



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

---

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών σε ζωτροφές με τη  
μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης**

**Μαρίνα Ξύγκη**

**A.M. 17077**

**ΕΠΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**ΑΘΗΝΑ, 2021**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:** Χούχουλα Δήμητρα

**Μέλος επιτροπής:** Αντωνόπουλος Διονύσιος

**Μέλος επιτροπής:** Μπατρίνου Ανθιμία

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Μαρίνα Ξύγκη του Ευαγγέλου, με αριθμό μητρώου 17077 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα



## Περίληψη

Οι γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές αποτελούν ιδανική λύση για την κάλυψη των συνεχώς αυξανόμενων αναγκών στο τομέα της γεωργικής παραγωγής. Όμως, η υπέρβαση των επιτρεπόμενων ορίων στην Ευρώπη εγείρει ανησυχίες. Για αυτό το λόγο θεσπίστηκε ένα ιδιαίτερα αυστηρό σύστημα ελέγχου. Στην παρούσα εργασία, γίνεται εκτενής αναφορά στις γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες που βρίσκουν εφαρμογή στην παραγωγή ζωοτροφών, στο νομοθετικό πλαίσιο που διέπει την ασφάλειά τους, στις τεχνικές PCR που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους καθώς και στις ανησυχίες που εγείρονται από τη χρήση τους. Κύριος στόχος είναι η εξέταση της πιθανής μεταφοράς ανασυνδυασμένου/ων γονιδίου/ων από ζωοτροφές στα ζώα και κατά επέκταση στον άνθρωπο που καταναλώνει αυτά ή τα προϊόντα τους.

**Λέξεις κλειδιά:** Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί, PCR, cry1ab, διαγονιδιακό DNA, εκκινητές, σόγια, καλαμπόκι

## **Abstract**

Genetically Modified animal feed is an ideal solution to meet the ever-increasing needs in the field of agricultural production. However, the exceedance of the permitted limits raises concerns in Europe. On account of this, a particularly strict control system was enacted. In the present study, an extensive report is made on genetically modified crops that find application in feed production, the legal framework governing the safety, the PCR techniques that are used to detect them, as well as the concerns raised by their use. The main objective is the examination of the possible transfer of recombinant gene/s from animal feed to animals, by extension to person that consume them or their products.

**Keywords:** Genetically Modified Organisms, PCR, cry1ab, transgenic DNA, primers, soya, corn

## **Ευχαριστίες**

Με την περάτωση της πτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνετέλεσαν στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Συγκεκριμένα, οφείλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Χούγουλα Δήμητρα για την καθοδήγηση και τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια συγγραφής της εργασίας. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και όλους εκείνους που ήταν δίπλα μου σε όλη αυτήν την προσπάθεια.

## Πίνακας περιεχομένων

|   |    |
|---|----|
| Περίληψη.....   | 4  |
| Abstract.....   | 5  |
| Ευχαριστίες.....  | 6  |
| Κατάλογος πινάκων.....  | 9  |
| Κατάλογος εικόνων.....  | 11 |
| Κατάλογος σχημάτων.....   | 12 |
| 1. Εισαγωγή.....  | 14 |
| 1.1 Γενικά περί γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.....                         | 14 |
| 1.2 Διαδικασία παραγωγής γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.....                | 15 |
| 1.3 Χρήση του <i>Bacillus thuringiensis</i> σε καλλιέργειες.....                | 16 |
| 1.3.1 Bt καλαμπόκι.....   | 16 |
| 1.3.2. Bt βαμβάκι.....  | 17 |
| 2. Ευρωπαϊκή νομοθεσία σχετικά με τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.... | 17 |
| 2.1 Αξιολόγηση ασφάλειας.....   | 17 |
| 2.2 Νομοθετικό πλαίσιο για τις γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές.....           | 20 |
| 2.3 Εξουσιοδότηση ΓΤΟ.....  | 21 |
| 2.4 Επισήμανση διατροφικών προϊόντων που φέρουν ΓΤΟ.....                        | 21 |
| 2.5 Επιτήρηση προϊόντων μετά την απελευθέρωση στην αγορά.....                   | 22 |
| 2.6 Ρόλος των παραγωγών στον εντοπισμό ΓΤΟ.....                                 | 22 |
| 3. Θετικές επιδράσεις από τη χρήση ΓΤΟ στις καλλιέργειες.....                   | 24 |
| 4. Στάση των καταναλωτών και των χωρών απέναντι στα ΓΤ.....                     | 25 |
| 4.1 Στάση των καταναλωτών.....  | 25 |
| 4.2 Πολιτική στάση των χωρών της ΕΕ και των ΗΠΑ απέναντι στις ΓΤ καλλιέργειες   |    |
| 25  |    |
| 4.2.1 Πολιτική στάση των χωρών της ΕΕ απέναντι στις ΓΤ καλλιέργειες.....        | 25 |
| 4.2.2 Πολιτική στάση των ΗΠΑ.....   | 26 |
| 5. Απομόνωση DNA – Τεχνικές PCR.....  | 26 |

|  |    |
|--|----|
| 5.1 Απομόνωση DNA .....  | 26 |
| 5.2 Τεχνικές PCR.....  | 27 |
| 5.2.1 Ιστορικό.....  | 27 |
| 5.2.2 Μέθοδος PCR.....   | 27 |
| 5.2.3 Πλεονεκτήματα RTi – PCR έναντι συμβατικής και προβλήματα .....                                 | 29 |
| 5.2.4 Τεχνολογίες παραγωγής σήματος φθορισμού.....   | 30 |
| 5.2.4.1 Μέθοδος SYBR Green .....   | 30 |
| 5.2.4.2 Μέθοδος TaqMan.....  | 32 |
| 5.2.4.3 Μέθοδος AmpliFluor, Plexor, Lux, μοριακών φάρων, CPT και LNA .....                           | 32 |
| 5.2.4.3 Μέθοδος Lux.....   | 32 |
| 5.2.4.3 Μέθοδος Plexor.....  | 32 |
| 5.2.4.3 Μέθοδος AmpliFluor .....   | 33 |
| 5.2.4.3. Μέθοδος μοριακών φάρων.....   | 33 |
| 5.2.4.3 Μέθοδος CPT.....   | 33 |
| 5.2.4.3. Μέθοδος LNA .....   | 34 |
| 5.2.5. PCR oligoplex – multiplex.....  | 34 |
| 5.2.6 Digital PCR .....  | 35 |
| 5.2.6.1 Droplet digital PCR.....   | 36 |
| 5.2.7 Nested PCR .....   | 37 |
| 5.2.8 Σύστημα CGE .....  | 37 |
| 5.2.9 Μικροσυστοιχίες DNA πολλαπλή PCR.....  | 38 |
| Εντοπισμός UGMO’s (Unauthorised Genetically Modified Organisms) .....                                | 38 |
| 6. Η χρήση των ΓΤ καλλιεργειών στις ζωοτροφές.....   | 38 |
| 6.1 Παραγωγή αραβόσιτου λυσίνης .....  | 39 |
| 6.1.1 Σύγκριση συμβατικού αραβοσίτου και αραβοσίτου λυσίνης .....                                    | 40 |
| 6.2 Καλαμπόκι με γονίδιο φυτάσης από το <i>Escherichia Coli</i> .....                                | 40 |
| 6.3 Roundup Ready (RR) σόγια.....  | 40 |
| 6.4 Ronozyme ProAct.....   | 42 |
| 7. Αξιολόγηση πιθανής μεταφοράς διαγονιδιακού DNA σε ζώα από γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές ..... | 43 |
| 7.1 Χοίροι .....   | 45 |
| 7.2 Αγριόχοιροι.....   | 52 |



|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 7.3 Αγελάδες.....             | 53 |
| 7.3.1. Αγελαδινό γάλα .....   | 57 |
| 7.4 Πρόβατα.....              | 59 |
| 7.5 Κοτόπουλα.....            | 62 |
| 7.6 Κουνέλια.....             | 68 |
| 7.7 Κατσίκες .....            | 70 |
| 7.8 Πουλερικά και χοίροι..... | 71 |
| 7.9 Ελάφια.....               | 71 |
| 7.10 Ψάρια .....              | 72 |
| Συμπεράσματα.....             | 74 |
| Βιβλιογραφία .....            | 76 |

## **Κατάλογος πινάκων**

**Πίνακας 1.** ΓΤΟ σε ζωοτροφές

**Πίνακας 2.** Γενετικά τροποποιημένα φυτά και μικροοργανισμοί που έχουν εγκριθεί για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση

**Πίνακας 3.** PCR εκκινητές, αλληλουχίες και ειδικότητα

**Πίνακας 4.** Ανιχνεύσιμο θραύσμα διαγονιδιακού DNA (211 ζ.β.) σε περιεχόμενο γαστρεντερικού σωλήνα χοίρων που σφαγιάστηκαν σε διαφορετικούς χρόνους μετά την τελευταία σίτιση με Bt αραβόσιτο

**Πίνακας 5.** Εκκινητές στην PCR για την εύρεση φυτικού DNA

**Πίνακας 6.** Ανίχνευση διαγονιδιακών φυτικών DNA αλληλουχιών σε δείγματα των προϊόντων πέψης και ιστών από αρνιά που διατράφηκαν με Roundup Ready ελαιοκράμβη (n = 11)

**Πίνακας 7.** Ανίχνευση διαγονιδιακών φυτικών DNA αλληλουχιών σε δείγματα από γουρούνια που τράφηκαν με Roundup Ready ελαιοκράμβη (n = 11)

**Πίνακας 8.** Εκκινητές και συνθήκες PCR που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό των γονιδίων στόχων

**Πίνακας 9.** Πλήθος ζώων στο οποίο εντοπίστηκε το cry1ab γονίδιο στα προϊόντα πέψης

**Πίνακας 10.** Αποτελέσματα εντοπισμού διαγονιδιακού DNA στο αίμα

**Πίνακας 11.** Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των γονιδίων

**Πίνακας 12.** Θετικά (+), αρνητικά (-), ασαφή αποτελέσματα (I) PCR

**Πίνακας 13.** Ανίχνευση ανασυνδυσμένου DNA σε δείγματα γαλάτων με PCR και ηλεκτροφόρηση

**Πίνακας 14.** Σχέδιο δειγματοληψίας

**Πίνακας 15.** Ανθεκτικότητα των DNA αλληλουχιών στόχων

**Πίνακας 16.** Περιγραφή εκκινητών και ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιγραφή του Roundup DNA

**Πίνακας 17.** Αλληλουχίες εκκινητών, ιχνηθέτη και γονίδιο στόχος

**Πίνακας 18.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων

**Πίνακας 19.** Αριθμός θετικών δειγμάτων Cry3Bb1 πρωτεΐνης σε κόπρανα, συκώτι και μαστικό ιστό

**Πίνακας 20.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση γονιδίων καλαμποκιού και σόγιας

**Πίνακας 21.** Εκκινητές για τον εντοπισμό των γονιδίων στόχων σε δείγματα από ωτόκες όρνιθες

**Πίνακας 22.** Εκκινητές και ιχνηθέτης που σχετίζονται με το ανασυνδυσμένο γεγονός 40 – 3 – 2 της RR σόγιας

**Πίνακας 23.** Αλληλουχία (5' → 3'), μέγεθος αντιγράφου και θερμοκρασία τήξης των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην PCR

**Πίνακας 24.** Αλληλουχία (5' → 3'), μέγεθος αντιγράφου και θερμοκρασία τήξης των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην PCR

**Πίνακας 25.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών για κάθε θραύσμα του γονιδίου στόχου

**Πίνακας 26.** Ανίχνευση θραύσματος DNA υποκινητή CaMV 35S (220 ζ.β.) σε περιεχόμενα του γαστρεντερικού από ψάρια (n = 20)

**Πίνακας 27.** Ανίχνευση θραύσματος DNA υποκινητή CaMV 35S σε λευκοκύτταρα και ιστούς ψαριών (n = 20)

## **Κατάλογος εικόνων**

**Εικόνα 1.** Ενσίρωμα καλαμποκιού

**Εικόνα 2.** Τρόπος επισήμανσης ΓΤ προϊόντων στις ΗΠΑ

**Εικόνα 3.** Καμπύλη τήξης DNA

**Εικόνα 4.** Χημικός τύπος γλυφοσάτης

**Εικόνα 5.** Roundup Ready σόγια

**Εικόνα 6.** *Petunia hybrida*

**Εικόνα 7.** Συλλογή υγρού από το πρώτο στομάχι

**Εικόνα 8.** Σπόροι βαμβακιού Bollgard II

## Κατάλογος σχημάτων

|  |    |
|--|----|
| <b>Σχήμα 1.</b> Διαδικασία παραγωγής ΓΤΟ .....   | 16 |
| <b>Σχήμα 2.</b> Μηχανισμός δράσης τοξίνης .....  | 17 |
| <b>Σχήμα 3.</b> Μέθοδος PCR.....   | 28 |
| <b>Σχήμα 4.</b> Γενετικά τροποποιημένο φυτικό κατασκεύασμα .....   | 29 |
| <b>Σχήμα 5.</b> Μέθοδος SYBR Green .....   | 30 |
| <b>Σχήμα 6.</b> Μέθοδος TaqMan.....  | 32 |
| <b>Σχήμα 7.</b> Μέθοδος CPT, μοριακών φάρων, Lux, Plexor, AmpliFluor.....  | 34 |
| <b>Σχήμα 8.</b> Multiplex PCR.....   | 34 |
| <b>Σχήμα 9.</b> Nested PCR .....   | 37 |
| <b>Σχήμα 10.</b> Εισαγωγή LY038.....   | 39 |
| <b>Σχήμα 11.</b> PCR στο γαστρεντερικό περιεχόμενο των χοίρων που διατρέφονταν με Bt καλαμπόκι (λωρίδα 6 - 10) για το 1-5'-cryIA 1-3' (110 ζεύγη βάσεων). Ως S, D, C, R το περιεχόμενο του στομάχου, του δωδεκαδάκτυλου, του τυφλού και του ορθού. Ως + ο θετικός μάρτυρας (Bt11) .....  | 45 |
| <b>Σχήμα 12.</b> PCR για την εύρεση ανασυνδυασμένου DNA, +: θετικό control, - : control χωρίς DNA, C chyme (χυμός), B blood (αίμα), Mi milk (γάλα), E excrements (κόπρανα) .....   | 53 |
| <b>Σχήμα 13.</b> Επιβίωση θραύσματος 1914 ζ.β. που περιέχει το γονίδιο cry1a(b) σε ΓΤ κόκκους καλαμποκιού .....  | 60 |
| <b>Σχήμα 14.</b> Ανθεκτικότητα του θραύσματος 211 ζ.β.....   | 60 |
| <b>Σχήμα 15.</b> PCR σε δείγματα από κοτόπουλα .....   | 63 |
| <b>Σχήμα 16.</b> PCR σε δείγματα από ωοτόκες κότες.....  | 63 |
| <b>Σχήμα 17.</b> PCR για την 40-3-2 σόγια σε δείγματα από ιστούς (1 - 9 αίμα, συκώτι, πλευρικό τετρακέφαλο μυ, μήκιστο μυ, νεφρό, στομάχι, έντερο, περιφερικό λιπώδη ιστό και καρδιά), η λωρίδα 10 αντιστοιχεί στο προϊόν πέψης του στομάχου, η 11 στα κόπρανα και η 12 στα μαλλιά. Η α εικόνα αντιστοιχεί στα κουνέλια που έχουν διατραφεί με τη ΓΤ σόγια ενώ η β σε εκείνα που κατανάλωσαν συμβατική. Όπου Μ ο δείκτης, - : αρνητικός μάρτυρας δίχως DNA, --αρνητικός έλεγχος (DNA από συμβατική |    |

σόγια) και + : θετικός μάρτυρας (DNA από ΓΤ σόγια). Τα βέλη δείχνουν το προσδοκώμενο μήκος των προϊόντων PCR. .... 69

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Γενικά περί γενετικά τροποποιημένων οργανισμών

Σύμφωνα με τον FAO εκτιμάται ότι η παραγωγή τροφίμων πρέπει να αυξηθεί κατά περισσότερο από 75% τα επόμενα 40 χρόνια. Οι υπάρχοντες φυσικοί πόροι κρίνονται ανεπαρκείς για να καλύψουν την παραπάνω ζήτηση οπότε αναπόφευκτα θα επέλθει η εξάντλησή τους. Με βάση την αναλογία του παγκόσμιου πληθυσμού, η παραγωγή σιτηρών θα πρέπει να αυξηθεί κατά τουλάχιστον ένα δισεκατομμύριο τόνους και η κτηνοτροφία κατά 200 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Κρίσιμος είναι ο τομέας της παραγωγής ζωοτροφών καθώς διακυβεύεται σχεδόν το 80% της παγκόσμιας γεωργικής γης που παρέχει τροφή για τη βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων και κόκκινου κρέατος (Cakir, 2015). Λύση σε αυτό το πρόβλημα δίνει η εφαρμογή της γενετικής τροποποίησης που ανήκει στις σύγχρονες γεωργικές βιοτεχνολογίες και έχει ως στόχο την αύξηση της παραγωγής, την αποτελεσματικότερη χρήση των φυσικών πόρων και τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων (Giraldo, 2019).

Σαφέστερα, οι ζωοτροφές είναι ουσίες ή προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των πρόσθετων υλών, που είτε έχουν υποστεί πλήρη ή μερική επεξεργασία είτε όχι και προορίζονται για τη χορήγηση τροφής από το στόμα στα ζώα. Σε αυτές περιλαμβάνονται το άχυρο, το ενσίρωμα, οι συμπιεσμένες και οι σφαιριδιακές τροφές, τα λάδια, οι σπόροι και τα όσπρια. Τα συστατικά τους προέρχονται από πλήθος πρώτων υλών φυτικής και ζωικής προέλευσης, καθώς και από φαρμακευτικές και βιομηχανικές πηγές. Ορισμένα συστατικά των ζωοτροφών ποικίλλουν ανάλογα με το ζώο (Sarkota, 2007).

**Εικόνα 1.** Ενσίρωμα καλαμποκιού



**ΠΗΓΗ:**

<https://www.foudoukis.gr/gr/kalampoki.html>

Συγκεκριμένα, ως γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί ορίζονται οι οργανισμοί των οποίων το γενετικό υλικό έχει τροποποιηθεί όχι με αναπαραγωγή ή και φυσικό ανασυνδυασμό αλλά με την εισαγωγή τροποποιημένου γονιδίου ή γονιδίου από άλλη ποικιλία ή είδος με τη χρήση της Γενετικής Μηχανικής (European Union Law).

Ο πρώτος ΓΤΟ που εγκρίθηκε για εμπορευματοποίηση ήταν η ντομάτα Flavr-Savr το 1994 (Lucht, 2015). Η διάρκεια ζωής της αυξήθηκε με την καταστολή του

γονιδίου της πολυγαλακτουρουνάσης στην οποία αποδίδεται το πρόωρο μαλάκωμα των φρούτων (Krieger, 2008).

Οι κύριες διαγονιδιακές καλλιέργειες που καλλιεργούνται στο εμπόριο είναι η σόγια (*Glycine max*), το καλαμπόκι (*Zea mays*), το βαμβάκι (*Gossypium hirsutum*) και η κανόλα (*Brassica napus*) οι οποίες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται ο ψεκασμός των ΓΤ φυτών τα οποία στοχεύουν τα ζιζάνια και τα έντομα αλλά δεν προκαλούν βλάβη στην καλλιέργεια (Muzhinji, 2021). Επί του παρόντος, οι ΗΠΑ είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός ΓΤ καλλιεργειών παγκοσμίως. (Kleter, 2018). Στην ΕΕ μόνο ο γενετικά τροποποιημένος αραβόσιτος Bt MON810 επιτρέπεται να καλλιεργηθεί (Lucht, 2015).

Στις ζωοτροφές βρίσκουν εφαρμογή η γενετικά τροποποιημένη σόγια με ανθεκτικότητα στη γλυφοσάτη ως τροφή αγελάδας, κουνελιού, ο Bt αραβόσιτος και βαμβακόσπορος ως τροφή αγελάδας, βοδιού, ακόμα η GM ελαιοκράμβη που είναι ανθεκτική στη γλυφοσάτη ως τροφή προβάτου και ο Bt αραβόσιτος ως τροφή κοτόπουλου.

## **1.2 Διαδικασία παραγωγής γενετικά τροποποιημένων οργανισμών**

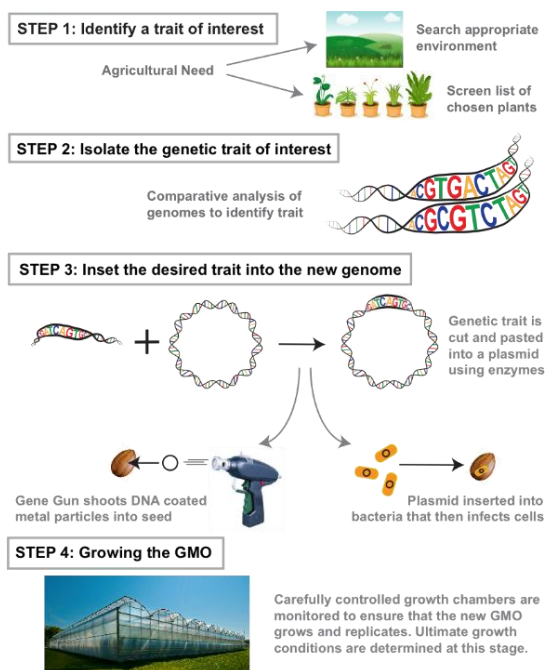
Τα κύρια βήματα που εμπλέκονται στη παραγωγή ΓΤΟ είναι ο εντοπισμός ενός επιθυμητού χαρακτηριστικού, η απομόνωσή του, η εισαγωγή αυτού του χαρακτηριστικού σε έναν επιθυμητό οργανισμό και η ανάπτυξη αυτού του οργανισμού (Harvard, 2015).

Η εισαγωγή επιτυγχάνεται με τη χρήση βακτηρίων που παράγουν μια επιθυμητή πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, κόβεται και τοποθετείται με τη βοήθεια ενζύμων ένας κλώνος DNA σε ένα πλασμίδιο. Για την επιτυχή εισαγωγή του γενετικά τροποποιημένου πλασμιδίου στα βακτήρια, τα παραπάνω εκτίθενται σε θερμότητα ή ηλεκτρισμό. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ανήκουν στο είδος του *A. tumefaciens*, γιατί παρουσιάζει μεγαλύτερη ευκολία στην τροποποίησή του σχέση με τους σπόρους των φυτών (Harvard, 2015).

Ακολουθεί ο έλεγχος του γονοτύπου των οργανισμών για να διασφαλιστεί ότι αναπαράγονται μόνο οργανισμοί με την επιθυμητή τροποποίηση. Χρησιμοποιούνται κλιματιζόμενοι θάλαμοι ανάπτυξης και διενεργείται έλεγχος με το χέρι από τους επιστήμονες. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιούνται αυτοματοποιημένα μηχανήματα για την επίβλεψη των φυτών και τον υπολογισμό εκείνων των συνθηκών που εξασφαλίζουν την

καλύτερη σπορά και ανάπτυξη με στόχο την μεγιστοποίηση των αποδόσεων (Harvard, 2015).

Σχήμα 1. Διαδικασία παραγωγής ΓΤΟ



ΠΗΓΗ: <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/how-to-make-a-gmo/>

### 1.3 Χρήση του *Bacillus thuringiensis* σε καλλιέργειες

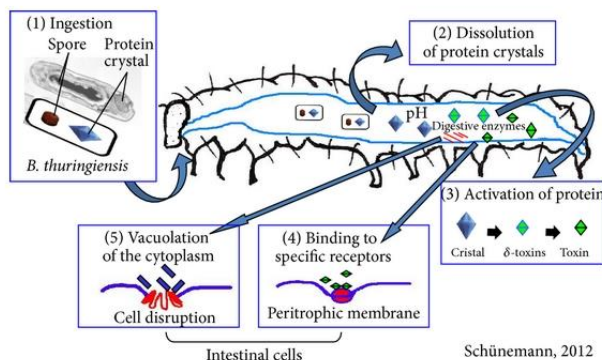
#### 1.3.1 Bt καλαμπόκι

Το γενετικώς τροποποιημένο καλαμπόκι Bt μεταφέρει διαφορετικά γονίδια που εκφράζουν πρωτεΐνες Cry από το βακτήριο του εδάφους *Bacillus Thuringiensis* (Abbas, 2018). Ο *B. thuringiensis* είναι βακτήριο θετικό κατά Gram με εντομοπαθογόνες ικανότητες που βρίσκει εφαρμογή ως ψεκαζόμενο βιοκτόνο (Kamle, 2017). Οι πρωτεΐνες ονομάζονται τοξίνες Bt καθώς σκοτώνουν φυτικά παράσιτα όπως έντομα των τάξεων *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* (Abbas, 2018). Σχηματίζουν κρυσταλλικά εγκλείσματα είτε μόνες τους ή με τις τοξίνες Cyt περιμετρικά του σπόρου και ονομάζονται δ-ενδοτοξίνη. Διαθέτουν την ικανότητα λύσης των επιθηλιακών κύτταρων του εντέρου του εντόμου. Δεν αποτελούν κίνδυνο για τον άνθρωπο, τα σπονδυλωτά και τα φυτά και είναι πλήρως βιοαποικοδομήσιμες (Abbas, 2018). Ανήκουν στην κατηγορία των βακτηριακών τοξινών που δημιουργούν πόρους, εξάγονται ως υδατοδιαλυτές και τροποποιούνται για να εισαχθούν ή να μετατοπιστούν σε κυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή τους. Οι τοξίνες σχηματισμού πόρων διακρίνονται στις α – ελικοειδείς όπου τα



τιμήματα της  $\alpha$  – έλικας δημιουργούν τον διαμεμβρανικό πόρο και τις τοξίνες  $\beta$  – βαρελίου που η είσοδό τους στη μεμβράνη επιτυγχάνεται με τα φύλλα φουρκέτας του  $\beta$  – βαρελίου. Στις  $\alpha$  – ελικοειδείς κατατάσσονται οι Cry πρωτεΐνες ενώ στις άλλες οι Cyt. (Bravo, 2007).

Σχήμα 2. Μηχανισμός δράσης τοξίνης



ΠΗΓΗ: <https://www.hindawi.com/journals/ism/2014/135675/>

### 1.3.2. Bt βαμβάκι

Το βαμβάκι χρησιμοποιείται για την παραγωγή ινών και λαδιών. Η δημιουργία του γενετικά τροποποιημένου διαγονιδιακού βαμβακιού με ανθεκτικότητα στα έντομα (Bt-cotton) αποσκοπεί στον έλεγχο των σκουληκιών, των παρασίτων και των λεπιδόπτερον. Στο Bt-cotton ενσωματώθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί την τοξίνη Bt ως διαγονίδιο, με αποτέλεσμα να παράγει εντομοκτόνο στους ιστούς. Η απορρόφηση των Bt τοξινών από το έδαφος ενεργοποιεί πληθώρα ενζύμων. Η καλλιέργεια Bt βαμβακιού στο ίδιο έδαφος επηρεάζει τη διατροφική σύσταση του εδάφους επιφέροντας ελάττωση στην περιεκτικότητα του αζώτου και του καλίου ενώ αυξάνει εκείνη του φωσφόρου και του ψευδαργύρου. Από αυτό συνάγεται ότι επηρεάζεται η χημική σύνθεση της ρίζας και τα υπολείμματα των καλλιεργειών που αλλάζουν την λειτουργία του οικοσυστήματος και την ανάπτυξη των φυτών (Riaz Marral MW, 2020).

## 2. Ευρωπαϊκή νομοθεσία σχετικά με τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς

### 2.1 Αξιολόγηση ασφάλειας

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έως το 2017 έχουν καταγραφεί 77 ΓΤ φυτά / προϊόντα με δυνατότητα χρήσης στις ζωοτροφές εκ των οποίων τα 43 αφορούν είδη ΓΤ αραβοσίτου, τα 11 είδη ΓΤ βαμβακιού, τα 15 είδη ΓΤ σόγιας, τα 4 είδη ΓΤ ελαιοκράμβης

και ζαχαρότευτλα με προσωρινές ή πλήρεις εγκρίσεις, που παρέχονται σύμφωνα με τον κανονισμό για τα ΓΤ Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές. (Efsa, 2008 Safety and Nutritional Assessment).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την χρήση γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών ως τροφή είναι η αξιολόγηση της ασφάλειας σύμφωνα με διεθνείς αρχές που έχουν αναπτυχθεί υπό την αιγίδα του Codex Alimentarius FAO/WHO. Σύμφωνα με αυτές τις αρχές, τα χαρακτηριστικά των γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών συγκρίνονται με εκείνα των αντίστοιχων συμβατικών με ένα ιστορικό ασφαλούς χρήσης, περιλαμβάνοντας μοριακά, φαινοτυπικά, αγρονομικά και δεδομένα σύστασης. Ο μοριακός έλεγχος περιλαμβάνει τον μοριακό χαρακτηρισμό του εισαχθέντος DNA και την ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης. Η αγρονομική και φαινοτυπική ανάλυση σχετίζονται με την ανάπτυξη των φυτών, τη μορφολογία σε διαφορετικά στάδια της ζωής, την αναπαραγωγή, την γεωργική παραγωγικότητα και την ευαισθησία σε ασθένειες.

Μια αποδεκτή τεχνική ανίχνευσης ΓΤΟ θα πρέπει να εντοπίζει όλους τους γνωστούς ΓΤΟ, να παρέχει ποσοτικά δεδομένα σχετικά με το περιεχόμενο ή / και την παρουσία ΓΤΟ και να εφαρμόζεται για μεγάλο εύρος προϊόντων. Επίσης, να είναι ευαίσθητη, ακριβής σε όλες τις εργαστηριακές συνθήκες παρέχοντας αξιόπιστα, αναπαραγώγιμα και ελάχιστα ψευδή θετικά αποτελέσματα (Kamle, 2017).

Οποιοσδήποτε παρατηρούμενες αλλαγές αξιολογούνται για την συσχέτισή τους με την ασφάλεια και κατά πόσο απαιτούνται περαιτέρω δεδομένα για να καταλήξουμε σε ένα συμπέρασμα σχετικά με την ασφάλεια της συγκεκριμένης γενετικά τροποποιημένης καλλιέργειας.

Σαφέστερα θα πρέπει να αξιολογείται η διατροφική τους συνάφεια σε είδη ζώα-στόχους που επιλέγονται ανάλογα με την υπό εκτίμηση ΓΤ καλλιέργεια (π.χ. πουλερικά, χοίροι ή μηρυκαστικά). Στην περίπτωση γενετικώς τροποποιημένων φυτών με τροποποιημένο περιεχόμενο θρεπτικών ουσιών, πρέπει να διενεργούνται κτηνοτροφικές μελέτες με μοντέλο ή με είδη στόχους προκειμένου να προσδιοριστεί η βιοδιαθεσιμότητα μεμονωμένων θρεπτικών ουσιών στις ζωοτροφές που προέρχονται από ένα ΓΤ φυτό. Στην περίπτωση γενετικώς τροποποιημένων φυτών με χαρακτηριστικά που βελτιώνουν την απόδοση των ζώων, μέσω αυξημένης περιεκτικότητας θρεπτικών ουσιών (π.χ. αυξημένη περιεκτικότητα σε λάδι) ή μέσω υψηλότερου επιπέδου συγκεκριμένου θρεπτικού συστατικού (π.χ. απαραίτητο αμινοξύ ή βιταμίνη), πρέπει να γίνει κατάλληλη διαίτα ελέγχου με παρόμοιο θρεπτικό προφίλ. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η

σόγια DP-305423 με τροποποιημένη περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα σπόρων, συγκεκριμένα με υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και χαμηλή σε λινολενικό οξύ καθώς και σόγια MON 87769 που περιέχει στεαριδονικό οξύ, ως εναλλακτική πηγή ω-3 λιπαρών οξέων για να καλύψει την απαραίτητη διατροφική πρόσληψή τους (de Santis, 2018).

Ο πειραματικός σχεδιασμός και η στατιστική προσέγγιση των μελετών διατροφής θα εξαρτηθούν από την επιλογή των ζωικών ειδών, τον τύπο των χαρακτηριστικών φυτών που μελετήθηκαν και το μέγεθος του αναμενόμενου αποτελέσματος (European Union). Θα πρέπει να παρέχονται πληροφορίες για την επιδιωκόμενη λειτουργία, τον διατροφικό ρόλο και το αναμενόμενο επίπεδο χρήσης των ζωοτροφών που προέρχονται από το ΓΤ φυτό. Απαιτείται ο καθορισμός των συγκεντρώσεων των πρόσφατα εκφρασμένων πρωτεϊνών, άλλων νέων συστατικών και ενδογενών συστατικών με επίπεδα που έχουν αλλάξει ως αποτέλεσμα της γενετικής τροποποίησης (π.χ. λόγω αλλαγών στις μεταβολικές οδούς) σε εκείνα τα μέρη του ΓΤ φυτού που προορίζονται για χρήση σε ζωοτροφές. Η αναμενόμενη πρόσληψη αυτών των συστατικών πρέπει να εκτιμάται λαμβάνοντας υπόψη τις επιδράσεις της επεξεργασίας, της αποθήκευσης και της αναμενόμενης επεξεργασίας των εν λόγω τροφίμων και ζωοτροφών, π.χ. πιθανή συσσώρευση ή μείωση. Επίσης, επιβάλλεται η εύρεση του αναμενόμενου μέσου και μεγίστου επιπέδου πρόσληψης των ζωοτροφών με βάση τα αντιπροσωπευτικά στοιχεία κατανάλωσης για προϊόντα που προέρχονται από τα αντίστοιχα συμβατικά φυτά (European Union).

Σε περιπτώσεις ΓΤ φυτών που έχουν υποστεί πολλαπλές γενετικές τροποποιήσεις ενδέχεται να προκύψουν πρόσθετοι κίνδυνοι από τις συνδυασμένες επιδράσεις των γενετικά τροποποιημένων γονιδίων, π.χ. θα πρέπει να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις στις βιοχημικές οδούς. Συγκεκριμένα, η εκτίμηση της επικινδυνότητας των πολλαπλών γενετικών τροποποιήσεων πρέπει να εστιάζει κυρίως σε ζητήματα που σχετίζονται με τη σταθερότητα των εισαχθέντων γονιδίων, την έκφρασή τους και τις πιθανές συνεργαστικές ή ανταγωνιστικές επιπτώσεις που προκύπτουν από το συνδυασμό των τροποποιήσεων. Υπάρχει η απαίτηση να αποδειχθεί ότι κάθε μία από τις ΓΤ που συναντώνται στο φυτό έχει τις ίδιες μοριακές ιδιότητες και χαρακτηριστικά όπως στις καλλιέργειες με μεμονωμένη ΓΤ (European Union).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το καλαμπόκι MON 87427 × MON 87460 × MON 89034 × 1507 × MON 87411 × 59122 το οποίο έχει υποστεί 6 γενετικές

τροποποιήσεις. Άλλο παράδειγμα αποτελεί η σόγια DAS – 8419–2 × DAS – 44406–6 που έχει υποστεί δύο γενετικές τροποποιήσεις. Αναπτύχθηκε για να παρέχει προστασία έναντι ορισμένων παρασίτων λεπιδόπτερων και ανοχή στο 2,4 – διχλωροφαινοξυοξικό οξύ και άλλα συναφή φαινοξυ ζιζανιοκτόνα, γλυφοσάτη και γλυφοσινικό αμμώνιο. Σύμφωνα με τον EFSA είναι τόσο ασφαλή όσο και τα συγκριτικά τους μη ΓΤ. (Naegeli, 2021)

Επίσης, συνιστάται ένα πρόγραμμα δοκιμών το οποίο περιλαμβάνει μελέτη τοξικότητας 90 ημερών σε τρωκτικά (Van Eenennaam, 2013).

Ακόμα, η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου ασχολείται με την έκθεση των βακτηρίων που βρίσκονται στη γαστρεντερική οδό ζώων που τρέφονται με ΓΤ υλικό σε ανασυνδυασμένο DNA και με βακτήρια που υπάρχουν σε περιβάλλοντα που εκτίθενται στα κόπρανα αυτών των ζώων. Συγχρόνως, εξετάζεται η τυχαία απελευθέρωση στο περιβάλλον βιώσιμων ΓΤΟ κατά τη μεταφορά και / ή την επεξεργασία (Eurlex).

Όσον αφορά την αλλεργιογένεση, δεν υπάρχουν αναφορές για περιστατικά αλλεργικών αντιδράσεων ή ανοσοτοξικών επιδράσεων που προκύπτουν από την κατανάλωση γενετικά τροποποιημένων τροφών σε σύγκριση με τις τροφές που δεν περιέχουν ΓΤ (Eurlex).

## **2.2 Νομοθετικό πλαίσιο για τις γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές**

Κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, κρίσεις στο τομέα των τροφίμων (ΣΕΒ, διοξίνη, αφθώδης πυρετός, γρίπη των πτηνών) κλόνισαν την εμπιστοσύνη του κοινού σχετικά με την παραγωγή και την ασφάλειά τους. Εξαιτίας αυτών των κρίσεων οι αρμόδιες αρχές στην Ευρώπη έκριναν απαραίτητη την εισαγωγή ενός πολύ αυστηρού συστήματος έγκρισης για γενετικά τροποποιημένες καλλιέργειες και ζωοτροφές / τρόφιμα το οποίο εναρμονίζεται πλήρως με την «αρχή της προφύλαξης» ως απάντηση στον σκεπτικισμό των καταναλωτών και στην αποτελεσματική άσκηση πίεσης εκ μέρους περιβαλλοντικών ΜΚΟ (Lucht, 2015).

Οι ΓΤ ζωοτροφές πρέπει να τηρούν ορισμένες νομοθετικές απαιτήσεις. Συγκεκριμένα, δεν πρέπει να επηρεάζουν δυσμενώς την υγεία των ανθρώπων, των ζώων ή να βλάπτουν το περιβάλλον. Δεν πρέπει να παραπλανούν τον χρήστη και δεν πρέπει να βλάπτουν ή να παραπλανούν τον καταναλωτή αλλοιώνοντας τα διακριτικά γνωρίσματα των ζωικών προϊόντων. Ακόμα, δεν πρέπει να διαφέρουν από τις ζωοτροφές, στην

αντικατάσταση των οποίων αποσκοπούν, σε βαθμό που η συνήθης κατανάλωσή τους να ζημιώνει τα ζώα ή τον άνθρωπο από άποψη διατροφικής αξίας (Eur- lex).

### **2.3 Εξουσιοδότηση ΓΤΟ**

Η αίτηση για έγκριση ΓΤΟ για χρήση σε ζωοτροφές πρέπει να υποβληθεί σε εθνική αρχή μέσω ηλεκτρονικής πλατφόρμας υποβολής. Είναι υποχρεωτικό να περιλαμβάνει όλα τα σχετικά δεδομένα, τις μελέτες, την ανάλυση των αποτελεσμάτων, τον σκοπό, το πεδίο εφαρμογής, το σχέδιο παρακολούθησης, την πρόταση επισήμανσης, την μέθοδο ανίχνευσης καθώς και την ένδειξη εμπιστευτικών πληροφοριών. Η εθνική αρχή αναγνωρίζει την παραλαβή της αίτησης εντός 14 ημερών. Στη συνέχεια, η αίτηση αποστέλλεται στην EFSA για την αξιολόγηση κινδύνου και η σύνοψη της αίτησης καθίσταται διαθέσιμη στο κοινό.

Εάν η αίτηση καλύπτει επίσης την καλλιέργεια, ανατίθεται η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου σε μια χώρα της ΕΕ που αποστέλλει στην EFSA την έκθεση αξιολόγησης περιβαλλοντικού κινδύνου. Η ομάδα GMO της EFSA αξιολογεί τους κινδύνους που μπορεί να παρουσιάζει ο ΓΤΟ για το περιβάλλον, την ανθρώπινη υγεία και την ασφάλεια των ζώων στην ΕΕ. Μπορεί να παρέχει συστάσεις σχετικά με την επισήμανση ή τους όρους χρήσης και πώλησης. Η εκτίμηση της επικινδυνότητας διενεργείται εντός έξι μηνών από την παραλαβή της αίτησης και εκδίδεται μια επιστημονική γνώμη που δημοσιεύθηκε στην Εφημερίδα EFSA. Η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει περισσότερο εάν ζητηθούν πρόσθετες πληροφορίες από τον αιτούντα ώστε να ολοκληρωθεί η αξιολόγηση. Η EFSA υποβάλλει τη γνώμη της στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή, στις χώρες της ΕΕ και είναι διαθέσιμη στο κοινό.

Εντός τριών μηνών από τη λήψη της γνώμης της EFSA, η Επιτροπή προτείνει στο κράτος μέλος να χορηγήσει ή να αρνηθεί την έγκριση. Εάν η πρόταση της Επιτροπής διαφέρει από τη γνώμη της EFSA, πρέπει να εξηγηθεί γιατί. Οι άδειες ισχύουν για μέγιστο διάστημα 10 ετών και υπάρχει η δυνατότητα ανανέωσης.

### **2.4 Επισήμανση διατροφικών προϊόντων που φέρουν ΓΤΟ**

Όλα τα προϊόντα πρέπει να φέρουν ετικέτα εάν αυτά περιέχουν ή αποτελούνται από ΓΤΟ ή εάν παράγονται ή περιέχουν συστατικά που παράγονται από ΓΤΟ. Το όριο επισήμανσης είναι 0,9% για κάθε καλλιέργεια που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του τελικού προϊόντος, υπό την προϋπόθεση ότι αυτή η παρουσία είναι τυχαία ή τεχνικά

αναπόφευκτη. Επίσης, το μέγιστο επιτρεπτό όριο στις ζωοτροφές στις ΗΠΑ, στον Καναδά και στην Ιαπωνία έχει οριστεί στο 5%. Στην Αυστραλία, στη Νέα Ζηλανδία, στη Νότια Αφρική, στη Βραζιλία και στη Κίνα ανέρχεται στο 1% (Giraldo, 2019). Επιπλέον, η αραίωση του ΓΤΟ συστατικού κάτω από το καθορισμένο όριο είναι παράνομη. Σε κάθε ΓΤΟ με άδεια κυκλοφορίας στην ΕΕ εκχωρείται ένας μοναδικός κωδικός ταυτοποίησης που αποτελείται από αριθμούς και γράμματα. Αυτός ο κωδικός περιλαμβάνεται στα έγγραφα που συνοδεύουν το προϊόν στα στάδια της αλυσίδας παραγωγής και διανομής, επιτρέποντας τον εντοπισμό της προέλευσης. Στην περίπτωση των μη εγκεκριμένων ΓΤΟ εφαρμόζεται η τεχνική του μηδενικού ορίου στο επίπεδο 0,1% που είναι το χαμηλότερο επίπεδο ΓΤ υλικού που εξετάζεται από το Εργαστήριο Αναφοράς της ΕΕ για την επικύρωση ποσοτικών μεθόδων. Εάν τα επίπεδα των μη εγκεκριμένων ΓΤΟ υπερβαίνουν αυτό το όριο, τότε η συγκεκριμένη παρτίδα μπορεί να μην εισέλθει στην ευρωπαϊκή αγορά.

**Εικόνα 2.** Τρόπος επισήμανσης ΓΤ προϊόντων στις ΗΠΑ



**ΠΗΓΗ:** USDA

## **2.5 Επιτήρηση προϊόντων μετά την απελευθέρωση στην αγορά**

Τα κράτη μέλη οφείλουν να δημιουργήσουν προγράμματα παρακολούθησης που θα περιλαμβάνουν δειγματοληψία και ανάλυση, για την τήρηση των κανονισμών ιχνηλασιμότητας ΓΤΟ. Οι κανονισμοί ανιχνευσιμότητας θα πρέπει να διευκολύνουν την απόσυρση προϊόντων όταν προκύπτουν απρόβλεπτες επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων ή των ζώων.

## **2.6 Ρόλος των παραγωγών στον εντοπισμό ΓΤΟ**

Οι εισαγωγείς ή οι παραγωγοί υποχρεούνται να διαπιστώσουν εάν ένα προϊόν περιέχει ή αποτελείται από ΓΤΟ και, στην περίπτωση βιώσιμων οργανισμών ποιοι ΓΤΟ συμμετέχουν. Κρίνεται απαραίτητη η ύπαρξη συστημάτων και διαδικασιών από τους παραγωγούς με στόχο να καταστήσουν δυνατή την ανίχνευση των σχετικών πληροφοριών για περίοδο πέντε ετών από κάθε συναλλαγή. Εντούτοις είναι αδύνατη η ανίχνευση όλης της τροφής στην οποία έχει εκτεθεί το ζώο στο αγρόκτημα προέλευσης και ο προσδιορισμός της αναλογίας και της ταυτότητας των συστατικών από τα γενετικά τροποποιημένα παράγωγα συστατικά σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα.

**Πίνακας 1.** ΓΤΟ σε ζωοτροφές

| <b>Καλλιέργεια τροφής</b>                 | <b>Βελτιωμένα χαρακτηριστικά</b>  | <b>Αριθμός εγκεκριμένων GM τροποποιήσεων</b> |
|---|---|--|
| Alfalfa (Λουκέρνη)                        | ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα, τροποποιημένη ποιότητα προϊόντος  | 5  |
| Μήλο                                      | αναστολή μαυρίσματος  | 3  |
| Ελαιοκράμβη Αργεντινής                    | ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα, τροποποιημένη ποιότητα προϊόντος, σύστημα ελέγχου επικονίασης   | 37   |
| Φασόλι                                    | αντοχή σε ιογενείς νόσους   | 1  |
| Ραδίκι                                    | ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα, σύστημα ελέγχου επικονίασης   | 3  |
| Βαμβάκι                                   | αντοχή στα έντομα, ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα   | 57   |
| Μαυρομάτικα φασόλια                       | αντοχή στα έντομα   | 1  |
| Creeping Bentgrass (αναρριχώμενο χορτάρι) | ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα  | 1  |
| Ευκάλυπτος                                | ογκομετρική αύξηση του ξύλου  | 1  |
| Λινάρι                                    | ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα  | 1  |
| Αραβόσιτος                                | τροποποιημένη ποιότητα προϊόντος, αντοχή στα έντομα, ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα, σύστημα ελέγχου επικονίασης, ανθεκτικότητα στο αβιοτικό stress | 140  |
| Παπάγια                                   | αντίσταση στις ασθένειες  | 2  |
| Δαμάσκηνο                                 | αντίσταση στις ασθένειες  | 1  |
| Πολωνική                                  | ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα  | 4  |



|   |   |    |
|---|---|----|
| Ελαιοκράμβη                                   |   |    |
| Πατάτα  | αντοχή στα έντομα, αντίσταση στις ασθένειες, ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα, τροποποιημένη ποιότητα προϊόντος       | 41 |
| Ρύζι  | αντοχή στα έντομα, ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα   | 6  |
| Safflower<br>(Αμερικανικό, Μεξικανικό σαφράν) | τροποποιημένο λιπαρό οξύ, αντοχή στα αντιβιοτικά  | 2  |
| Σόγια   | τροποποιημένη ποιότητα προϊόντος, ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα, αντοχή στα έντομα, τροποποιημένη ανάπτυξη/απόδοση | 35 |
| Κολοκύθι                                      | αντίσταση στις ασθένειες  | 2  |
| Ζαχαρότευτλο                                  | ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα  | 3  |
| Ζαχαροκάλαμο                                  | αντοχή στα έντομα   | 4  |
| Τομάτα  | τροποποιημένη ποιότητα προϊόντος, αντίσταση στις ασθένειες, αντοχή στα έντομα                                       | 11 |
| Σιτάρι  | ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα  | 1  |

ΠΗΓΗ: <https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/11/default.asp>

### 3. Θετικές επιδράσεις από τη χρήση ΓΤΟ στις καλλιέργειες

Με την χρήση GMO's στις καλλιέργειες προέκυψαν κέρδη απόδοσης λόγω της επιτυχούς καταπολέμησης των ζιζανίων, των εντόμων και της ξηρασίας. Ακόμα, παρέχεται η δυνατότητα χρήσης λιγότερων καλλιεργήσιμων εκτάσεων και αύξησης των ενδιατημάτων για τη βιοποικιλότητα και την άγρια ζωή χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η επισιτιστική ασφάλεια (Vicini, 2017). Παρατηρήθηκε εξοικονόμηση στα καύσιμα λόγω εφαρμογής λιγότερων σπρέι σε καλλιέργειες GM και λόγω της χρήσης συστημάτων καλλιέργειας μειωμένου οργώματος ή καθόλου οργώματος σε σχέση με τις συμβατικές καλλιέργειες οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην ελάττωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα (Brookes, 2015). Ο σχεδιασμός των ΓΤ καλλιεργειών παρουσιάζει



μεγαλύτερη ευελιξία και ευκολία στη χρήση. Οι καταναλωτές αποκομίζουν οικονομικό όφελος λόγω της πτώσης των τιμών των τροφίμων, γεγονός που οφείλεται στις χαμηλότερες τιμές εμπορευμάτων λόγω της χρήσης ΓΤ καλλιεργειών (Lucht, 2015).

## **4. Στάση των καταναλωτών και των χωρών απέναντι στα ΓΤ**

### **4.1 Στάση των καταναλωτών**

Οι Ευρωπαίοι καταναλωτές είναι αρνητικότεροι και λιγότερο διατεθειμένοι να αγοράσουν ΓΤ τρόφιμα σε σύγκριση με τους καταναλωτές από τη Βόρεια Αμερική. Ανησυχούν για πιθανές αρνητικές επιπτώσεις των ΓΤ τροφίμων στην υγεία τους, τις επιπτώσεις της κατανάλωσης «ξένου» DNA, την πιθανή ύπαρξη αλλεργιογόνων, τοξινών, την πρόκληση βλάβης στο περιβάλλον, την αντοχή στα αντιβιοτικά, την εξάπλωση των εισαχθέντων γονιδίων σε φυτά που δεν αποτελούν στόχο από τη μετακίνηση της γύρης και απρόσμενες αλλαγές στη διατροφική ποιότητα (Lisha et al, 2017). Προβληματισμοί εγείρονται για την κατοχύρωση με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, για τις αρνητικές επιπτώσεις των ΓΤ καλλιεργειών στους μικρούς αγρότες και για την πιθανή συμβολή στην παγκόσμια ανισότητα, για την αυξανόμενη επιρροή των πολυεθνικών εταιρειών στον εφοδιασμό τροφίμων. Στην Ελλάδα υπάρχουν εθνικές απαγορεύσεις για την καλλιέργεια των ΓΤ (Lucht,2015). Τα δομικά και εδαφολογικά χαρακτηριστικά της ελληνικής γεωργίας ευνοούν περισσότερο τη βιολογική καλλιέργεια (Varzakas, 2007).

Η πλειονότητα των καταναλωτών αγνοεί τις διαθέσιμες πληροφορίες για την χρήση των ΓΤ καλλιεργειών ως ζωοτροφών για την ζωική παραγωγή στην Ευρώπη. Η μειονότητα στρέφεται στην αγορά βιολογικών τροφίμων ή σε τρόφιμα τα οποία διαθέτουν επισήμανση ότι είναι ελεύθερα από ΓΤΟ. Συνεπώς, η απορριπτική στάση των Ευρωπαίων καταναλωτών απέναντι στις ΓΤ καλλιέργειες δεν επηρεάζει την πραγματική συμπεριφορά τους (Lucht, 2015).

### **4.2 Πολιτική στάση των χωρών της ΕΕ και των ΗΠΑ απέναντι στις ΓΤ καλλιέργειες**

#### **4.2.1 Πολιτική στάση των χωρών της ΕΕ απέναντι στις ΓΤ καλλιέργειες**

Τα κράτη μέλη της ΕΕ διακρίνονται σε “adopters” (υιοθετούντα) , “conflicted” και “opposed” (αντίθετα) με βάση την αποδοχή της βιοτεχνολογίας των φυτών. Στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται οι χώρες που είτε καλλιεργούν το μοναδικά επιτρεπόμενο καλαμπόκι Bt στην ΕΕ (Ισπανία, Πορτογαλία, Τσεχία, Σλοβακία, Ρουμανία) είτε είναι θετικά προσκείμενες στην μελλοντική του φύτευση (Δανία,

Εσθονία, Φινλανδία, Κάτω Χώρες, Σουηδία, Ηνωμένο Βασίλειο). Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι χώρες (Πολωνία, Γαλλία, Γερμανία, Βουλγαρία, Ιρλανδία, Λιθουανία) όπου το επιστημονικό δυναμικό, οι αγρότες, οι βιομηχανίες ζωοτροφών επιθυμούν την χρήση ΓΤ καλλιεργειών, όμως αντιτίθενται οι καταναλωτές και οι κυβερνήσεις εξαιτίας των ΜΚΟ και ορισμένων πολιτικών κομμάτων. Στην τρίτη κατηγορία εμπίπτουν οι χώρες (Αυστρία, Κροατία, Κύπρος, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιταλία, Μάλτα και Σλοβενία) που αρνούνται την καλλιέργεια ΓΤ (Lucht, 2015).

#### **4.2.2 Πολιτική στάση των ΗΠΑ**

Στον αντίποδα, οι ΗΠΑ εφάρμοσαν τη θεωρία της «ουσιαστικής ισοδυναμίας». Σύμφωνα με αυτήν, όταν ένα καινούριο γενετικά τροποποιημένο προϊόν έχει την ίδια σύσταση με το αντίστοιχο μη ΓΤ, η επισήμανση κρίνεται περιττή καθώς δεν παρέχει στον καταναλωτή πληροφορίες για τη φύση του προϊόντος. Εξαιρέση σε αυτό, αποτελούν τα αλλεργιογόνα και οι αλλαγές στη θρεπτική αξία (Lucht, 2015).

## **5. Απομόνωση DNA – Τεχνικές PCR**

### **5.1 Απομόνωση DNA**

Η καθαρότητα και η δομική ακεραιότητα αποτελούν βασικά κριτήρια που πρέπει να ικανοποιεί μια μονάδα εκχύλισης DNA προκειμένου να παρέχει κατάλληλο πρότυπο DNA για ποσοτική ανάλυση ΓΤΟ.

Όλα τα προϊόντα ζωοτροφών ομογενοποιούνται και το DNA εξάγεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CTAB με μικρή τροποποίηση. Συγκεκριμένα, δείγμα τροφής αλέθεται με ρυθμιστικό διάλυμα CTAB. Το αλεσμένο ομοιογενές δείγμα αναμιγνύεται με ακίδα σε αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης. Ακολουθεί προσθήκη του ρυθμιστικού CTAB, ανάμιξη και προσθήκη πρωτεΐνης Κ. Το μείγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 65 ° C για 60-90 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται RNase και το μείγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 65 ° C για 15-20 λεπτά. Μετά από τρεις φυγοκεντρήσεις, τρεις μεταφορές σε νέους σωλήνες μικροφυγοκέντρησης και προσθήκη χλωροφορμίου, ο όγκος της προκύπτουσας ανώτερης στιβάδας αναμιγνύεται με διάλυμα κατακρήμνισης CTAB και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση και αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, το σφαιρίδιο διαλύεται σε NaCl και αναμιγνύεται με χλωροφόρμιο. Μετά από τρεις φυγοκεντρήσεις, μεταφορές σε σωλήνες μικροφυγοκέντρησης και προσθήκης ισοπροπανόλης το σφαιρίδιο πλένεται με 70% αιθανόλη και φυγοκεντρείται. Η στιβάδα αιθανόλης απομακρύνεται και η υπολειμματική

αιθανόλη ξηραίνεται στον αέρα. Το προκύπτον σφαιρίδιο DNA διαλύεται ξανά σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και η συγκέντρωση του DNA και η ποσότητα μετريέται χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο. Δείγματα γονιδιωματικού DNA διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% βαμμένο με βρωμιούχο αιθίδιο για να εκτιμηθεί η ποιότητά τους. Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα εκχυλισμένα DNA αποθηκεύονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  έως ότου χρησιμοποιηθούν για τα επόμενα στάδια (Cakir, 2015).

Μια άλλη μέθοδος είναι η Dellaporta που χρησιμοποιεί πρώτα ένα βήμα λύσης (θερμικές λύσεις παρουσία Tris HCl, EDTA, CTAB και β-μερκαπτοαιθανόλης) ακολουθούμενη από την απομάκρυνση των επιμολυντών με καθίζηση φαινόλης-χλωροφορμίου. Η μέθοδος έχει επικυρωθεί από το EURL-GMFF για συγκεκριμένη ποσοτικοποίηση της γενετικά τροποποιημένης σειράς σόγιας Roundup Ready (Bellochi, 2010).

Η τεχνική Wizard στηρίζεται στον μαγνητικό καθαρισμό του DNA χρησιμοποιώντας ένα βήμα λύσης (θερμικές λύσεις παρουσία Tris HCl, EDTA, SDS) και εφαρμόζοντας την τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων για την απομόνωση DNA με βάση το διοξείδιο του πυριτίου (Bellocchi, 2010).

## **5.2 Τεχνικές PCR**

### **5.2.1 Ιστορικό**

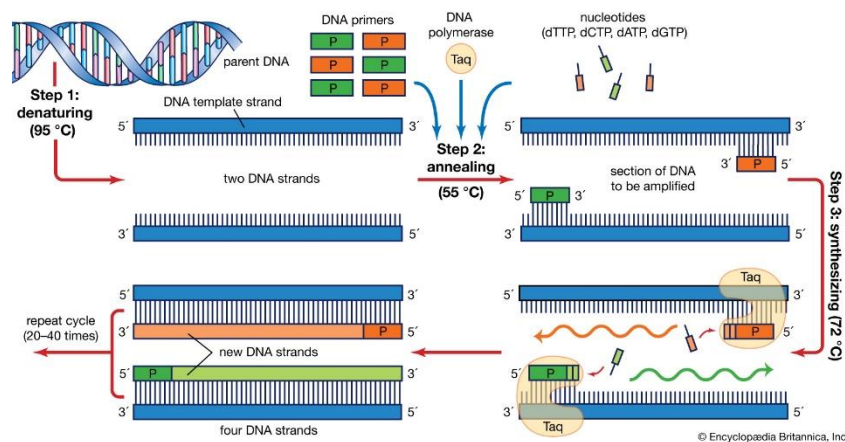
Κατά την αλληλούχιση του αντιγράφου ενός γονιδίου ο Mullis διαπίστωσε ότι η μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας Sanger έδωσε ασθενή σήματα λόγω ανεπαρκούς συγκέντρωσης DNA. Για τον διαχωρισμό κάθε δίκλωνου DNA προστέθηκε παράγοντας μετουσίωσης και προέκυψαν δύο μονόκλιωνα DNA. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε αντίστροφος εκκινητής για να οριοθετηθεί το συνολικό μήκος του αμπλικονίου. Οι δύο παραπάνω ενέργειες συνετέλεσαν στον διπλασιασμό του DNA. Το μειονέκτημα της μεθόδου ήταν η καταστροφή της πολυμεράσης κατά την αποδιάταξη, οπότε θα έπρεπε να προστεθεί σε κάθε κύκλο PCR. Το πρόβλημα αυτό επιλύθηκε με την αντικατάσταση της φρέσκιας πολυμεράσης με εκείνη που παράγουν τα βακτήρια *Thermophilus aquaticus* (Taq polymerase) η οποία επιβιώνει σε θερμοκρασία  $94^{\circ}\text{C}$  (Zhu, 2020).

### **5.2.2 Μέθοδος PCR**

Για την εκτέλεσή της απαιτούνται ρυθμιστικό διάλυμα, δεοξυριβονουκλεοτίδια,  $\text{MgCl}_2$ , εκκινητές και η Taq Πολυμεράση. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται με προσανατολισμό 5' έως 3' στην αλυσίδα του στόχου DNA. Η μέθοδος βασίζεται σε

επαναλαμβανόμενους κύκλους θέρμανσης και ψύξης των κλώνων DNA που γίνονται 20 με 40 φορές περίπου και στην ενζυματική αντιγραφή του DNA. Το θερμοσταθερό ένζυμο (Taq πολυμεράση) επιτρέπει την εκθετική ενίσχυση του DNA ακολουθούμενη από τη μετανάστευση του ενισχυμένου θραύσματος DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Μετά από n κύκλους μπορούν να παραχθούν 2<sup>n</sup> αντίγραφα. Αυτή η τεχνική είναι in vitro και επιτρέπει την εκτίμηση του μεγέθους των θραυσμάτων DNA. Η διαδικασία ενίσχυσης σταματά με την εξάντληση των αντιδραστηρίων και την συσσώρευση προϊόντων PCR (Quan, 2018).

**Σχήμα 3.** Μέθοδος PCR



**ΠΗΓΗ:** <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>

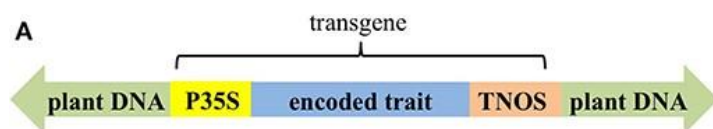
Η PCR σε σχέση με άλλες μεθόδους που στηρίζονται στο DNA πλεονεκτεί λόγω της ειδικότητας, της επαναληψιμότητας, της μεγάλης ευαισθησίας και της ικανότητας ανίχνευσης πληθώρας γονιδιακών κατασκευών (Cakir, 2015).

Τα θραύσματα DNA ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των ΓΤΟ. Με βάση τα διαφορετικά θραύσματα ενίσχυσης των εισαγόμενων αλληλουχιών DNA, οι μέθοδοι ανίχνευσης PCR των ΓΤΟ ομαδοποιούνται σε τέσσερις τύπους, όπως του ελέγχου (screen), του γονιδίου (gene), της δομής (construct) και του εξειδικευμένου γεγονότος (event specific). Η “event specific” PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, δηλαδή τις αλληλουχίες σύνδεσης για ενσωμάτωση μεταξύ ενός διαγονιδιακού κατασκευάσματος και του φυτικού γονιδιώματος. Η χρήση της μεθόδου PCR διευκολύνεται με τα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRMs) των ΓΤΟ (Dong, 2008).

Για την εύρεση ΓΤΟ στις ζωοτροφές ως γονίδια ελέγχου (screening targets) χρησιμοποιούνται συχνότερα το διαγονιδιακό στοιχείο p35S (υποκινητής μωσαϊκού ιού

κουνουπιδιού (CaMV) 35S) και το διαγονιδιακό στοιχείο tNOS (*Agrobacterium tumefaciens* αναστολέας συνθετάσης νοπαλίνης).

**Σχήμα 4.** Γενετικά τροποποιημένο φυτικό κατασκευάσμα



ΠΗΓΗ: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2020.00021/full>

Επίσης, χρησιμοποιούνται το *bar* που είναι το γονίδιο της φωσφοθρικίνης N-ακετυλο τρανσφεράσης του βακτηρίου *Streptomyces hygrosopicus*. Το *pat* προέρχεται από τον *Streptomyces viridochromogenes* και το *nptII* είναι η φωσφοτρανσφεράση II της νεομυκίνης (Ribarits, 2020). Ο ρόλος της φωσφοθρικίνης N-ακετυλο τρανσφεράσης είναι η κατάλυση της ακετυλίωσης της 1-φωσφοθρικίνης (Eck, 2013). Η ζιζανιοκτόνος δράση της φωσφοθρικίνης οφείλεται στην αναστολή του ενζύμου συνθετάση της γλουταμίνης το οποίο συνθέτει την γλουταμίνη και αποτοξινώνει τους φυτικούς οργανισμούς από την αμμωνία (Christ, 2017).

Συνοπτικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό GM συστατικών με τη μέθοδο PCR ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα. Αρχικά, παρασκευάζεται το δείγμα και εκχυλίζεται το DNA. Ακολουθεί ανάλυση PCR για την ενίσχυση της διαγονιδιακής αλληλουχίας στόχου, της φυσικής αλληλουχίας αναφοράς και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Morcia, 2020).

Πληθώρα πλατφορμών χρησιμοποιούνται για την τμηματοποίηση των αντιδράσεων PCR, όπως ενεργές πλατφόρμες διαχωρισμού με βάση μηχανικό βοήθημα για το σχηματισμό διαμερισμάτων, πλατφόρμες παθητικής διαμερισματοποίησης υπό την επίδραση των ρευστών, πλατφόρμες αυτο-ψηφιοποίησης που συνδυάζουν τόσο μη ενεργητική πλήρωση όσο και διαχωρισμό και πλατφόρμες με σταγονίδια που δρουν ως μικροαντιδραστήρες. Το πλήθος των καταμήσεων και ο αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να επεξεργαστούν σε μία εκτέλεση αποτελούν τις πιο αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις μεταξύ των πλατφορμών (Morcia, 2020).

### 5.2.3 Πλεονεκτήματα RTi – PCR έναντι συμβατικής και προβλήματα

Η PCR σε πραγματικό χρόνο (RTi-PCR) είναι η συνηθέστερη από τις μεθόδους εντοπισμού ΓΤΟ (Turkes, 2015). Είναι καλύτερη από τη συμβατική PCR, λόγω της

ποσοτικής απόδοσής της, της μεγαλύτερης ευαισθησίας και της χρήσης δοκιμών κλειστού σωλήνα παρακάμπτοντας τις τροποποιήσεις μετά την ενίσχυση και μειώνοντας τον κίνδυνο μόλυνσης (Cankar, 2006). Επίσης, είναι ταχεία, φιλική προς το χρήστη και με μεγάλο εύρος εφαρμογών. Η προέλευση του δείγματος DNA επηρεάζει την ανάλυση. Απαιτείται DNA υψηλής ποιότητας για ακριβή ποσοτικοποίηση. Η διαδικασία απομόνωσης DNA μπορεί να επιδράσει στην ποσοτικοποίηση, καθώς οι μέθοδοι ποικίλλουν ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην απομάκρυνση ουσιών που εμπλέκονται στην αντίδραση PCR. Ακόμα, συστατικά των διαλυμάτων απομόνωσης DNA μπορούν να επηρεάσουν τις αντιδράσεις PCR. Συνεπώς, η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου εκχύλισης για ένα δείγμα είναι ακρογωνιαίος λίθος για μια επιτυχή ανάλυση. Η ποσοτικοποίηση των ΓΤΟ γίνεται με μια καμπύλη που παράγεται από αραιώσεις υλικών αναφοράς. Η αντίδραση παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ενίσχυσης και η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ανάλυση του φθορισμού σήματος στην εκθετική φάση.

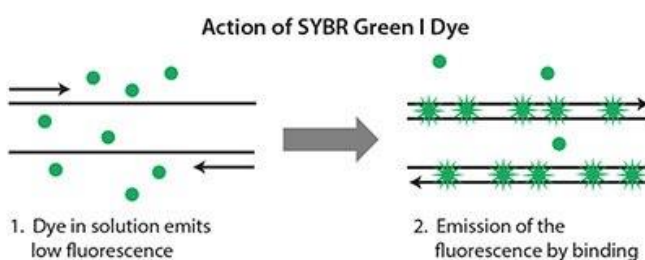
Η ποσότητα του προϊόντος που συντίθεται κατά τη διάρκεια της PCR μετρείται σε πραγματικό χρόνο με την ανίχνευση ενός σήματος φθορισμού. Οι συνηθέστερες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του σήματος φθορισμού είναι ο εξειδικευμένος ιχνηθέτης φθορισμού (Taqman) και οι χρωστικές φθορισμού που δεσμεύουν το δίκλωνο DNA (π.χ. SYBR Green I, Eva Green). Η καταγραφή της εκπεμπόμενης ποσότητας φθορισμού σε κάθε κύκλο παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης και στη συνέχεια συσχετίζεται το σήμα φθορισμού με την αρχική ποσότητα του προτύπου στόχου (Broeders, 2012).

## 5.2.4 Τεχνολογίες παραγωγής σήματος φθορισμού

### 5.2.4.1 Μέθοδος SYBR Green

Στην SYBR Green χημεία χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I που έχει την ικανότητα να συνδέεται με κάθε δίκλωνο DNA ακόμα με μη ειδικά προϊόντα PCR και με διμερείς εκκινητές. Λύση σε αυτό παρέχει η ανάλυση της καμπύλης τήξης στο τέλος

Σχήμα 5. Μέθοδος SYBR Green

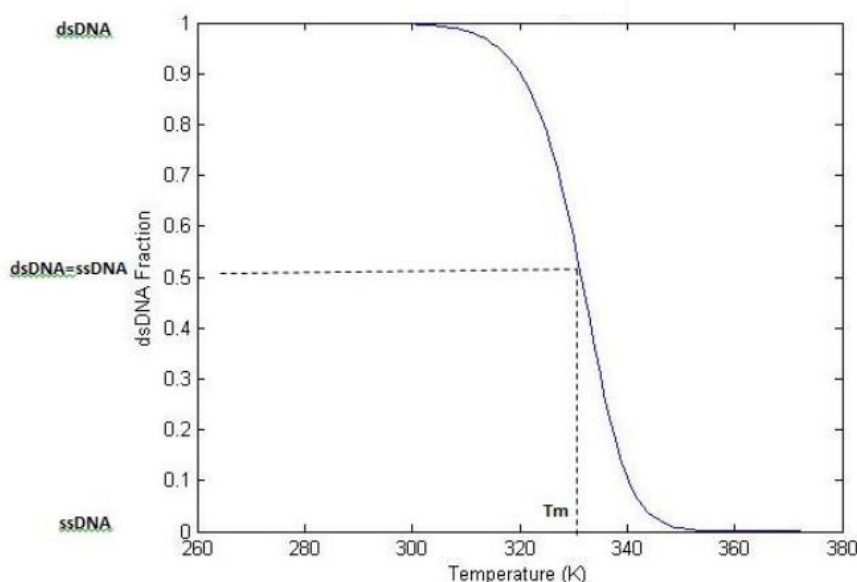


ΠΗΓΗ: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/quantitative-pcr-and-digital-pcr-detection-methods>



της PCR, δηλαδή η μέτρηση της διάστασης του DNA σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία (Broeders, 2012). Κάθε δίκλωνο DNA έχει μια συγκεκριμένη θερμοκρασία τήξης ως άμεση ιδιότητα του περιεχομένου νουκλεοτιδίων του. Η τιμή  $T_m$  αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασία στην οποία το 50% του SYBR® Green φθορισμού χάνεται λόγω μετουσίωσης και διαχωρισμού κλώνου του τελικού προϊόντος PCR. Με βάση αυτή τη θερμοκρασία τήξης, είναι εφικτή η διάκριση των μη ειδικών θραυσμάτων από τα ειδικά προϊόντα PCR. Επίσης, η τιμή  $C_t$  της qPCR αντιπροσωπεύει το χρονικό σημείο κατά το οποίο η αντίδραση PCR φθάνει σε ένα προκαθορισμένο επίπεδο «κατώφλι». Αυτό το επίπεδο λαμβάνει υπόψη τις διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων αντίδρασης και την έναρξη της μετρήσιμης εκθετικής ενίσχυσης.

**Εικόνα 3.** Καμπύλη τήξης DNA



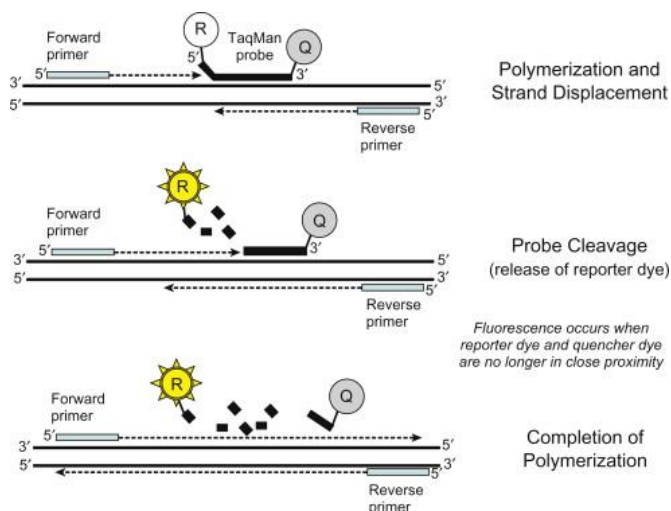
**ΠΗΓΗ:** <https://labmedicineblog.com/2016/06/06/hybridization-conditions-and-melting-temperature/>

Η χημεία SYBR Green είναι φθηνότερη γιατί δεν απαιτείται επισημασμένος φθορίζοντας ανιχνευτής, όπως γίνεται στην τεχνολογία TaqMan (Broeders, 2012). Εμφανίζει ισχυρό σήμα φθορισμού, αλλά έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί ανασταλτικά στην αντίδραση PCR, ότι έχει μικρό δυναμικό εύρος και χαμηλότερη αναπαραγωγιμότητα από άλλες χημικές ουσίες ανίχνευσης. Αντιθέτως, η Eva Green χρωστική είναι περισσότερη σταθερή και δύναται να χρησιμοποιηθεί σε συνθήκες κορεσμού για την δημιουργία μεγαλύτερων σημάτων φθορισμού (Eischeid, 2011).

### 5.2.4.2 Μέθοδος TaqMan

Η χημεία TaqMan χρησιμοποιεί τρία εξειδικευμένα ολιγονουκλεοτίδια, συγκεκριμένα δύο εκκινητές και έναν ιχνηθέτη. Ο ιχνηθέτης είναι επισημασμένος στο 5' άκρο με φθορίζουσα βαφή «reporter – δότης» και στο 3' με «quencher – αποδέκτης». Αφού οι δύο βαφές βρίσκονται σε μικρή απόσταση, η εκπομπή φθορισμού της βαφής «reporter» αποτρέπεται από τον «quencher». Κατά το χρονικό διάστημα της φάσης επιμήκυνσης της PCR σε πραγματικό χρόνο, η Taq πολυμεράση διασπά τον ανιχνευτή (5' → 3' δραστηριότητα εξωνουκλεάσης). Ο φθορισμός από τον απελευθερωμένο «reporter» εντοπίζεται και παρακολουθείται. Επίσης, μεγαλώνει αναλογικά με την ποσότητα DNA που υπάρχει στην αντίδραση με κάθε κύκλο ενίσχυσης. Αυτό συνδέεται με την αύξηση του αριθμού αντιγραφής του ενισχυμένου στόχου (Broeders, 2012).

Σχήμα 6. Μέθοδος TaqMan



ΠΗΓΗ: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/taqman>

### 5.2.4.3 Μέθοδος AmpliFluor, Plexor, Lux, μοριακών φάρων, CPT και LNA

Επίσης, για την ανίχνευση χρησιμοποιούνται οι τεχνολογίες AmpliFluor, Plexor, Lux που βασίζονται στους εκκινητές καθώς και εκείνες με τους διπλά – επισημασμένους ανιχνευτές που περιλαμβάνουν υβριδοποίηση (μοριακός φάρος) και υδρόλυση (CPT και LNA).

#### 5.2.4.3 Μέθοδος Lux

Στη μέθοδο Lux ένας από τους εκκινητές έχει επισημανθεί πλησίον του 3' άκρου που σβήνει από την δομή της φουρκέτας του εκκινητή. Η φουρκέτα επεκτείνεται με αποτέλεσμα ο φθορισμός να αυξάνει έως και 8 φορές.

#### 5.2.4.3 Μέθοδος Plexor

Στη μέθοδο Plexor καθώς αυξάνεται το πλήθος των προϊόντων PCR το σήμα φθορισμού διαγράφει πτωτική πορεία.



#### **5.2.4.3 Μέθοδος AmpliFluor**

Στην AmpliFluor τεχνολογία χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές ειδικοί για το στόχο DNA και ένας με μορφή φουρκέτας. Ένας από τους ειδικούς εκκινητές διαθέτει στο 5' άκρο την αλληλουχία Z όπως και ο εκκινητής φουρκέτας την έχει ως ουρά. Κατά την παραγωγή των προϊόντων PCR δημιουργείται ο συμπληρωματικός κλώνος των αλληλουχιών Z και η ουρά του εκκινητή – φουρκέτα μπορεί να επιμηκύνει τα νεοσυντιθέμενα προϊόντα. Το σβήσιμο τερματίζεται όταν η φουρκέτα απομακρυνθεί αφού συντεθεί ο συμπληρωματικός της κλώνος.

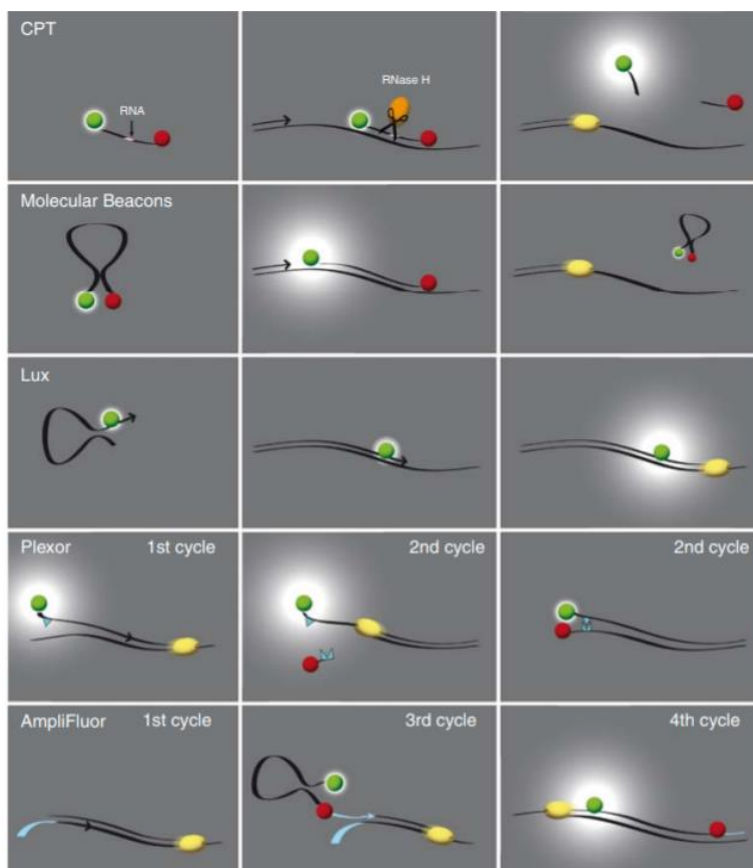
#### **5.2.4.3. Μέθοδος μοριακών φάρων**

Όσον αφορά τους μοριακούς φάρους (molecular beacons) που είναι ανιχνευτές υβριδισμού, αυτοί απαρτίζονται από μια περιοχή βρόχου συγκεκριμένης αλληλουχίας που οριοθετείται από δύο αντεστραμμένες επαναλήψεις που δημιουργούν δομή φουρκέτας. Αφού ξεδιπλωθούν, ενώνονται σε συμπληρωματική αλληλουχία στόχου, ξεχωρίζοντας με αυτόν τον τρόπο το φθοροφόρο από τον “quencher”, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του φθορισμού.

#### **5.2.4.3 Μέθοδος CPT**

Στην τεχνολογία CPT (Cycling Probe Technology) ο ανιχνευτής διαθέτει ένα τροποποιημένο RNA νουκλεοτίδιο που μετά την υβριδοποίηση δημιουργεί δίκλωνο RNA – DNA. Έπειτα, η ριβονουκλεάση H κόβει το δίκλωνο μόριο οπότε ο “quencher” αποχωρίζεται από τον “reporter” οδηγώντας σε αύξηση του φθορισμού.

**Σχήμα 7.** Μέθοδος CPT, μοριακών φάρων, Lux, Plexor, AmpliFluor



ΠΗΓΗ: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-009-3418-0>

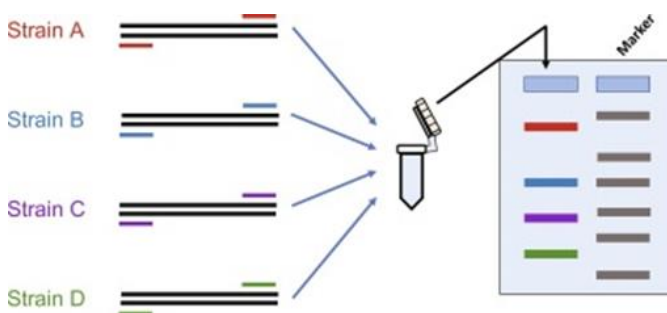
### 5.2.4.3. Μέθοδος LNA

Στην LNA (locked nucleic acids) τεχνολογία τα νουκλεοτίδια έχουν στην ριβόζη τους μια επιπρόσθετη γέφυρα 2' - O, 4' μεθυλένιο και «κλειδώνουν» τον ανιχνευτή στο στόχο (Buh Gašparič, M, 2010).

### 5.2.5. PCR oligoplex – multiplex

Οι τεχνικές PCR χωρίζονται σε oligoplex και multiplex, με το oligoplex να τίθεται ως δέκα στόχοι ή λιγότεροι σε μια μόνο αντίδραση (Nadal, 2018). Σε σχέση με την ποσοτική PCR παρουσιάζεται το πλεονέκτημα της μείωσης του αριθμού των αντιδράσεων που απαιτούνται για τη δοκιμή της πιθανής παρουσίας ΓΤΟ σε ένα

**Σχήμα 8.** Multiplex PCR



ΠΗΓΗ: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/multiplex-polymerase-chain-reaction>

δείγμα. Επίσης, εκμηδενίζεται η πιθανότητα εμφάνισης διαφοροποιήσεων στους σωλήνες που μπορεί να οφείλονται σε σφάλματα της πιπέτας οπότε αυξάνεται η αξιοπιστία της μεθόδου (Bahrtdt,2010). Στη πολλαπλή PCR σε σύγκριση με την απλή εμφανίζεται πολυπλοκότερος σχεδιασμός και βελτιστοποίηση, καθώς οι συνθήκες δεν είναι δυνατόν να βελτιστοποιηθούν μεμονωμένα για τον εκάστοτε στόχο PCR. Παράλληλα, υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των στόχων PCR για πόρους στην αντίδραση. Εξαιτίας της μεγάλης πολυπλοκότητας μπορεί να σχηματιστούν διμερή εκκινητών με αποτέλεσμα την ύπαρξη αναληθών αποτελεσμάτων που οφείλονται είτε σε ελαττωμένη ευαισθησία λόγω των ανταγωνιστικών επιδράσεων είτε σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η απόδοση αυτής της στρατηγικής περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα των βαφών με φάσμα εκπομπής και απορρόφησης φθορισμού αρκετά διακριτό για την αποφυγή επικαλύψεων σημάτων (Nadal, 2018).

Οι πλατφόρμες σμίκρυνσης της κλίμακας από μικρόλιτρα σε νανόλιτρα και της μικρορευστής δυναμικής συστοιχίας συνδυάζουν χιλιάδες ξεχωριστούς θαλάμους αντίδρασης σε μία μόνο συσκευή, παρέχοντας μικροσκοπικό qPCR, με ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο σε κάθε θάλαμο αντίδρασης, επιτρέποντας την αξιολόγηση των μεμονωμένων καμπύλων ενίσχυσης με τον ίδιο τρόπο όπως στις συμβατικές πλατφόρμες qPCR. Όμως, ο όγκος της αντίδρασης μειώνεται περίπου 1000 φορές. Αυτό σημαίνει ότι ο αριθμός των ειδικών στόχων DNA ανά αντίδραση, επεξηγηματικότερα ο αριθμός των μορίων DNA στο δείγμα που περιέχουν το θραύσμα που πρόκειται να ενισχυθεί μέσω της αντίδρασης PCR, μειώνεται επίσης από περίπου δέκα σε συμβατικό qPCR για ένα μόνο δείγμα κοντά στο όριο ανίχνευσης (LOD) σε ένα στις 100 αντιδράσεις (σε ξεχωριστά σταγονίδια ) σε αυτές τις πλατφόρμες. Συνεπώς ο αριθμός των αντιδράσεων ανά στόχο πρέπει να αυξηθεί από μερικές σε μερικές εκατοντάδες για να επιτευχθεί το ίδιο LOD μειώνοντας έτσι την εφαρμογή αυτών των πλατφορμών για ανίχνευση ΓΤΟ χωρίς περαιτέρω τροποποίηση. Η επιλογή της αύξησης της συγκέντρωσης DNA με παράγοντα 1000 καθιστά πρακτική την ποσοτικοποίηση ΓΤΟ και μπορεί ακόμα να είναι χρήσιμη ποιοτικά, υπό την προϋπόθεση ότι το LOD επιτυγχάνεται για όλους τους στόχους.

### **5.2.6 Digital PCR**

Προκειμένου να ξεπεραστούν ορισμένα από τα προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν κατά την προσέγγιση της qPCR, ιδιαίτερα στην παρουσία αναστολέων ή στους διαγονιδιακούς αριθμούς αντιγραφής, χρησιμοποιείται η τεχνολογία του dPCR

όπου σήματα φθορισμού συλλέγονται μέσω μέτρησης του τελικού σημείου. Είναι κατάλληλη για την εύρεση παραλλαγών στα αλληλόμορφα. Αναγνωρίζει σπάνιους και λιγότερους στόχους αριθμού αντιγράφων για την αξιολόγηση διαφορών στον αριθμό αντιγράφου. Ο ποσοτικός προσδιορισμός που πλεονεκτεί σε σύγκριση με το qPCR οφείλεται στο γεγονός ότι η τυχαία κατανομή μορίων σε πολλά διαμερίσματα ακολουθεί μια κατανομή Poisson (Quan,2018).

Συγκεκριμένα, το σύστημα dPCR διακρίνεται στο cdPCR (chamber) και στο ddPCR (droplet). Στην πρώτη περίπτωση στον θάλαμο cdPCR χρησιμοποιούνται θάλαμοι μικρορευστών που διαθέτουν πολλά τμήματα (έως μερικά 1000) μεμονωμένων αντιδράσεων. Η τεχνολογία αυτή εφαρμόστηκε για την εύρεση διαγονιδιακού συμβάντος (MON810) στο GM καλαμπόκι. Το ddPCR εξαρτάται από τον φθορισμό του τελικού σημείου ταυτοποίησης ή του στόχου, ενώ το cdPCR παρακολουθεί την επέκταση στην παρούσα κατάσταση όπως στην περίπτωση του qPCR (Salisu, 2017).

#### **5.2.6.1 Droplet digital PCR**

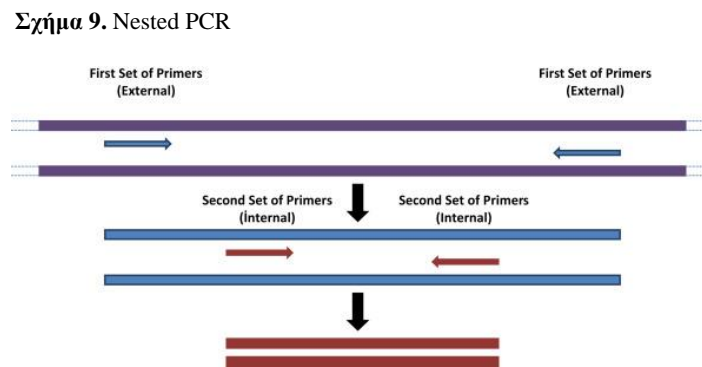
Η ελάττωση τάξης μεγέθους της κλίμακας από μικρόλιτρα σε νανόλιτρα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ψηφιακού PCR σταγονιδίων (ddPCR). Το ddPCR ορίζεται ως ο διαχωρισμός ενός δείγματος PCR σε εκατομμύρια κλάσματα, συνήθως μέσω γαλακτωμάτων νερού σε λάδι. Στο ddPCR, πραγματοποιείται αραίωση και κατανομή του δείγματος σε έως και εκατομμύρια ξεχωριστές αντιδράσεις, ώστε τα περισσότερα να περιέχουν ένα ή καθόλου αντίγραφα της επιθυμητής ακολουθίας. Χρησιμοποιώντας τη κυτταρομετρία ροής επιτυγχάνεται η μέτρηση του αριθμού των «θετικών» κατατμήσεων, στις οποίες ανιχνεύεται η ακολουθία, έναντι των «αρνητικών» διαμερισμάτων, στις οποίες δεν εντοπίζεται, οπότε προσδιορίζεται με ακρίβεια πόσα αντίγραφα ενός μορίου DNA ήταν στο αρχικό δείγμα. Παρέχεται ακριβής και απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός των στόχων, χωρίς την ανάγκη καμπυλών βαθμονόμησης. Σε σύγκριση με το qPCR, ο προσδιορισμός ddPCR έδειξε καλύτερη επαναληψιμότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις στόχων. Σε σχέση με το cdPCR, το δυναμικό εύρος είναι μεγαλύτερο ενώ το κόστος λειτουργίας, οι συσκευές και οι χρησιμοποιούμενες συστοιχίες είναι φθηνότερες. Έχει αποδειχθεί ότι οι προαναφερθείσες μέθοδοι πληρούν τα κριτήρια ποιότητας όπως ορίζονται για μεθόδους ΓΤΟ για τον συνήθη ποσοτικό προσδιορισμό ποικιλιών ΓΤ αραβοσίτου και με οικονομικά αποδοτικό τρόπο.

Η πολλαπλή ποσοτική PCR βασισμένη σε συστοιχίες DNA (MQDA – PCR) βρίσκει εφαρμογή στη ταυτοποίηση διαγονιδιακών φαινόμενων στο GM καλαμπόκι.

Χρησιμοποιείται εξειδικευμένος PCR εκκινητής που διαθέτει μια κοινή ουρά ώστε να επαναχρησιμοποιηθεί στην επόμενη PCR για το γονίδιο. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, παρατηρείται το σήμα που έχει προκύψει από τον υβριδισμό των ενισχυμένων προϊόντων με ιχνηθέτες που φθορίζουν στη συστοιχία DNA (Salisu, 2017).

### 5.2.7 Nested PCR

Η ένθετη ανάλυση PCR περιλαμβάνει μια πρωτογενή και μια δευτερεύουσα PCR για να αυξήσει την ειδικότητα και την ευαισθησία της. Το πρωτεύον προϊόν PCR λειτουργεί ως πρότυπο για τη δευτερεύουσα PCR ώστε να μην δημιουργηθούν διμερείς εκκινητές ή μη ειδικά προϊόντα καθώς και ψευδή θετικά και αρνητικά αποτελέσματα. Επίσης, στόχος είναι να επιτευχθεί διαχωρισμός μεταξύ ειδικών και μη ειδικών ζωνών DNA. Συνεπώς η ένθετη PCR παρέχει τη δυνατότητα εντοπισμού χαμηλών επιπέδων ΓΤΟ. Δύναται να εφαρμοστεί για τον εντοπισμό γενετικών τροποποιήσεων στον αραβόσιτο Bt-176 και στη σόγια GTS 40-3-2 (σόγια RR). Όσα δείγματα εμφανίσουν θετικό σήμα για ειδικά είδη γονιδίων αναλύονται για να βρεθεί ποια γενετική τροποποίηση συναντάται στην τροφή. Τα εξωτερικά και εσωτερικά ζεύγη εκκινητών σχεδιάζονται με βάση την εύρεση της διαγονιδιακής περιεκτικότητας των δειγμάτων τροφής για τις επιτρεπόμενες ΓΤ (π.χ. Bt-176, Bt-11, GTS-40-3-2). Η μέθοδος αυτή είναι ταχεία και έχει χαμηλότερο κόστος από άλλες τεχνικές PCR (Çakır, 2016).



**ΠΗΓΗ:** <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/nested-polymerase-chain-reaction>

### 5.2.8 Σύστημα CGE

Η μέθοδος της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης πηκτής βασίζεται στην πραγματοποίηση πολλαπλής αντίδρασης PCR με την χρήση πρόσθιων εκκινητών οι οποίοι έχουν σημειωθεί με φθορισμό και στη διάκριση ενισχυτή παραπλήσιου μεγέθους με την μέθοδο CGE. Σε σύγκριση με το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, παρουσιάζει ισχύ μεγαλύτερης ανάλυσης για την ανίχνευση προϊόντων PCR. Επιπλέον, πενταπλό (pentaplex) και εξαπλό (hexaplex) PCR έχουν σχεδιαστεί ειδικά για τον εντοπισμό GM καλαμποκιού και βαμβακιού. Ένα τετραπλό σύστημα PCR προτείνεται για την ταυτοποίηση διαγονιδιακών φαινομένων από γενετικώς τροποποιημένο καλαμπόκι,

(γονίδιο Bt11) GM σόγιας (γονίδιο GTS40-3-2) με την χρήση συσκευών ηλεκτροφόρησης (Salisu,2017).

### **5.2.9 Μικροσυστοιχίες DNA πολλαπλή PCR**

Οι μικροσυστοιχίες DNA είναι διαφάνειες μικροσκοπίου που εκτυπώνονται με χιλιάδες μικροσκοπικά σημεία σε καθορισμένες θέσεις, με κάθε σημείο να περιέχει μια γνωστή αλληλουχία ή γονίδιο DNA. Η τεχνολογία τσιπ DNA σε συνδυασμό με την πολλαπλή PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό διαφορετικών διαγονιδιακών γεγονότων από ΓΤΟ, ανιχνεύοντας μεγάλο αριθμό γενετικών στοιχείων από σύνθετα δείγματα DNA με μία μόνο ανάλυση. Η μέθοδος στηρίζεται στο ότι πολυάριθμοι ιχνηθέτες συνδέονται σε μια στερεή επιφάνεια κατά τρόπο κηλίδας με μεμονωμένο σημείο να έχει πολλά αντίγραφα του ανιχνευτή. Το απομονωμένο DNA του επιθυμητού δείγματος που υβριδοποιείται με μια σειρά, επισημαίνεται με φθορισμό. Στο στάδιο υβριδοποίησης, το επισημασμένο τμήμα του DNA παραμένει σε συνδυασμό με τους επισημασμένους ανιχνευτές με βάση τις αντίθετες αλληλουχίες DNA. Έπειτα οι αλληλουχίες που παρουσιάζουν ελάχιστη σύνδεση στους ανιχνευτές μαζί με τις υπόλοιπες ελεύθερες σημασμένες αλληλουχίες απομακρύνονται και έπειτα σαρώνεται η συστοιχία ώστε να ελεγχθεί η ένταση του φθορισμού για κάθε σημείο.

### **Εντοπισμός UGMO's (Unauthorised Genetically Modified Organisms)**

Για τον εντοπισμό μη εξουσιοδοτημένων ΓΤΟ χρησιμοποιείται η αφαιρετική προσέγγιση που στηρίζεται στον έλεγχο στοιχείων που συνδέονται με ΓΤΟ και καλλιέργειες που έχουν περιγραφεί σε ερευνητικές εργασίες. Η ύπαρξη οποιουδήποτε ΓΤ σχετιζόμενου με το DNA όπως υποκινητές, αλληλουχίες κωδικοποίησης σε ένα μικτό δείγμα θα πρέπει να ανήκει σε τουλάχιστον μία από τις εγκεκριμένες αλληλουχίες ΓΤ. Συγκεκριμένα, διεξάγεται έλεγχος των στοιχείων και περιορισμός των δυνητικά υπαρχόντων GM γεγονότων. Έπεται η πραγμάτωση των qPCR και εάν ο συγκερασμός των εντοπισμένων συμβάντων αδυνατεί να εξηγήσει την ύπαρξη τους τότε μπορεί να συναχθεί η παρουσία ενός πιθανού UGMO. Αναλύοντας την αλληλουχία επιβεβαιώνεται η παρουσία του UGMO (Nadal, 2018).

## **6. Η χρήση των ΓΤ καλλιεργειών στις ζωοτροφές**

Οι πρώτες ύλες των ζωοτροφών συχνά κρίνονται ελλιπείς σε κάποιο θρεπτικό συστατικό ή η βιοδιαθεσιμότητα ενός θρεπτικού τους παράγοντα είναι χαμηλή ή ελαττώνεται εξαιτίας ενός αντιδιατροφικού συστατικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον

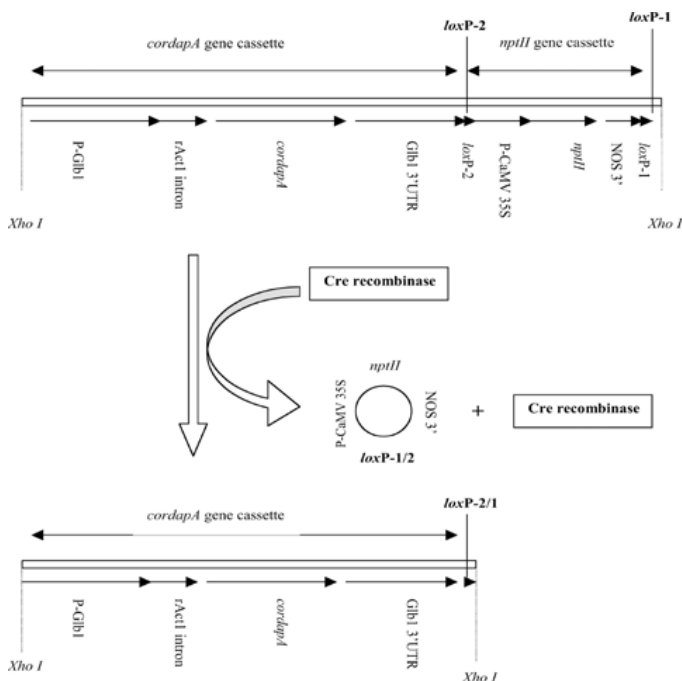
περιορισμό της ζωικής παραγωγής. Για αυτό το λόγο αναπτύσσονται καλλιέργειες με τροποποιήσεις που αποσκοπούν στην αύξηση της συγκέντρωσης ενός συγκεκριμένου θρεπτικού συστατικού, συντελώντας έτσι σε βελτιωμένες διατροφικές ιδιότητες (Chapter 6, 2008).

Τα πουλερικά και οι χοίροι που διατρέφονται κυρίως με σόγια και αραβόσιτο χρειάζονται επιπλέον λυσίνη για να έχουν τη μέγιστη ανάπτυξη και παραγωγή. Η λυσίνη αυτή υπάρχει στο εμπόριο και παράγεται από τη ζύμωση του *Corynebacterium glutamicum* ή *Brevibacterium lactofermentum*. Με τη χρήση της βιοτεχνολογίας, το γονίδιο *cordapA* εισήχθη στο γονιδίωμα του αραβοσίτου, παράγοντας κόκκους αραβοσίτου με μεγαλύτερη ποσότητα λυσίνης (LY038) δηλαδή με μεγαλύτερη θρεπτική αξία. Οι παραπάνω κόκκοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τροφή σε χοίρους, γαλοπούλες και κοτόπουλα (Chapter 6, 2008).

### 6.1 Παραγωγή αραβόσιτου λυσίνης

Σε αραβόσιτο εισήχθη ευθύγραμμο τμήμα πλασμιδίου με τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες *cordapA* και *nptII*. Το γονίδιο *nptII* είναι υπεύθυνο για την αντίσταση σε ορισμένες αμινογλυκοσίδες, όπως η νεομυκίνη. Καλλιεργώντας παρουσία νεομυκίνης, παρατηρήθηκε ανάπτυξη μόνο των επιτυχώς μετασηματισμένων φυτικών κυττάρων. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο PCR εντοπίστηκαν τα φυτά που περιείχαν το γονίδιο *cordapA* και συνέχισε ο πολλαπλασιασμός αυτών.

Σχήμα 10. Εισαγωγή LY038



Το γονίδιο *cordapA* κωδικοποιεί μια διϋδροδιπικολινική συνθάση από το *Corynebacterium glutamicum* (cDHDPS). Ο υποκινητής της σφαιρίνης 1 (Glb1) ελέγχει το γονίδιο *cordapA* και την έκφραση της πρωτεΐνης cDHDPS. Τα εσώνια που βρίσκονται μετά τον υποκινητή ενισχύουν τη μεταγραφή του DNA (Chapter 6, 2008).

#### **6.1.1 Σύγκριση συμβατικού αραβοσίτου και αραβοσίτου λυσίνης**

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την εύρεση τυχόν διαφορών ανάμεσα στον αραβόσιτο λυσίνης και τον συμβατικό. Τα ευρήματα φανέρωσαν ότι δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στον φαινότυπο, στα χαρακτηριστικά αδράνειας και βλάστησης, στη μορφή και στη βιωσιμότητα της γύρης. Όσον αφορά τη σύσταση, διαπιστώθηκε η αναμενόμενη αύξηση στο ποσοστό της λυσίνης και αύξηση σε ενώσεις σχετιζόμενες με τη λυσίνη που παράγονται κατά τον καταβολισμό της. Επίσης, η αλληλουχία της πρωτεΐνης cDHDPS δεν προσομοιάζει με εκείνη των γνωστών αλλεργιογόνων και τοξινών. Στην προβλεπόμενη υποχρόνια μελέτη τοξικότητας δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες στους αρουραίους (Chapter 6, 2008).

#### **6.2 Καλαμπόκι με γονίδιο φυτάσης από το *Escherichia Coli***

Στα φυτικά οξέα αποθηκεύεται ο φώσφορος και η ινοσιτόλη των φυτών. Τα μη μηρυκαστικά ζώα διασπών μερικώς τα φυτικά οξέα με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται φώσφορος στο περιβάλλον που λειτουργεί ως ρυπαντικός παράγοντας. Για το λόγο αυτό, στη τροφή των ζώων προστίθεται μικροβιακή φυτάση για να ελαττώσει το ποσοστό του φωσφόρου που καταλήγει στο περιβάλλον. Εναλλακτική λύση αποτελεί το γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι (CBP) με προϊόν φυτάσης που εκφράζεται στο ενδοσπέρμιο του πυρήνα του καλαμποκιού.

Στη μελέτη των Nyannor και Adeola συγκρίθηκαν διάφορες παράμετροι των κοτόπουλων με βάση την προσθήκη CBP ή μικροβιακής φυτάσης στην τροφή τους. Διαπιστώθηκε ότι σε εκείνα που περιείχε η τροφή τους CBP υπήρχε καλύτερη ορυκτοποίηση των οστών σε σχέση με εκείνες που κατανάλωσαν μικροβιακή φυτάση, αλλά στην απόδοσή τους δεν παρατηρήθηκε διαφορά (Nyannor, 2007).

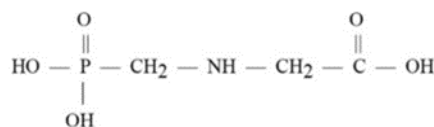
#### **6.3 Roundup Ready (RR) σόγια**

Η σόγια είναι ιδανική για την διατροφή των πουλερικών και των χοίρων λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε λυσίνη, αργινίνη και τρυπτοφάνη (Sieradzki, 2021). Η ανθεκτικότητα της σόγιας στη γλυφοσάτη που ανήκει στην ποικιλία *Roundup Ready*



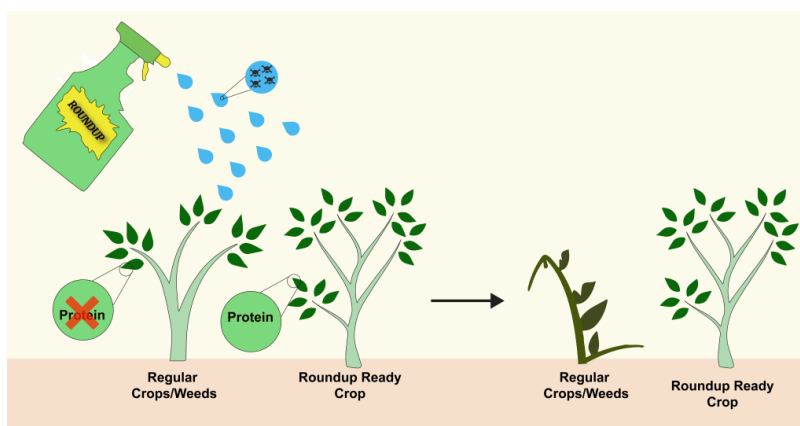
(RR) οφείλεται σε γονίδιο που διαθέτει από το μικρόβιο του εδάφους *Agrobacterium sp.* στέλεχος CP4 που κωδικοποιεί το γονίδιο *cp4 epsps*. Από τις αναλύσεις που διεξάχθηκαν δεν παρουσιάστηκαν αξιοσημείωτες δομικές ομοιότητες μεταξύ CP4 EPSPS και αλλεργιογόνων ή τοξικών πρωτεϊνών. Επίσης, η ταχεία αποικοδόμηση του CP4 EPSPS από την πεψίνη και από την παγκρεατίνη επιβεβαιώνει ότι είναι αδύνατο η πρωτεΐνη να έχει αλλεργιογόνο ή τοξική δράση καθώς και ότι δεν θα υπάρξει σοβαρή έκθεση σε ακέραιο CP4 EPSPS μέσω της τροφής από καλλιέργειες που εκφράζουν αυτήν την πρωτεΐνη. Επίσης, για την εκτίμηση της πιθανής τοξικότητας στα θηλαστικά διεξάχθηκε έρευνα οξείας τοξικότητας με ποντίκια όπου χορηγήθηκε στοματικά δόση 572 mg / kg σωματικού βάρους, ποσότητα ιδιαίτερα μεγαλύτερη από τις εκείνες που εκτίθενται οι άνθρωποι από τρόφιμα που υπάρχει το CP4 EPSPS και δεν διαπιστώθηκαν αρνητικά αποτελέσματα (Chinnadurai, 2018). Οι Βόην κ.α. διαπίστωσαν ότι η GM - σόγια περιέχει υψηλότερα ποσοστά παλμιτικού οξέος σε σχέση με την οργανική.

**Εικόνα 4.** Χημικός τύπος γλυφοσάτης



**ΠΗΓΗ:** doi:10.1016/b978-0-08-091809-9.00013-3

**Εικόνα 5.** Roundup Ready σόγια



**ΠΗΓΗ:** <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/roundup-ready-crops/>

Για την αξιολόγηση του κινδύνου μελετάται τόσο ο δυνητικός κίνδυνος της εισαγόμενης πρωτεΐνης, όσο και η έκθεση. Τα ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης επηρεάζονται από το γονότυπο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι γονοτυπικοί παράγοντες σχετίζονται με τα γονίδια που ρυθμίζουν την πρωτεΐνη ή την γενετική σύσταση του φυτού. Η ύπαρξη πολλαπλών αντιγραφών στα γονίδια συνδέεται με διαφοροποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης με θετικό ή αρνητικό τρόπο. Ακόμα,

παρατηρείται αλλαγή στην έκφραση της πρωτεΐνης σε διαφορετικά φυτά καθώς και στο ίδιο φυτό διαπιστώνονται μεταβολές στα διάφορα επίπεδα ανάπτυξης.

Οι φυσικοχημικές διεργασίες που υφίστανται οι ζωοτροφές κατά την επεξεργασία διασπών τυχαία το γονιδιωματικό DNA σε θραύσματα μικρότερου μεγέθους, γεγονός που ελαττώνει την ευαισθησία της PCR. Συγκεκριμένα, σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 95-100 ° C αποικοδομείται το DNA και χάνεται μόνιμα η δευτεροταγής δομή του. Κατά την διάρκεια της ενσίρωσης όπου διασπώνται τα κυτταρικά τοιχώματα λόγω της μηχανικής καταπόνησης και της δράσης των νουκλεασών μπορεί να αποικοδομηθεί το DNA. Σε μίγματα ζωοτροφών, μπορεί να εισαχθούν στο DNA τυχόν ακαθαρσίες που να αναστείλουν την αντίδραση PCR (Cakir, 2015).

#### 6.4 Ronozyme ProAct

Είναι πρόσθετο ζωοτροφών που περιέχει πρωτεάση σερίνης από το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος του *Bacillus licheniformis*. Χρησιμοποιείται ως μέσο πάχυνσης των κοτόπουλων. Διεξάχθηκαν δοκιμές αντιστροφής της μετάλλαξης των βακτηρίων, μια δοκιμή μετάλλαξης των χρωμοσωμάτων και μια μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας. Έπειτα, από τις παραπάνω δοκιμές το στέλεχος που παράγει το ένζυμο κρίθηκε ασφαλές για τον καταναλωτή. Για την αξιολόγηση της περιβαλλοντικής ασφάλειας παρασκευάστηκε ένα υγρό συμπύκνωμα του τελικού σκευάσματος, στο οποίο δεν εντοπίστηκαν ούτε ζωντανά κύτταρα του βακτηριακού στελέχους ούτε DNA. Παράλληλα, η πρωτεΐνη θα διασπαστεί ή θα καταστεί ανενεργή διερχόμενη από το πεπτικό σύστημα των ζώων ή όταν απελευθερωθεί στο περιβάλλον (Efsa Journal, 2021).

**Πίνακας 2.** Γενετικά τροποποιημένα φυτά και γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί που έχουν εγκριθεί για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση

| Γονίδιο         | Χαρακτηριστικό                                     |
|-----------------|--|
| cp4 epsps       | ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο glyphosate          |
| Pat             | ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο glyphosate          |
| cry1Ac          | ανθεκτικότητα σε λεπιδόπτερα έντομα                |
| cry2Ab2         | ανθεκτικότητα σε λεπιδόπτερα έντομα                |
| cryIA(b)        | ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο glyphosate ammonium |
| cry1F           | ανθεκτικότητα σε λεπιδόπτερα έντομα                |
| cry34Ab1        | ανθεκτικότητα σε κολεόπτερα έντομα                 |
| cry35Ab1        | ανθεκτικότητα σε κολεόπτερα έντομα                 |
| cry3Bb1         | ανθεκτικότητα σε έντομα                            |
| np1II           | δείκτης επιλογής                                   |
| goxv247         | ανθεκτικότητα στο ζιζανιοκτόνο glyphosate          |
| barnase barstar | έλλειψη βιώσιμης γύρης και στειρότητα              |

## **7. Αξιολόγηση πιθανής μεταφοράς διαγονιδιακού DNA σε ζώα από γενετικά τροποποιημένες ζωοτροφές**

Τα ζώα που προορίζονται για την παραγωγή τροφίμων καταναλώνουν το 70-90% της βιομάζας που έχει προκύψει από γενετικά τροποποιημένα φυτά (GMPs) (Van Eenennaam, 2014). Το DNA που λαμβάνεται από τις τροφές, διασπάται με τις διεργασίες της μάσησης, της όξινης υδρόλυσης και των ενζύμων του εντέρου σε μικρότερα τμήματα. Θεωρείται ότι είναι αδύνατο να βρεθεί σε απώτερα σημεία του εντέρου, θραύσμα DNA με μήκος μεγαλύτερο των 500 ζευγών βάσεων (Rossi, 2005). Η βιολογική δραστηριότητα του DNA τερματίζεται από τη δράση του αποικοδομητικού ενζύμου δεοξυριβονουκλεάση I και από το χαμηλό pH (Sieradzki, 2013). Παρόλα αυτά, οι πρωτεΐνες προστατεύουν τα θραύσματα DNA από την διάσπαση με αποτέλεσμα τα παραπάνω να διέρχονται από τον γαστρεντερικό σωλήνα (Klotz, 2002).

Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των μελετών ως προς την ανίχνευση ή μη ΓΤ αλληλουχιών σχετίζονται με τον τύπο και την ποσότητα της παρεχόμενης τροφής, που καθορίζουν την αρχική ποσότητα του ΓΤ γονιδίου που καταναλώνεται (Sharma, 2006). Επίσης, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν ο αριθμός αντιγράφου γονιδίου, ο βαθμός διάσπασης του DNA των ζωοτροφών, η μέθοδος εξαγωγής DNA, η ύπαρξη αναστολέων στη μέθοδο PCR και το όριο ανίχνευσης των αμπλικονίων (Deanville, 2005). Επιπρόσθετα, ασκεί και η ικανότητα πέψης των τροφών καθώς και η ύπαρξη ολόκληρων φυτικών κυττάρων που λειτουργούν ως ασπίδα του γενετικού υλικού, κατά τη διάρκεια διέλευσης της τροφής από μη φιλόξενα περιβάλλοντα (Sharma, 2006). Έχει διαπιστωθεί ότι η μεταφορά DNA τόσο από συμβατική όσο και από ΓΤ τροφή έχει τις ίδιες επιπτώσεις, στον οργανισμό που τις καταναλώνει (Tudisco, 2010).

Ο μηχανισμός της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων ευθύνεται για την ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών στα βακτήρια. Η πιθανότητα μεταφοράς γονιδίου από φυτά με ανασυνδυασμένο DNA στο εκάστοτε βακτήριο του ανθρώπινου εντέρου ανέρχεται σε  $2 \times 10^{-11}$  με  $1.3 \times 10^{-21}$ . Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων προϋποθέτει την ακεραιότητα του γονιδίου, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στις ζωοτροφές λόγω της εκτεταμένης επεξεργασίας τους (Van Eenennaam, 2017). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η θερμική και χημική επεξεργασία διασπών σε μεγαλύτερο βαθμό το DNA σε σχέση με τις φυσικές επεξεργασίες όπως η άλεση (Deanville, 2005). Ακόμα και αν τμήματα του

γονιδίου καταλήξουν στο γαστρεντερικό σωλήνα θα βρεθούν αντιμέτωπα με άλλα θραύσματα, που θα μπορούσαν να εισαχθούν σε βακτήρια. Απαραίτητη κρίνεται και η ύπαρξη ρυθμιστικών αλληλουχιών για την έκφραση του γονιδίου. Επίσης, το σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης του κυττάρου – δέκτη ασκεί επιρροή στην έκφραση ή μη του εισαχθέντος DNA (Van Eenennaam, 2017).

Θεωρείται ότι στα μηρυκαστικά το φυτικό DNA που καταναλώνεται διασπάται προς νουκλεοτίδια σε χρονικό διάστημα 4 ωρών και απορροφάται από τα μικρόβια του πρώτου στομάχου ή καταλήγει στο δωδεκαδάκτυλο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 85%. Ανεξάρτητα από τον τύπο της τροφής, το DNA παρουσιάζει αντίσταση στις διάφορες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο πεπτικό σύστημα οπότε δεν κατακερματίζεται εντελώς. Στα κύτταρα του αίματος και του εντέρου των θηλαστικών παρατηρείται ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης όταν εισέρχεται τμήμα DNA στον οργανισμό με αποτέλεσμα ο εντοπισμός του να καθίσταται δυσκολότερος. Αξίζει να τονιστεί ότι στα σπονδυλωτά, δεν έχει εντοπιστεί στο γονιδίωμα των ζώων και των ανθρώπων γονίδιο ή τμήμα DNA που απορροφήθηκε από τον βλεννογόνο του εντέρου (Morera, 2016).

Ο Guertler κ.ά. (2009) υποστήριξαν ότι η έλλειψη ΓΤ αλληλουχιών στο γάλα μπορεί να οφείλεται στη διάσπαση που υφίστανται το DNA και η πρωτεΐνη κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και πέψη. Παράλληλα, θεωρείται ότι η αποικοδόμηση εκκινεί από τη συγκομιδή λόγω της δράσης των βακτηρίων. Η απουσία μηχανισμών απορρόφησης της cry1ab πρωτεΐνης από το έντερο στο αίμα και από εκεί στο μαστό ώστε να εκκριθεί στο γάλα, δικαιολογεί την μη εύρεσή της στο γάλα. Απαραίτητη κρίνεται η διεξαγωγή μακροπρόθεσμων μελετών για δείγματα γάλακτος από αγελάδες που τρέφονται μόνιμα με ΓΤ τροφή (Guertler, 2009).

Διενεργήθηκε μια μετα-ανάλυση 1.783 επιστημονικών μελετών για την ασφάλεια των ΓΤ καλλιεργειών που δημοσιεύθηκαν από το 2002 έως το 2012. Τριακόσια δώδεκα (312) από τα άρθρα επικεντρώθηκαν στην κατανάλωση ΓΤ τροφίμων / ζωοτροφών. Από την έρευνα αυτή προέκυψε ότι πραγματοποιείται σημαντική αραίωση του διαγονιδιακού DNA από τη συνολική ποσότητα του λαμβανόμενου DNA (από 0,00006% έως 0,00009%) και η αφομοίωσή του δεν διαφοροποιείται από οποιοδήποτε DNA. Επιπλέον, υποβαθμίζεται με την εφαρμογή θερμικών επεξεργασιών και δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι το απορροφούμενο DNA από το πεπτικό σύστημα μπορεί να μεταφερθεί στα κύτταρα του οργανισμού ξενιστή. Το RNA παρουσιάζει το ίδιο επίπεδο ασφάλειας με το DNA, καθώς είναι φυσιολογικό συστατικό της διατροφής. Οι πρωτεΐνες χάνουν την

δραστικότητα τους λόγω της αποικοδόμησης που υφίστανται κατά τη διάρκεια της πέψης. Με βάση τα ευρήματα, δεν υπάρχουν σημαντικοί κίνδυνοι που να συνδέονται άμεσα με τη χρήση των καλλιεργειών ΓΤ (Nicolia, 2013).

Έπονται μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα στα οποία έχει χορηγηθεί γενετικά τροποποιημένη τροφή με στόχο την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένου DNA στο γαστρεντερικό σύστημα, στα προϊόντα πέψης, στο αίμα και στο αγελαδινό γάλα.

## 7.1 Χοίροι

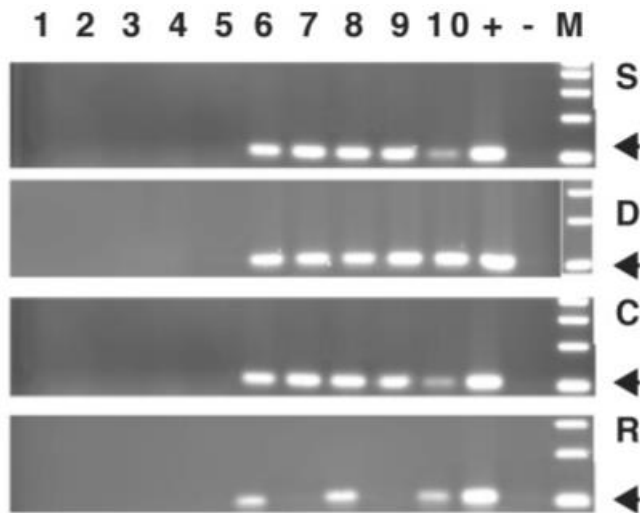
Διεξάχθηκε έρευνα με στόχο την εύρεση ΓΤ τμημάτων DNA αραβοσίτου και της *Cry1ab* πρωτεΐνης στο περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα των γουρουνιών που διατρέφονταν με Bt11 καλαμπόκι. Χρησιμοποιήθηκαν 10 γουρούνια που χωρίστηκαν σε 2 ομάδες με βάση την κατανάλωση Bt ή μη καλαμποκιού για 1 μήνα. Συλλέχθηκαν δείγματα την τελευταία ημέρα από το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, τον ειλέο, το τυφλό και το ορθό. Σχεδιάστηκαν εκκινητές Bt11 1-5'-*cryIA* 1-3' με μήκος 110 ζεύγη βάσεων και IVO1-CR01 μήκος 437 ζευγών βάσεων μεταξύ της περιοχής του εκκινητή 35S του ιού μωσαϊκού κουνουπιδιού και του γονιδίου *cryIAb* (Chowdhury, 2003).

**Πίνακας 3.** PCR εκκινητές, αλληλουχίες και η ειδικότητα

| Όνομα             | Αλληλουχία                                     | Ειδικότητα                       | Πηγή               | Αντίγραφο           |
|-------------------|--|----------------------------------|--------------------|---------------------|
| Bt11 1-5'         | 5-CCA TTT<br>TTC AGC TAG<br>GAA GTT C-3'       | <i>adh1-1S</i><br>(νοηματική)    | Bt11<br>αραβόσιτος | 110 ζεύγη<br>βάσεων |
| <i>cryIA</i> 1-3' | 5-TCG TTG<br>ATG TTK GGG<br>TTG TTG TCC-<br>3' | <i>cry1Ab</i><br>(αντινοηματική) |                    |                     |
| IVO1              | 5-GGT ACA<br>GTA CAC ACA<br>CAT GTA T-3'       | <i>adh1-1S</i><br>(νοηματική)    |                    | 437 ζεύγη<br>βάσεων |
| CR01              | 5-GAT GTT<br>TGG GTT GTT<br>GTC CAT-3'         | <i>cry1Ab</i><br>(αντινοηματική) |                    |                     |

**ΠΗΓΗ:** Chowdhury, E. H., Kuribara, H., Hino, A., Sultana, P., Mikami, O., Shimada, N., ... Nakajima, Y., 2003

**Σχήμα 11.** PCR στο γαστρεντερικό περιεχόμενο των χοίρων που διατρέφονταν με Bt καλαμπόκι (λωρίδα 6 - 10) για το 1-5'-*cryIA* 1-3' (110 ζεύγη βάσεων). Ως S, D, C, R το περιεχόμενο του στομάχου, του δωδεκαδάκτυλου, του τυφλού και του ορθού. Ως + ο θετικός μάρτυρας (Bt11)



ΠΗΓΗ: Chowdhury, E. H., Kuribara, H., Hino, A., Sultana, P., Mikami, O., Shimada, N., ... Nakajima, Y., 2003

Παρατηρήθηκε ότι το Bt11 1-5'-cryIA 1-3 ' ζεύγος εκκινητών ανίχνευσε το *cryIab* σε όλα τα δείγματα των ζώων με εξαίρεση του ορθού που εντοπίστηκε μόνο στα 3 από τα 5. Σε αντίθεση, το ζεύγος IV01-CR01 βρήκε *cryIab* στα 3 από τα 5 δείγματα του στομάχου, του δωδεκαδάκτυλου και του τυφλού και στο ορθού σε 1 από τα 5. Επίσης, το σήμα του Bt11 1-5'-cryIA 1-3 ήταν ισχυρότερο από του IV01-CR01. Βρέθηκε ότι η πεπτικότητα της πρωτεΐνης Cry1Ab ανέρχεται στο 92%. Η αντιγονικότητά της παραμένει αμετάβλητη παρόλο που διασπάται στο παχύ έντερο (Chowdhury, 2003).

Η πιθανότητα ανίχνευσης DNA αυξάνεται με τη χρήση εκκινητή μικρότερου μήκους. Επίσης, η αξιοπιστία της μεθόδου PCR αυξάνεται με την προσθήκη δύο ή περισσότερων εκκινητών. Η *cryIab* είναι αβλαβής για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου των θηλαστικών καθώς τα παραπάνω δεν διαθέτουν υποδοχείς Cry πρωτεϊνών. Μηδαμινές ποσότητες αποικοδομημένου DNA και πρωτεΐνης *cryIab* ενδέχεται να απεκκριθούν στο περιβάλλον χωρίς καμία επίπτωση στο περιβάλλον (Chowdhury, 2003).

Γενετικά τροποποιημένος αραβόσιτος (Bt) δόθηκε ως τροφή σε πλήθος 36 γουρουνιών με στόχο την μελέτη της πορείας του DNA κατά την διάρκεια της πέψης. Με κριτήριο το χρονικό διάστημα (4, 8, 12, 24, 48 και 72 ώρες) που μεσολαβούσε από την τελευταία σίτιση μέχρι τη σφαγή, τα ζώα διακρίθηκαν σε 6 ομάδες. Οι 3 τελευταίες ομάδες ζώων (24, 48, 72 ώρες) έλαβαν διαίτα που περιείχε κριθάρι και σιτάρι. Ακολούθησε η αφαίρεση του DNA από ιστούς και περιεχόμενα του εντέρου (από στομάχι, τρία τμήματα του λεπτού και τρία τμήματα του παχέος εντέρου). Η μέθοδος PCR εντόπισε ανασυνδυασμένο DNA μήκους 211 ζευγών βάσεων, στο εντερικό

περιεχόμενο ζώων ως και 48 ώρες μετά την τελευταία σίτιση με ΓΤ αραβόσιτο (Πίνακας 4). Στους ιστούς των ζώων δεν βρέθηκε ανασυνδυασμένο DNA (Reuter, 2003).

**Πίνακας 4.** Ανιχνεύσιμο θραύσμα διαγονιδιακού DNA (211 ζ.β.) σε περιεχόμενο γαστρεντερικού σωλήνα χοίρων που σφαγιάστηκαν σε διαφορετικούς χρόνους μετά την τελευταία σίτιση με Bt αραβόσιτο

| Χρόνος | Στομάχι | Δωδεκαδάκτυλο | Νήστιδα | Ειλεός | Τυφλό | Κόλον | Ορθό |
|--------|---------|---------------|---------|--------|-------|-------|------|
| 4      | 6       | 5             | 6       | 4      | 6     | 5     | 6    |
| 8      | 6       | 1             | 4       | 4      | 5     | 3     | 6    |
| 12     | 4       | 4             | 0       | 0      | 6     | 6     | 3    |
| 24     | 2       | 2             | 0       | 0      | 0     | 0     | 1    |
| 48     | 0       | 1             | 1       | 1      | 0     | 0     | 1    |
| 72     | 0       | 0             | 0       | 0      | 0     | 0     | 0    |

ΠΗΓΗ: Reuter, T. and Aulrich, K. (2003).

Πραγματοποιήθηκε μελέτη σε γουρούνια που καταλάωναν γενετικά τροποποιημένες πατάτες με στόχο την καταγραφή της πορείας των εισαχθέντων γονιδίων 1 - SST (σακχαρόζη 1 – φρουκτοσυλο τρανσφεράση) και 1 – FFT (φρουκτάνη 1 – φρουκτοσυλοτρανσφεράση). Συγκεκριμένα, πλήθος 4 γουρουνιών διατράφηκαν με ενσίρωμα διαγονιδιακής πατάτας για χρονικό διάστημα 42 ημερών. Μετά τη θανάτωση των ζώων αφαιρέθηκαν το συκώτι, τα νεφρά, η σπλήνα, συλλέχθηκαν δείγματα ιστών και των προϊόντων πέψης από το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, τη νηστίδα, τον ειλεό, το κόλον, το τυφλό και το ορθό. Χρησιμοποιήθηκε RT – PCR για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένου DNA με μήκος 104 ζεύγη βάσεων στο γαστρεντερικό σύστημα. Σε κανέναν ιστό δεν ανιχνεύτηκε διαγονιδιακό DNA ενώ εντοπίστηκε στο δωδεκαδάκτυλο και στη νηστίδα. Είναι ανέφικτος ο διαχωρισμός μεταξύ επιπρόσθετου χρωμοσωμικού DNA και DNA που έχει εισαχθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή και προέρχεται από το φυτό (Broll, 2005).

Εκπονήθηκε έρευνα από τους Sharma κ.ά. για την εκτίμηση της σταθερότητας των διαγονιδίων στο γαστρεντερικό σωλήνα των αρνιών και των γουρουνιών που τρέφονταν με RoundUp Ready ελαιοκράμβη. Η χορηγούμενη ΓΤ τροφή διέθετε το γονίδιο *cp4 epsps* των 1,3 κιλοβάσεων. Πάρθηκαν δείγματα από ιστούς και τα προϊόντα πέψης από 11 αρνιά και 36 χοίρους. Ακολούθησε ανάλυση PCR όπου έγινε χρήση διαγονιδιακών εκκινητών, εξειδικευμένων για τα φυτά οι οποίοι αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 5.** Εκκινητές στην PCR για την εύρεση φυτικού DNA

|    | Όνομα εκκινητή | Μέγεθος<br>αμπλικονίου<br>(ζεύγη βάσεων) | Γονίδιο/περιοχή<br>στόχος                       |
|----|----------------|--|---|
| F1 | PF2/ER3        | 179                                      | υποκινητής/πεπτίδιο<br>διέλευσης<br>χλωροπλάστη |
| F2 | PF2/ER1        | 527                                      | υποκινητής/cp4<br>epsps                         |
| F3 | EF5/ER5        | 278                                      | εντός του cp4 epsps                             |
| F4 | EF2/ER2        | 270                                      | εντός του cp4 epsps                             |
| F5 | EF2/TR         | 420                                      | τέλος του cp4 epsps                             |
| F6 | EF1/ER1        | 1363                                     | ολόκληρο το cp4<br>epsps γονίδιο                |

**ΠΗΓΗ:** Sharma, R., Damgaard, D., Alexander, T. W., Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Stanford, K., & McAllister, T. A, 2006

Τα F1 – F5 είναι κατασκευασμένα θραύσματα που προέρχονται από το cp4 epsps γονίδιο, αφού σπάνια εντοπίζεται σε ιστό ή σε προϊόντα πέψης το ακέραιο γονίδιο. Για την εύρεση του ακέραιου γονιδίου έγινε χρήση του εκκινητή EF1 (5'-TCA CGG TGC AAG CAG CCG TCC AGC-3') και του εκκινητή ER1 (5'-TCA AGC AGC CTT AGT GTC GGA GAG TTC G-3'). Οι επόμενοι πίνακες δείχνουν το πλήθος των θετικών δειγμάτων για τα αρνιά και τα γουρούνια.

**Πίνακας 6.** Ανίχνευση διαγονιδιακών φυτικών DNA αλληλουχιών σε δείγματα των προϊόντων πέψης και ιστών από αρνιά που διατράφηκαν με Roundup Ready ελαιοκράμβη (n = 11)

| Ενισχυμένη<br>αλληλουχία | Δείγματα προϊόντων<br>πέψης |      |      | Δείγματα ιστών |    |      |      |      | Ιστός<br>οργάνου |    |
|--------------------------|-----------------------------|------|------|----------------|----|------|------|------|------------------|----|
|                          | ΠΡ                          | Τ.Σ. | Π.Ε. | Ο              | ΠΡ | Τ.Σ. | Λ.Ε. | Π.Ε. | Σ.               | Ν. |
| F1                       | 1                           | 2    | 6    | 0              | 1  | 2    | 3    | 3    | 0                | 0  |
| F2                       | 2                           | 5    | 6    | 0              | 1  | 0    | 1    | 2    | 0                | 0  |
| F3                       | 4                           | 4    | 7    | 0              | 3  | 1    | 1    | 3    | 0                | 0  |
| F4                       | 1                           | 2    | 3    | 0              | 2  | 1    | 2    | 1    | 0                | 0  |
| F5                       | 2                           | 2    | 7    | 0              | 0  | 1    | 1    | 1    | 0                | 0  |

**ΠΗΓΗ:** Sharma, R., Damgaard, D., Alexander, T. W., Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Stanford, K., & McAllister, T. A, 2006

Για τα δείγματα των προϊόντων πέψης και ιστών : ΠΡ, πρώτο στομάχι ; Τ.Σ., τέταρτο στομάχι; Π.Ε., παχύ έντερο; Ο, οισοφάγος ; Λ.Ε. , λεπτό έντερο. Για τους ιστούς των οργάνων: Σ, στομάχι ; Ν, νεφρό.

**Πίνακας 7.** Ανίχνευση διαγονιδιακών φυτικών DNA αλληλουχιών σε δείγματα από γουρούνια που τράφηκαν με Roundup Ready ελαιοκράμβη (n = 36)



| Ενισχυμένο<br>θραύσμα | Περιεχόμενο<br>τυφλού | Γαστρεντερικός σωλήνας |       | Ιστός οργάνου |         |       |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------|---------------|---------|-------|
|                       |                       | Δωδεκαδάκτυλο          | Τυφλό | Συκώτι        | Σπλήνας | Νεφρό |
| F1                    | 22                    | 2                      | 2     | 0             | 0       | 0     |
| F2                    | 14                    | 0                      | 2     | 0             | 0       | 0     |
| F3                    | 27                    | 1                      | 5     | 1             | 0       | 1     |
| F4                    | 12                    | 4                      | 10    | 0             | 0       | 0     |
| F5                    | 23                    | 0                      | 5     | 0             | 0       | 0     |

**ΠΗΓΗ:** Sharma, R., Damgaard, D., Alexander, T. W., Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Stanford, K., & McAllister, T. A, 2006

Τα θραύσματα cp4 epsrs στα προϊόντα πέψης των αρνιών παρουσίασαν διακύμανση ως προς τη συχνότητα εντοπισμού (9 – 63 %). Στη συγκεκριμένη μελέτη, θεωρείται πιθανό ότι τα φυτικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, λειτούργησαν προστατευτικά απέναντι στη νουκλεάση. Το DNA που απελευθερώθηκε, διασπάστηκε ταχέως από τη νουκλεάση αλλά τμήμα του, διέφυγε της υδρόλυσης. Στην περίπτωση των χοίρων βρέθηκαν ΓΤ αλληλουχίες σε τμήμα του παχέος εντέρου (τυφλό) (Sharma, 2006).

Σε απογαλακτισμένους χοίρους χορηγήθηκε ΓΤ καλαμπόκι που περιέχει πλασμίδιο με ανασυνδυασμένο DNA το οποίο συνθέτει τη γλουταμική δεϋδρογονάση του *Escherichia Coli*, με στόχο την μελέτη της πορείας του στο πεπτικό σύστημα των ζώων. Η γλουταμική δεϋδρογονάση συμβάλλει στην ευκολότερη αφομοίωση του αζώτου. Αρχικά, πλήθος 64 γουρουνιών που είχαν χωριστεί σε 8 ομάδες διατράφηκαν με συμβατικό καλαμπόκι για χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων. Ένα γουρούνι από κάθε ομάδα ορίστηκε ως το control. Τα υπόλοιπα διατράφηκαν με ανάμικτη ζωοτροφή που περιείχε *gdhA* καλαμπόκι για 1 εβδομάδα και έπειτα λήφθηκαν δείγματα από διάφορα τμήματα των ζώων. Διεξήχθη PCR και ηλεκτροφόρηση πηκτής με εκκινητές κατάλληλους για το 490 ζευγών βάσεων τμήμα DNA που έχει την περιοχή σύνδεσης του πλασμιδίου μεταξύ της ουβικουϊνίνης του αραβοσίτου και των γονιδίων *gdhA*. Ο πολλαπλασιασμός της συγκεκριμένης περιοχής επικυρώνει ότι το DNA στόχος είναι από το πλασμίδιο και όχι από το *E.coli* του πεπτικού συστήματος ή από τον αραβόσιτο ουβικουϊνίνης. Οι αλληλουχίες των εκκινητών ήταν: 5'- TTGGATGATGGCATAT GCAGCA-3 ' και 5'- AAGGTTTGTTCAAAGCCGAGGA-3 '. Το όριο ανίχνευσης ανήλθε στα 0,99 fg για 20 mL αντίδρασης. Η ΓΤ αλληλουχία βρέθηκε στο περιεχόμενο του στομάχου στα 40 από τα 56 ζώα και στον ειλέο μόνο σε 1 δείγμα, ενώ δεν εντοπίστηκε στο παχύ έντερο, στα δείγματα των μυών, των λευκών αιμοσφαιρίων, του πλάσματος και του ήπατος. Ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση για τα θετικά δείγματα του στομάχου και του ειλεού με στόχο την ποσοτικοποίηση. 50 δείγματα στομάχου είχαν

ποσοτικοποιήσιμη ποσότητα του DNA στόχου (1,56 fg) και το μοναδικό θετικό του ειλεού με 2,137 fg. Η διάσπαση του *gdhA* ξεκίνησε στο στομάχι και η αλληλουχία δεν βρέθηκε στο παχύ έντερο (Beagle, 2006).

Η PCR πραγματικού χρόνου ανιχνεύει το DNA στόχο σε συγκεντρώσεις 50 φορές μικρότερες από τις αντίστοιχες που εντοπίζει η συμβατική, δηλαδή διαθέτει μεγαλύτερη ευαισθησία. Το DNA δεν εκτίθεται σε σημαντικές ποσότητες ενζύμου στο στομάχι αφού η δεοξυριβονουκλεάση εκκρίνεται από το πάγκρεας στο λεπτό έντερο του χοίρου. Το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκε το τμήμα DNA σε όλα τα δείγματα στομάχου δηλώνει τον κατακερματισμό που υφίσταται κατά τη μάσηση καθώς και από τα ένζυμα ή τα οξέα του σάλιου και του στομάχου. Πιστεύεται ότι η ηλικία του ζώου επηρεάζει την έκφραση της παγκρεατικής DNAάσης. Η διαφοροποίηση των ευρεθέντων ποσοστών στα δείγματα του στομάχου και του τελευταίου τμήματος του λεπτού εντέρου φανερώνει ότι η διάσπαση του DNA γίνεται κυρίως στο λεπτό έντερο. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 89,29 % στα δείγματα των προϊόντων πέψης του στομάχου σε αντίθεση με το τελευταίο τμήμα του λεπτού εντέρου (τερματικός ειλεός) όπου ανιχνεύτηκε στο 1,79 % των δειγμάτων (Beagle, 2006).

Οι Walsh κ.ά. (2012) διερεύνησαν την μοίρα του διαγονιδιακού DNA και της πρωτεΐνης στο γαστρεντερικό σύστημα των χοίρων που είχαν καταναλώσει Bt αραβόσιτο για εκτεταμένο χρονικό διάστημα. Χρησιμοποιήθηκαν 40 ζώα τα οποία χωρίστηκαν σε ομάδες με βάση την κατανάλωση τροφής ΓΤ ή μη για 110 ημέρες. Αρχικά όλα τα ζώα διατράφηκαν για 12 ημέρες με συμβατικό αραβόσιτο. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, δημιουργήθηκαν οι 4 ομάδες διατροφής που αναγράφονται στον κάτωθι πίνακα (Walsh, 2012).

|           |  |
|-----------|--|
| Ομάδα I   | Συμβατικός αραβόσιτος                          |
| Ομάδα II  | Bt αραβόσιτος (MON81)                          |
| Ομάδα III | 30 ημέρες συμβατικός αραβόσιτος – 80 ημέρες Bt |
| Ομάδα IV  | 30 ημέρες Bt αραβόσιτος – 80 ημέρες συμβατικός |

Λήφθηκαν δείγματα την 110<sup>η</sup> ημέρα (ημέρα σφαγής) τόσο από το αίμα για τον εντοπισμό του γονιδίου και της πρωτεΐνης *cry1ab* όσο και από το συκώτι, το νεφρό για την εύρεση του γονιδίου *cry1ab* και της τοξίνης Bt. Επίσης, πάρθηκαν δείγματα από τα προϊόντα της πέψης του στομαχιού, του ειλεού, του τυφλού και του κόλον για την εύρεση του κομμένου γονιδίου *cry1ab* και της τοξίνης Bt. Διενεργήθηκε PCR για την εύρεση των

επιθυμητών γονιδίων στα δείγματα. Ο πίνακας που έπεται περιλαμβάνει τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Walsh, 2012).

**Πίνακας 8.** Εκκινητές και συνθήκες PCR που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό των γονιδίων στόχων

| Εκκινητής      | Αλληλουχία (5' – 3')                       | Ειδικότητα             | Γονίδιο στόχος | Μήκος αντιγράφου (ζβ) |
|----------------|--|------------------------|----------------|-----------------------|
| cry1ab – 2 – F | ACT ATC<br>CTT CGC<br>AAG ACC<br>CTT CCT C | φυτό<br>(διαγονιδιακό) | cry1ab         | 149                   |
| cry1ab – 2 – R | GCA TTC<br>AGA GAA<br>ACG TGG<br>CAG TAA C | φυτό<br>(διαγονιδιακό) | cry1ab         |                       |

**ΠΗΓΗ:** Walsh MC, Buzoianu SG, Rea MC, et al., 2012

Ανεξάρτητα από την τροφή που χορηγήθηκε, δεν εντοπίστηκε θραύσμα γονιδίου *cry1ab* των 211 ή 149 ζευγών βάσεων στο συκώτι, στα νεφρά και στα λευκά αιμοσφαίρια.

Στον επόμενο πίνακα είναι καταγεγραμμένο το πλήθος των ζώων στα οποία ανιχνεύτηκε στα προϊόντα της πέψης του στομάχου, του ειλεού, του τυφλού και του κόλον το *cry1ab* γονίδιο.

**Πίνακας 9.** Πλήθος ζώων στο οποίο εντοπίστηκε το *cry1ab* γονίδιο στα προϊόντα πέψης

| Αντίγραφο             | Στομάχι |   |   |   | Ειλεός |   |   |   | Τυφλό |   |   |   | Κόλον |   |   |   |
|-----------------------|---------|---|---|---|--------|---|---|---|-------|---|---|---|-------|---|---|---|
|                       | 1       | 2 | 3 | 4 | 1      | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 |
| cry1Ab – 1 (211 ζ.β.) | 0       | 9 | 9 | 0 | 0      | 2 | 1 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 |
| cry1Ab – 2 (149 ζ.β.) | 0       | 9 | 9 | 0 | 0      | 0 | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 | 0     | 0 | 0 | 0 |

**ΠΗΓΗ:** Walsh MC, Buzoianu SG, Rea MC, et al., 2012

Όσον αφορά την Bt τοξίνη, η προαναφερθείσα δεν βρέθηκε στα νεφρά και στο συκώτι. Όμως, εντοπίστηκε στα προϊόντα της πέψης των ζώων που κατανάλωναν αποκλειστικά ή για 80 ημέρες Bt αραβόσιτο (Walsh, 2012).

Στη μελέτη των Świątkiewicz κ.ά. (2013) μελετήθηκε η πιθανή μεταφορά του διαγονιδιακού DNA σε χοίρους από την κατανάλωση ΓΤ Roundup Ready (RR) σόγιας και αραβοσίτου MON810. Στον ακόλουθο πίνακα καταγράφονται οι ομάδες στις οποίες χωρίστηκαν οι χοίροι με κριτήριο την κατανάλωση συμβατικής ή μη σόγιας και αραβοσίτου.

|                   |                                    |
|-------------------|------------------------------------|
| Ομάδα I (control) | Συμβατική σόγια και αραβόσιτος     |
| Ομάδα II          | ΓΤ σόγια και συμβατικός αραβόσιτος |
| Ομάδα III         | Συμβατική σόγια και ΓΤ αραβόσιτος  |
| Ομάδα IV          | ΓΤ σόγια και ΓΤ αραβόσιτος         |

Για την εύρεση των αλληλουχιών των γονιδίων λήφθηκε DNA χοίρου από το αίμα, εκτελέστηκε PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Στον παρακάτω πίνακα διακρίνονται τα αποτελέσματα της ανίχνευσης διαγονιδιακού DNA στο αίμα των ζώων.

**Πίνακας 10.** Αποτελέσματα εντοπισμού διαγονιδιακού DNA στο αίμα

|                 | Ομάδα |       |    |               |               |       |    |       |
|-----------------|-------|-------|----|---------------|---------------|-------|----|-------|
|                 | I     |       | II |               | III           |       | IV |       |
|                 | R     | MON81 | R  | MON810        | RR            | MON81 | R  | MON81 |
| Περιφερικό αίμα | 0     | 0     | 0  | δεν αναλύθηκε | δεν αναλύθηκε | 0     | 0  | 0     |

**ΠΗΓΗ:** Świątkiewicz, M., Bednarek, D., Markowski, J., Hanczakowska, E. & Kwiatek, K. (2013).

Παρατηρείται ότι δεν εντοπίστηκαν οι συνηθισμένες αλληλουχίες των 172 ζευγών βάσεων της RR σόγιας και των 170 ζευγών βάσεων του Bt αραβόσιτου (Świątkiewicz, 2013).

Αναλύθηκαν δείγματα χοιρινής νεφραμιάς από ζώα που κατανάλωναν Roundup Ready σόγια, με στόχο τον εντοπισμό τυχόν θραυσμάτων ανασυνδυασμένου DNA. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου PCR σχεδόν ένα διπλοειδές γονιδίωμα της RR σόγιας. Από την ανάλυση, δεν ανιχνεύτηκε το θραύσμα μήκους 272 ζευγών βάσεων που κωδικοποιεί την *cp4 epsps* περιοχή (Jennings, Kolwyck, 2003).

## 7.2 Αγριόχοιροι

Εκπονήθηκε έρευνα με στόχο την μελέτη του διαγονιδιακού DNA και πρωτεΐνης σε αγριόχοιρους. Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν διακρίθηκαν σε 2 ομάδες με βάση την κατανάλωση ΓΤ ή μη τροφής για χρονικό διάστημα 35 ημερών. Στα δείγματα του γαστρεντερικού συστήματος μόνο θραύσματα μέχρι 727 ζευγών βάσεων μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν. Στο στομάχι και στη νηστίδα βρέθηκε σε 3 και 1 αντίστοιχα από τα 7 αγριογούρουνα, τμήμα του *cryIab* γονιδίου (~100 ζεύγη βάσεων). Επίσης, στα κόπρανα παρατηρήθηκαν ολόκληροι σπόροι αραβόσιτου (Wiedemann, 2009).

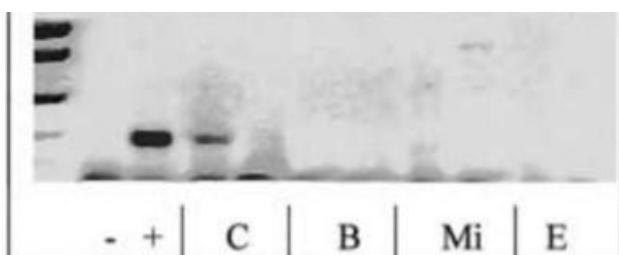
Η διασπορά άθικτων σπόρων αραβόσιτου από τα κόπρανα και η βλάστησή τους είναι μηδαμινή. Αυτό οφείλεται στη δράση των γαστρικών οξέων και των ενζύμων πέψης

κατά τις διαδικασίες αποικοδόμησης. Η απέκκριση βιωσιμότερων σπόρων σχετίζεται με διαφοροποιήσεις στο αναπτυξιακό στάδιο, στις διατροφικές συνήθειες, στην κονιορτοποίηση της τροφής ή / και στον μειωμένο χρόνο πέψης στο γαστρεντερικό σύστημα λόγω ασθένειας. Επίσης, εξαρτάται από την ποσότητα της τροφής και το τμήμα του αραβοσίτου που χρησιμοποιήθηκε. Οι χαμηλές θερμοκρασίες επιδρούν αρνητικά στους σπόρους αραβοσίτου, συνεπώς η ενδεχόμενη βλάστηση των πυρήνων αραβοσίτου μετά από καλλιέργεια συμβαίνει μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες, εναλλακτικά κατά την άνοιξη όταν προστίθεται ΓΤ αραβόσιτος. DNA μικρού μήκους που τυχόν θα εισέλθει στο αίμα και στο σώμα θα υποστεί αρχικά φαγοκυττάρωση από τα μονοκύτταρα λευκά αιμοσφαίρια και έπειτα περαιτέρω υποβάθμιση από ένζυμα των κυττάρων και νουκλεασών των ιστών (Wiedemann, 2009)

### 7.3 Αγελάδες

Διεξάχθηκε μελέτη σε πλήθος 40 βοοειδών που διατρέφονταν με γενετικά τροποποιημένο Bt ενσίρωμα αραβοσίτου για την εύρεση ανασυνδυσμένου DNA σε δείγματα ιστών (αίμα, συκώτι, μυς, σπλήνα, νεφρό). Μετά το πέρας της ανάλυσης, κανένας ιστός δεν βρέθηκε θετικός στο *cryIA* γονίδιο. Αντίστοιχη διατροφή ακολούθησαν 4 αγελάδες με στόχο την εύρεση διαγονιδιακού DNA στο γάλα, στο αίμα, στο χυμό του λεπτού εντέρου και των κοπράνων. Στο χυμό του δωδεκαδάκτυλου ανευρέθηκαν θραύσματα DNA σε αντίθεση με το αίμα και τα κόπρανα (Einspanier, 2001).

**Σχήμα 12.** PCR για την εύρεση ανασυνδυσμένου DNA, +: θετικό control, - : control χωρίς DNA, C chyme (χυμός), B blood (αίμα), Mi milk (γάλα), E excrements (κόπρανα)



**ΠΗΓΗ:** Einspanier, R., Klotz, A., Kraft, J., Aulrich, K., Poser, R., Schwägele, F., ... Flachowsky, G. ,2001

Πραγματοποιήθηκε μελέτη σε γαλακτοφόρες αγελάδες με στόχο την καταγραφή της ύπαρξης ή μη, ανασυνδυσμένου DNA στο γάλα, στο αίμα, στα κόπρανα, στο υγρό του πρώτου στομάχου και στα προϊόντα πέψης που εντοπίζονται στο δωδεκαδάκτυλο. Σε περίπτωση εύρεσης, προσδιορίζεται το μέγεθος του θραύσματος. Χορηγήθηκε γενετικά

τροποποιημένη σόγια (*cp4epsps* γονίδιο) και καλαμπόκι (*cryIa[b]* γονίδιο). Για την ανεύρεση ανασυνδυασμένου DNA σε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι χρησιμοποιήθηκε εκκινητής που αντιγράφει το θραύσμα των 203 ζευγών βάσεων, επικαλύπτοντας το εσώνιο και την κωδικοποιητική περιοχή του *cryIa(b)*. Αντίστοιχα, στη σόγια οι εκκινητές επικαλύπτουν το πεπτίδιο διέλευσης των χλωροπλαστών και τον υποκινητή 35S που βρίσκεται πριν από το *epsps* γονίδιο (Phipps, 2003).

**Πίνακας 11.** Εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των γονιδίων

| Όνομα εκκινητή | Αλληλουχία 5' - 3'       | Γονίδιο στόχος | Μέγεθος αντιγράφου (ζβ) |
|----------------|--------------------------|----------------|-------------------------|
| MON 810        | CTCCCTAGTGTTGACCAGTGTTAC | Hsp70-Cry1Ab   | 203                     |
|                | CTGCGTGAGGGAGAGGGAGATGTC |                |                         |
| 35S – CTP      | CGATGTGATATCTCCACTGACG   | 35S – CTP      | 171                     |
|                | TGTATCCCTTGACCCATGTTGT   |                |                         |

ΠΗΓΗ : Phipps, R. H., Deaville, E. R., & Maddison, B. C., 2003

**Πίνακας 12.** Θετικά (+), αρνητικά (-), ασαφή αποτελέσματα (I) PCR

| Αντίγραφο                                | +  | -  | I |
|--|----|----|---|
| Υγρό πρώτου στομάχου (υγρή φάση)         |    |    |   |
| MON 810                                  | 0  | 13 | 0 |
| 35S – CTP                                | 0  | 13 | 0 |
| Υγρό πρώτου στομάχου (στερεή φάση)       |    |    |   |
| MON 810                                  | 5  | 5  | 3 |
| 35S – CTP                                | 12 | 1  | 0 |
| Περιεχόμενο δωδεκαδάκτυλου (υγρή φάση)   |    |    |   |
| MON 810                                  | 0  | 13 | 0 |
| 35S – CTP                                | 0  | 13 | 0 |
| Περιεχόμενο δωδεκαδάκτυλου (στερεή φάση) |    |    |   |
| MON 810                                  | 8  | 5  | 0 |
| 35S – CTP                                | 11 | 0  | 2 |
| Κόπρανα                                  |    |    |   |
| MON810                                   | 0  | 13 | 0 |
| 35S – CTP                                | 0  | 13 | 0 |

ΠΗΓΗ : Phipps, R. H., Deaville, E. R., & Maddison, B. C., 2003

Η εύρεση ανασυνδυασμένου DNA στη στερεή φάση του πρώτου στομάχου και του δωδεκαδάκτυλου, υποδεικνύει ότι δεν διασπάται πλήρως η ζωοτροφή μέχρι το

δωδεκαδάκτυλο. Σε αντίθεση, στα αντίστοιχα δείγματα της υγρής φάσης δεν εντοπίζεται το γονίδιο, γεγονός που δείχνει την ταχύτατη διάσπαση του DNA. Επίσης, το γονίδιο δεν ανιχνεύτηκε στα κόπρανα, στο αίμα και στο γάλα (Phipps, 2003).

Διενεργήθηκε μελέτη με διάρκεια 90 ημερών σε 6 μοσχάρια με στόχο την μελέτη της πορείας ανασυνδυασμένων γονιδίων (*cryIab*) αραβοσίτου Bt11. Ελήφθησαν δείγματα από το γαστρεντερικό σύστημα, τους ιστούς και μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Σχεδιάστηκαν οι εκκινητές Bt11 1-5' και *cryIA* 1-3' (110 ζεύγη βάσεων), IV01 και CR01 (437 ζεύγη βάσεων) για τον εντοπισμό οργανισμών στην περιοχή του υποκινητή 35 S του ιού του μωσαϊκού και για την μείζονα αλληλουχία του *cab22L* γονιδίου (*Petunia hybrida*) και του *cryIAb* του *B. thuringiensis* ώστε να αποφευχθούν ψευδείς θετικές αντιδράσεις. Στο υγρό του πρώτου στομάχου τα ποσοστά ανίχνευσης ήταν μεγαλύτερα για τους εκκινητές Bt11 1-5' και *cryIA* 1-3'. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με το διαφορετικό αναμενόμενο μήκος του στόχου που προέρχεται από την ελάττωση του μεγέθους του *cryIab* θραύσματος στη γαστρεντερική οδό. Στα περιεχόμενα του τέταρτου στομάχου, στο μεσαίο τμήμα του λεπτού εντέρου και στο πρώτο τμήμα του παχέος εντέρου εντοπίστηκε το θραύσμα του *cryIab* γονιδίου (110 ζ.β.). Σε αντίθεση, δεν ανιχνεύτηκαν στα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος και στους ιστούς, γεγονός που αποδίδεται στο χαμηλό αριθμό αντιγράφου του γονιδίου (Chowdhury, 2004).

Εικόνα 6. *Petunia hybrida*



ΠΗΓΗ:

<https://horomidis.gr/en/product/petunia-hybrida->

Εικόνα 7. Συλλογή υγρού από το πρώτο στομάχι



ΠΗΓΗ:

<https://www.progressivedairy.com/topics/herd-health/collection-of-rumen-fluid>

Σε 12 γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες διεξάχθηκε μελέτη με αντικείμενο τον εντοπισμό διαγονιδιακού DNA ή πρωτεΐνης στο αίμα. Χορηγήθηκε ως τροφή Bt176 καλαμπόκι και εκτελέστηκαν PCR για τις αλληλουχίες του 35S υποκινητή και της ειδικής σύνδεσης Bt176. Ένα δείγμα βρέθηκε θετικό στις προαναφερόμενες αλληλουχίες, γεγονός όμως που αποδίδεται σε επιμόλυνση κατά τη δειγματοληψία,



συλλογή, προετοιμασία ή ανάλυση. Η αδυναμία ανίχνευσης μπορεί να σχετίζεται με το μικρή περιεχόμενη ποσότητα του Bt176 σε cry1ab πρωτεΐνη καθώς παράγει λιγότερη σε σχέση με άλλες ΓΤ τροφές (Bertheau, 2009).

Ο Paul κ.ά. ασχολήθηκαν με την υποβάθμιση της Cry1Ab πρωτεΐνης του καλαμποκιού MON810 στο γαστρεντερικό σωλήνα 36 αγελάδων για χρονικό διάστημα 25 μηνών. Με κριτήριο της κατανάλωση συμβατικής ή μη τροφής τα ζώα διαιρέθηκαν σε 2 ομάδες. Στη ΓΤ τροφή και στα κόπρανα το μέσο επίπεδο πρωτεΐνης ήταν 9,40 και 4,18 µg Cry1Ab/g ολικής πρωτεΐνης και οι ακριβείς συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης μετρήθηκαν 245,5 και 57,1 ng/g υγρών δειγμάτων αντίστοιχα. Επίσης, στα κόπρανα η συνολική πρωτεΐνη ήταν η μισή έναντι της αρχικής. Στο πρώτο στομάχι, στο τέταρτο στομάχι, στο λεπτό, στο παχύ έντερο και στο τυφλό, τα προϊόντα πέψης στο καθένα από αυτά, είχαν συγκέντρωση 3,84, 0,38, 0,83, 2,89 και 3,13 µg πρωτεΐνης Cry1Ab / g ολικής πρωτεΐνης. Κατά αναλογία, οι απόλυτες συγκεντρώσεις ήταν 11,17, 2,66, 9,42 32,82 και 35,55 ng / g προϊόν πέψης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πρώτο στομάχι αποδίδεται στην παρουσία αχώνευτων σωματιδίων των ζωοτροφών. Στον αντίποδα, η μικρότερη συγκέντρωση στο τέταρτο στομάχι συνδέεται με την απελευθέρωση πρωτεϊνών μικροβιακής προέλευσης. Στα υπόλοιπα τμήματα η βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης σχετίζεται με την απορρόφηση των προϊόντων πέψης στο λεπτό έντερο και την αφαίρεση νερού στο παχύ έντερο και στα κόπρανα (Paul V, 2010).

Σε άλλες έρευνες οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης διαφέρουν λόγω των έτερων επιπέδων έκφρασης και της διαφορετικής φυσικής κατάστασης και μεταβολισμού των πειραματόζωων. Η πρωτεΐνη Cry1Ab δεν είναι σταθερότερη από άλλες που περιέχονται στην τροφή. Το γεγονός αυτό απορρέει από την σύγκριση της ποσότητάς της με την συνολική πρωτεΐνη στα κόπρανα (Paul V, 2010).

Στην μελέτη των Singhal κ.ά. διερευνήθηκε το ενδεχόμενο ανίχνευσης των πρωτεϊνών Cry1Ac και Cry2Ab2 του Bollgard II βαμβακόσπορου σε γάλα και πλάσμα αγελάδων. Η χρονική διάρκεια του πειράματος ήταν 28 ημέρες. Η συλλογή του γάλακτος έγινε μία ημέρα πριν την έναρξη της πειράματος, την 3<sup>η</sup>, την 7<sup>η</sup>, την 14<sup>η</sup>, την 21<sup>η</sup> και την 28<sup>η</sup> ημέρα. Δείγμα αίματος λήφθηκε την τελευταία μέρα της έρευνας και απομονώθηκε το πλάσμα. Οι πρωτεΐνες Cry1Ac και Cry2Ab δεν εντοπίστηκαν στο γάλα και στο

**Εικόνα 8.** Σπόροι βαμβακιού Bollgard II



**ΠΗΓΗ:**

<https://www.indiamart.com/proddetail/sarthak-xl-9386578012.html>



πλάσμα του αίματος, εύρημα που υπαινίσσεται την αφομοίωση τους στο πεπτικό σύστημα ή / και την μη απορρόφησή τους στην πρωταρχική τους μορφή από τον βλεννογόνο του εντέρου (Singhal, 2011).

### 7.3.1. Αγελαδινό γάλα

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση για τον εντοπισμό διαγονιδιακού DNA σε δείγματα γάλακτος που προέρχονταν από αγελάδες που διατρέφθηκαν με ΓΤ βαμβακόσπορο. Δεν εντοπίστηκε η αλληλουχία των 215 ζευγών βάσεων του *cryIAc* σε κανένα από τα 24 δείγματα (Castillo, 2004).

Εκπονήθηκε δοκιμή σίτισης με ΓΤ καλαμπόκι ποικιλίας Chardon Liberty Link που διαθέτει ανθεκτικότητα στο γλυφοσινικό αμμώνιο, για χρονικό διάστημα 3 μηνών σε πλήθος 16 αγελάδων. Αντικείμενο της έρευνας ήταν η δυνητική ανίχνευση διαγονιδιακού DNA στο βόειο γάλα. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που αντιγράφουν το θραύσμα των 320 ζευγών βάσεων του γονιδίου *pat* και η ανάλυση PCR είχε ως όριο ανίχνευσης τα 2,5 ng γονιδιωματικού DNA/ mL γάλακτος. Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν την 1<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> εβδομάδα κανένα από τα δείγματα του γάλακτος δεν βρέθηκε θετικό για ανασυνδρασμένο DNA (Phipps, 2005).

Πάρθηκαν 60 δείγματα αγελαδινού γάλακτος με στόχο τον εντοπισμό των αλληλουχιών της ΓΤ σόγιας και αραβοσίτου. Ενισχύθηκαν τα αναμενόμενα θραύσματα των 145 ζευγών βάσεων της σόγιας και των 106 του αραβοσίτου. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει το πλήθος των ΓΤ αλληλουχιών που εντοπίστηκε σε κάθε γάλα με τη μέθοδο της PCR (Agodi, 2006).

**Πίνακας 13.** Ανίχνευση ανασυνδρασμένου DNA σε δείγματα γαλάτων με PCR και ηλεκτροφόρηση

| Δείγματα γάλακτος | Τύπος γάλακτος | Αριθμός δειγμάτων | Cry1A | CP4EPSPS |
|-------------------|----------------|-------------------|-------|----------|
| A <sub>1</sub>    | Τυπικό         | 5                 | 3     | 3        |
| A <sub>2</sub>    | Τυπικό         | 3                 | 2     | 0        |
| A <sub>3</sub>    | Οργανικό       | 4                 | 2     | 2        |
| B <sub>1</sub>    | Τυπικό         | 3                 | 1     | 1        |
| B <sub>2</sub>    | Για παιδιά     | 2                 | 0     | 0        |
| C <sub>1</sub>    | Τυπικό         | 3                 | 1     | 1        |
| C <sub>2</sub>    | Τυπικό         | 1                 | 0     | 0        |
| C <sub>3</sub>    | Οργανικό       | 4                 | 1     | 0        |

|                |                     |    |      |      |
|----------------|---------------------|----|------|------|
| D <sub>1</sub> | Τυπικό              | 5  | 3    | 0    |
| D <sub>2</sub> | Τυπικό              | 3  | 2    | 0    |
| D <sub>3</sub> | Τυπικό              | 1  | 0    | 0    |
| E              | Τυπικό              | 2  | 1    | 0    |
| F              | Τυπικό              | 2  | 0    | 0    |
| G <sub>1</sub> | Για παιδιά          | 2  | 0    | 0    |
| G <sub>2</sub> | Για παιδιά          | 2  | 0    | 0    |
| H              | Για παιδιά          | 3  | 1    | 0    |
| I              | Οργανικό για παιδιά | 3  | 1    | 0    |
| L              | Οργανικό            | 3  | 2    | 0    |
| M <sub>1</sub> | Οργανικό            | 3  | 1    | 0    |
| M <sub>2</sub> | Οργανικό για παιδιά | 3  | 1    | 0    |
| N              | Για παιδιά          | 2  | 1    | 0    |
| P              | Προβάτου            | 1  | 0    | 0    |
| Σύνολο         |                     | 60 | 23   | 7    |
| %              |                     |    | 38,3 | 11,7 |

ΠΗΓΗ: Agodi, A., Barchitta, M., Grillo, A., & Sciacca, S., 2006

Τα ευρεθέντα θραύσματα του ανασυνδυασμένου DNA μπορεί να οφείλονται στην αερομεταφορά τους, από τροφές που βρίσκονται πλησίον των τοποθεσιών όπου γίνεται το άρμεγμα και η αποθήκευση των γαλάτων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η θερμική επεξεργασία της παστεριώσεως αδυνατεί να κατακερματίσει τις αλληλουχίες του DNA στο γάλα (Agodi, 2006).

Διεξάχθηκε έρευνα με στόχο τον εντοπισμό τυχόν ύπαρξης ανασυνδυασμένου DNA και *cryIab* πρωτεΐνης στο γάλα αγελάδων που κατανάλωναν ΓΤ τροφή με τα γονίδια *mpsp*s και *cryIab*. Χρησιμοποιήθηκαν 8 αγελάδες από τις οποίες λήφθηκαν 32 δείγματα γάλακτος και το πείραμα διήρκεσε 56 ημέρες. Οι διαγονιδιακές αλληλουχίες δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα δείγμα (Calsamiglia, 2007).

Διενεργήθηκε μελέτη σε έξι βιομηχανίες γάλακτος με σκοπό την αξιολόγηση της μεταφοράς διαγονιδιακού DNA αραβοσίτου και σόγιας σε γάλατα αγελάδων που διατρέφονταν με ΓΤ ή μη τροφή. Συλλέχθηκαν πλήθος 66 δειγμάτων νωπού αγελαδινού

γάλακτος. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο PCR επιβεβαιώθηκε η παρουσία ΓΤ σόγιας και αραβοσίτου στις ζωοτροφές με την αντίστοιχη σήμανση και η έλλειψή τους στις βιολογικές/χωρίς ΓΤ τροφές. Εντός του ορίου ανίχνευσης, κανένα δείγμα γάλακτος που προερχόταν από αγελάδα που διατρεφόταν με ΓΤ τροφή δεν βρέθηκε θετικό για ανασυνδυασμένο DNA (Giacomo, 2016).

**Πίνακας 14.** Σχέδιο δειγματοληψίας

| Φάρμα               | ΓΤ τροφή               | Οργανική τροφή         | Ελεύθερη από ΓΜ τροφή  |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Αριθμός δειγμάτων   |                        |                        |                        |
| Φάρμα 1<br>(κοντά)  | 10 (αραβόσιτος)        | -                      | -                      |
|                     | 10 (αραβόσιτος, σόγια) | -                      | -                      |
| Φάρμα 2<br>(μακριά) | 10 (αραβόσιτος)        | -                      | -                      |
|                     | 10 (αραβόσιτος, σόγια) | -                      | -                      |
| Φάρμα 3<br>(μακριά) | -                      | -                      | 10 (αραβόσιτος)        |
|                     | -                      | -                      | 10 (αραβόσιτος, σόγια) |
| Φάρμα 4<br>(μακριά) | -                      | 10 (αραβόσιτος)        | -                      |
|                     | -                      | 10 (αραβόσιτος, σόγια) | -                      |
| Φάρμα 5<br>(κοντά)  | 10 (αραβόσιτος)        | -                      | -                      |
|                     | 10 (αραβόσιτος, σόγια) | -                      | -                      |
| Φάρμα 6<br>(μακριά) | 10 (αραβόσιτος)        | -                      | -                      |
|                     | 10 (αραβόσιτος, σόγια) | -                      | -                      |

\*μακριά: σύστημα γεωργικής εκμετάλλευσης που επιλέγεται με χώρο αρμέγματος διαχωρισμένο από το χώρο σίτισης (απόσταση 50 – 100 μέτρα); κοντά: σύστημα πλησίον της εκμετάλλευσης που επιλέγεται με περιοχή αρμέγματος όμορη με εκείνη της σίτισης (απόσταση μικρότερη των 5 μέτρων)

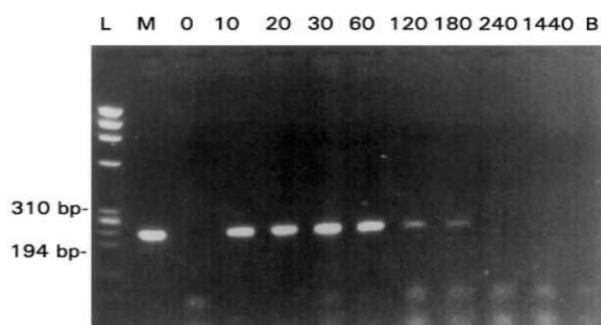
**ΠΗΓΗ:** Giacomo, Marzia & Domenicantonio, C. & De Santis, Barbara & Debegnach, Francesca & Onori, Roberta & Brera, Carlo. (2016).

## 7.4 Πρόβατα

Σε πρόβατα που διατρέφονταν είτε με ενσίρωμα είτε με σπόρους ΓΤ καλαμποκιού πραγματοποιήθηκε μελέτη με αντικείμενο την διερεύνηση της πορείας των διαγονιδίων. Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Cry01/02 που πλαισιώνουν το γονίδιο *CryIA(b)* και αντιγράφουν τμήμα 1914 ζευγών βάσεων και οι Cry03/04 που αντιγράφουν τμήμα 211 ζευγών βάσεων. Διαπιστώθηκε ότι στα υγρά του πρώτου στομάχου εντοπίστηκε το τμήμα του *cryIa(b)* 1914 ζευγών βάσεων, 5 ώρες μετά τη σίτιση με σπόρους καλαμποκιού. Αντίθετα, στα πρόβατα που είχαν λάβει ενσιρωμένο καλαμπόκι δεν εντοπίστηκε. Με την ελάττωση του μήκους του στόχου σε 211 ζεύγη βάσεων αυξήθηκε η ευαισθησία της ανίχνευσης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση του μικρότερου τμήματος των 211

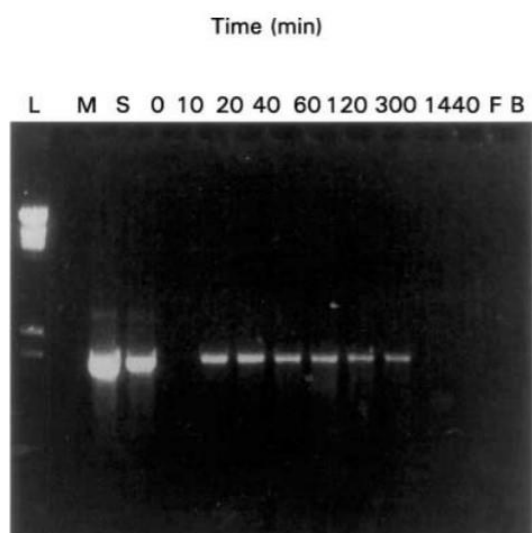
ζ.β. 3 ώρες μετά την κατανάλωση ενσιρωμένης τροφής και 24 ώρες μετά την κατανάλωση σπόρων καλαμποκιού (Duggan, 2003).

**Σχήμα 13.** Επιβίωση θραύσματος 1914 ζ.β. που περιέχει το γονίδιο cry1a(b) σε ΓΤ κόκκους καλαμποκιού



**ΠΗΓΗ:** Duggan, P. S., Chambers, P. A., Heritage, J., & Forbes, J. M. (2003)

**Σχήμα 14.** Ανθεκτικότητα του θραύσματος 211 ζ.β.



**ΠΗΓΗ:** Duggan, P. S., Chambers, P. A., Heritage, J., & Forbes, J. M. (2003)

**Πίνακας 15.** Ανθεκτικότητα των DNA αλληλουχιών στόχων

| Αλληλουχία στόχος | Χρόνος επιβίωσης (λεπτά) |        |
|-------------------|--------------------------|--------|
|                   | Ενσίρωμα                 | Σπόροι |
| 1914 ζ.β cry1A(b) | 0                        | 300    |
| 211 ζ.β.          | 240                      | 1440   |

**ΠΗΓΗ:** Duggan, P. S., Chambers, P. A., Heritage, J., & Forbes, J. M. (2003)

Ο Alexander κ.ά. (2006) μελέτησαν την κατάληξη του διαγονιδιακού DNA της Roundup Ready ελαιοκράμβης που είχε χορηγηθεί ως τροφή σε πρόβατα. Αρχικά, για 2 εβδομάδες (1<sup>η</sup> φάση) τα πρόβατα κατανάλωναν τροφή χωρίς ΓΤ ελαιοκράμβη. Έπειτα, για τις επόμενες 11 ημέρες (2<sup>η</sup> φάση) η ΓΤ ελαιοκράμβη αποτέλεσε το 15% της

συνολικής τροφής. Συλλέχθηκαν δείγματα υγρών από τμήμα του στομάχου και του δωδεκαδάκτυλου, κοπράνων και αίματος ώστε να απομονωθεί DNA, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση PCR. Ο ακόλουθος πίνακας διαθέτει τους εμπρόσθιους (F), τους αντίστροφους (R) εκκινητές και τον ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 16.** Περιγραφή εκκινητών και ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιγραφή του Roundup DNA

| Θραύσμα                                       | Αλληλουχία εκκινητή ή ιχνηθέτη (5' → 3')   | Στόχος                             |
|---|--|------------------------------------|
| Ειδικό για το φυτό                            |  |                                    |
| F1 (62 ζεύγη βάσεων)                          | CCA CGG CGT GCA TGC<br>ACC AGA GGA CTT ACG<br>AGC AGT TG   | Πεπτίδιο διέλευσης του χλωροπλάστη |
| F2 (300 ζεύγη βάσεων)                         | CAA CAC TGG TAA GGC<br>TAT GC<br><br>GGT AAC TGG AAG ACG<br>ATC AC   | Εντός του cp4 epsps                |
| F3 (420 ζεύγη βάσεων)                         | TTG ATT GCG ATG AAG<br>GTG AG<br><br>ACA AAT GGT ACA AGA<br>AAA ACA G  | Τέλος του cp4 epsps                |
| F4 (1363 ζεύγη βάσεων)                        | TCA CGG TGC AAG CAG<br>CCG TCC AGC<br><br>TCA AGC AGC CTT AGT<br>GTC GGA GAG TTC G   | Ολόκληρο το cp4 epsps γονίδιο      |
| F5 (108 ζεύγη βάσεων)                         | CCA TAT TGA CCA TCA<br>TAC TCA TTG CT<br><br>GCT TAT ACG AAG GCA<br>AGA AAA GGA<br><br>TTC CCG GAC ATG AAG<br>ATC ATC CTC CTT<br>(ιχνηθέτης) | Σύνδεση των φυτών                  |
| Ειδικό για το βακτήριο 16S (466 ζεύγη βάσεων) | TCC TAC GGG AGG CAG<br>CAG T<br><br>GGA CTA CCA GGG TAT<br>CTA ATC CTG TT  | 16S rDNA                           |
| Ειδικό για το πρόβατο (652 ζεύγη βάσεων)      | CAA CAG GAAGGA ATC<br>ATT ACA GTA<br><br>CCA AAA CAG CCG CTT<br>ATC CAA G  | Παράγοντας ανάπτυξης               |

**ΠΗΓΗ:** Alexander, T. W., Reuter, T., Okine, E., Sharma, R., & McAllister, T. A., 2006

Το θραύσμα που είναι ειδικό για το πρόβατο λειτουργεί ως θετικό control για την ενίσχυση του DNA που προέρχεται από το αίμα. Κατά την εξέταση των προϊόντων πέψης, δεν εντοπίστηκαν τα θραύσματα F1, F2 και F3 την 3<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> ημέρα της 2<sup>ης</sup> φάσης του πειράματος. Αντιθέτως, βρέθηκε το F1 στα υγρά, αρκετές ώρες μετά την

τελευταία χορήγηση ΓΤ τροφής λόγω της απελευθέρωσης DNA στο πεπτικό σύστημα. Στην υδατική φάση τμήματος του στομάχου δεν εντοπίστηκε η αλληλουχία λόγω της ταχείας καταστροφής του DNA από τις μικροβιακές νουκλεάσες. Δεν βρέθηκε ούτε στην υδατική φάση του δωδεκαδάκτυλου. Επίσης, στο αίμα η ανάλυση έδωσε αρνητικά αποτελέσματα για όλα τα θραύσματα. Στην συγκεκριμένη μελέτη, θεωρείται ότι το ΓΤ DNA έφτασε στο λεπτό έντερο και διασπάστηκε σε τέτοιο βαθμό ώστε να μην είναι ανιχνεύσιμο, αφού δεν βρέθηκε στα κόπρανα (Alexander, 2006).

## 7.5 Κοτόπουλα

Πραγματοποιήθηκε μελέτη σε κοτόπουλα που διατρέφονταν με γενετικά τροποποιημένο αραβόσιτο με στόχο τον εντοπισμό διαγονιδιακού DNA (*cryIA*) στο συκώτι, στη σπλήνα, στο νεφρό, σε μύες των ποδιών και του στήθους. Για την αύξηση της ευαισθησίας της ανάλυσης PCR έγινε χρήση εκκινητών που ενισχύουν τμήμα DNA μήκους 189 ζευγών βάσεων. Δεν ανευρέθηκε θραύσμα DNA στους προαναφερθέντες ιστούς (Einspanier, 2001).

Οι Jennings κ.ά. πραγμάτωσαν μια μελέτη 42 ημερών σε κοτόπουλα που διατρέφονταν με καλαμπόκι Yieldguard, με στόχο την εύρεση διαγονιδιακού DNA και πρωτεΐνης. Έλαβαν δείγματα μυός από το στήθος, για την εύρεση της αλληλουχίας του Bt *cryIAb* γονιδίου με μήκος 211 ζεύγη βάσεων. Στη τεχνική που εφάρμοσαν το όριο ανίχνευσης ήταν 5 pg DNA για κάθε αντίδραση και το γονίδιο δεν εντοπίστηκε. Επίσης, για την εύρεση της πρωτεΐνης, η μέθοδος είχε όριο ανίχνευσης 60 ng και δεν βρέθηκε (Jennings, 2003).

Εκπονήθηκε μελέτη σε 26 κόκορες που κατανάλωναν Bt 176 καλαμπόκι σε μορφή πολτού για χρονικό διάστημα 35 ημερών με στόχο την εύρεση στο αίμα, στο γαστρεντερικό σύστημα και σε δείγματα ιστών, τυχόν ανασυνδυασμένου DNA.

**Πίνακας 17.** Αλληλουχίες εκκινητών, ιχνηθέτη και γονίδιο στόχος

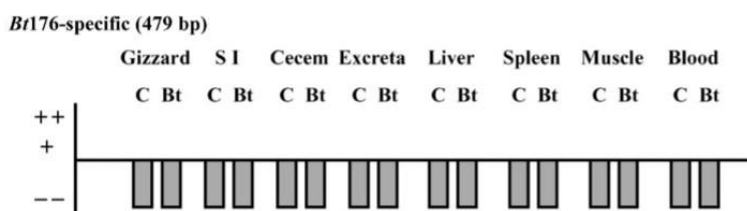
| Όνομα               | Αλληλουχία (5' → 3')             | Στόχος  |
|---------------------|----------------------------------|---|
| Cry2-F              | CCC ATC GAC ATC AGC CTG<br>AGC   | Τμήμα του γονιδίου <i>cryIab</i> (129 ζεύγη βάσεων) |
| Cry2-R              | CAG GAA GGC GTC CCA CTG<br>GC    |   |
| BTSYN-<br>Ιχνηθέτης | -ATG TCC ACC AGG CCC AGC<br>ACG- |   |

**ΠΗΓΗ:** Tony, M. A., Butschke, A., Broll, H., Grohmann, L., Zagon, J., Halle, I., ... Flachowsky, G. (2003).

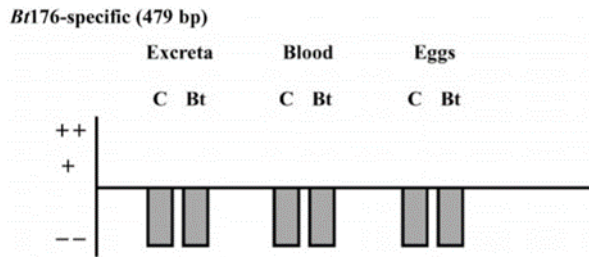
Στα δείγματα ιστών και αίματος δεν εντοπίστηκε διαγονιδιακό DNA σε αντίθεση με εκείνα του γαστρεντερικού συστήματος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα πουλερικά, γίνεται παλινδρόμηση δωδεκαδακτύλου δηλαδή το περιεχόμενο από το δωδεκαδάκτυλο μεταφέρεται πίσω στο στομάχι με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το περιεχόμενο του δωδεκαδακτύλου (Tony, 2003).

Διεξάχθηκε έρευνα για την αξιολόγηση της πορείας του ΓΤ DNA σε κοτόπουλα που διατρέφονταν με Bt176 καλαμπόκι. Το συγκεκριμένο καλαμπόκι περιέχει το γονίδιο *cryIA (b)* του *Bacillus thuringiensis* που προσδίδει αντίσταση έναντι των λεπιδόπτερων, το *bar* του *Streptomyces hygroscopicus* που κωδικοποιεί τη φωσφινοθρική-N-ακετυλοτρανσφεράση και το γονίδιο *bla* που κωδικοποιείται από τη β – λακταμάση και χρησιμεύει ως δείκτης για επιλογή βακτηριακών αποικιών για την ύπαρξη του φορέα πλασμιδίου. Χρησιμοποιήθηκαν 94 αρσενικά κοτόπουλα που χωρίστηκαν σε 2 ομάδες καθώς και 36 ωοτόκες κόττες που διακρίθηκαν και αυτές σε 2 ομάδες με βάση την κατανάλωση συμβατικού ή Bt176 καλαμποκιού. Στην ανάλυση PCR για τον εντοπισμό θραυσμάτων DNA του Bt176 χρησιμοποιήθηκε ειδικός εκκινητής και αναζητήθηκε το εξειδικευμένο θραύσμα των 476 ζευγών βάσεων. Από τα δείγματα που ελήφθησαν σε όργανα, στο κρέας και στα αυγά των πουλερικών δεν βρέθηκε το ειδικό γονίδιο για το Bt176. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη καταστροφή του DNA σε θραύσματα μικρότερα των 180 ζευγών βάσεων στον σωλήνα του εντέρου, τα οποία ήταν αδύνατο να ανιχνευτούν. Επίσης, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ των πτηνών. Αυτό οφείλεται στην ευκολότερη πέψη του DNA από ορισμένα πτηνά. Παρακάτω διακρίνονται τα αποτελέσματα της PCR για τα αρσενικά κοτόπουλα και τις κόττες (Aeschbacher, 2005).

**Σχήμα 15.** PCR σε δείγματα από κοτόπουλα



**Σχήμα 16.** PCR σε δείγματα από ωοτόκες κόττες



**ΠΗΓΗ:** Aeschbacher, K., Messikommer, R., Meile, L., & Wenk, C. ,2005

Το C συμβολίζει το συμβατικό (conventional) καλαμπόκι, το Bt το τροποποιημένο καλαμπόκι (Bt176), το ++ δηλώνει το έντονο σήμα, ενώ το + το αδύναμο σήμα, το -- σημαίνει ότι δεν ανιχνεύτηκε και το SI αντιστοιχεί στο λεπτό έντερο (small intestine).

Ο Rossi κ.ά. μελέτησαν την πορεία του DNA του Bt καλαμποκιού στο πεπτικό σύστημα 432 κοτόπουλων. Η εύρεση ολόκληρου του γονιδίου των 3500 ζευγών βάσεων του *CryIA(b)* στη ζωοτροφή είναι ανέφικτη λόγω της υποβάθμισης που υφίσταται. Για αυτό το λόγο, επιλέχτηκε τμήμα DNA 1800 ζευγών βάσεων το οποίο κωδικοποιεί την μικρότερη αλληλουχία που δύναται να δώσει τοξική πρωτεΐνη. Όμως, και πάλι το μέγεθος του θραύσματος είναι μεγάλο για να ανιχνευτεί σε σημεία του γαστρεντερικού συστήματος (Rossi, 2005).

Πραγματοποιήθηκε μελέτη σε πλήθος 24 κοκόρων με στόχο την εύρεση ανασυνδυασμένου DNA σε αίμα, ιστούς και προϊόντα πέψης. Τα ζώα διακρίθηκαν σε 4 ομάδες ανάλογα με την χορηγούμενη διαίτα.

|    |                                    |
|----|------------------------------------|
| T1 | συμβατικός αραβόσιτος και σόγια    |
| T2 | συμβατικός αραβόσιτος και ΓΤ σόγια |
| T3 | ΓΤ αραβόσιτος και συμβατική σόγια  |
| T4 | ΓΤ αραβόσιτος και ΓΤ σόγια         |

Για την ανίχνευση διαγονιδιακού DNA που προέρχεται από ΓΤ αραβόσιτο χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που πολλαπλασιάζουν θραύσμα μήκους 203 ζευγών βάσεων, επικαλύπτοντας το εσώνιο που προηγείται και την κωδικοποιητική περιοχή του *cryIa(b)*. Αντίστοιχα, για τη ΓΤ σόγια οι χρησιμοποιούμενοι εκκινητές επικαλύπτουν το πεπτίδιο διέλευσης των χλωροπλαστών και τον υποκινητή 35S. Επιπλέον, η χρήση των 35S F4 και R1 αποσκοπούσε στον πολλαπλασιασμό του υποκινητή 35S του ιού του μωσαϊκού που συντελεί στην έκφραση των διαγονιδίων στα 2 ΓΤ φυτά (Deaville, 2005).

**Πίνακας 18.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων



|           |                          |                           |                |
|-----------|--------------------------|---------------------------|----------------|
| Εκκινητής | Αλληλουχία (5' - 3')     | Μέγεθος αντιγράφου (ζ.β.) | Στόχος         |
| MON810    | CTCCCTAGTGTTGACCAGTGTTAC | 203                       | cry1ab         |
|           | CTGCGTGAGGGAGAGGGAGATGTC |                           |                |
| 35 S F3   | CGATGTGATATCTCCACTGACG   | 171                       | cp4epsps       |
| CTP R1    | TGTATCCCTTGACCCATGTTGT   |                           |                |
| 35S F4    | GCTCCTACAAATGCCATCA      | 195                       | υποκινητής 35S |
| 35S R1    | GATAGTGGGATTGTGCGTCA     |                           |                |

ΠΗΓΗ: Deaville, E. R., & Maddison, B. C. (2005).

Αξίζει να τονιστεί, ότι ο βαθμός διάσπασης του DNA της τροφής επηρεάζει το σχετικό επίπεδο ανίχνευσης του DNA. Επεξηγηματικότερα, ένα DNA που έχει υποστεί εκτεταμένη διάσπαση, θα διαθέτει λιγότερες ειδικές ενισχυτικές αλληλουχίες DNA (δηλ., «στόχος» DNA) του σωστού μεγέθους σε σχέση με το ακέραιο DNA. Από τις αναλύσεις, δεν προέκυψε θετικό αποτέλεσμα για διαγονιδιακό DNA στους ιστούς σε αντίθεση με τα δείγματα των προϊόντων πέψης στο στομάχι, στο δωδεκαδάκτυλο, στο υπόλοιπο λεπτό έντερο και στο παχύ έντερο. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι στην περίπτωση αντικατάστασης της ΓΤ τροφής με συμβατική, 96 ώρες πριν τη σφαγή, σε ζώα που διατρέφονταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος με ΓΤ τροφή (ομάδες T2, T3, T4), ο αριθμός των θετικών δειγμάτων στα προϊόντα πέψης μειώθηκε και η αλληλουχία του cp4epsps εντοπίστηκε μόνο στο στομάχι (Deaville, 2005).

Ο Scheideler κ.ά. πραγματοποίησαν δύο μελέτες για την πορεία της Cry3Bb1 πρωτεΐνης του καλαμποκιού MON863 σε ωοτόκες όρνιθες. Στην πρώτη, χορηγήθηκαν για 2 μήνες σε 48 ζώα ΓΤ τροφή και σε άλλα 48 συμβατικό καλαμπόκι. Συλλέχθηκαν κόπρανα μία ημέρα πριν την έναρξη του πειράματος, την 4<sup>η</sup> και 8<sup>η</sup> εβδομάδα. Ιστός ήπατος και μαστού λήφθηκαν την τελευταία μέρα του πειράματος. Στη δεύτερη έρευνα, 24 όρνιθες χωρίστηκαν ανάλογα με την κατανάλωση ΓΤ ή μη τροφής. Μετά το πέρας 1 μήνα, τα ζώα θανατώθηκαν με στόχο τη συλλογή και ανάλυση των προϊόντων των εντέρων. Για την ανίχνευση της Cry3Bb1 χρησιμοποιήθηκε ανοσοχρωματογραφική μέθοδος. Ο πίνακας δείχνει τον αριθμό των θετικών δειγμάτων στην Cry3Bb1 πρωτεΐνη (Scheideler, 2008).

**Πίνακας 19.** Αριθμός θετικών δειγμάτων Cry3Bb1 πρωτεΐνης σε κόπρανα, συκώτι και μαστικό ιστό

| Διατροφή  | Κόπρανα |        |        | Συκώτι |        |        | Μαστικός ιστός |        |        |
|-----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|--------|--------|
|           | 0       | 4 εβδ. | 8 εβδ. | 0      | 4 εβδ. | 8 εβδ. | 0 εβδ.         | 4 εβδ. | 8 εβδ. |
| Συμβατική | 0       | 0      | 2      | 0      | 0      | 0      | 0              | 0      | 0      |
| MON863    | 0       | 12     | 12     | 0      | 0      | 0      | 0              | 0      | 0      |

Το εβδ. αντιστοιχεί σε εβδομάδες. Η εύρεση της Cry3Bb1 πρωτεΐνης στα κόπρανα των ζώων που είχαν διατραφεί με συμβατική τροφή οφείλεται σε επιμόλυνση με ΓΤ (Scheideler, 2008).

Υπάρχει η δυνατότητα υπολογισμού της ποσότητας της Cry3Bb1 πρωτεΐνης σε ξηρή βάση. Συγκεκριμένα, το 77% του οργανικού περιεχομένου και η τέφρα υπέστησαν πέψη, με αποτέλεσμα το 23% της τροφής να καταλήξει στα κόπρανα. Επίσης, 41 ppm ήταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στη τροφή ενώ στα κόπρανα κυμάνθηκε από 1,5 – 4 ppm. Η χρήση του ακόλουθου τύπου αποσκοπεί στην εύρεση της πεπτικότητας. Ο παρακάτω τύπος υπολογίζει την ποσότητα της Cry3Bb1 πρωτεΐνης σε ξηρή βάση.

$$1 - \frac{\text{ποσοστό τροφής στα κόπρανα} \times \text{Cry3Bb1 συγκέντρωση στα κόπρανα}}{\text{ποσοστό τροφής} \times \text{Cry3Bb1 συγκέντρωση στη τροφή}} \times 100 = \% \text{Cry3Bb1 πρωτεΐνης υπέστη πέψη}$$

Το ποσοστό αφομοίωσης έφτασε στο 98 – 99%, γεγονός που αποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη είναι εξαιρετικά εύπεπτη (Scheideler, 2008).

Διεξάχθηκε μελέτη για τον πιθανό εντοπισμό διαγονιδιακών θραυσμάτων *CryIA(b)* και *epsps* από ζωοτροφές σε κοτόπουλα. Ως τροφή χορηγήθηκε καλαμπόκι και σόγια και το πείραμα διήρκησε 42 ημέρες. Ο ακόλουθος πίνακας δείχνει τις ομάδες που χωρίστηκαν οι κότες με βάση το περιεχόμενο της ζωοτροφής (Swiatkiewicz, 2010).

|         |   |
|---------|---|
| Ομάδα 1 | Συμβατικό καλαμπόκι και σόγια (control) |
| Ομάδα 2 | Συμβατικό καλαμπόκι και ΓΤ σόγια        |
| Ομάδα 3 | ΓΤ καλαμπόκι και συμβατική σόγια        |
| Ομάδα 4 | ΓΤ καλαμπόκι και σόγια                  |

Μετά το πέρας 43 ημερών, τα ζώα θανατώθηκαν και DNA απομονώθηκε από το έντερο και τους ιστούς. Οι εφαρμοζόμενες μέθοδοι είχαν την δυνατότητα να εντοπίσουν ΓΤ DNA σε ποσοστό 0,1 % του συνολικού. Δεν βρέθηκαν αλληλουχίες στα δείγματα που ελήφθησαν. Ο πίνακας που έπεται διαθέτει τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Swiatkiewicz, 2010).

**Πίνακας 20.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση γονιδίων καλαμποκιού και σόγιας

| Εκκινητής | Αλληλουχία 5' – 3'               | Στόχος                          | Μέγεθος αμπλικονίου, ζεύγη βάσεων |
|-----------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 35s – f2  | TGA TGT GAT ATC<br>TCC ACT GAC G | Σημείο σύνδεσης της αλληλουχίας | 172                               |

|              |   |  |     |
|--------------|---|--|-----|
| Petu – r1    | TGT ATC CCT TGA<br>GCC ATG TTG T        | του 35s υποκινητή<br>στην αλληλουχία<br>σήματος του<br>χλωροπλάστη στην<br>RR σόγια              | 172 |
| VW01         | TCG AAG GAC GAA<br>GGA CTC TAA CG       | Σημείο σύνδεσης<br>γονιδιωματικού<br>DNA με τον<br>υποκινητή του 35s<br>στο MON 810<br>καλαμπόκι | 170 |
| VW03         | TCC ATC TTT GGG<br>ACC ACT GTC G        |  | 170 |
| p35s – cf3   | CCA CGT CTT CAA<br>AGC AAG TGG          | CaMV 35s<br>υποκινητής της<br>σόγιας και του<br>MON810<br>καλαμποκιού                            | 123 |
| p35s – cf4   | TCC TCT CCA AAT<br>GAA ATG AAC TTC<br>C |  | 123 |
| HA – NOS 118 | GCA TGA CGT TAT<br>TTA TGA GAT GGG      | NOS τερματιστής<br>της RR σόγιας   | 118 |
| HA – NOS 118 | GAC ACC GCG CGC<br>GAT AAT TTA TCC      |  | 118 |

**ΠΗΓΗ:** Swiatkiewicz, Sylwester & Twardowska, Marta & Markowski, Jan & Mazur, Małgorzata & Sieradzki, Zbigniew & Kwiatek, And., 2010

Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 144 κότες για 4 μήνες η ΓΤ αλληλουχία και η πρωτεΐνη καταστράφηκαν σύντομα στο πεπτικό σύστημα και δεν εντοπίστηκαν στο αίμα, στην καρδιά, στο ήπαρ, στον σπλήνα, στα νεφρά, στους μαστούς και στα αυγά. Στον ακόλουθο πίνακα είναι καταγεγραμμένοι οι εκκινητές και οι συνθήκες της PCR ανάλυσης (Ma, 2013).

**Πίνακας 21.** Εκκινητές για τον εντοπισμό των γονιδίων στόχων σε δείγματα από φωτόκες όρνιθες

| Εκκινητής | Αλληλουχία (5' - 3')   | Ειδικότητα             | Γονίδιο στόχος | Μέγεθος αμπλικονίου (ζεύγη βάσεων) |
|-----------|------------------------|------------------------|----------------|------------------------------------|
| phyA2     | AACACTCTCGATCCGGGCACCT | Φυτό<br>(διαγονιδιακό) | phyA2          | 678                                |
|           | ACCAAGACACGGACCAAAGGC  |                        |                |                                    |

**ΠΗΓΗ:** Ma Q, Gao C, Zhang J, Zhao L, Hao W, Ji C., 2013

Μελετήθηκε η πορεία του διαγονιδιακού DNA και της πρωτεΐνης του ΓΤ καλαμποκιού φυτάσης στους ιστούς και στα προϊόντα των κοτόπουλων που είχαν διατραφεί με αυτό, από τους Lu κ.ά. Στο συγκεκριμένο καλαμπόκι εκφράζεται το γονίδιο (*phyA2*) που προέρχεται από τον *Aspergillus Niger*. Το *phyA2* έχει την ικανότητα να καταστήσει περισσότερο βιοδιαθέσιμο τον φώσφορο, οπότε αποφεύγεται η προσθήκη

ανόργανου φωσφόρου στην τροφή. Χρησιμοποιήθηκαν 160 ζώα που χωρίστηκαν με κριτήριο την κατανάλωση συμβατικού ή μη καλαμποκιού. Μετά το πέρας 42 ημερών, θανατώθηκαν και απομακρύνθηκαν η καρδιά, το ήπαρ, τα νεφρά, οι μαστοί καθώς και τα προϊόντα του γαστρεντερικού συστήματος. Σε κανένα από τα προαναφερθέντα δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός θραυσμάτων γονιδίου *phyA2*. Όσον αφορά την *phyA2* πρωτεΐνη, εκείνη δεν βρέθηκε στα δείγματα των ζώων που κατανάλωσαν συμβατικό καλαμπόκι. Αντιθέτως, βρέθηκε στα τμήματα που λήφθηκαν από το δωδεκαδάκτυλο και τη νηστίδα των ορνίθων που ταΐζονταν με διαγονιδιακό (Lu, 2015).

Εκπονήθηκε έρευνα σε κοτόπουλα για την εκτίμηση μεταφοράς ΓΤ DNA από Βt ρύζι για χρονικό διάστημα, 42 ημερών. Οι αλληλουχίες των χρησιμοποιούμενων εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό του *CryIab/lac* ήταν 5' - CAGGAACCAGGCCATCTCTA 3' και 5' - CGCTCCAAGCCAGTGTGTA - 3'. Επίσης, το τμήμα DNA που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση είχε μήκος 374 ζεύγη βάσεων. Δεν εντοπίστηκε η αλληλουχία του ΓΤ ρυζιού στο αίμα, στο συκώτι, στα νεφρά, στη σπλήνα, στο γαστρεντερικό σωλήνα και σε ιστό του μυός (Li, 2015).

## 7.6 Κουνέλια

Διενεργήθηκε μελέτη σε κουνέλια με σκοπό την εύρεση τυχόν ανασυνδυασμένου DNA από RR σόγια στους ιστούς και στο πεπτικό τους σύστημα. Από τα 15 πειραματόζωα, στα 10 χορηγήθηκε τροφή όπου η ΓΤ σόγια συμμετείχε σε ποσοστό 10% ενώ τα άλλα 5 διατρέφονταν με συμβατική σόγια. Η επιλογή διπλάσιου πλήθους κουνελιών για τη χορήγηση ΓΤ τροφής έγινε με στόχο την αύξηση της πιθανότητας εντοπισμού της ΓΤ αλληλουχίας. Λήφθηκαν δείγματα αίματος, συκωτιού, πλευρικού τετρακέφαλου μυ, μήκιστου μυ, νεφρού, στομάχου, εντέρου, περιφερικού λιπώδη ιστού και καρδιάς, προϊόντος πέψης του στομάχου, κοπράνων καθώς και μαλλιών για τον εντοπισμό πιθανής επιμόλυνσης από τις σκόνες ζωοτροφών. Κατά τη διάρκεια της PCR τα δείγματα παρακολουθήθηκαν για εκκινητές και ιχνηθέτες με λίγα νουκλεοτίδια, που σχετίζονται με τη δημιουργία αντιγράφων της 40-3-2 RR σόγιας μεγέθους 84 ζευγών βάσεων. Το όριο ανίχνευσης ήταν 13 αντίγραφα/ όγκο αντίδρασης (Morera, 2016).

**Πίνακας 22.** Εκκινητές και ιχνηθέτες που σχετίζονται με το ανασυνδυασμένο γεγονός 40-3-2 της RR σόγιας

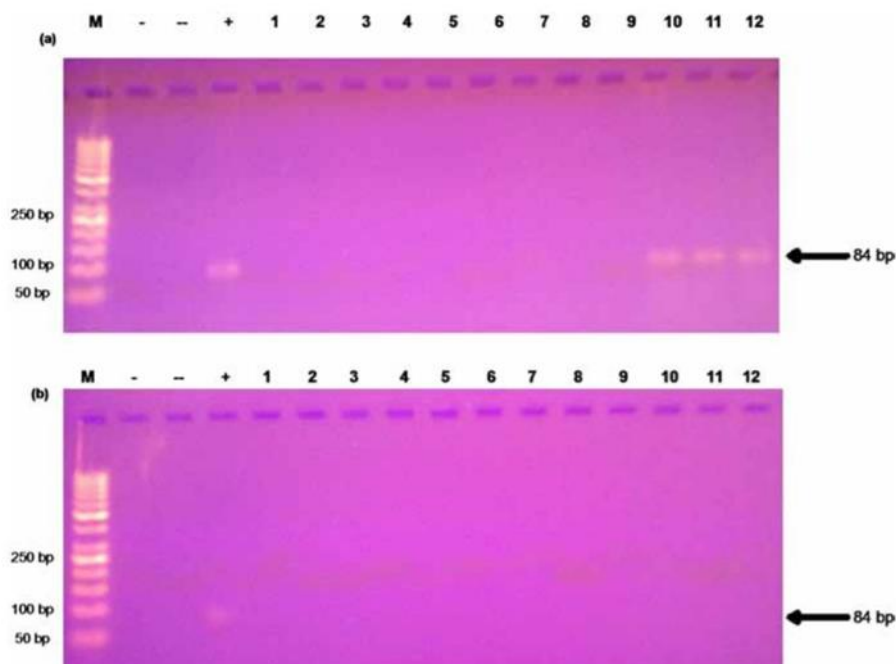
| Στόχος: Περιοχή σύνδεσης του ένθετου και του γονιδιώματος του φυτού |                    |                    |                      |
|---|--------------------|--------------------|----------------------|
| Γονίδιο   | Αλληλουχία 5' – 3' | Μέγεθος αντιγράφου | Θερμοκρασία τήξης °C |

|                         |                                    |                   |    |
|-------------------------|------------------------------------|-------------------|----|
|                         |                                    | , ζεύγη<br>βάσεων |    |
| 40-3-2<br>εκκινητή<br>ς | TTCATTCAAATAAGATCATACATACAGGT<br>T | 84                | 55 |
| 40-3-2<br>εκκινητή<br>ς | GGCATTGTAGGAGCCACCTT               |                   |    |
| 40-3-2<br>ιχνηθέτη<br>ς | FAM - CCTTTCCATTTGGG – MGBNFQ      |                   |    |

ΠΗΓΗ: Morera, P., Basiricò, L., Ronchi, B., & Bernabucci, U. ,2016

Η αλληλουχία εντοπίστηκε στα δείγματα του στομάχου και των περιττωμάτων υποδεικνύοντας ότι το ΓΤ DNA δεν υπέστη πλήρη αποικοδόμηση στο γαστρεντερικό σωλήνα. Επίσης, η ανίχνευσή του στα μαλλιά είναι αποτέλεσμα περιβαλλοντικής επιμόλυνσης. Δεν βρέθηκε στα δείγματα των ιστών, γεγονός που καθιστά το κρέας των κουνελιών που τρέφονται με ΓΤ τροφή εξίσου ασφαλές με εκείνων που τρέφονται με συμβατική.

**Σχήμα 17.** PCR για την 40-3-2 σόγια σε δείγματα από ιστούς (1 - 9 αίμα, σπυκώτι, πλευρικό τετρακέφαλο μυ, μήκιστο μυ, νεφρό, στομάχι, έντερο, περιφερικό λιπώδη ιστό και καρδιά), η λωρίδα 10 αντιστοιχεί στο προϊόν πέψης του στομάχου, η 11 στα κόπρανα και η 12 στα μαλλιά. Η α εικόνα αντιστοιχεί στα κουνέλια που έχουν διατραφεί με τη ΓΤ σόγια ενώ η β σε εκείνα που κατανάλωσαν συμβατική. Όπου M ο δείκτης, - : αρνητικός μάρτυρας δίχως DNA, -- αρνητικός έλεγχος (DNA από συμβατική σόγια) και + : θετικός μάρτυρας (DNA από ΓΤ σόγια). Τα βέλη δείχνουν το προσδοκώμενο μήκος των προϊόντων PCR.



ΠΗΓΗ: Morera, P., Basiricò, L., Ronchi, B., & Bernabucci, U. ,2016

Ο Shahid κ.ά. διερεύνησαν την κατάληξη του DNA του ΓΤ βαμβακιού στα κουνέλια. Το πείραμα εκτελέστηκε για 180 ημέρες σε 48 ζώα όπου η περιεκτικότητα της ζωοτροφής σε ΓΤ κυμαινόταν από 0 – 40 %. Ο πίνακας περιέχει τα γονίδια στόχους, τους εκκινητές, το μέγεθος των γονιδίων και τη θερμοκρασία τήξης τους.

**Πίνακας 23.** Αλληλουχία (5' → 3'), μέγεθος αντιγράφου και θερμοκρασία τήξης των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην PCR

| Αλληλουχία στόχος | Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3') | Μέγεθος αμπλικονίου (ζεύγη βάσεων) | Θερμοκρασία τήξης (°C) |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Cry1Ac            | TCAACAACATCATCGCATCC          | 459                                | 51                     |
|                   | CAGCCTCGAGTGTTCAGTA           |                                    |                        |
| Cry2A             | CCGCTCCATTACAACCAGAT          | 167                                | 51                     |
|                   | ATGGTGAAGCCGGTGTAGTC          |                                    |                        |
| Cp4 epsps         | TATGGCTTCCGCTCAGGT            | 111                                | 60                     |
|                   | AGCATCTTCTCAGTGTGGTCTCT       |                                    |                        |

**ΠΗΓΗ:** Salisu, Ibrahim & Shahid, Ahmad & Yaqoob, Amina & Khan, Innayat & Qayyum Rao, Abdul & Husnain, Tayyab., 2019

Από τις αναλύσεις δεν προέκυψαν θετικά δείγματα (αίμα, συκώτι, νεφρά, καρδιά, γαστρεντερικό) για τα γονίδια Cry1Ac, Cry2A και CP4 epsps (Salisu Shahid, 2019).

## 7.7 Κατσίκες

Εκπονήθηκε πείραμα με 20 έγκυες γαλακτοφόρες κατσίκες όπου τμήμα της τροφής τους περιείχε συμβατικό ή RR καλαμπόκι. Η μελέτη ξεκίνησε 2 μήνες πριν τον τοκετό και είχε στόχο τον εντοπισμό της πορείας του ανασυνδυασμένου DNA στις έγκυες αίγες και τους απογόνους τους. Μετά την γέννα συλλέχτηκε γάλα την 15<sup>η</sup>, 30<sup>η</sup>, 45<sup>η</sup>, 60<sup>η</sup> και 75<sup>η</sup> ημέρα. Ανιχνεύτηκαν οι διαγονιδιακές αλληλουχίες των 35 S και cp4 epsps στα δείγματα γάλακτος και αίματος μόνο από τις κατσίκες που είχαν διατραφεί με ΓΤ σόγια. Επίσης, βρέθηκαν στο συκώτι, στο νεφρό και στο αίμα ορισμένων απογόνων των αιγών (Tudisco, 2010).

**Πίνακας 24.** Αλληλουχία (5' → 3'), μέγεθος αντιγράφου και θερμοκρασία τήξης των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην PCR

| Θραύσμα   | Αλληλουχία εκκινητή (5' - 3')  | Μέγεθος αμπλικονίου (ζεύγη βάσεων) | Θερμοκρασία τήξης (°C) |
|-----------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| CP4 EPSPS | GCA AAT CCT CTG GCC<br>TTT CC  | 145                                | 60                     |
|           | CTT GCC CGT ATT GAT<br>GAC GTC |                                    |                        |

## 7.8 Πουλερικά και χοίροι

Διεξήχθη έρευνα σε πουλερικά και χοίρους που διατρέφονταν με ζωοτροφές που περιείχαν MON810 αραβόσιτο ή / και RR σόγια. Η έρευνα αποσκοπούσε στην εύρεση πιθανής μεταφοράς ανασυνδυασμένου DNA (αλληλουχία CaMV 35S, NOS), στην εκτίμηση της επίδρασης που έχει το ΓΤ DNA στην ποικιλία των βακτηρίων του πεπτικού συστήματος καθώς και στην πιθανή ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα τους. Τα ζώα διακρίθηκαν σε 4 ομάδες με γνώμονα την κατανάλωση ΓΤ ή μη σόγιας και αραβόσιτου. Συγκεκριμένα, η ομάδα I ήταν η ομάδα ελέγχου, στην ομάδα II χορηγήθηκε ΓΤ σόγια και συμβατικός αραβόσιτος, στην ομάδα III χορηγήθηκε συμβατική σόγια και ΓΤ αραβόσιτος και στην ομάδα IV ΓΤ σόγια και ΓΤ αραβόσιτος. Χρησιμοποιήθηκαν 643 κοτόπουλα Ross 308 και η διάρκεια του πειράματος ήταν 42 ημέρες. Λήφθηκαν δείγματα ιστών και προϊόντων πέψης την 43<sup>η</sup> ημέρα. Επιλέχθηκαν 96 Bovans Brown κότες 25 εβδομάδων, οι οποίες κατανάλωσαν μέχρι την 54<sup>η</sup> εβδομάδα της ζωής τους ανάμικτη τροφή. Κατά την 48<sup>η</sup> εβδομάδα αφαιρέθηκε ένα αυγό από κάθε κότα και στο τέλος του πειράματος λήφθηκαν δείγματα ανάλογα με εκείνα των κοτόπουλων. Το πλήθος των χρησιμοποιούμενων γουρουνιών ανήλθε στα 48 ενώ των μοσχαριών στα 40. Για την εύρεση πιθανών αλληλουχιών ΓΤ DNA στα βακτήρια του πεπτικού συστήματος, απομονώθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν βακτήρια *Escherichia Coli*, *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium* από το έντερο. Από τις αναλύσεις δεν προέκυψαν θετικά αποτελέσματα στα δείγματα της σπλήνας, του παγκρέατος, του ήπατος, των πνευμόνων, των νεφρών, του αίματος, των αυγών και των μυών. Εντοπίστηκαν διαγονιδιακές αλληλουχίες στο στομάχι όλων των ζώων και στο δωδεκαδάκτυλο των χοίρων. Επίσης, η ποσότητα και η ποικιλία των βακτηρίων της εντερικής χλωρίδας ήταν ίδια για όλες τις πειραματικές ομάδες (Sieradzki, 2013).

## 7.9 Ελάφια

Διεξήχθη μελέτη με στόχο την εύρεση του *cryIab* γονιδίου στο γαστρεντερικό σύστημα ελαφιού (*dama dama*) που κατανάλωσε ΓΤ αραβόσιτο. Η μελέτη περιλάμβανε 2 πειράματα με διαφορετικό πλήθος πειραματόζωων που διεξήχθησαν σε διαφορετικές εποχές του έτους.



**Πίνακας 25.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών για κάθε θραύσμα του γονιδίου στόχου

| Γονίδιο στόχος | Μέγεθος θραύσματος (ζεύγη βάσεων) | Αλληλουχίες εκκινητών               |
|----------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| cry1Ab         | 206                               | 5'-CCT GGA GAA CTT CGA CGG<br>TA-3' |
|                |                                   | 5'-TCG TGC CGT AGA GAG GAA<br>AG-3' |
|                | 244                               | 5'-CGT GCA GAA CTA CCA GGT<br>GC-3' |
|                |                                   | 5'-GGT TGT ACC TGA TCC AGT<br>CG-3' |
|                | 382                               | 5'-CCT GAC CAA GAG CAC CAA<br>CC-3' |
|                |                                   | 5'-CGA TGC GGT CGA TGT ACA<br>CC-3' |
|                | 727                               | 5'-ACG AGT GCA TCC CCT ACA<br>AC-3' |
|                |                                   | 5'-TAG TTG GGG AAC AGG CTC<br>AC-3' |
|                | 1423                              | 5'-ACG AGT GCA TCC CCT ACA<br>AC-3' |
|                |                                   | 5'-AGG TTG GTG CTC TTG GTC<br>AG-3' |

ΠΗΓΗ: Guertler, P., Lutz, B., Kuehn, R., Meyer, H. H. D., Einspanier, R., Killermann, B., & Albrecht, C., 2007

Δεν βρέθηκαν τμήματα DNA ούτε πρωτεΐνη. Ο αριθμός αντιγράφων γονιδίων επηρεάζει τη μεταφορά και τον εντοπισμό θραυσμάτων DNA στα εντόσθια. Η αδυναμία εντοπισμού στο πρώτο στομάχι, Cry1ab πρωτεΐνης οφείλεται στην ταυτόχρονη κατανάλωση του αραβόσιτου με χόρτα και βότανα (Guertler, 2007).

### 7.10 Ψάρια

Σε σολομούς του Ατλαντικού χορηγήθηκε ως τροφή ΓΤ σόγια που εκφράζει την πρωτεΐνη cp4epsps, με σκοπό την μελέτη της πορείας θραυσμάτων DNA (120 και 195 ζ. β.) στο γαστρεντερικό σωλήνα και την τυχόν εύρεσή τους στους ιστούς. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν μυϊκοί ιστοί γιατί καταναλώνονται από τον άνθρωπο καθώς και ιστοί του συκωτιού επειδή είναι το συνηθέστερο όργανο που λαμβάνει ουσίες από το αίμα. Επίσης, οι εγκεφαλικοί ιστοί χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητική σύγκριση διότι η μεταφορά ουσιών από το αίμα στα εγκεφαλικά κύτταρα είναι αυστηρότερα ελεγχόμενη (φράγμα αίματος – εγκεφάλου) σε σχέση με έτερα είδη ιστών. Από την ανάλυση PCR, εντοπίστηκε μόνο το θραύσμα των 120 ζ.β. στο περιεχόμενο του στομάχου, της πλωρικής περιοχής, του μέσου και περιφερικού εντέρου. Αντιθέτως, δεν ανιχνεύτηκε κανένα θραύσμα στους



ιστούς του εγκεφάλου, του συκωτιού και των μυών. Το όριο ευαισθησίας της ανάλυσης ανερχόταν σε 20 αντίγραφα (Sanden, 2004).

Σε πέστροφες χορηγήθηκε για χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων γενετικά τροποποιημένη σόγια χωρίς λίπος με στόχο την ανίχνευση του υποκινητή CaMV 35 S (220 ζεύγη βάσεων). Χρησιμοποιώντας την ένθετη ανάλυση PCR εντοπίστηκε στο πεπτικό σύστημα. Ύστερα, αλλάζοντας τη τροφή με συμβατική ο υποκινητής δεν ανιχνεύτηκε την 3<sup>η</sup> μέρα. Επίσης, ο υποκινητής εντοπίστηκε στα λευκοκύτταρα, στο νεφρό του κεφαλιού και στους μυς αλλά όταν αντικαταστάθηκε η τροφή με συμβατική την 5<sup>η</sup> μέρα δεν βρέθηκε. Τα προαναφερθέντα υποδεικνύουν ότι DNA από ΓΤ τροφή δεν θα παραμείνει στους ιστούς των ψαριών. Επίσης, κανένα δείγμα εγκεφάλου δεν βρέθηκε θετικό (Chainark, 2008).

**Πίνακας 26.** Ανίχνευση θραύσματος DNA υποκινητή CaMV 35 S (220 ζ.β.) σε περιεχόμενα του γαστρεντερικού από ψάρια (n= 20)

| Τροφή                | ΓΤ                    | Συμβατική |   |
|----------------------|-----------------------|-----------|---|
|                      |                       | 1         | 3 |
| Ημέρα δειγματοληψίας | Τέλος των 2 εβδομάδων |           |   |
| Στομάχι              | 8                     | 2         | 0 |
| Πρόσθιο έντερο       | 5                     | 3         | 0 |
| Οπίσθιο έντερο       | 2                     | 5         | 0 |

**ΠΗΓΗ:** CHAINARK, P., SATOH, S., HIRONO, I., AOKI, T., & ENDO, M. (2008)

**Πίνακας 27.** Ανίχνευση θραύσματος DNA υποκινητή CaMV 35 S σε λευκοκύτταρα και ιστούς ψαριών (n = 20)

| Τροφή                | ΓΤ                    | Συμβατική |   |   |
|----------------------|-----------------------|-----------|---|---|
|                      |                       | 1         | 3 | 5 |
| Ημέρα δειγματοληψίας | Τέλος των 2 εβδομάδων |           |   |   |
| Λευκοκύτταρο         | 2                     | 3         | 1 | 0 |
| Νεφρό του κεφαλιού   | 1                     | 1         | 2 | 0 |
| Σπλήνα               | 0                     | 0         | 0 | 0 |
| Συκώτι               | 0                     | 0         | 0 | 0 |
| Μυς                  | 1                     | 1         | 0 | 0 |
| Εγκέφαλος            | 0                     | 0         | 0 | 0 |

**ΠΗΓΗ:** CHAINARK, P., SATOH, S., HIRONO, I., AOKI, T., & ENDO, M. (2008)

## Συμπεράσματα

Η παρούσα πτυχιακή εργασία είχε ως αντικείμενο μελέτης, μέσω της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε ζωοτροφές με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Συγκεκριμένα, δόθηκαν γενικές πληροφορίες για τους ΓΤΟ όπως για τον τρόπο παραγωγής τους και την αναγκαιότητα χρήσης τους στον τομέα των ζωοτροφών. Ακολούθησε ανάλυση του ισχύοντος νομοθετικού πλαισίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης και περιγραφή των ενεργειών για την εξουσιοδότησή τους. Καταγράφηκαν τα οφέλη από την χρήση τους, η στάση των καταναλωτών απέναντι τους καθώς και οι μέθοδοι PCR που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους. Ειδική αναφορά έγινε σε συγκεκριμένες ΓΤ ζωοτροφές όπως η σόγια και ο αραβόσιτος λυσίνης, το καλαμπόκι με γονίδιο φυτάσης και η Roundup Ready σόγια.

Συλλέχθηκαν επιμελώς δεδομένα από πληθώρα πηγών για τη πιθανή μεταφορά ΓΤΟ από τις ζωοτροφές στα ζώα, στα προϊόντα τους και στον άνθρωπο. Αξίζει να τονιστεί ότι ο μηχανισμός αφομοίωσης τόσο της συμβατικής όσο και της ΓΤ ζωοτροφής είναι ίδιος. Η μεταφορά διαγονιδιακού DNA από τις ζωοτροφές θεωρείται απίθανη καθώς το DNA υφίσταται διάσπαση κατά τη διαδικασία παραγωγής της ζωοτροφής και κατά την κατανάλωσή της από το ζώο. Η πιθανότητα ανίχνευσης διαγονιδιακού DNA αυξάνεται όσο ελαττώνεται το μέγεθος του τμήματος DNA.

Επιπροσθέτως, υπάρχουν πρωτεΐνες που δύναται να λειτουργήσουν προστατευτικά ως προς το DNA οπότε το παραπάνω να φτάσει στο γαστρεντερικό σωλήνα και να εισαχθεί στα βακτήρια. Όμως, απαιτούνται οι κατάλληλες ρυθμιστικές αλληλουχίες για την επιτυχή εισαγωγή του DNA στα βακτήρια. Ακόμα, σημαντικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζει το σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης του κυττάρου. Σε περίπτωση που θραύσματα καταφέρουν να φτάσουν στο αίμα και στο έντερο των θηλαστικών ενεργοποιείται ο μηχανισμός της φαγοκυττάρωσης.

Στην πλειονότητα των μελετών, ανασυνδυασμένο DNA ανιχνεύτηκε στο στομάχι και στο δωδεκαδάκτυλο των ζώων σε αντίθεση με το αίμα, τους μύες και το γάλα στα οποία δεν εντοπίστηκε. Επίσης, η αδυναμία εύρεσης διαγονιδιακού DNA στους ιστούς, υποδεικνύει ότι το κρέας των ζώων που διατρέφονται με ΓΤ ζωοτροφές είναι εξίσου ασφαλές με εκείνων που διατρέφονται με συμβατική. Οι διαφορές που προκύπτουν μεταξύ των μελετών αποδίδονται σε πλήθος παραγόντων που συνδέονται με τις πειραματικές συνθήκες, τα ζώα και τις χορηγούμενες ζωοτροφές.

Συνοψίζοντας, το κεντρικό πόρισμα που αναδύεται είναι ότι οι ΓΤ ζωοτροφές είναι εξίσου ασφαλείς με τις συμβατικές τόσο για τα ζώα όσο και για τον άνθρωπο. Η Ευρωπαϊκή Ένωση θα μπορούσε να αναθεωρήσει τη στάση και τη νομοθεσία της ως προς τους ΓΤΟ για να επωφεληθεί από τα πολλαπλά οφέλη τους. Η κλιματική αλλαγή, η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, το πεπερασμένο και η κατασπατάληση των φυσικών πόρων καθιστούν επιτακτική την αξιοποίηση της γενετικής μηχανικής στο μέγιστο βαθμό.

## Βιβλιογραφία

### Ξερόγλωσση βιβλιογραφία

Abbas, M.S.T. Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. *Egypt J Biol Pest Control* **28**, 52 (2018).

<https://doi.org/10.1186/s41938-018-0051-2>

Aeschbacher, K., Messikommer, R., Meile, L., & Wenk, C. (2005). *Bt176 corn in poultry nutrition: physiological characteristics and fate of recombinant plant DNA in chickens*. *Poultry Science*, *84*(3), 385–394. doi:10.1093/ps/84.3.385

Agodi, A., Barchitta, M., Grillo, A., & Sciacca, S. (2006). *Detection of genetically modified DNA sequences in milk from The Italian market*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *209*(1), 81–88. doi: 10.1016/j.ijheh.2005.08.005

Alexander, T. W., Reuter, T., Okine, E., Sharma, R., & McAllister, T. A. (2006). *Conventional and real-time polymerase chain reaction assessment of the fate of transgenic DNA in sheep fed Roundup Ready rapeseed meal*. *British Journal of Nutrition*, *96*(06), 997. doi:10.1017/bjn20061935

Alexandra Ribarits, Frank Narendja, Walter Stepanek, Rupert Hochegger, Detection Methods Fit-for-Purpose in Enforcement Control of Genetically Modified Plants Produced with Novel Genomic Techniques (NGTs), *Agronomy*, 10.3390/agronomy11010061,**11**, 1, (61), (2020).

Bahrtdt, C., Krech, A. B., Wurz, A., & Wulff, D. (2010). Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(6), 2103–2112. doi:10.1007/s00216-009-3380-x

Beagle, J. M., Apgar, G. A., Jones, K. L., Griswold, K. E., Radcliffe, J. S., Qiu, X., ... Iqbal, M. J. (2006). *The digestive fate of Escherichia coli glutamate dehydrogenase deoxyribonucleic acid from transgenic corn in diets fed to weanling pigs1*. *Journal of Animal Science*, *84*(3), 597–607. doi:10.2527/2006.843597x

Bellocchi, G., De Giacomo, M., Foti, N. *et al.* Testing the interaction between analytical modules: an example with Roundup Ready<sup>®</sup> soybean line GTS 40-3-2. *BMC Biotechnol* *10*, 55 (2010).

Bertheau, Y., Helbling, J. C., Fortabat, M. N., Makhzami, S., Sotinel, I., Audéon, C., ... Martin, P. (2009). *Persistence of Plant DNA Sequences in the Blood of Dairy Cows Fed with Genetically Modified (Bt176) and Conventional Corn Silage*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 509–516. doi:10.1021/jf802262c

Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007;49(4):423-435. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022

Broeders, Sylvia R M et al. “How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed.” *Journal of biomedicine & biotechnology* vol. 2012 (2012): 402418. doi:10.1155/2012/402418

Brookes G, Barfoot P. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2013: Impacts on pesticide use and carbon emissions. *GM Crops Food*. 2015;6(2):103-133. doi:10.1080/21645698.2015.1025193

Broll, H., Zagon, J., Butschke, A., Leffke, A., Spiegelberg, A., Böhme, H., Flachowsky, G. (2005): The fate of DNA of transgenic inulin synthesizing potatoes in pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 14, Suppl. 1: 337-340.

Buh Gašparič, M., Tengs, T., La Paz, J. L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T., ... Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 2023–2029. doi:10.1007/s00216-009-3418-0

Çakır, Ö., Meriç, S., & Arı, Ş. (2016). *Detection of Genetically Modified Organisms in Feed*. *Genetically Modified Organisms in Food*, 207–222. doi:10.1016/b978-0-12-802259-7.00019-1

Calsamiglia, S., Hernandez, B., Hartnell, G. F., & Phipps, R. (2007). *Effects of Corn Silage Derived from a Genetically Modified Variety Containing Two Transgenes on Feed Intake, Milk Production, and Composition, and the Absence of Detectable Transgenic Deoxyribonucleic Acid in Milk in Holstein Dairy Cows*. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4718–4723. doi:10.3168/jds.2007-0286

Cankar, Katarina et al. “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* vol. 6 37. 14 Aug. 2006, doi:10.1186/1472-6750-6-37

Castillo, A. R., Gallardo, M. R., Maciel, M., Giordano, J. M., Conti, G. A., Gaggiotti, M. C., ... Hartnell, G. F. (2004). *Effects of Feeding Rations with Genetically Modified Whole Cottonseed to Lactating Holstein Cows*. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1778–1785. doi:10.3168/jds. s0022-0302(04)73333-0

CHAINARK, P., SATOH, S., HIRONO, I., AOKI, T., & ENDO, M. (2008). *Availability of genetically modified feed ingredient: investigations of ingested foreign DNA in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss**. *Fisheries Science*, 74(2), 380–390. doi:10.1111/j.1444-2906.2008. 01535.x

Chapter 6: Maize with Increased Lysine (Lysine Maize—LY038). (2008). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 99–106. doi:10.1111/j.1541-4337.2007.00029\_8.x

Chinnadurai P, Stojšin D, Liu K, et al. Variability of CP4 EPSPS expression in genetically engineered soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Transgenic Res*. 2018;27(6):511-524. doi:10.1007/s11248-018-0092-z

Chowdhury, E. H., Kuribara, H., Hino, A., Sultana, P., Mikami, O., Shimada, N., ... Nakajima, Y. (2003). *Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and *CryIAb* protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn *Bt11* 1*. *Journal of Animal Science*, 81(10), 2546–2551. doi:10.2527/2003.81102546x

CHOWDHURY, E. H., MIKAMI, O., MURATA, H., SULTANA, P., SHIMADA, N., YOSHIOKA, M., ... NAKAJIMA, Y. (2004). *Fate of Maize Intrinsic and Recombinant Genes in Calves Fed Genetically Modified Maize *Bt11**. *Journal of Food Protection*, 67(2), 365–370. doi:10.4315/0362-028x-67.2.365

Christ, B., Hochstrasser, R., Guyer, L. *et al.* Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene *BAR*. *Nature Plants* 3, 937–945 (2017).

<https://doi.org/10.1038/s41477-017-0061-1>

de Santis B, Stockhofe N, Wal JM, Weesendorp E, Lallès JP, van Dijk J, Kok E, De Giacomo M, Einspanier R, Onori R, Brera C, Bikker P, van der Meulen J, Kleter G. Case studies on genetically modified organisms (GMOs): Potential risk scenarios and associated health indicators. *Food Chem Toxicol*. 2018 Jul; 117:36-65. doi: 10.1016/j.fct.2017.08.033. Epub 2017 Aug 30. PMID: 28859885.

Deville, E. R., & Maddison, B. C. (2005). *Detection of Transgenic and Endogenous Plant DNA Fragments in the Blood, Tissues, and Digesta of Broilers*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10268–10275. doi:10.1021/jf051652f

Dong, W., Yang, L., Shen, K. *et al.* GMDD: a database of GMO detection methods. *BMC Bioinformatics* 9, 260 (2008).

Duggan, P. S., Chambers, P. A., Heritage, J., & Forbes, J. M. (2003). *Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep*. *British Journal of Nutrition*, 89(02), 159. doi:10.1079/bjn2002764

Eck, P. (2013). *Recombinant DNA Technologies in Food*. *Biochemistry of Foods*, 503–556. doi:10.1016/b978-0-08-091809-9.00013-3

Einspanier, R., Klotz, A., Kraft, J., Aulrich, K., Poser, R., Schwägele, F., ...

Flachowsky, G. (2001). *The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material*. *European Food Research and Technology*, 212(2), 129–134. doi:10.1007/s002170000248

Eischeid, A.C. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res Notes* 4, 263 (2011)

Efsa, 2008 Safety and Nutritional Assessment

[Elysia K. Krieger](#) , [Edwards Allen](#) , [Larry A. Gilbertson](#) , [James K. Roberts](#)<sup>1</sup> , [William Hiatt](#) , and [Rick A. Sanders](#), (2008), The Flavr Savr Tomato, an Early Example of RNAi Technology, *HortScience*, Volume 43 (3), 962 – 964, doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.3.962>

Eur-Lex REGULATION (EU) No 503/2013

Flachowsky, G., Schafft, H. & Meyer, U. Animal feeding studies for nutritional and safety assessments of feeds from genetically modified plants: a review. *J. Verbr. Lebensm.* 7, 179–194 (2012).

Giacomo, Marzia & Domenicantonio, C. & De Santis, Barbara & Debegnach, Francesca & Onori, Roberta & Brera, Carlo. (2016). Carry-over of DNA from genetically modified soyabean and maize to cow's milk. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 25. 1. 10.22358/jafs/65570/2016.

Giraldo PA, Shinozuka H, Spangenberg GC, Cogan NOI, Smith KF. Safety Assessment of Genetically Modified Feed: Is There Any Difference from Food? *Front Plant Sci.* 2019 Dec 11; 10:1592. doi: 10.3389/fpls.2019.01592. PMID: 31921242; PMCID: PMC6918800.

Guertler, P., Lutz, B., Kuehn, R., Meyer, H. H. D., Einspanier, R., Killermann, B., & Albrecht, C. (2007). *Fate of recombinant DNA and CryIAb protein after ingestion and dispersal of genetically modified maize in comparison to rapeseed by fallow deer (Dama dama).* *European Journal of Wildlife Research*, 54(1), 36–43. doi:10.1007/s10344-007-0104-4

Guertler, P., Paul, V., Albrecht, C., & Meyer, H. H. D. (2009). *Sensitive and highly specific quantitative real-time PCR and ELISA for recording a potential transfer of novel DNA and CryIAb protein from feed into bovine milk.* *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(6-7), 1629–1638. doi:10.1007/s00216-009-2667-2

Hanspeter Naegeli, Jean-Louis Bresson, Tamas Dalmay Assessment of genetically modified maize MON 87427 × MON 87460 × MON 89034 × 1507 × MON 87411 × 59122 and subcombinations, for food and feed uses, under Regulation (EC) No 1829/2003 (application EFSA-GMO-NL-2017-139) 2021, doi: 10.2903/j.efsa.2021.6351

ISAAA GM Approval Database

<https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/11/default.asp>

J.L. Vicini, GMO crops in animal nutrition, *Animal Frontiers*, Volume 7, Issue 2, April 2017, Pages 9–14

Jennings, J., Albee, L., Kolwyck, D., Surber, J., Taylor, M., Hartnell, G., ... Glenn, K. (2003). *Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn Borer Corn.* *Poultry Science*, 82(3), 371–380. doi:10.1093/ps/82.3.371

Li, Z., Gao, Y., Zhang, M., Feng, J., & Xiong, Y. (2015). *Effects of a diet containing genetically modified rice expressing theCryIAb/IAcprotein (Bacillus thuringiensistoxin) on broiler chickens.* *Archives of Animal Nutrition*, 69(6), 487–498. doi:10.1080/1745039x.2015.1087749



Lisha,, New,C.Y., Nishibuchi, M.,Son,R. Rapid genetically modified organism (GMO) screening of various food products and animal feeds using multiplex polymerase chain reaction, *Food Research*,Volume 1, Issue 1, January 2017, Pages 1-8

Lu L, Guo J, Li S, et al. Influence of Phytase Transgenic Corn on the Intestinal Microflora and the Fate of Transgenic DNA and Protein in Digesta and Tissues of Broilers. *PLoS One*. 2015;10(11): e0143408. Published 2015 Nov 23. doi: 10.1371/journal.pone.0143408

Lucht JM. Public Acceptance of Plant Biotechnology and GM Crops. *Viruses*. 2015;7(8):4254-4281. Published 2015 Jul 30. doi:10.3390/v7082819

Kamle M, Kumar P, Patra JK, Bajpai VK. Current perspectives on genetically modified crops and detection methods. *3 Biotech*. 2017;7(3):219. doi:10.1007/s13205-017-0809-3

Kleter G, McFarland S, Bach A, Bernabucci U, Bikker P, Busani L, Kok E, Kostov K, Nadal A, Pla M, Ronchi B, Terre M, Einspanier R. Surveying selected European feed and livestock production chains for features enabling the case-specific post-market monitoring of livestock for intake and potential health impacts of animal feeds derived from genetically modified crops. *Food Chem Toxicol*. 2018 Jul; 117:66-78. doi: 10.1016/j.fct.2017.10.004. Epub 2017 Oct 6. PMID: 28993215.

Klotz, A., Mayer, J., & Einspanier, R. (2002). *Degradation and possible carry over of feed DNA monitored in pigs and poultry*. *European Food Research and Technology*, 214(4), 271–275. doi:10.1007/s00217-001-0444-3

Ma Q, Gao C, Zhang J, Zhao L, Hao W, Ji C. Detection of transgenic and endogenous plant DNA fragments and proteins in the digesta, blood, tissues, and eggs of laying hens fed with phytase transgenic corn. *PLoS One*. 2013;8(4): e61138. doi: 10.1371/journal.pone.0061138

Morcia, C.; Ghizzoni, R.; Delogu, C.; Andreani, L.; Carnevali, P.; Terzi, V. Digital PCR: What Relevance to Plant Studies? *Biology* **2020**, 9, 433.

Morera, P., Basiricò, L., Ronchi, B., & Bernabucci, U. (2016). Fate of transgenic deoxyribonucleic acid fragments in digesta and tissues of rabbits fed genetically modified soybean meal1. *Journal of Animal Science*, 94(3), 1287–1295. doi:10.2527/jas.2015-0025

Nadal A, De Giacomo M, Einspanier R, Kleter G, Kok E, McFarland S, Onori R, Paris A, Toldrà M, van Dijk J, Wal JM, Pla M. Exposure of livestock to GM feeds: Detectability and measurement. *Food Chem Toxicol.* 2018 Jul; 117:13-35. doi: 10.1016/j.fct.2017.08.032. Epub 2017 Aug 25. PMID: 28847764.

Nicolia, A., A. Manzo, F. Veronesi, and D. Rosellini. 2013. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Critical Reviews in Biotechnology.* DOI: 10.3109/07388551.2013.823595.

Norman Muzhinji, Victor Ntuli. (2021) Genetically modified organisms and food security in Southern Africa: conundrum and discourse. *GM Crops & Food* 12:1, pages 25-35.

Nyannor, E.K.D., [Adeola](#) O. (2007). Corn Expressing an *Escherichia Coli*-Derived Phytase Gene: Comparative Evaluation Study in Broiler Chicks. *Poultry Science*, 87 (10), 2015 – 2022.

Paul V, Guertler P, Wiedemann S, Meyer HH. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total dietary feed proteins in dairy cow digestion. *Transgenic Res.* 2010;19(4):683-689. doi:10.1007/s11248-009-9339-z

Phipps, R. H., Deaville, E. R., & Maddison, B. C. (2003). *Detection of Transgenic and Endogenous Plant DNA in Rumen Fluid, Duodenal Digesta, Milk, Blood, and Feces of Lactating Dairy Cows.* *Journal of Dairy Science*, 86(12), 4070–4078. doi:10.3168/jds.s0022-0302(03)74019-3

Phipps, R. H., Jones, A. K., Tingey, A. P., & Abeyasekera, S. (2005). *Effect of Corn Silage from an Herbicide-Tolerant Genetically Modified Variety on Milk Production and Absence of Transgenic DNA in Milk.* *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2870–2878. doi:10.3168/jds.s0022-0302(05)72968-4

Quan, Phenix-Lan et al. “dPCR: A Technology Review.” *Sensors (Basel, Switzerland)* vol. 18,4 1271. 20 Apr. 2018, doi:10.3390/s18041271

Reuter, T. and Aulrich, K. (2003). Investigation on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: fate of feed-ingested foreign DNA in pig bodies. *Eur. Food Res. Technol.* 216: 185–192.

Riaz Marral MW, Khan MB, Ahmad F, Farooq S, Hussain M (2020) The influence of transgenic (Bt) and non-transgenic (non-Bt) cotton mulches on weed dynamics, soil

properties and productivity of different winter crops. PLoS ONE 15(9): e0238716.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238716>

Rossi, F., Morlacchini, M., Fusconi, G., Pietri, A., Mazza, R., & Piva, G. (2005). *Effect of Bt corn on broiler growth performance and fate of feed-derived DNA in the digestive tract. Poultry Science, 84(7), 1022–1030.* doi:10.1093/ps/84.7.1022

Salisu, Ibrahim & Shahid, Ahmad & Yaqoob, Amina & Khan, Innayat & Qayyum Rao, Abdul & Husnain, Tayyab. (2019). Assessing the fate of recombinant plant DNA in rabbit's tissues fed genetically modified cotton. *J Anim Physiol a Anim Nutr.* 10.1111/jpn.13243.

Salisu IB, Shahid AA, Yaqoob A, et al. Molecular Approaches for High Throughput Detection and Quantification of Genetically Modified Crops: A Review. *Front Plant Sci.* 2017; 8:1670. Published 2017 Oct 16. doi:10.3389/fpls.2017.01670

Sanden, M., Ian, J. B., Rahman, M. A., and Hemre, G-I. (2004). The fate of transgenic sequences presents in genetically modified plant products in fish feed, investigating the survival of GM soybean DNA fragments during feeding trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture.* 237: 391–405.

Sapkota AR, Lefferts LY, McKenzie S, Walker P. What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. *Environ Health Perspect.* 2007;115(5):663-670. doi:10.1289/ehp.9760

Scheideler, Sheila & Hileman, Ronald & Weber, T & Robeson, L & Hartnell, Gary. (2008). The In Vivo Digestive Fate of the Cry3Bb1 Protein in Laying Hens Fed Diets Containing MON 863 Corn. *Poultry science.* 87. 1089-97. 10.3382/ps.2007-00429.

Sharma, R., Damgaard, D., Alexander, T. W., Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Stanford, K., & McAllister, T. A. (2006). *Detection of Transgenic and Endogenous Plant DNA in Digesta and Tissues of Sheep and Pigs Fed Roundup Ready Canola Meal. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(5), 1699–1709.* doi:10.1021/jf052459o

Sieradzki Z, Mazur M, Kwiatek K, Swiatkiewicz S, Swiatkiewicz M, Koreleski J, Hanczakowska E, Arczewska-Włosek A, Goldsztejn M. Assessing the possibility of genetically modified DNA transfer from GM feed to broiler, laying hen, pig and calf tissues. *Pol J Vet Sci.* 2013;16(3):435-41. doi: 10.2478/pjvs-2013-0061. PMID: 24195276.

Sieradzki, Zbigniew, Mazur, Małgorzata, Król, Beata and Kwiatek, Krzysztof. "Prevalence of genetically modified soybean in animal feedingstuffs in Poland" *Journal of Veterinary Research*, vol.65, no.1, 2021, pp.93-99. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0012>

Singhal, K. K., Tyagi, A. K., Rajput, Y. S., Singh, M., Kaur, H., Perez, T., & Hartnell, G. F. (2011). *Feed intake, milk production and composition of crossbred cows fed with insect protected Bollgard II® cottonseed containing Cry1Ac and Cry2Ab proteins*. *Animal*, 5(11), 1769–1773. doi:10.1017/s1751731111000899

Świątkiewicz, M., Bednarek, D., Markowski, J., Hanczakowska, E. & Kwiatek, K. (2013). Effect of feeding genetically modified maize and soybean meal to sows on their reproductive traits, haematological indices and offspring performance. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57(3) 413-418.

Swiatkiewicz, Sylwester & Twardowska, Marta & Markowski, Jan & Mazur, Małgorzata & Sieradzki, Zbigniew & Kwiatek, And. (2010). Fate of transgenic DNA from Bt corn and Roundup-Ready soybean meal in broilers fed GMO feed. *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy*. 54. 237-242.

Theodoros H. Varzakas, G. Chryssochoidis, D. Argyropoulos, Approaches in the risk assessment of genetically modified foods by the Hellenic Food Safety Authority, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 45, Issue 4, 2007, Pages 530-542

Tony, M. A., Butschke, A., Broll, H., Grohmann, L., Zagon, J., Halle, I., ... Flachowsky, G. (2003). *Safety assessment of BT 176 Maize in broiler nutrition: Degradation of Maize-DNA and its metabolic fate*. *Archives of Animal Nutrition*, 57(4), 235–252. doi:10.1080/00039420310001594397

Tudisco, R., Mastellone, V., Cutrignelli, M. I., Lombardi, P., Bovera, F., Mirabella, N., ... Infascelli, F. (2010). *Fate of transgenic DNA and evaluation of metabolic effects in goats fed genetically modified soybean and in their offsprings*. *Animal*, 4(10), 1662–1671. doi:10.1017/s1751731110000728

Turkec A, Kazan H, Karacanli B, Lucas SJ. DNA extraction techniques compared for accurate detection of genetically modified organisms (GMOs) in maize food and feed products. *J Food Sci Technol*. 2015 Aug;52(8):5164-71. doi: 10.1007/s13197-014-1547-8. Epub 2014 Sep 17. PMID: 26243938; PMCID: PMC4519489.

Van Eenennaam AL, Young AE. Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations. *J Anim Sci.* 2014 Oct;92(10):4255-78. doi: 10.2527/jas.2014-8124. Epub 2014 Sep 2. Erratum in: *J Anim Sci.* 2014 Nov;92(11):5293. PMID: 25184846.

Van Eenennaam, A. L., & Young, A. E. (2017). *Detection of dietary DNA, protein, and glyphosate in meat, milk, and eggs*. *Journal of Animal Science*, 95(7), 3247–3269. doi:10.2527/jas.2016.1346

Walsh MC, Buzoianu SG, Rea MC, et al. Effects of feeding Bt MON810 maize to pigs for 110 days on peripheral immune response and digestive fate of the cry1Ab gene and truncated Bt toxin. *PLoS One.* 2012;7(5): e36141. doi: 10.1371/journal.pone.0036141

Wiedemann, S., Lutz, B., Albrecht, C., Kuehn, R., Killermann, B., Einspanier, R., & Meyer, H. H. D. (2009). Fate of genetically modified maize and conventional rapeseed, and endozoochory in wild boar (*Sus scrofa*). *Mammalian Biology - Zeitschrift Für Säugetierkunde*, 74(3), 191–197. doi: 10.1016/j.mambio.2008.07.002

Zhu, Hanliang et al. “PCR past, present and future.” *BioTechniques* vol. 69,4 (2020): 317-325. doi :10.2144/btn-2020-0057

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6448>

<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:157:0001:0048:EN:PDF>

<https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/how-to-make-a-gmo/>

### **Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία**

Μπατρίνου, Α. (2011) Σύγχρονη Βιοτεχνολογία Τροφίμων, Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδη