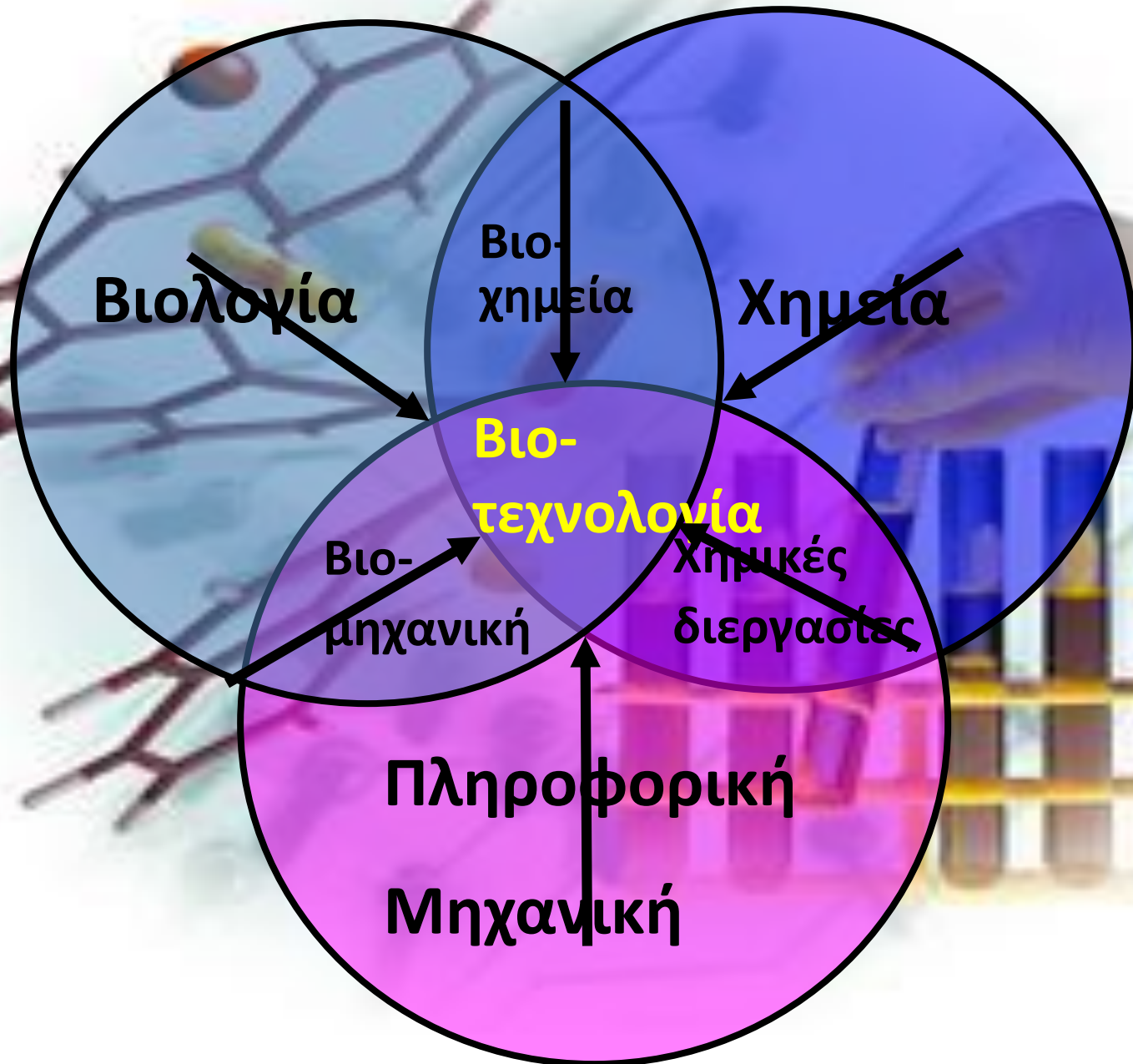


# Γενετικά Τροποποιημένοι Οργανισμοί (Γ.Τ.Ο)



# Η ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ



# Από τη Βιοτεχνολογία Φυτών στην Παραγωγή Βιο-προϊόντων

Κ. Παπαδοπούλου (kalparad@bio.uth.gr)

# Ο θαυμαστός κόσμος των φυτών

AT LEAST  
**31,128**  
PLANT SPECIES CURRENTLY  
HAVE A DOCUMENTED USE



5,538

διατροφή



17,810

φάρμακα



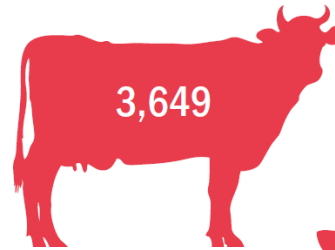
1,621

καύσιμα



1,382

κοινωνικά



3,649

σιτηρέσια



11,365

υλικά



2,503

δηλητήρια



5,338

Γονιδιακές  
πηγές



8,140

περιβαλλοντικές  
χρήσεις



683

Διατροφή ασπονδύλων

<https://stateoftheworldsplants>

FAO statistics



# Προκλήσεις του 21<sup>ου</sup> Αιώνα

Αύξηση του πληθυσμού

Αυξανόμενη έκκλυση GHG

Μείωση της βιοποικιλότητας

Κλιματική αλλαγή

Διαθεσιμότητα νερού

Αστικοποίηση

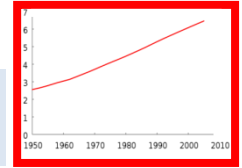
Μείωση των ορυκτών αποθεμάτων



# Επιστήμη των Φυτών και Προκλήσεις του 21<sup>ου</sup> Αιώνα

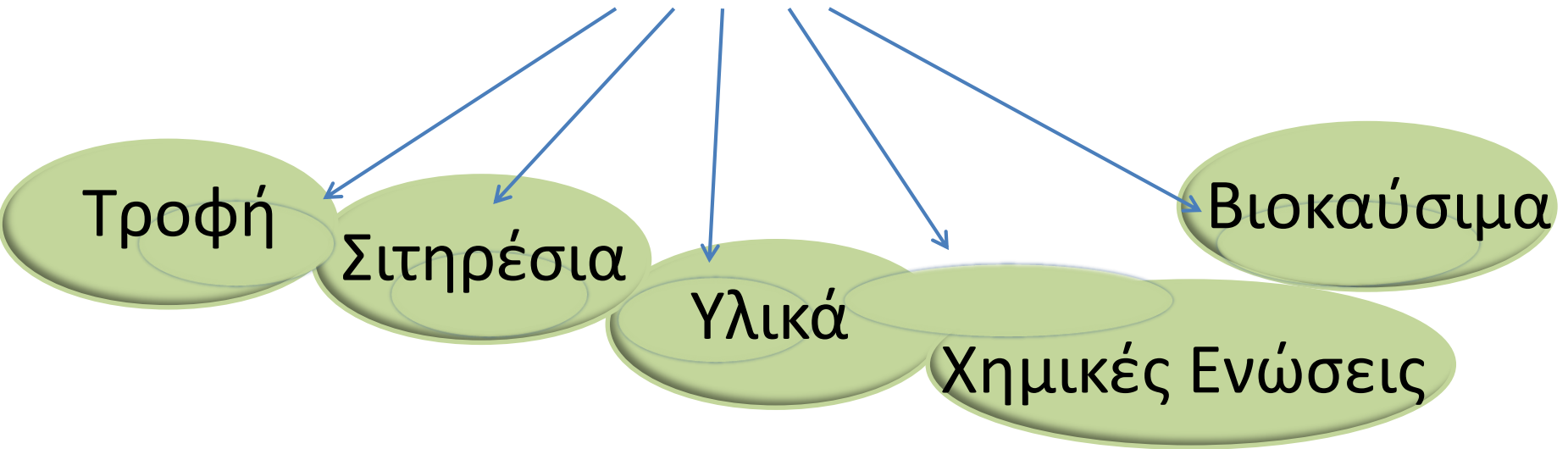
- ❖ Εξασφάλιση τροφής για την κάλυψη της ταχύτατης αύξησης του παγκόσμιου ανθρώπινου πληθυσμού

1950 (2.5 δις)  
2050 (10- δις)



- ❖ Αύξηση της φυτικής παραγωγής υπό τα δεδομένα της κλιματικής αλλαγής με μείωση των εισροών στη γεωργία (κλιματική αλλαγή- προστασία περιβάλλοντος- βιοποικιλότητα)
- ❖ Εξασφάλιση επαρκούς ή/και ενισχυμένης τροφής για μείωση της εμφάνισης χρόνιων ασθενειών στον πλανήτη (υγεία)
- ❖ Ανάγκη για παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές (αιιφορία και περιβάλλον)
- ❖ Παραγωγή βιοπροϊόντων αυξημένης προστιθέμενης αξίας

# Η γεωργία είναι μια παγκόσμια «βιομηχανία»



FOOD

FEED

FIBER

FUEL

FLOWERS

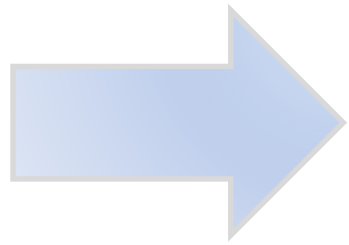
FUN



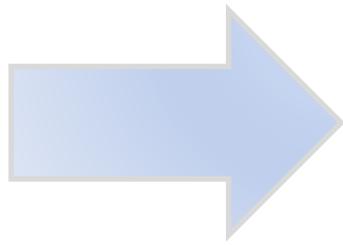
<http://www.keygene.com/>



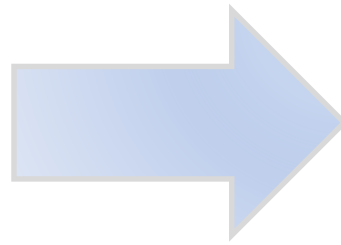
# Συγχώνευση της έρευνας με την εφαρμογή



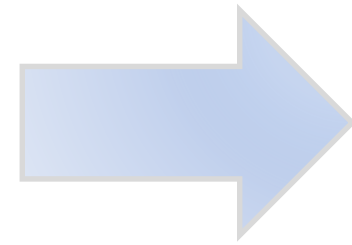
**Ανακάλυψη**



**Ανάπτυξη/  
Δημιουργία**



**Επίδειξη**



**Ανάπτυξη/ Εφαρμογή/  
Εξάπλωση**



Plant science



Crop science



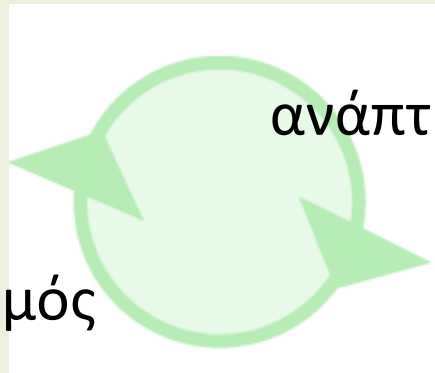
# Η γεωργία είναι μια παγκόσμια «βιομηχανία»

Παραγωγικότητα φυτών = δυναμικό συστήματος

παραγωγής των φυτών

**Πλαστικότητα**

μεταβολισμός



ανάπτυξη

# Πώς αναμένεται να επιτευχθεί αύξηση της φυτικής παραγωγής / βιομάζας;

## Με την ανάπτυξη/δημιουργία φυτών που

- είναι ανθεκτικά στην ξηρασία ή σε άλλες καταπονήσεις
- απαιτούν λιγότερες εισροές και νερό
- είναι ανθεκτικά σε παθογόνα / εχθρούς
- είναι πιο θρεπτικά



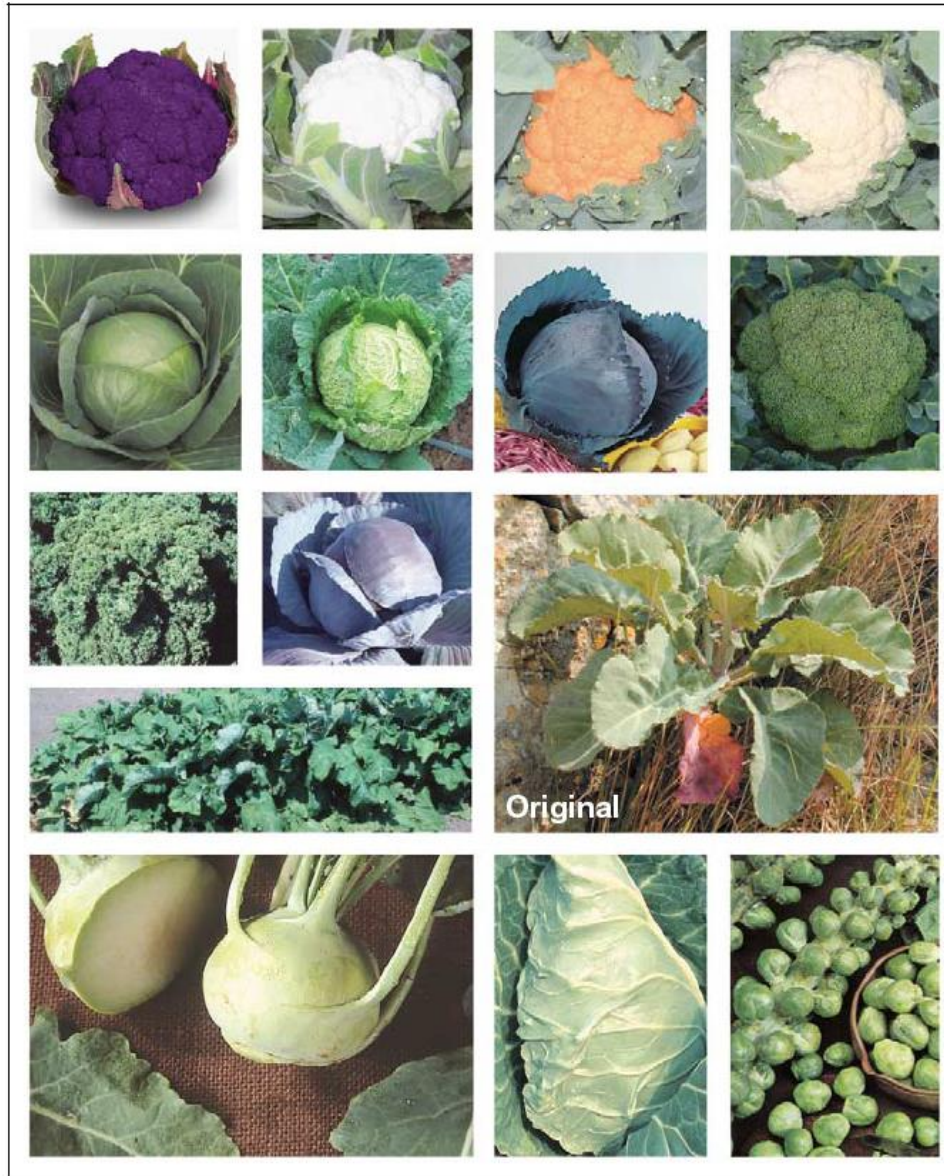
# Βελτίωση φυτών

## Στρατηγικές τροποποίησης γονιδιωμάτων

- Κλασική Βελτίωση
  - Επιλογή επιθυμητών χαρακτηριστικών (πληθυσμιακή γενετική)
  - Εισαγωγή νέων γονιδιακών χαρακτήρων
    - Τεχνολογίες υβριδισμού
      - Διασταυρούμενη επικονίαση
      - Ιστοκαλλιέργεια (σύντηξη πρωτοπλαστών)
- Μοριακή Βελτίωση
- Τεχνολογίες μεταφοράς DNA



# Τεχνητή επιλογή στην οικογένεια Brassicaceae



...στην ντομάτα

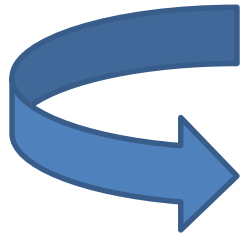


...στην πιπεριά





Οι έρευνες του Mendel αποτελούν την επαρχή της επιστήμης της γενετικής και της βελτίωσης των φυτών



## ΠΡΑΣΙΝΗ ΕΠΑΝΑΣΤΑΣΗ (1940-1960)



[Norman Borlaug](#)  
**1914-2009,**  
Nobel Laureate  
1970



# Ανάπτυξη ποικιλιών ρυζιού κατά την Πράσινη επανάσταση



Αρχικές ποικιλίες- πατρικά φυτά  
woo-gen (δεξιά) και  
dee-geo-woo-gen (μετάλλαγμα), το οποίο είχε  
την *sd1* μετάλλαξη



# Βελτίωση φυτών

- Στρατηγικές τροποποίησης γονιδιωμάτων

- Κλασική Βελτίωση

- Επιλογή επιθυμητών χαρακτηριστικών (πληθυσμιακή γενετική)
- Εισαγωγή νέων γονιδιακών χαρακτήρων
  - Τεχνολογίες υβριδισμού
    - Διασταυρούμενη επικονίαση
    - Ιστοκαλλιέργεια (σύντηξη πρωτοπλαστών)

- **Μοριακή Βελτίωση**

- Τεχνολογίες μεταφοράς DNA

# Δημιουργία ποικιλιών ρυζιού ανθεκτικών σε κατάκλιση



Julia Bailey-Serres et al, 2010, Rice Submergence Tolerant Rice: SUB1's Journey from Landrace to Modern Cultivar

# Βελτίωση φυτών

- Στρατηγικές τροποποίησης γονιδιωμάτων

- Κλασική Βελτίωση

- Επιλογή επιθυμητών χαρακτηριστικών (πληθυσμιακή γενετική)
- Εισαγωγή νέων γονιδιακών χαρακτήρων
  - Τεχνολογίες υβριδισμού
    - Διασταυρούμενη επικονίαση
    - Ιστοκαλλιέργεια (σύντηξη πρωτοπλαστών)

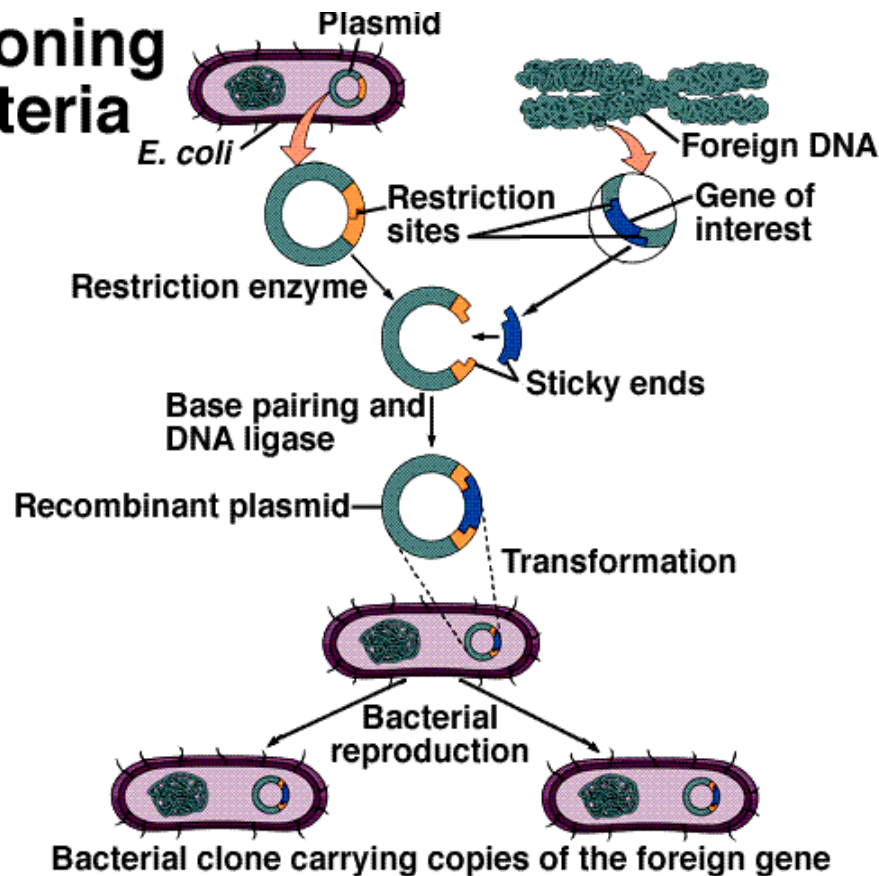
- Μοριακή Βελτίωση

- **Τεχνολογίες μεταφοράς DNA**

# Εισαγωγή νέων χαρακτήρων: Υπέρβαση των αναπαραγωγικών φραγμών

## Τεχνολογία Ανασυνδυασμένου DNA και γενετική μηχανική

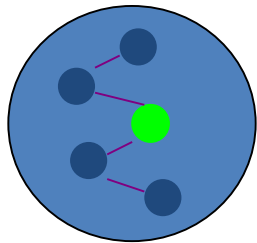
### Gene Cloning by Bacteria



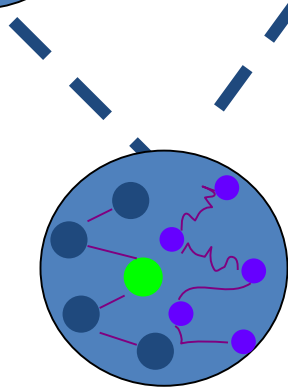
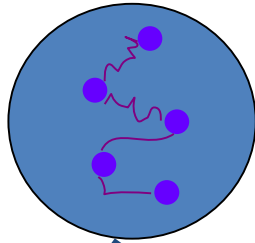


# Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA και βελτίωση φυτών

**Wild Relative**

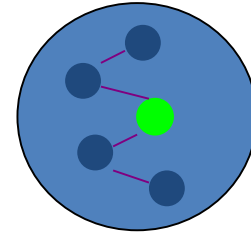


**Crop Plant**

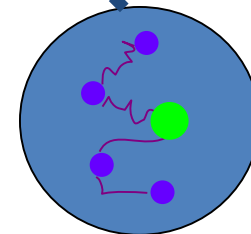
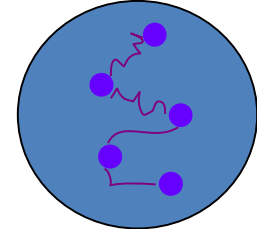


***Conventional Breeding***

**Wild Relative**



**Crop Plant**



***Genetic Engineering***

# Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA και βελτίωση φυτών

- Μπορεί να εφαρμοσθεί σε όλα τα είδη φυτών
- Επιτρέπει την άμεση μεταφορά μεμονωμένων επιθυμητών γονιδίων
- Απαιτεί μια μέθοδο μεταφοράς των γονιδίων στα φυτικά κύτταρα
- Απαιτεί κύτταρα που θα μπορούν να επαναδημιουργήσουν ένα ολόκληρο φυτό από μεμονωμένα γενετικώς τροποποιημένα κύτταρα

# *Agrobacterium tumefaciens*

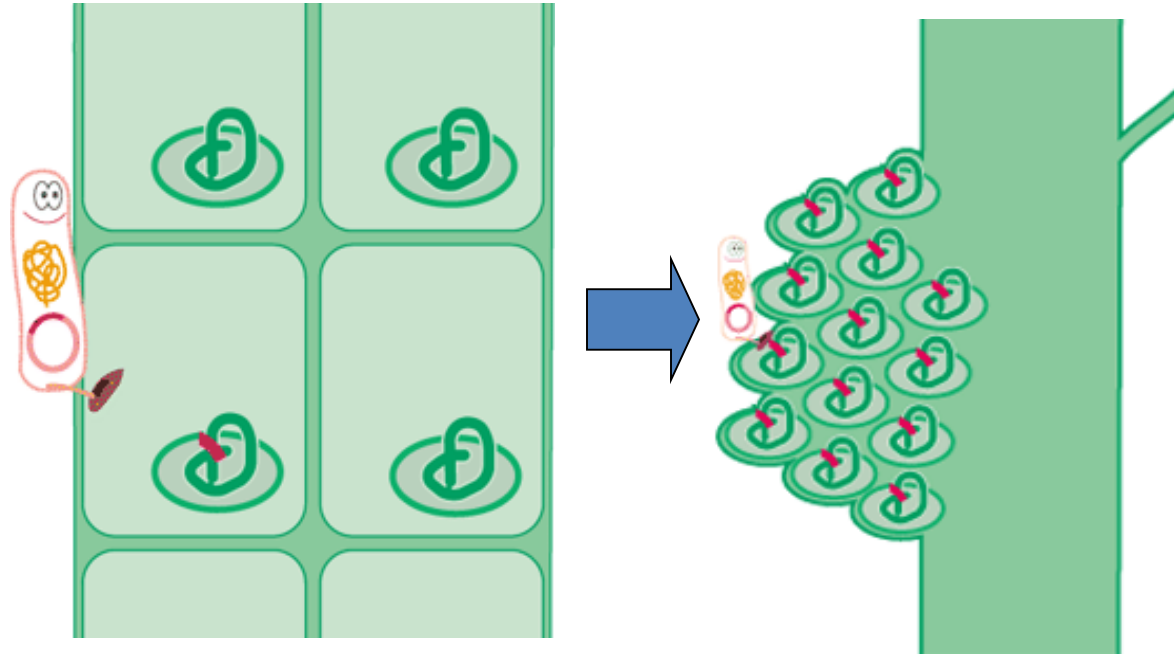
- Gram-αρνητικό βακτήριο της ριζόσφαιρας
- παθογόνο: υπεύθυνο για την ασθένεια του 'κορωνοτού κάλλου', η οποία εξαρτάται από την παρουσία του Ti (tumour-inducing) πλασμιδίου στο *A. tumefaciens*,



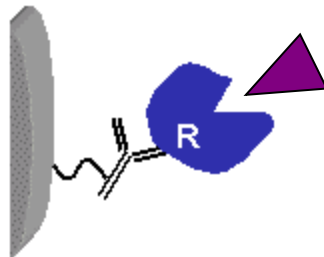
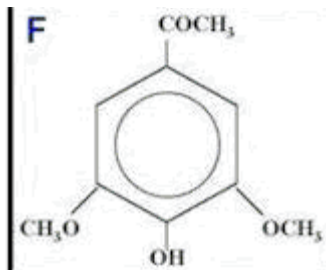
# Η βιολογία του *A. tumefaciens*

- Το *A. tumefaciens* τρέφεται με εκκρινόμενες ουσίες της ρίζας του φυτού

- μολύνει μέσω τραυματισμένων ιστών του φυτού:



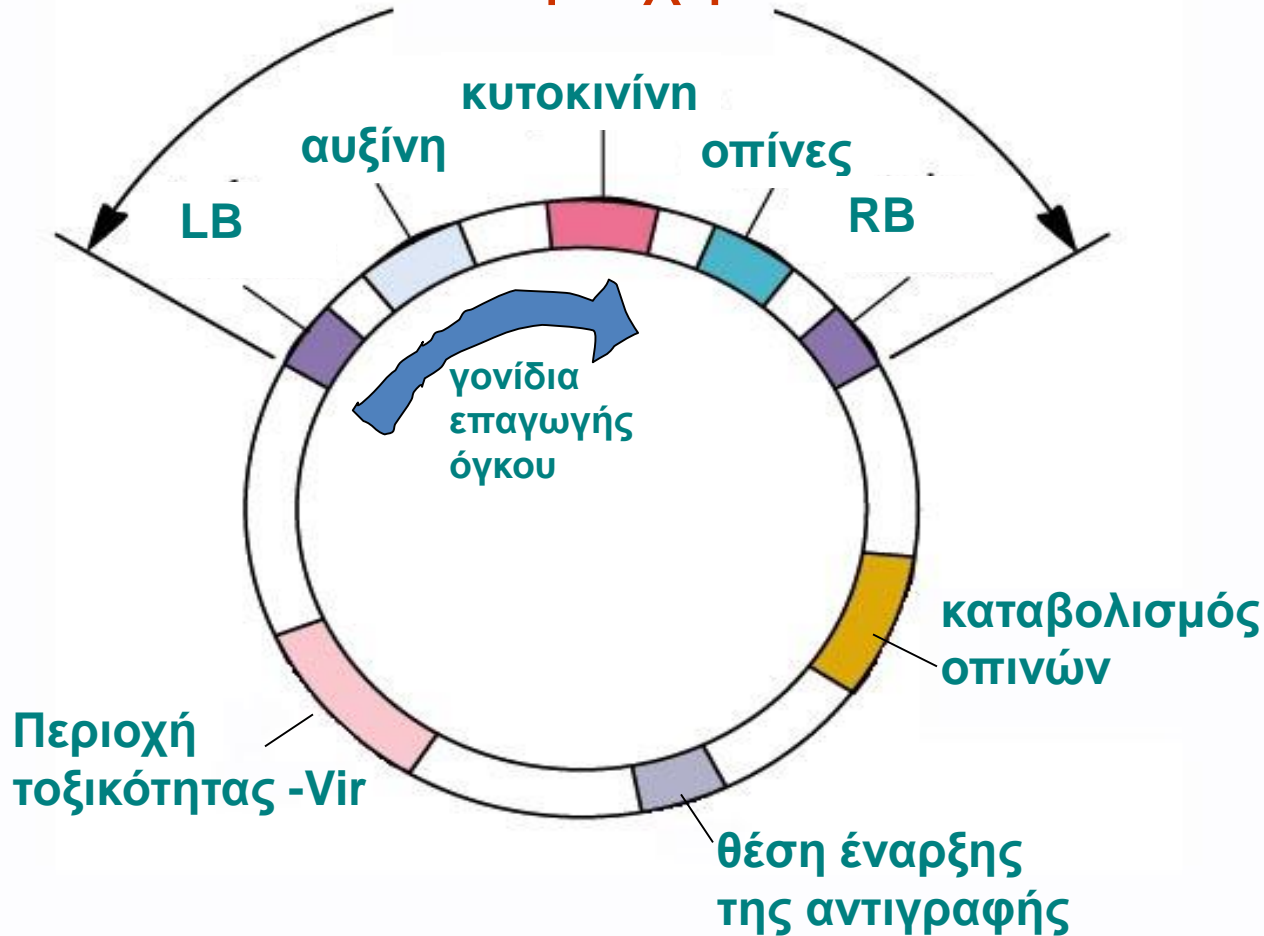
[www.genvagar.slu.se/teknik/djup/plasm.htm](http://www.genvagar.slu.se/teknik/djup/plasm.htm)



Το βακτηριακό T<sub>i</sub> πλασμίδιο παράγει και υποδοχείς για αυτές τις ενώσεις και το βακτήριο κινείται χημειοτακτικά προς αυτές

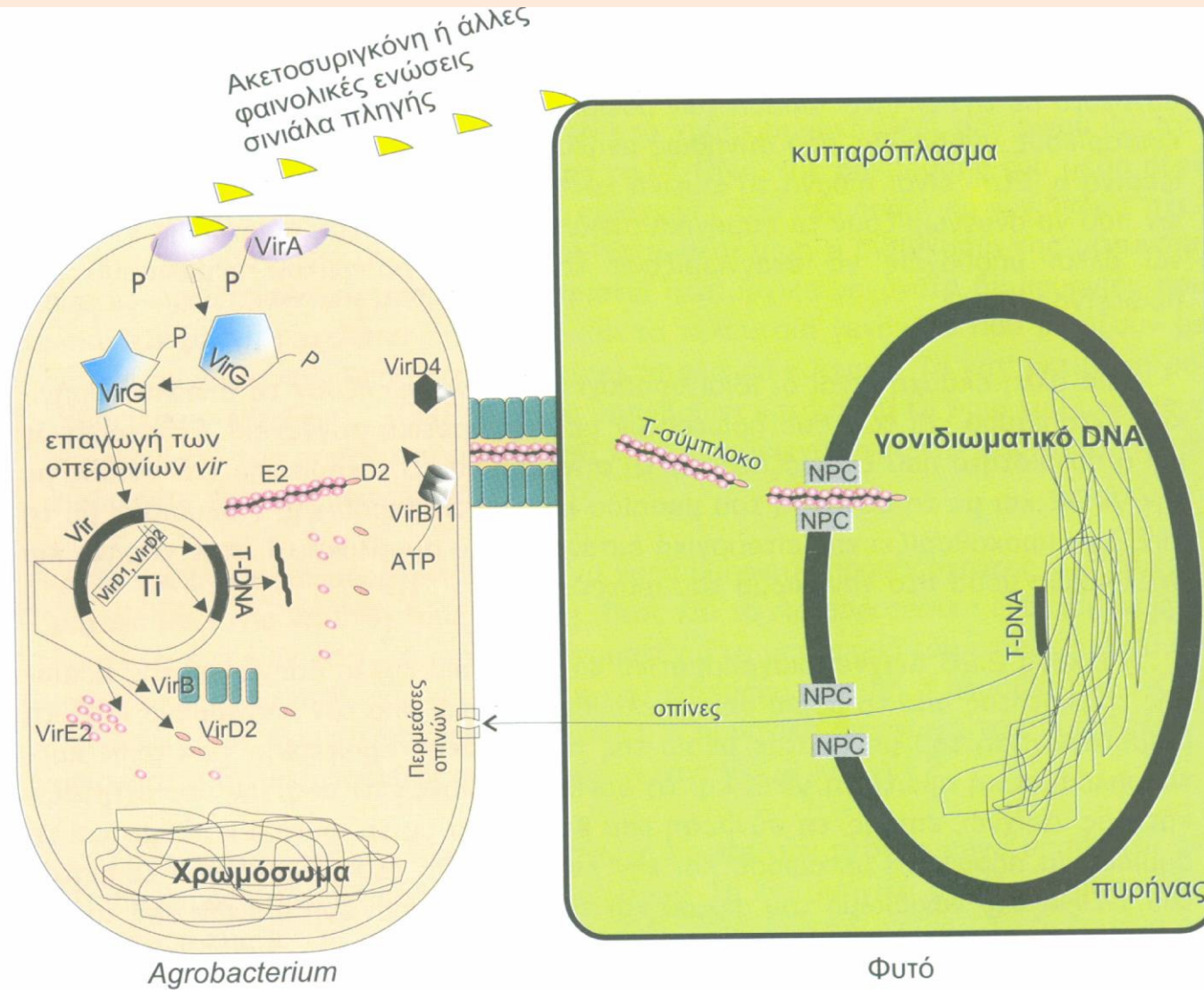
# Το Τι πλασμίδιο

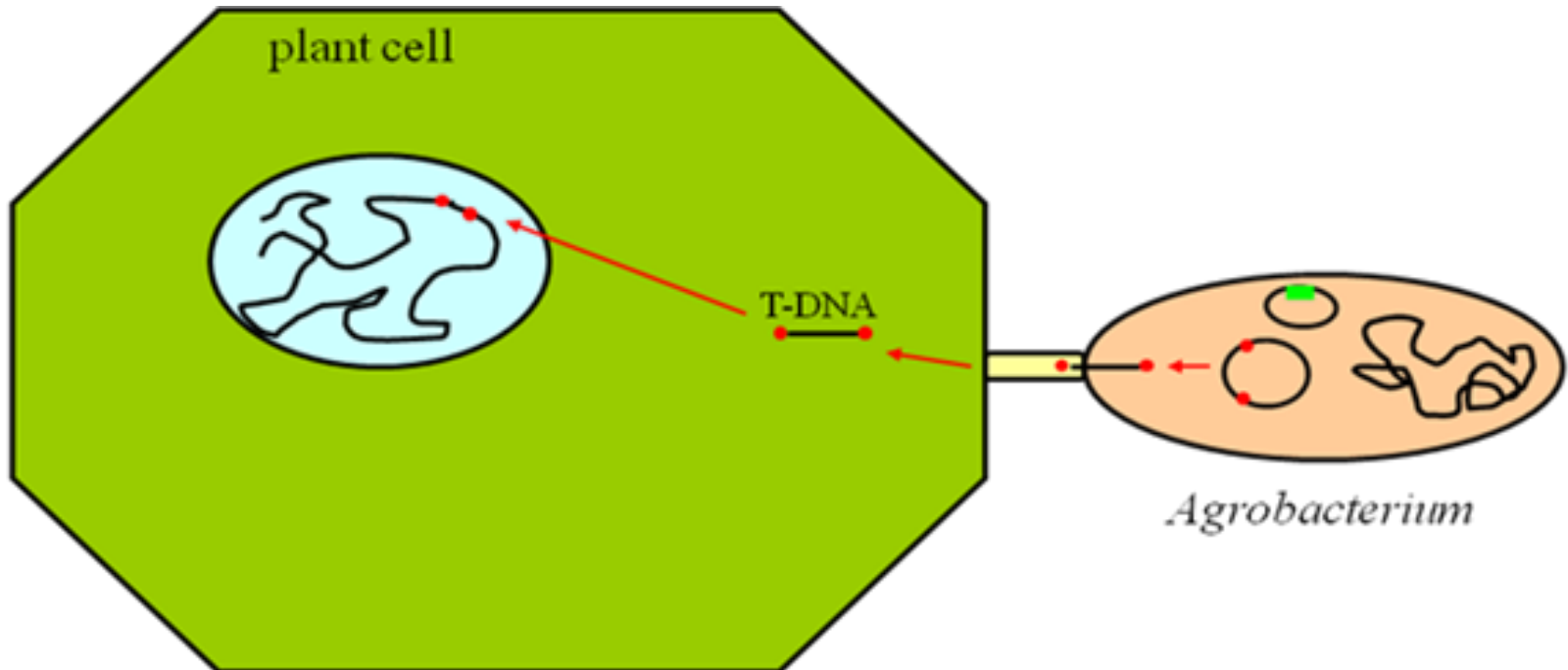
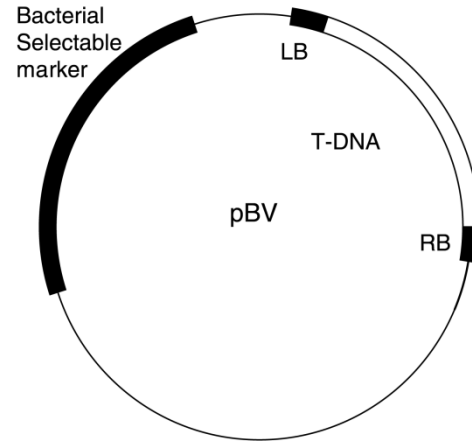
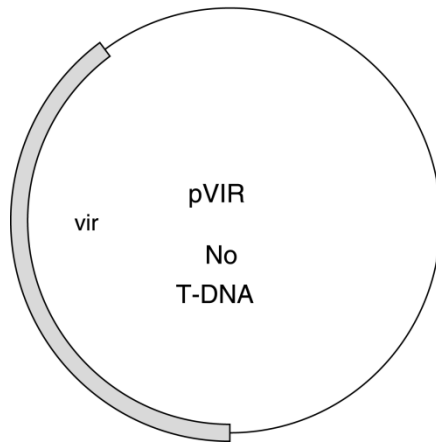
## T-DNA Περιοχή



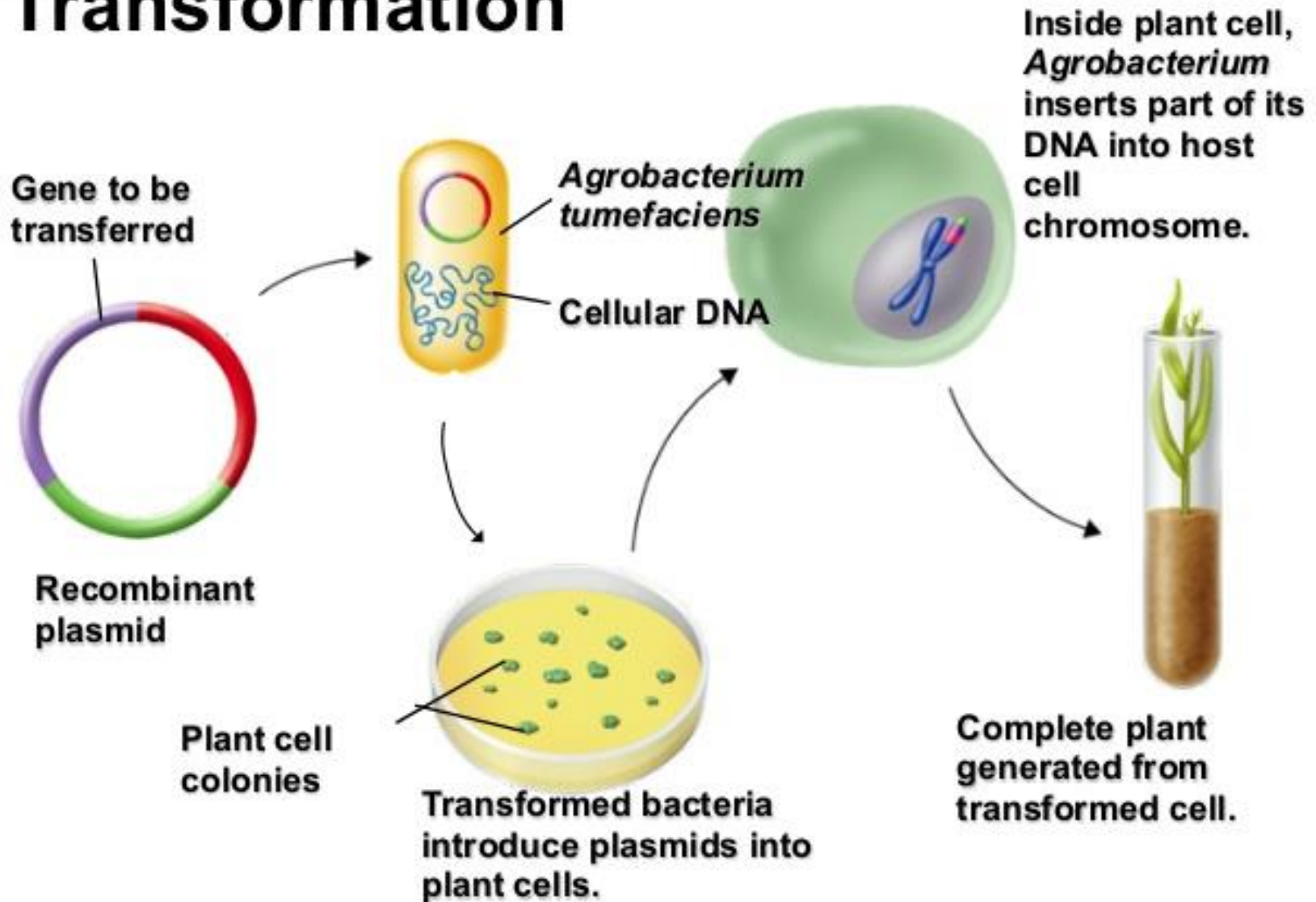


# Η βιολογία του *A. tumefaciens*





# Transformation



## Συστατικοί προαγωγείς στα διαγονιδιακά φυτά

προκαθορίζουν την έκφραση του γονιδίου σε όλους σχεδόν τους ιστούς σε παραπλήσια επίπεδα ανεξάρτητα από αναπτυξιακούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες

### Παραδείγματα

**35S** από CaMV (ιός του μωσαϊκού του καπνού): ιδανικός για την έκφραση των γονιδίων επιλογής και αναφοράς

**nos** (συνθάση της νοπαλίνης), **ocs** (συνθάση της οκτοπίνης), **mas** από *Agrobacterium*

**ubiquitin I** (καλαμπόκι) / **actin** (ρύζι) για μονοκότυλα

## Ρυθμιζόμενοι κατά συνθήκη προαγωγείς

- ✓ Ιστοειδικοί
- ✓ Επαγώμενοι
- ✓ Αναπτυξιακοί



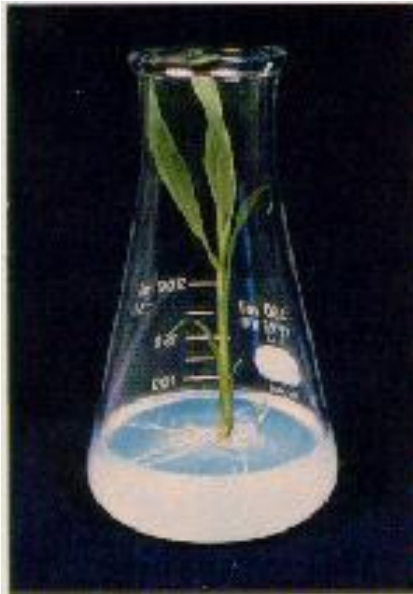
# Μεταμόρφωση φυτών μέσω του *Agrobacterium*

- ✚ Κλωνοποίηση του γονιδίου (ή τμήματός του) στη πολυδύναμη θέση κλωνοποίησης του κατάλληλου φορέα
- ✚ Εισαγωγή του γονιδίου σε ένα κατάλληλο στέλεχος *Agrobacterium tumefaciens*
- ✚ Συν-καλλιέργεια του τροποποιημένου γενετικά *A. tumefaciens* με τα κατάλληλα έκφυτα φυτών από τα οποία μπορεί να προέλθουν ολόκληρα φυτά
- ✚ Καλλιέργεια έκφυτου, αρχικώς στην παρουσία κάποιου βακτηριοστατικού παράγοντα που παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *Agrobacterium* αλλά όχι των φυτικών κυττάρων (π.χ. cefotaxime) και σε παράγοντα επιλογής για την επιλογή των μεταμορφωμένων φυτικών κυττάρων/ τμημάτων
- ✚ Επιλογή των αναγεννημένων φυτών για την έκφραση των δεικτών επιλογής ή αναφοράς
- ✚ Ανάπτυξη των απογόνων των μεταμορφωμένων φυτών και καθορισμός της κληρονομικότητας του εισαχθέντος γονιδίου

✓ Σταθερός μετασχηματισμός φυτών



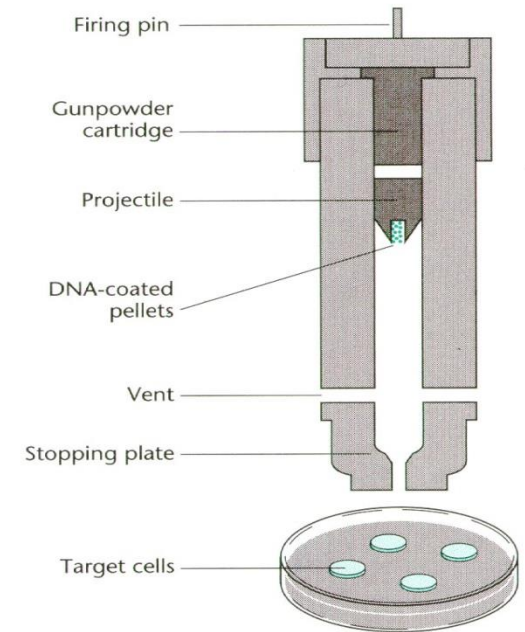




# Βομβαρδισμός σωματιδίων

(βιολογική, βομβαρδισμός προεξοχών, επιταχυντής σωματιδίων, γονιδιακό όπλο, όπλο σωματιδίων)

Χρήση επιταχυνόμενων με μεγάλη ταχύτητα σωματιδίων –προεξοχών (απο χρυσό ή βολφράμιο) στα οποία συνδέεται το DNA προς μεταφορά έτσι ώστε να διαπερνώνται οι εξωτερικές κυτταρικές στοιβάδες ή τα κυτταρικά τοιχώματα και να εισέρχεται το DNA στο κύτταρο



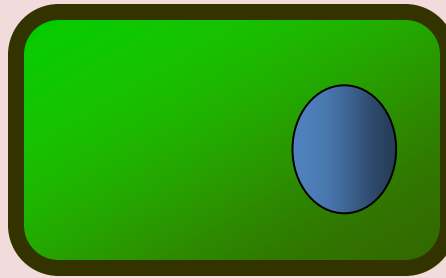
**Figure 15.3**

**DNA Particle Gun.** The DNA particle gun, developed by John C. Sanford of Cornell University, fires tungsten pellets coated with DNA into plant cells. The pellets are held by a plastic microprojectile, which is accelerated by a gunpowder charge. The plate stops the microprojectile; momentum sends the DNA-coated pellets into the

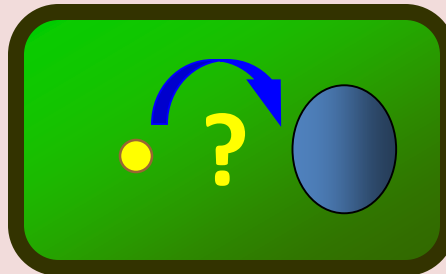
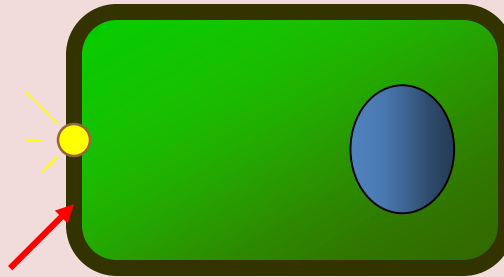
# Βιολιστική



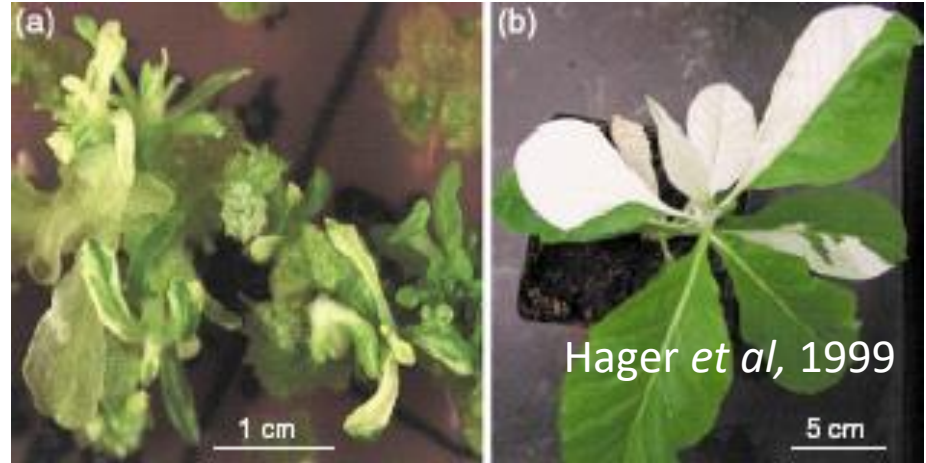
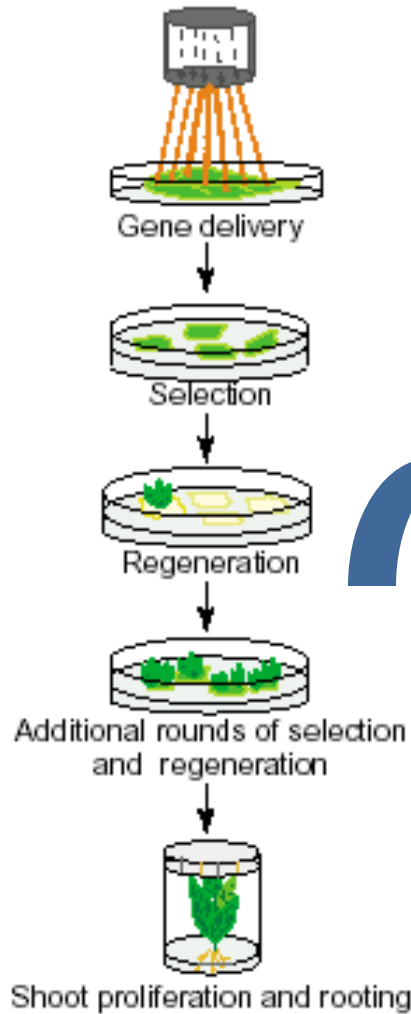
Σωματίδια χρυσού  
επικαλυμμένα με  
DNA



Κυτταρικό τοίχωμα



# Μεταμόρφωση χλωροπλαστών



Απαλοιφή των γονιδιωμάτων άγριου-τύπου και εγκαθίδρυση γενετικής τροποποίησης σε κάθε αντίγραφο του χλωροπλαστικού γονιδιώματος σε κάθε φυτικό κύτταρο :

**Ομοιοπλασμία (homoplasmly)**

# Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών ελεύθερων από γονίδια επιλογής - clean gene technology

Χρήση κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων, οι οποίοι

1. φέρουν γονίδια επιλογής χωρίς επικίνδυνες βιολογικές δραστηριότητες  
π.χ. *gfp*, *ipt*
2. επιτρέπουν την ένθεση του ξένου γονιδίου και του γονιδίου επιλογής σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του φυτού, μη συνδεδεμένες μεταξύ τους

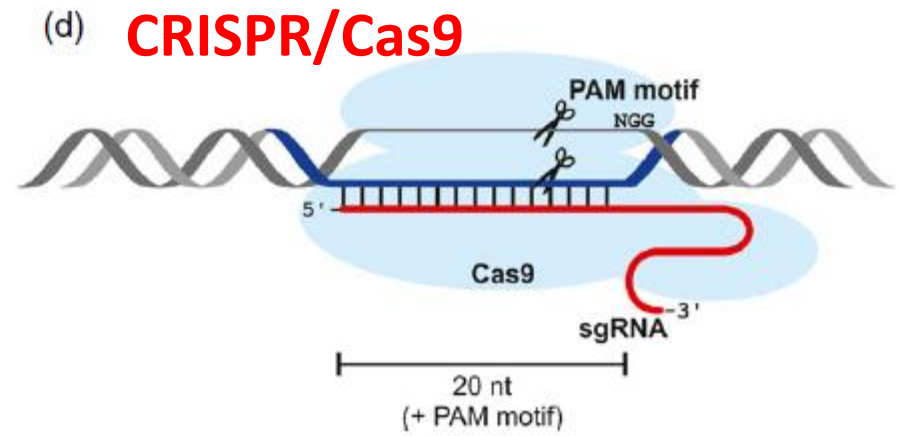
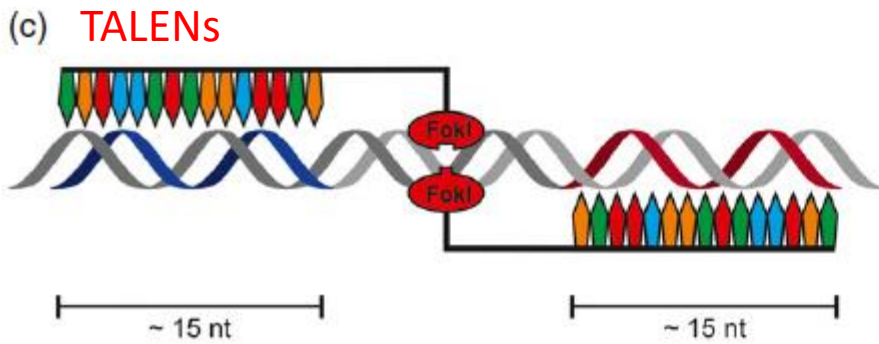
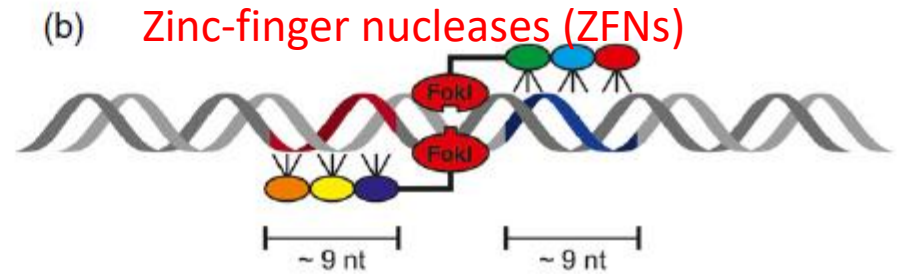
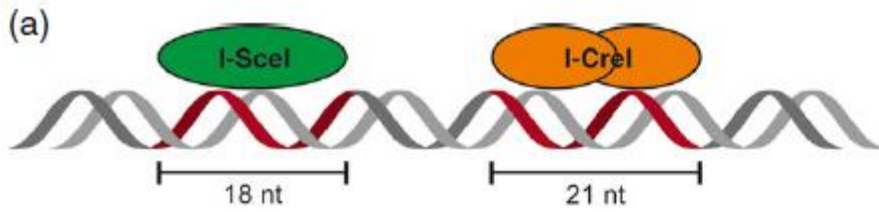


Γενετική ανάλυση των απογόνων για την αναγνώριση των επιθυμητών φυτών

3. αυξάνουν τη συχνότητα των ανασυνδυασμών με αποτέλεσμα την εξαγωγή του γονιδίου επιλογής
4. επιτρέπουν την εξαγωγή του γονιδίου επιλογής από το φυτικό γονιδίωμα με χρήση συστημάτων ρεκομπινάσης με εξειδίκευση θέσης



# Συνθετικές Νουκλεάσες για Γονιδιωματική Μηχανική



ενσωμάτωση με ακρίβεια θέσης του επιθυμητού  
γενετικού υλικού σε πολύ καθορισμένες θέσεις μέσα  
στο γονιδίωμα (genome editing)

# Διαγονιδιακά Φυτά στο εμπόριο

Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization



# Διαγονιδιακά Φυτά με Βελτιωμένα Αγρονομικά Χαρακτηριστικά

- ✓ Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα
- ✓ Ανθεκτικότητα σε έντομα
- ✓ Ανθεκτικότητα σε ασθένειες (βακτήρια, μύκητες, ιοί)

Αντοχή σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις

Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization



## The 4 Major Biotech Crops in 2012 are Soybean, Cotton, Maize and Canola.



### SOYBEAN

grown in 11 countries  
81% of global planting



### COTTON

grown in 15 countries  
81% of global planting



### MAIZE

grown in 17 countries  
35% of global planting



### CANOLA

grown in 4 countries  
30% of global planting



For more information, visit ISAAA website: <http://www.isaaa.org>

Source: James, Clive. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. *ISAAA Brief No. 44*.



isaaa.org



@isaaa\_org



isaaavideos



# Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2012

**17** million farmers

in 28 countries planted

**170** million hectares of biotech crops



For the first time, developing countries grew more biotech crops than industrial countries.



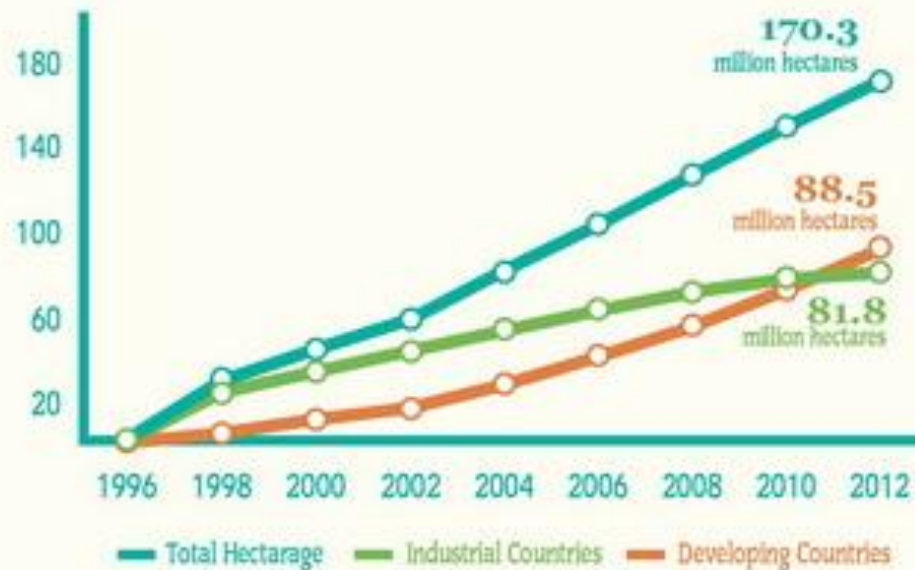
For more information, visit ISAAA website: <http://www.isaaa.org>

Source: James, Clive. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44.





For the first time, developing countries grew more biotech crops than industrial countries.



For more information, visit ISAAA website: <http://www.isaaa.org>

Source: James, Clive. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief No. 44.



✓ Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα



### 1. Αποτοξικοποίηση ζιζανιοκτόνου με εισαγωγή γονιδίων βακτηριακής (κυρίως) ή φυτικής προέλευσης

#### απαραίτητες ιδιότητες γονιδίων

- απόλυτη εξειδίκευση
- μονογονιδιακός χαρακτήρας
- να μην απαιτεί πολύπλοκα συνένζυμα
- καλή ενζυμική κινητική
- απουσία τοξικότητας του προϊόντος αντίδρασης

Δεν είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τον τρόπο δράσης

### 2. Υπερπαραγωγή της φυσιολογικής, μη-τροποποιημένης πρωτεΐνης-στόχου

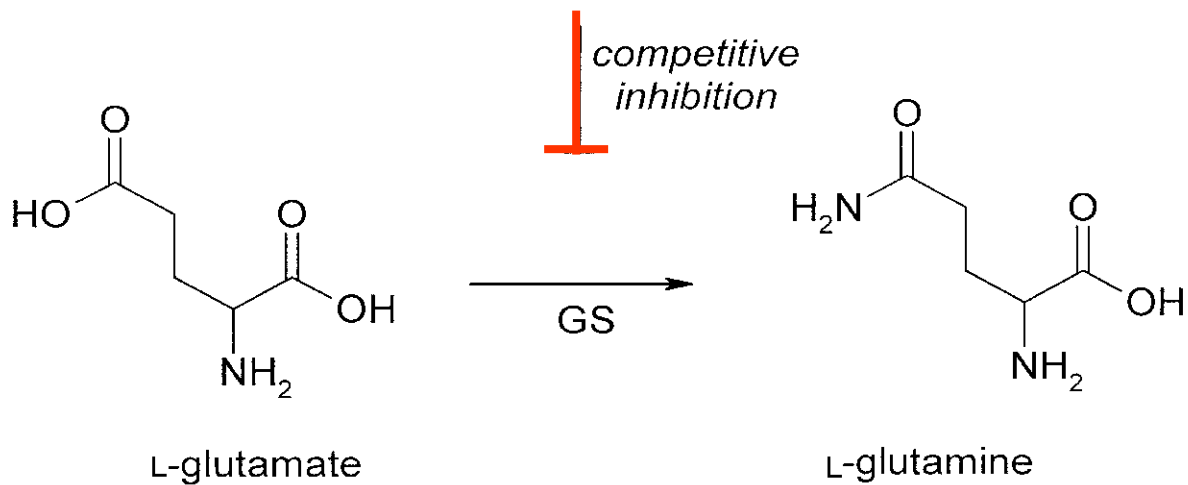
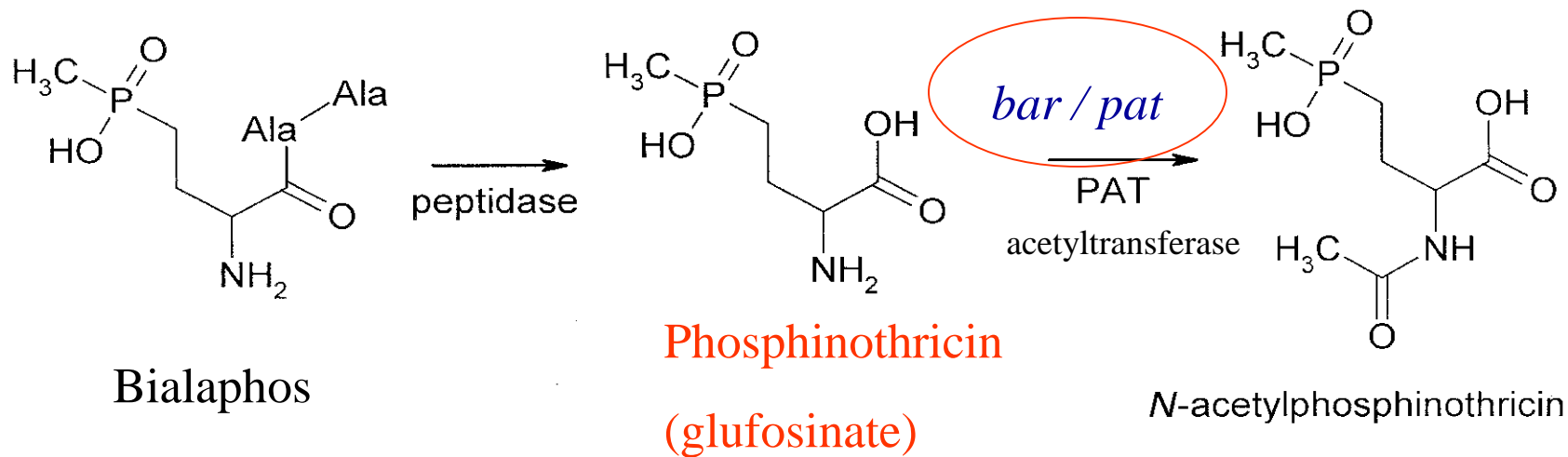
### 3. Τροποποίηση της πρωτεΐνης-στόχου

- γνωστή η βιοχημική θέση δράσης
- δυνατότητα στη μοριακή μηχανική τροποποίησης?
- εντοπισμός σε υποκυτταρικά διαμερίσματα
- πολυμερή ένζυμα

### 4. Ενίσχυση της αποτοξικοποίησης από ενδογενείς μηχανισμούς του φυτού (κυτοχρωμα P450, μεταφορά S της γλουταθειόνης, GST)



# Ανθεκτικότητα στο glufosinate (phosphinothricin)- BASTA

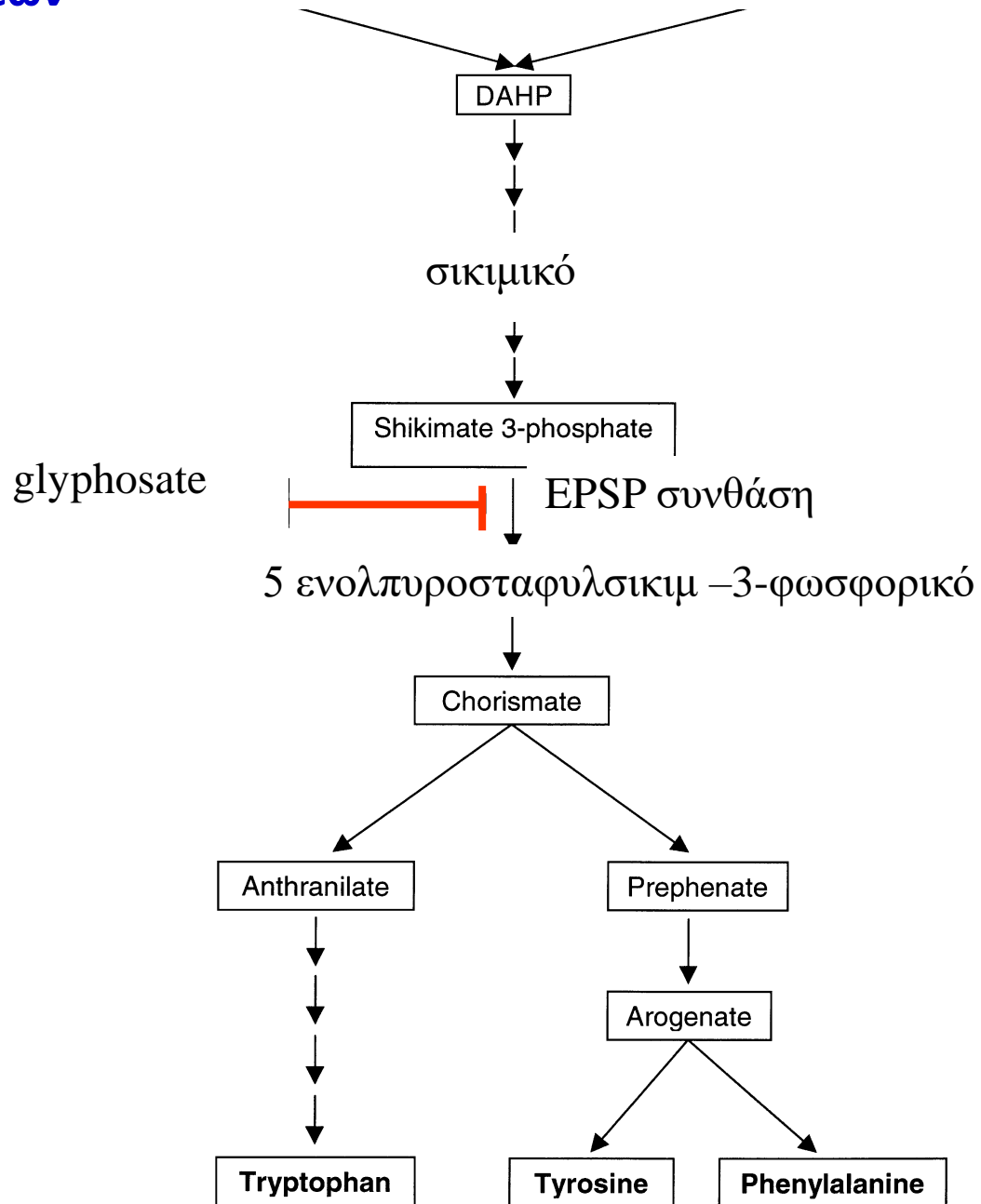


στρατηγική 1: εισαγωγή γονιδίων αποτοξικοποίησης  
βακτηριακής προέλευσης



# Βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων

φωσφορική ερυθρόζη    φωσφοενολπυροσταφυλικό οξύ





# Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα

Roundup Ready Soybeans



Traditional Soybeans

**Bollgard**  
with  
Roundup Ready<sup>®</sup>  
Cotton



# Ανθεκτικότητα σε έντομα



εισαγωγή γονιδίων βακτηριακής προέλευσης

*B. thuringiensis*:

*cry* γονίδια - insecticidal crystal protein

(ICP/ Cry/ Bt/ δ-ενδοτοξίνη)



# Ανθεκτικότητα σε ιούς

- Με υπερέκφραση των CP (coat protein) σε διαγονιδιακά φυτά
- Anti-sense RNA/ Ribozymes
- Gene silencing



# Διαγονιδιακά φυτά 2ης γενιάς



Συσσωρευμένα χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας  
σε ζιζανιοκτόνα και έντομα

- **SmartStax™ αραβόσιτος** (MON 89034 x TC1507 x MON 88017x DAS-59122-7)
- **RReady2Yield™ σόγια**







Εξάλειψη γονιδίων επιλογής (ανθεκτικότητας σε  
αντιβιοτικά)



“Εθνικά” προϊόντα

Π.χ. Bt Huahui-1 και Bt Shanyou Shanyou-63 ρύζι, Huazhong Agricultural  
University, Κίνα  
Bt βαμβάκι και Bt brinjal (eggplant) , Ινδία

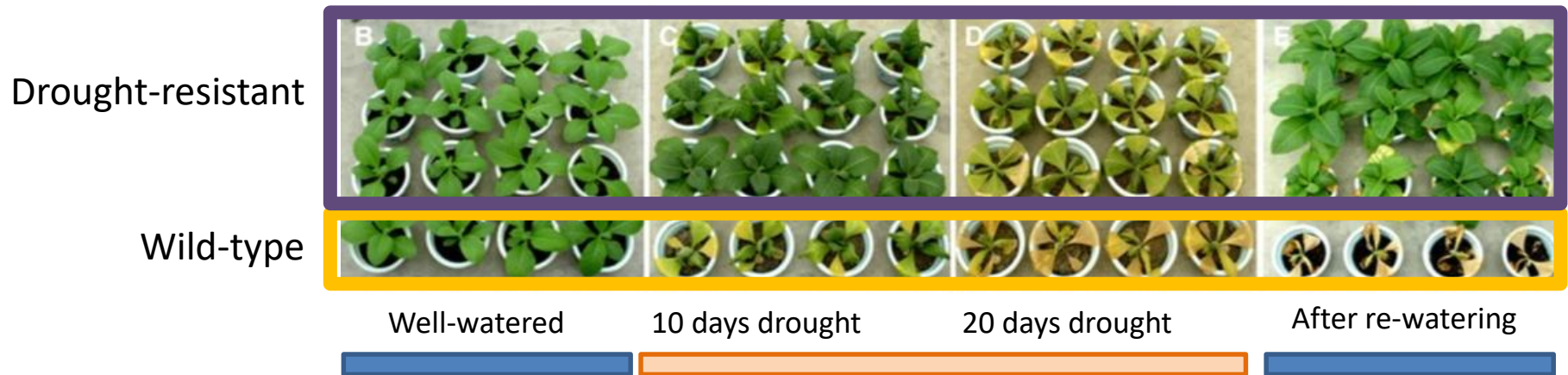
# Στόχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”

-  Φυτά με ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις: ξηρασία / αλατότητα / έλλειψη θρεπτικών στοιχείων – κυρίως N / P
-  Φυτά με ανθεκτικότητα σε ασθένειες
-  Βιοκαύσιμα
-  Φυτοαπορρύπανση/ Φυτοαποκατάσταση

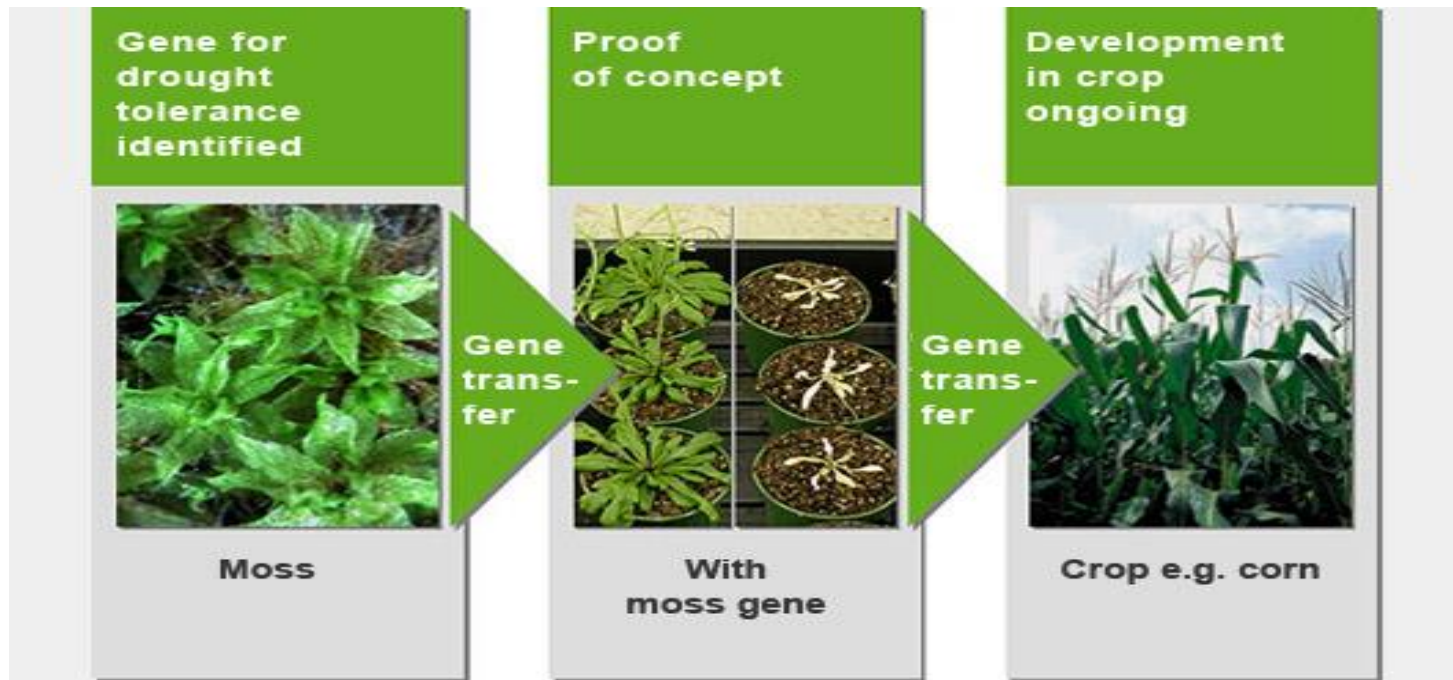
Περιβάλλον και Αειφορική Γεωργία



# Η αλλαγή ενός και μόνο γονιδίου αυξάνει την αντοχή στην ξηρασία



Yu, H., Chen, X., Hong, Y.-Y., Wang, Y., Xu, P., Ke, S.-D., Liu, H.-Y., Zhu, J.-K., Oliver, D.J., Xiang, C.-B. (2008)  
Activated expression of an *Arabidopsis* HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *Plant Cell* 20:[1134-1151](https://doi.org/10.1105/PC.106108).



**Π.χ. DroughtGard™ Hybrids system Monsanto, 2013  
για καλλιέργεια σε U.S.A. Western Corn Belt**

Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization



Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization

Trait category <sup>a</sup>	Earlier R&D stages	Advanced R&D	Regulatory pipeline	Commercial pipeline	Commercial GM crops
	Commercial in 2008	Commercial pipeline	Regulatory pipeline	Advanced development	Total by 2015 <sup>b</sup>
Insect resistance	21	2	11	25	59
Herbicide tolerance	11	5	4	13	33
Product quality <sup>c</sup>	2	1	5	12	20
Virus resistance	5	0	2	3	10
Abiotic stress tolerance	0	0	1	6	7
Other	0	0	2	11	13

Αραβόσιτος, περιεχόμενο σε λυσίνη

➔ Αραβόσιτος, ανθεκτικότητα σε ξηρασία (*cspB*, *Bacillus subtilis*)

- Ρυζι, ανθεκτικότητα σε μύκητες / ιούς / ξηρασία/ αλατότητα
- Αραβόσιτος, αμυλάση/ φυτάση
- Πατάτα, αμυλοπηκτίνη/ ΡΥV ανθεκτικότητα

- Σογια, τροποποιημένα λιπαρά (ελαικό / στεαριδονικό – ω-3-) ανθεκτικότητα σε νηματώδεις
- Πατάτα ανθεκτικότητα σε μύκητες/ τροποποιημένο άμυλο
- Golden Rice

Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization



Trait category <sup>a</sup>	Commercial in 2008	Commercial pipeline	Regulatory pipeline	Advanced development	Total by 2015 <sup>b</sup>
Insect resistance	21	2	11	25	59
Herbicide tolerance	11	5	4	13	33
Product quality <sup>c</sup>	2	1	5	12	20
Virus resistance	5	0	2	3	10
Abiotic stress tolerance	0	0	1	6	7
Other	0	0	2	11	13

**Αραβόσιτος, περιεχόμενο σε λυσίνη**

**Αραβόσιτος, ανθεκτικότητα σε ξηρασία (*cspB*, *Bacillus subtilis*)**

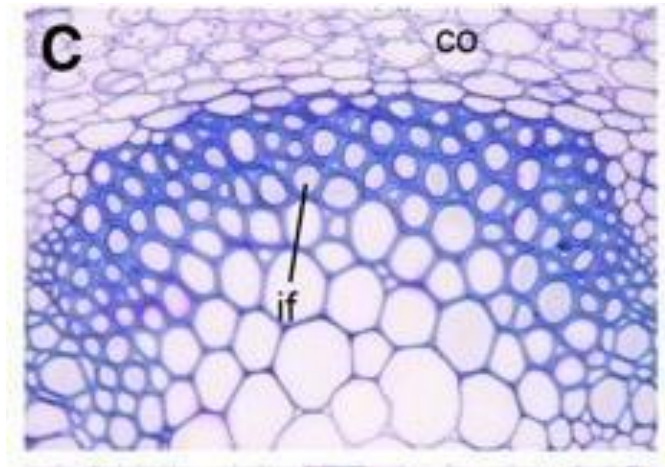
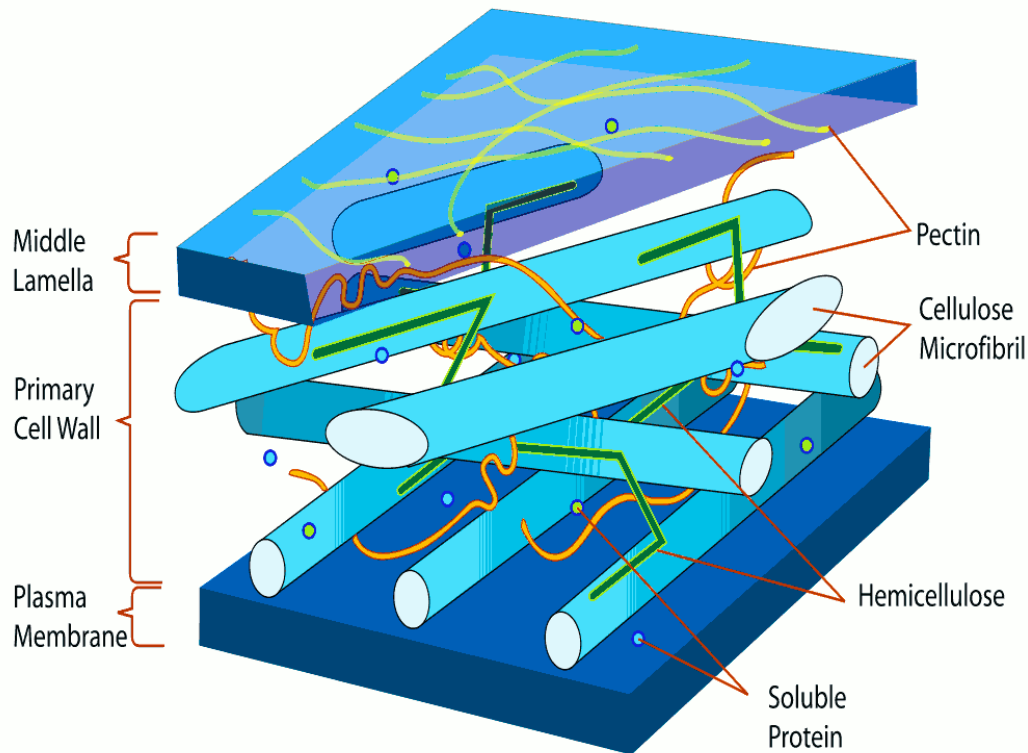
- Ρυζί, ανθεκτικότητα σε μύκητες / ιούς / ξηρασία/ αλατοτητα
- Αραβόσιτος, αμυλάση/ φυτάση
- Πατάτα, αμυλοπηκτίνη/ PYV ανθεκτικότητα

- Σογια, τροποποιημένα λιπαρα (ελαικο / στεαριδονικό – ω-3-)
- ανθεκτικότητα σε νηματώδεις
- Πατατα ανθεκτικότητα σε μύκητες/ τροποποιημένο άμυλο
- Golden Rice



# Κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων

Αποτελούνται κυρίως από υδατάνθρακες και πρωτεΐνες.

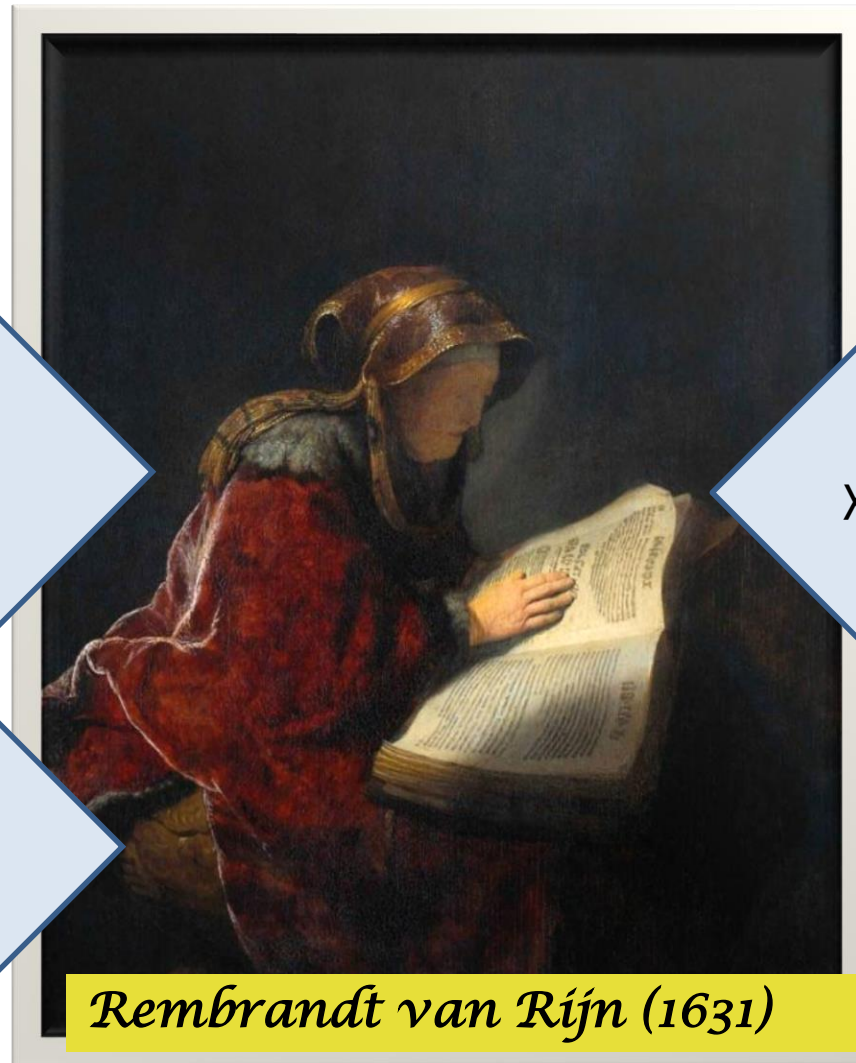


Το δευτερογενές τοίχωμα περιλαμβάνει λινίνη

credit: [www.wpclipart.com/plants](http://www.wpclipart.com/plants); Zhong, R., et al., (2008) Plant Cell 20:2763-2782 .



# Το ξύλο αποτελεί βασική πρώτη ύλη με πολλαπλες χρήσεις



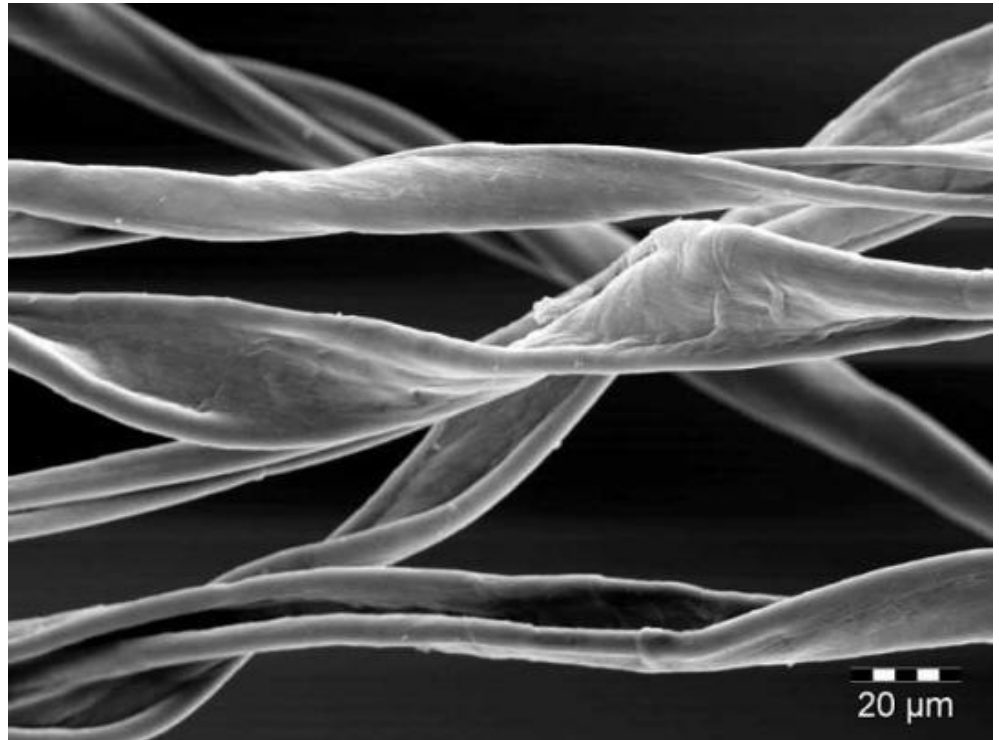
Ένδυση

χαρτί

Κατασκευές και  
έπιπλα

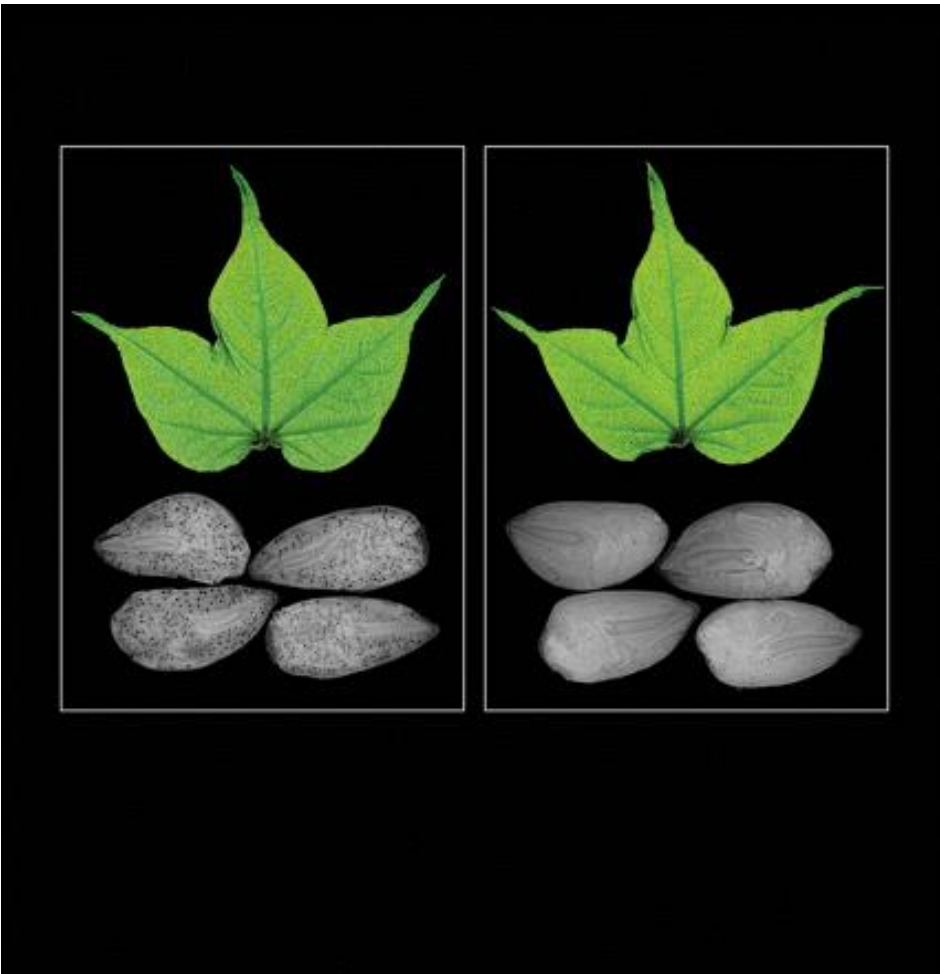
Ίνες κάνναβης  
και λινάρι

*Rembrandt van Rijn (1631)*

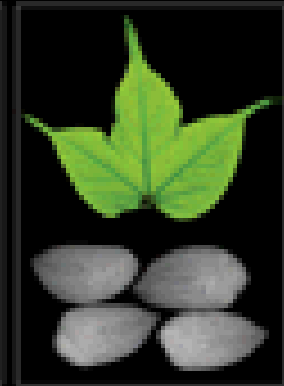
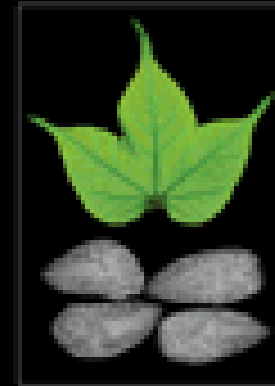


**Ποικιλίες βαμβακιού επιλέγονται σε προγράμματα βελτίωσης για ανθεκτικότητα σε εχθρούς και καλύτερη ποιότητα ίνας**

Photo credits: [Chen Lab](#); [IFPC](#)



## Engineering edible cottonseed



Manufacturing oil inclusion  
Eggs of the *Bruchus*  
Resistant mutation to insect pests  
With *gypsinase* target gene



Florigene Moonshadow™



Florigene Moonvista™





# Βιοκαύσιμα- Αιθανόλη

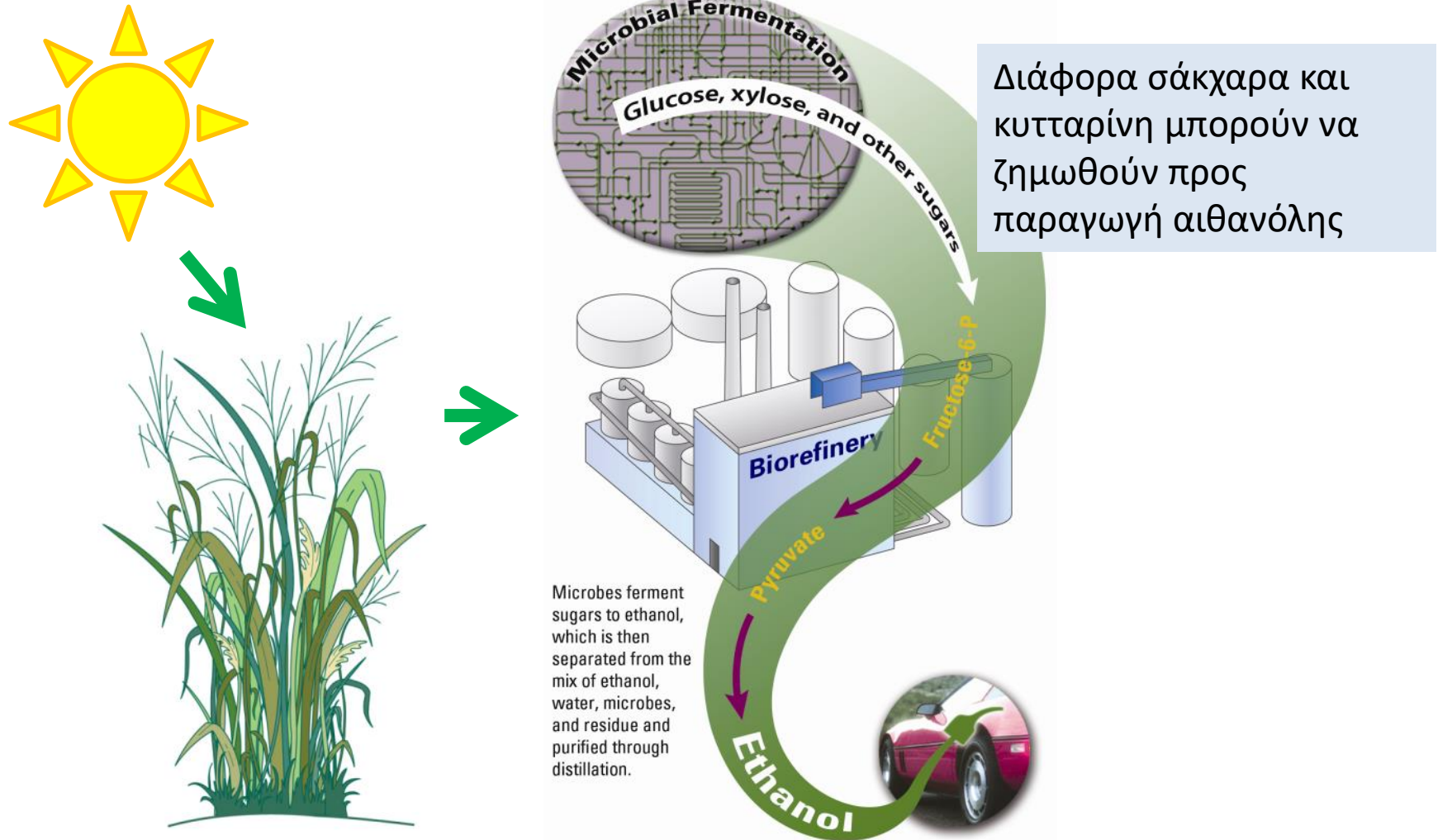
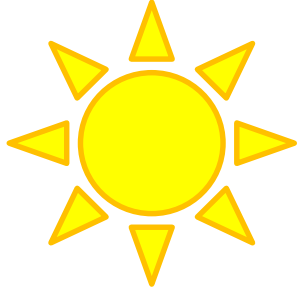


Image source: [Genome Management Information System, Oak Ridge National Laboratory](#)



# Βιοκαύσιμα-Βιοντιζελ



Παραγωγή βιοντιζελ από ελαιοκομικά φυτά  
(σόγια, ελαιοκράμβη, άλγες)



Image sources: [Tilo Hauke](#), University of Minnesota, Iowa State University Extension.



Photo Illustration courtesy S. Long Lab, University of Illinois, 2006

*Miscanthus giganteus*:  
ένα ενεργειακό φυτό που  
αναπτύσσεται ταχύτατα  
και καλλιεργείται σε  
εδάφη ακατάλληλα για  
φυτά-παραγωγείς  
τροφής



Από την παραγωγή βιοκαυσίμων μπορούν να παραχθούν και πολλά  
άλλα προϊόντα αυξημένης προστιθέμενης αξίας  
(με την περίσσεια της βιομάζας πχ αξιοποίηση λιγνίνης)



Primary Product



'Value Added' Products





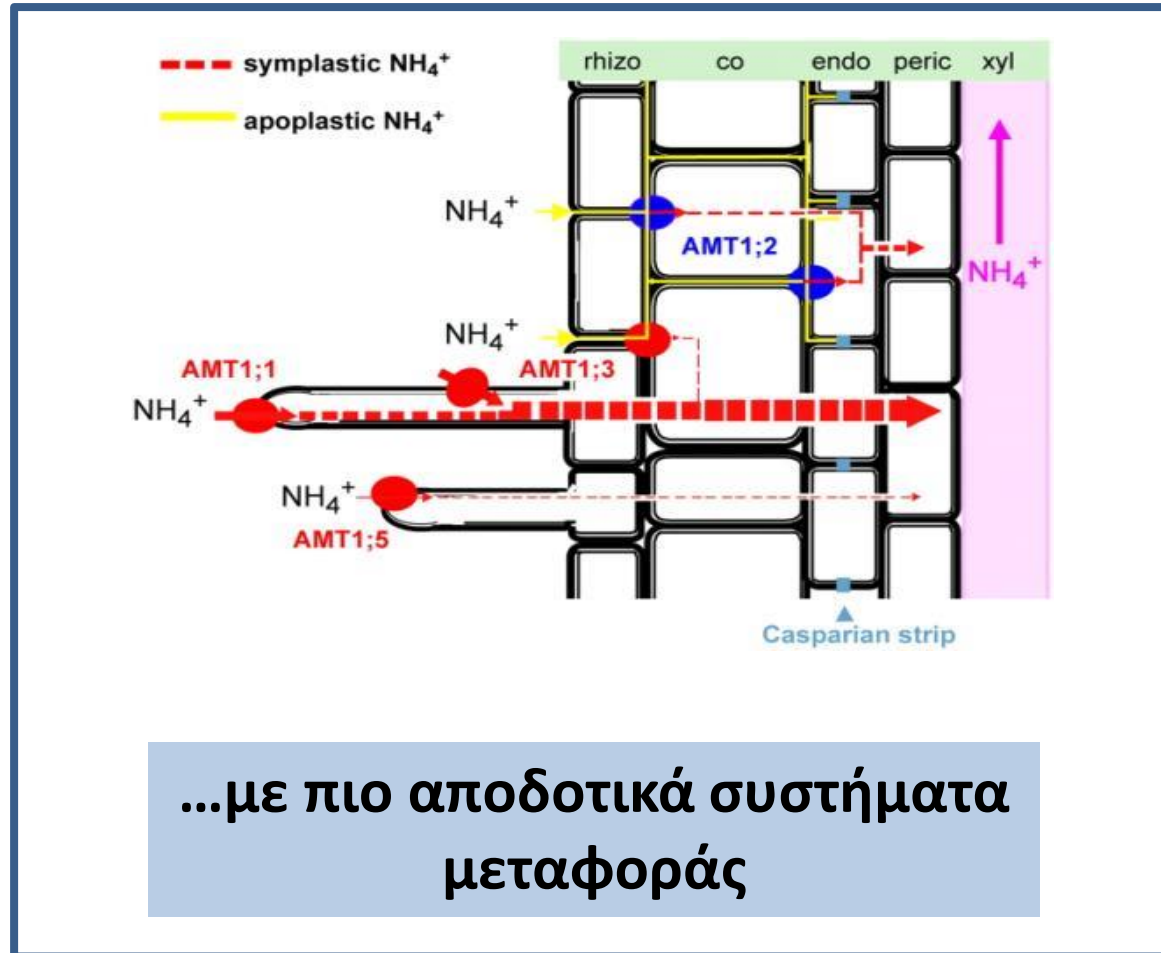
# Η λίπανση είναι μια ενεργοβόρα πρακτική

- Τα καλλιεργούμενα φυτά χρειάζονται λίπανση- κάλιο, φώσφορο, άζωτο και άλλα θρεπτικά στοιχεία
- Το κάλιο και ο φώσφορος είναι μη ανανεώσιμα
- Η σύνθεση των αζωτούχων λιπασμάτων είναι ενεργοβόρα

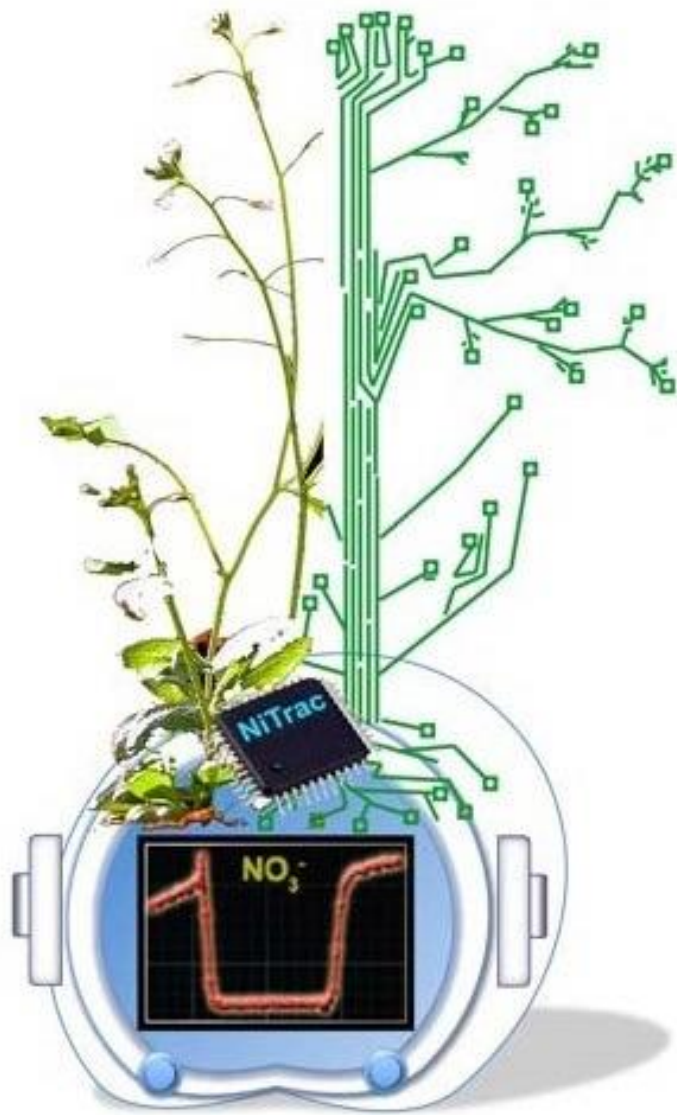


Photo credits: Mining Top News; Library of Congress, Prints & Photographs Division, FSA-OWI Collection, [LC-USW361-374](https://www.loc.gov/ead/gsa/OWI/OWI361-374/)

# Η πρόσληψη θρεπτικών από ειδικούς μεταφορείς μπορεί να βελτιωθεί



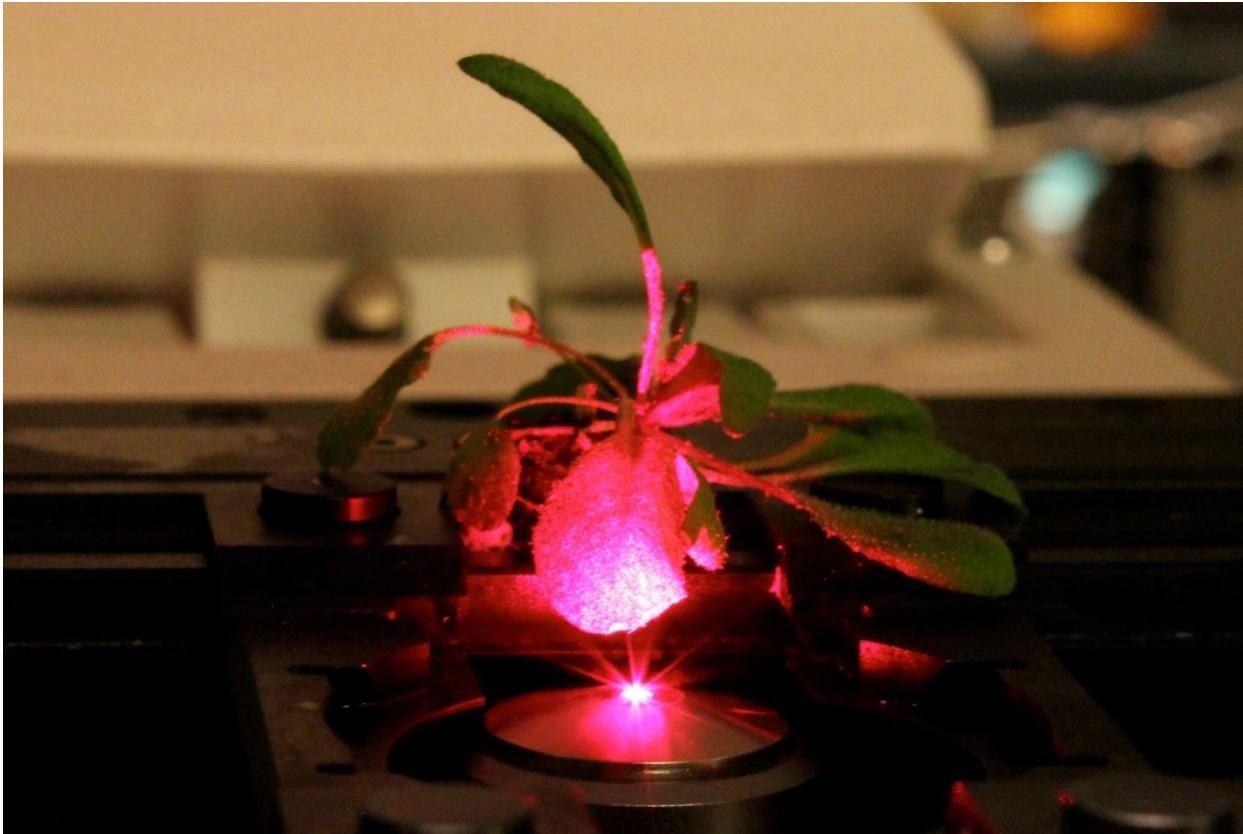




**...με τη δημιουργία βιο-αισθητήρων**

Οι ανάγκες του φυτού υπό τις διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος μπορούν να καταγράφονται και να γίνεται ανάλογη προσαρμογή στη διαχείριση των καλλιεργειών

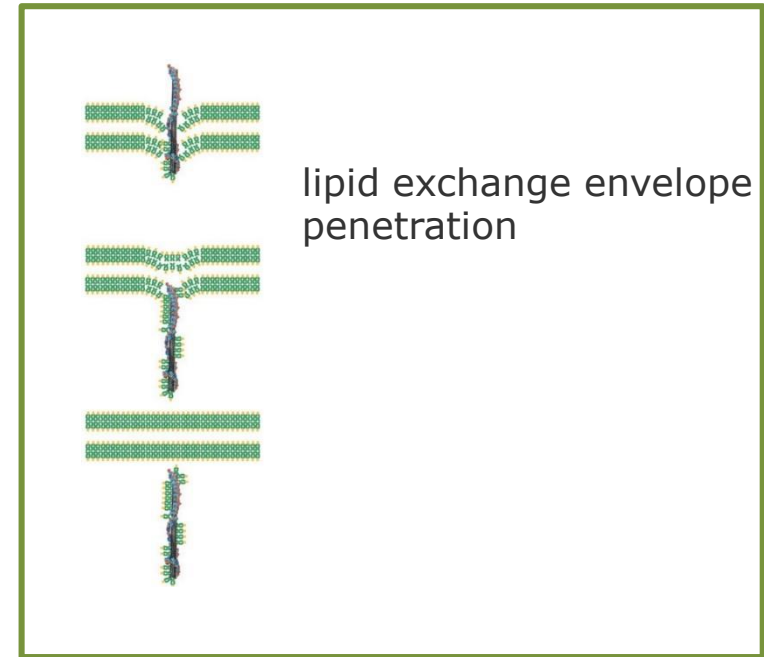
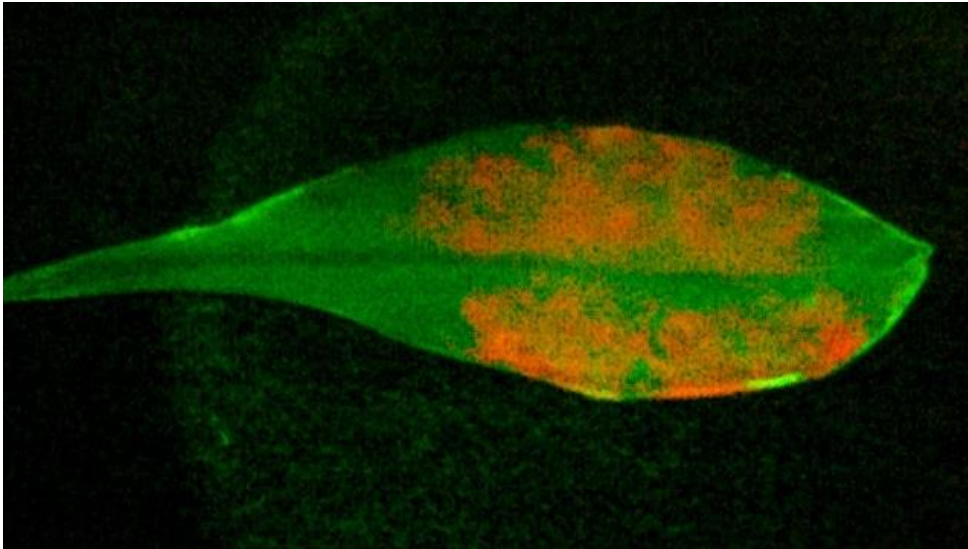
...με τη χρήση νανο-βιοτεχνολογίας



[https://www.youtube.com/watch?v=Ydbka6\\_HPZ0](https://www.youtube.com/watch?v=Ydbka6_HPZ0)

# The incorporation of synthetic nanoparticles into plants can enhance photosynthesis and transform leaves into biochemical sensors

nanotechnology can be coupled with synthetic biology to modify and enhance the function of living organisms



*Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing*

*Nature Materials* **13**, 400–408 (2014) doi:10.1038/nmat3890

# ***Plant nanobionics: one of the ten amazing tech innovations of 2014 according to the International Business Times***

March 10th, 2015



The image shows the top section of the International Business Times website. On the left, there is a hamburger menu icon and the text "INTERNATIONAL BUSINESS TIMES". On the right, there are social media icons for Facebook, Twitter, Google+, RSS, and a search icon. Below this is a large blue advertisement for Meritage Homes. The ad features the Meritage Homes logo on the left, the text "11 New Communities in So. Cal." in the center, and a photograph of a modern house on the right. Below the main text in the ad, it says "From the \$310s - \$875s | 877-715-8719" and a yellow "LEARN MORE" button. At the bottom of the ad, there is a small line of text: "Prices subject to change. See website for details."

Technology

## **10 amazing tech innovations in 2014: invisibility cloaks, smart lenses and mind readers**





By *Anthony Cuthbertson*

December 10, 2014 10:07 GMT



A row of social media sharing buttons: Facebook (352), Twitter (203), Google+, Reddit, and SoundCloud.

# Στόχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”

-  Φυτά με βελτιωμένα χαρακτηριστικά ποιότητας (βιοεμπλουτισμός σε βιταμίνες, σίδηρο κ.α.)
-  Φυτά με βελτιωμένα χαρακτηριστικά απόδοσης

**τροποποίηση μεταβολισμού**



# Η κακή διατροφή και η έλλειψη τροφής: ένα παγκόσμιο πρόβλημα

In 2004, 60 million people worldwide died

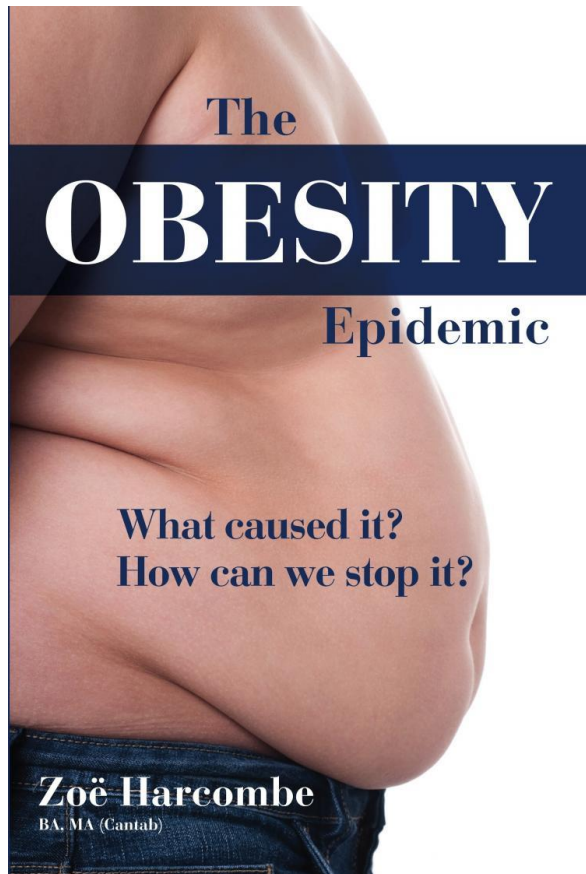
10 million of them were children under 5 years of age, of which 99% lived in low- or middle-income countries

5 million children under the age of 5 die each year due to **undernutrition** and related causes. **That's one preschool-aged child dying a preventable death every six seconds.**

A lack of adequate vitamin A kills one million children a year



# .....Και η άλλη όψη του νομίσματος



# Cassava: η βασική τροφή στην Αφρική είναι φτωχή σε θρεπτικά συστατικά

Ποικιλία ευρέως καλλιεργούμενη



Νέα ποικιλία με αυξημένη παραγωγή βιταμίνης Α



Welsch, R., Arango, J., Bar, C., Salazar, B., Al-Babili, S., Beltran, J., Chavarriaga, P., Ceballos, H., Tohme, J., and Beyer, P. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. *Plant Cell*: [tpc.110.077560](https://doi.org/10.110.077560).

# Εμπλουτισμός με γενετική τροποποίηση



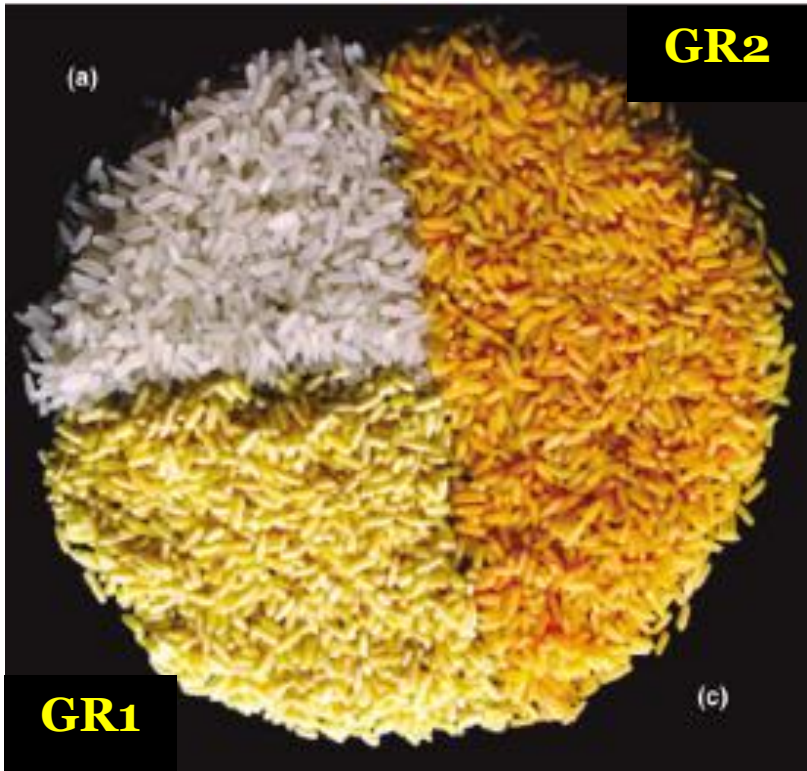
**Ρύζι με αυξημένη  
συγκέντρωση  
σιδήρου**



**Ντομάτες με αυξημένη  
συγκέντρωση  
αντιοξειδωτικών  
ανθοκυανινών**

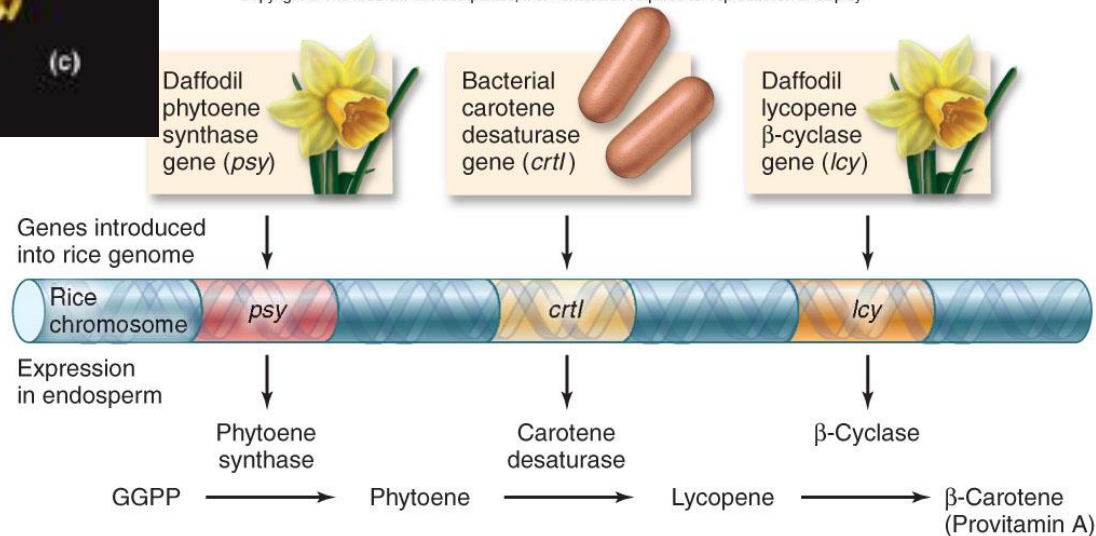
Photo credits: [Golden Rice Humanitarian Board](#) © 2007; Credit: [ETH Zurich / Christof Sautter](#); Butelli, E., et al., Nature Biotechnology 26, 1301 - 1308, copyright (2008).



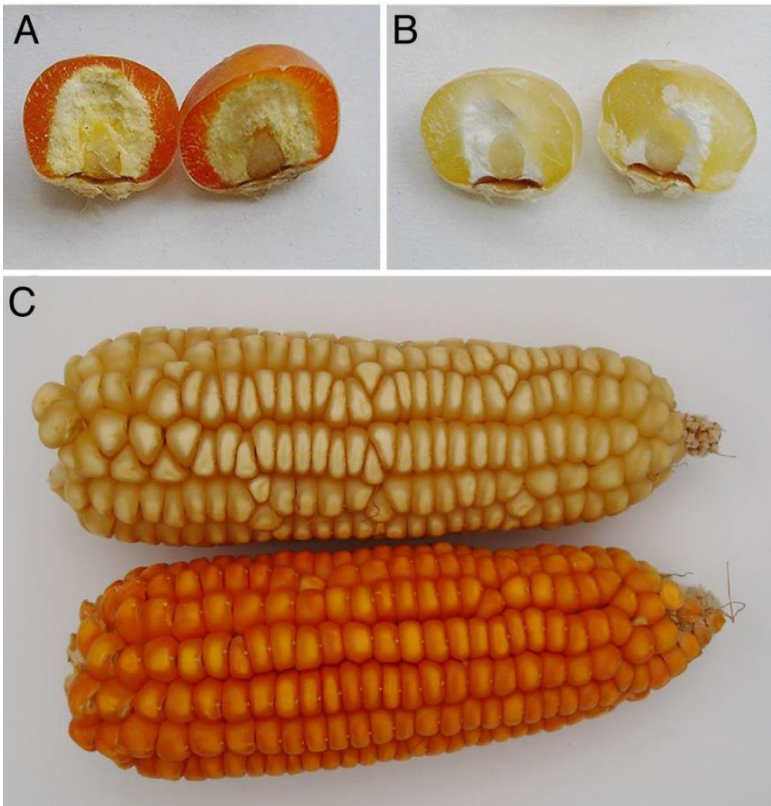


= 25 mg/g  $\beta$ -carotene  
 +εμπλουτισμός σε  
 βιταμίνη Ε και σίδηρο

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

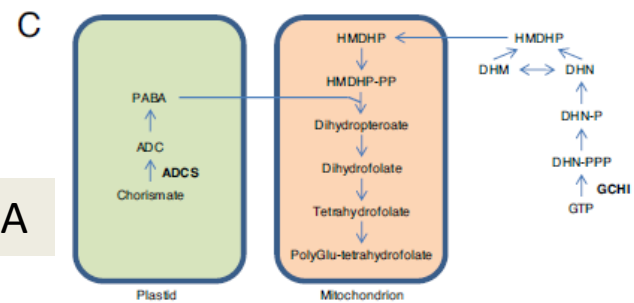
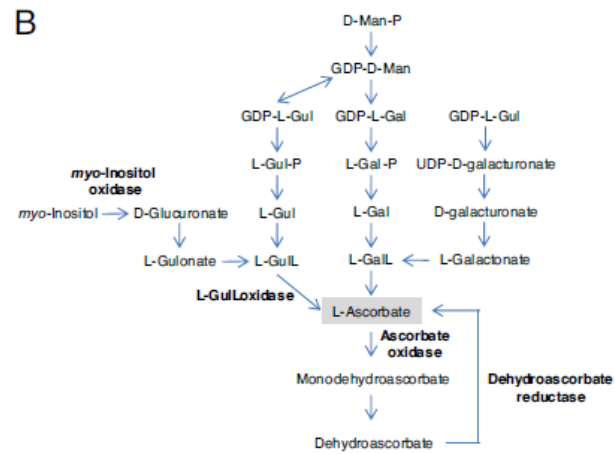
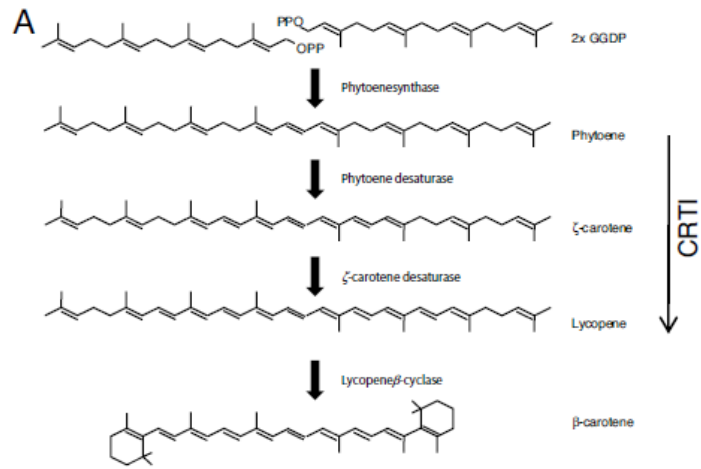






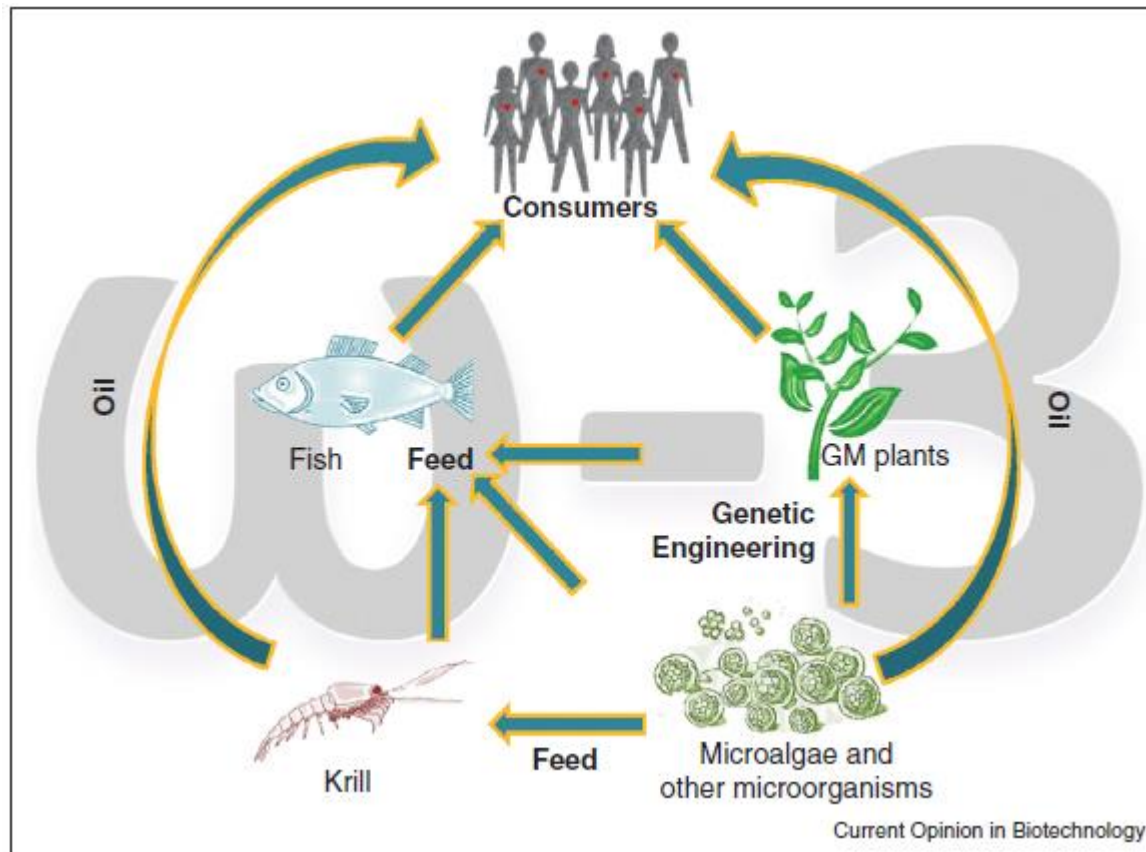
**Αύξηση 169X στην ποσότητα α-καροτενίου, 6X ασκορβικού οξέος και 2X φολικού οξέος**

Μέσω σπονδυλωτής μεταφοράς DNA



Navqi et al, PNAS, 2009

# Παραγωγή $\omega$ -3 και $\omega$ -6 λιπαρών οξέων σε διαγονιδιακά φυτά



C20:5 eicosapentaenoic acid (EPA) and C22:6 docohexaenoic acid (DHA)

Sustainable omega-3 production Adarme-Vega, Thomas-Hall and Schenk

Figure: The pipeline of GM crops from early R&D to commercialization

Trait category <sup>a</sup>	Earlier R&D stages	Advanced R&D	Regulatory pipeline	Commercial pipeline	Commercial GM crops
	Commercial in 2008	Commercial pipeline	Regulatory pipeline	Advanced development	Total by 2015 <sup>b</sup>
Insect resistance	21	2	11	25	59
Herbicide tolerance	11	5	4	13	33
Product quality <sup>c</sup>	2	1	5	12	20
Virus resistance	5	0	2	3	10
Abiotic stress tolerance	0	0	1	6	7
Other	0	0	2	11	13

➔ Αραβόσιτος, περιεχόμενο σε λυσίνη

Αραβόσιτος, ανθεκτικότητα σε ξηρασία (*cspB*, *Bacillus subtilis*)

- Ρυζί, ανθεκτικότητα σε μύκητες / ιούς / ξηρασία/ αλατοτητα
- Αραβόσιτος, αμυλάση/ φυτάση
- Πατάτα, αμυλοπηκτίνη/ ΡΥV ανθεκτικότητα

➔ -Σογια, τροποποιημένα λιπαρα (ελαικο / στεαριδονικό – ω-3-) ανθεκτικότητα σε νηματώδεις

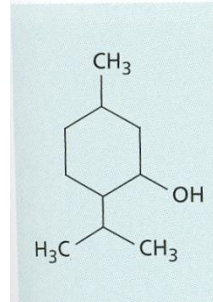
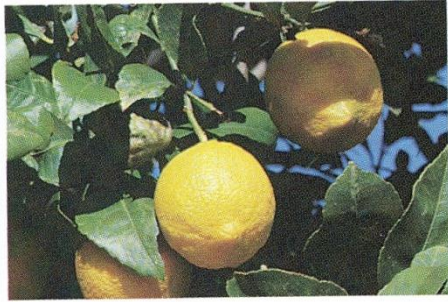
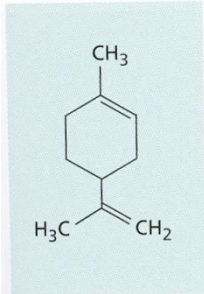
➔ -Πατατα ανθεκτικότητα σε μύκητες/ τροποποιημένο άμυλο

➔ -Golden Rice

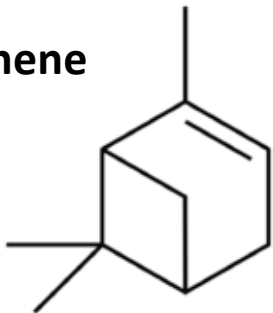
# Φυσικά προϊόντα- εξειδικευμένοι μεταβολίτες των φυτών



# Τερπένια



Pinene



Eucalyptol

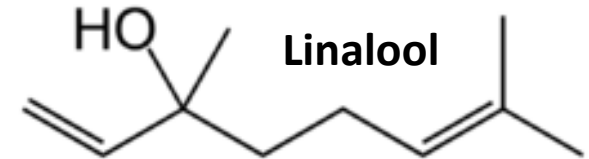
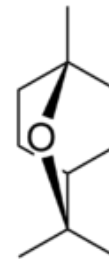
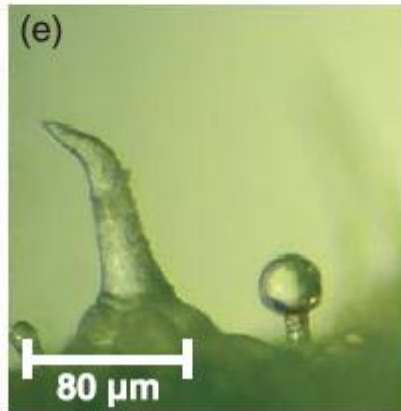
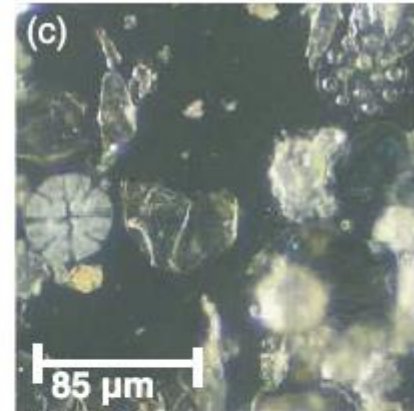
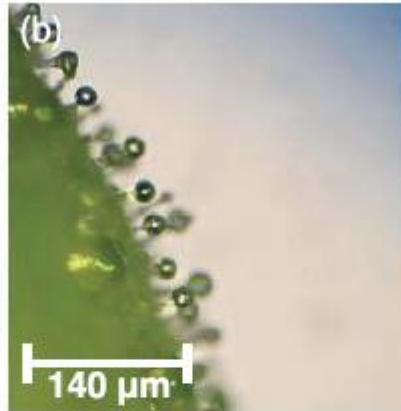
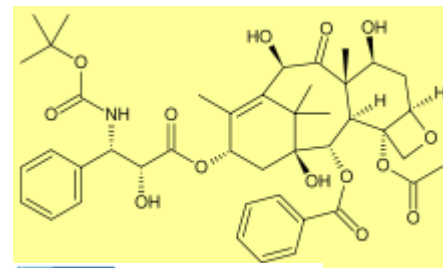
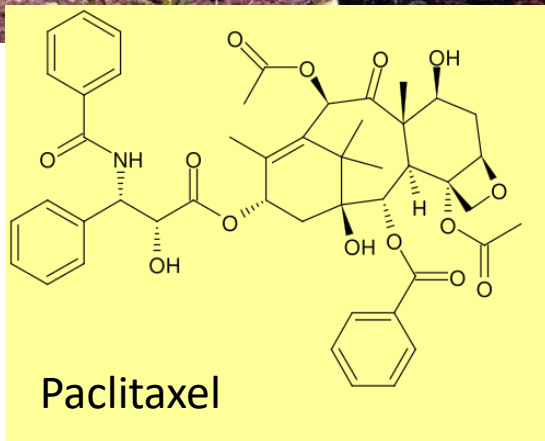


Image sources: [Calvero](#); [Wilhelm Thomé](#); [Forest & Kim Starr](#); [Karan A. Rawlins](#), University of Georgia





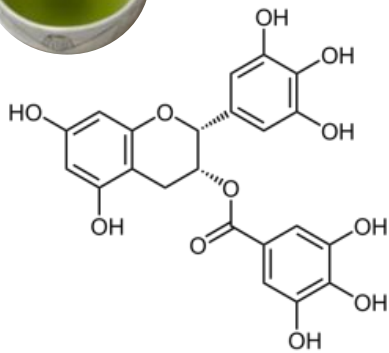


**AXOTERE<sup>®</sup>**  
(docetaxel)  
Injection Concentrate

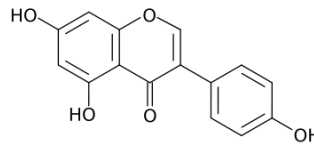




# Φαινολικές ενώσεις: φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, τανίνες κτλ

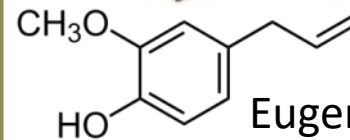


**Epigallocatechin gallate (EGCG)**, a flavonoid from green tea



**Genistein** an isoflavonoid from soy beans

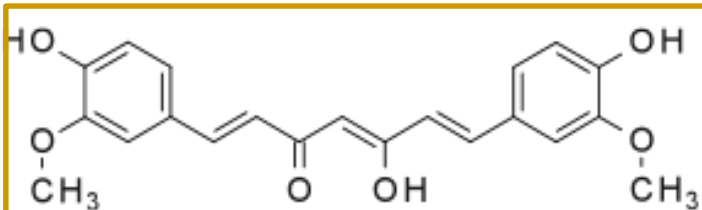
*Syzygium aromaticum*



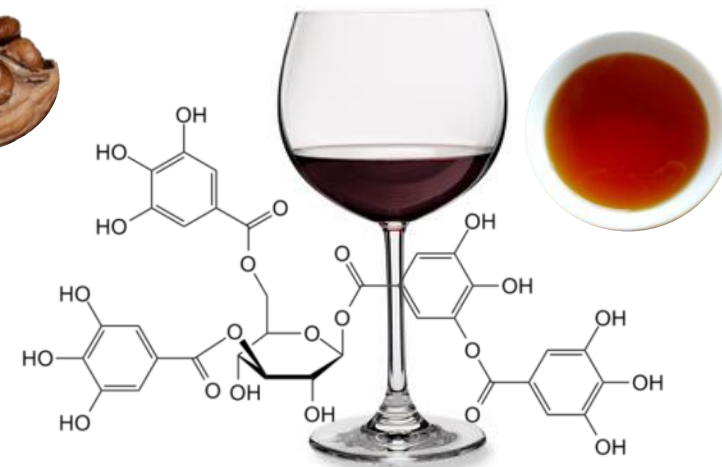
**Eugenol**



**Tannins** Found in tea, wine, nuts and many plants

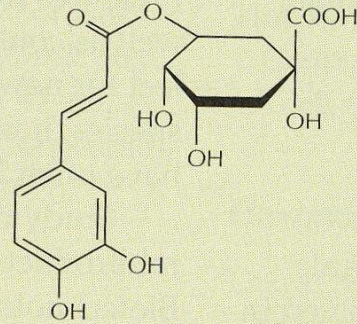


**Curcumin** from the spice turmeric



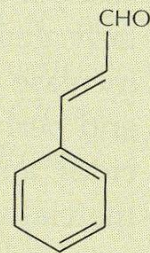


Coffee beans



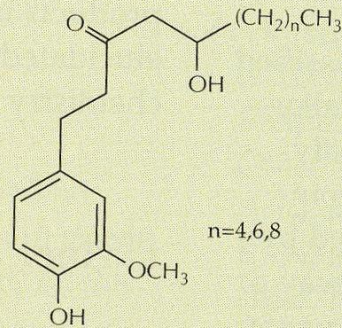
Chlorogenic acid

Cinnamon bark



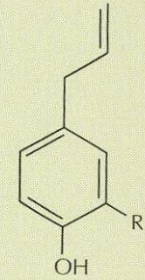
Cinnamaldehyde

Ginger rhizome



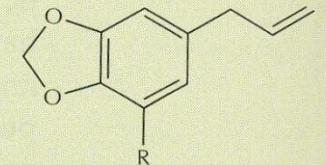
Gingerols

Cloves



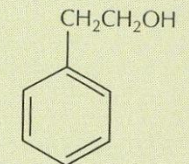
R = H      Chavicol  
 R = OCH<sub>3</sub>      Eugenol

Nutmeg



R = H      Safrole  
 R = OCH<sub>3</sub>      Myristicin

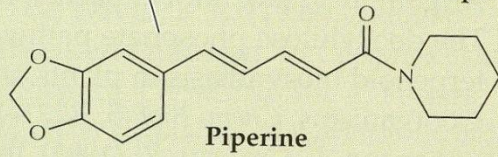
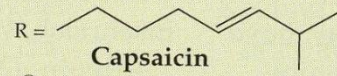
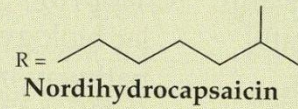
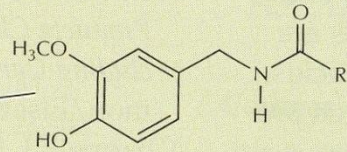
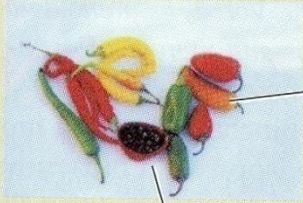
Orchid



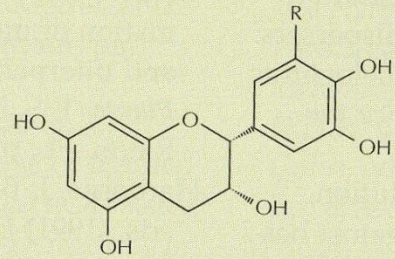
Phenylethyl alcohol



### Red and black peppers

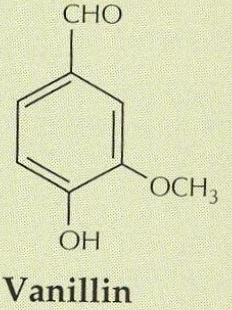


### Green tea



R = H    (-)-Epicatechin  
 R = OH   (-)-Epigallocatechin

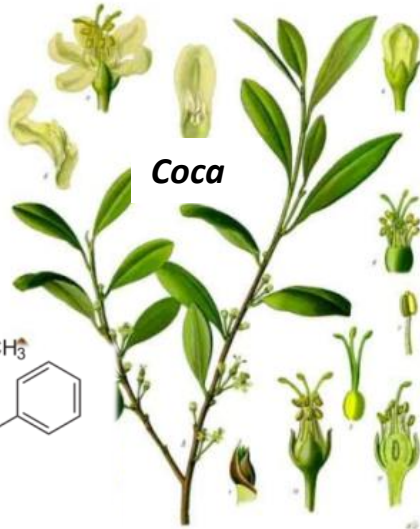
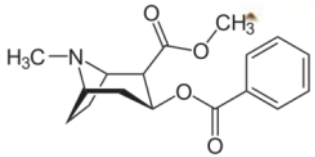
### Vanilla



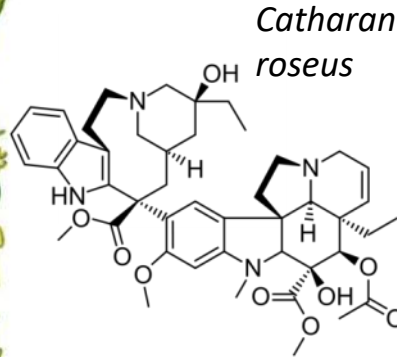


# Αλκαλοειδή

**Cocaine**



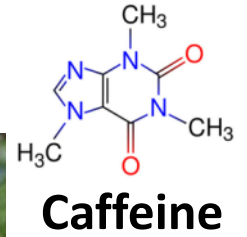
**Vincristine**



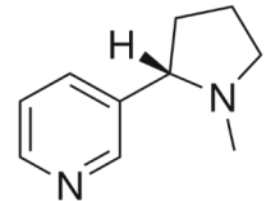
*Catharanthus roseus*



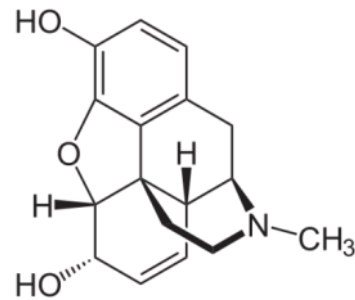
Coffee



**Nicotine**



*Nicotiana tabacum*



**Morphine**

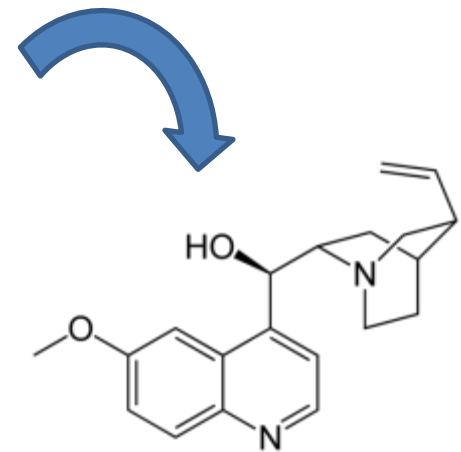
*Papaver somniferum*



# *Cinchona*: παραγωγή κινίνης στον κορμό - καταπολέμηση *Plasmodium*



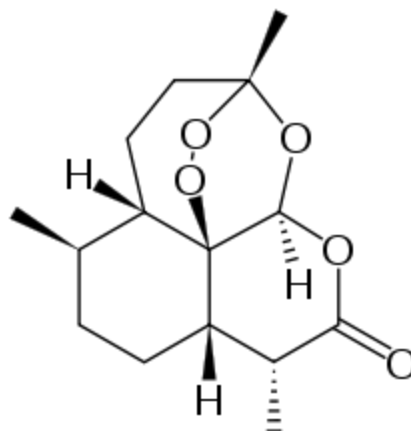
Image credits: [Köhler](#); [CDC](#)



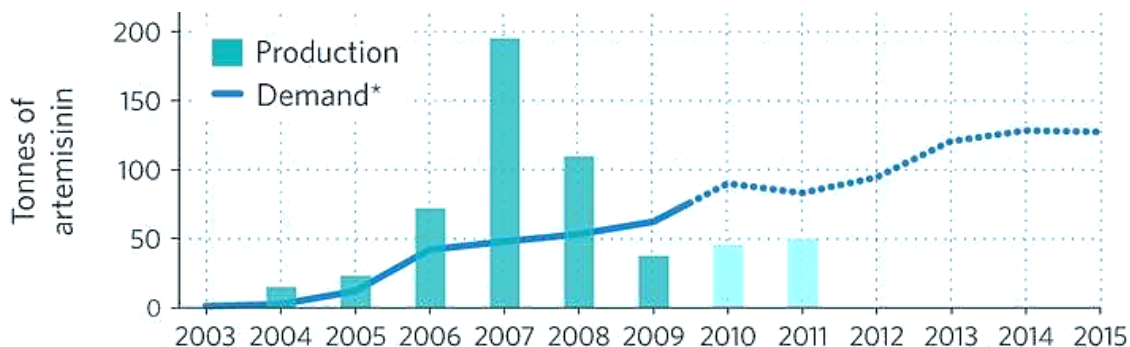
# *Artemisia annua*: παράγει αρτεμισίνη, ένα αποτελεσματικό τριτερπένιο για την καταπολέμηση της ελονοσίας

*Artemisia annua*

Artemisinin



Οι απαιτήσεις για αρτεμισίνη ξεπερνούν την παραγωγή

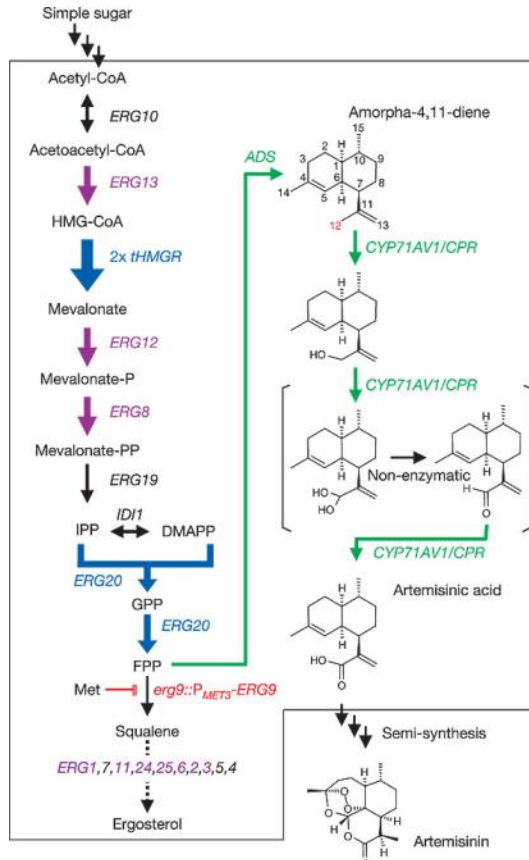
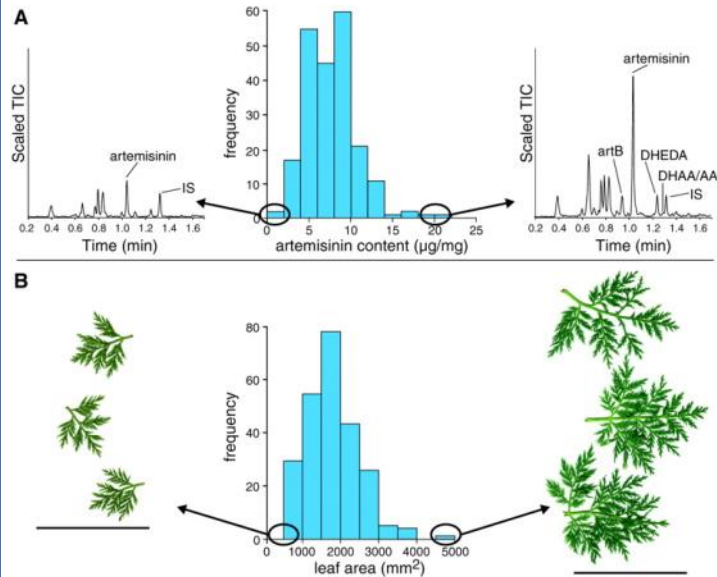


\*One tonne gives about two million doses of artemisinin-based combination therapy.

# Διάφορες προσεγγίσεις για την αύξηση της παραγωγής αρτεμισίνης



## Γενετική Βελτίωση



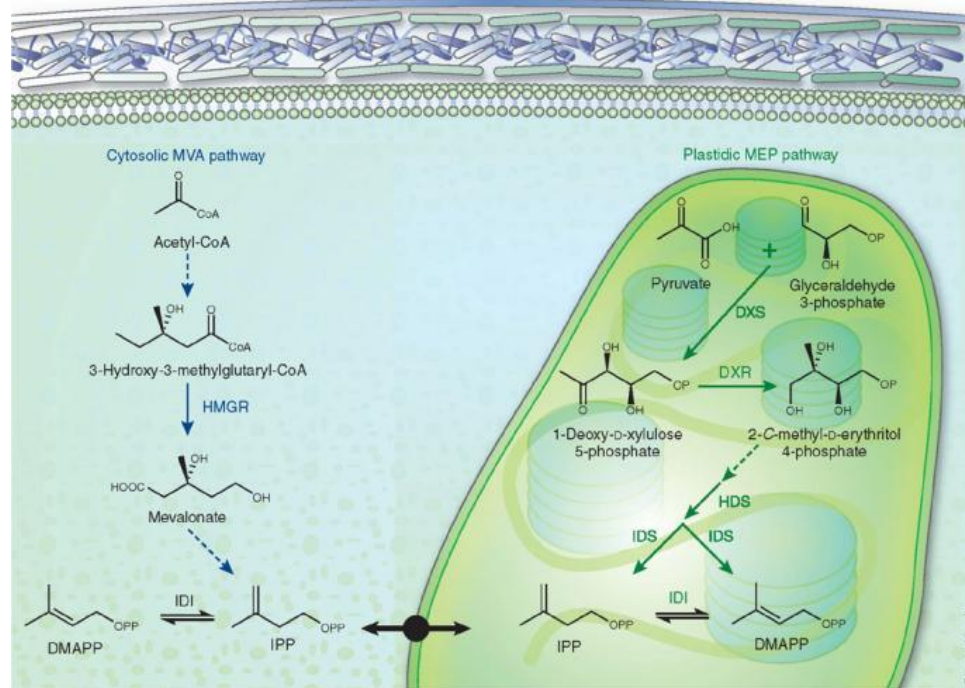
Ημισυνθετική παραγωγή: Έκφραση των φυτικών γονιδίων σε γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ζύμης

Reprinted from Graham, I.A., et al. and Bowles, D. (2010). The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. Science. 327: 328-331 with permission from AAAS; Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd from Ro, D.-Ket al and Keasling, J.D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature. 440: 940-943; see also Westfall, P.J. et al. and Paddon, C.J. (2012). Production of amorphaadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. Proc. Natl. Acad. Sci. 109: E111-E118. Covello, P.S. (2008). Making artemisinin. Phytochemistry. 69: 2881-2885. Lévesque, F. and Seeberger, P.H. (2012). Continuous-Flow Synthesis of the Anti-Malaria Drug Artemisinin. Angewandte Chemie International Edition. 51: 1706-1709.



# Μεταβολική Μηχανική σε φυτά και καλλιέργειες φυτικών κυττάρων

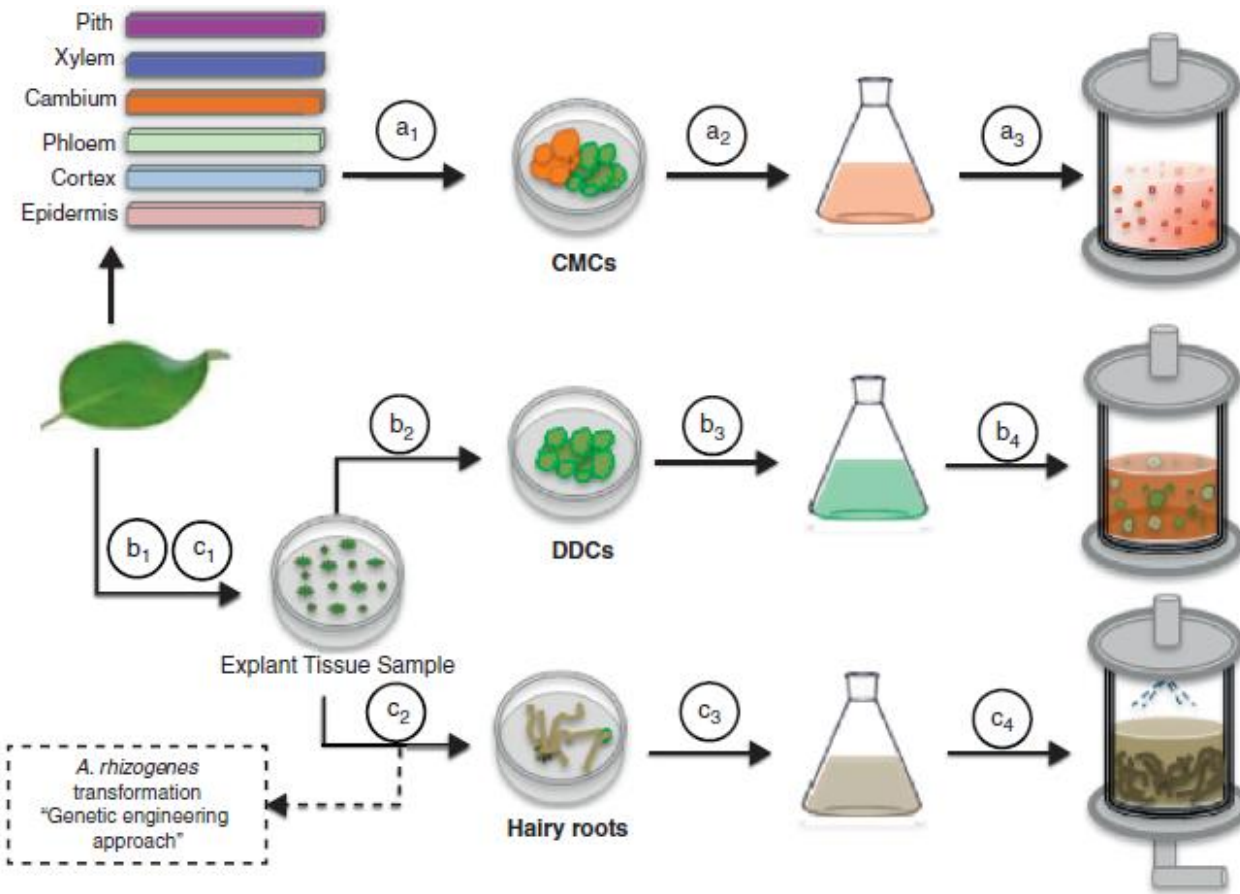
Τα ένζυμα που επηρεάζουν την παραγωγή φυσικών προϊόντων έχουν ενισχυθεί ή τροποποιηθεί σε φυτικά κύτταρα και σε ολόκληρα φυτά



Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd from Roberts, S.C. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.* 3: [387-395](#); Muñoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Ros, R. and Segura, J. (2006). Up-regulation of 1-oxo-d-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol.* 142: [890-900](#).



# Συστήματα καλλιέργειας φυτικών κυττάρων



Καλλιέργεια μεριστωματικών κυττάρων καμβίου

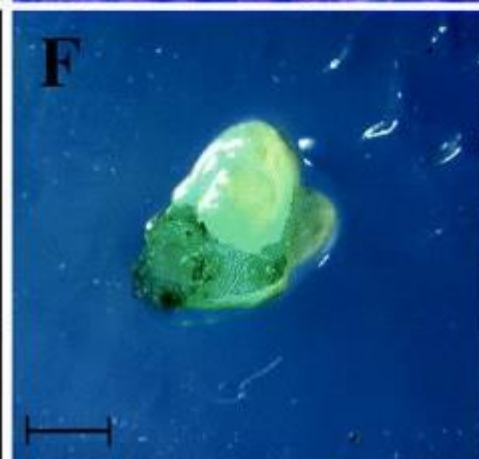
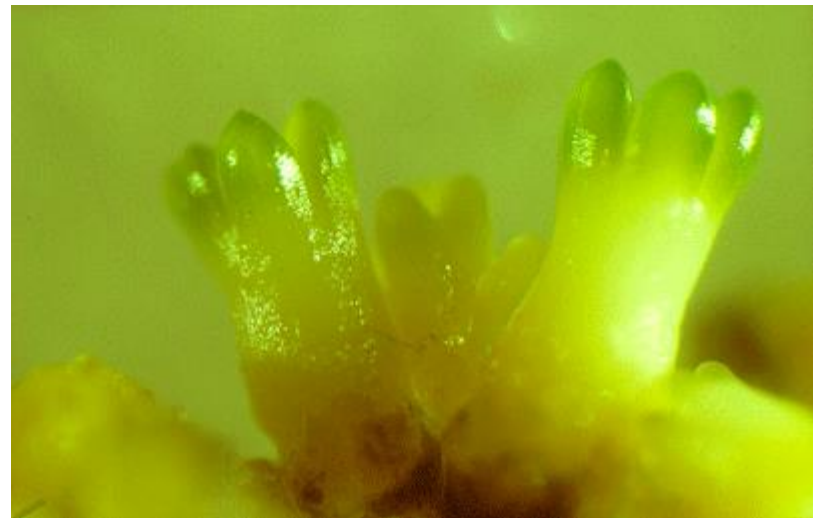
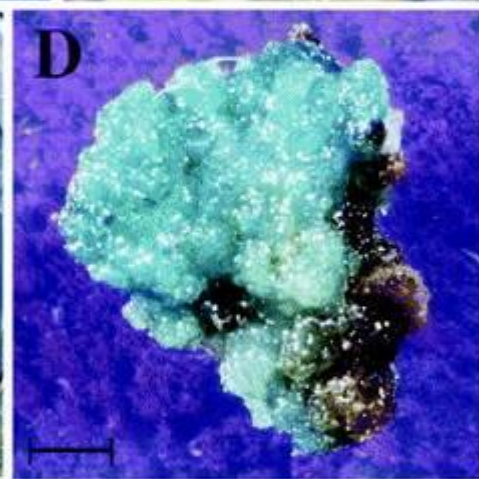
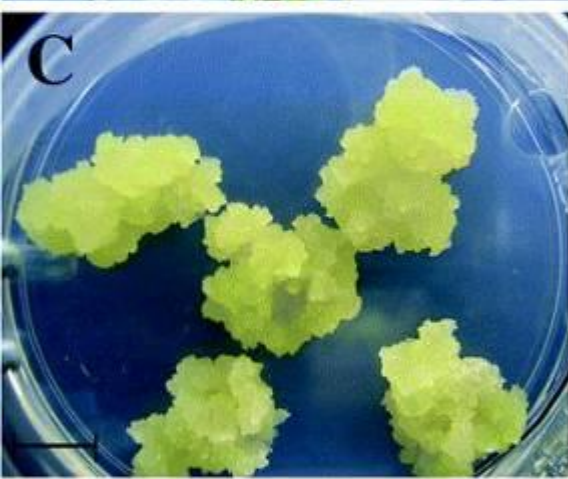
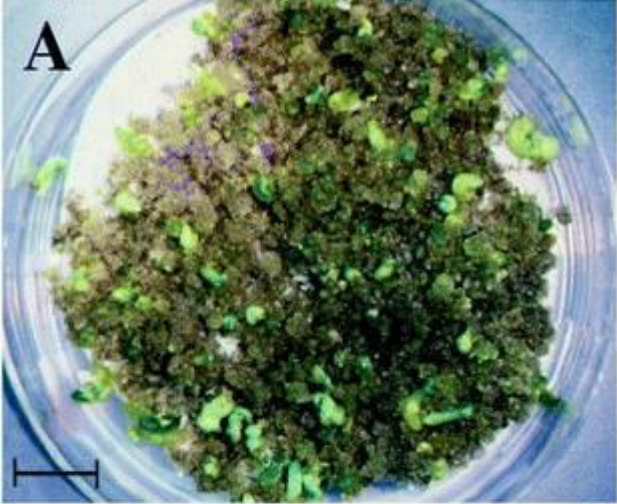
Καλλιέργεια μικτών κυττάρων

Καλλιέργεια ριζών

**Καλλιέργειες ριζών:** προέρχονται από έκφυτα ακροριζίου, σε σχετικά απλά θρεπτικά μέσα

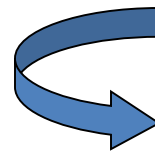
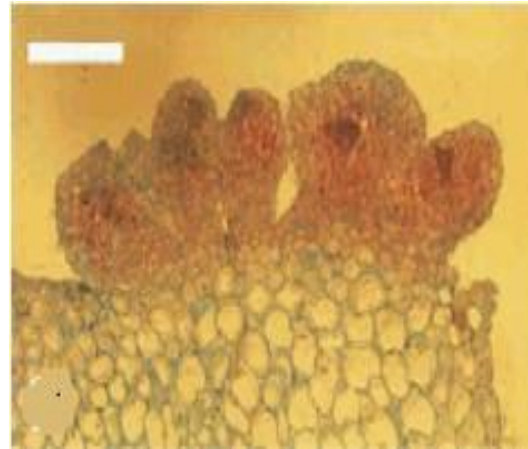
**Καλλιέργειες ακραίων βλαστικών μεριστωμάτων (οφθαλμών).** Η κορυφαία κυριαρχία μπορεί να ξεπεραστεί παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης κυτοκινίνης και να σχηματιστεί σύμπλεγμα από αναπτυσσόμενους βλαστούς  
- η κύρια μέθοδος μικροπολλαπλασιασμού/ κλωνικής παραγωγής φυτών *in vitro*





**Οργανογένεση: παραγωγή φυτικών οργάνων απευθείας από το έκφυτο ή από τον κάλλο. Εναλλακτικά επιγενείς οφθαλμοί, οι οποίοι αναπτύσσονται σε καλλιέργειες βλαστών και ακραίων ή μασχαλιαίων οφθαλμών, επίσης μπορούν να οδηγήσουν στην αναγέννηση ολόκληρων φυτών**

- Ρυθμίζεται από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου και κυρίως της αναλογίας αυξίνης: κυτοκινίνης

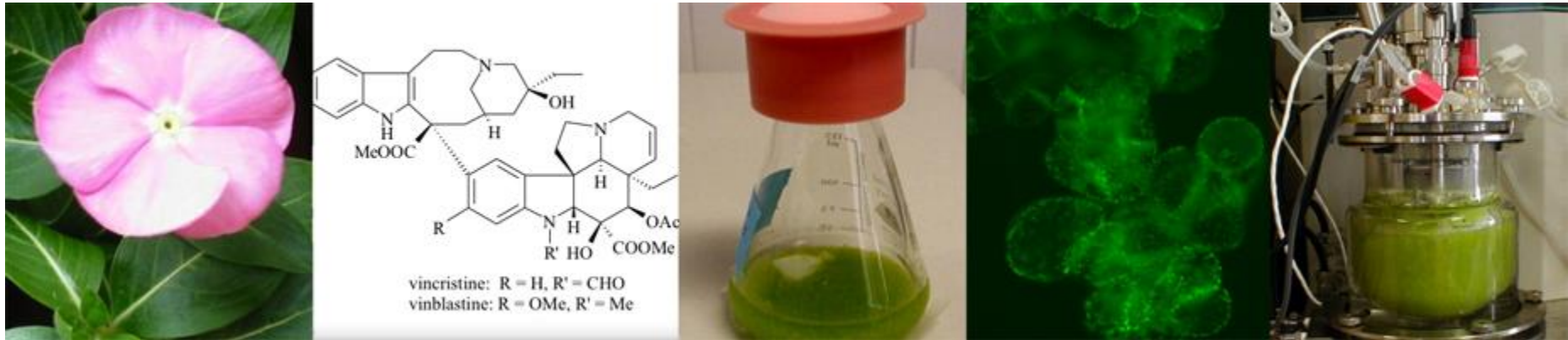


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας





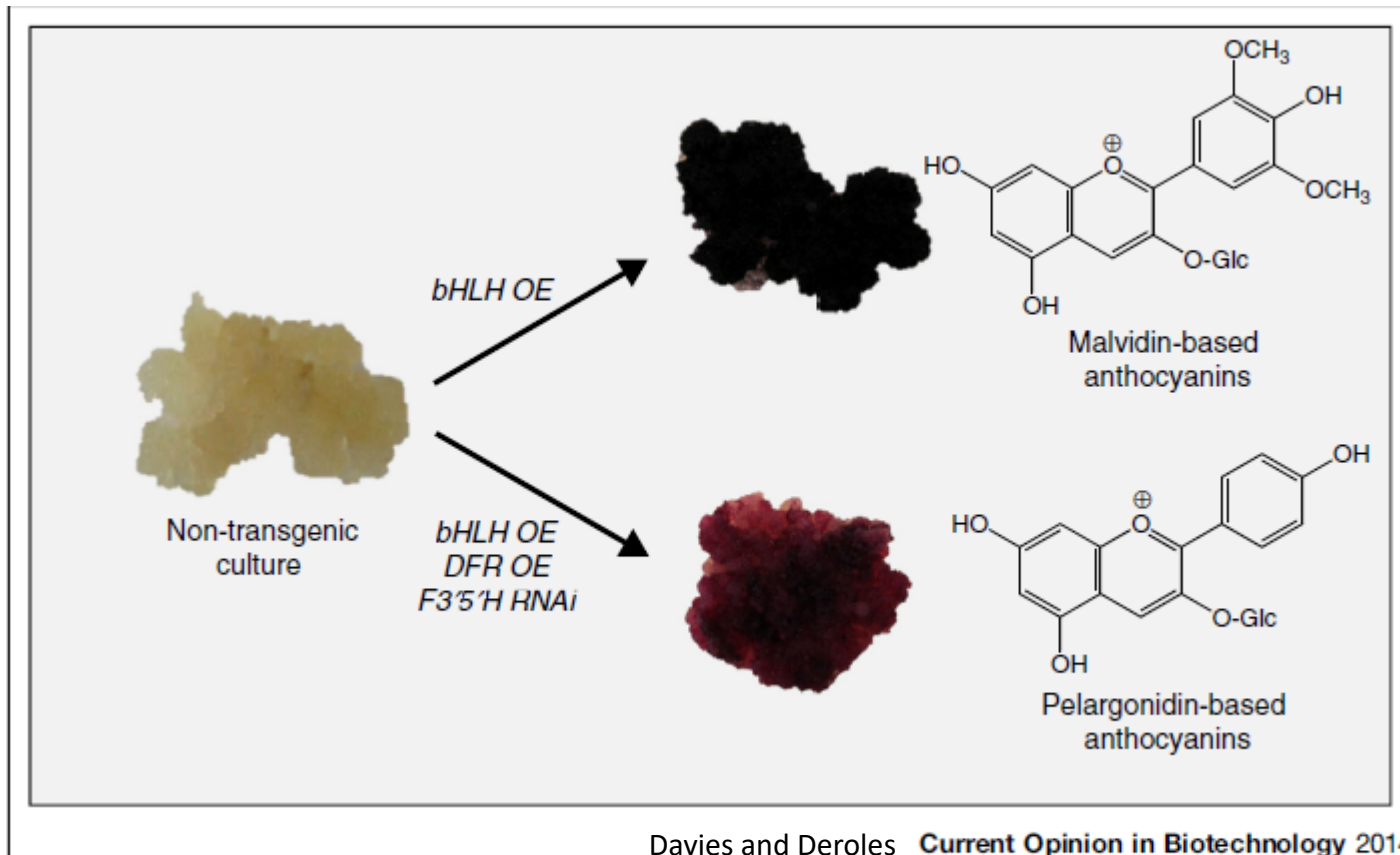
# παραγωγή των αντικαρκινικών ενώσεων βινκριστίνη και βινμπλαστίνη σε κύτταρα *Cantharanthus roseus*



Dr. Carolyn W. T. Lee-Parsons

Northeastern University

# παραγωγή ανθοκυανινών – φυσικών χρωστικών στην τεχνολογία τροφίμων σε καλλιέργειες κυττάρων

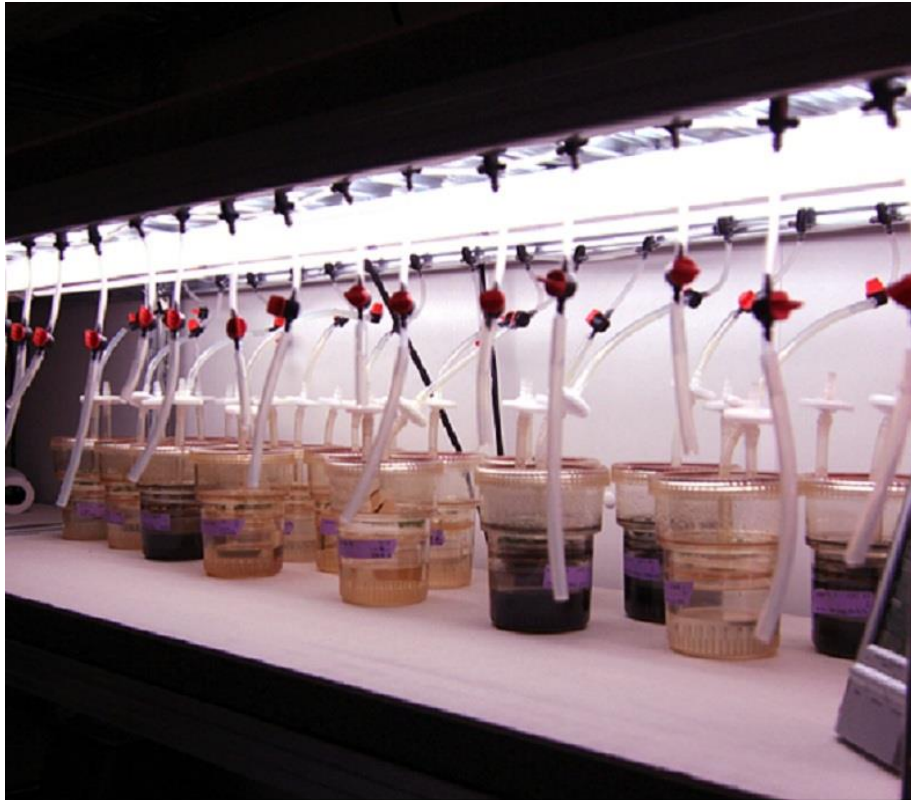


## Πλεονεκτήματα- Εφαρμογές της *in vitro* καλλιέργειας φυτών

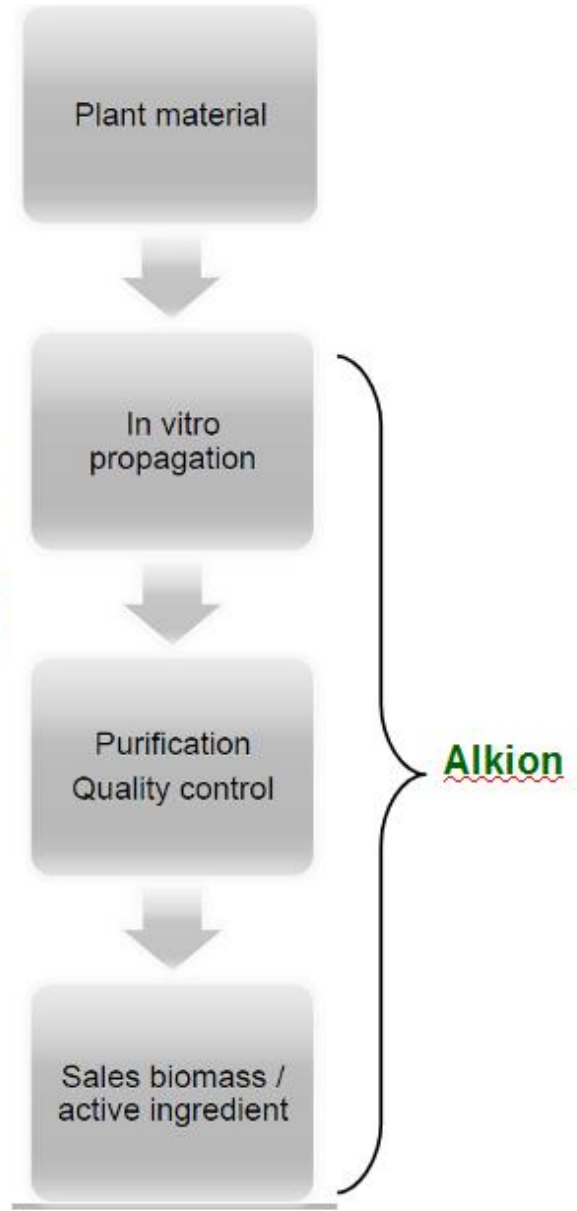
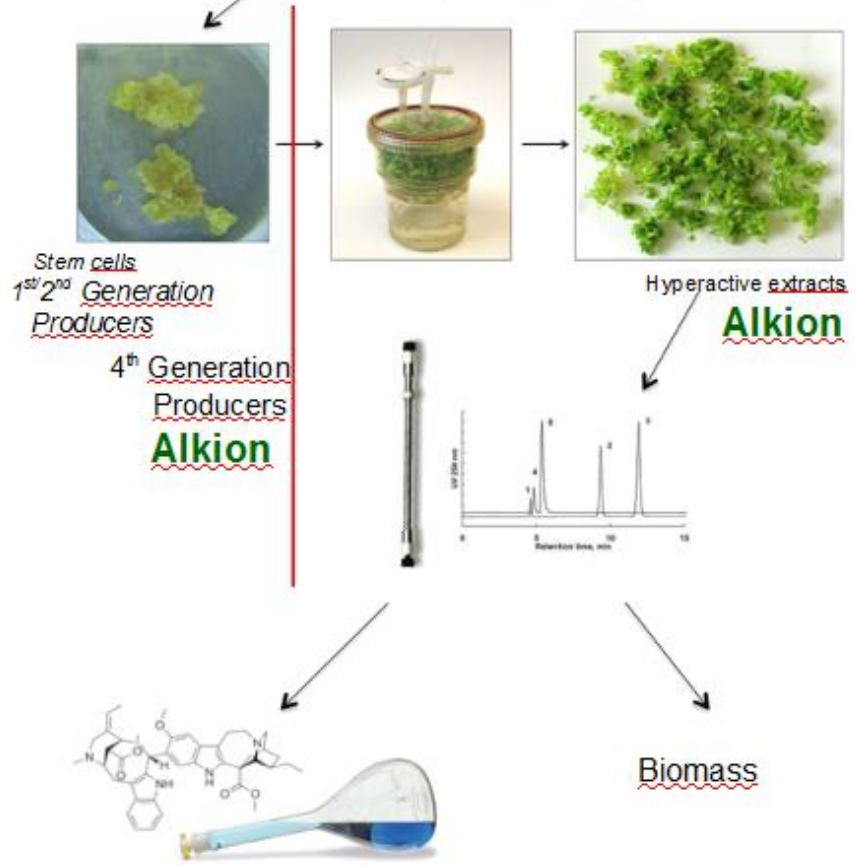
- Παραγωγή υγιών φυτών, απαλλαγμένων από ασθένειες
- Ταχύτατη παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών με ίδιο γενότυπο με μικροπολλαπλασιασμό
- Δημιουργία απλοειδών φυτών
- Διατήρηση γενετικού υλικού
- Παραγωγή φυτών των οποίων η ανάπτυξη είναι δύσκολη από σπόρο.
- Παραγωγή φυσικών προϊόντων από υγρές καλλιέργειες φυτικών κυττάρων
- Δημιουργία νέων υβριδίων από γενετικώς απομονωμένα είδη
- Επίτευξη ομοζυγωτίας σε προγράμματα βελτίωσης
- Αναγέννηση διαγονιδιακών φυτών

# Παραγωγή μεταβολιτών και φυτικής βιομάζας *in vitro*

<http://www.alkion-bioinnovations.com/>







# Νέες καλλιέργειες για παραγωγή καουτσουκ



*Taraxacum kok-saghyz*



*Parthenium argentatum*



Keygene Netherlands

# Στόχοι της βιοτεχνολογίας φυτών σήμερα “food, feed, fiber”



Φυτά για παραγωγή φαρμακευτικών και άλλων τεχνικών προϊόντων

Plant –made pharmaceuticals και plant-made industrial products

MP(I)P

# Διαγονιδιακά φυτά για παραγωγή προϊόντων (molecular farming/ μοριακή αγροκαλλιέργεια)

- ✓ Εμβόλια- Αντισώματα- άλλα Φαρμακευτικά προϊόντα
- ✓ Βιομηχανικά ένζυμα
- ✓ Βιοπλαστικά



# Πλεονεκτήματα

- ✓ Μεγάλη βιομάζα με μικρό κόστος επέκτασης παραγωγής
- ✓ Απουσία παθογόνων και μη επιθυμητών DNA αλληλουχιών
- ✓ Ορθή μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών (αναδίπλωση, αποθήκευση για σταθερότητα, γλυκοσυλίωση)
- ✓ Ο καθαρισμός δεν είναι απαραίτητος

# Θεραπεία υποκατάστασης ενζύμου

## Protalix Biotherapeutics <http://www.protalix.com/index.asp>



**Γλυκοσερεβροσιδάση για νόσο Gaucher**

**FDA 2012, Pfizer**

**ELELYSO™ (taliglucerase alfa):** <http://www.elelyso.com/how-elelyso-is-made>

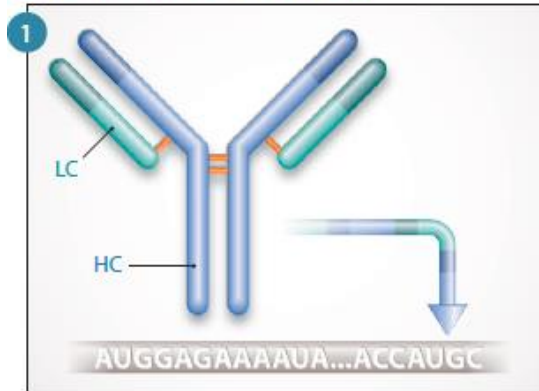
# Παραγωγή εμβολίων και αντισωμάτων σε φυτά

<http://www.medicago.com/English/Technologies/medicago-technologies/default.aspx>

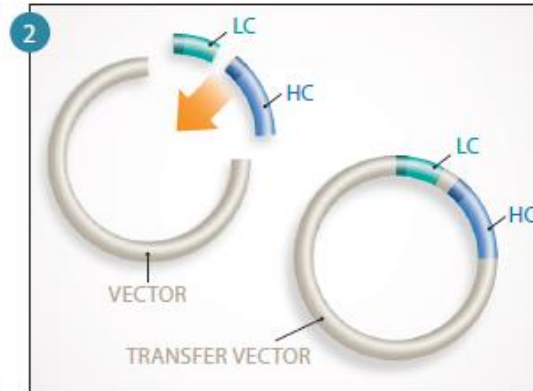
<http://www.kentuckybioprocessing.com/>

<http://www.plantformcorp.com/>

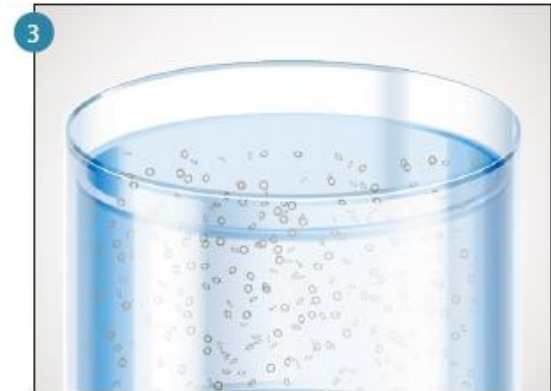
## GENETIC HANDLING



Medicago obtains the genetic sequence of the underlying light chain (LC) and heavy chain (HC) of each of the monoclonal antibodies.



Inserts the genes of the LC and HC into a transfer vector.



Transfer vector is multiplied into a growth solution.

## INSERTION OF TRANSFER VECTOR INTO PLANT LEAVES



*Nicotiana benthamiana* plants are plunged into the solution which contains the multiplied transfer vectors.



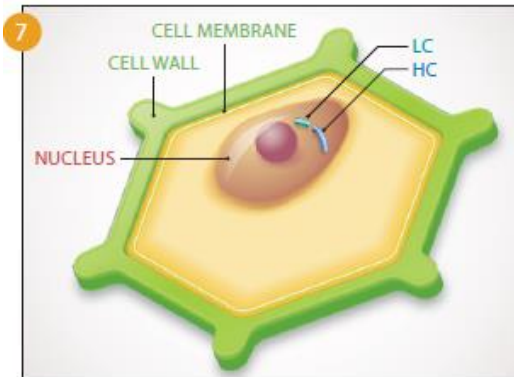
A vacuum infiltration system is applied and released to force entry of transfer vectors into the leaves.



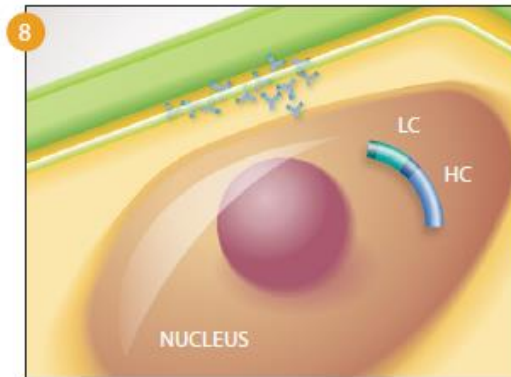
The plants are placed into incubation for about a week to promote antibody production.



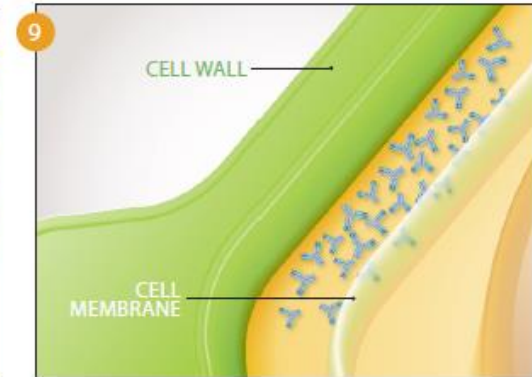
## EXPRESSION OF GENES AND PRODUCTION OF ANTIBODIES



LC and HC genes migrate to the nuclei of the plant cells.

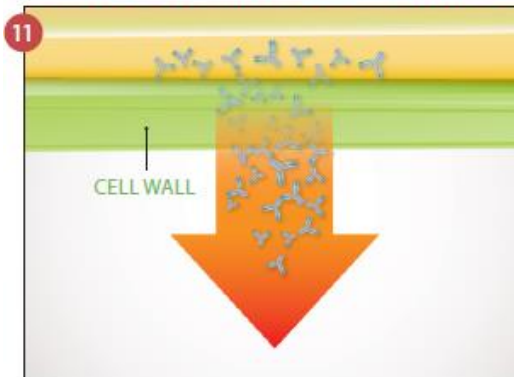


LC and HC proteins are produced. The plant cell machinery further assembles the LC and HC into full antibodies.



The antibodies accumulate and remain soluble between the membrane and the cell wall.

## DOWNSTREAM PROCESSING AND FINAL PRODUCT



Antibodies are released by enzymatic degradation of the cell wall.



An extraction process yields pure product.

# Παθητική ανοσοποίηση ενάντια στον ιό Ebola

<http://mappbio.com/>

<http://www.kentuckybioprocessing.com/>

FORBES [Pharma & Healthcare](#)

AUG 5, 2014 @ 08:41 AM

## Ebola 'Secret Serum': Small Biopharma, The Army, And Big Tobacco

ZMapp is manufactured in the tobacco plant [Nicotiana benthamiana](#) in the [bioproduction](#) process known as "[pharming](#)" by Kentucky BioProcessing, a subsidiary of [Reynolds American](#).<sup>[7][8][9]</sup>

# Βιομηχανικά Ένζυμα

Avidin/  $\beta$ -glucuronidase

trypsin

κυτταρινάσες

ξυλανάσες

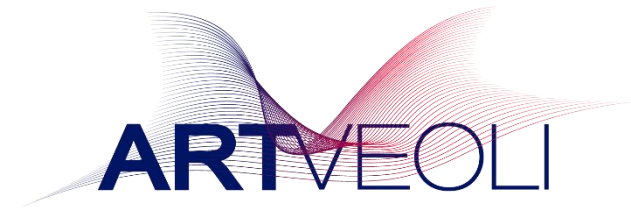
υπεροξειδάση της λιγνίνης

$\alpha$ -αμυλάση

$\beta$ -γλουκανάση

φυτάση

Artveoli combines algae and microfluidics to generate fresh air indoors



## MICROFLUIDIC HIGH DENSITY PHOTOBIOREACTOR





# ΓΤΟ: Γιατί αυτή η Αμφισβήτηση;

Η γενετική μηχανική είναι μια δυναμική νέα τεχνολογία που είναι γενικώς ελάχιστα κατανοητή και της οποίας οι μακροχρόνιες επιπτώσεις είναι άγνωστες ή απροσδιόριστες

Οι ΓΤΟ είναι ένας νεωτερισμός που επηρεάζει όλες τις πτυχές της παγκόσμιας αγροτικής οικονομίας

Production



Processing



Commodity Handling



Consumer Products



# Κίνδυνοι εξαιτίας των Γ.Τ.Ο.

- **Ασφάλεια:**

- **Δυνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία:**

**Αλλεργίες, δημιουργία ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και άλλες άγνωστες συνέπειες**

- **Δυνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον:** Κατά

**λάθος μεταφορά γονιδίων μέσω**

**αναπαραγωγής, άγνωστες συνέπειες σε**

**άλλους οργανισμούς(πχ βακτήρια εδάφους)**

- **Περιορισμός της βιοποικιλότητας**

# Κίνδυνοι εξαιτίας των Γ.Τ.Ο.

- **Πρόσβαση και Πνευματική Περιουσία:**
  - Κυριαρχία στην παγκόσμια παραγωγή τροφίμων λίγων εταιρειών
  - Αυξανόμενος βαθμός εξάρτησης των αναπτυσσόμενων χωρών από τις βιομηχανοποιημένες χώρες
  - Βιοπειρατεία-εκμετάλλευση φυσικών πόρων των αναπτυσσόμενων χωρών από της ανεπτυγμένες

# Κίνδυνοι εξαιτίας των Γ.Τ.Ο.

- **Ηθικοί:**

- Παραβίαση των ορίων των φυσικών οργανισμών
- Μεταβολή των φυσικών διαδικασιών μέσω ανάμιξης γονιδίων μεταξύ των ειδών
- Αντιρρήσεις στην κατανάλωση ζωικών γονιδίων μέσω φυτικών οργανισμών και αντίστροφα



# Κίνδυνοι εξαιτίας των Γ.Τ.Ο.

- **Δυσκολίες στην πληροφόρηση του καταναλωτή:**
  - Δεν έχει θεσπιστεί επαρκές νομοθετικό πλαίσιο σε μερικές χώρες (π.χ. ΗΠΑ)
  - Ανάμιξη Γ.Τ. καλλιεργειών με παραδοσιακές δυσκολεύει τις προσπάθειες ετικετοποίησης και σήμανσης

# Κίνδυνοι εξαιτίας των Γ.Τ.Ο.

- **Κοινωνικοί:**

- Η πρόοδος μπορεί να στραφεί προς όφελος των ανεπτυγμένων χωρών και σε βάρος των υπό ανάπτυξη

# ΓΤΟ: Τρία Μείζονα Ζητήματα

- Τροφική ασφάλεια και περιβαλλοντικές συνέπειες
- Διεθνές εμπόριο
- Αυξανόμενος έλεγχος της γεωργίας από λίγες πολυεθνικές

# GENETICALLY ENGINEERED CROPS

EXPERIENCES AND  
PROSPECTS



*The National Academies of*  
SCIENCES • ENGINEERING • MEDICINE

Committee on Genetically Engineered Crops:  
Past Experience and Future Prospects; [Board  
on Agriculture and Natural Resources](#); [Division  
on Earth and Life Studies](#); National Academies  
of Sciences, Engineering, and Medicine



[http://www.nytimes.com/2016/05/18/business/genetically-engineered-crops-are-safe-analysis-finds.html?\\_r=0](http://www.nytimes.com/2016/05/18/business/genetically-engineered-crops-are-safe-analysis-finds.html?_r=0)

# ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

- Με PCR, με εκκινητές εξειδικευμένους
  - για τα γονίδια προς ένθεση
  - για τα συνοριακά
  - για περιοχές δίπλα στα συνοριακά (για εξακρίβωση ενσωμάτωσης DNA του φορέα)
  - Ανάστροφη PCR (IPCR)
  
- Με Southern ανάλυση για την αναγνώριση μοναδιαίου αντίγραφου του ένθετου γονιδίου στο φυτικό γονιδίωμα
  
- FISH

# T-DNA fingerprinting

A. DNA isolation



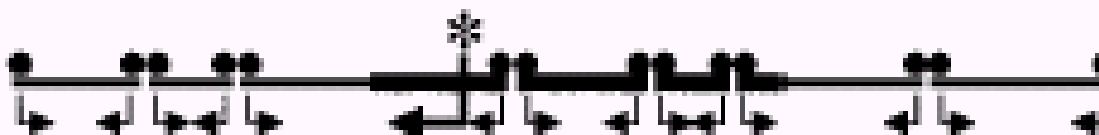
B. Tetracutter digestion



C. Adaptor ligation



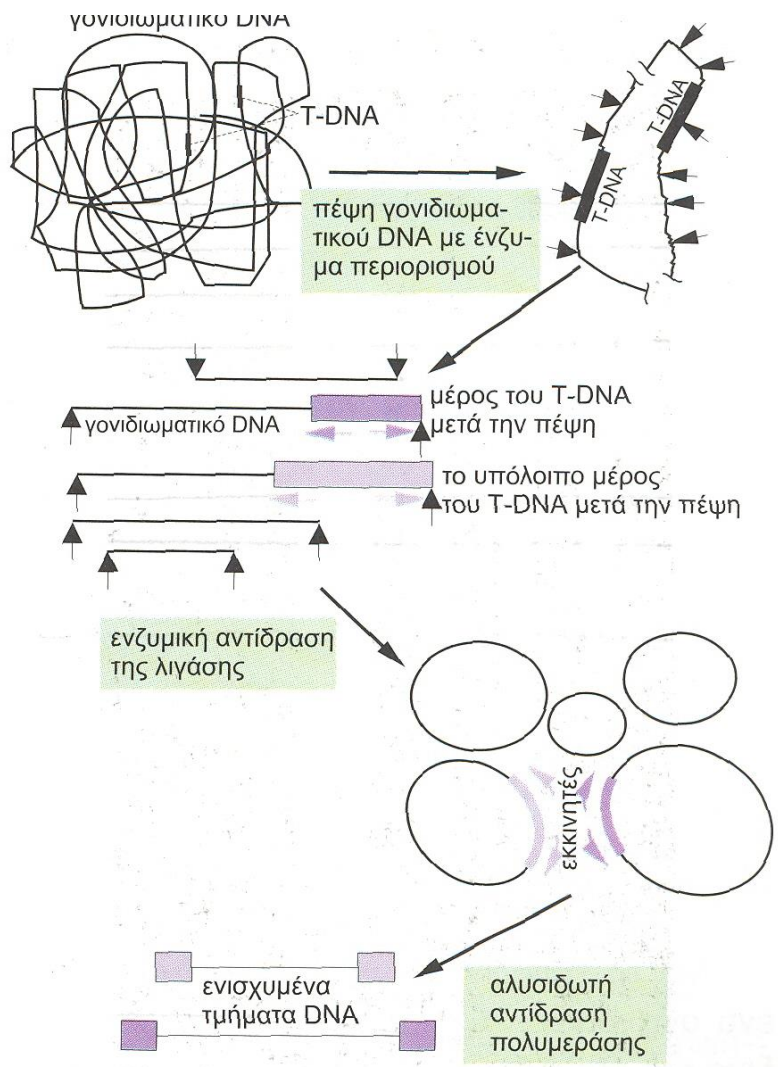
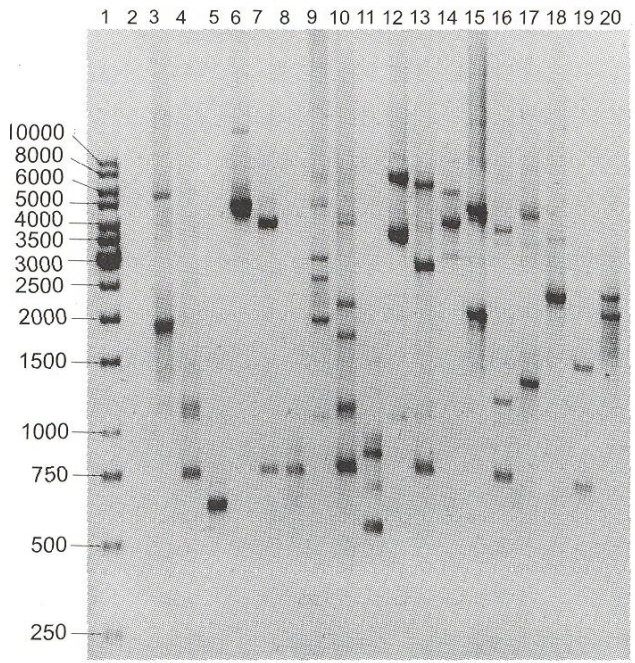
D. Anchored PCR



E. Detection



# I-PCR





# Ιχνηλασιμότητα των ΓΤΟ



# Γιατί ο έλεγχος για ΓΤΟ;

- **Νομοθεσία**

- ΗΠΑ: Σήμανση τροφών “GM-Free” <5% ΓΤ
- ΕΕ: Σήμανση τροφών “ΓΤ” εάν >1% ΓΤ
- Ιαπωνία: Σήμανση τροφών “ΓΤ” εάν >5%

- **Εξαγωγές**

- **Τι συμβαίνει με τις μη σημασμένες τροφές;**

# Πως ελέγχουμε για ΓΤΟ

## ELISA:

Έλεγχος παρουσίας πρωτεϊνών που εκφράζονται από τη γενετική τροποποίηση

Υπέρ: Γρήγορο, φθινό, χαμηλής τεχνολογίας

Κατά: Εξειδίκευση για κάθε φυτό, σταθερότητα πρωτεΐνης

## PCR:

Έλεγχος για παρουσία εισαγόμενου ξένου DNA

Υπέρ: Ταυτοποιεί διαφορετικά ΓΤ φυτά, σταθερότητα DNA

Κατά: Ακριβό, χρονοβόρο



# Ποιες τροφές δίνουν αξιόπιστο φυτικό DNA;

Very Reliable	Reliable	Less Reliable	Very Difficult / Not Possible
Fresh corn	Veggie sausages	Veggie burgers	Oil
Fresh papaya	Tortilla chips	Fried corn snacks	Salad dressing
Corn bread mix	Flavored tortilla chips	Popcorn	Cereal (eg cornflakes)
Corn meal	Puffed corn snacks	Fries	Wheat flour
Soy flour	Meatballs and burgers containing soy protein	Potato chips	
	Soy-based protein drinks/powders		



# Πως ελέγχουμε για ΓΤΟ

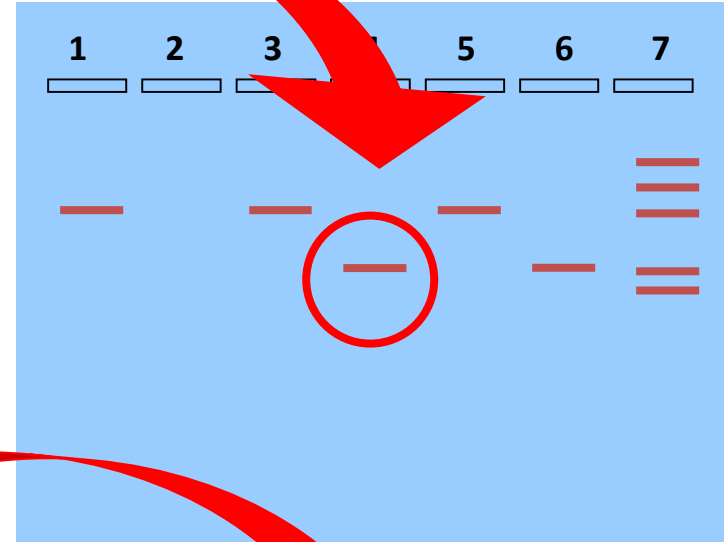
**Έλεγχος για ΓΤΟ με PCR:**

- 1. Άλεσμα τροφής**
- 2. Εξαγωγή DNA από το δείγμα**
- 3. Έλεγχος δείγματος DNA για αξιόπιστο φυτικό DNA**
- 4. Έλεγχος δείγματος DNA για γενετικές τροποποιήσεις**



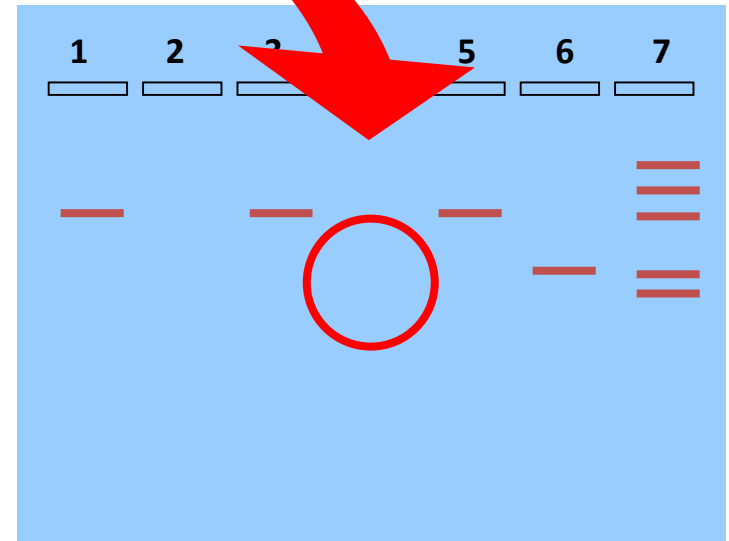
# Ανάλυση αποτελεσμάτων

**ΓΤΟ  
Θετικό**



- 1: non-GMO food with plant primers
- 2: non-GMO food with GMO primers
- 3: Test food with plant primers
- 4: Test food with GMO primers
- 5: GMO positive template with plant primers
- 6: GMO positive template with GMO primers
- 7: PCR MW Ruler

**ΓΤΟ  
αρνητικό**





<http://engl.jrc.ec.europa.eu/>



<http://bgmo.jrc.ec.europa.eu/home/default.aspx>

<http://bgmo.jrc.ec.europa.eu/home/ict/methodsdatabase.htm>



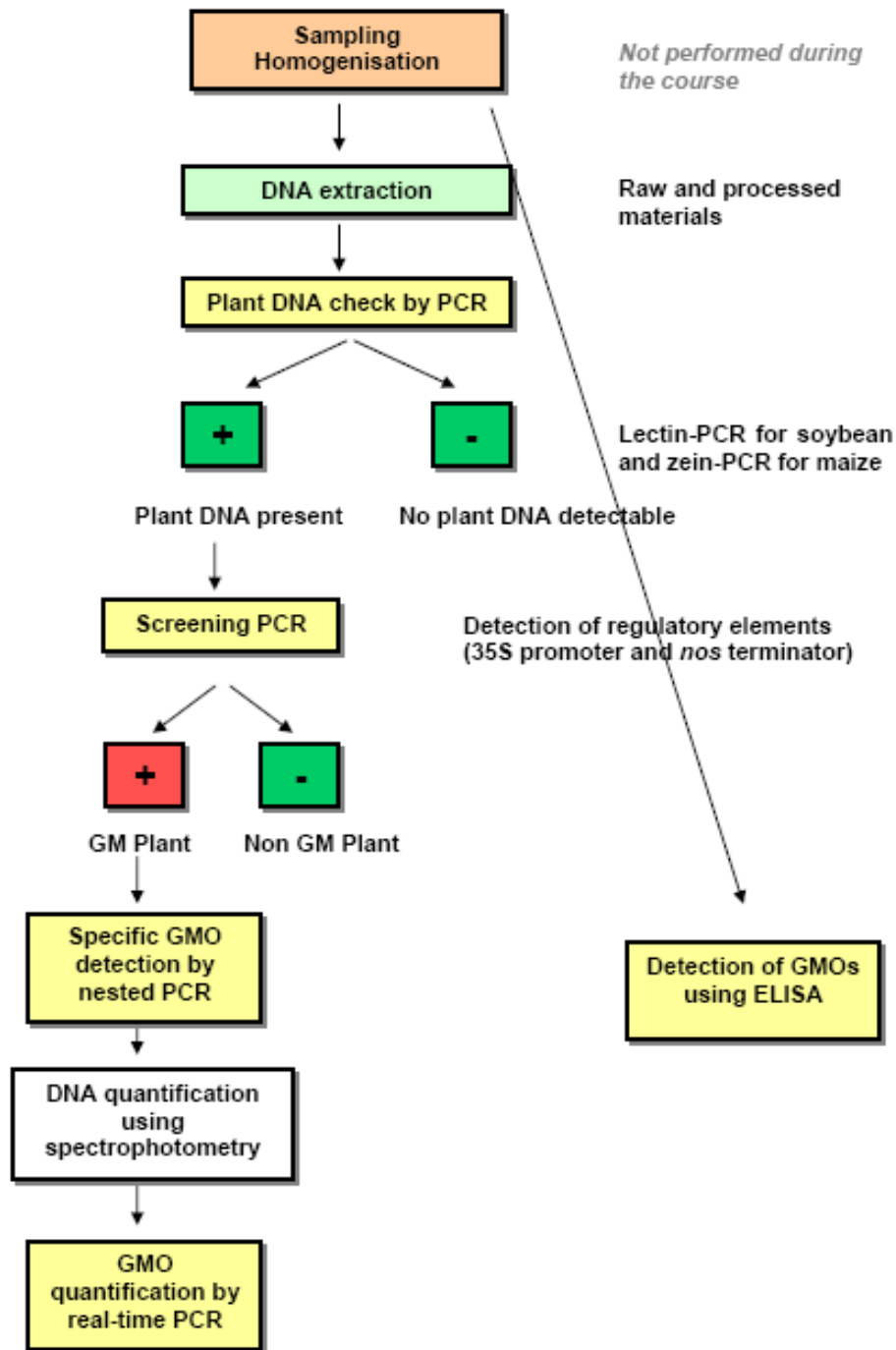
<http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/default.aspx>



<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>

Statistics and Sampling





**(2004/787/ΕΚ)**

**ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

**της 4ης Οκτωβρίου 2004**

**σχετικά με τεχνικές κατευθυντήριες γραμμές για τη δειγματοληψία και την ανίχνευση γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών και υλικών παραγόμενων από γενετικώς τροποποιημένους οργανισμούς ως προϊόντων ή συστατικών προϊόντων στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1830/2003**

- **ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ**

1. *Δειγματοληψία παρτίδων σπόρων προς σπορά και άλλου πολλαπλασιαστικού υλικού φυτών*
2. *Δειγματοληψία γεωργικών προϊόντων χύμα*
3. *Πρωτόκολλο για την παρασκευή αναλυτικών δειγμάτων*
4. *Πρωτόκολλο για την εκτίμηση της αβεβαιότητας*
5. *Πρωτόκολλο δειγματοληψίας παρτίδων τροφίμων και ζωοτροφών .*

Μέγεθος παρτίδας σε τόνους	Μέγεθος του συνολικού δείγματος σε kg	Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων
≤ 50	5	10
100	10	20
250	25	50
≥ 500	50	100

## • **ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ / ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΟΚΙΜΩΝ**

### **Εργαστηριακές απαιτήσεις**

Τα εθνικά εργαστήρια των κρατών μελών που εκτελούν τις αναλύσεις σύμφωνα με την παρούσα σύσταση πρέπει να έχουν διαπιστευτεί σύμφωνα με το πρότυπο EN ISO/IEC 17025/1999 ή να έχουν πιστοποιηθεί σύμφωνα με ένα κατάλληλο σύστημα, και πρέπει να συμμετέχουν τακτικά σε προγράμματα ελέγχου της επάρκειας τα οποία να διοργανώνονται ή να συντονίζονται από εργαστήρια αναγνωρισμένα σε εθνικό ή διεθνές επίπεδο ή/και από εθνικούς ή διεθνείς οργανισμούς.

### **Παρασκευή των αναλυτικών δειγμάτων**

Κατά τη δειγματοληψία, καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να λαμβάνονται αντιπροσωπευτικά και ομοιογενή εργαστηριακά δείγματα χωρίς δευτερογενή μόλυνση. Τα κράτη μέλη οφείλουν να χρησιμοποιούν τα σχέδια ευρωπαϊκών προτύπων prEN ISO 24276:2002 και prEN ISO 21571:2002 τα οποία υποδεικνύουν στρατηγικές για την ομοιογενοποίηση του εργαστηριακού δείγματος, τη μείωση του εργαστηριακού δείγματος σε δοκίμιο, την προετοιμασία του δοκιμίου και την παραλαβή της ουσίας προς ανάλυση.

Τα δείγματα σπόρων πρέπει να λαμβάνονται σύμφωνα προς τους διεθνείς κανόνες της ISTA για τις δοκιμασίες σπόρων προς σπορά. Τα δείγματα πολλαπλασιαστικού υλικού φυτών πρέπει να λαμβάνονται σύμφωνα προς τις διεθνώς εφαρμοζόμενες μεθόδους, εφόσον υφίστανται.

L 348/24 EL Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 24.11.2004

Μπορεί να ενδείκνυται να εφαρμοστεί πρώτα μέθοδος μαζικού ελέγχου για να διαπιστωθεί η παρουσία ή η απουσία ΓΤΟ. Εάν το αποτέλεσμα είναι θετικό, πρέπει να εφαρμόζονται ειδικές μέθοδοι για ένα γενετικό παρασκεύασμα ή/και μετασχηματισμό. Εάν στην αγορά κυκλοφορούν διαφορετικοί ΓΤΟ που περιέχουν το ίδιο γενετικό παρασκεύασμα, συνιστάται ανεπιφύλακτα η εφαρμογή μεθόδου ειδικής για συγκεκριμένο συμβάν. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης πρέπει να εκφράζονται ως εκατοστιαία αναλογία του αριθμού αντιγράφων του ΓΤ DNA προς τον αριθμό αντιγράφων του DNA της ταξινομικής ομάδας στόχου, υπολογιζόμενη με βάση απλοειδή γονιδιώματα. Όπου είναι δυνατόν, τα εργαστήρια χρησιμοποιούν μέθοδο η οποία να έχει επικυρωθεί σύμφωνα προς διεθνώς αναγνωρισμένα κριτήρια (π.χ. ISO 5725/1994 ή εναρμονισμένο πρωτόκολλο IUPAC), και να περιλαμβάνει τη χρήση πιστοποιημένου υλικού αναφοράς.

### **Έκφραση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων των αναλύσεων**

Στην περίπτωση των ποιοτικών μεθόδων, το όριο ανίχνευσης (LOD) είναι το κατώτερο επίπεδο της εξεταζόμενης ουσίας το οποίο είναι δυνατόν να ανιχνευθεί με αξιόπιστο τρόπο, με δεδομένο έναν γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδιώματος της ταξινομικής βαθμίδας στόχου.

Στην περίπτωση των ποσοτικών μεθόδων, το όριο ποσοτικής ανίχνευσης (LOQ) είναι το κατώτερο επίπεδο της εξεταζόμενης ουσίας το οποίο είναι δυνατόν να ανιχνευθεί ποσοτικά με αξιόπιστο τρόπο, με δεδομένο έναν γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδιώματος της ταξινομικής βαθμίδας στόχου.

**Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης πρέπει να εκφράζονται ως αριθμός αντιγράφων του ΓΤ DNA προς τον αριθμό αντιγράφων του DNA της ταξινομικής ομάδας στόχου, υπολογιζόμενη με βάση απλοειδή γονιδιώματα.**

Εάν η περιεκτικότητα της ΓΤ αλληλουχίας στόχου είναι κατώτερη του ορίου ποσοτικής ανίχνευσης (LOQ), τα αποτελέσματα πρέπει να εκφράζονται μόνο ποιοτικά.



**Table 3.** Comparison of genome size of some plant species and corresponding genome copies in defined amount of DNA

Sample	Genome size	Genome copies in 1 $\mu$ g DNA	Genome copies in 1 ng DNA
Maize	$5 \times 10^9$ bp	$1.85 \times 10^5$	185
Soybean	$1.55 \times 10^9$ bp	$5.98 \times 10^5$	598
Tobacco	$3.8 \times 10^9$ bp	$2.43 \times 10^5$	245
Rice	$4 \times 10^8$ bp	$2.31 \times 10^6$	2310

For example, in a 4 kb plasmid, containing a 1 kb insert, 25% of the input DNA is the target of interest. Conversely, a 1 kb gene in the maize genome ( $5 \times 10^9$  bp) represents approximately 0.00002% of the input DNA. Approximately 1,000,000-fold more maize genomic DNA is required to maintain the same number of target copies per reaction. For optimised results,  $> 10^4$  copies of the target sequence should be used as a starting template to obtain a signal in 25 - 30 cycles.

# Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing

- Using validated methods of analysis
  - Using internal quality control procedures
  - Participating in proficiency testing schemes
  - Becoming accredited to an International Standard, normally ISO/IEC 17025
- 
- Applicability
  - Practicability
  - DNA extraction and Purification (concentration, fragmentation state, purity eg  $\Delta Ct$ , measured  $Ct$ - extrapolated  $Ct$  of the first diluted sample  $<0.5$  and slope of inhibition curve between  $-3.6$  and  $-3.1$ )
  - Specificity
  - Dynamic Range
  - Trueness
  - Amplification Efficiency
  - $R^2$  coefficient
  - Precision
  - Limit of Quantification
  - Limit of Detection
  - Robustness

*Παράδειγμα Maize-E32-verification report*

# Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing

- Using validated methods of analysis
- Using internal quality control procedures
- Participating in proficiency testing schemes
- Becoming accredited to an International Standard, normally ISO/EC 17025

- Applicability
- Practicability
- DNA extraction and Purification (concentration, fragmentation state, purity eg  $\Delta Ct$ , measured  $Ct$ - extrapolated  $Ct$  of the first diluted sample  $<0.5$  and slope of inhibition curve between  $-3.6$  and  $-3.1$ )
- Specificity
- Dynamic Range
- Trueness
- Amplification Efficiency
- $R^2$  coefficient
- Precision
- Limit of Quantification
- Limit of Detection
- Robustness

*Παράδειγμα Verification of the Performance of a Method for the Detection of DAS-59132-8 (Event 32) in Maize using Real-Time PCR*

# **Event-specific method for the quantitation of maize line TC1057**

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/TC1507-WEB-Protocol-Validation.pdf>