RK., Gelfand DH., Stoffel S., Scharf SJ., Higuchi R., Horn GT., Mullis KB., Erlich HA. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
121. Schweitzer B., Kingsmore S. (2001). Combining nucleic acid amplification and detection. *Current Opinion Biotechnology*, 12: 21-27.



122. Segreev N., Distler M., Courtney S., Al-Khalidi S.F., Volokhov D., Chizhikov V., Rasooly A. (2004). Multipathogen oligonucleotide microarray for Environmental and biodefense applications. *Biosense Bioelectron.* 20: 684-698.
123. Shelton A., Zhao J. (2000). Insect resistance and the future of Bt transgenic plants, *Information systems for Biotechnology news report.*
124. Smith N. (2000). *Seeds of Opportunity: An assessment of the benefits, safety and oversight of plant genomics and agricultural biotechnology*, printed for the use of the Committee on Science.
125. Sommer A. (1997). Vitamin A deficiency, child health and survival. *Nutrition* 13: 484-485.
126. Staub JM., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz J., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlitter M., Carroll A., Spatola L., Ward D., Ye G., Russell D. (2000). High yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology* 18 (3): 333-338.
127. Stephenson J., Warner A. (1996). Release of genetically modified microorganisms in the environment. *Technical Biotechnology* 65: 5-14.
128. Stix G. (1995). A recombinant feast: new bioengineered crops move towards market. *Scientific American*, March 1995: 20-21.
129. Stryer L., (1995). Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
130. Sykes P.J., Neoh. S.J., Brisco M.J., Hughs E., Condon J., Morley A.A. (1992). Quantification of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 13: 444-445.
131. Tabe L., Higgins T. (1998). Engineering plant protein for improved nutrition. *Trends in Plant Science* 3: 282-286.
132. Tangley L. (2000). Engineering the harvest.

133. The Lancet (1999). Health Risks of Genetically Modified Foods, 353: 9167.
134. Thomson J. (2000). Report on GMO's at World Economic Forum. Information Systems for Biotechnology News Report.
135. Tomblin G., Bellizzi D., Sgaramella V. (1996). Heterogeneity of primer extension products in asymmetric PCR is due both to cleavage by a structure-specific exo/endonuclease activity of DNA polymerases and to premature stops. PNAS, 93: 2724-2728.
136. Uyttendaele M., Schukkink R., Gemen B., Debevere J. (1995). Development of NASBA, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and a codified FDA method. Int. J. Food Microbiol. 27: 77-89.
137. Varzakas T., Chrysoschoidis G., Argyropoulos D. (2007). Approaches in the risk assessment of genetically modified foods by the Hellenic Food Safety Authority. Food and Chemical Toxicology 45: 530-542.
138. Vasil IK. (1998). Biotechnology and food security for the 21<sup>st</sup> century: a real world perspective. Nature Biotechnology 16(5):399.
139. Wadman M. (1996). Genetic resistance spreads to consumers. Nature 383: 564.
140. Wadman M. (1997a). US farmers warm to bioengineered crops. Nature 387: 221.
141. Wadman M. (1997b). Dispute over insect resistance to crops. Nature 388: 817.
142. Wiedmann M., Czajka J., Barany F., Batt C.A. (1992). Discrimination of *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species by ligase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3443-3447.
143. Wiedmann M., Czajka J., Barany F., Batt C.A. (1993). Detection of *Listeria monocytogenes* using a nonisotopic polymerase chain reaction (PCR)- coupled ligase chain reaction (LCR) assay. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2743-2745.

144. Xu J., Miao H., Wu H., Huang W., Tang R., Qiu M., Wen J., Zhu S., Li Y. (2006). Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 71–77.
145. Yang L., Pan A., Zhang H., Guo J., Yin C., Zhang D. (2006). Event-Specific Qualitative and Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis for Genetically Modified Canola T45. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9735-9740.
146. Zambrynski P., Joss H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2: 2143-2150.
147. Zhang M., Gao X., Yu Y., Ao J., Qin J., Yao Y., Li Q. (2007). Detection of Roundup Ready soy in highly processed products by triplex nested PCR. *Food Control* 18: 1277–1281.

**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Γλυνού Κ. (2003). Σύνθεση και αναλυτικές εφαρμογές προϊόντων σύζευξης της φωτοπρωτεΐνης ακουορίνης με ολιγονουκλεοτίδια. Ανάλυση γενετικά τροποποιημένων τροφίμων. (Διδακτορική διατριβή).
2. Ευρωβαρόμετρο (1997, 2000): European Commission, Eurobarometer 46.1, Luxemburg: Directorate-General Research.
3. Καπούλας Β.Μ., Δημόπουλος Κ.Α. (1990). Σημειώσεις Βιοτεχνολογίας και Γενετικής Μηχανικής. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
4. Μπατρίνου Α. (2001). Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα. Παρόν και Μέλλον.
5. Παπαδοπούλου Χ. (2006). Μικροβιολογία και Υγιεινή Τροφίμων. Σελ. 151-155.
6. Σακελλάρης Γ. (1998). Ευρωβαρόμετρο 1997: Η θέση των Ευρωπαίων απέναντι στη Βιοτεχνολογία: « Η άλλη πλευρά της Βιοτεχνολογίας ».
7. Σαλαμούρα Α. (2007). Συγκριτική μελέτη των ISO καλλιεργητικών μεθόδων και των μοριακών μεθόδων PCR και RT-PCR στην ανίχνευση *Listeria monocytogenes* από τρόφιμα. (Διδακτορική διατριβή).
8. Σκαράκης Γ. (2007). Ημερίδα: “ Μεταλλαγμένα ” και ποιότητα τροφίμων, ποιοτική γεωργία. Θεσσαλονίκη, Μάρτιος 2007.
9. Τσαυτάρης Α. (1998). Βιοτεχνολογία: Επιτεύγματα-Προοπτικές-Προβληματισμοί.
10. Χαραλαμπίδης Ν. (1999). Απελευθέρωση γενετικά μεταλλαγμένων οργανισμών στο περιβάλλον: ένα πείραμα σε πλανητική κλίμακα με απρόβλεπτες και ανεξέλεγκτες συνέπειες. The medical Magazine, τεύχος 3, Μάρτιος 1999: 40-45.

**ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΙ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ Ε.Ε**

1. Οδηγία 90/220/ΕΟΚ με ισχύ από τον Οκτώβριο 2002.
2. Οδηγία 2001/18/ΕΚ με ισχύ από τον Οκτώβριο 2002.
3. Κανονισμός (ΕΚ) 258/97 για καινοφανή τρόφιμα και συστατικά τροφίμων.
4. Κανονισμός (ΕΚ) 1139/98 (Άρθρα 12-24), που αφορά στη διευκρίνιση και στη σήμανση ειδικών (καλαμποκιού και σόγιας) ζωοτροφών που παράγονται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.
5. Κανονισμός (ΕΚ) 49/2000.
6. Κανονισμός (ΕΚ) 50/2000 για τη σήμανση ζωοτροφών και συστατικών τροφίμων που περιέχουν προσθετικά και αρωματικές ουσίες.
7. Κανονισμός (ΕΚ) 1829/2003 για τα γενετικώς τροποποιημένα τρόφιμα και ζωοτροφές.
8. Κανονισμός (ΕΚ) 1830/2003 σχετικά με την ιχνηλασιμότητα και την επισήμανση γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών και την ιχνηλασιμότητα τροφίμων και ζωοτροφών που παράγονται από γενετικώς τροποποιημένους οργανισμούς, και για την τροποποίηση της οδηγίας 2001/18/ΕΚ.