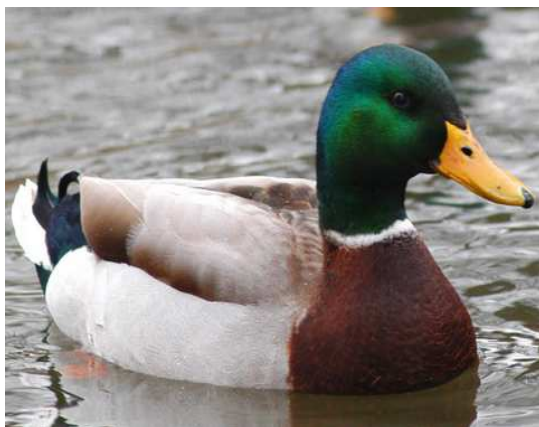


## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### Κεραμιδιώτη Ζωή

### Ανάπτυξη μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση ειδών του γένους *Anas*



**Ανάπτυξη μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση ειδών  
του γένους *Anas***

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**Μαμούρης Ζήσης**  
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

**Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**Μούτου Αικατερίνη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**Σαραφίδου Θεολογία: Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα 17/02/2010 - 30/06/2010, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και με τίμησε με την εμπιστοσύνη του, αναθέτοντάς μου τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνη καθώς και τη Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Σαραφίδου Θεολογία για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κ. Κουτσογιαννούλη Λία, για την πολύτιμη αρωγή τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, τις ιδιαίτερα χρήσιμες και καίριες συμβουλές και υποδείξεις τους και γενικότερα τη μεταλαμπάδευση της γνώσης και εμπειρίας τους, καθώς, βέβαια και για το ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε στο εργαστήριο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	5
1.1 Εξέλιξη.....	5
1.2 Προβλήματα στη διάκριση και ταυτοποίηση των ειδών .....	6
1.3 Γενετική βάση των διαφορών μεταξύ των ειδών .....	6
1.4 Αρχικές μελέτες ταυτοποίησης και διάκρισης των ειδών .....	7
2. ΔΕΙΚΤΕΣ.....	8
2.1 Μοριακοί Δείκτες .....	8
2.2 Χαρακτηριστικά Μοριακών Δεικτών.....	8
2.3 Κύριες κατηγορίες μοριακών δεικτών .....	9
2.3.1 RFLPs .....	9
2.3.2 RAPDs.....	10
2.3.3 AFLPs .....	10
2.3.4 SSRs, STRs.....	10
2.3.5 STS, EST, SSCP, SNP .....	11
3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΩΝ.....	12
3.1 Είδη υποδοχέων μελανοκορτίνης .....	12
3.2 Προσδέτες των υποδοχέων μελανοκορτίνης.....	12
4. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΗΣ 1.....	14
4.1 Γενικά για τον MC1R.....	14
4.2 Ο ρόλος του MC1R στον ανθρώπινο οργανισμό.....	14
4.3 Η λειτουργία του MC1R στα θηλαστικά και άλλους οργανισμούς .....	15
4.4 Ο χρωματισμός του πτερώματος των πτηνών – επίδραση του MC1R .....	17
4.5 Μελέτες του γενετικού τύπου MC1R σε διάφορες ταξινομικές ομάδες ....	18
5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.....	21
5.1 Προέλευση μιτοχονδρίου – μιτοχονδριακού DNA.....	21
5.2 Χαρακτηριστικά μιτοχονδρίου – μιτοχονδριακού DNA .....	21
5.3 Χρήση μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) ως εξελικτικό εργαλείο .....	22
6. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ – ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ	
<i>Anas &amp; Tadorna</i> .....	24
6.1 <i>Anas crecca</i> .....	25
6.2 <i>Anas Penelope</i> .....	26
6.3 <i>Anas platyrhynchos</i> .....	27
6.4 <i>Tadorna tadorna</i> .....	28
6.5 Κατανομή των 4 ειδών υδρόβιων πτηνών.....	28
6.6 Ενδιαιτήματα των 4 ειδών υδρόβιων πτηνών .....	28
6.7 Σίτιση των 4 ειδών υδρόβιων πτηνών .....	29
6.8 Αναπαραγωγή των 4 ειδών υδρόβιων πτηνών.....	29

<b>7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>31</b>
7.1 Συλλογή δειγμάτων .....	31
7.2 Απομόνωση του DNA.....	31
7.3 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της ποσότητας DNA .....	33
7.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	33
7.4.1 Υλικά για την προετοιμασία της PCR .....	34
7.4.2 Στάδια θερμικής κυκλοποίησης.....	35
7.4.3 Συνθήκες PCR.....	37
7.4.4 Πειραματική Διαδικασία PCR .....	38
7.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	38
7.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα μορίων DNA στην πηκτή ηλεκτροφόρησης.....	38
7.5.2 Διαλύματα πηκτής αγαρόζης.....	39
7.5.3 Παρασκευή πηκτή αγαρόζης .....	40
7.5.4 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.....	40
7.5.5 Έλεγχος των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης .....	40
7.6 Μέθοδος SSCP – Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας.....	41
7.6.1 Στάδια SSCP ανάλυσης .....	42
7.6.2 Περιορισμοί SSCP ανάλυσης.....	42
7.6.3 Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης.....	42
7.6.4 Προετοιμασία δειγμάτων – Αποδιάταξη προϊόντων PCR – ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης.....	43
7.6.5 Χρώση με νιτρικό άργυρο .....	44
7.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR – Αλληλούχηση για την ταυτοποίηση πολυμορφισμών .....	45
7.8 Επεξεργασία αποτελεσμάτων και σύγκριση αλληλουχιών .....	45
7.8.1 Ποιοτικός έλεγχος χρωματογραφημάτων .....	46
7.8.2 Στοιχισμός αλληλουχιών .....	46
<b>8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>47</b>
8.1 Απομόνωση του DNA.....	47
8.2 PCR.....	47
8.3 Ανάλυση SSCP .....	49
8.4 Αποτελέσματα αλληλούχησης .....	50
8.5 Αμινοξική ανάλυση .....	52
<b>9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>53</b>
<b>10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>55</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΕΞΕΛΙΞΗ

Στην επιστήμη της βιολογίας, με τον όρο εξέλιξη νοείται η αλλαγή στις ιδιότητες ενός πληθυσμού οργανισμών στο πέρασμα του χρόνου, μεταξύ διαφορετικών γενεών (Futuyma 1991). Εξελικτικές θεωρούνται ειδικά οι αλλαγές που κληροδοτούνται μέσω του γενετικού υλικού από γενιά σε γενιά, συνιστούν, επομένως, μια πληθυσμιακή διαδικασία και είναι σαφώς διακριτές, από την οντογένεση, ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού ατομικά. Τέτοιου τύπου μεταβολές που μπορεί να παρατηρηθούν σε μικρή κλίμακα σε κάθε γενιά, μακροπρόθεσμα είναι εφικτό να οδηγήσουν σε σημαντικές διαφοροποιήσεις στις ιδιότητες ενός οργανισμού, ώστε να επάγουν τελικά τη δημιουργία διακριτών ειδών. Η εξέλιξη αποτελεί φαινόμενο που υλοποιείται σταδιακά και σε μεγάλο βάθος χρόνου. Με λίγες εξαιρέσεις, απαιτείται το πέρασμα αρκετών γενεών για εξελικτικές αλλαγές μεγάλης κλίμακας, όπως για παράδειγμα η εξέλιξη των πτηνών από τα ερπετά. Λαμβάνει επίσης χώρα με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με το είδος του οργανισμού και το περιβάλλον του (Coyne 2009).

Η εξέλιξη μπορεί να θεωρηθεί ως μία δισδιάστατη πορεία. Η μία διάσταση αναφέρεται σε μεταλλάξεις και γενετικούς ανασυνδυασμούς που δημιουργούν γενετική ποικιλότητα, ενώ η δεύτερη διάσταση, αναφέρεται στις δυνάμεις και στις διαδικασίες, όπως η γονιδιακή ροή, η γενετική παρέκκλιση και η φυσική επιλογή, οι οποίες παρουσιάζουν τη διαφορική μεταβίβαση της γενετικής ποικιλότητας από γενιά σε γενιά. Ωστόσο, ο τρόπος που αντιδρούν οι παράγοντες αυτοί, έτσι ώστε να προκληθούν σοβαρές μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές που καταλήγουν σε νέο είδος, δεν είναι απόλυτα γνωστός (Parsons 1973). Πάνω στη δισδιάστατη μορφή της εξέλιξης μπορεί να ασκήσει τη δράσης της ειδογένεση.

Με τον όρο *ειδογένεση* περιγράφεται η εξελικτική διαδικασία με την οποία νέα βιολογικά είδη δημιουργούνται από ένα μοναδικό προγονικό είδος. Κατά την ειδογένεση, στα ευκαρυωτικά είδη, πραγματοποιείται διαχωρισμός μιας γενετικής δεξαμενής σε δύο ή περισσότερες, καθώς και διαφοροποίηση ενός φαινοτύπου σε περισσότερους. Οι γενετικοί φραγμοί στη διαειδική αναπαραγωγή - απομονωτικοί μηχανισμοί – προκύπτουν με διάφορους τρόπους και αντίστοιχα η ειδογένεση μπορεί να ταξινομηθεί κυρίως σε δύο κατηγορίες. Αυτές οι δύο ταξινομήσεις δίνουν έμφαση, στη γεωγραφική κλίμακα μέσα στην οποία μπορεί να συμβεί η ειδογένεση και στα γενετικά γεγονότα που οδηγούν στην αναπαραγωγική απομόνωση (Futuyma 1991).

Το **είδος** είναι μια γενετική, αναπαραγωγική και οικολογική μονάδα, η οποία προκύπτει εξελικτικά με την συσσώρευση πολλών γενετικών αλλαγών σε έναν πληθυσμό, με την πάροδο μεγάλων χρονικών περιόδων. Τα άτομα ενός είδους ανήκουν σε μια κοινή γονιδιακή δεξαμενή, με την ανάπτυξη όμως αναπαραγωγικών απομονωτικών μηχανισμών εμποδίζεται η γονιδιακή ανταλλαγή μεταξύ των πληθυσμών που ανήκουν σε διαφορετικά είδη.

Η εμφάνιση νέων ειδών απαιτεί την ταυτοποίηση αυτών και τη διάκριση μεταξύ τους καθώς και από το προγονικό είδος από όπου προήλθαν.

## 1.2 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ

Έχουν γίνει τεράστιες προσπάθειες πάνω στη βαθύτερη μελέτη των οργανισμών, όμως καμία δεν μπόρεσε να κλείσει τους οργανισμούς μέσα σε αριθμούς ή σε απόλυτους ορισμούς. Έτσι και για ένα είδος δημιουργούνται στην πράξη προβλήματα στην ταυτοποίησή του, τα κυριότερα από τα οποία οφείλονται (Hickman 2001):

1. Στην **ποικιλότητα** που παρουσιάζουν τα άτομα των πληθυσμών ενός είδους κυρίως λόγω ποικιλομορφίας, φυλετικού διμορφισμού και διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης.
2. Στην **ασεξουαλική αναπαραγωγή** με παρθενογένεση, αυτογαμία ή ψευδογαμία, με αποτέλεσμα ο ορισμός του είδους δεν μπορεί καθοριστεί καθώς, δεν υπάρχει αλληλογονιμοποίηση
3. Σε **μη ολοκληρωμένη ειδογένεση**. Υπάρχουν πληθυσμοί που βρίσκονται στη φάση της διαφοροποίησής τους σε νέα είδη χωρίς όμως η εξελικτική διαδικασία να έχει ολοκληρωθεί. Η μη ολοκληρωμένη ειδογένεση οδηγεί στην:
  - A. Εμφάνιση αναπαραγωγικής απομόνωσης χωρίς ταυτόχρονη μορφολογική διαφοροποίηση
  - B. Εμφάνιση έντονης μορφολογικής διαφοροποίησης χωρίς αναπαραγωγική απομόνωση
  - Γ. Στην εμφάνιση υβριδισμού λόγω αδυναμίας ολοκλήρωσης της διαδικασίας της γενετικής απομόνωσης δύο συγγενικών ειδών

## 1.3 Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ

Τα είδη συχνά διαφέρουν σε αρκετούς χαρακτήρες, πολλοί από τους οποίους δεν συνεισφέρουν στην αναπαραγωγική απομόνωση. Οι γενετικές διαφορές μεταξύ των ειδών συμπεριλαμβάνουν αλληλόμορφα που διέφεραν ήδη ως προς τη συχνότητά τους μεταξύ των πληθυσμών, πριν ακόμη οι πληθυσμοί αυτοί απομονωθούν γενετικά, αλληλόμορφα που οι συχνότητές τους διαφοροποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της ειδογένεσης και τέλος αλληλόμορφα που οι συχνότητές τους διαφοροποιήθηκαν μετά την ολοκλήρωση της αναπαραγωγικής απομόνωσης (Futuyma 1995).

Η γενετική βάση των μορφολογικών διαφορών μεταξύ των ειδών μπορεί να καθοριστεί μόνο όταν τα υβρίδια είναι αρκετά γόνιμα ώστε να δώσουν δεύτερη υβριδική γενιά (F<sub>2</sub>) ή απογόνους από ανάδρομη διασταύρωση. Ιδιαίτερα στα ζώα, τέτοιες γενετικές αναλύσεις δείχνουν ότι οι μορφολογικές διαφορές καθορίζονται από αρκετά ή και πολλά γονίδια, που συχνά έχουν προσθετική επίδραση στο φαινότυπο (Templeton 1981).

Τέτοιοι είδους διαφορές, σε μοριακό ή μορφολογικό επίπεδο, προσπαθούν να αξιοποιήσουν οι ερευνητές ώστε να τις χρησιμοποιήσουν ως εργαλείο για τη διάκριση και τη ταυτοποίηση κυρίως στενά συγγενικών ειδών.

#### 1.4 ΑΡΧΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗΣ ΕΙΔΩΝ

Πριν από την εισαγωγή των μοριακών μεθόδων, οι γενετικές μελέτες γίνονταν κυρίως μέσω διασταυρώσεων ορισμένων ειδών που μπορούσαν να ελεγχθούν σε εργαστηριακές συνθήκες (μοσχομπίζελα του Mendel, βακτήριο *E.coli*, καλαμπόκι *Zea mays*, η φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*, ποντίκι *Mus musculus* κ.α). Τέτοιου είδους μελέτες ήταν αδύνατο να αποκαλύψουν το υψηλό ποσοστό ποικιλότητας που έχει η πληθώρα των ζώντων οργανισμών του πλανήτη. Αυτό το πρόβλημα λύθηκε με τις μοριακές μεθόδους που μπορούν να έχουν εφαρμογή σε κάθε γονίδιο ή πρωτεϊνικό προϊόν του, σε όλους τους οργανισμούς.

Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και η αποκάλυψη γενετικών πολυμορφισμών με τη χρήση μοριακών δεικτών σε πληθυσμιακό επίπεδο, καθιερώθηκε μετά το 1960, με την εφαρμογή της μεθόδου ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Harris 1966, Harris 1976), που αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στην πληθυσμιακή γενετική ανάλυση και την εξελικτική έρευνα. Η πρώτη προσπάθεια για την προσέγγιση της εξελικτικής διαδικασίας σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, έγινε με τη βοήθεια της τεχνικής της υβριδοποίησης DNA (Britten 1968). Η ανακάλυψη των ενδονουκλεασών περιορισμού (Meselson 1968) καθώς και της υβριδοποίησης κατά Southern (Southern 1975), έδωσε σημαντική ώθηση στην μελέτη της γενετικής ποικιλότητας στο επίπεδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η τεχνική του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA (Maxam 1977, Sanger 1977) συνέβαλε στην αποκωδικοποίηση της γενετικής πληροφορίας στο επίπεδο του DNA. Η διαπίστωση ότι υπάρχουν διαδοχικά επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες στο πυρηνικό γονιδίωμα, οδήγησε, στα τέλη της δεκαετίας του 1980, στην ανάπτυξη μιας νέας τεχνικής που ονομάζεται αποτύπωμα DNA (DNA fingerprinting) (Hillis 1987). Τέλος, η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) συνέβαλλε στη χρήση και άλλων μεθόδων μελέτης γενετικών πολυμορφισμών, όπως οι μέθοδοι AFLPs, SSCPs κ.α, οι οποίες αρχίζουν να χρησιμοποιούνται ευρύτερα στη γενετική ανάλυση των πληθυσμών.



## 2. ΔΕΙΚΤΕΣ

Μέχρι σήμερα, έχει γίνει χρήση πληθώρας μεθόδων ανίχνευσης της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού, σε έρευνες που αφορούν κατ' αρχάς στη μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών και εν συνεχεία στην καταγραφή και μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων ενός πληθυσμού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις κατηγορίες γενετικών δεικτών:

- **Μορφολογικοί δείκτες:** πρόκειται για γονίδια που είναι υπεύθυνα για κάποιο μορφολογικό γνώρισμα ενός οργανισμού, τα διαφορετικά αλληλόμορφα των οποίων προκαλούν τους διάφορους φαινοτύπους. (χρώμα, μέγεθος, πειράματα ανθεκτικότητας κ.α) (Χατζόπουλος, 2001)
- **Βιοχημικοί δείκτες:** είναι δείκτες που βασίζονται σε πολυμορφισμούς ισοενζύμων που παρουσιάζουν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Στα περισσότερα είδη ο πολυμορφισμός των ενζύμων είναι περιορισμένος, εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο και υπόκειται σε μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζονται και από το περιβάλλον (Harris 1966 Lewontin 1966)
- **Μοριακοί δείκτες:** μικρές περιοχές του γονιδιώματος που χρησιμοποιούνται ως δείκτες γενετικής ποικιλομορφίας

### 2.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η ανάπτυξη μοριακών δεικτών επέφερε επανάσταση στον τομέα της πληθυσμιακής γενετικής. Οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο και η χρησιμότητά τους εστιάζεται στη μελέτη της κληρονομικότητας και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών με την αξιοποίηση του πολυμορφισμού που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA χωρίς κάποια αναγκαία επίπτωση στα προϊόντα που τυχόν κωδικοποιούν (Fanourakhs 2004). Επιπλέον δεν εξαρτώνται ούτε από τα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού, ούτε από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Χατζόπουλος 2001).

### 2.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα (Avisé 1987, Hu 1995) ώστε να παρουσιάζουν τη βέλτιστη χρησιμότητα:

- Παρουσία πολυμορφισμού και ύπαρξη πολλών αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο
- Μεντελική κληρονομικότητα με συνεπικρατή αλληλόμορφα
- Υψηλός συντελεστής κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι η παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων

- Άμεσος τρόπος μετάδοσης, χωρίς ανασυνδυασμό ή άλλες γενετικές αναδιάταξεις
- Απλή γενετική δομή χωρίς πολύπλοκα στοιχεία όπως, μεταθετά στοιχεία, ψευδογονίδια και ιντρόνια
- Δυνατή η διάκριση μεταξύ ομόζυγης και ετερόζυγης κατάστασης
- Χαμηλό κόστος, γρήγορη μεθοδολογία απομόνωσης

### **DNA barcoding**

DNA barcodes είναι μικρές αλληλουχίες που συμβάλλουν στη διάκριση των ειδών σε ένα ευρύ φάσμα ζωντανών οργανισμών. Στην τεχνική, DNA barcoding, συνήθως χρησιμοποιούνται αλληλουχίες των μιτοχονδρίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακριβή ταυτοποίηση του είδους. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των DNA barcodes είναι ότι διαφέρουν ελάχιστα μέσα στο είδος, αλλά είναι διαφορετικά ανάμεσα στα είδη (Hebert 2003b).

Επίσης ένας μοριακός δείκτης για να καταστεί κατάλληλος για την ταυτοποίηση των ειδών ενός γένους και τη διάκριση τους από άλλα είδη θα πρέπει να πληρεί ορισμένα κριτήρια (Hebert 2003):

1. Στην ομάδα μελέτης, θα πρέπει να είναι αρκετά μεταβλητός ώστε να μπορεί να διακρίνει τα είδη μεταξύ τους, αλλά να είναι αρκετά συντηρημένος και λιγότερο μεταβλητός εντός των ατόμων του ίδιου είδους
2. Οι θέσεις όπου συνδέονται οι εκκινήτες θα πρέπει να είναι επαρκώς συντηρημένες ώστε να καταστεί δυνατή μια αξιόπιστη ενίσχυση χωρίς τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων
3. Το γονίδιο θα πρέπει να μεταφέρει επαρκείς φυλογενετικές πληροφορίες ώστε να κατατάσσει τα είδη σε μείζονες ταξινομικές ομάδες μετά τη χρήση απλών φαινοτυπικών προσεγγίσεων
4. Η ενίσχυση και η αλληλούχησή του θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ισχυρή και αξιόπιστη και να εμφανίζει ανθεκτικότητα σε μεταβλητές εργαστηριακές συνθήκες και τυποποιημένα πρωτόκολλα
5. Η στοίχιση των αλληλουχιών του θα πρέπει να είναι δυνατή και μεταξύ μακρινών συγγενικών ταξινομικών ομάδων
6. Να εξελίσσεται με ραγδαίο ρυθμό ώστε να εμφανίζονται νέες καταστάσεις χαρακτήρων ακόμα και κατά τη διάρκεια ζωής ενός είδους, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες μικροεξέλιξης

## **2.3 ΚΥΡΙΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ**

### **2.3.1 Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA (RFLPS - Restriction Fragment Length Polymorphisms)**

Η μεθοδολογία του πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP) βασίζεται στην πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού. Αποτέλεσμα της πέψης είναι η δημιουργία διαφορετικού μεγέθους γονιδιακών τμημάτων από το

αρχικό DNA-στόχο. Ο πολυμορφισμός παρατηρείται σε ένα πρότυπο περιοριστικών τμημάτων DNA όταν συμβεί κάποια μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού όπως επίσης και από τη δημιουργία ή την εξάλειψη μία νέας θέσης αναγνώρισης από ένθεση ή απαλοιφή περιοχών DNA, με αποτέλεσμα την αλλαγή του μεγέθους του τμήματος του DNA. (Botstein 1980, Χατζόπουλος 2001).

### **2.2.3 Τυχαίο Ενισχυμένο Πολυμορφικό DNA (RAPDs - Random Amplified DNA)**

Η μέθοδος του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD) βασίζεται στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (random primers), κυρίως δεκαμερών σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη θερμοανθεκτική πολυμεράση TaqI και ένα μόνο εκκινητή ανά αντίδραση, με σκοπό την ενίσχυση του DNA. Τα προϊόντα της ενίσχυσης διαχωρίζονται σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης ή ακρυλαμίδης και γίνονται ορατά με χρώση συνήθως βρωμιούχου αιθιδίου. Ο πολυμορφισμός εκδηλώνεται με τις διαφορές του προτύπου των ζωνών του DNA στην ηλεκτροφόρηση και μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές βάσεων της θέσης υβριδισμού, καθιστώντας τη μη αναγνωρίσιμη από τον εκκινητή, σε απάλειψη της θέσης υβριδισμού καθώς και σε προσθήκες ή ελλείψεις τμημάτων DNA που διαφοροποιούν το μέγεθος της αλληλουχίας που ενισχύεται με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διαφορετικές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση (Williams 1990, Χατζόπουλος 2001).

### **2.3.3 Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων Τμημάτων (AFLPs - Amplified Fragment Length Polymorphisms)**

Η τεχνολογία πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP) παρέχει ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον εντοπισμό γενετικής ποικιλομορφίας. Η μεθοδολογία, είναι ανάλογη με αυτή των RFLPs και βασίζεται κυρίως σε τρία στάδια: (α) εφαρμογή περιοριστικών ενζύμων (β) επιλογή και ενίσχυση των θραυσμάτων και (γ) ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και ταυτοποίηση των πολυμορφισμών, λόγω των διαφορών που προκύπτουν στον αριθμό και το μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων (Vos 1995, Χατζόπουλος 2001).

### **2.3.4 Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSRs – Simple Sequence Repeats) και διαδοχικές επαναλήψεις μικρού μήκους (STRs – Short Tandem Repeats)**

Όλες αυτές οι μεθοδολογίες αναφέρονται σε μικρές συνεχείς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών 2, 3 ή 4 νουκλεοτιδίων (Olson 1989). Τέτοιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό σε πολλά γονιδιώματα, έχουν αρκετά ευδιάκριτα αλληλόμορφα ανά γενετικό τόπο καθώς και υψηλή συχνότητα ετεροζυγωτίας (Carafell, 1998). Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την ενίσχυση γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές συμπληρωματικούς των

αλληλουχιών εκατέρωθεν των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Εμφανίζονται ως ζώνες ηλεκτροφόρησης με διαφορετικό μέγεθος που οφείλεται στο διαφορετικό αριθμό των επαναλήψεων των συγκεκριμένων αλληλουχιών (Hearne 1992, Gale 2005, Χατζόπουλος 2001).

### 2.3.5 STS, EST, SSCP, SNP, ASOH, DASH

- ✓ **STS – Sequence Tagged Site. Θέσεις επισημασμένης αλληλουχίας:** είναι ένας γενικός όρος για τους μοριακούς δείκτες που βασίζονται σε γενετικούς τόπους που ταυτοποιούνται βάσει της αλληλουχίας τους. Είναι μοναδιαίοι, τουλάχιστον όσον αφορά τη θέση των εκκινήτων. Μπορεί να είναι απλές γενωμικές αλληλουχίες, ESTs, μικροδορυφορικοί τόποι, γενικά οποιοδήποτε αλληλουχία που είναι μοναδική στο γονιδίωμα ενός οργανισμού. Ο πολυμορφισμός αυτών των μοριακών δεικτών ανιχνεύεται με PCR.
- ✓ **EST – Expressed Sequence Tag. Επισημάνση εκφραζόμενων αλληλουχιών:** Είναι ένα υποσύνολο των STSs που προέρχεται από κλώνους cDNA μικρότερου μήκους. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό μεταγράφων γονιδίων, και αποτελεί ένα εργαλείο για τον εντοπισμό γονιδίων και την εύρεση των αλληλουχιών τους, σε οργανισμούς που δεν είναι γνωστή η αλληλουχία τους (Adams 1991, Χατζόπουλος 2001).
- ✓ **SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism. Πολυμορφισμός Μονόκλωνης Αλυσίδας:** Αποτελεί μία εναλλακτική προσέγγιση του εντοπισμού της ποικιλομορφίας της αλληλουχίας των ενισχυμένων τμημάτων DNA, πέρα από την αλληλούχηση. Η μεθοδολογία αυτή εκμεταλλεύεται την τάση του μονόκλωνου DNA να αναδιπλώνεται σχηματίζοντας εσωτερικά ζεύγη βάσεων που οδηγούν σε θηλιές και πτυχώσεις που προσδίδουν στη μονόκλωνη αλυσίδα μία μοναδική τρισδιάστατη δομή που είναι ανεξάρτητη του μήκους της. Αλλαγές στην αλληλουχία του DNA μπορεί να επηρεάσουν τη διαμόρφωση των μονόκλωνων μορίων DNA, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αλλαγές στη μετακίνηση των μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση και έτσι να εντοπιστεί ο πολυμορφισμός (Patrinou 2008).
- ✓ **SNP – Single Nucleotide Polymorphism. Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου:** Είναι μία παραλλαγή της αλληλουχίας του DNA που συμβαίνει όταν ένα νουκλεοτίδιο – A, T, C, G – στο γονιδίωμα διαφέρει μεταξύ των ατόμων ενός είδους ή στο ένα εκ των δύο χρωμοσωμάτων σε ένα άτομο. Μπορεί να ταυτοποιηθεί με τη μέθοδο RFLP, την ανάλυση SSCP καθώς και με αλληλούχηση (Landegren 1988, Χατζόπουλος 2001).

Στην παρούσα μελέτη, επιχειρήθηκε η γενετική ταυτοποίηση ειδών του γένους *Anas* και *Tadorna* με τη χρήση δύο γονιδίων, του *MC1R* και του 16S rRNA. Τα εν λόγω γονίδια, διαθέτουν τα περισσότερα από τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω, καθιστώντας τα υποψηφίους μοριακούς δείκτες για την συγκεκριμένη μελέτη.

## 3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΩΝ (MCRs)

### 3.1 ΕΙΔΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΗΣ

Οι υποδοχείς της μελανοκορτίνης (melanocortin receptors) είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων της ροδοψίνης, υποδοχείς που διαθέτουν 7 διαμεμβρανικές περιοχές και συνδέονται με πρωτεΐνες G (7-transmembrane, G protein-coupled receptors) (Fredriksson 2003). Υπάρχουν πέντε γνωστά μέλη του συστήματος των υποδοχέων μελανοκορτίνης (melanocortin receptor system) που έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα και το καθένα διαθέτει διαφορετική εξειδίκευση για τις μελανοκορτίνες (Voisey 2003). Τα 5 αυτά μέλη παρουσιάζουν τις παρακάτω λειτουργίες (Haskell 2006):

- **MC1R**: συμμετέχει στην εναπόθεση μελανίνης στο δέρμα και στο χρωματισμό του τριχώματος και του πτερώματος στα ζώα, ενώ έχει εντοπιστεί και η έκφραση του και σε άλλους ιστούς και κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των λευκοκυττάρων (Haskell 2006)
- **MC2R**: εκφράζεται στο φλοιό των επινεφριδίων και στο λιπώδη ιστό και διαδραματίζει ρόλο στη στεροειδογένεση και στη λιπόλυση αντίστοιχα
- **MC3R**: εμπλέκεται στον καρδιαγγειακό έλεγχο και στην νατριουρία
- **MC4R**: είναι σημαντικός στη διατροφική συμπεριφορά και στη ρύθμιση της ομοιόστασης του βάρους και του ενεργειακού ισοζυγίου.
- **MC5R**: εκφράζεται σε μία σειρά περιφερειακών ιστών, συμπεριλαμβανομένων των επινεφριδίων, των λιποκυττάρων, των λευκών αιμοσφαιρίων (Chhajlani 1996) και συμμετέχει επίσης, στην εξωκρινή λειτουργία και ρύθμιση των σηματογόνων αδένων (Chen 1997)

### 3.2 ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΗΣ

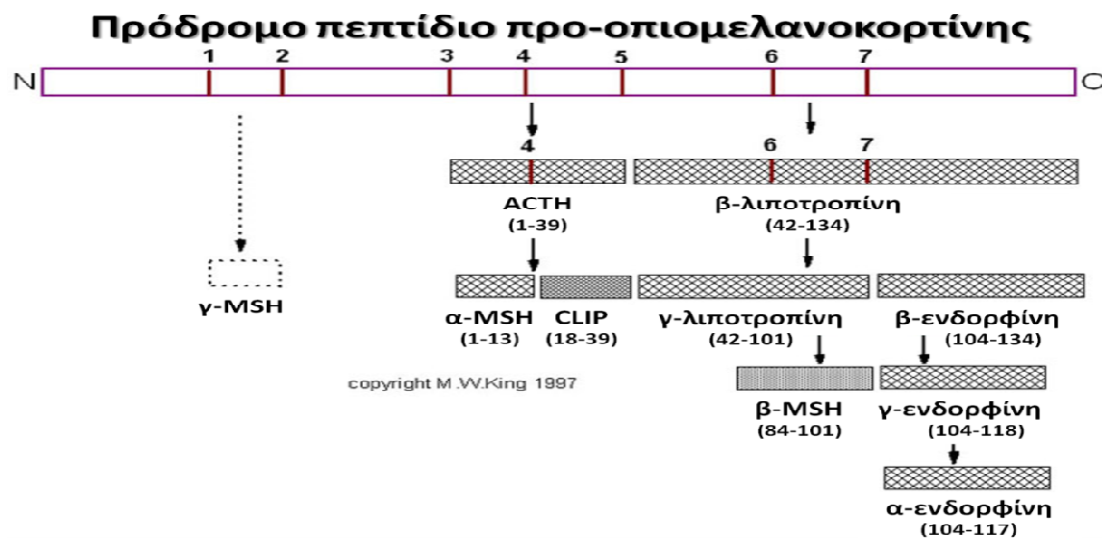
Πολλοί προσδέτες για τους υποδοχείς έχουν αναφερθεί, οι οποίοι αφού συνδεθούν στους υποδοχείς, είτε τους ενεργοποιούν (συνθετικοί και ενδογενείς αγωνιστές), είτε τους αναστέλλουν (ενδογενείς αντίστροφοι αγωνιστές, ανταγωνιστές) (Cone 1996).

Οι βασικές κατηγορίες των αγωνιστών των MCRs είναι οι μη επιλεκτικοί αγωνιστές (Afamelanotide,  $\alpha$ -MSH, bremelanotide, melanotan II), οι επιλεκτικοί, για τον MC4R, αγωνιστές (ACTH, consyntropin, tetracosactide), οι επιλεκτικοί, για τον MC3R, αγωνιστές ( $\gamma$ -MSH) καθώς και οι επιλεκτικοί, για τον MC4R, αγωνιστές ( $\beta$ -MSH, THIQ). Οι κυριότεροι αντίστροφοι αγωνιστές και ανταγωνιστές των MCRs είναι οι MC1 επιλεκτικοί (agouti signaling peptide) και οι MC4 επιλεκτικοί (HS-014, HS-024, MCL-0042, MCL-0129, MPB-10, SHU-9119 και agouti-related protein).

Παρά την μεγάλη ποικιλία των προσδετών, θα επικεντρωθούμε στην ορμόνη μελανοτροπίνη ( $\alpha$ -MSH, alpha-melanocyte stimulating hormone), η οποία δρα ως επιλεκτικός αγωνιστής και στο σηματοδοτικό πεπτίδιο agouti (agouti signalling peptide), το οποίο δρα ως επιλεκτικός MC1R ανταγωνιστής. Οι δύο προσδέτες συνδέονται αντιστρεπτά στον MC1R και ρυθμίζουν τη δράση του.

Η ορμόνη μελανοτροπίνη (α-MSH, alpha-melanocyte stimulating hormone) ανήκει σε μια ομάδα πεπτιδικών ορμονών που ονομάζονται μελανοκορτίνες (MCs, melanocortins) και παράγονται στα κύτταρα του μεσαίου λοβού της υπόφυσης. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει την επινεφριδιοφλοιοτρόπο ορμόνη (ACTH), και διάφορες μορφές της ορμόνης μελανοτροπίνης (alpha-, beta-, gamma-MSH). Οι μελανοκορτίνες ρυθμίζουν ποικίλες μεταβολικές και φυσιολογικές λειτουργίες όπως: μελανογένεση, ενεργειακή ομοιόσταση, φλεγμονή, ανοσορύθμιση, στεροειδογένεση, αναπαραγωγή, σεξουαλική διέγερση και λειτουργία, εξωκρινή έκκριση, αναλγησία, όρεξη, καρδιαγγειακή ρύθμιση, νευρομυική αναγέννηση και έλεγχο της θερμοκρασίας (Gantz 2003).

Οι μελανοκορτίνες, τα οπιοειδή, η β-, γ- λιποτροπίνη καθώς και η β- ενδορφίνη είναι πεπτίδια που αποτελούν προϊόντα διάσπασης του μεγάλου πρόδρομου πεπτιδίου προ-οπιομελανοκορτίνης (POMC, pro-opiomelanocortin) μέσω της δράσης των ενδοπεπτιδασών (Mountjoy 1997) (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Επεξεργασία πρόδρομης πρωτεΐνης POMC. Το πεπτίδιο POMC που αποτελείται από 267 αμινοξέα, τα οποία διασπάται πρωτεολυτικά από ενδοπεπτιδάσες σε διάφορα πολυπεπτιδικά θραύσματα. Αυτά τα θραύσματα περιλαμβάνουν την ACTH, τη β-λιποτροπίνη, την α-, β-, γ-ενδορφίνη καθώς και την α-, β-, γ-MSH. (<http://themedicalbiochemistrypage.org>)

Το σηματοδοτικό πεπτίδιο agouti (agouti signalling peptide), το οποίο αναφέρεται και ως agouti, είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 131 αμινοξέα (Gantz 2003). Λειτουργεί ως ένας αντίστροφος αγωνιστής στους υποδοχείς της μελανοκορτίνης, και συγκεκριμένα στον *MC1R* (Lu 1994). Στα ποντίκια το γονίδιο agouti κωδικοποιεί ένα παρακρινές σηματοδοτικό μόριο που προκαλεί την σύνθεση της φαιομελανίνης από τα μελανοκύτταρα του θύλακα της τρίχας, μία κίτρινη χρωστική ουσία, αντί για την καφέ – μαύρη χρωστική ουσία, ευμελανίνη. Η εκκρινόμενη πρωτεΐνη:

- (1) δρα ως αντίστροφος αγωνιστής της α-MSH
- (2) επηρεάζει την ποιότητα της μελάγχρωσης των τριχών
- (3) παίζει ρόλο στις νευροενδοκρινικές δράσεις της μελανοκορτίνης
- (4) έχει λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων στα λιποκύτταρα (Gantz, 2003).

## 4. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΗΣ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΗΣ 1 (MC1R)

### 4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ MC1R

Ο χρωματισμός στο δέρμα, τα μαλλιά και τα μάτια των θηλαστικών οφείλεται στη χρωστική ουσία μελανίνη, η σύνθεση της οποίας, γνωστή με τον όρο μελανογένεση, συντελείται σε εξειδικευμένα κύτταρα, τα μελανοκύτταρα, σε ειδικά οργανίδια που ονομάζονται μελανοσώματα (Gantz 2003). Πρόκειται για μια πολύπλοκη ενζυμική διαδικασία, κατά την οποία η τυροσίνη μετατρέπεται σε υδροξυφαινολαανίνη (DOPA), η οποία οξειδώνεται σε DOPA κινόνη και τελικά σε μαύρη- καφέ ευμελανίνη ή σε κόκκινο - κίτρινη φαιομελανίνη. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων, που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή, έχουν ως αποτέλεσμα μια ποικιλία φαινοτύπων που χαρακτηρίζονται από διαφορετική απόθεση και πυκνότητα έως πλήρη έλλειψη μελανίνης. Η πλήρης έλλειψη της μελανίνης, έχει σαν αποτέλεσμα την απουσία όλων των δερματικών και οφθαλμικών χρωστικών (οφθαλμοδερματικός αλφισμός, OCA1) (Μαργαρίτης 2004).

Μία από τις κύριες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της φυσιολογικής μελανογένεσης είναι, όπως προαναφέρθηκε, ο υποδοχέας της μελανοκορτινής 1 (MC1R), γνωστός και ως «υποδοχέας της ορμόνης που διεγείρει τα μελανοκύτταρα» (melanin activating peptide receptor - MSHR). Ο MC1R βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των μελανοκυττάρων και αποτελεί έναν συνδυασμό G-πρωτεΐνης και υποδοχέα (GPCR) που συνδέεται με τις μελανοκορτίνες, οι οποίες ελευθερώνονται από το μεσαίο λοβό της υπόφυσης στον εγκέφαλο και διεγείρουν την παραγωγή και απελευθέρωση της μελανίνης (Μαργαρίτης 2004).

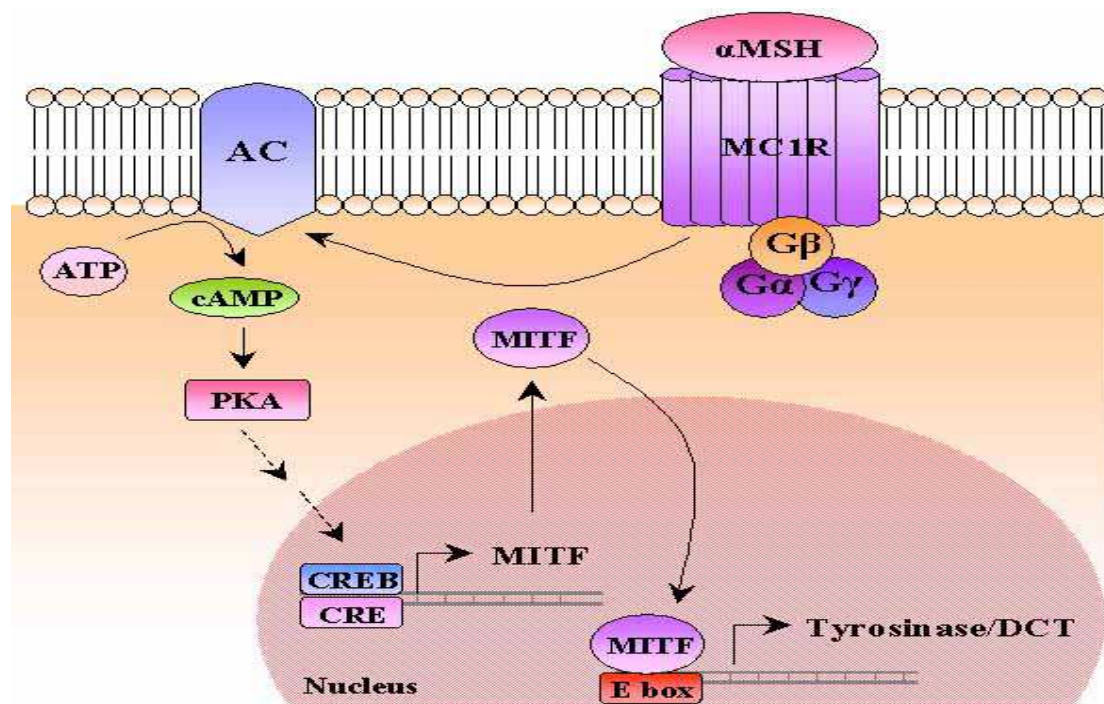
Ο MC1R ελέγχει τον τύπο της μελανίνης που παράγεται από τα μελανοκύτταρα. Όταν δεν είναι ενεργοποιημένος, παράγεται φαιομελανίνη, ενώ στην περίπτωση που ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί από έναν συνδέτη, κυρίως την α-MSH, δίνει το έναυσμα για μια σειρά χημικών αντιδράσεων εντός των μελανοκυττάρων που τα διεγείρουν για την παραγωγή ευμελανίνης, προκαλείται, δηλαδή, μετατόπιση της βιοσυνθετικής διαδικασίας προς την πιο σκουρόχρωμη χρωστική. Η σχετική ποσότητα των δύο αυτών ουσιών προσδιορίζει, σε σημαντικό βαθμό, το χρωματισμό δέρματος και τριχωτού, εξ' ου και παρατηρείται ένα ευρύ φάσμα διαβαθμίσεων και επομένως, έντονη ποικιλομορφία, με τους πολυμορφισμούς που παρατηρούνται στο γονίδιο του MC1R να προσθέτουν ενδιαφέρουσα χρωματικά πρότυπα και σχέδια (Lightner 2008, <http://ghr.nlm.nih.gov/>).

### 4.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ MC1R ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Ο πιο σημαντικός ρυθμιστής της σύνθεσης της μελανίνης είναι η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), που διεγείρει απευθείας τα μελανοκύτταρα με την έκκριση μονοξειδίου του αζώτου (NO) και cGMP, τα οποία επάγουν τη σύνθεση της μελανίνης ή προκαλεί την έκκριση παραγόντων, όπως την α-MSH, από τα κερατινοκύτταρα (Μαργαρίτης, 2004). Ο άνθρωπος συνήθως ανταποκρίνεται στην υπεριώδη ακτινοβολία αυξάνοντας την παραγωγή του συνδέτη του MC1R.

Όταν ο συνδέτης δεσμεύεται στον *MC1R*, συντελείται ενεργοποίηση των πρωτεϊνών G και διέγερση της αδενυλικής κυκλάσης (AC) (Lightner 2008). Μέσα από μία σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που ακολουθούν (Εικόνα 2), τα μελανοκύτταρα μεταστρέφουν τη βιοσύνθεση της μελανίνης από τη φαιομελανίνη στην ευμελανίνη, η οποία διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο σε ό, τι αφορά τις βλαβερές συνέπειες της ηλιακής ακτινοβολίας UV.

Οι άνθρωποι, στους οποίους παρατηρείται εντονότερη παραγωγή ευμελανίνης, χαρακτηρίζονται από καστανά ή μαύρα μαλλιά και σκουρόχρωμο δέρμα που «μαυρίζει» εύκολα, ενώ εκείνη που παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες φαιομελανίνης τείνουν να εμφανίζουν κόκκινα ή ξανθά μαλλιά, φακίδες, και ανοιχτόχρωμο δέρμα με μικρή έως ελάχιστη ικανότητα μαυρίσματος και διατρέχουν αυξημένο, συγκριτικά, κίνδυνο καταστροφής του δέρματος από την επιβλαβή δράση της ακτινοβολίας UV (Rouzaud 2006, <http://ghr.nlm.nih.gov>).



**Εικόνα 2:** Σηματοδοτικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της μελανίνης. Η μελανογένεση ενεργοποιείται από ένα συνδέτη, την  $\alpha$ -MSH, που προσδένεται και ενεργοποιεί τον *MC1R*. Ο *MC1R* με τη βοήθεια της πρωτεΐνης G ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (AC), η οποία με τη σειρά της καταλύει τη μετατροπή του κυτταροπλασματικού ATP σε cAMP. Τα υψηλά επίπεδα cAMP, δρουν ως δεύτεροι διαβιβαστές και ενεργοποιούν την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία με την ενεργοποίησή της, φέρεται στον πυρήνα και φωσφορυλιώνει την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων CREB (cAMP Responsive Element - Binding). Τα φωσφορυλιωμένα CREBs συνδέονται σε αλληλουχίες του DNA, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στο c-AMP (CRE, cAMP responsive elements) και ως εκ τούτου επάγουν την μεταγραφή των γονιδίων όπως το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα MITF (Microphthalmia – associated transcription factor). Ο μεταγραφικός παράγοντας MITF που είναι σημαντικός για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων, δεσμεύεται στο E-box του υποκινητή του γονιδίου τυροσινάσης, επάγοντας με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφή του. Τέλος, η τυροσινάση, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την τυροσίνη, καταλύει την παραγωγή της μελανίνης και άλλων χρωστικών ουσιών (Kabbarah 2006)



Τα ποικίλα αλληλόμορφα στο γονίδιο του *MC1R* συνδέονται άρρηκτα με τις συνήθεις διαφοροποιήσεις στο δέρμα και το χρώμα των μαλλιών. Ορισμένα αλληλόμορφα είναι πιο συχνά σε άτομα με ανοιχτές αποχρώσεις και αυξημένη ευαισθησία στην έκθεση του ήλιου και θεωρείται ότι αυτά τα αλληλόμορφα του γονιδίου του *MC1R* μειώνουν την ικανότητα του υποδοχέα να διεγείρει την παραγωγή της ευμελανίνης, προκαλώντας τα μελανοκύτταρα να παράξουν ως επί το πλείστον φαιομελανίνη. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο του *MC1R* έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υποδοχέα που δέχεται συνεχώς μηνύματα – ακόμη και όταν δε βρίσκεται σε κατάσταση διέγερσης – ή τη μείωση της δραστηριότητας του υποδοχέα.

Επομένως, γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι ο *MC1R* αποτελεί βασικό γονίδιο στη φυσιολογική χρώση των ανθρώπων, αν και ένας σημαντικός αριθμός άλλων γονιδίων συμβάλλουν επίσης στο χρώμα του δέρματος και της τρίχας σε ένα άτομο.

#### **4.3 Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ *MC1R* ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**

Τα αλληλόμορφα για τη συστατική ενεργοποίηση του *MC1R* οδηγούν σε μαύρο χρωματισμό του τριχώματος, ενώ αλληλόμορφα απώλειας λειτουργίας (loss-of function) του *MC1R* είναι υπολειπόμενα και οδηγούν σε τρίχωμα φωτεινότερων αποχρώσεων. Αλληλόμορφα του γονιδίου του *MC1R* συνδέονται, επίσης, με μαύρο, κόκκινο/ κίτρινο και λευκό χρώμα τριχώματος. Συγκεκριμένα, κατά την ενεργοποίηση μίας από τις μορφές της MSH, συνήθως α-MSH, ο *MC1R* ξεκινά ένα σύνθετο μηχανισμό σηματοδότησης που οδηγεί στην παραγωγή της καφέ ή μαύρης ευμελανίνης. Όταν, όμως, ο συνήθης ανταγωνιστής του *MC1R*, δηλαδή ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο agouti (agouti signaling peptide – ASIP), συνδέεται ανταγωνιστικά στον *MC1R*, εμποδίζει το συνδέτη του να συνδεθεί και να τον ενεργοποιήσει, οπότε συντίθεται φαιομελανίνη. Έτσι, με διαφορετικά επίπεδα πρωτεΐνης α-MSH και agouti, ο υποδοχέας μπορεί να στραφεί στη βιοσύνθεση της μελανίνης προς οποιαδήποτε εκ των δύο διαφορετικών μορφών (Lightner 2008). Η παλμική φύση της σηματοδότησης ASIP μέσω *MC1R* παράγει το χαρακτηριστικό κίτρινο και μαύρο «πρότυπο ζωνών» (agouti banding pattern), που παρατηρείται στο τρίχωμα των περισσότερων θηλαστικών. Σε μερικά είδη, όμως η σηματοδότηση ASIP περιορίζεται σε ορισμένες περιοχές του σώματος, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα άλογα: ένα κανελί άλογο μπορεί να εμφανίζει μαύρα πόδια, χαιτή και ουρά, αλλά σώμα κοκκινωπό (<http://en.wikipedia.org>).

Ελαφρά διαφορετικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει ο *MC1R* σε ψυχρόαιμα ζώα, όπως τα ψάρια, τα αμφίβια και τα ερπετά. Σε αυτά, ο *MC1R* λειτουργεί ως βασικός μεσολαβητής του προσαρμοστικού κρυπτικού χρωματισμού, δηλαδή μεσολαβεί στην ανταπόκριση των χρωματοφόρων κυττάρων των εν λόγω ζώων στη φωτεινότητα του περιβάλλοντος που εκτίθενται, έχοντας επιπτώσεις τόσο στον αριθμό τους, όσο και στην ποσότητα μελανίνης που το καθένα περιέχει. Η ενεργοποίηση του *MC1R* από την α-MSH έχει σαν αποτέλεσμα τη διασπορά των μελανοσωμάτων που έχουν πληρωθεί με ευμελανίνη σε ολόκληρο το εσωτερικό των μελανοφόρων κυττάρων, πράγμα που προσδίδει στο δέρμα των ζώων μια σκουρόχρωμη χροιά, ενώ αν η διαδικασία αντιστραφεί, με τη δράση της ορμόνης MCH (melanin-concentrating hormone) τα μελανοσώματα συγκεντρώνονται σε μία

μικρή περιοχή στο κέντρο των μελανοφόρων και το ζώο παρουσιάζει μια πιο ανοιχτόχρωμη συνολική εμφάνιση, χρωματικές εναλλαγές που συχνά παρατηρούνται ως απάντηση στις διαφοροποιήσεις του περιβάλλοντος (Logan 2006, Mundy 2009).

#### 4.4 Ο ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΤΕΡΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ – ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ *MC1R*

Η τεράστια ποικιλία χρωματικών παραλλαγών και διακυμάνσεων στο πτέρωμα των πτηνών έχει γίνει αντικείμενο ιδιαίτερης προσοχής και διερεύνησης σε ειδικά επιστημονικά πεδία, όπως για παράδειγμα στην οικολογία και την εξελικτική βιολογία, καθώς ο χρωματισμός του πτερώματος φαίνεται να εμπλέκεται σε πλήθος διαφορετικών τομέων έρευνας και μελέτης, συμπεριλαμβανομένης της σεξουαλικής επιλογής (Darwin 1871, Andersson 1994), της γεωγραφικής διαφοροποίησης και ειδογένεσης (Mayer 1963) και της εξέλιξης των φυλετικών διμορφισμών (Dunn 2001) και πολυμορφισμών (Roulin 2004). Μεταβολές στο χρωματισμό του πτερώματος τόσο εντός όσο και μεταξύ των ειδών εμφανίζουν μια ισχυρή γενετική συνιστώσα και είναι έντονο το ενδιαφέρον για τη γενετική βάση της προσαρμογής και της φαινοτυπικής εξέλιξης. Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα, έχει σημειωθεί μικρή πρόοδος στον καθορισμό των γενετικών αλλαγών που εμπλέκονται, αν και έχει καταστεί σαφές ότι οι πολυποίκιλοι χρωματικοί τόνοι είναι αποτέλεσμα πολλαπλών και διαδοχικών μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια (Buckley 1987, Merila 2001, Price 2002, Mundy 2005b).

Το χρώμα του πτερώματος συνίσταται στην παρουσία λιποχρώματος και μελανίνης. Το λιπόχρωμα αποτελείται από ουσίες προερχόμενες από τη σύνθεση της καροτίνης – κίτρινης και κόκκινης –, ενώ η μελανίνη συντίθεται στον οργανισμό των πτηνών από μη βασικά αμινοξέα και βιταμίνη B2 και η απόθεσή της στο δέρμα τους αυξάνεται κατά την έκθεσή τους στην ηλιακή ακτινοβολία. Μία υπόθεση υποστηρίζει, ότι τα πτηνά με ανοιχτόχρωμες αποχρώσεις, προέρχονται από μια μετάλλαξη που εμπόδισε το αρχέγονο γονίδιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό της μελανίνης του πτερώματος, να λειτουργήσει, με αποτέλεσμα ο φαινότυπος στο πτέρωμα να παρουσιάζει μόνο λιποχρώματα (Φασούρας).

Οι μελανίνες εμπλέκονται σε ευρύ και πολυδιάστατο φάσμα λειτουργιών στα πτηνά, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής προστασίας, της προστασίας από τα παράσιτα και μιας ποικιλίας λειτουργιών σηματοδότησης. Τα αποτελέσματα πληθώρας μελετών της μοριακής γενετικής βάσης του μελανισμού στα πτηνά αποκαλύπτουν μια ισχυρή διατήρηση των εξελικτικών μηχανισμών σε ποικιλία ειδών, με την επαναλαμβανόμενη συμμετοχή του *MC1R* να αποτελεί το αντιπροσωπευτικό παράδειγμα, αντικατοπτρίζοντας ένα συνδυασμό της υψηλής μεταβλητότητας για τη λειτουργικότητα ασυνήθιστων αλληλομόρφων του γονιδίου, μια σχετική απουσία επιβλαβών πλειοτροπικών επιδράσεων των γονιδίων αυτών, καθώς και την προβολή επικρατών ή συνεπικρατών μελανικών αλληλομόρφων στην φυσική επιλογή (Mundy 2005a).

Σημαντικό πλήθος ερευνών καταδεικνύουν ότι ο *MC1R* είναι το κύριο γονίδιο για τον καθορισμό του φυσιολογικού μελανισμού του πτερώματος και ότι τα διαφορετικά αλληλόμορφα του γονιδίου του *MC1R* προκαλούν σωρεία διαφορετικών προτύπων μελανισμού σε διαφορετικά είδη (Mundy 2005a).

#### 4.5 ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MC1R* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

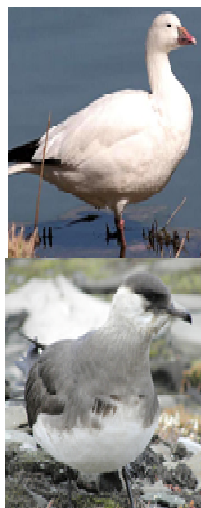
Το γονίδιο *MC1R*, παρουσιάζει πολυμορφισμούς μεταξύ των ταξινομικών ομάδων. Συσχετίσεις μεταξύ πολυμορφισμών σε αυτό το γονίδιο και διαφορετικών επιπέδων μελανίνης έχουν αποδειχτεί για μία ποικιλία ταξινομικών ομάδων όπως τα ψάρια, τα ερπετά, τα πτηνά και τα θηλαστικά (Baia 2007). Πιο συγκεκριμένα:



Στα bananaquits (*Coereba flaveola*), μία μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση, Glu92Lys, αποτελεί ένα μελανικό διακόπτη που προκαλεί συστατική ενεργοποίηση του *MC1R* με αποτέλεσμα τη μετάβαση του χρώματος των πτηνών από το κίτρινο στο εντελώς μαύρο πτέρωμα (Robbins 1993, Ling 2003).



Στο οικόσιτο κοτόπουλο (*Gallus gallus*), μία μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση, Glu92Lys, στην πρωτεΐνη *MC1R* οδηγεί στην εμφάνιση ενός μελανικού φαινοτύπου (Takeuchi 1998).



Στις lesser snow geese (*Anser caerulescens*) και στα arctic skuas (*Stercorarius parasiticus*) μία σημειακή μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση (Val85Met και Arg233His αντίστοιχα) στο εξωτερικό μέρος της δεύτερης διαμεμβρανικής περιοχής του *MC1R*, επηρεάζει τη δραστηριότητά του όπως επίσης, και την ποσότητα της μελανίνης (Majerus 2003). Αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μετάλλαξης είναι η εμφάνιση φαινοτύπου μπλε πτερώματος ενώ ο άγριος τύπος είναι λευκό πτέρωμα. Στη περίπτωση των arctic skuas, οι μεταβολές στον υποδοχέα καθορίζουν τις σταδιακές μεταβολές στην ποσότητα της μελανίνης που θα κατανεμηθεί σε κάθε φτερό, ενώ στις lesser snow geese, ο πολυμορφισμός στο γονίδιο *MC1R* συσχετίζεται με τον αριθμό των φτερών που είναι μελανισμένα (Mundy 2004).



Στα fairy – wren (*Malurus leucopterus*), πολλοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο *MC1R* οδήγησαν στην εμφάνιση πτηνών με μαύρο χρώμα πτερώματος, τα οποία διαφέρουν αισθητά από τα πτηνά με μπλε χρωματισμό πτερώματος (Doucet 2004).



Στα red-footed boobis (*sula sula*), δύο μη συνώνυμες αμινοξικές αντικαταστάσεις (Val85Met, His207Arg) και ο διαφορετικός αριθμός αντιγράφων των αλληλομόρφων του *MC1R*, προκαλούν τη διάκριση των *sula sula* σε 3 κύριες κατηγορίες, σύμφωνα με το χρωματισμό τους πτερώματός τους, (λευκό, λευκό με καφέ ουρά, καφέ με πολλές κηλίδες ενδιάμεσα). Οι αντικαταστάσεις οδηγούν στην μείωση του αριθμού των λευκών φτερών τα οποία εδράζονται στην ωμοπλατιαία περιοχή (Baia 2007).



Στους **κύκνους**, τρεις μη συνώνυμες αμινοξικές αντικαταστάσεις (R230H, E92A και E100K) οδήγησαν σε αλλαγές στην αμινοξική ακολουθία λειτουργικών περιοχών του γενετικού τύπου *MC1R* (εμφάνιση πολυμορφισμών στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης) με αποτέλεσμα τη διαφορετική εμφάνιση των δύο ειδών, *C. atratus* (μαύρο σώμα) και *C. melanoscyphus* (μαύρος λαιμός), από το είδος *C. Cygnus* (λευκό σώμα) λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του υποδοχέα (Pointer 2008).



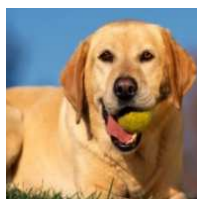
Στα **beach mice** (*Peromyscus polionotus*), στα **mammoth** καθώς και στις **μαύρες αρκούδες** (*Ursus arctos*) μία μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση (R65C, R65C

και Y298C αντίστοιχα), οδηγεί σε χαμηλή δραστηριότητα του *MC1R* με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανοιχτόχρωμου φαινοτύπου (Hoekstra 2006, Rompler 2006, Ritland 2001)



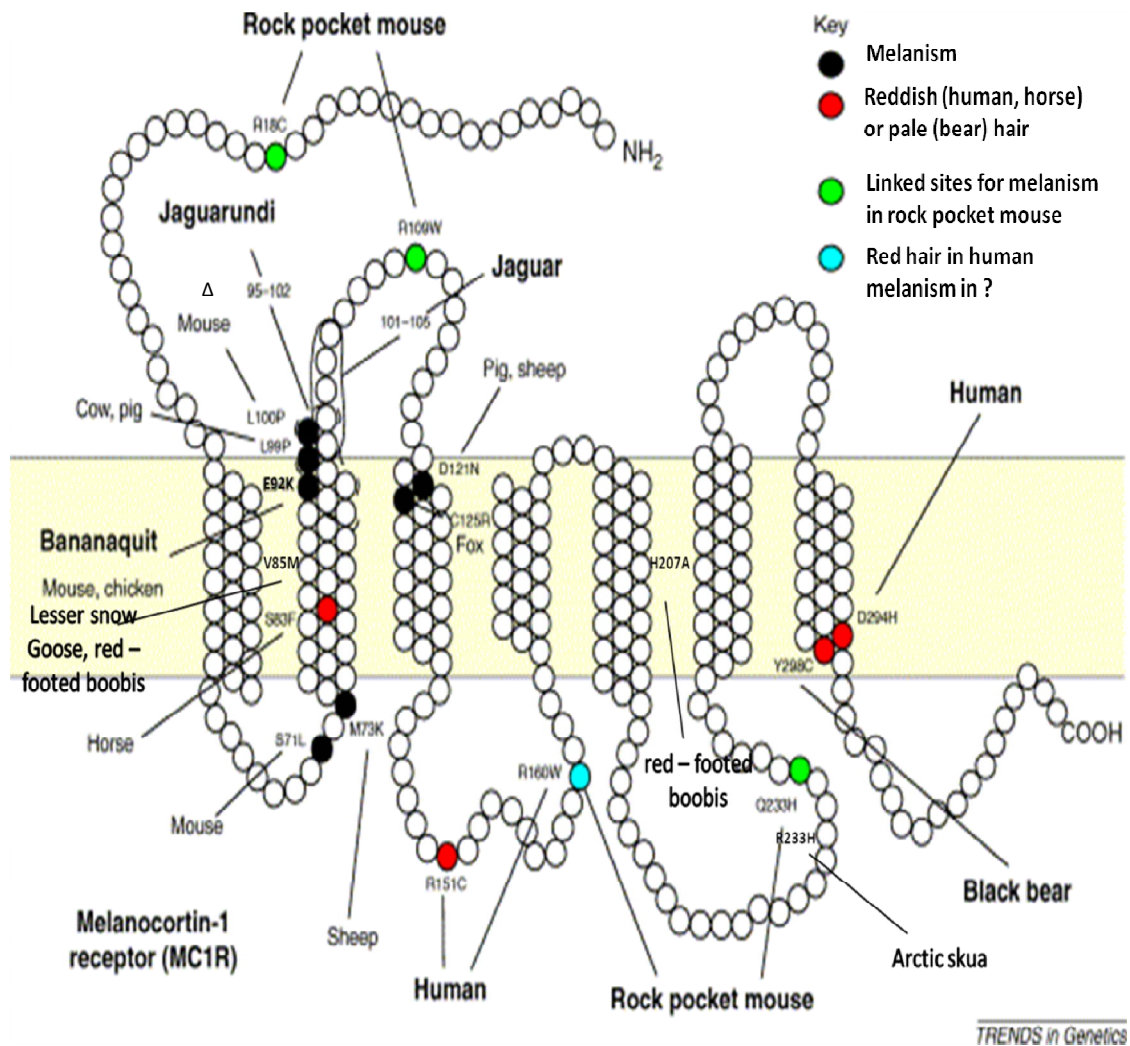
Στους χοίρους **British Large Black** καθώς και στους **Chinese Meishan** χοίρους, δύο μη συνώνυμες αμινοξικές αντικαταστάσεις

(V92M και L99P), συσχετίζονται με το μαύρο φαινότυπο σε αυτά τα είδη (Lightner 2008). Αντιθέτως, στους χοίρους **Pietrain**, μία παρεμβολή δύο ζευγών βάσεων στο κωδικόνιο 23 (πt67insCC) προκαλεί μία μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας, η οποία καθιστά την πρωτεΐνη *MC1R* μη λειτουργική με αποτέλεσμα την εμφάνιση μαύρων κηλίδων (Kijas 2001).



Στο **Yellow Labrador**, στο **Golden Retriever** καθώς και στο **Irish Setter**, μία μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας (R306ter) οδηγεί σε έναν μη λειτουργικό υποδοχέα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός κίτρινου/ κόκκινου φαινοτύπου (Lightner 2008).

Στην Εικόνα 3, απεικονίζεται ο *MC1R* καθώς και οι αντικαταστάσεις των αμινοξέων που σχετίζονται με αλλαγές στο χρώμα του πτερώματος, του τριχώματος και των μαλλιών που συμβαίνουν στα πτηνά, στα θηλαστικά και στον άνθρωπο αντίστοιχα.



**Εικόνα 3:** Μη συνώνυμες αμινοξικές αντικαταστάσεις στην ακολουθία του *MC1R* που σχετίζονται με αλλαγές στο χρώμα του πτερώματος και των μαλλιών σε πτηνά και θηλαστικά αντίστοιχα. Το εξωκυτταρικό τμήμα είναι από επάνω. Ο συμβολισμός των αμινοξέων με ένα γράμμα (απ1 3) χρησιμοποιείται για να μας δείξει τις μη συνώνυμες αμινοξικές αντικαταστάσεις και το γράμμα Δ αναφέρεται σε διαγραφές. Οι αντικαταστάσεις που συνδέονται με τον μελανισμό επισημαίνονται με μαύρο χρωματισμό, ενώ οι αντικαταστάσεις που συνδέονται με τη μείωση της ευμελανίνης (συχνά μαζί με την αύξηση της φαιομελανίνης) επισημαίνονται με κόκκινο χρωματισμό. Επίσης με πράσινο χρωματισμό επισημαίνονται οι θέσεις οι οποίες συνδέονται με το μελανισμό στα rock pocket mice, ενώ με γαλάζιο χρωματισμό επισημαίνονται οι θέσεις που σχετίζονται με τα κόκκινα μαλλιά στον άνθρωπο. Η αντικατάσταση R160W συνδέεται τόσο με το μελανισμό στα rock pocket mice όσο και με το κόκκινο χρώμα των μαλλιών στους ανθρώπους. (<http://criticalbiomass.freeblog.hu>)

Επομένως, γίνεται άμεσα αντιληπτή, η σημασία περαιτέρω διερεύνησης της επίδρασης και λειτουργίας του *MC1R*, καθώς η μελάγχρωση αποτελεί ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη της γενετικής βάσης του φαινοτύπου. Η θέση του *MC1R* στη βιοσυνθετική οδό της μελανογένεσης είναι τόσο ιδιαίτερη, ώστε οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως το ίδιο φαινοτυπικό αποτέλεσμα δε θα μπορούσε να επιτευχθεί με υποκαταστάσεις σε άλλο τόπο (Mundy 2005a).

## 5. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

### 5.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ

Έχουν αναπτυχθεί δύο βασικές θεωρίες για την προέλευση του μιτοχονδρίου. Η μία θεωρία υποστηρίζει ότι το γονιδίωμα των οργανιδίων προέρχεται από ευκαρυωτικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα, από θραύσματα του πυρηνικού γονιδιώματος που εγκοιλώθηκαν σε μεμβράνες και σχημάτισαν τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες (Cavalier 1975). Όμως, βάσει μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών παρατηρήσεων, τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες προσομοιάζουν πολύ περισσότερο με προκαρυωτικά κύτταρα, παρά με ευκαρυωτικά. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη της θεωρίας της ενδοσυμβίωσης (Margoulis 1970), σύμφωνα με την οποία τόσο τα μιτοχόνδρια όσο και οι χλωροπλάστες είναι απόγονοι οργανισμών παρεμφερών με βακτήρια, οι οποίοι για κάποιους λόγους εισήλθαν σε κύτταρα πρώτο - ευκαρυωτικών οργανισμών, απέκτησαν μαζί τους σχέσεις ενδοσυμβίωσης και στη συνέχεια εξελίχθηκαν σε μιτοχόνδρια ή χλωροπλάστες. Από τη στιγμή που δημιουργήθηκε η σχέση ενδοσυμβίωσης, η οποία είναι συνεργιστική αλλά και ταυτόχρονα ανταγωνιστική, τα πρώτο - μιτοχόνδρια μπορούσαν να επηρεάσουν όχι μόνο τη δική τους αναπαραγωγή, αλλά και το ρυθμό αναπαραγωγής του ξενιστή τους (Gray 1992, Gray 1993).

### 5.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟΥ – ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

Το μιτοχόνδριο είναι ένα ζωτικό οργανίδιο του κυττάρου και υπάρχει σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα καθώς, αποτελεί το «εργοστάσιο» παραγωγής ενέργειας του κυττάρου και κατ' επέκταση του ζωντανού οργανισμού (Henze 2003). Εκτός από τον εφοδιασμό με ενέργεια στα κύτταρα, το μιτοχόνδριο εμπλέκεται σε μια σειρά άλλων διαδικασιών, όπως τη θερμογένεση, τη σηματοδότηση, την κυτταρική διαφοροποίηση, τον κυτταρικό θάνατο, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την ανάπτυξη των κυττάρων (McBride 2006). Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια που περιέχουν το δικό τους γενετικό υλικό (mtDNA), το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει αρκετά αντίγραφα DNA. Το mtDNA στα περισσότερα ζωικά είδη είναι μητρικής προέλευσης. Έχουν καταγραφεί όμως και ορισμένες εξαιρέσεις πατρικής κληρονόμησης στα ποντίκια, ή διπατρικής προέλευσης στα μύδια *Mytilus* (Zouros 1992). Το mtDNA στους περισσότερους οργανισμούς είναι απλοειδές, δίκλωνο, κυκλικό μόριο, όμως υπάρχουν και περιπτώσεις, όπου το μιτοχόνδριο είναι γραμμικό (πρωτόζωα, μερικοί μύκητες) (Fukuhara 1993). Σε γενικές γραμμές το μιτοχόνδριο στερείται ιντρονίων (Anderson 1981), όμως υπάρχουν και οργανισμοί, όπως οι ζύμες και τα πρώτιστα, που διαθέτουν ιντρόνια στο μιτοχονδριακό τους DNA (Hebbar 1992, Gray 1998). Το μήκος του κυμαίνεται από 15 έως 20kb.

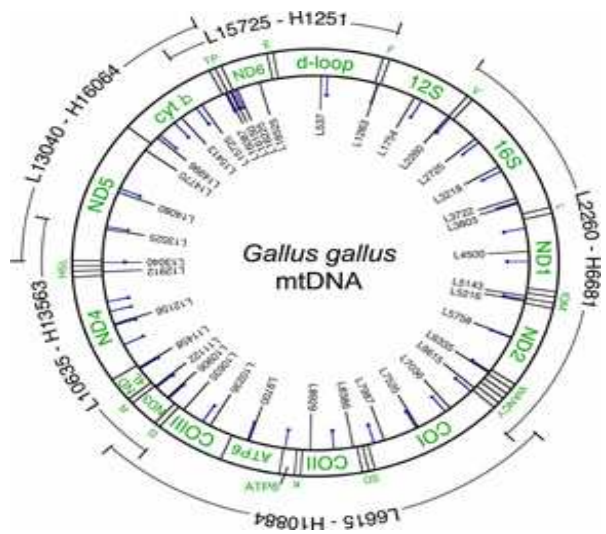
Εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις το μιτοχondριακό γονιδίωμα των μεταζώων περιέχει 37 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν (Εικόνα 4):

- 22 μόρια tRNA
- 2 μόρια rRNA (12S, 16S rRNA)
- 13 μόρια mRNA (Chan 2006).

Το 12S rRNA κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος. Το 16S rRNA κωδικοποιεί για τη μικρή και τη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος αντίστοιχα.

Τα 13 μόρια mRNA μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς e<sup>-</sup> και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση:

- Κυτόχρωμα b
- 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1-6,4L)
- 3 υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (CO I, II, III)
- 2 υπομονάδες (6 και 8) της μιτοχondριακής συνθετάσης του ATP (De La Cruz 1984, Meyer 1993)



**Εικόνα 4:** Μιτοχondριακό DNA του πτηνού Gallus Gallus (Sorenson 2003)

Η δομή του mtDNA είναι πολύ συμπαγής καθώς περιοχές, όπως ιντρόνια, ψευδογονίδια αλλά και επαναλαμβανόμενο DNA συνήθως απουσιάζουν. Ωστόσο, υπάρχει μια μη κωδικοποιούσα περιοχή, η περιοχή ελέγχου ή βρόχος D (στα έντομα ονομάζεται AT – rich region), που περιέχει αλληλουχίες απαραίτητες για την έναρξη της αντιγραφής και της μεταγραφής (Krzywinski 2006).

Στα πτηνά, η πρώτη ολοκληρωμένη αλληλουχία mtDNA που δημοσιεύτηκε, ήταν αυτή του κοτόπουλου. Τα χαρακτηριστικά του mtDNA των πτηνών είναι κατά κύριο λόγο όμοια με των υπόλοιπων σπονδυλωτών, όμως παρόλα αυτά παρουσιάζει ορισμένες σημαντικές διαφορές στη σύσταση του μιτοχondρίου και τη διάταξη των γονιδίων (Desjardins 1990, Quinn 1993).

### 5.3 ΧΡΗΣΗ ΜΙΤΟΧONΔΡΙΑΚΟΥ DNA (mtDNA) ΩΣ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ

Το mtDNA των πολυκύτταρων οργανισμών παρουσιάζει μοναδικά χαρακτηριστικά που το καθιστούν πολύτιμο εργαλείο για τη διερεύνηση ταξινομικών, φυλογενετικών, πληθυσμιακών και εξελικτικών προβλημάτων και το κάνουν πλεονεκτικότερο σε σχέση με το πυρηνικό DNA (Brown 1982, Jeong 2009):

- **Ευκολία απομόνωσης**
- **Υψηλός αριθμός αντιγράφων**
- **Μικρό μέγεθος**
- **Συντήρηση της αλληλουχίας και της δομής στα μετάζωα**
- **Μητρική κληρονομικότητα**
- **Έλλειψη ανασυνδυασμού**
- **Γρήγορη εξέλιξη** (5-10 φορές υψηλότερος ρυθμός εξέλιξης από το πυρηνικό DNA), λόγω του ταχύτερου ρυθμού μεταλλάξεων που παρουσιάζει στην αλληλουχία των βάσεων του, της έλλειψης επιδιορθωτικού μηχανισμού μεταλλάξεων (Brown 1983) καθώς και της έλλειψης ιστονών στο μόριο του mtDNA (Avisé 1991, Wilson 1985)
- **Διαφορετικοί ρυθμοί εξέλιξης σε διαφορετικά τμήματα του μορίου.** Η περιοχή ελέγχου και οι περιοχές, που είναι δεκτικές σε σιωπηλές αντικαταστάσεις, των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεϊνικές υπομονάδες, εξελίσσονται ταχύτερα σε σχέση με άλλα μιτοχονδριακά τμήματα τα οποία παρουσιάζουν ομολογία σε πλήθος οργανισμών (Fos 1990)

Το mtDNA έχει καθιερωθεί ως ένα από τα δημοφιλέστερα γενετικά συστήματα για τη μελέτη της γενετικής δομής των πληθυσμών, της γονιδιακής ροής, της βιογεωγραφίας και των φυλογενετικών σχέσεων σε ενδοειδικό και διαειδικό επίπεδο (Moritz 1987). Γενικά το mtDNA σε διαειδικό επίπεδο μπορεί να προσδιορίσει και να ταυτοποιήσει με ακρίβεια τα είδη. Σε ενδοειδικό επίπεδο, λόγω των ταχύτερων ρυθμών αλλαγών που παρουσιάζει στην αλληλουχία των βάσεων του σε σχέση με το πυρηνικό DNA είναι δυνατόν να εντοπισθούν διαπληθυσμιακές διαφορές ακόμα και σε περιπτώσεις που οι πληθυσμοί εμφανίζονται όμοιοι στο πυρηνικό DNA. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του mtDNA έχει αποκαλύψει συχνά τεράστια γενετική ποικιλότητα τόσο μέσα όσο και ανάμεσα σε γειτονικούς πληθυσμούς (Avisé 1994). Επομένως δίνει τη δυνατότητα να βρεθούν ειδικοί δείκτες που θα συμβάλλουν στην ταυτοποίηση των διαφορετικών πληθυσμών του είδους.

Τα περισσότερα από τα γονίδια του mtDNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, χρησιμοποιούνται για να εξεταστούν οι φυλογενετικές σχέσεις από το ταξινομικό επίπεδο της οικογένειας και χαμηλότερα (Navajas 1996). Το 12S rRNA είναι το πιο συντηρημένο γονίδιο του mtDNA και χρησιμοποιείται για την αποσαφήνιση φυλογενετικών σχέσεων σε επίπεδο του φύλου ή του υπόφυλου (Ballard 2004), ενώ το 16S rRNA εξελίσσεται πιο γρήγορα και χρησιμοποιείται συνήθως για μεσαία ταξινομικά επίπεδα των οικογενειών και των γενών. Στις “βαθιές” φυλογενέσεις έχει αποδειχθεί χρήσιμος μάρτυρας και το πρότυπο των αναδιατάξεων του mtDNA, το οποίο εμφανίζεται υψηλά συντηρημένο ανάμεσα στα διαφορετικά φύλα (Hwang 2001).



## 6. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ – ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Anas* & *Tadorna*

Το γένος *Anas* και το γένος *Tadorna* ανήκουν στην τάξη των χηνόμορφων (*Anseriformes*) πτηνών, των οποίων η εμφάνιση ανάγεται στη Παλαιόκαινη περίοδο, δηλαδή πριν από περίπου 65 - 55 εκατομμύρια χρόνια. Αυτή η ευρεία τάξη περιλαμβάνει περίπου 263 ζώντα είδη πτηνών σε 94 γένη. Τα γένη αυτών των ειδών κατανομούνται σε 3 οικογένειες: την οικογένεια *Anhimidae*, την οικογένεια *Anseranatidae* και την οικογένεια *Anatidae* (Ericson 1997). Πολλά είδη αυτής της τάξης είναι τεράστιας οικονομικής σημασίας για τον άνθρωπο, άλλα αποτελούν εκλεκτά θηράματα και μερικά συγκαταλέγονται στα ομορφότερα πτηνά.

Η οικογένεια των *Anatidae* περιλαμβάνει περίπου 146 είδη σε 40 γένη (πάπιες, χήνες και κύκνους). Αυτή η οικογένεια έχει μία παγκόσμια κατανομή, σε όλες τις ηπείρους - εκτός της ανταρκτικής - και τα περισσότερα νησιά της υψηλίου. Τα πτηνά αυτής της οικογένειας είναι εξελικτικά προσαρμοσμένα στην κολύμβηση, την επίπλευση στην επιφάνεια του νερού, καθώς και - σε ορισμένες περιπτώσεις - στην κατάδυση σε ρηχά νερά. Είναι γενικώς φυτοφάγα και μονογαμικά. Πέντε είδη έχουν εξαφανιστεί από το 1600, και πολλά άλλα απειλούνται με εξαφάνιση. Οι κυριότερες υποοικογένειες της οικογένειας *Anatidae* είναι οι ακόλουθες: *Dendrocygnae*, *Thalassorninae*, *Anserinae*, *Stictonettinae*, *Plectropterinae*, *Aythiinae*, *Merginae* και *Oxyurinae*, ***Tadorninae***, ***Anatinae*** (Johnson 1999).

Η υποοικογένεια ***Anatinae***, όπου ανήκει το γένος *Anas*, αριθμεί 50-60 ζώντα είδη που ταξινομούνται σε 8 γένη (Livezey 1986). Το γένος *Anas* αποτελείται κυρίως από 75 είδη υδρόβιων πτηνών, μικρότερα συνήθως σε σύγκριση με τα συγγενικά τους πτηνά, τους κύκνους και τις χήνες, που εμφανίζουν παγκόσμια εξάπλωση. Επίσης η οικόσιτη πάπια κατάγεται από την αγριόπαπια και έχει διατηρήσει τις συνήθειες και τα χαρακτηριστικά της

Η υποοικογένεια ***Tadorninae*** περιλαμβάνει κυρίως τις χηνόπαπιες. Σε αυτή την υποοικογένεια συγκαταλέγονται 10 διασωθέντα γένη με περίπου 24 ζωντανά είδη (ένα πιθανώς να έχει εξαφανιστεί) που παρουσιάζουν κατανομή στο νότιο ημισφαίριο, ενώ εμφανίζονται και λίγα στο βόρειο ημισφαίριο, τα οποία χαρακτηρίζονται ως παραφυλετική ομάδα (Sraml 1996). Το γένος *Tadorna* περιλαμβάνει 7 είδη το ένα εκ των οποίων είναι οι χηνόπαπιες, μία ομάδα μεγάλων ημι- χερσαίων υδρόβιων πτηνών που μπορεί να θεωρηθεί ενδιάμεσο των *Anserinae* και *Anatinae* (ενδιάμεσο μεταξύ χηνών και παπιών) (<http://wikipedia.org>)

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν 3 από τα 50 είδη του γένους *Anas* και 1 από τα 7 είδη του γένους *Tadorna*:

- *Anas Crecca* (*Common Teal*, *Eurasian Teal*, κικίρι)
- *Anas Penelope* (*Wigeon*, *Eurasian Wigeon*, σφυριχτάρι)
- *Anas Platyrhynchos* (*Mallard*, πρασινοκέφαλη)
- *Tadorna, Tadorna* (*Common Shelduck*, κοινώς βαρβάρα)

## 6.1 *Anas Crecca*

Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά του είδους *Anas Crecca*

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	<i>Anas Crecca</i> , Common Eurasian Teal, Κικκίρι (Linnaeus, 1758)
ΜΗΚΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	34-43 cm
ΜΗΚΟΣ ΦΤΕΡΩΝ	17.5-20.4 cm
ΑΝΟΙΓΜΑ ΦΤΕΡΩΝ	53-59 cm
ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	Βάρος αρσενικού: 360 gr Βάρος θηλυκού: 340 gr
ΜΗΚΟΣ ΡΑΜΦΟΥΣ	3.2–4 cm
ΑΒΓΑ	8-11 αυγά, επώαση για 21-23 μέρες
Φυλετικός διμορφισμός θηλυκών και αρσενικών ( <a href="http://e-fox.gr">http://e-fox.gr</a> )	

Η *Anas Crecca* είναι ένα από τα μικρότερα, πολύ όμορφα και πλέον διαδεδομένα είδη αγριόπαπιας που επισκέπτονται την Ελλάδα σε αρκετά μεγάλους αριθμούς. Το αναπαραγωγικό αρσενικό εμφανίζει γκρι πτέρωμα, ράμφος και πόδια, καφέ κεφάλι και λαιμό και πλατιά ιριδίζουσα σκούρα πράσινη κηλίδα σε σχήμα μισοφέγγαρου στην περιοχή του οφθαλμού. Το επάνω μέρος του σώματός του, είναι σκουρόχρωμης καφετί αποχρώσεως, όπως και τα φτερά του, στα οποία όμως υπάρχει μία πράσινη ακανόνιστη κηλίδα περιτριγυρισμένη από μία λευκή ράβδωση στο επάνω μέρος και μία σκούρα μαύρη ακανόνιστη κηλίδα προς το εξωτερικό. Το κάτω μέρος της *Anas Crecca* είναι υπόλευκου χρώματος όπως και το στήθος της, το οποίο όμως είναι διάστικτο με μαύρες και γκριζωπές αποχρώσεις. Η ουρά του είναι και αυτή σκούρου καφετί χρώματος, ανάλογο με το επάνω μέρος του σώματός του, ενώ τα ακριανά φτερά φέρουν ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Σε μη αναπαραγωγική περίοδο, το πτέρωμα, του αρσενικού μοιάζει περισσότερο με αυτό του θηλυκού πτηνού. Το θηλυκό έχει ένα γενικότερο σκούρο καφετί χρωματισμό, με το στήθος και τον λαιμό ελαφρώς ανοιχτότερου χρώματος, και εμφανίζει επίσης χρωματιστές ακανόνιστες κηλίδες στις φτερούγες του, ανάλογα με εκείνες των αρσενικών. Το ράμφος του θηλυκού είναι ροζ ή κίτρινο στη βάση και γίνεται πιο σκούρο γκρι προς την κορυφή, τα πόδια του γκρι – καφέ (Carboneras 1992) και η ίριδα πάντα καστανή (Εικόνα 5). Χαρακτηρίζονται, γενικά, ως θορυβώδη είδη (Madge 1987).



Εικόνα 5: Αριστερά αρσενικό *Anas Crecca*, και δεξιά θηλυκό *Anas Crecca* (<http://wikipedia.org> & <http://www.monasteriopiedra.com>)

## 6.2 *Anas Penelope*

Πίνακας 2: Βασικά χαρακτηριστικά του είδους *Anas Penelope*

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	<i>Anas Penelope</i> , Wigeon, Σφυριχτάρι (Linnaeus, 1758)
ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	Αρσενικό : 520-750 gr Θηλυκό : 430-550 gr
ΜΗΚΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	42-50 cm
ΑΝΟΙΓΜΑ ΦΤΕΡΩΝ	71-80 cm
ΜΗΚΟΣ ΡΑΜΦΟΥΣ	3.5 cm
ΑΒΓΑ	8-9 αυγά, επώαση για 24-25 μέρες
Φυλετικός διμορφισμός (Floyd, 2008)	



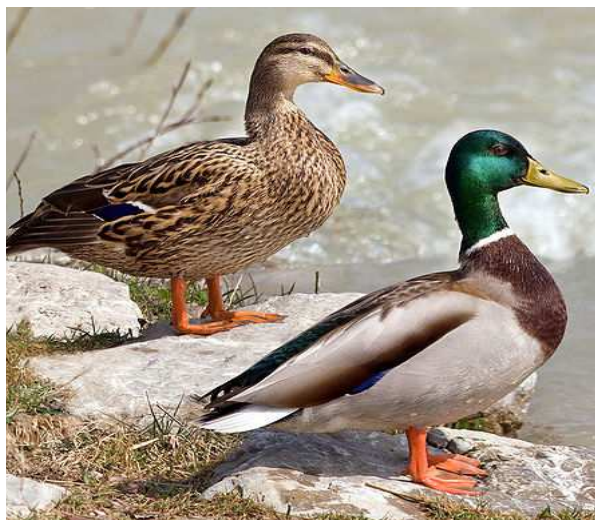
Εικόνα 6: *Anas Penelope* (<http://wikimedia.org>)

Η *Anas Penelope* είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα είδη αγριόπαπιας που επισκέπτονται την Ελλάδα. Το αρσενικό σε περίοδο αναπαραγωγής έχει καστανέρυθρο κεφάλι που φέρει χαρακτηριστικό χρυσοκίτρινο χρώμα στο κορυφαίο μέρος του (στέμμα). Το επάνω μέρος του σώματος, ο αυχένας, οι πλευρές και η ουρά έχουν γκριζωπό χρώμα με στενές και λεπτές εγκάρσιες, καφετί γραμμώσεις. Το κάτω μέρος του στήθους και η κοιλιά είναι λευκά, ενώ η ουρά στο τελειώμά της είναι μαύρη. Τα πρωτεύοντα φτερά είναι καφετί, ενώ στην πλάτη φέρει επιμήκη φτερά, μαύρου χρώματος με λευκοκίτρινες άκρες. Το μεγαλύτερο τμήμα του λαιμού και το επάνω μέρος του στήθους φέρουν ροζ – καφετί χρώμα. Τα μάτια των αρσενικών είναι κίτρινα και το ράμφος τους είναι γαλάζιο – μπλε με μαύρη άκρη, ενώ τα πόδια τους γκριζά ως μαύρα. Σε μη αναπαραγωγική περίοδο, το πτέρωμα του αρσενικού μοιάζει περισσότερο με αυτό του θηλυκού, το οποίο είναι μικρότερο σε μέγεθος και ο γενικός χρωματισμός του καφέ με μαύρες ή σκούρες καφετί κηλίδες ή στίγματα (Dunn 2006). Τα θηλυκά έχουν πιο στρογγυλό κεφάλι και μικρότερο λαιμό από τα αρσενικά. Τα μάτια τους είναι καφετί χρώματος και το ράμφος τους είναι ίδιο με το αρσενικό αλλά ελαφρώς πιο γκριζωπό (Εικόνα 6). Πρόκειται για θορυβώδη είδη. Το αρσενικό έχει ένα καθαρό σφύριγμα, ενώ το θηλυκό ένα χαμηλό βουητό.

### 6.3 *Anas Platyrhynchos*

**Πίνακας 3:** Βασικά χαρακτηριστικά του είδους *Anas Platyrhynchos*

<b>ΟΝΟΜΑΣΙΑ</b>	<i>Anas Platyrhynchos</i> , Mallard, Αγριόπαπια (Linnaeus, 1758)
<b>ΜΗΚΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ</b>	Αρσενικό: 50 –65 cm Θηλυκό: 50 – 56 cm
<b>ΑΝΟΙΓΜΑ ΦΤΕΡΩΝ</b>	81 - 98 cm
<b>ΒΑΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ</b>	Αρσενικό: 1.2 kg Θηλυκό: 1.0 kg
<b>ΑΒΓΑ</b>	8-13 αυγά, επώαση για 27-28 μέρες
<b>Φυλετικός διμορφισμός (Δαβανέλος, 2007)</b>	



**Εικόνα 7:** *Anas Platyrhynchos* (<http://wikipedia.org>)

Ένα από τα πλέον διαδεδομένα είδη αγριόπαπιας που επισκέπτονται τη χώρα μας, η *Anas Platyrhynchos*, είναι ένα είδος με ιδιαίτερη θηρευτική αξία. Το αρσενικό κατά την αναπαραγωγική περίοδο, έχει κεφάλι χρώματος πράσινου ιριδίζοντος. Το ίδιο χρώμα εμφανίζεται και στο λαιμό, το οποίο κατεβαίνει χαμηλά μέχρι το στήθος, όπου και διακόπτεται από ένα στενό άσπρο «δαχτυλίδι». Το χρώμα των φτερών του στήθους είναι σκοτεινό καστανέρυθρο, ενώ το χρώμα των φτερών της κοιλιάς και των πλευρών είναι ανοιχτό γκρι. Η ράχη καλύπτεται από ανοιχτόχρωμο καφέ – γκρι πτέρωμα, ενώ η ουρά είναι μαύρου χρώματος. Ένα από τα πλέον ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πρασινοκέφαλης είναι και το ουραίο φτερό, ένα κεντρικό φτερό κατά μήκος της ουράς, το οποίο παρουσιάζει μια εμφανή σύστριψη προς τα επάνω. Το ράμφος και τα πόδια είναι εντόνου πορτοκαλί χρώματος.

Κατά τη μη αναπαραγωγική περίοδο, το πτέρωμα της αρσενικής πάπιας γίνεται όμοιο με αυτό του θηλυκού, αν και εξακολουθεί να ξεχωρίζει από το κίτρινο ράμφος και το κοκκινωπό στήθος. Το χρώμα του σώματος του θηλυκού είναι μια πρόσμιξη ανοιχτού καφέ με σκούρες ραβδώσεις και στίγματα, με σκούρο καφέ ράμφος και κεφάλι και λεπτές σκούρες ραβδώσεις γύρω από τα μάτια. Τα φτερά τους έχουν την ανάλογη λάμψη των αρσενικών, με το χρώμα τους να είναι καφετί όπως και το στήθος τους (Εικόνα 7).

Είναι ένα θορυβώδες είδος, στο οποίο το αρσενικό έχει ένα ρινικό κάλεσμα, ενώ το θηλυκό, κλασική κραυγή πάπιας (Rogers 2001, Δαβανέλος 2009).

## 6.4 *Tadorna tadorna*

Η *Tadorna Tadorna* (Common Shelduck, κοινώς βαρβάρρα) είναι μία μεγάλη πάπια (1-1.5Kg) με εντυπωσιακό ασπρόμαυρο πτέρωμα. Το μήκος του σώματός της κυμαίνεται από 58 έως 71 cm και το άνοιγμα των φτερών της μπορεί να φτάσει τα 133 cm (<http://e-fox.gr>). Εκτός από το λευκό πτέρωμα στο σώμα, το μαύρο κεφάλι και το μαύρο μέρος του λαιμού, είναι πολύ χαρακτηριστικός ο καστανός δακτύλιος στο στήθος του. Επίσης ιδιαίτερο γνώρισμά της είναι το κόκκινο ράμφος και τα μαύρα πρωτεύοντα πτερά. (Εικόνα8). Το αρσενικό ξεχωρίζει από το θηλυκό μόνο από το κόκκινο οζίδιο στο επάνω τμήμα του ράμφους (Kightley 1998), καθώς δε διαθέτει φυλετικό διμορφισμό.



Εικόνα 8: *Tadorna tadorna*  
(<http://www.birding.in>)

## 6.5 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ 4 ΕΙΔΩΝ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

Τα είδη του γένους *Anas* αναπαράγονται στις βόρειες περιοχές της Ευρώπης και της Ασίας, αλλά σε περιόδους αναπαραγωγικής αδράνειας (χειμώνας) μεταναστεύουν, με τη μορφή σμηνών, σε νοτιότερες περιοχές, έξω από το εύρος αναπαραγωγής τους, όπου ευνοείται η αλλαγή του πτερώματός τους (Νότια Ευρασία και Βόρεια Αφρική). Παρόλο που είναι εν μέρει μεταναστευτικά είδη, απαντώνται στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, Ασίας, Αφρικής, Δυτικής και Βόρειας Αμερικής και στην Αλάσκα, σε όλη, σχεδόν, τη διάρκεια του χρόνου, πράγμα που δείχνει τη μεγάλη γεωγραφική τους εξάπλωση (Carboneras 1992, Clements 2007, Herrera 2006). Εν αντιθέσει, το είδος *Tadorna tadorna*, του γένους *Tadorna*, αναπαράγεται στην εύκρατη Ευρασία, ενώ το χειμώνα μεταναστεύει προς περιοχές της βόρειας Ευρώπης, όπου και διαμένει καθ' όλη τη διάρκεια του, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται σε μεγάλο βαθμό κάτοικος της Δυτικής και Βόρειας Ευρώπης (Kear 2005).

## 6.6 ΕΝΔΙΑΙΤΗΜΑ ΤΩΝ 4 ΕΙΔΩΝ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

Τα τέσσερα αυτά υδροβία πτηνά κατά την περίοδο της αναπαραγωγής τους διαβιούν σε υγροτόπους με γλυκό νερό και υψηλή βλάστηση, όπως μικρές λίμνες πλούσιες σε καλαμώνες, λιμνοθάλασσες, έλη, ποταμάκια με χαμηλή ταχύτητα ροής νερού, αλλά και σε μεγάλα υγροτοπικά συστήματα και κοιλάδες με δασόβια βλάστηση, σε υγρά λιβάδια και βοσκοτόπια. Κατά τη χειμερινή περίοδο, εμφανίζονται αρκετά συχνά σε υφάλμυρα νερά και πιο συγκεκριμένα, σε κολπίσκους και λιμνοθάλασσες που βρίσκονται κατά μήκος της ακτής, σε παράκτιες

και αλόφυτες εκτάσεις, σε εκβολές ποταμών, όπως επίσης και σε ελώδεις περιοχές (Johnson 2000). Συνήθως αποφεύγουν τις τούνδρες, τα πυκνά δάση, την ορεινή ενδοχώρα καθώς και τα ποτάμια ή τα ρέματα ταχείας ροής (Dunn 2006, Δαβανέλος 2009).

#### **6.7 ΣΙΤΙΣΗ ΤΩΝ 4 ΕΙΔΩΝ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΠΤΗΝΩΝ**

Είναι είδη παμφάγα και οι μέθοδοι εξασφάλισης της τροφής τους ποικίλουν ανάλογα με το βιότοπο, την εποχή, την ώρα της ημέρας και το φύλο. Μπορεί να φιλτράρουν τη λάσπη περπατώντας στις όχθες λιμνών ή ποταμών, να κολυμπούν με το κεφάλι βυθισμένο μέσα στο νερό, να επιλέγουν τροφή από την επιφάνεια του νερού, και σπάνια να καταδύονται. Κατά την περίοδο της αναπαραγωγής τους, τρέφονται συνήθως με ασπόνδυλα, όπως οστρακοειδή, έντομα και τις προνύμφες τους, μαλάκια και σκουλήκια, αλλά επίσης μπορούν να τραφούν με ψάρια και βατράχια. Το χειμώνα μεταβάλλονται σε νυκτόβια σποροφάγα, όπου τρέφονται με σπόρους υδρόβιων φυτών και πρασινάδες, τα οποία αναζητούν είτε με βάδισμα στην ξηρά είτε κολυμπώντας στην επιφάνεια του νερού (Johnson 2000, Dunn 2006, Δαβανέλος 2009).

#### **6.8 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ 4 ΕΙΔΩΝ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΠΤΗΝΩΝ**

Η αναπαραγωγική περίοδος αρχίζει με μια σειρά από ερωτικές εκδηλώσεις μεταξύ αρσενικών και θηλυκών. Σχηματίζουν ζεύγη το χειμώνα και φτάνουν στις περιοχές αναπαραγωγής μαζί. Οι περιοχές, που δημιουργούν τη φωλιά τους τα θηλυκά, ποικίλει, από περιοχές με ελάχιστη έως αρκετή βλάστηση, ακόμη και δέντρα ύψους 10 μέτρων. Το αρσενικό επιβλέπει το θηλυκό ως και τις πρώτες ημέρες εναπόθεσης των αυγών, όμως όταν το θηλυκό γεννήσει, τότε απομακρύνεται και σχηματίζει σμήνη με άλλα αρσενικά, με αποτέλεσμα το θηλυκό να επωάζει και να φροντίζει τους νεοσσούς μόνο του. Η επώαση απορροφά σχεδόν τα τρία τέταρτα του χρόνου του θηλυκού, ενώ ο υπόλοιπος χρόνος αναλώνεται στην εύρεση τροφής. Οι νεοσσοί παραμένουν στη φωλιά τις πρώτες ημέρες της γέννησής τους καθώς είναι αρκετά ευαίσθητοι, ενώ μετά την ανάπτυξή τους, η μητέρα οδηγεί τα μικρά της στο νερό όπου τα μαθαίνει να τρέφονται και να προστατεύονται από τους εχθρούς τους (<http://www.dkose.gr>).

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη μοριακών δεικτών με απώτερο στόχο την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Anas* και του γένους *Tadorna*. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκαν το πυρηνικό γονίδιο *MC1R*, το οποίο εμπλέκεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της μελανίνης και το μιτοχονδριακό γονίδιο 16S rRNA το οποίο κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος στο μιτοχόνδριο. Ο συνδυασμός μιτοχονδριακών και πυρηνικών δεικτών κρίνεται απαραίτητος σε περιπτώσεις προσπάθειας ταυτοποίησης ειδών καθώς ο μιτοχονδριακός δείκτης, με ιδιότητες ενδοειδικού μονομορφισμού και διαειδικού πολυμορφισμού, είναι άριστος δείκτης για το διαχωρισμό στενά συγγενικών ειδών αλλά ακατάλληλος για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση τυχόν υβριδίων. Η ανάλυση ενός πυρηνικού δείκτη είναι σε θέση να επιβεβαιώσει την ύπαρξη ενδεχόμενου υβριδισμού με την εμφάνιση ετερόζυγων ατόμων που θα έφεραν αλληλόμορφα και των δύο ειδών.

## 7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Συλλογή δειγμάτων
2. Απομόνωση γενετικού υλικού από ήπαρ παπιών
3. Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της απόδοσης του πρωτοκόλλου της απομόνωσης
4. Ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών με κατάλληλα ζεύγη εκκινητών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)
5. Έλεγχος της απόδοσης της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%
6. Ανάλυση διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP)
7. Καθαρισμός των δειγμάτων που φέρουν διαφορετικό πρότυπο
8. Αλληλούχηση για την ταυτοποίηση των πολυμορφισμών
9. Επεξεργασία αποτελεσμάτων και σύγκριση αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

### 7.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Υλικό για την παρούσα μελέτη αποτέλεσε ήπαρ από 57 δείγματα του γένους *Anas*, από τα είδη *Anas Penelope* (10), *Anas Platyrinchos* (44), *Anas Crecca* (3) και 7 δείγματα του γένους *Tadorna* από το είδος *Tadorna Tadorna* (7). Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η λαβίδα και το νυστέρι. Ιδιαίτερη προσοχή έπρεπε να δοθεί στο σχολιαστικό καθαρισμό τους, έπειτα από τη λήψη κάθε δείγματος. Για αυτό, μεταξύ των δειγμάτων τα εργαλεία πλένονταν με νερό, και στη συνέχεια με απορροφητικό χαρτί. Μετά τη λήψη τους, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σωληνάκι τύπου erppendorf, αριθμήθηκαν και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη.

### 7.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η απομόνωση πρέπει να εξασφαλίζει DNA καλής ποιότητας, δηλαδή μη αποικοδομημένο και επαρκούς ποσότητας. Υπάρχουν πολλά πρωτόκολλα απομόνωσης με βάση το είδος του DNA που πρόκειται να απομονωθεί (πυρηνικό, μιτοχονδριακό, πλασμιδιακό) καθώς και την προέλευση του εξεταζόμενου πρωτογενούς υλικού. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού από κύτταρα ήπατος.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της απομόνωσης αναγράφονται στον πίνακα 4.



**Πίνακας 4:** Διαλύματα για τη διαδικασία της απομόνωσης

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΣΚΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ
Διάλυμα λύσης	Λύση των κυττάρων
Πρωτεΐνάση K (10mg/ml)	Πέψη των πρωτεϊνών και προστασία του DNA από τη δράση των νουκλεασών (Ebeling 1974)
Ριβονουκλεάση (10μg/ml)	Αποικοδόμηση του RNA
Φαινόλη	Αποδιάταξη πρωτεϊνών και διαχωρισμός πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται εξισορροπημένο διάλυμα φαινόλης σε pH > 7 ώστε το DNA να παραμείνει στην υδατική φάση (Chomczynski 1987)
Χλωροφόρμιο Ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v)	Χλωροφόρμιο: καλύτερος διαχωρισμός των φάσεων λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας. Μετουσίωση πρωτεϊνών και απομάκρυνση περίσσειας φαινόλης από την υδατική φάση (Chomczynski, 1987)
	Ισοαμυλική αλκοόλη: σταθεροποίηση της ενδιάμεσης φάσης μεταξύ υδατικής και οργανικής στην οποία συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες (Chomczynski 1987)
Οξικό Νάτριο (CH <sub>3</sub> COONa) 3M	Είναι ένα άλας που προσφέρει ιόντα που είναι απαραίτητα για να αλληλεπιδράσουν με το DNA, διευκολύνοντας την κατακρήμνισή του. Επίσης παρεμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις του DNA με τις πρωτεΐνες (Protocol online 2007)
Αιθανόλη συγκέντρωση 100% και 70%	Η αιθανόλη είναι λιγότερο πολική σε σχέση με το νερό, επομένως αν η έλξη μεταξύ DNA και κατιόντων που περιέχονται στο διάλυμα γίνει αρκετά ισχυρή, τότε σχηματίζονται σταθεροί δεσμοί που έχουν σαν αποτέλεσμα την κατακρήμνιση του DNA (Joseph 2001)

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100mg ήπατος και ακολουθήθηκαν οι παρακάτω πειραματικές διαδικασίες σύμφωνα με το πρωτόκολλο erpendorf, με κατάλληλες τροποποιήσεις :

1. Προσθήκη τεμαχισμένου ιστού σε σωλήνα erpendorf του 1.5ml και προσθήκη 700μl διαλύματος λύσης και 20μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml).
2. Επώαση των δειγμάτων στους 55°C για 1h, με συνεχή ανακίνηση
3. Προσθήκη 15μl Ριβονουκλεάσης και επώαση στους 37°C για 1h
4. Προσθήκη 350μl φαινόλης και 350μl χλωροφόρμιου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και αναδεύση για 10min
5. Φυγοκέντρηση για 10min στις 13.000rpm, στους 4°C
6. Μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf (1.5ml)
7. Επανάληψη του βήματος 4, 5 και 6
8. Προσθήκη 700μl χλωροφόρμιου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ανάδευση για 10min
9. Φυγοκέντρηση για 10min στις 13.000rpm, στους 4°C
10. Μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf (1.5ml)
11. Προσθήκη 1ml παγωμένης αιθανόλης 100% και 40μl οξικού νατρίου (3M)
12. Επώαση των δειγμάτων στους -20°C για 10min
13. Φυγοκέντρηση για 10min στις 13.000rpm, στους 4°C

14. Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 1ml παγωμένης αιθανόλης 70%
15. Φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000rpm, στους 4°C
16. Αφαίρεση του υπερκείμενου
17. Επώαση των δειγμάτων στους 37°C ώστε να ξηρανθεί το ίζημα
18. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100-200μl ddH<sub>2</sub>O
19. Τοποθέτηση των δειγμάτων ολονύκτια (ο/ν) σε θερμοκρασία δωματίου για να διαλυθεί το DNA και τέλος αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C

### 7.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ DNA

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης, το DNA ελέγχθηκε ποιοτικά και ποσοτικά με φωτομέτρηση και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

**Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης:** Η διαδικασία θα περιγραφεί παρακάτω. Με τη μέθοδο αυτή επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη DNA και η ακεραιότητά του. Εάν παρατηρηθούν πολλές ζώνες σημαίνει ότι το DNA έχει αποικοδομηθεί. Το γενωμικό DNA πρέπει να βρίσκεται μέσα στα πηγάδια ή ελάχιστα κάτω από το ύψος τους, ενώ το mtDNA θα πρέπει να βρίσκεται πιο χαμηλά στην πηκτή αγαρόζης.

**Φωτομέτρηση:** Η φωτομέτρηση βασίζεται στην απορρόφηση των νουκλεϊκών οξέων στα 260nm, λόγω της ύπαρξης αρωματικών βάσεων. Πραγματοποιήθηκε μετά από αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49μl ddH<sub>2</sub>O. Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA η οποία ενδείκνυται να είναι πάνω από 150ng/μl. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA από τις πρωτεΐνες που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 2.

### 7.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR (Polymerase chain reaction) αποτελεί μια δυναμική προσέγγιση της μελέτης και ανάλυσης των γονιδίων, η οποία στηρίζεται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών του DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες DNA-στόχου (Saiki 1988). Είναι μία τεχνική που ενισχύει ένα τμήμα DNA κατά πολλές τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες ως εκατομμύρια αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη θερμική κυκλοποίηση, αποτελούμενη από κύκλους επαναλαμβανόμενης θέρμανσης και ψύξης της αντίδρασης σε κατάλληλες θερμοκρασίες, για αποδιάταξη και ενζυμική αντιγραφή του DNA. Οι εκκινητές αποτελούνται από αλληλουχίες συμπληρωματικές ως προς την αλληλουχία του στόχου και καθορίζουν την επιλεκτική ενίσχυση.

#### 7.4.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ PCR

Μία αντίδραση PCR για να πραγματοποιηθεί απαιτεί εξοπλισμό και αντιδραστήρια όπως:

**1. Θερμικό κυκλοποιητή**

**2. DNA στόχο** που να περιέχει την περιοχή του DNA που θα ενισχυθεί

**3. Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση:** Η Ταq πολυμεράση είναι θερμοανθεκτική πολυμεράση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* YT1, το οποίο ζει στο νερό σε θερμοκρασία 75°C. Το ένζυμο αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα, με μοριακό βάρος 94 kDa (Life Technologies, 2001). Έχει πολυμεριστική δράση 5' → 3' και πολυμερίζει περίπου 1000 βάσεις ανά λεπτό (Bangham 1991). Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της πολυμεράσης είναι 72°C, αλλά παραμένει σταθερή ακόμα και στους 94°C (Saiki, 1988).

**4. Ρυθμιστικό διάλυμα:** Παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την καλύτερη δυνατή δραστικότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης. Περιέχει Tris HCl (pH8,7), KCl και (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και έχει αρχική συγκέντρωση 10X, ενώ η τελική συγκέντρωσή του στο μίγμα της αντίδρασης είναι 1X.

**5. Ιόντα Mg<sup>++</sup>:** Προστίθενται με τη μορφή διαλύματος MgCl<sub>2</sub> και χρησιμοποιούνται ως συμπράγοντας για τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης. Η συγκέντρωσή τους στο μίγμα της αντίδρασης είναι σημαντική, αφού περίσσεια ιόντων Mg<sup>++</sup> οδηγεί στην αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης, ενώ έλλειψη Mg<sup>++</sup> ελαττώνει την ποσότητα των προϊόντων. Συνήθως χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις 1,5-2,5 mM (αρχική συγκέντρωση 50 ή 100mM).

**6. Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs):** Είναι τα δομικά υλικά για τη σύνθεση νέων αλληλουχιών του επιλεγμένου DNA και επίσης παρέχουν την ενέργεια για την επιμήκυνση. Η συγκέντρωσή τους στο μίγμα αντίδρασης ποικίλει μεταξύ 50 και 200μM. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μειώνουν το ρυθμό σύνθεσης DNA και μπορεί να προκαλέσουν παραγωγή παραπροϊόντων.

**7. Εκκινητές (primers):** Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτιδικές ακολουθίες, συμπληρωματικές προς τα άκρα του τμήματος DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Συνδέονται βάσει συμπληρωματικότητας στο 5' άκρο ενός τμήματος εκατέρωθεν του DNA στόχου αφήνοντας το 3' άκρο τους ελεύθερο για να επιμηκυνθεί από την DNA πολυμεράση (Roche).

Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά ώστε να είναι κατάλληλοι για την PCR (Bangham 1991) (Πίνακας 5)

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά εκκινητών

Μήκος 18-30 ζευγών βάσεων. Ωστόσο, μεγαλύτερου μήκους εκκινητές μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματικοί
Περιεχόμενο GC αντίστοιχο με εκείνο του DNA – στόχου (50-60% GC)
Απουσία τριών ή περισσότερων γουανινών ή κυτοσινών στη σειρά, στο 3' άκρο του εκκινητή
Απουσία συμπληρωματικότητας μεταξύ των δύο εκκινητών, καθώς και μεταξύ διαφορετικών περιοχών του ίδιου εκκινητή, ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία δευτεροταγών δομών
Απουσία αλληλοεπικάλυψης των δύο εκκινητών στο 3' άκρο, προς αποφυγή δημιουργία διμερών εκκινητών

Για την ενίσχυση των επιλεγμένων μοριακών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν τρία ζεύγη ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, οι ακολουθίες των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Αλληλουχίες εκκινητών με βάση τη γενωμική θέση των δύο τμημάτων του *MC1R* γονιδίου καθώς και του 16S rRNA γονιδίου

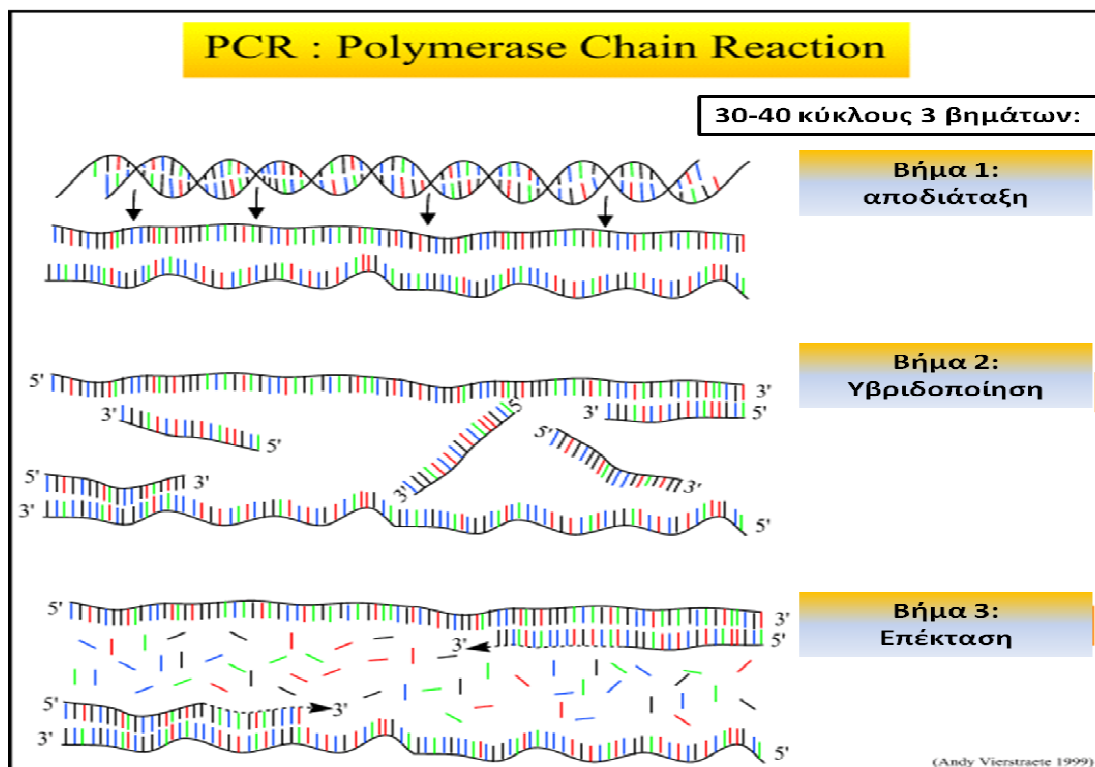
ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ FW	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ RV
<i>MC1R A</i>	CAA TGA GCT CTT CCT GAC GCT GG	GAA GAC GGT GCT GGA GAC GGT GC
<i>MC1R B</i>	GCA CCG TCT CCA GCA CCG TCT TC	CAG CGT CCG CCG GAG CTC CTG GC
16S rRNA	A <sup>Y</sup> A AGA CGA GAA GAC CC (Y = C ή T)	GAT TGC GCT GTT ATC CC

Το γονίδιο του *MC1R* ενισχύθηκε ξεχωριστά σε δύο αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα (A και B) των 400bp καλύπτοντας με αυτό τον τρόπο ένα μεγάλο μέρος του γονιδίου. Ο forward εκκινητής, για το τμήμα A, υβριδίστηκε από τη θέση 82 έως τη θέση 97 και ο reverse εκκινητής από τη θέση 464 έως τη θέση 486 του γονιδίου *MC1R*. Αντίστοιχα, ο forward εκκινητής, για το τμήμα B, υβριδίστηκε από τη θέση 464 έως τη θέση 486, ενώ ο reverse εκκινητής από τη θέση 851 έως τη θέση 873 του γονιδίου *MC1R*. Αντίθετα, για το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιήθηκαν καθολικοί (universal) εκκινητές, οι οποίοι είναι χρήσιμοι για την ενίσχυση γονιδιακών τμημάτων σε πολλούς οργανισμούς καθώς υβριδοποιούνται σε καλά συντηρημένες περιοχές του γονιδίου.

#### 7.4.2 ΣΤΑΔΙΑ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η PCR αποτελείται συνήθως από μια σειρά 30-40 επαναλαμβανόμενων αλλαγών θερμοκρασίας που ονομάζονται κύκλοι. Κάθε κύκλος αποτελείται συνήθως από 3 διακριτά στάδια θερμοκρασίας. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται και το χρονικό διάστημα της εφαρμογής τους σε κάθε κύκλο εξαρτώνται από μια σειρά παραμέτρων. Αυτές περιλαμβάνουν: την πολυμεράση, τη συγκέντρωση του DNA, τη συγκέντρωση των δισθενών ιόντων και των dNTPs καθώς και το T<sub>m</sub> των εκκινητών. Τα στάδια της θερμικής κυκλοποίησης είναι τα ακόλουθα (Eeles 1993) (ΕΙΚΟΝΑ 9):

- 1. Θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στόχου :** Επιτελείται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (91-95°C), η οποία καταλήγει στη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων και την παραγωγή μονόκλωνων αλυσίδων οι οποίες χρησιμεύουν ως στόχο για τη σύνθεση των νέων μορίων του DNA
- 2. Υβριδισμός των κατάλληλων εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου :** Περιλαμβάνει τον υβριδισμό των κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες. Η θερμοκρασία του σταδίου αυτού εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών
- 3. Επέκταση - επιμήκυνση των συμπληρωματικών αλληλουχιών:** Πραγματοποιείται η σύνθεση των νέων τμημάτων DNA με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής Taq DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί για σύνθεση τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια. Η θερμοκρασία του σταδίου αυτού εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Ο χρόνος επέκτασης εξαρτάται τόσο από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται όσο και από το μήκος του DNA που ενισχύεται.



**Εικόνα 9:** Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου της PCR (<http://www.microscopesblog.com>)

Στο τέλος των επαναλαμβανόμενων κύκλων αποδιάταξης – υβριδισμού – επιμήκυνσης ακολουθεί ένα στάδιο διάρκειας 5 έως 10 λεπτών κατά το οποίο η Taq πολυμεράση ολοκληρώνει τη σύνθεση των αλυσίδων που έμειναν ημιτελείς. Μετά την ολοκλήρωση της PCR, τα δείγματα διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C όπου μπορούν να συντηρηθούν για μικρό χρονικό διάστημα.

Υπό βέλτιστες συνθήκες, δηλαδή, εάν δεν υπάρχουν περιορισμοί, λόγω περιορισμού υποστρώματος ή αντιδραστηρίων, σε κάθε βήμα επέκτασης, το ποσό του DNA στόχου διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα ο πολλαπλασιασμός της συγκεκριμένης περιοχής DNA να είναι εκθετικός. Το τελικό αποτέλεσμα της PCR μετά από  $n$  κύκλους είναι η παραγωγή  $n^2$  δίκλωνων μορίων DNA, πιστών αντιγράφων της αλληλουχίας που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών.

### 7.4.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών ενίσχυσης των παραπάνω μοριακών δεικτών πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός δοκιμών οι οποίες περιλαμβάνουν αλλαγές στη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στο DNA στόχο καθώς και της συγκέντρωσης του  $MgCl_2$  και του DNA στο μίγμα της αντίδρασης. Έτσι κατέστη δυνατός ο καθορισμός του βέλτιστου συνδυασμού θερμοκρασίας – συγκέντρωσης προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική ενίσχυση για κάθε γονίδιο. Οι συνθήκες που προσδιορίστηκαν για την υβριδοποίηση των εκκινητών και την ενίσχυση των γονιδίων *MC1R* και 16S rRNA παρατίθενται στον Πίνακα 7.

**Πίνακας 7:** Συνθήκες PCR για τα γονίδια *MC1R* και 16S rRNA

ΣΤΑΔΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΤΟ <i>MC1R</i>	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΓΙΑ ΤΟ 16S rRNA
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 4 min	95°C για 4 min
Αποδιάταξη	95°C για 40 sec	95°C για 40 sec
Υβριδοποίηση	57°C για 50 sec	52°C για 1 min
Επιμήκυνση	72°C για 40 sec	72°C για 50 sec
Τελική επιμήκυνση	72°C για 10 min	72°C για 10 min

} 35 κύκλοι

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι βέλτιστες ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την επιτυχημένη ενίσχυση των μοριακών δεικτών *MC1R* και 16S rRNA σε τελικό όγκο 50μl (Πίνακας 8).

**Πίνακας 8:** Βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης για τους μοριακούς δείκτες *MC1R* και 16S rRNA

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (μl)
DNA	200ng	-	1.00
Forward primer	50pmol/μl	1pmol/μl	1.00
Reverse primer	50pmol/μl	1pmol/μl	1.00
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10X	1X	5.00
$MgCl_2$	50-100mM	1.5mM	2.00
dNTPs	10mM each	0.2mM each	1.00
Taq πολυμεράση	5U/μl	1U/μl	0.02
ddH <sub>2</sub> O	-	-	38.8
Τελικός όγκος	-	-	50.0

#### 7.4.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ PCR

Η ακριβής πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε προκειμένου να ενισχυθεί η επιθυμητή περιοχή του DNA με τη μέθοδο της PCR έχει ως εξής:

1. Προσθήκη των χημικών αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα (εκτός από το DNA) σε ένα σωλήνα erpendorf. Τα αντιδραστήρια προστέθηκαν στο μίγμα σε ποσότητες ίσες με την ποσότητες που έπρεπε να προστεθούν σε κάθε δείγμα επί τον αριθμό των δειγμάτων συν ένα , έτσι ώστε να υπήρχε περίσσεια μίγματος.
2. Αφού προηγήθηκε φυγοκέντρηση, το μίγμα μοιράστηκε ισόποσα σε σωλήνες PCR στον καθένα από τους οποίους είχε τοποθετηθεί το DNA του κάθε δείγματος.
3. Ακολουθήθηκε σύντομη φυγοκέντρηση των δειγμάτων και προσθήκη στον θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος προηγουμένως είχε ρυθμιστεί στο επιθυμητό πρόγραμμα.
4. Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης και παρατήρηση σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

#### 7.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της PCR, δηλαδή αν έχει ενισχυθεί το επιθυμητό τμήμα DNA χωρίς παραπροϊόντα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα μακρομόρια είναι ηλεκτρικά φορτισμένα και όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από τη σχέση του ηλεκτρικού φορτίου προς το μοριακό τους βάρος. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο διαχωρισμός τμημάτων DNA με διαφορετικό μέγεθος. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων των νουκλεοτιδίων και κινείται προς το θετικό πόλο κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder), ο οποίος περιέχει τμήματα DNA γνωστού μεγέθους και κινείται στην πηκτή παράλληλα με τα προϊόντα της PCR.

##### 7.5.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΣΤΗΝ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα των μορίων DNA σε πηκτή αγαρόζης είναι οι εξής (Sambrook 2001):

1. **Το μοριακό μέγεθος του DNA:** Τα μόρια του δίκλωνου DNA κινούνται στην πηκτή αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού βάρους του DNA. Τα μεγαλύτερα μόρια κινούνται πιο αργά, λόγω του ότι κινούνται μέσω των πόρων του πηκτώματος με μεγαλύτερη δυσκολία απ' ότι τα μικρά μόρια.

2. **Η συγκέντρωση της αγαρόζης:** Η αγαρόζη είναι φυτικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από θαλάσσια φύκη και η πηκτή που σχηματίζει δεν είναι συμπαγής αλλά περιέχει πόρους, το μέγεθος των οποίων είναι αντιστρόφως ανάλογο προς τη συγκέντρωσή της. Επομένως, ένα ευθύγραμμο μόριο DNA συγκεκριμένου μεγέθους μετακινείται με διαφορετικούς ρυθμούς μέσα σε πηκτές που έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης.

3. **Η διαμόρφωση του DNA:** Μόρια DNA, ίδιου μοριακού βάρους αλλά διαφορετικών σχηματισμών, κινούμενα σε πηκτή συγκεκριμένης συγκέντρωσης αγαρόζης παρουσιάζουν διαφορετικές κινητικότητες. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες ηλεκτροφόρησης το κυκλικό DNA μετακινείται ταχύτερα από το αντίστοιχου μεγέθους γραμμικό DNA.

4. **Η εφαρμοζόμενη τάση:** Η αύξηση της τάσης προκαλεί αύξηση της κινητικότητας του DNA.

5. **Το χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα:** Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA επηρεάζεται από τη σύσταση και την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος.

## 7.5.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης είναι τα ακόλουθα:

- Διάλυμα TAE 1X: για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν 20ml πυκνού διαλύματος 50X TAE (Πίνακας 9) και 980ml ddH<sub>2</sub>O
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10μg/ml)
- Διάλυμα φόρτωσης 6X (Πίνακας 9)

Πίνακας 9: Σύσταση πυκνών διαλυμάτων

TAE 50x (500ml)	Διάλυμα φόρτωσης 6x (10ml)
121gr Tris Base με τελική συγκέντρωση 2M	1ml μπλε της βρωμοφαινόλης 1% w/v με τελική συγκέντρωση 1% v/v
28.5ml οξικό οξύ (100%) με τελική συγκέντρωση 5.7% v/v	0.5ml TBE 20X με τελική συγκέντρωση 1X
50ml EDTA 0,5M με τελική συγκέντρωση 0.05M	5ml γλυκερόλη (99%) με τελική συγκέντρωση 50% v/v
ddH <sub>2</sub> O έως τα 500ml	ddH <sub>2</sub> O έως τα 10ml

Παρασκευή του συμπυκνωμένου διαλύματος TBE 10X :

1. Διαλυτοποίηση 60.5gr 0.5M Tris Base και 30.85gr βορικού οξέος (3% w/v) σε 900ml ddH<sub>2</sub>O
2. Προσθήκη 40ml 0.5M EDTA και πλήρωση με ddH<sub>2</sub>O έως το 1lt



### 7.5.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης, αρχικά αναμίχθηκαν, σε κωνική φιάλη, 0.6gr αγαρόζης με 40ml διαλύματος TAE 1X (πηκτική 2%). Στη συνέχεια το μίγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων (600W) για περίπου 4 λεπτά μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Έπειτα το διάλυμα τοποθετήθηκε κάτω από συνεχή ροή νερού βρύσης και αναδεύονταν κυκλικά, για να κρυσώσει. Αμέσως μετά προστέθηκαν 4ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) (10μg/ml) με ταυτόχρονη ανάδευση. Το EtBr παρεμβαίνει ανάμεσα στις βάσεις του δίκλωνου DNA και έχει την ικανότητα να φθορίζει όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Οι δύο ανοιχτές πλευρές του καλουπιού σφραγίστηκαν με κολλητική ταινία και το καλούπι τοποθετήθηκε σε επίπεδη επιφάνεια. Ακολούθησε η έκχυση του διαλύματος στο ειδικό καλούπι και η απομάκρυνση των φυσαλίδων που πιθανόν να είχαν δημιουργηθεί. Ενώ η αγαρόζη ήταν ακόμη ζεστή, τοποθετήθηκαν στις ειδικές εγκοπές του καλουπιού "χτενάκια" τα οποία θα δημιουργούσαν τα "πηγαδάκια". Η πηκτική αφέθηκε να στερεοποιηθεί (πολυμερισμός πηκτικής) για περίπου 20 λεπτά. Μετά τη στερεοποίηση της αγαρόζης, αφαιρέθηκαν προσεκτικά τα "χτενάκια" και οι ταινίες από την πηκτική και δημιουργήθηκαν τα "πηγαδάκια". Τέλος το καλούπι τοποθετήθηκε στην ηλεκτροφορητική συσκευή που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα, 1X TAE (Εικόνα 10).

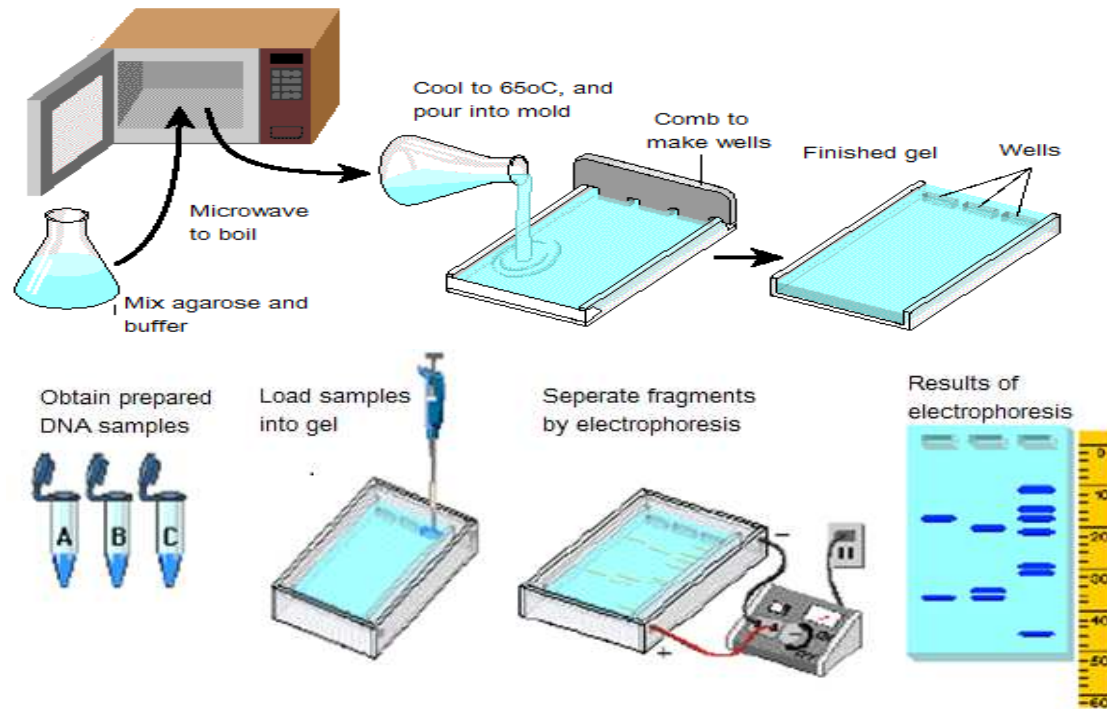
### 7.5.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Αμέσως μετά την τοποθέτηση της πηκτής αγαρόζης μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η συσκευή πληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE έως ότου καλυφθούν τα "πηγαδάκια" και πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων. Για κάθε δείγμα, αναμείχθηκαν, πάνω σε parafilm 5μl (10% του συνολικού όγκου) προϊόντος PCR και 3μl loading buffer (διάλυμα φόρτωσης). Έπειτα κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό πηγαδάκι της πηκτικής, με πιπέτα. Μετά το τέλος της διαδικασίας, συνδέθηκε η συσκευή ηλεκτροφόρησης με ένα τροφοδοτικό μηχανήμα και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο (180mA, 100Volts). Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ήταν περίπου 30 λεπτά, μέχρις ότου η χρωστική θα διένυε τα 2/3 του μήκους της πηκτικής (Εικόνα 10).

### 7.5.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων PCR. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγιναν ορατά με τη βοήθεια συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Εάν η PCR ήταν επιτυχής, τα προϊόντα εμφανίζονταν ως φωτεινές ζώνες επάνω στην πηκτική αγαρόζη. Παράλληλα ήταν δυνατός ο εντοπισμός επιμολύνσεων με τη χρήση ενός αρνητικού μάρτυρα (negative control) ο οποίος ήταν ποσότητα (50μl) του μίγματος της PCR χωρίς του προσθήκη του DNA – στόχου.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης του DNA που απομονώθηκε από κύτταρα ήπατος ήταν η ίδια με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε πηκτή μικρότερης συγκέντρωσης σε αгарόζη (0.3gr αгарόζης - 40ml διαλύματος 1X TAE) και επίσης κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, αναμίχθηκαν 2μl DNA (2% του συνολικού όγκου) από κάθε δείγμα με 3μl loading buffer (διάλυμα φόρτωσης).



**Εικόνα 10: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης**  
(<http://snhs-plin.barry.edu> & <http://www.phschool.com>)

## 7.6 ΜΕΘΟΔΟΣ SSCP – ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (Single Strand Conformation Polymorphism)

Τα δείγματα που ενισχύθηκαν με τη PCR, στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ανάλυση SSCP για την ανίχνευση τυχόν πολυμορφισμών στα γονίδια 16S rRNA και *MC1R*. Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στην πηκτή ακρυλαμίδης και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου.

Η κινητικότητα του δίκλωνου DNA σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος της αλυσίδας της διπλής έλικας του DNA αλλά είναι ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που το απαρτίζουν. Όμως η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων επηρεάζεται αισθητά από τις πολύ μικρές αλλαγές στην αλληλουχία, ακόμα και με αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Αυτές οι μικρές αλλαγές γίνονται αντιληπτές λόγω του ασταθής χαρακτήρα της μονόκλωνης αλυσίδας του DNA. Η απουσία μιας συμπληρωματικής αλυσίδας, οδηγεί την μονόκλωνη αλυσίδα σε αναδίπλωση σχηματίζοντας εσωτερικά ζεύγη βάσεων που οδηγούν σε θηλιές και πτυχώσεις που προσδίδουν στη μονόκλωνη αλυσίδα μια μοναδική τρισδιάστατη δομή που είναι ανεξάρτητη του μήκους της (Patrinos 2008).

### 7.6.1 ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ SSCP

Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τέσσερα διακριτά στάδια:

- ➔ Παρασκευή της πηκτής ακρυλαμίδης
- ➔ Αποδιάταξη των προϊόντων PCR
- ➔ Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης
- ➔ Χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων

### 7.6.2 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ SSCP

Για την αποτελεσματικότητα της τεχνικής θα πρέπει να ελέγχονται κάποιοι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της ανάλυσης SSCP (Kukita 1977):

- **Θερμοκρασία:** Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων DNA εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για καλύτερα αποτελέσματα θα πρέπει η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης να διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία
- **pH:** Η ευαισθησία της τεχνικής εξαρτάται από το pH. Τα δίκλινα μόρια DNA, ως επί το πλείστο, αποδιατάσσονται σε βασικές συνθήκες και σε αυξημένο pH. Η προσθήκη γλυκερόλης στην πηκτή ακρυλαμίδης μειώνει το pH του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης (0.5X TBE). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου
- **Μήκος τμημάτων DNA:** Για βέλτιστα αποτελέσματα θα πρέπει τα θραύσματα DNA να έχουν μήκος από 150 έως 500 bp. Η προσθήκη γλυκερόλης μπορεί να επιτρέψει τη χρήση μεγαλύτερων τμημάτων DNA

### 7.6.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR των γονιδίων *MC1R* και 16S rRNA χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης με πυκνότητα 8% και 10% αντίστοιχα. Τα συστατικά και οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτών ακρυλαμίδης αναγράφονται στον Πίνακα 10.

**Πίνακας 10:** Συστατικά – διαλύματα για την παρασκευή πηκτής ακρυλαμίδης 8% και 10%

Συστατικά	8% ( <i>MC1R</i> )	10% (16S rRNA)
Ακρυλαμίδη	5gr	6.25gr
ddH <sub>2</sub> O	έως τα 62.5ml	έως τα 62.55ml
Δις ακρυλαμίδη	0.125gr	0.156gr
Γλυκερόλη 50%	55ml	6.255ml
TBE 10X	3.755ml	3.755ml
TEMED	62.55ml	62.55ml
APS 20%	3505ml	3505ml
Συνολικός όγκος	62.55ml	62.55ml

Πριν την προετοιμασία του διαλύματος της πηκτής ακρυλαμίδης, τοποθετήθηκαν δύο τζάμια τα οποία συγκρατούνταν μεταξύ τους με κάθετα διαχωριστικά 2mm, τα οποία προηγουμένως είχαν επικαλυφθεί με μικρή ποσότητα βαζελίνης και προσαρμόστηκαν σε ειδική συσκευή που επιτύγχανε την στεγανοποίησή τους.

Για την προετοιμασία της πηκτής ακρυλαμίδης πυκνότητας 8% , αρχικά ζυγίστηκαν 5gr ακρυλαμίδης, 0.125gr δις ακρυλαμίδης. Τα συστατικά αυτά μαζί με 35ml ddH<sub>2</sub>O προστέθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως. Το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε για ανάδευση ενώ προστέθηκαν παράλληλα 5ml γλυκερόλης 50% και 3.75 ml TBE 10X. Το διάλυμα αφέθηκε για ομογενοποίηση. Έπειτα το διάλυμα διηθήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο με διηθητικό χαρτί και συμπληρώθηκε νερό μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 62.5ml. Το διήθημα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη όπου προστέθηκαν 62.5μl TEMED και 375μl APS 20%. Το διάλυμα της ακρυλαμίδης αναδεύτηκε με γρήγορες κινήσεις και αποχύθηκε προσεκτικά ανάμεσα στα τζάμια υπό γωνία 45 μοιρών έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων. Αμέσως μετά την προσθήκη του διαλύματος τοποθετήθηκαν κατάλληλα χτενάκια (2mm) των 15 ή 20 θέσεων (ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων) στο επάνω άνοιγμα των τζαμιών. Τα χτενάκια ήταν αυτά που σχημάτισαν τα "πηγαδάκια" του πηκτώματος. Το διάλυμα αφέθηκε 45 λεπτά ώστε να πήξει. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την παρασκευή πηκτής 10% με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες συστατικών (Πίνακας 10).

Το πολυακρυλαμίδιο είναι ένα μεγάλο μόριο που αποτελείται από μεγάλες αλυσίδες μορίων ακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μηχανισμό ελευθέρων ριζών. Για να αρχίσει ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου απαιτείται ένας καταλύτης έναρξης όπως το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) που θα δημιουργήσει τις πρώτες ελεύθερες ρίζες, και ένας ενεργοποιητής του καταλύτη όπως το *N, N, N', N'*- tetramethylenediamine (TEMED). Για το σχηματισμό του πηκτώματος απαιτείται επιπλέον ένα μόριο που θα δημιουργήσει πλευρικούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου και αυτό είναι η μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδη. Η πηκτή δημιουργήθηκε από την ένωση των μονομερών ακρυλαμίδης (CH<sub>2</sub>=CH-CO-NH<sub>2</sub>) σε μακριές αλυσίδες καθώς και από τη δημιουργία εγκάρσιων διακλαδώσεων με *N, N* μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδη (CH<sub>2</sub>=CH-CO-NH-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH<sub>2</sub>) (Shi 1998).

#### **7.6.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR – ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ**

Η προετοιμασία των δειγμάτων συνήθως επιτελέστηκε κατά το χρονικό διάστημα στο οποίο πολυμεριζόταν η πηκτή ακρυλαμίδης. Μέσα σε eppendorfs του 0.5ml προστέθηκαν 5-7μl προϊόντος PCR (250-300ng/μl) και 10μl αποδιατακτικού ρυθμιστικού διαλύματος (denaturation buffer). Το διάλυμα αυτό είναι απαραίτητο για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA σε μονόκλινα αλλά επίσης βοηθάει το DNA να αποκτήσει βάρος ώστε να παραμείνει στη βάση του πηγαδιού. Τα δείγματα στη συνέχεια επώαστηκαν για 7min στους 97°C. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο ώστε να διατηρηθούν σε μονόκλινη κατάσταση και να μην επαναυβριδοποιηθούν οι κλώνοι.

Η σύσταση του αποδιατακτικού ρυθμιστικό διαλύματος (denaturation buffer) είναι: 95% φορμαμίδιο, 0.05% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.05% κυανό ξυλενίου, 10mM NaOH.

Μετά το πέρας της αποδιάταξης, και αφού η στεγανοποιημένη πηκτή καθαρίστηκε, πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. η πηκτή τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή, αφού προηγουμένως η συσκευή είχε πληρωθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 0.5X TBE και τα αποδιαταγμένα δείγματα τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια. Η συσκευή ρυθμίστηκε στα 210Volt και η πηκτή αφέθηκε για περίπου 20 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης τα τζάμια αφαιρέθηκαν από τη συσκευή και διαχωρίστηκαν μεταξύ τους. Η πηκτή μεταφέρθηκε σε νάιλον μεμβράνη και τοποθετήθηκε σε αναδευτήρα ώστε να πραγματοποιηθεί η χρώση.

### 7.6.5 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ

Για την ανίχνευση του προτύπου των ζωνών της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης πραγματοποιήθηκε χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο. Ο νιτρικός άργυρος συνδέεται στο DNA αντιδρώντας με τη φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις εμφανίζονται με σκούρο καφέ χρώμα, ενώ το φόντο παραμένει κίτρινο (Sambrook 2000). Η διαδικασία της χρώσης αποτελείται από τα εξής στάδια:

1. Προετοιμασία του πρώτου διαλύματος για τη χρώση: Μέσα σε ογκομετρικό κύλινδρο (1lt) προστέθηκαν 400ml ddH<sub>2</sub>O, 8ml EtOH 100% (με τελική συγκέντρωση 2% v/v) και 0.5ml οξικό οξύ 100% (με τελική συγκέντρωση 0,125% v/v). Το διάλυμα εκχύθηκε στην πηκτή σε δύο δόσεις των 200ml. Αρχικά εκχύθηκαν τα 200ml του διαλύματος και η πηκτή επώαστηκε για 3min. Έπειτα αφαιρέθηκε το υγρό και προστέθηκαν τα υπόλοιπα 200ml, με χρόνο επώασης πάλι 3min. Στο τέλος του πρώτου σταδίου, αφαιρέθηκε το διάλυμα και η πηκτή ξεπλύθηκε μία φορά με ddH<sub>2</sub>O για 1min
2. Προετοιμασία του δεύτερου διαλύματος για τη χρώση: Μέσα σε ογκομετρικό κύλινδρο (1lt) διαλύθηκαν 0.2gr νιτρικού αργύρου (0.1% w/v) σε 200ml ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αφού ομογενοποιήθηκε αποχύθηκε η πηκτή και ακολούθησε επώαση για 15min. Μετά το πέρας της επώασης η πηκτή ξεπλύθηκε 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O για 1min η καθεμία
3. Προετοιμασία του τρίτου διαλύματος για τη χρώση: Μέσα σε ένα ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 200ml ddH<sub>2</sub>O και 1ml φορμαλδεΐδης. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε αναδευτήρα. Έπειτα ζυγίστηκαν 3gr NaOH (1.5% w/v) και 0.01gr NaBH<sub>4</sub> (0.005% w/v) (βοροϋδρίδιο του νατρίου) τα οποία προστέθηκαν και αυτά μέσα στο ποτήρι ζέσεως. Το διάλυμα αφέθηκε να ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στην πηκτή. Πραγματοποιήθηκε επώαση της πηκτής έως ότου γίνουν εμφανείς οι ζώνες (~20 λεπτά). Το υγρό αφαιρέθηκε από την πηκτή, και η πηκτή ξεπλύθηκε 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O για 1min κάθε φορά. Τέλος αφαιρέθηκε από την πηκτή η περίσσεια ddH<sub>2</sub>O και η πηκτή τοποθετήθηκε μέσα σε νάιλον μεμβράνη.

Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίθηκαν τα πρότυπα των διαφορετικών ατόμων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα έφεραν κοινά πρότυπα και ποια διέφεραν μεταξύ τους. Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων, επιλέχθηκαν 1 ή 2 αντιπροσωπευτικά άτομα για κάθε πρότυπο, για το γονίδιο *MC1R*, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας.

## 7.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR – ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

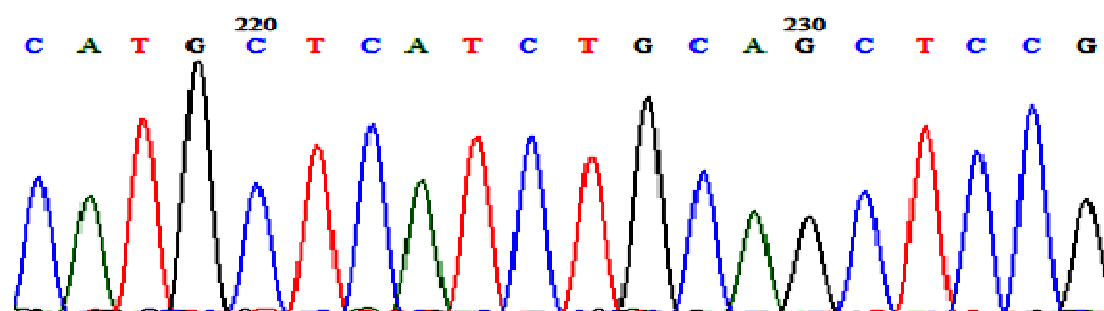
Το στάδιο αυτό αφορά τον καθαρισμό των προϊόντων PCR. Ο καθαρισμός είναι απαραίτητος για την αλληλούχηση. Αυτό οφείλεται στο ότι οι αναλυτές αλληλουχίας είναι πολύ ευαίσθητοι στις προσμίξεις. Τέτοιες προσμίξεις αφορούν κατάλοιπα ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν είτε στη PCR είτε στην απομόνωση του DNA (άλατα, ένζυμα, απορρυπαντικά και ολιγονουκλεοτίδια). Τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο στην SSCP συγκεντρώθηκαν και υποβλήθηκαν εκ νέου σε PCR σε τελικό όγκο 50μl. Από τα 50μl του προϊόντος PCR, τα 5μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και παρατηρήθηκαν σε UV ώστε να διαπιστωθεί εάν είχε επιτευχθεί η ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος ενώ, τα υπόλοιπα 45μl του προϊόντος PCR καθαρίστηκαν με κατάλληλο kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (#K2100-2).

Το καθαρό πλέον προϊόν, υποβλήθηκε σε κατακρήμνιση με την προσθήκη 300μl παγωμένης αιθανόλης 100% και 10μl CH<sub>3</sub>COONa 3M (οξικό νάτριο). Στη συνέχεια οι σωλήνες erpendorf αναδεύτηκαν ελαφρά και επώαστηκαν στους -20°C ο/ν. Την επόμενη μέρα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15min στις 13.000rpm σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και αποξηράνθηκε το ίζημα σε θερμοκρασία 37°C. Τέλος τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR (μαζί με τους εκκινητές τους, c= 10 pmol/μl) αποστάλθηκαν στην εταιρία Macrogen στην Κορέα για αλληλούχηση .

## 7.8 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής BioEdit (Hall 1999). Η τελική μορφή της αλληλουχίας, όπως δίνεται από τον υπολογιστή, ονομάζεται χρωματογράφημα (Εικόνα 11), και είναι το βασικό εργαλείο για τις επόμενες αναλύσεις.



**Εικόνα 11:** Σχηματική αναπαράσταση από Η/Υ του φθορισμού των ζωνών υπό μορφή χρωματογραφήματος

### 7.8.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Το πρώτο βήμα είναι ο έλεγχος της ποιότητας των χρωματογραφημάτων. Τα χρωματογραφήματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση πρέπει να έχουν το αναμενόμενο μήκος βάσεων και μοναδική, ευδιάκριτη κορυφή για κάθε σημείο της αλληλουχίας. Οι αλληλουχίες των χρωματογραφημάτων που δεν θεωρούνται αξιόπιστες βάσει εμπειρικού, οπτικού ελέγχου, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται σε περαιτέρω αναλύσεις.

Συνήθως η ποιότητα των χρωματογραφημάτων μετά την αλληλούχηση δεν είναι καλή στις πρώτες 15 – 40 βάσεις, μετά ακολουθούν 700 – 900 βάσεις με πολύ καλή ποιότητα και το σήμα έπειτα από αυτές τις βάσεις απότομα φθίνει.

Σε αρκετά χρωματογραφήματα παρατηρούνται ασάφειες σε ορισμένα σημεία, πχ. τοποθετείται ο χαρακτηρισμός N (άγνωστη βάση) πάνω από ευδιάκριτες κορυφές ή τοποθετείται βάση πάνω από κορυφές μη διακριτές (ιδιαίτερα στα άκρα της αλληλουχίας). Τα λάθη αυτά, εάν δεν διορθωθούν, μειώνουν την ακρίβεια της συνολικής αλληλουχίας. Η διόρθωση στα χρωματογραφήματα είναι άλλο ένα σημείο στην ανάλυση στο οποίο επεμβαίνει ο ερευνητής. Για τη διόρθωση αυτών των σημείων γίνεται μια στοίχιση των αλληλουχιών, εντοπίζονται τα σημεία όπου υπάρχουν πολυμορφισμοί και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα διαβάζονται ώστε να γίνει η σύγκριση των αλληλουχιών βάση προς βάση.

### 7.8.2 ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Οι αλληλουχίες των υπό μελέτη δειγμάτων δεν αναμένεται να είναι πανομοιότυπες αλλά να παρουσιάζουν διαφορές ως προς τις βάσεις ορισμένων νουκλεοτιδικών θέσεων. Για την ταυτοποίηση αυτών των πολυμορφισμών οι αλληλουχίες στοιχίζονται. Η στοίχιση αποσκοπεί στον εντοπισμό πολυμορφισμών καθώς και στον προσδιορισμό των ομόλογων θέσεων των αλληλουχιών.

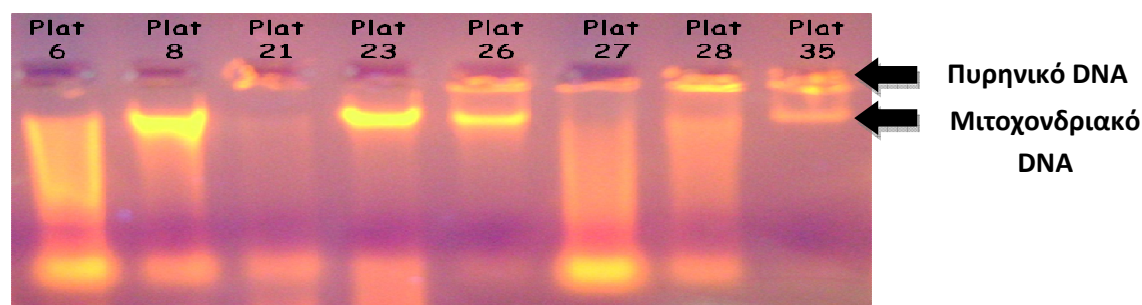
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για τη στοίχιση των αλληλουχιών το πρόγραμμα ClustalW (Thompson 1994), ένα ευρέως διαδεδομένο πρόγραμμα. Η μέθοδος ClustalW χρησιμοποιεί προοδευτικούς αλγορίθμους, κατά τους οποίους οι δύο συνολικά πιο ομόλογες αλληλουχίες στοιχίζονται πρώτες και ακολουθεί μια σειρά από νέες στοιχίσεις προσθέτοντας σε κάθε βήμα την αμέσως συγγενέστερη αλληλουχία προς τις ήδη στοιχισμένες. Το ClustalW έχει αποδειχθεί κατάλληλο εργαλείο για πολλούς τύπους αλληλουχιών, ενώ εάν υπάρχουν στα δεδομένα μερικές αλληλουχίες αρκετά συγγενείς ώστε οι πρώτες στοιχίσεις να γίνουν σωστά, τότε το πρόγραμμα δίνει στοιχίσεις σχεδόν ιδανικές (Higgins 1987).

## 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των μοριακών δεικτών και των μοριακών τεχνικών που εφαρμόστηκαν για τη γενετική ταυτοποίηση των ειδών *Anas Crecca*, *Anas Penelope*, *Anas Platyrhynchos* και *Tadorna tadorna*.

### 8.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA

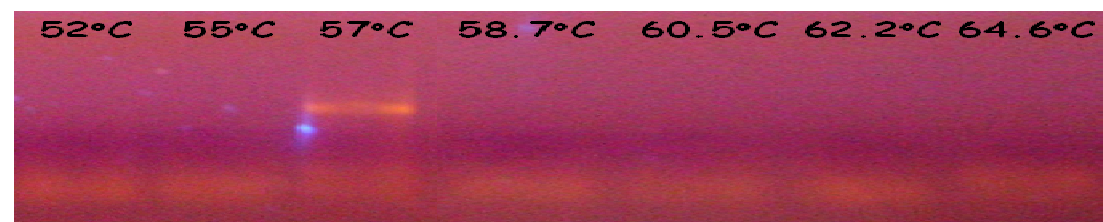
Η απομόνωση DNA από 57 δείγματα παρείχε υψηλής ποιότητας DNA, με τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 400ng/μl και τιμές  $A^{260}/A^{280}$  περίπου 2. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% εμφάνισε 2 διακριτές ζώνες : μια ζώνη, η οποία βρίσκεται μέσα στα πηγαδάκια ή σε ελάχιστο ύψος κάτω από αυτά και αποτελεί το πυρηνικό DNA, και μια δεύτερη ζώνη, που εμφανίζεται χαμηλότερα και αποτελεί το μιτοχονδριακό DNA (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** Ηλεκτροφόρηση DNA που απομονώθηκε από τα άτομα *Anas Platyrhynchos* 6, 8, 21, 23, 26, 27, 28, 35 (Plat 6, 8, 21, 23, 26, 27, 28, 35).

### 8.2 PCR

Αρχικά για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε μεγάλος αριθμός δοκιμών οι οποίες περιελάμβαναν αλλαγές στη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην ποσότητα του DNA στόχου και στη συγκέντρωση του  $MgCl_2$ . Ενδεικτικά, στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση ενός προϊόντος PCR, για το γονίδιο *MC1R*, με διαβάθμιση θερμοκρασιών υβριδοποίησης εκκινητών από 52°C έως 64.6°C.

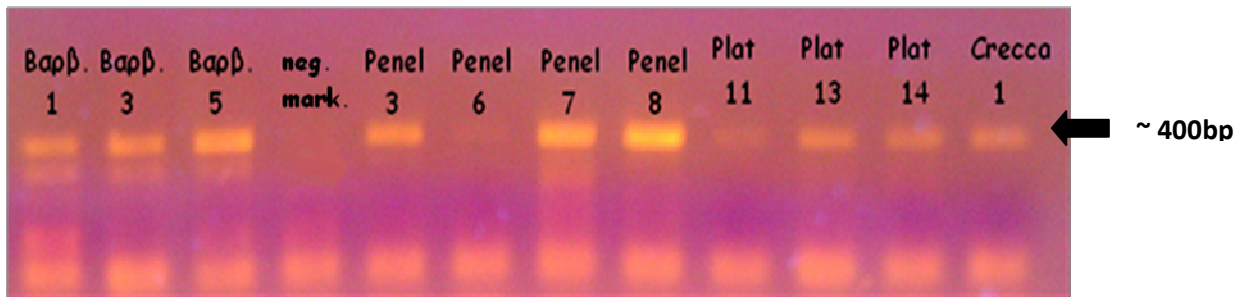


**Εικόνα 13:** PCR διαβάθμισης θερμοκρασιών υβριδοποίησης εκκινητών (gradient) για το γονίδιο *MC1R*



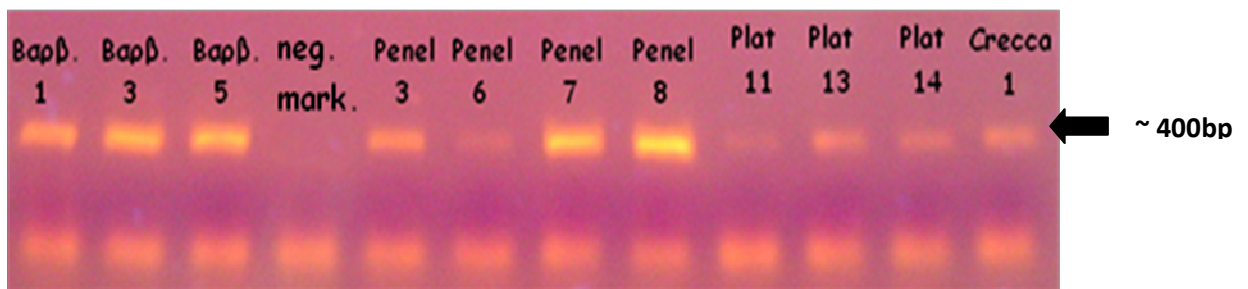
Σύμφωνα με την Εικόνα 13, επιλέχθηκε η τρίτη συνθήκη με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στο DNA στόχο να αντιστοιχεί στους 57°C.

Στη συνέχεια, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (Πίνακας 6), ενισχύθηκε το μεγαλύτερο τμήμα του γονιδίου *MC1R* με την εφαρμογή δύο αντιδράσεων PCR σε δύο αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα (A και B) των 400bp όπως επίσης και τμήμα (235bp) του μιτοχondριακού γονιδίου 16S rRNA. Για την επαλήθευση της επιτυχίας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτική αгарόζης 2%. Στις Εικόνες 14, 15 και 16 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR των γονιδίων *MC1R* και 16S rRNA σε ενδεικτικό αριθμό ατόμων.

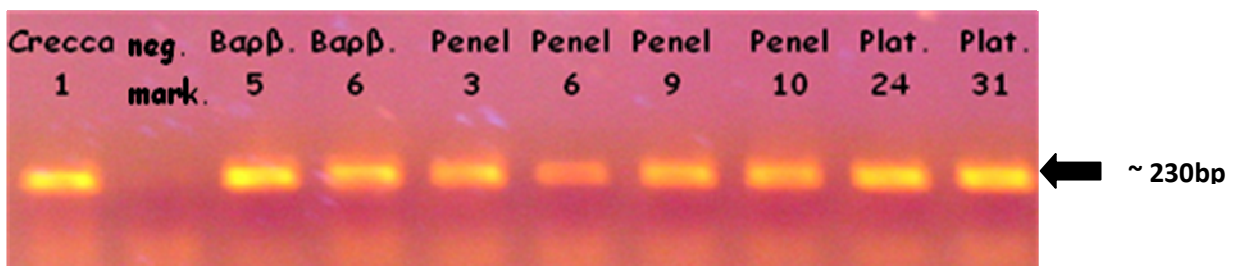


**Εικόνα 14:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του τμήματος A του γονιδίου *MC1R*, 404bp.

Τα δείγματα αντιπροσωπεύουν τρία είδη του γένους *Anas* (*Anas Penelope* με τον κωδικό Pen 3, 6, 7 και 8, *Anas Platyrhynchos* με τον κωδικό Plat 11, 13 και 14 και *Anas Crecca* με τον κωδικό Crecca 1) και ένα είδος του γένους *Tadorna* (*Tadorna Tadorna* με τον κωδικό Βαρβ. 1, 3 και 5). Στο τέταρτο πηγάδι φορτώθηκε ο αρνητικός μάρτυρας (neg.mark)



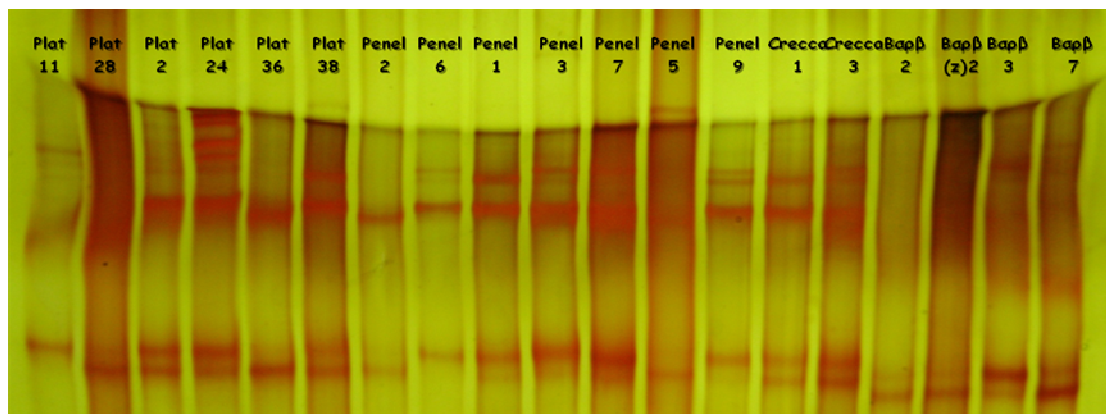
**Εικόνα 15:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του τμήματος B του γονιδίου *MC1R*, 409bp. Τα δείγματα αντιπροσωπεύουν τρία είδη του γένους *Anas* (*Anas Penelope* με τον κωδικό Pen 3, 6, 7 και 8, *Anas Platyrhynchos* με τον κωδικό Plat 11, 13 και 14 και *Anas Crecca* με τον κωδικό Crecca 1) και ένα είδος του γένους *Tadorna* (*Tadorna Tadorna* με τον κωδικό Βαρβ. 1, 3 και 5). Στο τέταρτο πηγάδι φορτώθηκε ο αρνητικός μάρτυρας (neg.mark)



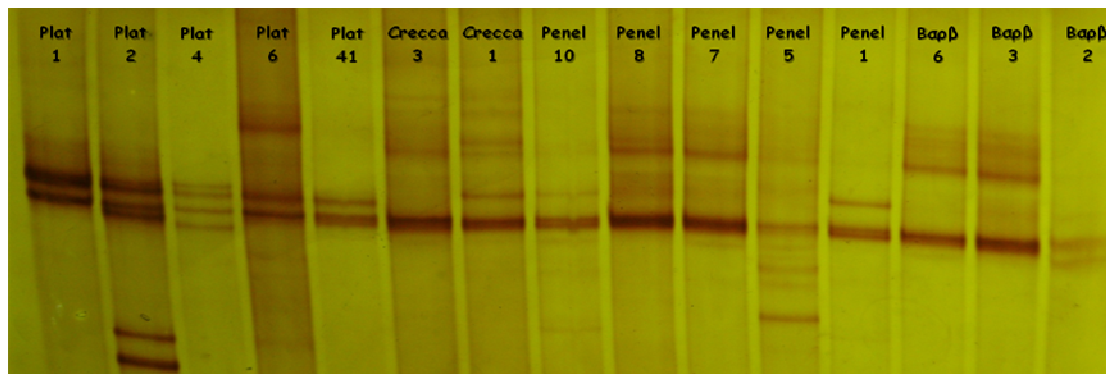
**Εικόνα 16:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γονιδίου 16S rRNA, 235bp. Τα δείγματα αντιπροσωπεύουν τρία είδη του γένους *Anas* (*Anas Penelope* με τον κωδικό Pen 3, 6, 9 και 10, *Anas Platyrhynchos* με τον κωδικό Plat 24 και 31 και *Anas Crecca* με τον κωδικό Crecca 1) και ένα είδος του γένους *Tadorna* (*Tadorna Tadorna* με τον κωδικό Βαρβ. 5 και 6). Στο δεύτερο πηγάδι φορτώθηκε ο αρνητικός μάρτυρας (neg.mark)

### 8.3 ΑΝΑΛΥΣΗ SSCP

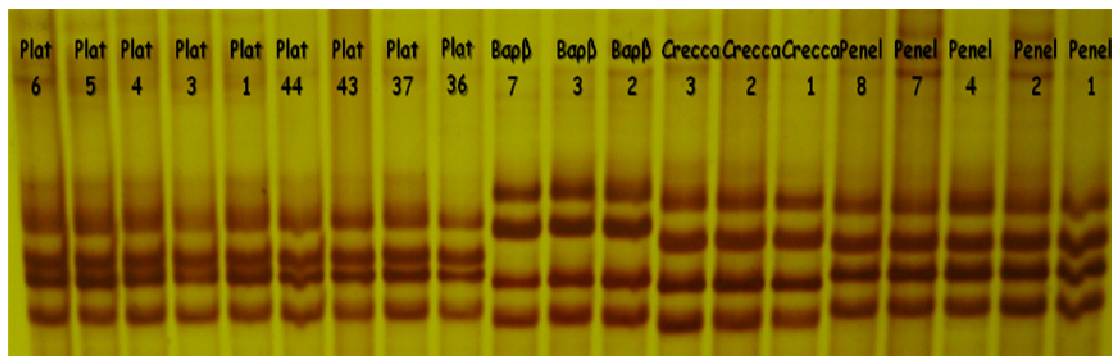
Τα προϊόντα PCR των δειγμάτων που ενισχύθηκαν αποτελεσματικά, υποβλήθηκαν σε SSCP ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης 8% για το γονίδιο *MC1R* και 10% για το γονίδιο 16S rRNA. Η εμφάνιση ζωνών έπειτα από χρώση με νιτρικό άργυρο αποκάλυψε 16 και 15 διαφορετικά πρότυπα για το τμήμα A και B του γονιδίου *MC1R* αντίστοιχα, και 4 διαφορετικά πρότυπα για το γονίδιο 16S rRNA (Εικόνα 17, 18, 19). Ο σκοπός της ανάλυσης SSCP, ήταν η αντιστοίχιση κάθε δείγματος σε ένα από τα πρότυπα που προέκυψαν, ώστε να επιλεγθεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα για κάθε πρότυπο και να αλληλουχηθεί.



**Εικόνα 17:** Συγκεντρωτική πηκτή ακρυλαμίδης 8% όπου διακρίνονται τα διαφορετικά πρότυπα των δειγμάτων για το τμήμα A του γονιδίου *MC1R*.



**Εικόνα 18:** Συγκεντρωτική πηκτή ακρυλαμίδης 8% όπου διακρίνονται τα διαφορετικά πρότυπα των δειγμάτων για το τμήμα B του γονιδίου *MC1R*.



**Εικόνα 19:** Πηκτή ακρυλαμίδης 10% όπου διακρίνονται τα διαφορετικά πρότυπα των δειγμάτων για το γονίδιο 16S rRNA.

Ο διαχωρισμός των ειδών του γένους *Anas* και *Tadorna* κατέστη δυνατός με τη χρήση του γονιδίου 16S rRNA, καθώς η ανάλυση SSCP εμφάνισε ένα διακριτό πρότυπο για κάθε είδος (Εικόνα 19). Εν αντιθέσει, στο γονίδιο *MC1R*, παρόλο που εμφανίστηκε διαφορετικό πρότυπο για κάθε είδος, οι αποστάσεις μεταξύ των ζωνών στην πηκτή ήταν μικρές και δυσδιάκριτες. Επίσης, σε ορισμένα άτομα εντοπίστηκε συνδυασμός ζωνών οι οποίες αντιστοιχούσαν σε δύο διαφορετικά είδη. Τέλος, παρατηρήθηκαν κοινές ζώνες σε πρότυπα διαφορετικών ειδών. Ως αποτέλεσμα αυτών, η διάκριση των ειδών έρχιζε περαιτέρω μελέτης. Για αυτό το λόγο, επιλέχθηκαν ένα ή δύο αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο και στάλθηκαν προς αλληλούχηση, αφού πρώτα καθαρίστηκαν με τη βοήθεια κατάλληλου kit.

Τα άτομα που στάλθηκαν για αλληλούχηση είναι τα εξής: για το τμήμα Α του γονιδίου *MC1R*, *Anas Platyrhynchos* 11, 24, 28, 36, 38, *Anas Penelope* 1, 2, 3, 6, 7, 9, *Anas Crecca* 1, 3, *Tadorna Tadorna* (βαρβάρα) 2, 3, 7. Για το τμήμα Β του γονιδίου *MC1R*, *Anas Platyrhynchos* 1, 2, 4, 6, 41, *Anas Penelope* 1, 5, 7, 8, 10, *Anas Crecca* 1, 3, *Tadorna Tadorna* (βαρβάρα) 2, 3, 6.

#### 8.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ

Για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία για τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο εκκινητές του *MC1R* (Πίνακας 4) για την αντίδραση αλληλούχησης. Τα δύο χρωματογραφήματα που λήφθηκαν για κάθε δείγμα, αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit, και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα ClustalW, και έτσι προέκυψε η τελική αλληλουχία του κάθε δείγματος. Το συνολικό μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε, όπως προκύπτει από την αλληλούχηση όλων των δειγμάτων, ήταν περίπου 753bp. Αυτό το μέγεθος ήταν ίδιο για όλα τα δείγματα, πράγμα που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχουν προσθήκες ή ελλείψεις στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των ατόμων αυτών. Επιπλέον, για να επιβεβαιώσουμε ότι ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου *MC1R*, επιλέχθηκε τυχαία μία από τις αλληλουχίες που προσδιορίσαμε και ομοπαράτέθηκε με την εφαρμογή BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) για να εξακριβωθεί η ομολογία της με άλλα τμήματα *MC1R* γονιδίων. Πράγματι, η ομοπαράθεση επιβεβαίωσε ότι πρόκειται για τμήμα του γονιδίου *MC1R*, καθώς όλα τα αποτελέσματα της ομοπαράθεσης ήταν τμήματα πυρηνικών γονιδίων *MC1R* από άλλα είδη. Μάλιστα, στις πρώτες θέσεις με τη μεγαλύτερη ομολογία εμφανίστηκε ένα τμήμα γονιδίου *MC1R* που ανήκει στο είδος *Anas Platyrhynchos* (EU924107).

Έπειτα από ομοπαράθεση όλων των υπό μελέτη αλληλουχιών, καθώς και της γνωστής, από τη βάση δεδομένων GenBank, αλληλουχίας του *Anas Platyrhynchos* (EU924107), βρέθηκαν συνολικά 12 πολυμορφικές θέσεις. Από τις αλληλουχίες που αναλύθηκαν προέκυψαν 12 αλληλόμορφα του γονιδίου *MC1R*. Στην Εικόνα 20 παρατίθενται η νουκλεοτιδική αλληλουχία των αλληλομόρφων του γονιδίου *MC1R*.

Τα άτομα των ειδών του γένους *Anas* και *Tadorna* (που είχαν σταλεί προς αλληλούχηση) που αντιστοιχούν σε κάθε αλληλόμορφο, καθώς και η αντιστοίχιση των ειδών στα διάφορα αλληλόμορφα παρατίθενται στον Πίνακα 11 και 12 αντίστοιχα.

**Πίνακας 11:** Αντιστοίχιση των αλληλομόρφων στα διάφορα άτομα των ειδών του γένους *Anas* και *Tadorna*

ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΑΤΟΜΑ
1	<i>Anas Crecca</i> 3, <i>Anas Platyrhynchos</i> 41b
2	<i>Anas Platyrhynchos</i> 24, 11b, 38b
3	<i>Anas Platyrhynchos</i> 4b
4	<i>Anas Penelope</i> 3, 6
5	<i>Anas Penelope</i> 1, 5a, 7a, 8b, 9, 10
6	<i>Anas Penelope</i> 7b
7	<i>Anas Penelope</i> 5b
8	<i>Tadorna Tadorna</i> 6b
9	<i>Tadorna Tadorna</i> 7
10	<i>Tadorna Tadorna</i> 2, 3, 6a
11	<i>Anas Crecca</i> 1, <i>Anas Penelope</i> 8a
12	<i>Anas Platyrhynchos</i> 1, 2, 4a, 6, 11a, 28, 36, 38a, 41a

Αξίζει να σημειωθεί ότι 8 από τα 24 υπό μελέτη άτομα, ήταν ετερόζυγα για το γονίδιο *MC1R*, και χαρακτηρίζονται με τα γράμματα a και b, τα οποία αντιπροσωπεύουν και τα δύο αλληλόμορφα. Τα άτομα, που εμφάνιζαν ετεροζυγωτία, είναι τα εξής: *Anas Platyrhynchos* 4, 11, 38, 41, *Anas Pelelope* 5, 7, 8 και *Tadorna Tadorna* 6.

**Πίνακας 12:** Αντιστοίχιση των ειδών του γένους *Anas* και *Tadorna* στα διάφορα αλληλόμορφα του γονιδίου *MC1R*

ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	ΕΙΔΗ
2, 3, 12	<i>Anas Platyrhynchos</i>
4, 5, 6, 7	<i>Anas Pelelope</i>
8, 9, 10	<i>Tadorna tadorna</i>
1	<i>Anas Platyrhynchos</i> , <i>Anas Crecca</i>
11	<i>Anas Pelelope</i> , <i>Anas Crecca</i>

Πρέπει να αναφερθεί ότι δεν είναι δυνατή η πλήρης αντιστοίχιση του κάθε αλληλομόρφου σε ένα είδος καθώς, ο αριθμός των ατόμων που μελετήθηκαν ήταν περιορισμένος. Αν ήταν διαθέσιμος μεγαλύτερος αριθμός ατόμων υπήρχε πιθανότητα τα αλληλόμορφα, που στην παρούσα μελέτη είναι μοναδικά για κάθε είδος, να εμφανίζονταν και σε άλλα είδη.

Συγκρίνοντας τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Εικόνα 20) και με τη βοήθεια του Πίνακα 11, τα άτομα του είδους *Tadorna tadorna* είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν βάσει αντικατάστασης της βάσης κυτοσίνης (C) από θυμίνη (T) στη θέση 84 και 105 καθώς και της κυτοσίνης (C) από γουανίνη (G) στη θέση 342. Επίσης, τα άτομα του είδους *Anas Platyrhynchos* είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν βάσει αντικατάστασης της αδενίνης (A) από γουανίνη (G) στη θέση 538. Τέλος, τα άτομα του είδους *Anas Penelope* είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν βάσει αντικατάστασης της κυτοσίνης (C) από θυμίνη (T) στη θέση 618.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

Allele\_EU924107 CTTGGTGGAGCCTGGTGGAGAACCTGCTGGTGGTGGCCGCCATCCTAAAGAACAGGAACCTGCACCTGCCCATGTACTACTTCATCTGCTGCCTGGCCGTCTCCGACATGCTGGTGGAGCTCAGCAACCTGG

Allele 1

Allele 2 G

Allele 3

Allele 4

Allele 5 G

Allele 6 G

Allele 7 G

Allele 8 G T T

Allele 9 G T T

Allele 10 G T T

Allele 11 G

Allele 12

140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260

Allele\_EU924107 CCGAGACGCTCTTCATGCTGCTGATGGAGCATGGCGTGGTGGTATCCACGCCAGCATCATCCGCCACATGGACAACATCATCGACATGCTCATCTGCAGCTCCGCTCGTGTCCCTCCCTCCTCCTAGG

Allele 1

Allele 2

Allele 3

Allele 4

Allele 5

Allele 6

Allele 7

Allele 8

Allele 9

Allele 10

Allele 11

Allele 12

270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390

Allele\_EU924107 GGTGATCGCCGTGGACCGCTACATCACCATCTTCTACGCCCTGCGCTACCACAGCATCATGACGCTGCAGCGGGCCGTGGTCAACATGGCCAGCGTCTGGCTGGCCAGCACCGTCTCCAGCACCGTCTTC

Allele 1

Allele 2

Allele 3

Allele 4

Allele 5

Allele 6

Allele 7

Allele 8 G

Allele 9 T G

Allele 10 G

Allele 11

Allele 12



Εικόνα 20: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των αλληλομόρφων του γονιδίου *MC1R*

## 8.5 ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τη χρήση του προγράμματος BioEdit 7.0 δεν αποκάλυψε κανένα κωδικόνιο λήξης σε καμία αλληλουχία, οπότε πιθανότατα οι αλληλουχίες είναι λειτουργικές.

Η ανάλυση της αλληλουχίας των 251 αμινοξέων όλων των αλληλομόρφων, αποκάλυψε μία μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση στη θέση 180 της αμινοξικής ακολουθίας, η οποία εμφανίστηκε στις 9 από τις 12 αμινοξικές ακολουθίες των αλληλομόρφων και αντιπροσώπευε κυρίως όλα τα υπό μελέτη άτομα των ειδών του γένους *Anas* και *Tadorna*, με εξαίρεση τα άτομα του είδους *Anas Platyrhynchos* (Εικόνα 21).

Αυτή η μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση, έχει προκληθεί από μία μετάπτωση της γουανίνης (G) σε αδενίνη (A) στη θέση 538 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, η οποία οδήγησε σε μία μη συνώνυμη αντικατάσταση αμινοξέων. Η αντικατάσταση της αλανίνης από τη θρεονίνη θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική, καθώς παρόλο που και τα δύο αμινοξέα έχουν παρόμοιο μέγεθος, εντούτοις, η αλανίνη είναι ένα μη πολικό αλειφατικό αμινοξύ, ενώ η θρεονίνη είναι ένα πολικό μη φορτισμένο αμινοξύ. Η παρουσία του υδροξυλίου στην πλευρική ομάδα της θρεονίνης αλλάζει την πολικότητα της πρωτεΐνης.

	160	170	180	190	200
Allhlomorfo EU924107	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	LIILMLVLYI	HMFALARHHLRS	ISSQOKHPAVYRTSSILK	GAVTLTILLGVF
Allhlomorfo 2	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....
Allhlomorfo 3	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....
Allhlomorfo 12	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....
Allhlomorfo 1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....
Allhlomorfo 4	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....
Allhlomorfo 5	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....
Allhlomorfo 6	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....
Allhlomorfo 7	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....
Allhlomorfo 8	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....
Allhlomorfo 9	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....
Allhlomorfo 10	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....
Allhlomorfo 11	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	T	.....

**Εικόνα 21:** Τμήμα αμινοξικής αλληλουχίας των 12 αλληλομόρφων. Στη θέση 180 παρουσιάζεται η σημειακή μη συνώνυμη αντικατάσταση του αμινοξέος αλανίνη (A) σε αμινοξύ θρεονίνη (T).

Συγκρίνοντας τα επίπεδα της ποικιλομορφίας των νουκλεοτιδικών και των αμινοξικών αλληλουχιών, από τα 24 δείγματα που στάλθηκαν για καθαρισμό, παρατηρήθηκαν 12 πολυμορφισμοί στο γονίδιο *MC1R*, εκ των οποίων, οι 11 οδηγούν σε συνώνυμες αμινοξικές αντικαταστάσεις ενώ ο ένας πολυμορφισμός οδηγεί σε μία μη συνώνυμη αμινοξική αντικατάσταση. Τα επίπεδα πολυμορφισμού της αμινοξικής αλληλουχίας ήταν χαμηλότερα από αυτά των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (1/251 και 12/753 αντίστοιχα), γεγονός το οποίο οφείλεται στον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα.

## 9.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με παλαιοντολογικά στοιχεία, οι πάπιες μαζί με τη στρουθοκάμηλο, το παγώνι, τη γαλοπούλα, τα ορνίθια και άλλα πτηνά, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις μελέτες εξέλιξης των πτηνών (Huang 2006). Πιο συγκεκριμένα για τις πάπιες, μέχρι σήμερα, τα περισσότερα διαθέσιμα στοιχεία αφορούν δεδομένα που έχουν εντοπιστεί από μελέτες αλλοενζύμων (Braithwaite 1975) καθώς και από εξελικτικές και πληθυσμιακές μελέτες που βασίζονται στην ανάλυση μικροδορυφορικών τόπων (Huang 2005) όπως επίσης και αλληλουχιών μιτοχονδριακού DNA (Judith 1994). Ωστόσο οι πληροφορίες σχετικά με μοριακούς δείκτες για τη μελέτη της κληρονομικότητας, της ποικιλομορφίας και της ταξινομησης στις πάπιες είναι περιορισμένες.

Η επιλογή του κατάλληλου γονιδιακού τμήματος – δείκτη για κάθε μελέτη είναι ζωτικής σημασίας. Είναι ο βασικός παράγοντας για την εύρεση πολυμορφισμών. Απαιτείται και βιβλιογραφική αναζήτηση για την εύρεση πολυμορφικών τόπων, ώστε η πειραματική διαδικασία να δώσει αποτελέσματα, καθώς υπάρχουν γονίδια τα οποία δεν δίνουν εξαρχής διαφορές και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτόν τον σκοπό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο μοριακοί δείκτες, το πυρηνικό γονίδιο *MC1R* και το μιτοχονδριακό γονίδιο 16S rRNA για τη ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Anas* και του γένους *Tadorna* και πιο συγκεκριμένα, για τα είδη *Anas Crecca*, *Anas Penelope*, *Anas Platyrhynchos* και *Tadorna Tadorna* αντίστοιχα. Ο συνδυασμός των μιτοχονδριακών και πυρηνικών αλληλουχιών έχει αποδειχθεί χρήσιμος για την ταυτοποίηση των εν λόγω ειδών.

Η ανάλυση SSCP του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA αποκάλυψε ένα διακριτό πρότυπο ζωνών για κάθε είδος του γένους *Anas* και *Tadorna*, αποτέλεσμα που οδηγεί στην αποτελεσματική ταυτοποίηση των ειδών. Εντούτοις από μόνο του, το μιτοχονδριακό γονίδιο 16S rRNA δεν είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί σαν αποκλειστικός μοριακός δείκτης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πιθανή διασταύρωση δύο διαφορετικών ειδών, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή υβριδίων τα οποία, λόγω της μητρικής κληρονομησης του mtDNA, θα φέρουν μόνο το μιτοχονδριακό DNA των θηλυκών ατόμων της προηγούμενης γενιάς. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη κατάταξη του υβριδίου σε κάποιο είδος, καθώς το υβρίδιο δεν θα εμφανίζει ετεροζυγωτία ως προς τα δύο είδη, αλλά θα φέρει μόνο τον έναν, μητρικό, απλότυπο (Ballard 2004, Shaw 2002).

Για αυτό το λόγο, η μελέτη της ταυτοποίησης των ειδών του γένους *Anas* και *Tadorna*, επιτελέστηκε με το συνδυασμό ενός μιτοχονδριακού και ενός πυρηνικού γονιδίου, του *MC1R*. Η ανάλυση πυρηνικών γενετικών δεικτών είναι σε θέση να επιβεβαιώσει αυτήν την υπόθεση του υβριδισμού, με την προϋπόθεση, οι πυρηνικοί δείκτες να εμφανίζουν ενδοειδικό μονομορφισμό και σημαντικό επίπεδο διαιδικού πολυμορφισμού. Η προϋπόθεση αυτή είναι σημαντική, καθώς η ύπαρξη υβριδισμού μεταξύ των δύο ειδών, θα επιβεβαιώνονταν μόνο με την εμφάνιση ετερόζυγων ατόμων που θα έφεραν αλληλόμορφα και των δύο ειδών.

Ανάλυση του γονιδίου *MC1R*, με τη διαδικασία της αλληλούχησης καθώς και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, αποκάλυψε ένα ικανοποιητικό επίπεδο ποικιλότητας ανάμεσα στα είδη, συνδυασμένο με μικρά επίπεδα ποικιλότητας μεταξύ των ατόμων ενός είδους. Ιδιαίτερη εντύπωση προκάλεσε ο



μεγάλος αριθμός των αλληλομόρφων που παρατηρήθηκαν για το εν λόγω γονίδιο. Παρότι ο πυρηνικός μοριακός δείκτης *MC1R* εμφάνισε αλληλόμορφα τα οποία ήταν μοναδικά για κάθε είδος, εντούτοις, υπήρχαν και δύο αλληλόμορφα όπου το καθένα εμφανίστηκε σε περισσότερα του ενός είδη. Επομένως, ο συγκεκριμένος δείκτης δεν ενδείκνυται για την ακριβή διάκριση των ειδών του γένους *Anas* και *Tadorna*, καθώς προκαλείται σύγχυση στην αντιστοίχιση των ατόμων που φέρουν ένα από τα δύο εν λόγω αλληλόμορφα στο είδος στο οποίο ανήκουν.

Περαιτέρω έρευνες για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Anas* και *Tardona* θα πρέπει να κατευθυνθούν προς την αλληλούχηση του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA, ώστε να επιβεβαιωθούν και σε επίπεδο αλληλουχίας τα πρότυπα που ταυτοποιήθηκαν με την ανάλυση SSCP. Επιπλέον, λόγω της ακαταλληλότητας του πυρηνικού γονιδίου *MC1R* ως μοριακός δείκτης, θα πρέπει να γίνει επιλογή διαφορετικών μοριακών δεικτών, οι οποίοι να είναι πολυμορφικοί, και να εμφανίζουν ένα ικανοποιητικό επίπεδο διαειδικού πολυμορφισμού, αλλά να είναι ενδοειδικά σταθεροί. Υποψήφιοι μοριακοί δείκτες, οι οποίοι πληρούν τα παραπάνω κριτήρια, είναι τα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Τα βασικά χαρακτηριστικά του πολυμορφισμού στο MHC είναι ότι υπάρχουν πολλά αλληλόμορφα σε κάθε λειτουργικό γενετικό τόπο του συμπλέγματος και κάθε ένα από αυτά εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί, ότι η ενίσχυση τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA του γένους *Anas* και *Tadorna*, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά με τη χρήση καθολικών (universal) εκκινητών. Οι καθολικοί εκκινητές είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την ενίσχυση γονιδιακών τμημάτων σε πολλούς οργανισμούς καθώς υβριδοποιούνται σε καλά συντηρημένες περιοχές του γονιδίου. Αυτή τους η ιδιότητα είναι πολύ σημαντική όταν υπάρχει ένα μίγμα ειδών, π.χ. σε επεξεργασμένα προϊόντα στα οποία η μορφολογία του οργανισμού δεν είναι πλέον διακριτή, στο οποίο απαιτείται η διάκρισή τους καθώς, οι καθολικοί εκκινητές είναι σε θέση να ενισχύσουν το συγκεκριμένο τμήμα DNA σε όλα τα είδη του μίγματος σε μία και μόνο αντίδραση.

## 10.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, et al. 1991.** "Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project". *Science* **252** (5013): 1651–6.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de-Bruijn MHL, Coulson AR, et al. 1981.** "Sequence and organization of the human mitochondrial genome".
- Andersson, M. 1994.** Sexual selection. Princeton: Princeton University Press.
- Avise JC. 1991.** Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Genet.* 25:45-69.
- Avise JC. 1994.** Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.
- Avise JC, Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A & Saunders N.C. 1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18: 489 – 522
- Baia P.C., Schreiber E. A., Parker P. G. 2007.** "The Genetic Basis of the Plumage Polymorphism in Red-Footed Boobies (*Sula sula*) : a Melanocortin-1 Receptor (*MC1R*) Analysis"
- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C. 2004.** The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* 13: 729–744.
- Bangham C., 1991.** Methods in molecular Biology, Vol. 9: Protocols in Human Molecular Genetics, The Humana Press Inc, Clifton N.J
- Botstein D, White R.L. Skolnick M. and Davis R.W., 1980.** Construction of a genetic lineage map in man using restriction fragment length polymorphisms.
- Braithwaite, L.W, Miller. B. 1975.** The Mallard, *Anas Platyrhynchos*, and Mallard – Black Duck, *A. superciliosa rogersi*, hybridization. *Evid. Res.* 2:47-61
- Britten. R.J. & Kohne. D.E. 1968.** Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529-540.
- Brown WM, Prager EM, Wang A & Wilson AC, 1982.** Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 225-239.
- Brown, W.M. 1983.** Evolution of animal mitochondrial DNA. In: *Evolution of genes and proteins* (M. Nei and R.K. Koehn eds.) pp. 62-89, Sinauer, Sunderland, M.A.
- Buckley P. A. 1987.** Mendelian genes. In *Avian genetics* (ed. F. Cooke & P. A. Buckley). London: AP.
- Calafell F., Shuster A., Speed WC., Kidd JR, Kidd KK. 1998.** Short tandem repeat polymorphism evolution in Humans
- Carboneras Carles. 1992.** Family Anatidae (Ducks, Geese and Swans). In: DEL HOYO, JOSEP; ELLIOTT, ANDREW & SARGATAL, JORDI (EDS.): *Handbook of Birds of the World (Volume 1: Ostrich to Ducks)*: 536-629, plates 40-50. Lynx Edicions, Barcelona.
- Cavalier-Smith T. 1975.** The origin of nuclei and eukaryotic cells, *Nature* 256: 463 – 468
- Chan DC. 2006.** "Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development". *Cell* **125** (7): 1241–1252

**Chen, W., Kelly M. A., Opitz-Araya X., Thomas R. E., Low M. J., & Cone R. D.. 1997.** Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 91:789–798.

**Chhajlani, V. 1996.** Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38:73–80

**Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987.** "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction".

**Clements, James, (2007)** *The Clements Checklist of the Birds of the World*, Cornell University Press, Ithaca

**Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA. 1996.** The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation.

**Coyne, Jerry A. 2009.** *Why Evolution is true*, Oxford University Press

**Darwin, C. 1871.** *The descent of man, and selection in relation to sex.* Princeton: Princeton University Press.

**De La Cruz, V.F., N. Neckelmann & L. Simpson. 1984.** Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. *Journal of Biological Chemistry* 259:15136-15147.

**Desjardins P & Morais R, 1990.** Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology*, 212, 599-634.

**Doucet S. M., Shawkey M. D., Rathburn M. K., H. L. Mays and R. Montgomerie. 2004** "Concordant evolution of plumage colour, feather microstructure and a melanocortin receptor gene between mainland and island populations of a fairy-wren"

**Dunn P., Whittingham, L. & Pitcher, T. 2001.** Mating systems, sperm competition and the evolution of sexual dimorphism in birds. *Evolution* 55, 161–175.

**Dunn, J. & Alderfer, J. 2006** *National Geographic Field Guide to the Birds of North America* 5th Ed.

**Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H, 1974.** "Proterinase K from *Tritirachium album* Limber

**Eeles, R.A.; Stamps, A.C., 1993.** "Polymerase Chain Reaction (PCR) The Technique And Its Applications", The Institute of Cancer Research, The Royal Marsden Hospital, Sutton, Surrey, United Kingdom.

**Ericson, PGP. 1997,** *Systematic relationships of the paleogene family Presbyornithidae (Aves: Anseriformes)*. *Zool. J. Linn. Soc.* 121:429-483. *Anatidae, Anhimidae, Anseriformes, Presbyornithidae, Telmabates.*

**Fanourakhs N, Pavlikaki H and Navarro C.P, 2004.** Genetic relationships of different Greek landraces of cucumber. *Euphytica Plant breeding.* 136: 143- 147

**Floyd, T. 2008 .** *Smithsonian Field Guide to & Birds of North America* Harper Collins, NY

**Fos, M., M.A. Dominguez, A. Latorre and A. Moya. 1990.** Mitochondrial DNA evolution in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4198-4201.

- Fredriksson, R., M. C. Lagerström, L-G. Lundin, and H. B. Schioth. 2003.** The G-protein coupled receptors in the human genome form five main families: phylogenetic analysis, paralogon groups and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63:1256–1272.
- Fukuhara H, Sor F, Drissi R, Dinouël N, Miyakawa I, Rousset, and Viola AM 1993.** "Linear mitochondrial DNAs of yeasts: frequency of occurrence and general features". *Mol Cell Biol.* 13(4): 2309–2314.
- Futuyma, Douglas. 1995.** Εξελικτική βιολογία, (2<sup>η</sup> Έκδοση) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- Gale Thomson. 2005.** STR (Short Tandem Repeat) Analysis
- Gantz Ira and Fong Tung M. 2003.** The melanocortin system
- Gray M.W, Lang BF, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D. 1998.** "Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs". *Nucl Acids Res.* 26 (4): 865–878.
- Gray, M.W. 1993.** Origin and evolution of organelle genomes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3:884-890.
- Gray, M.W.1992.** The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cyt.* 141:233-257.
- Haig M. Susan. 1998.** Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79:413-425
- Hall T.A 1999.** "BioEdit: a user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl Acids Sump Ser.* 41: 95 – 98
- Harris H. 1966.** Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 164: 298-310.
- Harris, H. & Hopkinson D.A. 1976.** *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*, North Holland, Amsterdam
- Haskell- Luevano, Hadley Mac E. Hrubby Victor J. Jiang Jiwen, Sharma Shubh D., Jody L. Fink, Obeidi. Fahad Al, Sawyer. Tomi. K., 2006.** The melanocortin receptors
- Hearne CM, Ghosh S and Todd JA, 1992.** Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* 1992 (8): 288 – 94
- Hebbar SK, Belcher SM, Perlman PS. 1992 April.** "A maturase-encoding group IIA intron of yeast mitochondria self-splices in vitro". *Nucleic Acids Res.* 20 (7): 1747–54.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003.** Biological identification through DNA barcodes.
- Henze K, Martin W. 2003.** "Evolutionary biology: essence of mitochondria". *Nature* 426 (6963): 127–8.
- Herrera, Néstor; Rivera, Roberto; Ibarra Portillo, Ricardo & Rodríguez, Wilfredo .2006:** Nuevos registros para la avifauna de El Salvador.
- Higgins D.M. 1987.** Molecular versus morphological approaches to systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 23 – 42
- Hoekstra HE, Hirshmann RJ, Bunday RA, Insel PA, Crossland JP. 2006.** A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern.
- Hu J., van Eysden J. & Quiros C.F, 1995.** Generation of DNA- based markers in specific genome regions by two- primer RAPD reactions. *Cold Spring Harbor, Vol 4*, p: 346-351

**Huang Yinhua, Zhao Yonghui, Haley Chris S., Hu Shengqiang, Hao Jinping, Wu Changxin & Li Ning. 2006.** A Genetic and Cytogenetic Map for the Duck (*Anas Platyrhynchos*)

**Huang, Y. H., J. F. Tu, X. B. Cheng, B. Tang, X. X. Hu et al., 2005** Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (*Anas Platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. *Genet. Sel. Evol.* 37: 455–472

**Hwang,U.W., Park,C.J., Yong,T.S. & Kim,W.2001.** One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. *Mol. Phyl.Evol.* 19: 345–352.

**Jeong, H., Kim, J., Im, H., Jeong, H., Hong, M., Lee, J., Han, Y., Kim, I. 2009** Mitochondrial DNA sequence variation of the swallowtail butterfly, *Pappilus xuthus* and the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Biochem Genet* 47:165

**Johnson, Kevin P. McKinney, Frank; Wilson, Robert & Sorenson, Michael D. 2000:** The evolution of postcopulatory displays in dabbling ducks (Anatini): a phylogenetic perspective. *Animal Behaviour*

**Johnson, Kevin P., Sorenson, Michael D. 1999:** Phylogeny and biogeography of dabbling ducks (genus *Anas*): a comparison of molecular and morphological evidence. *Auk* 116(3): 792–805.

**Judith M. Rhymer, Williams Murray J. & Braun Michael J. 1994.** Mitochondrial analysis of gene flow between New Zealand Mallards (*Anas Platyrhynchos*) and Grey Ducks (*A. Supercilliosa*)

**Kabbarah Omar & Chin Lynda . 2006.** Advances in malignant melanoma: genetic insights from mouse and man

**Kambhampati, S. & Smith, P.T.1995.** PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Mol. Biol.* 4: 233–236.

**Kear Janet (2005).** Ducks, Geese and Swans: General chapters, species accounts (Anhima to Salvadorina) , Oxford University Press. pp. 420.

**Kightley,C, Madge. S. Numey Dave. 1998.** Whooper and Bewick's Swans, Pocket Guide to the birds of Britain and North-West Europe: 25, Yale University Press

**Kijas, J. M. H., M. Moller, G. Plastow, and L. Andersson. 2001.** A frameshift mutation in *MC1R* and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics*158:779–785

**Krzywinski, J., Grushko, O., Besansky, N. 2006.** Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. *Molecular phylogenetics and evolution* 39:417

**Kukita, Y., et al. 1997.** SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. *Human Mutation*; (10): 400-7.

**Landegren U., Kaiser R., Sanders J., and Hood L., 1988.** DNA diagnostics – molecular techniques and automation. *Science.*; 242(4876):229-37

**Lewontin RC and Hubby JL. 1966.** A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations.

**Lightner J. K. 2008.** "The Melanocortin 1 Receptor (*MC1R*)

- Ling, M. K., Lagerström, M. C., Fredriksson, R., Okimoto, R., Mundy, N. I., Takeuchi, S. & Schiöth, H. B. 2003.** Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken. *Eur. J. Biochem.* 270, 1441–1449.
- Linnaeus, C. 1758.** Tomus I. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata. Holmiae. (Laurentii Salvii): [1-4], 1-824
- Livezey, Bradley C. 1986:** A phylogenetic analysis of recent anseriform genera using morphological characters. *Auk* 103(4): 737-754.
- Logan DW, Burn SF, Jackson IJ 2006.** "Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores". *Pigment Cell Res.* 19 (3): 206–13
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO. 1994.** "Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor". *Nature* 371 (6500): 709–802.
- Madge, Steve & Burn, Hilary. 1987:** Wildfowl : an identification guide to the ducks, geese and swans of the world. Christopher Helm, London
- Majerus, M. N. & Mundy, N. I. 2003.** Mammalian melanism: natural selection in black and white. *Trends Genet.* 19, 585–588.
- Margoulis L. 1970.** Origin of Eukaryotic Cells, Yale University Press, New Haven, CT.
- Maxam, A.M. and W. Gilbert. 1977.** A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560-564.
- Mayer, E. 1963.** Animal species and their evolution. Cambridge: Harvard University Press.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. 2006.** "Mitochondria: more than just a powerhouse". *Curr. Biol.* 16 (14): R551
- Merila. J. and Sheldon. B. 2001.** Avian quantitative genetics. In *Current ornithology* (ed. V. Nolan), vol. 16. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Meselson. M. & Yuan. R. 1968.** DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110-1114.
- Meyer, A. 1993.** Evolution of mitochondrial DNA in fish. In *Biochemistry and molecular Biology of Fish Vol 2*. Hochachka PW and TP Mommsen (eds.) Elsevier Press, pp.1-38.
- Mitton, J.B. 1994.** Molecular approaches to population biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25:45-69.
- Moritz C, Dowling TE and Brown WM, 1987.** Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population Biology and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292
- Mountjoy K.G and Wong J. 1997.** Obesity, diabetes and functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides).
- Mundy N.I., Badcock N.S., Hart T., Scribner, K., Janssen K., Nadeau N.J. 2004** "Conserved Genetic Basis of a Quantitative Plumage Trait Involved in Mate Choice"
- Mundy Nicholas I. 2005a.** "A window on the genetics of evolution: *MC1R* and plumage colouration in birds"
- Mundy Nicholas I. 2009.** "Conservation and Convergence of Colour Genetics: *MC1R* Mutations in brown Cavefish "

**Mundy, N. 2005b.** The genetic basis of avian coloration in the wild. In *Bird coloration: Volume 1. Measurements and mechanisms* (ed. G. Hill & K. McGraw), vol. 1. Cambridge: Harvard University Press.

**Navajas, M., Fournier, D., Lagnel, J., Gutierrez, J. & Boursot, P. 1996.** Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. *Insect Molecular Biology* 5: 281–285.

**Olson M et al. 1989.** A common language for physical mapping of the human genome. *Science*. 1989 Sep 29;245(4925):1434-5

**Parsons, P.A. 1973.** Mating speed and duration of copulation in *Drosophila pseudoobsura*. *Heredity, Lond.* 21:219-225.

**Patrinos George P., Ansorge Wilhelm, Μοριακή διαγνωστική, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού, 2008**

**Pointer. A. Marie & Mundy I Nicholas. 2008.** "Testing whether macroevolution follows microevolution: Are colour differences among swans (*Cygnus*) attributable to variation at the *MC1R* locus? "

**Price, T. D. 2002.** Domesticated birds as a model for the genetics of speciation by sexual selection. *Genetica* 116, 311–327.

**Quinn TW and Wilson AC, 1993.** Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *Journal of Molecular Evolution*, 37: 417-425.

**Ritland, K., Newton, C. & Marshall, H. D. 2001.** Inheritance and population structure of the white-phased "Kermode" black bear. *Curr. Biol.* 11, 1468–1472.

**Robbins, L. S., Nadeau, J. H., Johnson, K. R., Kelly, M. A., Roselli-Rehffuss, L., Baack, E., Mountjoy, K. G. & Cone, R. D. 1993.** Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function

**Rogers, D. (2001):** Animal Diversity Web: *Anas Platyrhynchos*

**Roulin A. 2004** The evolution, maintenance and adaptive function of genetic colour polymorphism in birds. *Biol. Rev.* 79, 815–848.

**Rouzaud Francois, Costin Gertrude-E., Yamaguchi Yuji, Valencia Julio C., Berens Werner F., Chen Kevin G., Hoashi Toshihiko, Böhm Markus, Abdel-Malek Zalfa A. & Hearing Vincent J. 2006.** "Regulation of constitutive and UVR-induced skin pigmentation by melanocortin 1 receptor isoforms"

**Rompler H, Rohland N, Lalueza-Fox C, Willerslev E, Kuznetsova T, Rabeder G, Bertranpetit J, Schoneberg T, Hofreiter M. 2006.** Nuclear gene indicates coat-color polymorphism in mammoths. *Science* 2006, 313:62.

**Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. & Ehrlich H.A., 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

**Sambrook J. & Russell D.W., 2001.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

**Sambrook,J.2000** *Molecular Cloning : Laboratory Manual* (third edition)

**Sanger, F., S. Nicklen & Coulson. A.R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

- Shaw, K. L. 2002.** Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16122–16127.
- Shi Q & Jackowski G, 1998.** One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, pp 1–52 in Hames BD (ed) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 3rd edn.
- Sorenson Michael D. 2003.** Avian mtDNA primers, Boston University
- Southern, E.M. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol* 98:503-517.
- Sraml, M.; Christidis, L.; Easteal, S.; Horn, P. & Collet, C.1996:** Molecular Relationships Within Australasian Waterfowl (Anseriformes). *Australian Journal of Zoology* 44(1): 47-58
- Takeuchi, S., Suzuki, H., Yabuuchi, M. & Takahashi, S. 1998.** A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta* 1308, 164–168.
- Templeton, A.R. 1981.** Mechanisms of speciation: a population genetic approach. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 12:23-48
- Thompson, J.D., Higgings, D.G., Gibson, T.J. 1994.** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position – specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673 – 80
- Voisey J, Carroll L, van Daal A. 2003.** "Melanocortins and their receptors and antagonists". *Current Drug Targets* 4 (7): 586–97.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*; 23(21):4407-14
- Williams J.G.K, Kubelik A.R, Livak K.J, Rafalski J.A and Tingey S.V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22 6531
- Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS, 1995.** "Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene". *Hum. Mol. Genet.* 4 (2): 223–30.
- Wilson, A.C., R.L. Cann, S.M. Carr, M. George, U.B. Gyllensten, K.M. Helm-Bychowski, R.G. Higuchi, S.R. Palumbi, E.M. Prager, R.D. Sage and M. Stoneking 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26:376-397.
- Zouros E, Freeman KR, Ball AO and Pogson GH, 1992.** Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*
- Δαβανέζος Κωνσταντίνος, 2009.** Πρασινοκέφαλη.  
[http://konstantinosdavanelos.blogspot.com/2009/03/blog-post\\_09.html](http://konstantinosdavanelos.blogspot.com/2009/03/blog-post_09.html)
- Hickman, C.P., L.S. Roberts, A. Larson, H. 2001.** Ολοκληρωμένες Αρχές Ζωολογίας, 11th edition (2η Ελληνική έκδοση). McGraw-Hill, New York
- Μαργαρίτης Λ.Χ, Γαλανόπουλος Β.Κ, Κεραμάρης Κ.Ε, Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη Ι.Σ, Στραβοπόδης Δ.Ι, Τρουγκάκος Ι.Π. 2004.** Βιολογία Κυττάρου (4<sup>η</sup> Έκδοση)
- Φάσουρας Νίκος.** Χρώμα και ποιότητα φτερώματος: <http://www.ferotos-kosmos.info/Fasoura-feather.html>
- Χατζόπουλος Π, 2001.** Βιοτεχνολογία φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο Έμβρυο, Αθήνα



- **Life Technologies, 2001.** Taq DNA polymerase: product accompanying manual.
- **Roche.** PCR reaction complements:  
<http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/790/PCR-Reaction-Components.html>
- **Protocol online, 2007.** Sodium acetate – the function of sodium acetate in precipitation of DNA/ RNA

#### **ΕΙΚΟΝΕΣ ΕΞΩΦΥΛΛΟΥ:**

- <http://www.monasteriopiedra.com>
- <http://www.pbase.com>
- <http://animal.discovery.com>
- <http://www.birding.in>