

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΤΩΝ

2

Η γενετική τροποποίηση των φυτών βασίζεται στις αρχές της Μοριακής Γενετικής για το χειρισμό του γενετικού υλικού με μοριακές τεχνικές.

Οι εφαρμογές των μοριακών τεχνικών ώστε να επιτευχθεί γενετική τροποποίηση στα φυτά, αλλά και σε άλλους οργανισμούς, αποτελεί τον ιδιαίτερο κλάδο της Βιοτεχνολογίας που ονομάζουμε Γενετική Μηχανική. Οι επεμβάσεις αυτές γίνονται σε ποιοτικά γνωρίσματα (γνωρίσματα που ελέγχονται από ένα γονιδιακό τόπο) και αφορούν είτε την τροποποίηση προϋπάρχοντος γνωρίσματος, είτε την εισαγωγή νέου γνωρίσματος με μεταφορά γονιδίων από άλλους οργανισμούς.

Η Γενετική Μηχανική περιλαμβάνει την κλωνοποίηση γονιδίων (συνήθως μέσω βακτηρίων) και τη μεταφορά τους στα φυτά. Το μεγάλο πλεονέκτημα σε σχέση με την κλασική Βελτίωση των Φυτών είναι ότι δεν απαιτεί διασταυρώσεις και μακρόχρονη διαδικασία επιλογών και απογονικού ελέγχου. Επισημαίνεται όμως πως αυτό είναι εφικτό μόνο για ποιοτικά γνωρίσματα τα γονίδια των οποίων είναι εύκολο να εντοπιστούν και απομονωθούν, κάτι που είναι δύσκολο για τα ποσοτικά γνωρίσματα που ελέγχονται από μεγάλο αριθμό γονιδίων. Με τη μέθοδο της κλωνοποίησης γονιδίων μεταφέρονται στα καλλιεργούμενα φυτά γονίδια αντοχής σε ζιζανιοκτόνα, έντομα, ιούς και ασθένειες, όχι όμως γονίδια που αφορούν την απόδοση ή την προσαρμοστικότητα των ποικιλιών.

3 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ Γ.Τ.

4

Οι κυριότερες εφαρμογές της Γενετικής Μηχανικής στα Φυτά αναφέρονται:

- στην αφαίρεση ενός γονιδίου ώστε να εξαλειφθεί ένα γνώρισμα του φυτού
- Στην τροποποίηση ενός γονιδίου του φυτού ώστε αφενός να εξακολουθεί εκφράζεται κανονικά αλλά από την άλλη το προϊόν του, δηλ. η πρωτεΐνη που παράγει, να μη αναγνωρίζεται από κάποιο ανασταλτικό της δράσης του παράγοντα (πχ δραστική ουσία ζιζανιοκτόνου)
- στην προσθήκη ενός «ξένου» γονιδίου ώστε το φυτό να αποκτήσει ένα νέο γνώρισμα (πχ αντοχή σε ένα έντομο)

Η αφαίρεση και τροποποίηση γονιδίου αφορά συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο και ουσιαστικά αποτελεί 'στοχευμένη' τροποποίηση. Αντίθετα, η προσθήκη γονιδίου γίνεται σε τυχαία θέση και είναι μη στοχευμένη.

5

Η ένθεση του 'ξένου' γονιδίου σε τυχαία θέση ενδέχεται να συντελέσει σε ανεπιθύμητες μεταλλάξεις, όπως ένθεση σε δομικό (ενεργό) γονίδιο του φυτού αλλοιώνοντας τη γενετική πληροφορία, ή σε θέση που επιφέρει αναξιόπιστη έκφραση του «ξένου» γονιδίου.

6-8

Η γενετική τροποποίηση μπορεί να είναι στοχευμένη ακόμη και στην περίπτωση προσθήκης γονιδίου (γονιδιακή στόχευση). Αυτό επιτυγχάνεται με την αντικατάσταση προϋπάρχοντος γονιδίου (γονιδιακή αντικατάσταση) ή με την ενσωμάτωση του σε προεπιλεγμένη θέση που κρίνεται κατάλληλη για την έκφρασή του (στοχευμένη ένθεση).

Για τη γονιδιακή αντικατάσταση, με διπλό χιάσμα και αμοιβαία ανταλλαγή ομόλογο τμήμα του γονιδιωματικού DNA αντικαθίσταται από το «ξένο» γονίδιο.

Για τη στοχευμένη ένθεση, με απλό χιάσμα το «ξένο» γονίδιο ενθέτεται στην επιθυμητή περιοχή.

9

Η Κλασική Βελτίωση είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα, ακόμη και όταν αφορά ένα μονογονιδιακό γνώρισμα, όπως στην περίπτωση της αναδιασταύρωσης για τη μεταφορά ενός μονογονιδιακού γνώρισματος από μια πηγή (δότης) σε μια ποικιλία (δέκτης). Απαιτούνται περίπου 10 γενεές για τη μεταφορά ενός γονιδίου σε μια ποικιλία, ακόμη και αν η διαδικασία υποστηρίζεται από μοριακή επιλογή. Με τη Γενετική Μηχανική κάτι τέτοιο μπορεί να γίνει στο εργαστήριο σε διάστημα λιγότερο του ενός χρόνου. Βέβαια στη συνέχεια πάλι απαιτούνται πειράματα στο χωράφι ώστε να αξιολογηθεί η συμπεριφορά των τροποποιημένων φυτών στις φυσικές συνθήκες καλλιέργειας. Σε κάθε περίπτωση όμως είναι κατά πολύ συντομότερη της κλασικής αναδιασταύρωσης.

10

Ένα ακόμη μειονέκτημα στην κλασική βελτίωση είναι ότι, επιπλέον του επιθυμητού γονιδίου μεταφέρονται από το δότη και άλλα γονίδια λόγω στενής σύνδεσης που ενδέχεται να είναι ανεπιθύμητα. Αντίθετα, το πλεονέκτημα της γενετικής μηχανικής αφορά την ακρίβεια της γενετικής τροποποίησης της ποικιλίας, ειδικά όταν γίνεται με στοχευμένη ένθεση. Στη γενετική μηχανική μεταφέρεται το επιθυμητό γονίδιο και τίποτε άλλο.

Εντούτοις, δεν μπορεί να γίνει σύγκριση των δύο κλάδων γιατί η γενετική τροποποίηση είναι ρεαλιστική μόνο για μονο-γονιδιακά (ποιοτικά) γνώρισμα ενώ στην κλασική βελτίωση κυριαρχούν τα ποσοτικά γνώρισμα. Καθώς τα ποσοτικά γνώρισμα είναι πρωταρχικής σημασίας για τις ποικιλίες, η συνήθης πρακτική είναι η Γενετική Μηχανική να έπεται της Βελτίωσης Φυτών ώστε να επιφέρει επιπλέον βελτίωση με την προσθήκη του νέου γνώρισματος.

11

Για τη γενετική τροποποίηση των φυτών είναι απαραίτητος ένας φορέας που λειτουργεί ως «δούρειος ίππος» και μεταφέρει τα «ξένα» γονίδια στα φυτά. Τέτοιοι φορείς μπορεί να είναι τα πλασμίδια των βακτηρίων ή ιοί που προσβάλλουν βακτήρια (βακτηριοβόγοι ιοί) ή τα κοσμίδια που προκύπτουν τεχνητά από το συνδυασμό πλασμιδίου και βακτηριοφάγου ιού. Η επιλογή του κατάλληλου φορέα γίνεται με βάση το μέγεθος του «ξένου» γονιδίου καθώς τα πλασμίδια φιλοξενούν DNA έως 15 χιλ. βάσεις, οι βακτηριοφάγοι ιοί 12 – 22 χιλ. βάσεις και τα κοσμίδια έως 45 χιλ. βάσεις

12

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, που το κύριο γενετικό τους υλικό αποτελείται από ένα και μοναδικό, κυκλικό χρωμόσωμα. Εκτός όμως από το κύριο χρωμόσωμα, έχουν και άλλα μικρότερα χρωμοσώματα (όχι πάντα), επίσης κυκλικά, τα οποία ονομάζονται πλασμίδια. Ένα τέτοιο πλασμίδιο είναι το R (resistance), που είναι το πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Τα πλασμίδια αυτά μπαιοβγαίνουν συχνά στο βακτηριακό κύτταρο και έτσι είναι εύκολη η απομόνωσή τους.

13

Σε ένα πλασμίδιο εντοπίζονται τα εξής σημεία:

1. αρχή αντιγραφής, είναι το σημείο από το οποίο ξεκινά ο διπλασιασμός του με τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA
2. ένα γονίδιο μάρτυρας, που συνήθως είναι γονίδιο αντοχής σε κάποιο αντιβιοτικό. Αυτό αξιοποιείται για την αναγνώριση των βακτηρίων που έχουν το πλασμίδιο (όσα επιβιώνουν παρουσία του αντιβιοτικού σημαίνει ότι έχουν το πλασμίδιο)
3. το σημείο περιορισμού, η θέση στην οποία κόβεται όταν το χειριστούμε με το ανάλογο περιοριστικό ένζυμο.

14

Με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων το πλασμίδιο ανοίγεται στο σημείο περιορισμού. Με ειδικά ένζυμα, που λέγονται λιγάσες, τα οποία αντίθετα με τα περιοριστικά ένζυμα έχουν την ικανότητα να ενώνουν DNA, το «ξένο» γονίδιο ενσωματώνεται στο ανοιχτό πλασμίδιο.

15

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται και μεταμορφώνει βακτήρια στα οποία απουσιάζει το πλασμίδιο. Για να διευκολυνθεί η είσοδος του πλασμιδίου στο κύτταρο του βακτηρίου, τα τοιχώματα του κυττάρου γίνονται διαπερατά μετά από κατεργασία με CaCl_2 . Βακτήρια που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ονομάζονται μεταμορφωμένα (transformed).

16

Ένα τέτοιος φορέας κλωνοποίησης είναι είναι το πλασμίδιο pUC19 που δημιουργήθηκε από το Παν της Καλιφόρνιας και δημοσιεύτηκε το 1983.

Έχει 2686 βάσεις και είναι ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα, γιατί περιλαμβάνει ένα πολυσυνθέτη (σημείο περιορισμού για διάφορα περιοριστικά ένζυμα) που εδράζεται στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και όταν ανασυνδυαστεί μπορεί εύκολα να διακριθεί από μη ανασυνδυασμένα, χάρη στη διαφορετική τους χρώση.

17

Συγκεκριμένα, με τον ανασυνδυασμο το 'ξένο' γονίδιο ενσωματώνεται διακόπτοντας τη συνέχεια του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης και το καθιστά μη εκφραζόμενο, οπότε

18

Τα βακτήρια που έχουν υποστεί τη μεταχείριση της μεταμόρφωσης πολλαπλασιάζονται σε μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό, με σκοπό την ανίχνευση αυτών που είναι μεταμορφωμένα. Η επιλογή βασίζεται στην ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό και στην έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης.

Όσα βακτήρια δεν περιλαμβάνουν το πλασμίδιο νεκρώνονται λόγω έλλειψης του γονιδίου αντοχής στην αμικικιλίνη.

Τα βακτήρια που φέρουν ακέραιο (μη ανασυνδυασμένο) το πλασμίδιο είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη), έχουν ακέραιο το γονίδιο *lacZ* και «σπάνε» την ουσία X-gal στο υπόστρωμα σχηματίζοντας αποικίες με σκούρο μπλε χρώμα.

Τα βακτήρια που είναι μεταμορφωμένα, δηλαδή φέρουν το πλασμίδιο με το ξένο DNA (ανασυνδυασμένο πλασμίδιο), δεν έχουν πια ακέραιο το γονίδιο *lacZ* και επομένως δε μπορούν να «σπάσουν» την ουσία X-gal στο υπόστρωμα, οπότε δίνουν λευκές αποικίες.

19 ΜΕΘΟΔΟΙ Γ.Τ.

Οι μέθοδοι γενετικής μηχανικής στα φυτά περιλαμβάνουν την έμμεση μεταφορά γονιδίων από άλλους οργανισμούς μέσω μεταμορφωμένων βακτηρίων *Agrobacterium* είτε με μεθόδους άμεσης μεταφοράς

20-21

Τα βακτήρια *Agrobacterium tumefaciens* και *Agrobacterium rhizogenes*, είναι παθογόνα των δικοτυλήδων φυτών και ιδιαίτερα της οικογένειας Solanaceae και αποτελούν τους φυσικούς φορείς μεταφοράς ξένων γονιδίων στα φυτά. Προσβάλλουν τα φυτά σε πληγωμένους ιστούς και προκαλούν ανώμαλη αύξηση των φυτικών ιστών. Ειδικότερα η προσβολή από το *A. tumefaciens* προκαλεί σχηματισμό κάλων (όγκων), ενώ από το *A. rhizogenes* σχηματισμό ριζών.

Η ογκογόνος δράση του *A. tumefaciens* οφείλεται σ' ένα πλασμίδιο που έχουν οι παθογόνες φυλές του, το Ti (tumor inducing) πλασμίδιο. Το *A. rhizogenes* περιέχει το Ri (root inducing) πλασμίδιο το οποίο προκαλεί σχηματισμό ριζών στο σημείο της προσβολής. Προσβάλλοντας φυτικούς ιστούς και όταν έλθουν σε επαφή με το φυτικό κύτταρο τα *Agrobacterium* σχηματίζουν ένα λεπτό σωλήνα από πρωτεΐνη ο οποίος διαπερνά το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα και μέσω αυτού εισάγουν στα φυτικά κύτταρα ένα τμήμα DNA του πλασμιδίου τους.

Η τοξικότητα των βακτηρίων χάνεται όταν χάνουν το πλασμίδιο (πχ σε 37°C, αντί της άριστης 28°C) που επανακτάται με είσοδο του πλασμιδίου.

Η περίπτωση τους αποτελεί ένα παράδειγμα φυσικής δι-ειδικής γενετικής τροποποίησης γιατί με την προσβολή γονίδια των βακτηρίων ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του φυτού. Ο μηχανισμός προσβολής αξιοποιήθηκε στην γενετική τροποποίηση των φυτών με εισαγωγή «ξένων» γονιδίων.

22

Το Ti πλασμίδιο του *Agrobacterium tumefaciens* έχει μέγεθος περίπου 200 χιλ. βάσεις και φέρει το τμήμα που ονομάζεται T- DNA που μετά την προσβολή αποκόπτεται από το πλασμίδιο και ενσωματώνεται σε τυχαία θέση στο γονιδίωμα του φυτού. Είναι αυτό στο οποίο βρίσκονται τα ογκογόνα γονίδια που επάγουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των προσβεβλημένων κυττάρων του φυτού με αποτέλεσμα τη δημιουργία κάλων. Το T-DNA, πέραν των ογκογόνων γονιδίων στον αριστερό βραχίονα, στο δεξιό βραχίονα φέρει και γονίδια του βακτηρίου υπεύθυνα για την παραγωγή θρεπτικών συστατικών για τα βακτήρια, τις **οπίνες**.

Επιπλέον, έξω από την περιοχή του T- DNA, το πλασμίδιο φέρει γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά του στο φυτικό κύτταρο, αλλά και γονίδια για τον καταβολισμό των οπινών.

23

Τα κύτταρα του κάλου που αναπολλαπλασιάζουν το T-DNA εκφράζουν τα γονίδια των οπινών. Τα γονίδια αυτά δεν μπορούν να εκφραστούν στα βακτήρια αλλά μόνο στα κύτταρα-

ξενιστές των φυτών. Οι οπίνες (οκταπίνη, νοπαλίνη και αγροπίνη) που παράγουν τα προσβεβλημένα φυτικά κύτταρα αποτελούν πηγές άνθρακα και αζώτου για να θρέψουν τα βακτήρια.

24

Η γενετική τροποποίηση των φυτών μέσω του *Agrobacterium* γίνεται σε πέντε στάδια. Το πρώτο στάδιο αξιοποίησης του T-DNA ως φορέα «ξένου» γονιδίου περιλαμβάνει την προετοιμασία του Tι πλασμιδίου με τον αφοπλισμό του, δηλαδή απομάκρυνση από το T-DNA των ογκογόνων γονιδίων και αυτών που παράγουν τις οπίνες.

25

Στο δεύτερο στάδιο το αφοπλισμένο Tι πλασμίδιο ανασυνδυάζεται ώστε να συμπεριλάβει το «ξένο» γονίδιο, αλλά και ένα γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικό όπως και ένα γονίδιο αντοχής σε ζιζανιοκτόνο. Το γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικό είναι απαραίτητο για την ταυτοποίηση στη συνέχεια των μεταμορφωμένων βακτηρίων (που θα φέρουν το ανασυνδυασμένο Tι πλασμιδίου), ενώ το γονίδιο αντοχής στο ζιζανιοκτόνο για την ταυτοποίηση των φυτικών κυττάρων που θα έχουν τροποποιηθεί (στο γένωμα τους έχει ενσωματωθεί το ανασυνδυασμένο T-DNA).

26

Στο τρίτο στάδιο βακτήρια *Agrobacterium* που στερούνται πλασμιδίου μεταμορφώνονται με εισαγωγή στα κύτταρά τους του ανασυνδυασμένου Tι πλασμιδίου. Μετά από πολλαπλασιασμό τους σε θρεπτικό υπόστρωμα μεταχειρίζονται με το αντιβιοτικό για το οποίο είχε ενσωματωθεί γονίδιο αντοχής, οπότε επιβιώνουν μόνο τα μεταμορφωμένα.

27

Στο τέταρτο στάδιο τα μεταμορφωμένα βακτήρια μολύνουν φυτικά κύτταρα. Στα φυτικά κύτταρα μεταναστεύει το ανασυνδυασμένο T-DNA φέροντας το «ξένο» γονίδιο και ενσωματώνεται στο γένωμα του κυττάρου. Τα φυτικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε θρεπτικό υπόστρωμα που έχει και το ζιζανιοκτόνο για το οποίο είχε ενσωματωθεί γονίδιο αντοχής οπότε επιβιώνουν μόνο κύτταρα που έχουν τροποποιηθεί.

28

Στο τελευταίο στάδιο, ένα τροποποιημένο φυτικό κύτταρο με μικροπολλαπλασιασμό τελικά δίνει ένα γενετικά τροποποιημένο (διαγονιδιακό) φυτό που στο σύνολο των κυττάρων του φέρει το «ξένο» γονίδιο.

29

Μετά την ταυτοποίηση των διαγονιδιακών φυτών επιλέγονται εκείνα που στο γενετικό του υλικό έχει εισέλθει ένα αντίγραφο. Διαγονιδιακά με πολλά αντίγραφα απορρίπτονται γιατί σ' αυτά είναι αυξημένη η πιθανότητα μεταλλάξεων (από ενθέσεις που διακόπτουν κρίσιμες αλληλουχίες, πχ ενός σημαντικού γονιδίου). Σε κάθε περίπτωση τα επιλεγόμενα αξιολογούνται φαινοτυπικά για τον έλεγχο έκφρασης μεταλλάξεων.

30

Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία στην τροποποίηση γκαζόν και καπνού ώστε να εκφράζουν το γονίδιο της λουσιφεράσης από την πυγολαμπίδα, με αποτέλεσμα το φυτό να εκπέμπει συνεχώς φως

31-32

Μέθοδοι άμεσης μεταφοράς:

Στην ηλεκτροπόρωση, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου δημιουργεί πόρους στη μεμβράνη των φυτικών κυττάρων που θα αποτελέσουν τη δίοδο του «ξένου» DNA στο εσωτερικό τους.

Στον βομβαρδισμό με σωματίδια, χρησιμοποιούνται συσκευές επιταχυνόμενων με μεγάλη ταχύτητα σωματιδίων (βολφράμιο ή χρυσός) καλυμμένων με DNA, ώστε να διαπεράσουν τις εξωτερικές κυτταρικές στοιβάδες ή τα κυτταρικά τοιχώματα.

Στη χημική μέθοδο, χημικές ουσίες που προστατεύουν το DNA και επάγουν την πρόσληψη νουκλεϊκών οξέων από τους πρωτοπλάστες (πχ πολυαιθυλενική γλυκόλη)

Η μικροέγχυση βασίζεται στη χρήση γυάλινης μικροπιπέτας στην οποία με θέρμανση και κοπή στο άκρο δημιουργείται διάμετρος οπής 0,5-1,0μm. Η μικρή διάμετρος του άκρου της πιπέτας επιτρέπει τη διείσδυσή της μέσω της πλασματικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα χωρίς να καταστρέφει το κύτταρο. Το «ξένο» DNA εγχύεται στο κυτταρόπλασμα ή και απευθείας στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου.

33

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ Γ.Τ.

Οι εφαρμογές της γενετικής μηχανικής σε καλλιεργούμενες ποικιλίες αφορούν κυρίως την αντοχή σε ζιζανιοκτόνα και έντομα, καθώς επίσης και σε ιούς, βακτήρια και μύκητες ενώ η έρευνα περιλαμβάνει και περιβαλλοντικές καταπονήσεις

ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ.

34

Ορισμένα από τα εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα (νεκρώνουν ζιζάνια και όχι τα καλλιεργούμενα φυτά) έχουν μεγάλη υπολειμματικότητα επιβαρύνοντας το περιβάλλον, ενώ μπορεί να είναι τοξικά για τους ζωικούς οργανισμούς. Αυτό καθιστά αναγκαία τη χρήση ήπιων ζιζανιοκτόνων τα οποία όμως πολλές φορές δεν έχουν εκλεκτικότητα (έχουν καθολική δράση νεκρώνοντας όλη τη φυτική βλάστηση) οπότε δεν μπορούν να εφαρμοστούν στις καλλιέργειες. Η Γενετική Μηχανική ευελπιστεί στη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών με αντοχή σε ήπια ζιζανιοκτόνα (glyphosate, Θειουρίες (sulphonylureas), atrazine, L-φωσφινοθρισίνη) ως λύση στο πρόβλημα.

35

Τα ζιζανιοκτόνα συνήθως με τη δραστική (χημική) τους ουσία μπλοκάρουν ένα κρίσιμο ένζυμο του φυτού με συνέπεια να αναστέλλουν την αντίστοιχη βιοχημική διεργασία στα φυτικά κύτταρα.

Η απενεργοποίηση του ενζύμου επιτυγχάνεται καθώς η δραστική ουσία μπλοκάρει το ένζυμο, κατά αντιστοιχία με τη σχέση «κλειδί-κλειδαριά»

36

Οι στρατηγικές δημιουργίας αντοχής σε ζιζανιοκτόνα περιλαμβάνουν

1. Εισαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα αποικοδόμησης/απενεργοποίησης της χημικής ένωσης
2. Τροποποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί το κρίσιμο ένζυμο

3. Υπερπαραγωγή του κρίσιμου ενζύμου (ενσωμάτωση πολλών αντιγράφων του γονιδίου)

37

Στην 1^η προσέγγιση τα γονίδια αντοχής που κωδικοποιούν ένζυμα αποικοδόμησης /απενεργοποίησης της χημικής ένωσης απομονώνονται από βακτήρια, μύκητες ή άλλα φυτά

38

Η διαφάνεια δείχνει πηγές ενζύμων βακτηριακής προέλευσης που αποικοδομούν δραστικές ουσίες με ζιζανιοκτόνο δράση. Οι ουσίες αυτές είναι το glyphosate που παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση τριών απαραίτητων για τα φυτά αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη, φανυλαλανίνη), το 2-4 D που λειτουργεί ως ορμόνη για την ανώμαλη αύξηση των φυτών, οι ουρίες (diuron, fluometuron, isoproturon, linuron) και φαινυλο-καρβαμιδικά (desmedipham) που είναι παρεμποδιστές της φωτοσύνθεσης.

39

Ένα παράδειγμα γονιδίου αντοχής σε ζιζανιοκτόνα είναι το γονίδιο bar που προέρχεται από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus*. Το γονίδιο bar παράγει το ένζυμο ακετυλο-τρανσφεράση της φωσφινोθρισίνης που παρουσία του συνενζύμου ακετυλο-CoA μετατρέπει τη χημική ουσία φωσφινοθρισίνη στη λιγότερο τοξική μορφή της ακετυλιωμένης φωσφινοθρισίνης.

40

Στη 2^η προσέγγιση, με την τροποποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί το κρίσιμο ένζυμο, τροποποιείται κατ' επέκταση και το ένζυμο οπότε η δραστική ουσία δεν το αναγνωρίζει για να το μπλοκάρει. Η τροποποίηση του ενζύμου γίνεται με τρόπο ώστε να μη υφίσταται η σχέση «κλειδί-κλειδαριά», χωρίς όμως το ένζυμο να χάσει τη λειτουργική του ικανότητα αναφορικά με τη βιοχημική αντίδραση που καταλύει.

41

Στην 3^η προσέγγιση, με την εισαγωγή πολλών αντιγράφων του γονιδίου στο φυτό προκαλείται υπερπαραγωγή του κρίσιμου ενζύμου, οπότε τα μόρια της δραστικής ουσίας μπλοκάρουν ένα αριθμό μορίων του ενζύμου αλλά άλλα μόρια ενζύμου μένουν ελεύθερα και καταλύουν τη βιοχημική αντίδραση

42

Το ζιζανιοκτόνο Glyphosate θεωρείται φιλικό στο περιβάλλον γιατί αποικοδομείται γρήγορα στο έδαφος. Είναι αυτό για το οποίο κυρίως έχει γίνει, σε εμπορική κλίμακα, γενετική τροποποίηση καλλιεργειών (καλαμπόκι, σόγια, βαμβάκι). Ο μηχανισμός δράσης του ζιζανιοκτόνου είναι η αναστολή της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων λόγω απενεργοποίησης του ενζύμου EPSPS. Με μεταλλάξεις στο γονίδιο *aroA* που κωδικοποιεί το ένζυμο EPSPS στο βακτήριο *Salmonella typhimurium*, υπήρξε αντοχή λόγω τροποποίησης αλλά και υπερπαραγωγής του ενζύμου. Με τον τρόπο αυτό, αρχικά παράχθηκαν διαγονιδιακά φυτά τομάτας και πατάτας με μεταλλαγμένες μορφές του *aroA* που ήταν 3 φορές ανθεκτικότερα στο ζιζανιοκτόνο.

Για την τροποποίηση αυτή διατυπώθηκαν σοβαρές επιφυλάξεις ως προς τον κίνδυνο διαρροής του γονιδίου σε συγγενικά ζιζάνια. Ο κίνδυνος διαρροής περιορίζεται αν ο μετασχηματισμός γίνεται σε DNA του χλωροπλάστη (γιατί;)

43-46

Εικόνες σχετικές με διαγονιδιακά φυτά για αντοχή σε ζιζανιοκτόνα

ANTOXH ΣΕ ENTOMA

46-47

Για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών αντοχή στα έντομα πηγή γονιδίων αντοχής είναι το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*. Υπάρχουν διάφορα στελέχη και υποείδη του βακτηρίου που το καθένα παράγει διαφορετική τοξίνη και θανατώνει διαφορετικά έντομα. Οι τοξίνες αυτές που είναι γνωστές και ως Bt τοξίνες, είναι πρωτεϊνικής φύσης και διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες.

Οι Bt τοξίνες έχουν μικρή υπολλειμματικότητα και δεν είναι τοξικές για ωφέλιμα έντομα (μέλισσες) και ζωικούς οργανισμούς. Για το λόγο αυτό μάλιστα χρησιμοποιούνται για καταπολέμηση εντόμων στη βιολογική γεωργία.

48

Η τοξίνη Bt πρέπει να ληφθεί ως τροφή από το έντομο, οπότε εισέρχεται στη μεμβράνη του επιθηλιακού κυττάρου του εντόμου σχηματίζοντας ιοντικό κανάλι μεταξύ κυτταροπλάσματος και εξωκυττάρου χώρου, με συνέπεια η εκροή ATP μέσω του καναλιού να οδηγήσει στο θάνατο του εντόμου

49

Τα γονίδια Bt είναι πλασμιδιακά. Η πρωτεΐνη που παράγουν διακρίνεται σε τρεις περιοχές:

- περιοχή I: άμινο άκρο που εμπλέκεται στην εξειδικευμένη σύνδεση της τοξίνης στα επιθηλιακά κύτταρα των εντόμων
- περιοχή II: δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στη δράση της τοξίνης
- περιοχή III: καρβοξύ άκρο που δεν περιέχει τμήμα της τοξίνης

έχει βρεθεί ότι αν ενσωματωθούν στα φυτά Bt γονίδια η έκφρασή τους και κατ' επέκταση η τοξικότητά τους βελτιώνεται όταν εισάγεται μόνο το τμήμα που αντιστοιχεί στην περιοχή I της πρωτεΐνης.

50

Ο πίνακας δείχνει ότι στη γενετική τροποποίηση αν ενσωματωθούν στα φυτά Bt γονίδια η έκφρασή τους και κατ' επέκταση η τοξικότητά τους βελτιώνεται όταν εισάγεται μόνο το τμήμα που αντιστοιχεί στην περιοχή I της πρωτεΐνης.

51

Εικόνα καρπού από συμβατικό και τροποποιημένο για αντοχή σε έντομο καλαμπόκι

ANTOXH ΣΕ ΙΟΥΣ

52-53

Οι ιοί αποτελούν απλούς σχηματισμούς και η δομή ενός τυπικού ιού περιλαμβάνει την κεφαλή και την ουρά. Στο εσωτερικό της κεφαλής βρίσκεται το DNA (ή RNA), που περιβάλλεται από μια πρωτεϊνική κάψα. Οι ιοί δεν παρουσιάζουν αυτόνομη λειτουργία, αλλά αναπαράγονται μόνο μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Όταν ένας ιός προσβάλλει ένα φυτικό κύτταρο, αποστέλλει στο εσωτερικό του κυττάρου μόνο το DNA του, ενώ οι πρωτεϊνικές κάψες μένουν έξω. Μέσα στο κύτταρο-ξενιστή το DNA του ιού αναπαράγεται πολλές φορές, εκμεταλλευόμενο τη βιοχημική δραστηριότητα του κυττάρου-ξενιστή και στη συνέχεια σχηματίζει νέες πρωτεϊνικές κάψες που περιβάλλουν καθεμιά ένα από τα μόρια του DNA του ιού. Τα ολοκληρωμένα αυτά νέα σώματα του ιού στη συνέχεια μπορεί να προσβάλλουν νέα φυτικά κύτταρα κ.ο.κ. Το DNA του ιού

αποτελείται από δύο κατηγορίες γονιδίων, τα πρώιμα και τα όψιμα γονίδια. Τα πρώιμα ενεργοποιούνται πρώτα, όταν το DNA του ιού βρεθεί στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή και είναι υπεύθυνα για την αναπαραγωγή του DNA, ενώ τα όψιμα ενεργοποιούνται στη συνέχεια και με την έκφρασή τους σχηματίζονται οι πρωτεϊνικές κάψες. Από τη στιγμή που ένα μόριο DNA του ιού περάσει μέσα σε μια κάψα, παύει η λειτουργία των πρώιμων γονιδίων, άρα και η αναπαραγωγή του.

54

Ενας από τους μηχανισμούς που αναπτύχθηκαν για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φυτά, ήταν η ενσωμάτωση όψιμων γονιδίων του ιού στο φυτικό γένωμα, τα οποία εκφράζονται κανονικά παράγοντας πρωτεϊνικές κάψες. Με τον τρόπο αυτό, όταν το DNA ενός ιού μπαίνει στο φυτικό κύτταρο, περιβάλλεται αμέσως από μια κάψα, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται ο πολλαπλασιασμός του ιού. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στον καπνό, στον οποίο μεταφέρθηκαν, μέσω του βακτηρίου *A. tumefaciens* και του T_i πλασμιδίου, όψιμα γονίδια του ιού της μωσαϊκής.

55

Ενας άλλος τρόπος δημιουργίας ανθεκτικότητας στους ιούς είναι η εισαγωγή στα φυτά πρώιμων γονιδίων του ιού. Είναι γνωστό ότι για τη μεταγραφή του DNA σε RNA μεταγράφεται μόνο η μια αλυσίδα, η πληροφοριακή αλυσίδα. Τα πρώιμα γονίδια του ιού που ενσωματώνονται στο φυτό ρυθμίζονται ώστε να μεταγράφουν τη συμπληρωματική αντί της πληροφοριακής αλυσίδας. Αυτό σημαίνει ότι το φυτό παράγει μόρια RNA με συμπληρωματικές βάσεις σε σχέση με το κνονικό RNA που παράγει το γονίδιο του ιού. Όταν γίνεται η προσβολή τα RNA του ιού που παράγονται από τη μεταγραφή του ιικού DNA υβριδίζονται από με τα συμπληρωματικά τους που ήδη βρίσκονται μέσα στο κύτταρο του φυτού. Ο υβριδισμός μπλοκάρει τη μετάφρασή τους στα ένζυμα που επάγουν την αναπαραγωγή του ιικού DNA. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν φυτά καπνού και τομάτας ανθεκτικά στον ιό της μωσαϊκής και φυτά ζαχαροτεύλων ανθεκτικά σε ιό των φύλλων τους.