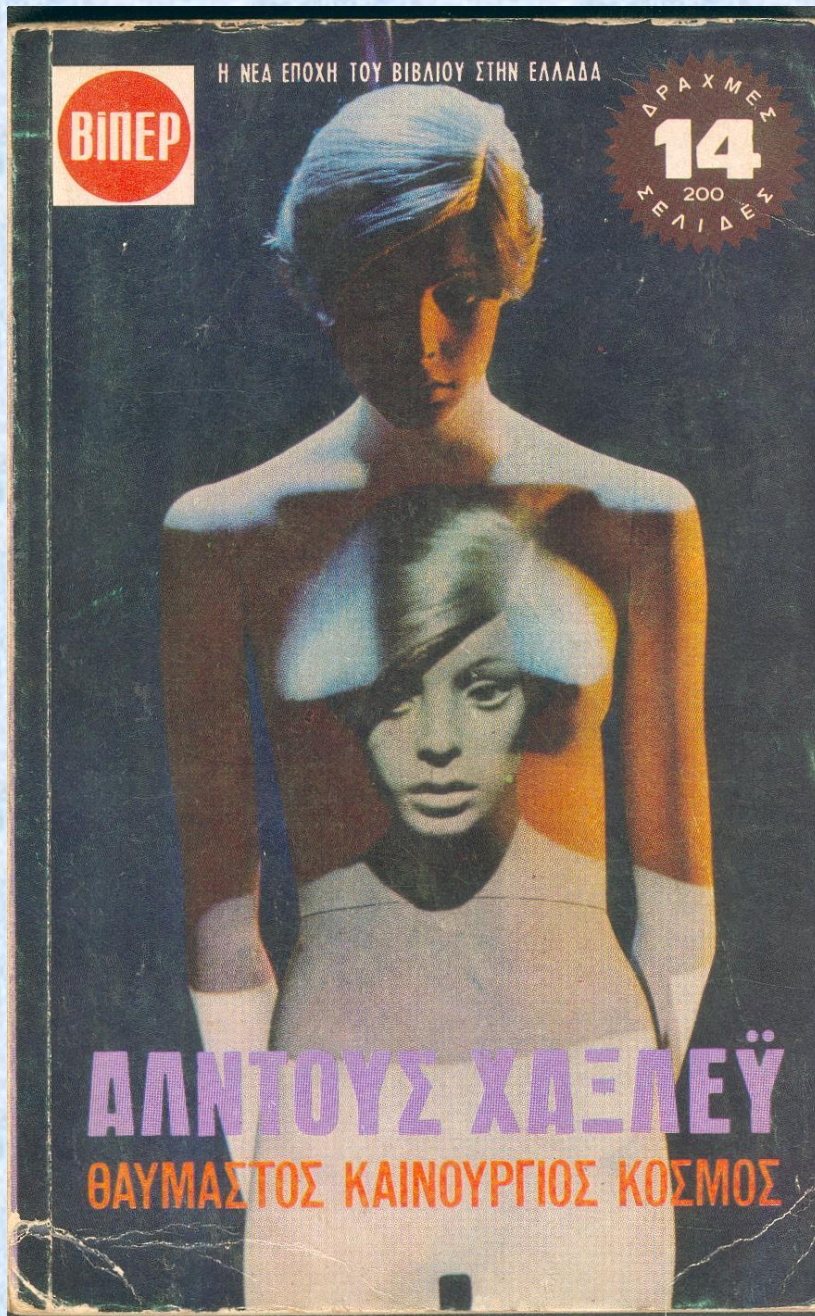


ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ



Αρχές της δεκαετίας του 1930 κυκλοφόρησε "Ο θαυμαστός καινούργιος κόσμος" του Aldus Haxley.

Ιωάννης Ν. Συνιάς. Βελτίωση Φυτών: Μοριακή Βελτίωση

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριάντα ετών η ραγδαία ανάπτυξη της Βιοτεχνολογίας έχει δώσει νέα διάσταση στη γεωργική παραγωγή και όχι μόνο. Επιτεύγματα που στο παρελθόν θα μπορούσαν να είναι σενάρια έργων επιστημονικής φαντασίας είναι σήμερα κοινές πρακτικές.

Ο θόρυβος όμως που έχει δημιουργηθεί όσον αφορά τις προσεγγίσεις που επιχειρεί η νέα αυτή βελτιωτική διαδικασία, επιβάλλει μια δεοντολογική προσέγγιση και αποσαφήνιση του ρόλου και των δυνατοτήτων της Βιοτεχνολογίας.

Δημιουργία νέας γενετικής παραλλακτικότητας με τη Μοριακή Γενετική Μηχανική

Η πρόοδος που έχει πραγματοποιηθεί κατά τα τελευταία χρόνια στη Γενετική Μηχανική έχει ανοίξει νέους δρόμους στη δημιουργία νέας γενετικής παραλλακτικότητας. Έτσι, τα εμπόδια της ασυμβατότητας που υπήρχαν μεταξύ των διαφόρων φυτικών ειδών όχι μόνο υπερκεράστηκαν, αλλά έγινε δυνατή η μεταφορά γονιδίων μεταξύ οργανισμών που ευρίσκονται πολύ μακριά ο ένας από τον άλλο στην κλίμακα της εξέλιξης.

Το τελευταίο πρακτικά σημαίνει ότι οποιοδήποτε γνώρισμα υπάρχει στη φύση (ανεξάρτητα αν ευρίσκεται σε φυτικό ή ζωικό οργανισμό) μπορεί να μεταφερθεί σε οποιοδήποτε φυτικό ή ζωικό οργανισμό.

Η εφαρμογή όμως της τεχνικής αυτής έχει χωρίσει την επιστημονική κοινότητα σε δύο στρατόπεδα:

- (α) σε αυτούς που θεωρούν ότι από τη στιγμή που υπάρχει κάποιο "χρήσιμο" γονίδιο σε ένα οργανισμό, αυτό μπορεί να μεταφερθεί σε οποιοδήποτε άλλο, ακόμα και αν η μεταφορά γίνει από ένα ζωικό σε ένα φυτικό οργανισμό, και**
- (β) σε αυτούς που θεωρούν ότι οι μεταφορές αυτές παραβιάζουν τη φύση και γι αυτό θα πρέπει να αποφεύγονται, γιατί πιθανόν να οδηγήσουν σε τερατουργήματα.**

Η πρώτη από αυτές τις δυο τάσεις κυρίως υποστηρίζεται από τις μεγάλες εταιρείες γεωργικών φαρμάκων, ενώ κύριοι εκφραστές της δευτέρης τάσης είναι οι διάφορες οικολογικές οργανώσεις.

Σύμφωνα με τον Τσαυτάρη οι στόχοι των γενετικών επεμβάσεων στα φυτά είναι οι ακόλουθοι:

- (α) αύξηση των αποδόσεων των φυτικών οργανισμών, χωρίς περαιτέρω αύξηση των εισροών ενέργειας,**
- (β) δημιουργία φυτών που να είναι ανθεκτικά στους βιοτικούς παράγοντες (ασθένειες, έντομα) με συνεπακόλουθη μείωση της χρήσης των φυτοφαρμάκων,**
- (γ) δημιουργία φυτών που να είναι ανθεκτικά στους αβιοτικούς παράγοντες (αλατούχα, όξινα εδάφη, ξηρασία, χαμηλές θερμοκρασίες κ. α.),**
- (δ) βελτίωση της ποιότητας των παραγομένων προϊόντων και της καταλληλότητάς τους για μεταποίηση, ώστε να αποφεύγεται η χημική κατεργασία κατά τη μεταποίησή τους από τη βιομηχανία,**
- (ε) παραγωγή νέων προϊόντων που θα αντικαταστήσουν άλλα που είναι λιγότερο υγιεινά**

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής των τεχνικών της Γενετικής Μηχανικής είναι πολλά και σπουδαία.

Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα της Γενετικής Μηχανικής που κυκλοφορούν στην αγορά είναι τα εμβρυακά προϊόντα, τα πρώτα δηλαδή προϊόντα που δημιουργήθηκαν με τις τεχνικές αυτές.

Πολλές από τις αδυναμίες που παρουσίασαν τα πρώτα γενετικά τροποποιημένα φυτά έχουν αντιμετωπισθεί, οπότε τα νέα, "νεοφανή" όπως ονομάστηκαν, προϊόντα της Γενετικής Μηχανικής αναμένεται να είναι κατά πολύ ασφαλέστερα από αυτά που κυκλοφορούν σήμερα.

Γενετικά τροποποιημένοι φυτικοί οργανισμοί οι οποίοι είχαν δοκιμασθεί στον αγρό έως τον Οκτώβριο του 1996 (Γκέκιου-Χατζούδη 1999).

Είδος	Γενετικά τροποποιημένα γνωρίσματα	Είδος	Γενετικά τροποποιημένα γνωρίσματα	Είδος	Γενετικά τροποποιημένα γνωρίσματα
Ακτινίδιο	Z	Αγγούρια	A	Σιτάρι	AZ,K
Καρότα	A,K	Κολοκύθια	A	Καλαμπόκι	E,A,Z,K
Παπάγια	A	Κούμαρα	E	Φράουλα	Z,K,A
Γαρύφαλλα	Z	Φιστίκια	A,Z	Μήλα	E,A
Κιχόριο	Z,K	Σόγια	A,Z,K	Δαμάσκηνα	A,K
Ηλιανθος	E,A,K	Μπιζέλια	Z,K	Τριαντάφυλλο	K
Μαρούλια	A,Z	Σκόρδο	Z	Σμέουρο	K
Γλυκοπατάτες	Z	Καρύδια	E,A	Γλυκό πιπέρι	A,K
Τεύτλα	A,Z	Κρεμμύδια	A	Ντομάτες	E,A,Z,K
Κράμβη	E,A,Z,K	Σπαράγγια	K	Μελιτζάνες	E,K
Μπρόκολα	E,A,Z	Βύνη	A,Z	Πατάτες	E,A,Z,K
Λάχανα	E	Ρύζι	E,A,Z,K	Σταφύλια	Z
Καρπούζι	A	Σακχαρ/ρο	E,Z		

όπου **E**: ανθεκτικότητα σε έντομα, **A**: σε ασθένειες, **Z**: σε ζιζανιοκτόνα και **K**: άλλα γνωρίσματα που περιλαμβάνουν ανθεκτικότητα σε καιρικές συνθήκες και στο κρύο.

Οι βιοχημικοί και οι μοριακοί δείκτες.

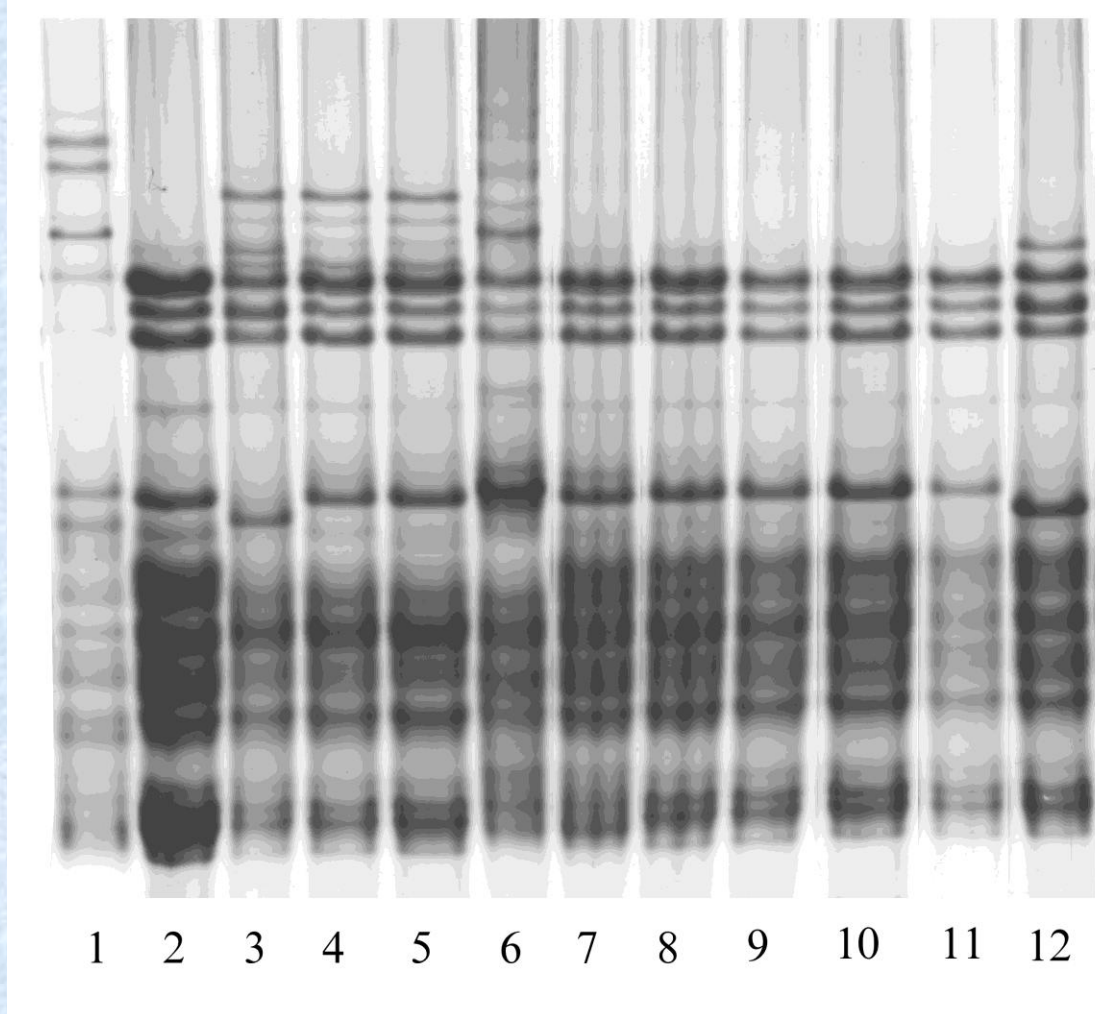
Βιοχημικοί δείκτες

Τα ισοένζυμα

Τα ισοένζυμα (isozymes ή isoenzymes) αποτελούν διαφορετικές παραλλαγές του ιδίου ενζύμου, έχουν ακριβώς τις ίδιες ή παρόμοιες λειτουργίες και είναι παρόντα στο ίδιο άτομο.

Οι αποθηκευτικές πρωτεΐνες

Η δεύτερη μεγάλη ομάδα βιοχημικών δεικτών είναι η πολυμορφική ομάδα των αποθηκευτικών πρωτεϊνών των σπόρων. Στο σιτάρι οι κύριες αποθηκευτικές πρωτεΐνες είναι οι γλιαδίνες και οι γλοβουλίνες.



Ηλεκτροφοροδόγραμμα των γλιαδινών (APAGE) των Ελληνικών ποικιλιών σιταρόβριζας: Βρυτώ (2), Θίσβη (3), Δάδα (4), Εκάτη (5), Λητώ (6), Διώνη (7), Νιόβη (8), Ερατώ (9), Βροντή (10), Φαίδρα (11) και Κυβέλη (12). Μάρτυρας η ποικιλία μαλακού σιταριού Bezostaya 1 (1).

Τα ισοένζυμα και οι αποθηκευτικές πρωτεΐνες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία:

- (α) σε μελέτες γενετικής πληθυσμών και ανάλυσης της γενετικής ποικιλότητας αγρίων ειδών σιτηρών,
- (β) στην ταυτοποίηση ποικιλιών καλλιεργούμενου σιταριού,
- (γ) στη βελτίωση της ποιότητας του σπόρου του σιταριού,
- (δ) στην αναγνώριση "ξένου" (alien) γενετικού υλικού στο γονιδίωμα του σιταριού,
- (ε) στον εντοπισμό γονιδίων ανθεκτικότητας στο σιτάρι, και
- (στ) σε μελέτες συσχέτισης των βιοχημικών δεικτών με τα γνωρίσματα της προσαρμοστικότητας και της παραγωγικότητας των φυτών.

Μοριακοί δείκτες

Ως μοριακοί δείκτες περιγράφονται τμήματα του DNA που προκύπτουν από την επεξεργασία του γενετικού υλικού με διάφορα ένζυμα.

Τα τμήματα αυτά εμφανίζονται ως διακριτές ζώνες σε ηλεκτοφορετική κατατομή.

Είναι φαινοτυπικά ουδέτεροι, ανεξάρτητοι από το περιβάλλον και ανιχνεύουν πολυμορφισμούς (διαφορές στις γενετικές πληροφορίες) μεταξύ των ατομικών φυτών. Οι δείκτες αυτοί έχουν αναπτυχθεί τόσο για ζωικά όσο και για φυτικά συστήματα.

Μια από τις πιο εκτεταμένες χρήσεις των μοριακών δεικτών ήταν η ανάπτυξη λεπτομερειακών χρωμοσωματικών χαρτών για πολλούς οργανισμούς, ανάμεσα στους οποίους ευρίσκεται ο άνθρωπος (από τους ζωικούς) και το μαλακό σιτάρι (από τους φυτικούς).

Αύξηση της αποτελεσματικότητας της παραδοσιακής βελτίωσης των φυτών: διεξάγοντας έμμεση επιλογή μέσω μοριακών δεικτών που είναι συνδεδεμένοι με τα γνωρίσματα που ενδιαφέρουν τη βελτίωση ενός είδους. Σε αυτό βοηθά ότι οι δείκτες αυτοί δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον και μπορούν να καταγραφούν σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των φυτών.

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε φυτικά συστήματα για χαρακτηρισμό του γενετικού υλικού, για γενετική διαγνωστική, για ανίχνευση και χαρακτηρισμό γενετικών μεταμορφωμένων φυτών, για μελέτη της οργάνωσης του γονιδιώματος, για φυλογενετικές αναλύσεις κ. ά.

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν γενικά να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες.

- (α) Δείκτες DNA που βασίζονται σε υβριδισμό: στην ομάδα αυτή ανήκουν οι RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) και το αποτύπωμα ολιγονουκλεοτιδίων (oligonucleotide fingerprinting).
- (β) Δείκτες DNA που βασίζονται στην αλυσσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης: στην ομάδα αυτή ανήκουν οι δείκτες RAPDs (random amplified polymorphic DNAs), οι οποίοι μπορούν να μετατραπούν σε SCAPs (sequence characterized amplified regions), σε SSRs (simple sequence repeats), ή σε μικροδορυφόρους (microsatellites), σε SST (sequence-tagged sites), σε AFLPs (amplified fragment length polymorphisms), σε ISA (inter-simple sequence repeat amplification), σε CAPs (cleaved amplified polymorphic sequences) και σε ALPs (amplicon length polymorphisms).
- (γ) Δείκτες DNA που βασίζονται σε μικρά αλληλουχημένα τμήματα: στην ομάδα αυτή ανήκουν οι δείκτες πολυμορφισμού απλού νουκλεοτιδίου (SNPs, single nucleotide polymorphisms).

Εκτός από τους παραπάνω δείκτες, χρήσιμοι στην ανίχνευση γενετικού πολυμορφισμού υπήρξαν και οι παρακάτω: MP-PCR (microsatellite-primed polymerase chain reaction), AP-PCR (arbitrarily-primed PCR), AS-PCR (allele-specific PCR) και DAF (DNA amplification fingerprinting).

Μοριακή βελτίωση

Ως **Μοριακή** ορίζεται η βελτίωση που πραγματοποιείται με τη βοήθεια των Μοριακών Δεικτών.

Αντιπροσωπεύει μια ουσιαστική συμβολή στην αναβάθμιση της αποτελεσματικότητας της κλασικής βελτίωσης και αυτό επιτυγχάνεται με την:

(α) Επιλογή γνωρισμάτων δια μέσου των μοριακών δεικτών (MAS, marker assisted selection):

με τον τρόπο αυτό διακρίνονται οι επιθυμητοί γενότυποι με μεγαλύτερη ακρίβεια, παρακολουθώντας την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων μοριακών δεικτών, που είναι στενά συνδεδεμένοι με το επιθυμητό γνώρισμα.

Οι Μοριακοί Δείκτες αποτελούν ένα μοναδικό εργαλείο για τη συγκέντρωση στην ίδια ποικιλία γονιδίων ανθεκτικότητας σε κάποιο βιοτικό παράγοντα καταπόνησης, διαφορετικής προέλευσης.

Αυτό αποκτά μεγαλύτερο ενδιαφέρον όταν η φαινοτυπική έκφραση των γονιδίων αυτών είναι ταυτόσημη, μη επιτρέποντας τη διάκρισή τους από την εκτίμηση και μόνο της προσδιδόμενης ανθεκτικότητας.

Τέλος, με τη χρησιμοποίηση των Μοριακών δεικτών είναι δυνατή η επιτάχυνση της ενσωμάτωσης επιθυμητών γνωρισμάτων σε **"εκλεκτούς"** (elite) γενότυπους, μειώνοντας τον χρόνο που απαιτείται για αναδιασταυρώσεις στο μισό.

Αυτό βεβαίως προϋποθέτει την ύπαρξη εκτεταμένων χαρτών Μοριακών Δεικτών, τόσο για τον εκλεκτό γενότυπο όσο και για τον γενότυπο που θα χρησιμοποιηθεί ως δότης για το γνώρισμα που επιδιώκεται να ενσωματωθεί.

(β) Γενετική ταυτοποίηση:

αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την προστασία ποικιλιών και για τον έλεγχο της πιστότητας κατά τη σποροπαραγωγή.

(γ) Εκτίμηση γενετικών αποστάσεων:

έτσι γίνεται ορθολογικότερη επιλογή γονέων υβριδίων υψηλής ετέρωσης.

Γενετική τροποποίηση

Είναι η αλλαγή στη σύνθεση του γονιδιώματος ενός φυτικού οργανισμού με την μεταφορά και εισαγωγή σε αυτό γνωρισμάτων χωρίς την εφαρμογή της τεχνητής διασταύρωσης μεταξύ διαφόρων ατόμων.

Είναι η πιο εντυπωσιακή αλλά και αμφισβητούμενη εφαρμογή της Βιοτεχνολογίας.

Τα κύρια σημεία που διαφοροποιούν τη Γενετική Μηχανική από την κλασική μεταφορά των γονιδίων εντοπίζεται σε τέσσερα σημεία:

- (α) Η Γενετική Μηχανική επιτρέπει τον ακριβέστερο χειρισμό των γονιδίων και τη μεταφορά συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA.**
- (β) Είναι δυνατή η αξιοποίηση γονιδίων ανεξάρτητα από τα ταξινομικά εμπόδια.**
- (γ) Ο χειρισμός εστιάζεται σε απλά γονίδια, που ακολουθούν ποιοτική κληρονομικότητα και**
- (δ) Παρέχεται η δυνατότητα της ταχύτερης ενσωμάτωσης ενός γνωρίσματος σε ένα συγκεκριμένο γενότυπο.**

Οι κύριες δραστηριότητες των Κρατικών Οργανισμών και των Ιδιωτικών Εταιρειών για την αξιοποίηση της Γενετικής Μηχανικής έχουν να κάνουν με

- (α) εισαγωγή στα καλλιεργούμενα φυτικά είδη γονιδίων ανθεκτικότητας σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης**
- (β) βελτίωση των ποιοτικών και ποσοτικών γνωρισμάτων των φυτών και**
- (γ) παραγωγή νέων προϊόντων (π. χ. κατάλληλων για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τα ζώα, τη χρησιμοποίηση από τη βιομηχανία ως πρώτες ύλες, παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών).**

Γενετική μεταμόρφωση

Τα πρώτα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα βακτήρια *Agrobacterium tumefaciens* και *Agrobacterium rhizogenes* (προσβάλλουν τα δικοτυλήδονα φυτά και ειδικά τα σολανώδη και στα σημεία προσβολής το πρώτο προκαλεί σχηματισμό όγκων, με τη βοήθεια του Ti πλασμιδίου που έχουν οι παθογόνοι φυλές και το δεύτερο με το Ri πλασμίδιο που προκαλεί στα σημεία προσβολής σχηματισμό ριζών).

Γενετική μεταμόρφωση

Όταν το *Agrobacterium tumefaciens* προσβάλει ένα φυτό ένα τμήμα του πλασμιδίου (ονομάζεται T- DNA και περιέχει γονίδια που εκφράζονται στο φυτικό κύτταρο) εισέρχεται στο φυτικό κύτταρο και ενσωματώνεται στο γονιδίωμά του.

Τα κύτταρα στα οποία ενσωματώνεται το T- DNA πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και σχηματίζεται ένας όγκος (**κάλος**). Τα κύτταρα του όγκου που έχει σχηματισθεί, συνθέτουν πρωτεΐνες (**οπίνες**), που χρησιμοποιούνται από το βακτήριο ως τροφή.

Το ίδιο συμβαίνει και με *A. rhizogenes*.

Γενετική μεταμόρφωση

Από το T- DNA του Ti-πλασμιδίου είναι δυνατό να αφαιρεθούν τα ογκογόνα γονίδια και αυτά που κωδικοποιούν την παραγωγή οπινών και (με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων και λιγάσης) να προστεθεί στο T- DNA κάποιο γονίδιο που να δίνει ανθεκτικότητα στα φυτά σε μια ασθένεια.

Το τροποποιημένο αυτό πλασμίδιο μεταμορφώνει (μεταφέρεται δηλαδή) μη μολυσματικές φυλές του *Agrobacterium tumefaciens*, με τις οποίες μολύνονται φυτικά κύτταρα και όσα από αυτά ενσωματώσουν στο γενετικό τους υλικό το γονίδιο της ανθεκτικότητας, καλλιεργούνται σε θρεπτικά υποστρώματα.

Γενετική μεταμόρφωση

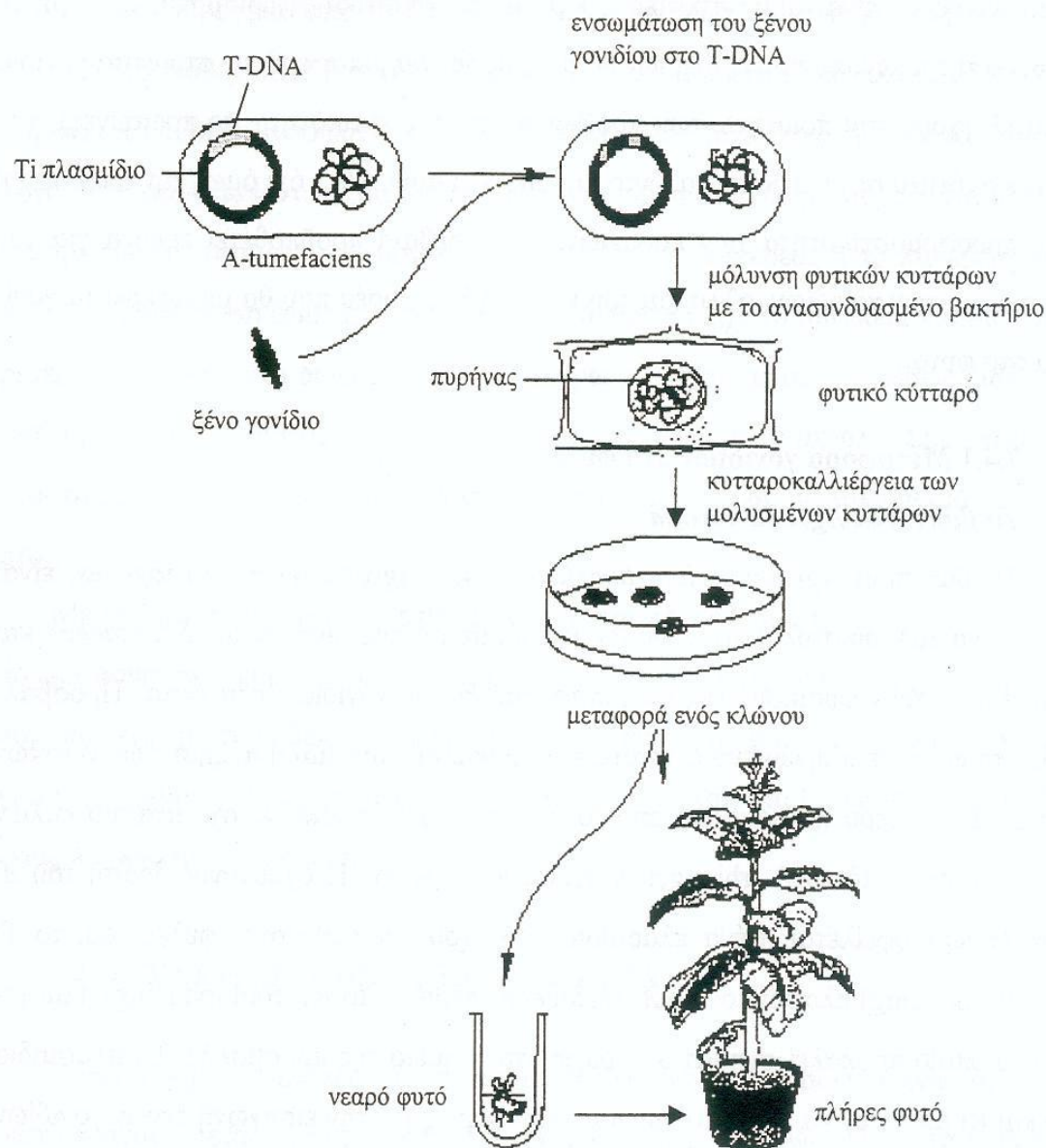
Τα φυτά που αναγεννώνται περιέχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας και ονομάζονται γενετικά τροποποιημένα.

Ο έλεγχος και η πιστοποίηση των μεταμορφωμένων βακτηρίων, γίνεται με την ταυτόχρονη ενσωμάτωση σε αυτά και ενός δεύτερου γονιδίου που δίνει στα βακτήρια υπερβολική ευαισθησία σε κάποιο αντιβιοτικό.

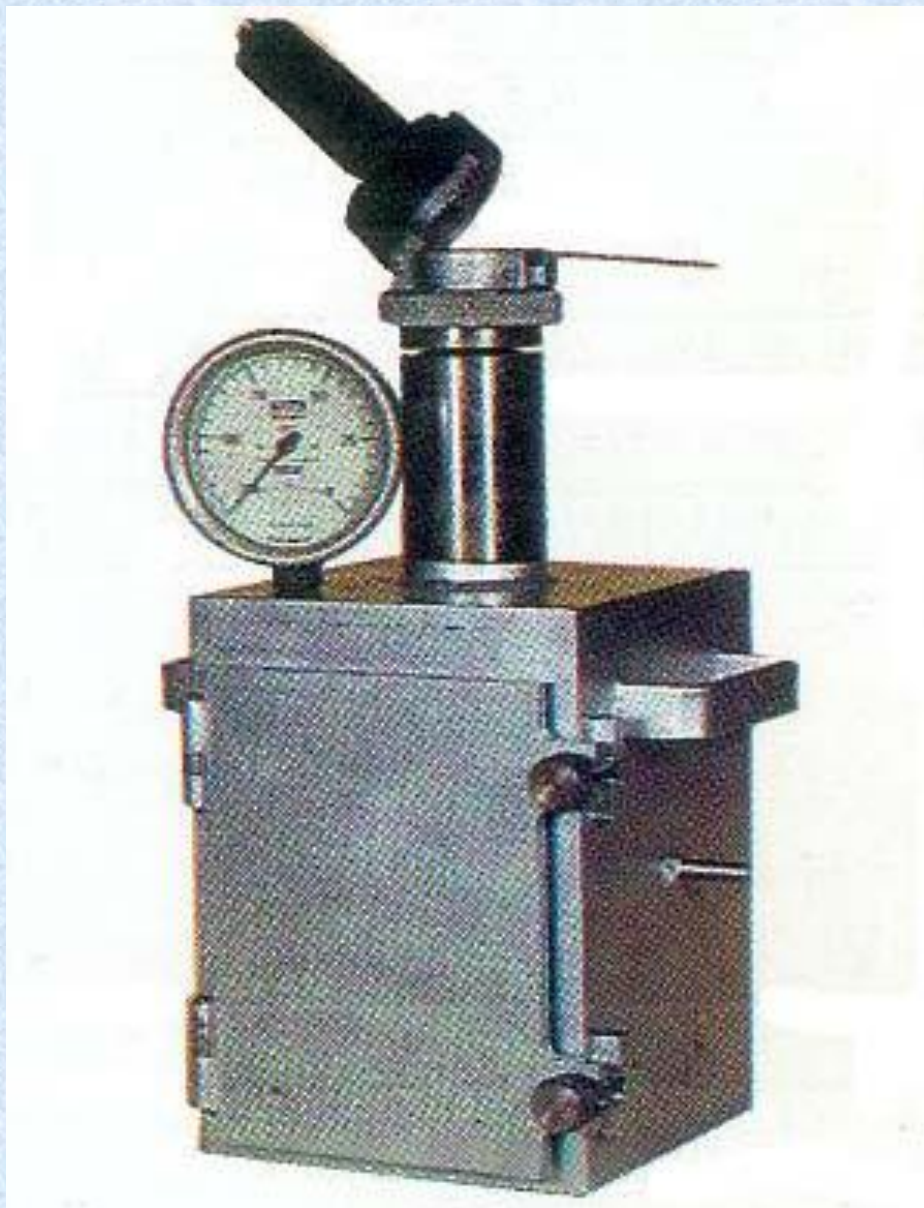
Γενετική μεταμόρφωση

Τα τροποποιημένα βακτήρια καλλιεργούνται σε κατάλληλο υπόστρωμα και δημιουργείται αντίγραφο της καλλιέργειας αυτής. Στη συνέχεια προστίθεται στην καλλιέργεια το αντιβιοτικό και όσα βακτήρια φέρουν το ζητούμενο γονίδιο (και μαζί και την ευαισθησία στο αντιβιοτικό) πεθαίνουν.

Έτσι γίνεται γνωστή η θέση στην καλλιέργεια των μεταμορφωμένων βακτηρίων. Χρησιμοποιώντας το αντίγραφο της καλλιέργειας των βακτηρίων, εντοπίζονται οι θέσεις στις οποίες υπάρχουν και με τον τρόπο αυτό απομονώνονται τα μεταμορφωμένα βακτήρια.



Διαδικασία μεταμόρφωσης του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* και δημιουργία ενός γενετικά τροποποιημένου φυτού.



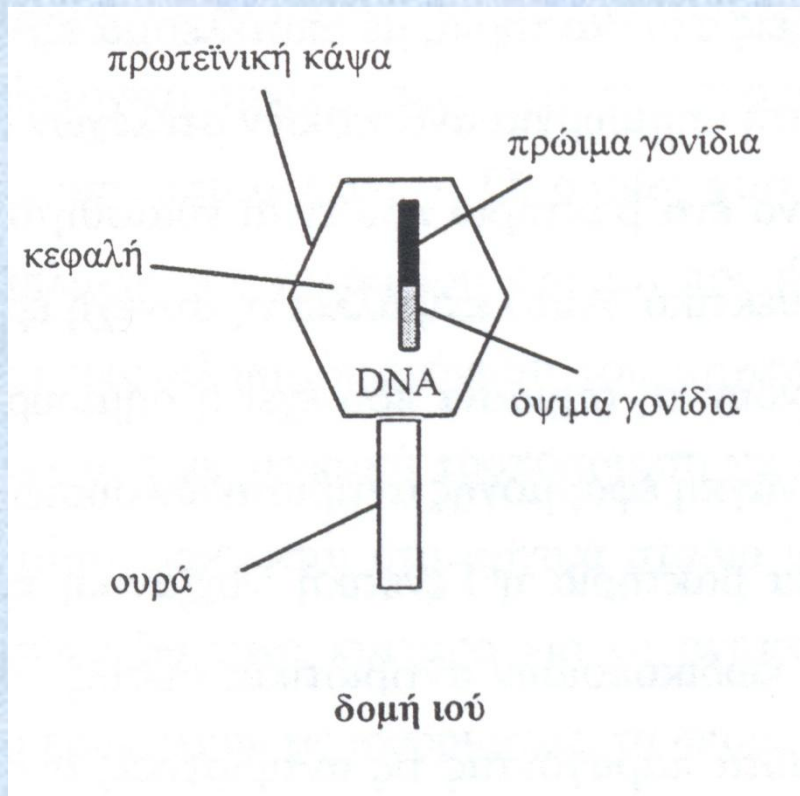
Συσκευή (πιστόλι) ενσωμάτωσης του επιθυμητού γονιδίου στο γονιδίωμα του φυτού ξενιστή.

Επιτεύγματα της Βιοτεχνολογίας στη Βελτίωση των φυτών

Ανθεκτικότητα σε ιούς

Ο μόνος τρόπος για να προστατευθούν τα φυτά είναι η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών. Για να γίνει όμως δυνατή η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών, θα πρέπει να είναι γνωστή η μορφολογία και η λειτουργία των ιών.

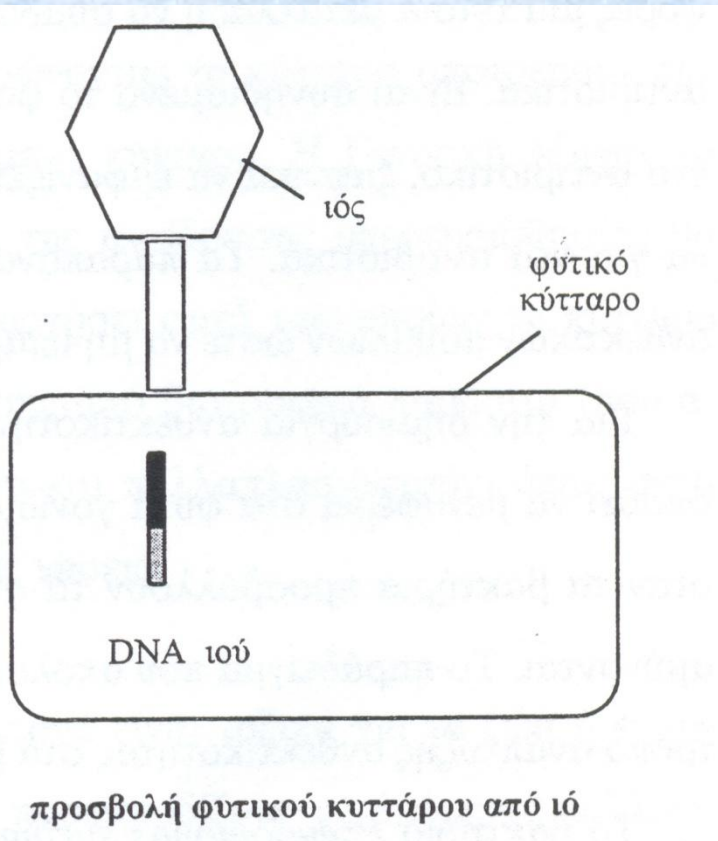
Ανθεκτικότητα σε ιούς



Οι τελευταίοι έχουν πολύ απλή δομή, αποτελούμενοι από δυο μέρη, την κεφαλή και την ουρά. Μέσα στην κεφαλή του ιού βρίσκεται το γενετικό του υλικό (DNA ή RNA), που περιβάλλεται από μια πρωτεϊνική κάψα. Οι ιοί δεν έχουν αυτόνομη λειτουργία και για το λόγο αυτό χρειάζονται τον ξενιστή-φυτό, μέσα στο οποίο αναπαράγονται.

Ανθεκτικότητα σε ιούς

Όταν ο ιός προσβάλλει τον ξενιστή, στέλνει με την ουρά μόνο το γενετικό του υλικό (DNA ή RNA). Μετά την προσβολή, το γενετικό υλικό του ιού αναπαράγεται πολλές φορές, εκμεταλλευόμενο τη δραστηριότητα του φυτικού κυττάρου.



Στη συνέχεια σχηματίζει νέες πρωτεϊνικές κάψες, κάθε μια από τις οποίες περιβάλλει ένα από τα μόρια του γενετικού υλικού του ιού. Οι νέοι αυτοί ιοί με τη σειρά τους προσβάλλουν άλλα κύτταρα του φυτού-ξενιστή και η ασθένεια εξαπλώνεται με τον τρόπο αυτό.

Ανθεκτικότητα σε ιούς

Η γενετική Μηχανική έχει ήδη συμβάλλει στη διευκρίνιση της λειτουργίας του γενετικού υλικού των ιών. Το γενετικό υλικό των ιών αποτελείται από δυο κατηγορίες γονιδίων:

(α), πρώιμα γονίδια, που ενεργοποιούνται αμέσως μόλις ο ιός προσβάλλει το φυτικό κύτταρο και που κωδικοποιούν την αναπαραγωγή του γενετικού υλικού των ιών και

(β) όψιμα γονίδια, που ενεργοποιούνται στη συνέχεια και κωδικοποιούν το σχηματισμό των πρωτεϊνικών καψών. Μόλις το νέο γενετικό υλικό μπει σε μια κάψα σταματά η λειτουργία των πρώιμων γονιδίων το ιού.

Ανθεκτικότητα σε ιούς

Ανθεκτικότητα με ενσωμάτωση στο φυτικό γένωμα των όψιμων γονιδίων του ιού:

Η ενσωμάτωση αυτή επιτρέπει την κανονική έκφραση των όψιμων γονιδίων του ιού, οπότε οι πρωτεϊνικές κάψες σχηματίζονται κανονικά.

Έτσι μόλις ο ιός προσβάλλει ένα φυτό, με το που μπαίνει το DNA του μέσα στο φυτικό κύτταρο περιβάλλεται από μια πρωτεϊνική κάψα και σταματά η αναπαραγωγή του γενετικού του υλικού και φυσικά ο πολλαπλασιασμός του ιού.

Με τον προσέγγιση αυτή δημιουργήθηκε στον καπνό ανθεκτικότητα στον ιό της μωσαϊκής, με τη βοήθεια του *Agrobacterium tumefaciens*.

Ανθεκτικότητα σε ιούς

Ανθεκτικότητα με ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα αντιπληροφοριακού RNA:

Όταν μεταγράφεται το DNA σε RNA, μεταγράφεται μόνο η μια αλυσίδα του πρώτου (η πληροφοριακή).

Σύμφωνα λοιπόν με την προσέγγιση, ενσωματώνονται στο φυτικό κύτταρο τα πρώιμα γονίδια του ιού και υποβοηθείται η μεταγραφή της αντι-πληροφοριακής αλυσίδας.

Με τον τρόπο αυτό παράγονται πολλά μόρια RNA που είναι όμως συμπληρωματικά (για το λόγο αυτό λέγεται αντιπληροφοριακό RNA) του κανονικού RNA που παράγεται από το γονίδιο του ιού.

Ανθεκτικότητα σε ιούς

Ανθεκτικότητα με ενσωμάτωση στο φυτικό γονιδίωμα αντιπληροφοριακού RNA:

Έτσι, με την προσβολή του κυττάρου το RNA του ιού αδρανοποιείται από αυτό που υπάρχει στο κύτταρο και δεν προφταίνει να μεταφρασθεί.

Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν φυτά τομάτας και καπνού ανθεκτικά στον ιό της μωσαϊκής και φυτά τεύτλων ανθεκτικά σε ιό που προσβάλλει τα φύλλα τους.

Ανθεκτικότητα σε ιούς

Παραγωγή αντισωμάτων από τα φυτά:

Αποτελεί την πλέον τολμηρή πρόταση και προβλέπει τη μεταφορά γονιδίων που παράγουν αντισώματα για τον ιό. Τα φυτά, όπως είναι γνωστό, δεν έχουν ανοσοποιητικό σύστημα και για το λόγο αυτό δεν παράγουν αντισώματα.

Ελπίζεται όμως ότι με την απομόνωση και μεταφορά ζωικών γονιδίων στα φυτά, που παράγουν αντισώματα για ιούς, θα μπορέσουν και τα φυτά να παράγουν τα αντισώματα αυτά.

Σχετικές προσπάθειες με την προσέγγιση αυτή έγιναν με μεταφορά γονιδίων από τα ποντίκια στον καπνό, αλλά η όλη προσπάθεια είναι σε εξέλιξη και το τελικό αποτέλεσμα δεν είναι γνωστό.

Ανθεκτικότητα σε βακτήρια και μύκητες

Η αντιμετώπιση των βακτηρίων και μυκήτων με αντιβιοτικά, είναι δαπανηρή και τοξική για το περιβάλλον.

Τα αντιβιοτικά δεν διακρίνουν τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς από τους μη ωφέλιμους και έχουν μεταλλαξογόνο δράση και μπορεί να μετατρέψουν ένα μικροοργανισμό από μη μολυσματικό σε μολυσματικό.

Ανθεκτικότητα σε βακτήρια και μύκητες

Στην αντιμετώπιση λοιπόν των βακτηρίων και μυκήτων, η Γενετική Μηχανική προσέφερε τρεις λύσεις:

(α) αν η μολυσματική δράση του μικροοργανισμού οφείλεται στη παραγωγή μιας πρωτεΐνης που δρα τοξικά (συνήθως ενώνεται μια από τις απαραίτητες πρωτεΐνες του φυτού και την κάνει μη ενεργή) ακολουθείται η εξής τακτική. Αλλάζουν στην πρωτεΐνη του φυτού κάποια από τα αμινοξέα της, προσέχοντας να μη έχει αυτό αρνητικές συνέπειες για το φυτό. Η αλλαγμένη πρωτεΐνη δεν αναγνωρίζεται από αυτήν του μικροοργανισμού και έτσι χάνει ο τελευταίος τη μολυσματικότητά του.

Ανθεκτικότητα σε βακτήρια και μύκητες

(β) Το φυτό ξενιστής τροποποιείται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να παράγει πάρα πολλά αντίγραφα από την πρωτεΐνη που προσβάλλει ο μικροοργανισμός. Με τον τρόπο αυτό τα μόρια της τοξίνης του μικροοργανισμού δεν είναι αρκετά για να αδρανοποιήσουν όλες τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του φυτού, οπότε μένουν αρκετές για να επιτελέσουν την αποστολή τους.

Ανθεκτικότητα σε βακτήρια και μύκητες

(γ) Εκμετάλλευση του φαινομένου της υπερευαισθησίας (που οφείλεται στην παραγωγή από το φυτό κάποιων ουσιών, που λέγονται φυτολεξίνες, που συσσωρεύονται στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί και προκαλούν τη νέκρωση τους. Η νέκρωση αναστέλλει την εξάπλωση του μικροοργανισμού. Με την πλήρη διευκρίνιση του μηχανισμού υπερευαισθησίας από τη Γ. Μ. αναμένεται να δημιουργηθούν ποικιλίες, που θα νεκρώνουν πολύ γρήγορα τα κύτταρά τους μόλις προσβάλλονται από κάποιο μικροοργανισμό.

Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα

Με τη Γενετική Μηχανική έγινε δυνατή η δημιουργία φυτών, που παράγουν πολλά μόρια της πρωτεΐνης που αδρανοποιείται από τις συγκεκριμένες χημικές ουσίες.

Έτσι, όσα μόρια της πρωτεΐνης και να αδρανοποιηθούν από το ζιζανιοκτόνο, μένουν αρκετά για να επιτελέσουν το ρόλο τους και το φυτό επιβιώνει.

Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν ποικιλίες καπνού και τομάτας ανθεκτικές στο ζιζανιοκτόνο glyphosate.

Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα

Επίσης βρέθηκε ότι στελέχη του βακτηρίου *Klebsiella* έχουν την ικανότητα να αδρανοποιούν το ζιζανιοκτόνο bromoxynil, παράγοντας ένα ένζυμο που διασπά τη δραστική ουσία του σκευάσματος.

Το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από γονίδιο που βρίσκεται στο πλασμίδιο του βακτηρίου και μεταφέρθηκε στη τομάτα.

Επίσης έχουν απομονωθεί γονίδια ανθεκτικότητας και σε άλλα ζιζανιοκτόνα (chlorosulfuron, sulfometuron methyl, κ. ά.).

Ανθεκτικότητα σε έντομα

Έχει μεταφερθεί μια εντομοκτόνος πρωτεΐνη, από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* (πρωτεΐνη BT), στο καλαμπόκι, στο βαμβάκι, στη τομάτα, στον καπνό και στη μελιτζάνα.

Ανθεκτικότητα σε έντομα

Πλεονεκτήματα:

- (α) η εντομοκτόνος ουσία που είναι οργανικής προέλευσης, διασπάται εύκολα στο έδαφος και συμβάλλει με τον τρόπο αυτό στη προστασία του περιβάλλοντος
- (β) η πρωτεΐνη ΒΤ δεν παράγεται στο καρπό των φυτών.



Γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι στο οποίο έχει μεταφερθεί το γονίδιο BT.



Γενετικά τροποποιημένο βαμβάκι στο οποίο έχει μεταφερθεί το γονίδιο BT.

Ανθεκτικότητα σε έντομα

Άλλη περίπτωση είναι η σόγια που στον καρπό της παράγεται μια πρωτεΐνη - αναστολέας της τρυψίνης (η τρυψίνη βρίσκεται στο στομάχι των ζώων και των εντόμων και βοηθά την πέψη).

Η αναστολή της δράσης του ενζύμου συνεπάγεται τη δηλητηρίαση του ατόμου που καταναλώνει το προϊόν (για να καταναλωθεί η σόγια θα πρέπει να καταστραφεί ο αναστολέας της τρυψίνης με θέρμανση).

Παρόμοιο γονίδιο έχει μεταφερθεί στη τομάτα, στον καπνό και στην πατάτα.

Ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες

Η πατάτα για να δώσει προϊόν υψηλής ποιότητας θα πρέπει να υποστεί την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών, που είναι δυνατό να προκαλέσουν κάψιμο των φυτών.

Για το λόγο αυτό έχει μεταφερθεί σε φυτά πατάτας ένα γονίδιο από κάποιο ψάρι που ζει στο βυθό των ωκεανών και προσδίδει ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες

Επίσης κάποια βακτήρια δημιουργούν παγοκρυστάλλους μέσα στους χυμώδεις ιστούς των καρπών, όταν η θερμοκρασία πέφτει κάτω από το μηδέν.

Η δημιουργία των κρυστάλλων οφείλεται σε μια πρωτεΐνη που παράγεται από τα βακτήρια. Όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενες και ασηπτικές συνθήκες, τότε βρέθηκε να αντέχουν στις χαμηλές θερμοκρασίες, πιστοποιώντας με τον τρόπο αυτή την ευθύνη των βακτηρίων.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε, απομονώθηκε και αφαιρέθηκε.

Ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες

Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν τροποποιημένες φυλές των βακτηρίων που δεν είναι βλαβερές.

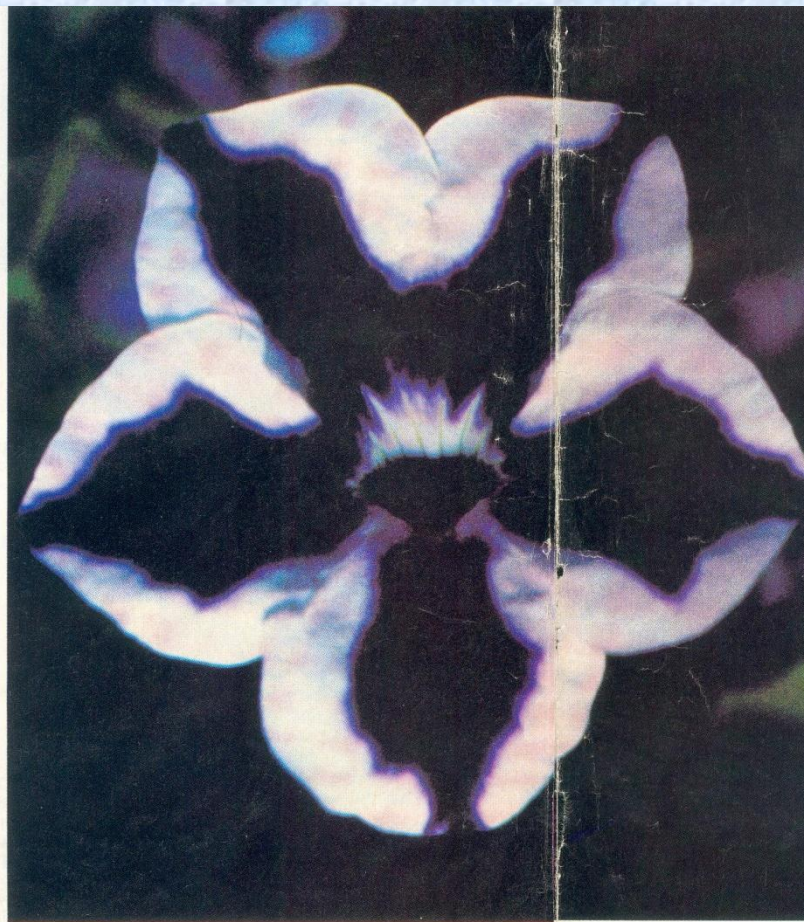
Αν τώρα κάποιος ψεκάσει τα τροποποιημένα βακτήρια στα φυτά, αυτά ανταγωνίζονται τα μη τροποποιημένα, προσφέροντας με τον τρόπο αυτό προστασία από τις χαμηλές θερμοκρασίες.

Βελτίωση ανθοκομικών φυτών



Μεταφορά του γονιδίου της λουσιφεράσης από την πυγολαμπίδα στο γκαζόν.

Βελτίωση ανθοκομικών φυτών



Γονίδια έχουν μεταφερθεί επίσης από το καλαμπόκι στην πετούνια, δίνοντας στην τελευταία μοναδικούς συνδυασμούς χρωμάτων και σχήματος ανθέων.

Λοιπές εφαρμογές



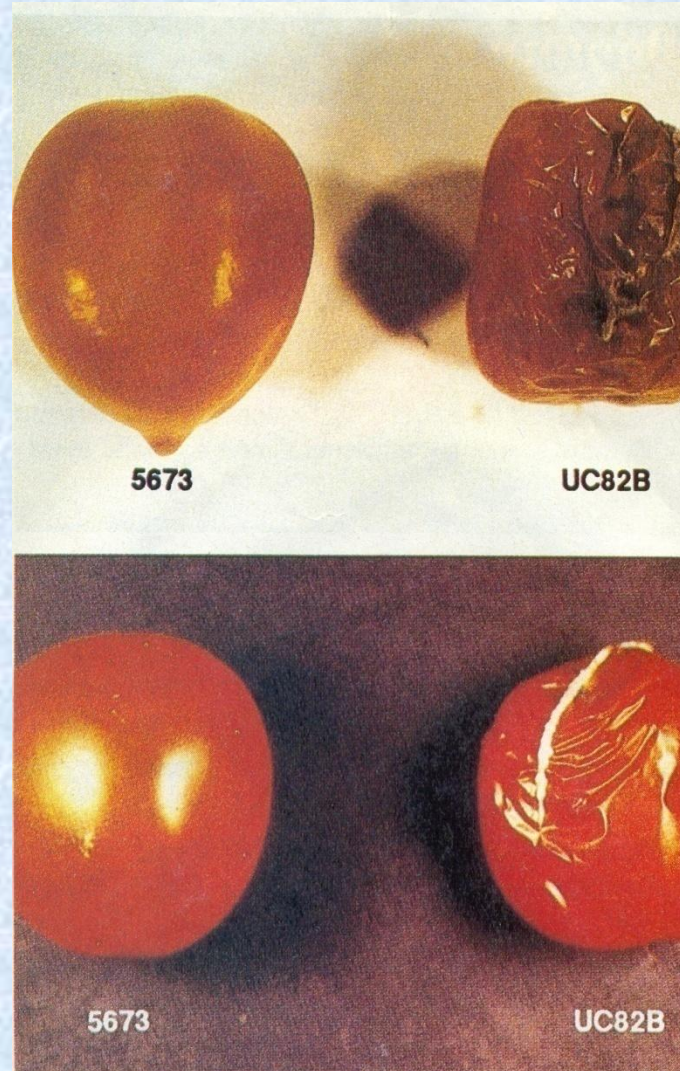
Ποικιλίες ηλιανθου που παράγουν μόνο κορεσμένα ή μόνο ακόρεστα λιπαρά οξέα.....

Λοιπές εφαρμογές



Μεταφορά γονιδίου στις τομάτες που ελέγχει το σχήμα.

Λοιπές εφαρμογές



Γ. Τ. τομάτες ανθεκτικές ανθεκτικές στη μετασυλλεκτική διατήρηση.

Λοιπές εφαρμογές



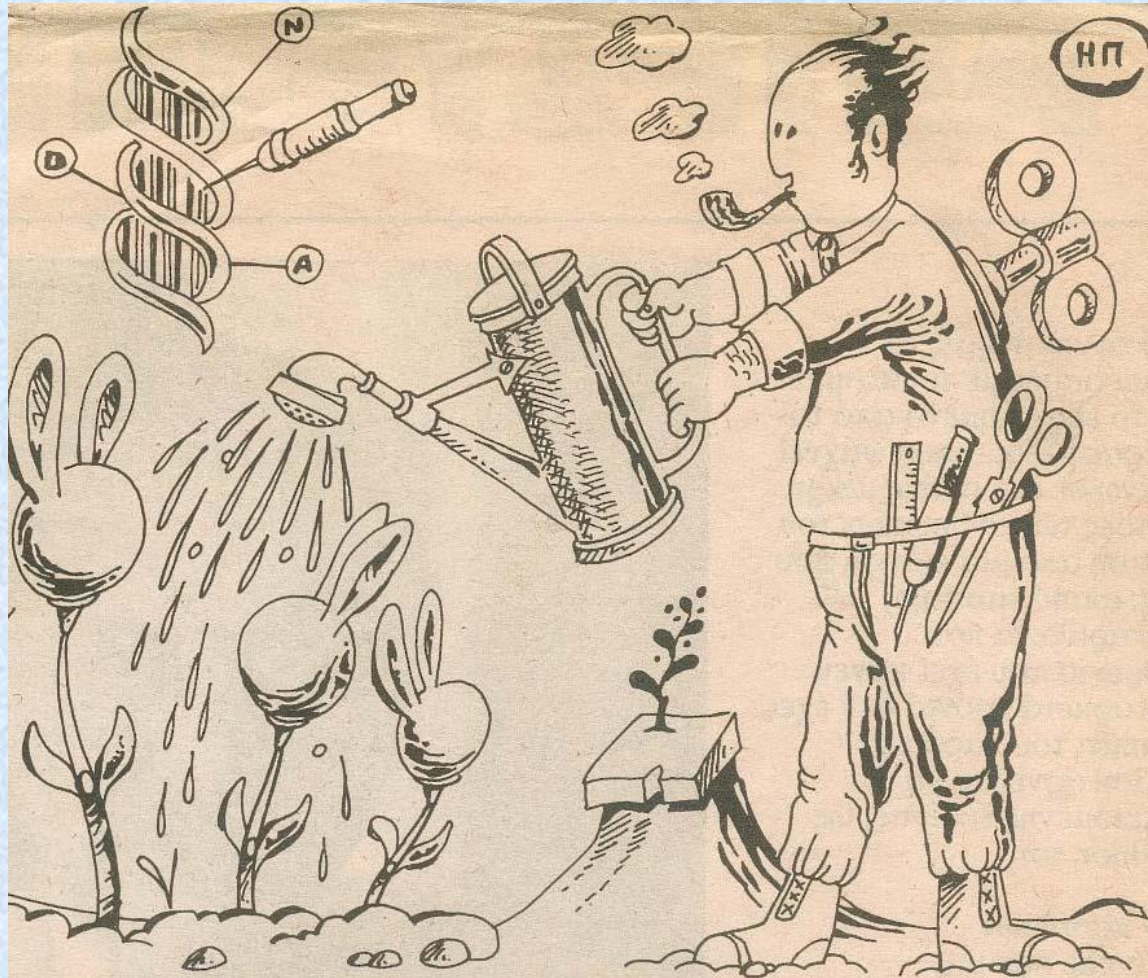
Κλώνοι χοίρων και αλόγου.

Λοιπές εφαρμογές



Η Ντόλλη.

Λοιπές εφαρμογές



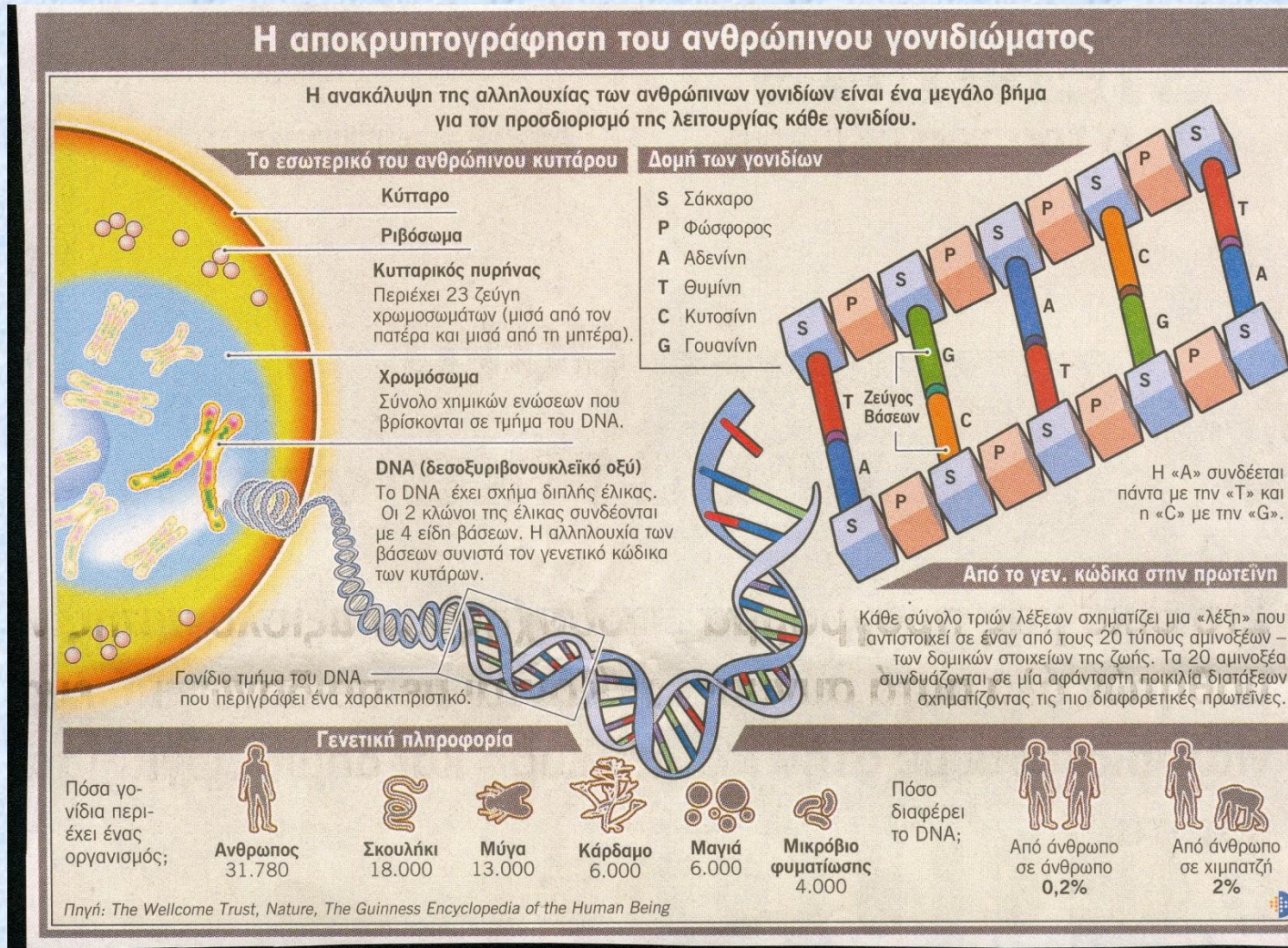
Η θρυαλλίδα της Γενετικής.

Λοιπές εφαρμογές

.....ποικιλίες πατάτας και καλαμποκιού πλούσιες μόνο σε αμυλόζη ή σε αμυλοπηκτίνη, μη μουσικά φασόλια, παραγωγή φυτικών ελαίων που περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες λιπαρών οξέων ωμέγα-3 .

.....δημιουργήθηκαν **πορφυρές** ντομάτες, με μεγάλη περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες (έντονα αντιοξειδωτικές ουσίες) μεταφέροντας γονίδια από το φυτό αντίρρινο.

Λοιπές εφαρμογές



Η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Ιωάννης Ν. Ξυνιάς. Βελτίωση Φυτών: Μοριακή Βελτίωση

Προβληματισμός όσον αφορά την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων φυτών.

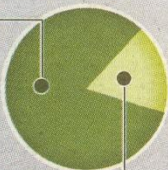
Η ταυτότητα των καλλιεργούμενων βιοτεχνολογικών τροφίμων

Λίγες είναι οι χώρες που καλλιεργούν βιοτεχνολογικά τρόφιμα

Ως επί το πλείστον αυτά χωρίζονται σε τέσσερις βασικές καλλιέργειες:

82%

της
συνολικής
παραγωγής
**Σόγια και
καλαμπόκι**



18%

της συνολικής παραγωγής
βαμβάκι και ελαιοκράμβη

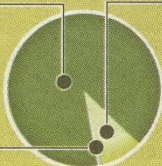
17 εκατ. στρέμματα
ήταν η έκταση γης που
χρησιμοποιούνταν για
καλλιέργεια το 1996

526 εκατ. στρέμματα
έφθασε το 2001

ΑΠΟ ΑΥΤΑ

90%

βρίσκεται
στις ΗΠΑ
και στην
Αργεντινή



9%

βρίσκεται
στον
Καναδά
και την
Κίνα

1%

βρίσκεται στη Βόρεια Αφρική
(2 εκατ. στρέμ. καλαμπόκι, σόγια και βαμβάκι)
και την Αυστραλία (2 εκατ. στρέμ. βαμβάκι)

ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

77% καλλιεργούνται
με ανθεκτικότητα στα
ζιζανιοκτόνα

15% καλλιεργούνται
με ανθεκτικότητα
στα έντομα

8% καλλιεργούνται με
μεικτή ανθεκτικότητα στα
ζιζανιοκτόνα και στα έντομα

Έως το 1998 είχαν καλλιεργηθεί
περισσότερα από 340 εκατομ.
στρέμματα με ποικιλίες ή
υβρίδια Γ. Τ. Φ. Οι εκτάσεις
αυτές αυξήθηκαν στα 526
εκατομ. στρέμματα το 2001.

Κύριες χώρες καλλιέργειας των
Γ. Τ ποικιλιών και υβριδίων
ήταν οι Η. Π. Α., χώρες της
Λατινικής Αμερικής, η Κίνα
και η Ν Αφρική.

Στην Ευρώπη τα πράγματα
είναι αρκετά διαφορετικά γιατί
επικρατεί αρκετός σκεπτικι-
σμός όσον αφορά την
αναγκαιότητα της δημιουργίας
και κατανάλωσης νεοφανών
προϊόντων.

**Ιωάννης Ν. Ξυνιάς. Βελτίωση Φυτών:
Μοριακή Βελτίωση**

Ο προβληματισμός εστιάζεται κυρίως στα παρακάτω σημεία.

(α) Ασφάλεια: πόσο ασφαλή είναι τα προϊόντα των γενετικά τροποποιημένων φυτών;

Ο κίνδυνος μετάδοσης οποιασδήποτε γενετικής πληροφορίας στο περιβάλλον (μεταφορά της ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα στα ζιζάνια, μεταφορά ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στα βακτήρια) είναι κάτι παραπάνω από ορατός και πιθανός.

Επίσης, είναι πιθανή κάποια πρόκληση τοξικών αντιδράσεων και αλλεργιών στους οργανισμούς που θα καταναλώσουν τα νεοφανή τρόφιμα.

Παράδειγμα: η γενετικά τροποποιημένη ελαιοκράμβη, που είναι λιγότερο στυφή από την μη τροποποιημένη. Όταν καλλιεργήθηκε στη Γερμανία η γενετικά τροποποιημένη ελαιοκράμβη τα ελάφια έτρωγαν χωρίς μέτρο και πέθαιναν από το πολύ φαγητό.

Τέλος, υπάρχει το πρόβλημα της αλλοίωσης του φυσικού περιβάλλοντος με την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.

(β) Γεωργική πρακτική:

Εδώ το ερώτημα που τίθεται είναι κατά πόσο θα μειωθεί η χρήση των φυτοφαρμάκων με την καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων φυτών.

Για παράδειγμα η δημιουργία φυτών σόγιας και βαμβακιού ανθεκτικών στα ζιζανιοκτόνα glyphosate και gluphosinate θα μειώσει τελικά τη χρησιμοποίηση των ζιζανιοκτόνων αυτών;

Επίσης προβληματισμό προκαλεί το κόστος του σπόρου των γενετικά τροποποιημένων ποικιλιών και ο κίνδυνος της μονοκαλλιέργειας, με όλες τις αρνητικές συνέπειες που έχει η τελευταία.

(γ) Κοινωνικά και οικονομικά προβλήματα:

Ορατός είναι ο κίνδυνος εξάρτησης της γεωργικής παραγωγής από λίγες πολυεθνικές Εταιρείες που θα παράγουν τόσο τα γενετικά τροποποιημένα φυτά όσο και τα ζιζανιοκτόνα για παράδειγμα, στα οποία είναι ανθεκτικά.

Στον αντίποδα των παραπάνω προβληματισμών, θα μπορούσε ίσως κάποιος να αναρωτηθεί κατά πόσο είναι λογική η παντελής άρνηση και απαγόρευση της καλλιέργειας των γενετικά τροποποιημένων φυτών.

Για να γίνει μια ορθολογικότερη αξιολόγηση της νέας τεχνολογίας και των μεγάλων δυνατοτήτων που προσφέρει, θα πρέπει να γίνει ένας ειλικρινής διάλογος μεταξύ των επιστημόνων και των εκπροσώπων των καταναλωτών για το θέμα των πιθανών κινδύνων που εγκυμονεί η απελευθέρωση και καλλιέργεια των γενετικά τροποποιημένων φυτών.

Νεώτερες τεχνικές Βελτίωσης των φυτών

Αγροδιήθηση (Agroinfiltration)

Η αγροδιήθηση είναι μια μέθοδος για να επαχθεί η παροδική έκφραση των γονιδίων σε ένα φυτό ή για να παραχθεί μια επιθυμητή πρωτεΐνη. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε ένα φύλλο του φυτού εκχέεται ένα εναιώρημα του αγροβακτηρίου, με το οποίο μεταφέρεται το επιθυμητό γονίδιο στα φυτικά κύτταρα. Τα πλεονεκτήματα της αγροδιήθησης σε σχέση με την παραδοσιακή τροποποίηση των φυτών είναι η ταχύτητα και η ευκολία στη χρήση.



Έκχυση του διαλύματος του αγροβακτηρίου στην κάτω επιφάνεια ενός φύλλου.

Αποσιώπηση γονιδίων με τη βοήθεια ιών (Virus-induced gene silencing)

- Η δυνατότητα της προσωρινής (αλλά και αποτελεσματικής) καταστολής της συσσώρευσης του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων, αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο στη γονιδιωματική προσέγγιση του προσδιορισμού της βιολογικής λειτουργίας γονιδίων που είναι μη χαρακτηρισμένα.
- Η αποσιώπηση των γονιδίων που επάγεται με τη βοήθεια ιών (virus induced gene silencing, ή VIGS), αποτελεί μια μέθοδο προσωρινής διακοπής της λειτουργίας ενός γονιδίου μέσω παρέμβασης του RNA.
- Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο λειτουργεί η μέθοδος VIGS παραμένει ακόμη άγνωστος.

Αντίστροφη Βελτίωση (Reverse breeding)

- Η αντίστροφη Βελτίωση είναι μια νέα τεχνική που χρησιμοποιεί τη γενετική τροποποίηση για να επιταχυνθεί και για να διευκολυνθεί η παραγωγή F_1 υβριδίων.
- Αυτό το επιχειρεί καταστέλλοντας το μειωτικό ανασυνδυασμό με την αποσιώπηση των σχετικών γονιδίων.
- Κατά τα τελευταία στάδια της μεθόδου αποβάλλονται τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη γενετική τροποποίηση και τα τελικά φυτά είναι ελεύθερα από ακολουθίες του DNA που σχετίζονται με τη γενετική τροποποίηση.

Επιταχυνόμενη Βελτίωση που ακολουθεί την επαγωγή πρώιμης άνθησης (Accelerated breeding following induction of early flowering).

- Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιεί τη γενετική τροποποίηση για να επιταχυνθεί η βελτιωτική διαδικασία επάγοντας την πρώιμη άνθηση των φυτών.
- Κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της βελτιωτικής διαδικασίας τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη γενετική τροποποίηση απομακρύνονται.
- Με τον τρόπο αυτό παράγονται τελικά προϊόντα που δεν περιέχουν γενετική τροποποίηση.

Συνδυασμός γενετικά τροποποιημένων και μη γενετικά τροποποιημένων φυτών διαμέσου εμβολιασμού
(Combining of genetically modified and non-genetically modified plant parts by grafting)

Με τον συνδυασμό γενετικά τροποποιημένων (ΓΤ) και μη ΓΤ φυτικών τμημάτων είναι δυνατό να παραχθούν προϊόντα (όπως φρούτα ή άνθη) στα μη ΓΤ φυτικά μέρη, που έχουν εμβολιασθεί σε ρίζες ΓΤ φυτών. Τα φυτά από το συνδυασμό των ΓΤ- μη ΓΤ φυτών έχουν βελτιωμένα αγρονομικά γνωρίσματα.

Ομογένεση (Cisgenesis)

- Με τον όρο αυτό περιγράφεται η παραγωγή ΓΤ φυτών χρησιμοποιώντας ως δότη γονιδιακές αλληλουχίες (donor DNA sequences) που προήλθαν από το ίδιο το είδος ή από κάποιο άλλο είδος, που είναι συμβατό σε φυσική διασταύρωση.
- Τα γονίδια δότες μπορεί να υπάρχουν σε άγρια συγγενικά είδη και να κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα σε κάποια ασθένεια.
- Είναι όμως δυνατό να είναι κάποια βοηθητικά γονίδια που υπάρχουν μέσα στο είδος και τα οποία πιθανόν να μεταφέρονται από τον ένα γενότυπο στον άλλο.

Ενδογένεση (Intragenesis)

- Ενδογένεση είναι η παραγωγή ΓΤ φυτών χρησιμοποιώντας ως δότη γονιδιακές αλληλουχίες που προήλθαν από το ίδιο το είδος ή από κάποιο άλλο είδος, που είναι συμβατό σε φυσική διασταύρωση.
- Η μέθοδος αυτή διαφέρει από την ομογένεση στο ότι η ενδογένεση επιτρέπει τη δημιουργία νέων συνδυασμών τμημάτων του DNA που όλοι προέρχονται από το ίδιο είδος ή από κάποιο άλλο είδος που είναι συμβατό σε διασταύρωση.

Επαγωγή μεταλλάξεων με τη μεσολάβηση ολιγονουκλεοτιδίων (Oligonucleotide-mediated mutation induction)

- Η επαγωγή μεταλλάξεων με τη μεσολάβηση ολιγονουκλεοτιδίων είναι μια μέθοδος τροποποίησης ενός γονιδίου σε μια συγκεκριμένη θέση.
- Η τροποποίηση αυτή προκαλεί ακριβείς αλλαγές στην αλληλουχία του γονιδίου χωρίς την ενσωμάτωση γονιδίων που είναι ξένα με το είδος.
- Η τροποποίηση προκαλείται με τη χρησιμοποίηση χημικών ολιγονουκλεοτιδίων που έχουν παρασκευασθεί χημικά.

- Τέλος, όσον αφορά τις επιπτώσεις στο περιβάλλον, αυτές δεν είναι διαφορετικές από τις αντίστοιχες που προκαλούνται από τη βελτίωση με μεταλλάξεις.
- Τα φυτά που αποκτώνται με τις μεταλλάξεις με τη μεσολάβηση ολιγονουκλεοτιδίων θα πρέπει να υφίστανται τους ίδιους ελέγχους που χρησιμοποιούνται και για τα φυτά που επιλέγονται μετά από τη βελτίωση με μεταλλάξεις.

**Περισσότερες πληροφορίες για τη Μοριακή
βελτίωση στο βιβλίο του Ι. Ν. Ξυνιά: Βελτίωση
Φυτών: Θεωρία και Ασκήσεις, Εκδόσεις Έμβρυο,
Αθήνα**

Κωδικός Εύδοξου: 33074459