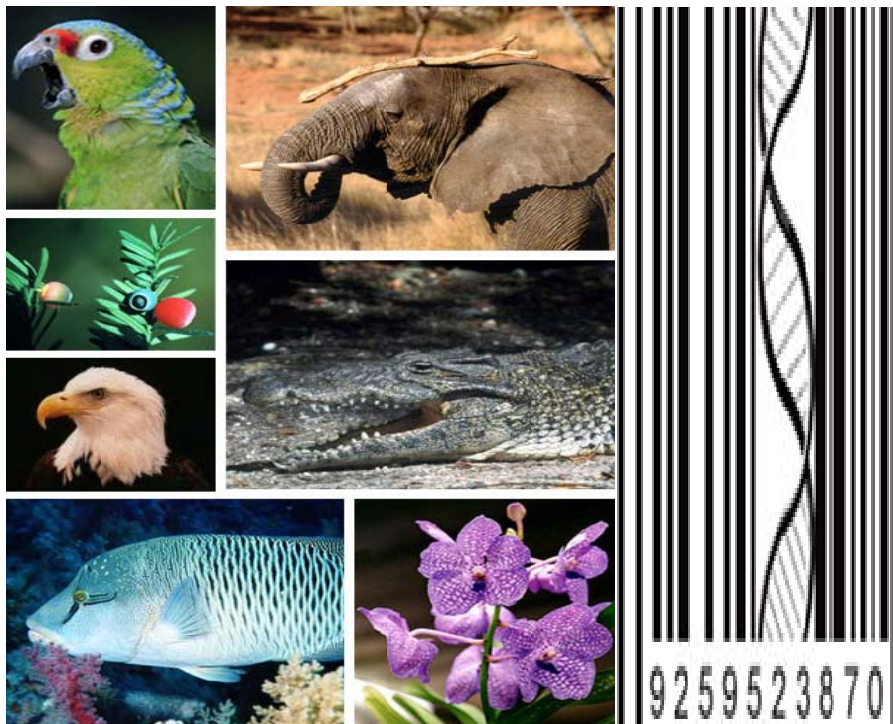


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Διπλωματική Εργασία

**Έλεγχος της καταλληλότητας του γονιδίου *16S rRNA* ως
παγκόσμιου μοριακού δείκτη για την ταυτοποίηση
ζωικών ειδών**

Σαρρή Κωνσταντίνα



Λάρισα 2011

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής 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 Οργανισμών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου την εκτέλεση αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνη καθώς και τη Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κ. Σαραφίδου Θεολογία για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και τις ιδιαίτερα χρήσιμες συμβουλές τους. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Εισαγωγή.....	5
Μοριακοί δείκτες.....	7
Πρόγραμμα προσδιορισμού ετικετών ταυτοποίησης DNA (DNA barcoding)	9
Χρησιμότητα του DNA barcoding	9
Προϋποθέσεις επιλογής ενός μοριακού δείκτη ως DNA barcode.....	10
Χαρακτηριστικά του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA).....	11
Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ως πηγή μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών.....	13
Το μιτοχονδριακό γονίδιο κυτοχρωμική οξειδάση (COI) ως DNA barcode	14
Σκοπός.....	17
Υλικά και Μέθοδοι	18
1. Ζωικά είδη	18
2. Απομόνωση DNA.....	19
3. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA.....	21
4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	21
5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη	24
6. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)	26
7. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο	28
8. Αλληλούχηση και ανάλυση αλληλουχιών	29
Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	32
1. Έλεγχος του διαδειδικού πολυμορφισμού του τμήματος του γονιδίου 16S <i>rRNA</i>	32
2. Έλεγχος του ενδοειδικού πολυμορφισμού του τμήματος του γονιδίου 16S <i>rRNA</i>	42
Συμπεράσματα	45
Βιβλιογραφία	46

Περίληψη

Το DNA barcoding είναι μια μέθοδος που εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση οργανισμών σε μοριακό επίπεδο, για τη μελέτη της βιοποικιλότητας, για φυλογενετικές αναλύσεις, για την ικνηλασιμότητα διατροφικών προϊόντων και για άλλες παρεμφερείς μελέτες. Η μέθοδος βασίζεται στην ύπαρξη μικρών αλληλουχιών στο DNA των οργανισμών, μοναδικών για το κάθε είδος, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως «ετικέτες» ταυτοποίησης. Συνεπώς, το τμήμα DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως barcode θα πρέπει να έχει τέτοιο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης που να είναι τόσο αργός ώστε να ελαχιστοποιείται η ενδοειδική διαφοροποίηση αλλά παράλληλα να είναι και αρκετά ταχύς ώστε να τονίζεται η διαειδική διαφοροποίηση. Για αυτόν το λόγο, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα θεωρείται ιδανικό ως πηγή μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών. Σήμερα, για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών χρησιμοποιείται ευρύτατα το γονίδιο της υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI).

Στο πλαίσιο της ταυτοποίησης εναλλακτικών ή και συμπληρωματικών μοριακών δεικτών ταυτοποίησης ειδών, σχεδιάστηκε *in silico* ένα ζεύγος εκκινητών που αναγνωρίζουν συντηρημένες αλληλουχίες εκατέρωθεν μιας πολυμορφικής περιοχής του μιτοχονδριακού γονιδίου *16S rRNA*. Το τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* ελέγχθηκε με PCR και επακόλουθη αλληλούχηση σε δείγματα 92 ζωικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων θηλαστικών, πτηνών, ερπετών, ψαριών, μαλακίων, αρθρόποδων και ενός γεωσκώληκα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ενδοειδικού πολυμορφισμού με ανάλυση PCR-SSCP σε δείγματα διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνεται πως το γονίδιο *16S rRNA* του μιτοχονδριακού γονιδιώματος πληροί τις προϋποθέσεις ώστε να λάβει το χαρακτήρα του παγκόσμιου μοριακού δείκτη για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών.

Εισαγωγή

Η αναγνώριση των ειδών στο χρόνο

Η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των έμβιων οργανισμών είναι θεμελιώδους σημασίας για την επιστήμη της βιολογίας. Η σύγχρονη ταξινόμηση των οργανισμών έχει τις ρίζες της στα μέσα του 18ου αιώνα και έχει οδηγήσει στην περιγραφή περίπου 1,7 εκατομμύρια ειδών. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός πως τα μεγαλύτερα ζώα ήταν τα πρώτα που μελετήθηκαν, ενώ μικρότεροι οργανισμοί παραμένουν ακόμα και σήμερα άγνωστοι στην επιστημονική κοινότητα. Παραδείγματος χάριν, θεωρείται ότι περισσότερα από το 90% των ειδών των σπονδυλωτών έχουν αναγνωριστεί ενώ στην τάξη των νηματοειδών η συντριπτική πλειοψηφία παραμένει προς αναγνώριση (Waugh, 2007).

Οι σύγχρονες μέθοδοι αναγνώρισης και ταξινόμησης των οργανισμών έχουν τις ρίζες τους στο ταξινομικό σύστημα που αναπτύχθηκε από τον Carl Linnaeus πριν 250 χρόνια. Οι μέθοδοι αυτοί στηρίζονται κυρίως σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τη συγκριτική μορφολογία, τη φυσιολογία κλπ (Stoeckle et al., 2003). Οι μέθοδοι ανάλυσης των γνωρισμάτων (που ονομάστηκαν κλαδιστικές μέθοδοι) βασίζονται εν γένει στις αρχές που περιγράφηκαν από το Γερμανό εντομολόγο Willi Hennig στο βιβλίο του *Phylogenetic Systematics* (1966). Εφόσον ήταν γνωστό ότι ο γονότυπος ενός ατόμου αντικατοπτρίζεται στο φαινότυπό του, οι μορφολογικοί χαρακτήρες ήταν εκείνοι που χρησιμοποιούταν

κατά κύριο λόγο στις κλαδιστικές μελέτες, καθώς έφεραν πληροφορίες που αντιστοιχούσαν σε μεγάλο ποσοστό του γενετικού υλικού. Επιπροσθέτως, ο φαινότυπος είναι εκείνος που υφίσταται τις πιέσεις της φυσικής επιλογής και εξελίσσεται ορατά. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης των μορφολογικών χαρακτήρων, είναι η δυνατότητα χρήσης μεγάλου δείγματος ατόμων στις αναλύσεις, μειώνοντας με τον τρόπο αυτόν την πιθανότητα στατιστικού σφάλματος, καθώς και η δυνατότητα επανάληψης των αναλύσεων με τη χρήση των ίδιων ατόμων, εφόσον είναι δυνατή η διατήρησή τους. Για τους παραπάνω λόγους, η χρήση της μορφολογίας βρισκόταν σε άνθιση μέχρι τη δεκαετία του '80 (Moore & Willmer, 1997, Conway, 2003).

Η προσέγγιση αυτή όμως για την αναγνώριση ειδών σε επίπεδο ρουτίνας παρουσιάζει τέσσερις βασικούς περιορισμούς. Πρώτον, τόσο η μορφολογική πλαστικότητα όσο και η γενετική ποικιλομορφία στα χαρακτηριστικά που μελετώνται μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένες ταυτοποιήσεις ειδών. Δεύτερον, η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών μπορεί να παραβλέψει κρυπτικά είδη, είδη δηλαδή που μορφολογικά μοιάζουν απόλυτα αλλά γενετικά διαφέρουν κατά πολύ, φαινόμενο συνηθισμένο σε πολλές ομάδες. Τρίτον, το γεγονός πως τα περισσότερα μορφολογικά κριτήρια αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης και σε συγκεκριμένο φύλο, έχει ως επακόλουθη συνέπεια την αδυναμία αναγνώρισης πολλών ατόμων (Hebert et al., 2003). Τέλος, παρόλη την εξέλιξη του διαδικτύου και τη χρήση ποικίλων μορφολογικών κριτηρίων για την ταυτοποίηση των οργανισμών, η αναγνώριση ενός οργανισμού εξακολουθεί να

προϋποθέτει υψηλό βαθμό ειδίκευσης του ερευνητή, κάτι που συχνά οδηγεί σε λάθη (Stoeckle et al. 2003). Οι περιορισμοί αυτοί ανέδειξαν την ανάγκη εξεύρεσης νέων μεθόδων για την ταυτοποίηση των ειδών, οι οποίες θα ξεπερνούσαν τα συγκεκριμένα εμπόδια και δεν θα απαιτούσαν την απόλυτη εξειδίκευση του προσωπικού για τη χρήση τους. Τα τελευταία χρόνια, μέσω της ανάπτυξης των μεθόδων της μοριακής βιολογίας και κυρίως της εφεύρεσης της αλληλούχησης του DNA από τον Sanger , ο συγκεκριμένος στόχος άρχισε να γίνεται ολοένα και πιο εφικτός.

Παρόλα αυτά, η αλληλούχηση του DNA δεν αποτέλεσε πανάκεια. Το γενετικό υλικό των οργανισμών δε θα μπορούσε να είναι πληροφοριακό σε όλη του την έκταση τόσο λόγω της ύπαρξης συντηρημένων αλληλουχιών μεταξύ των ειδών όσο και της ύπαρξης υπερμεταβλητών περιοχών σε άτομα που ανήκουν στο ίδιο είδος. Για αυτό το λόγο, ήταν απαραίτητη η διερεύνηση διαφόρων τμημάτων του γενετικού υλικού για την εξεύρεση του κατάλληλου μοριακού δείκτη που θα εξυπηρετούσε στο εγχείρημα της ταυτοποίησης των ειδών.

Μοριακοί δείκτες

Η χρήση των μοριακών δεικτών είναι ευρέως διαδεδομένη σε διάφορους κλάδους της σύγχρονης επιστήμης και οι μέθοδοι ανάλυσης των γενετικών δεδομένων βελτιώνονται ταχύτατα.

Οι μοριακοί δείκτες καθορίζονται από δύο συνιστώσες: την περιοχή του DNA που πρόκειται να «καλύψουν», καθώς και το επίπεδο πολυμορφισμού και το ποσοστό της

ετεροζυγωτίας που εμφανίζεται σε αυτή, και την τεχνική που χρησιμοποιείται για την εύρεση της διαφοροποίησης.

Οι τέσσερις συχνότεροι τύποι μοριακών δεικτών, που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν από τους επιστήμονες είναι οι ακόλουθοι:

- Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικού θραύσματος (RFLP). Πρόκειται για μοριακό δείκτη, ο οποίος βασίζεται στην παραγωγή διαφορετικού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων μετά από πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα.
- Μικροδορυφόροι (microsatellites). Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, διάσπαρτες στο γονιδίωμα και διαφορετικές μεταξύ των ατόμων.
- Τυχαίος πολλαπλασιασμός πολυμορφικού DNA (RAPD). Πρόκειται για μοριακό δείκτη που βασίζεται στο διαφορικό πολλαπλασιασμό, με τη βοήθεια της PCR, τυχαίων αλληλουχιών ενός δείγματος DNA με εκκινητές που αποτελούνται από μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (συνήθως 8-10 βάσεις).
- Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. Πρόκειται για σύστημα μοριακών δεικτών βασισμένο στη υπάρχουσα ποικιλότητα των πρωτεϊνών που επιτελούν ταυτόσημη λειτουργία αλλά διαφέρουν ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα, λόγω διαφορών που παρουσιάζουν στην αμινοξική αλληλουχία (Αλαχιώτης, 2005).

Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνταν στις φυλογενετικές μελέτες και όχι μόνο, επειδή ήταν πιο οικονομικές και γρήγορες απ' ό,τι η αλληλούχηση του DNA. Με το πέρασμα όμως του χρόνου, τόσο το κόστος όσο και ο χρόνος που χρειάζεται για την αλληλούχηση του γενετικού υλικού, μειώθηκαν. Έτσι, η αλληλούχηση άρχισε να κερδίζει έδαφος στις φυλογενετικές μελέτες, αφού επρόκειτο για μια λεπτομερή και αναλυτική μέθοδο που μπορούσε να εκτιμήσει τις γενετικές αποστάσεις γονιδιακών τμημάτων ή γονιδίων των υπό μελέτη οργανισμών.

Πρόγραμμα προσδιορισμού ετικετών ταυτοποίησης DNA (DNA barcoding)

Οι πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία της αλληλούχησης του DNA εισήγαγαν τη δυνατότητα αξιοποίησης της υπάρχουσας ποικιλομορφίας σε σύντομες αλληλουχίες του DNA μεταξύ των ειδών, ως ετικέτες ταυτοποίησης.

Το εγχείρημα αυτό, οδήγησε στη δημιουργία του CBOLE (Consortium of Barcode of Life), μίας παγκόσμιας σύμπραξης, που στοχεύει στην παροχή DNA barcodes για όλα τα είδη. Ο CBOLE περιλαμβάνει περισσότερους από 120 μέλη από 45 χώρες, συμπεριλαμβανομένων μουσείων, βοτανικών μουσείων, ζωολογικών κήπων, ερευνητικών εργαστηρίων και ιδρυμάτων, κυβερνητικών αλλά και μη κυβερνητικών οργανισμών καθώς και άλλων οργανισμών που συσχετίζονται με ταξινομική έρευνα και θέματα βιοποικιλότητας. Τα μέλη του CBOLE υποβάλλουν τις αλληλουχίες DNA barcode τους καθώς και πιστοποιημένες πληροφορίες για το είδος στο οποίο ανήκει η εν λόγω αλληλουχία σε δημόσια βάση δεδομένων, ώστε να είναι προσβάσιμες από όλους (www.barcodeoflife.org) (Waugh, 2007).

Το DNA barcoding project δε φιλοδοξεί να κατασκευάσει το δέντρο της ζωής ούτε να οδηγήσει σε μοριακή ταξινόμηση. Στόχος του είναι ο σχεδιασμός ενός απλού διαγνωστικού εργαλείου βασιζόμενο στην ήδη υπάρχουσα ταξινομική γνώση (Frezal and Leblois, 2008).

Χρησιμότητα του DNA barcoding

Η πρόσβαση σε μία δημόσια βάση δεδομένων που παραπέμπει σε ταξινομικές ομάδες και αλληλουχίες, και κατ' επέκταση επιτρέπει την ταυτοποίηση μεγάλου εύρους ειδών είναι ωφέλιμη σε μελέτες που απαιτείται αξιόπιστη αναγνώριση ειδών. Έτσι, τα DNA barcodes αποκτούν υποστηρικτικό ρόλο

σε ποικίλα επιστημονικά πεδία, όπως η οικολογία, η εξελικτική βιολογία, η βιογεωγραφία και άλλα. Επιπλέον, τα DNA barcodes μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της βιοποικιλότητας, για τον έλεγχο εμπορίας και λαθραίας θήρευσης ειδών υπό εξαφάνιση, για την παρακολούθηση της αλυσίδας καθώς και για την αναγνώριση και τη ρύθμιση της εξάπλωσης παρασιτικών ειδών. Τέλος, το DNA barcoding μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο και στον έλεγχο ποιότητας διατροφικών προϊόντων (Frezal and Leblois, 2008).

Προϋποθέσεις επιλογής ενός μοριακού δείκτη ως DNA barcode

Ένας μοριακός δείκτης πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια για να κριθεί κατάλληλος, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως barcode. Αρχικά, πρέπει να είναι ικανοποιητικά πολυμορφικός ώστε να μπορεί να διακρίνει τα διαφορετικά είδη και παράλληλα επαρκώς συντηρημένος ώστε να είναι μην εμφανίζει πολυμορφισμό σε άτομα του ίδιου είδους. Δεύτερον, για την αξιόπιστη ενίσχυση του τμήματος του DNA που λειτουργεί ως δείκτης, οι εκατέρωθεν αλληλουχίες που θα υβριδίζονται οι εκκινητές θα πρέπει να είναι συντηρημένες μεταξύ των ειδών. Έτσι, στην περίπτωση που το δείγμα αποτελείται από μίγμα ειδών, είναι δυνατή η αναγνώρισή τους χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό αυτών, αφού οι εκκινητές αυτοί αναγνωρίζουν αλληλουχίες σε όλα τα είδη και δεν είναι απαραίτητη η χρήση ειδικών εκκινητών για το κάθε είδος. Επιπλέον, το τμήμα του DNA-δείκτη θα πρέπει να φέρει φυλογενετικό σήμα (δηλαδή το κατάλληλο επίπεδο πολυμορφισμού) ικανό να ταξινομεί τα υπό μελέτη είδη στις κύριες ταξινομικές βαθμίδες. Τέλος, η ενίσχυση και αλληλούχηση του γονιδίου πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο εφικτή γίνεται κάτω από τις συνήθεις εργαστηριακές συνθήκες, ενώ πρέπει να είναι δυνατή η στοίχιση των αλληλουχιών του γονιδίου ακόμα και μεταξύ ειδών που

ανήκουν σε απομακρυσμένες ταξινομικές ομάδες (Vences et al., 2005).

Με βάση το πρώτο κριτήριο για την επιλογή μίας αλληλουχίας ως DNA barcode, το μιτοχονδριακό DNA θεωρήθηκε ως το πλέον κατάλληλο. Επιπλέον, το ζωικό μιτοχονδριακό DNA εμφανίζει γρήγορο εξελικτικό ρυθμό. Εξελίσσεται έως και 10 φορές πιο γρήγορα από το μη επαναλαμβανόμενο πυρηνικό DNA, ενώ ο εξελικτικός ρυθμός είναι διαφορετικός ακόμα και ανάμεσα σε διαφορετικά τμήματα του mtDNA. Υπάρχουν όμως και πρακτικά πλεονεκτήματα, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι δείγματα mtDNA μπορούν να ληφθούν εύκολα, ενώ δεν είναι απαραίτητη μεγάλη ποσότητα ιστού. Τέλος, μπορεί εύκολα να μελετηθεί και να πολλαπλασιαστεί, καθώς έχουν σχεδιαστεί παγκόσμιοι εκκινητές για PCR, εκκινητές δηλαδή που είναι κοινοί για όλα τα είδη.

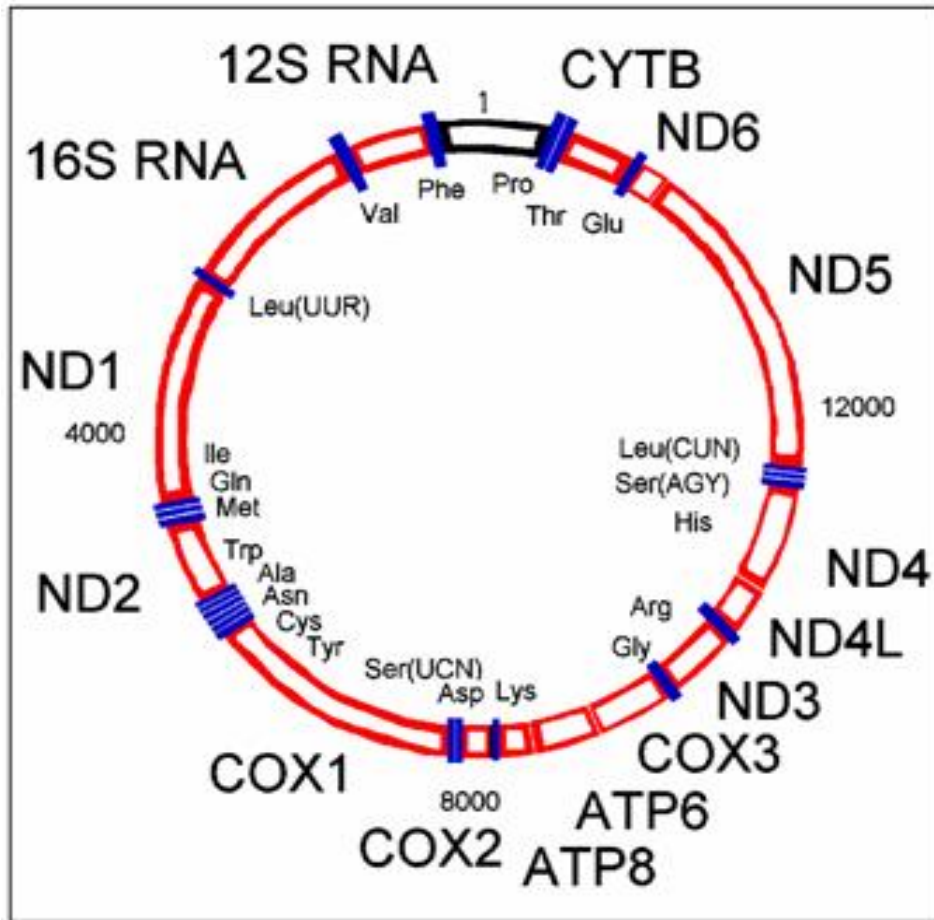
Το μικρό λοιπόν δραστικό μέγεθος του mtDNA σε σχέση με τα πυρηνικά γονίδια και ο υψηλός ρυθμός νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων, καθιστούν το mtDNA πολύτιμο εργαλείο στη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων σε διάφορα ταξινομικά επίπεδα, ανάλογα πάντα με το υπό μελέτη γονίδιο, ή συνδυασμό γονιδίων. Για παράδειγμα, τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για τα rRNAs (12S και 16S) είναι πιο συντηρημένα, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων σε υψηλά (φύλο, υποφύλο) και μεσαία (οικογένεια, γένος) ταξινομικά επίπεδα (Weisburg et al., 1991, Ballard et al., 1992).

Χαρακτηριστικά του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA)

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα συναντάται συνήθως σε δίκλωνη, κυκλική υπερελικωμένη μορφή ενώ σε μερικές κλάσεις των κνιδάριων (π.χ. Κυβόζωα, Σκυφόζωα και Υδροζωα) συναντάται σε γραμμική μορφή. Η δομή του mtDNA είναι πολύ συμπαγής καθώς περιοχές, όπως ιντρόνια, ψευδογονίδια και επαναλαμβανόμενο DNA συνήθως απουσιάζουν.

Το mtDNA στα περισσότερα ζωικά είδη είναι μητρικής προέλευσης. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν παρουσιάζει το φαινόμενο του ανασυνδυασμού, με ελάχιστες εξαιρέσεις (Rokas *et al.*, 2003). Κάθε άτομο φέρει στα κύτταρά του εκατοντάδες ή και χιλιάδες αντίγραφα του ίδιου μορίου μιτοχονδριακού DNA (ομοπλασμία). Έχουν καταγραφεί όμως περιπτώσεις, κατά τις οποίες μόρια mtDNA διαφορετικού μεγέθους ή διαφορετικής αλληλουχίας βρίσκονται στο ίδιο κύτταρο (ετεροπλασμία). Το mtDNA δε συνδέεται με ιστόνες (Russell, 2006).

Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα διαφορετικών ειδών παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες ως προς τον αριθμό και τις λειτουργίες των γονιδίων τους. Το μιτοχονδριακό DNA των ζώων είναι ένα μικρό, εξωχρωμοσωμικό γονιδίωμα, που το μέγεθος του ποικίλλει από 15 έως 20 kb. Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζώων περιέχουν τα ίδια 37 γονίδια, ομόλογα των οποίων υπάρχουν στο mtDNA των φυτών, των μυκήτων και των πρωτίστων. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν 22 μόρια tRNA, 2 μόρια rRNA (12S rRNA και 16S rRNA) και 13 μόρια mRNA που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι το κυτόχρωμα b, επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6), τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (CO I, II και III) και δύο υπομονάδες (6 και 8) της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP. Υπάρχει επίσης και μια μεγάλη μη κωδική περιοχή, η οποία είναι γνωστό ότι περιέχει στοιχεία ελέγχου της αντιγραφής και της μεταγραφής. (Krzywinski *et al.*, 2006). Δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο αυτές οι περιοχές ελέγχου είναι ομόλογες μεταξύ απομακρυσμένων εξελικτικά ζωικών ειδών ή έχουν προκύψει από διαφορετικές μη κωδικές αλληλουχίες ανεξάρτητα, σε ξεχωριστές εξελικτικές γενεαλογίες, δεδομένου ότι δε παρουσιάζουν κάποια ομολογία στις αλληλουχίες εκτός από τις περιπτώσεις που πρόκειται για στενά συγγενικά είδη (Boore, 1999).



Εικόνα 1. Μιτοχονδριακό γονιδίωμα (mtDNA). Φαίνονται τα γονίδια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος καθώς και η θέση τους στο γονιδίωμα (http://www.jogg.info/12/Logan_files/image002.jpg).

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ως πηγή μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών

Ο γρήγορος εξελικτικός ρυθμός αποδίδεται σε μεταλλάξεις, οι οποίες συσσωρεύονται λόγω αδυναμίας επιδιόρθωσης των λαθών κατά την αντιγραφή (η γ DNA πολυμεράση του μιτοχονδρίου δεν έχει την ικανότητα επιδιόρθωσης). Η απουσία ιστονών φαίνεται να το καθιστά ευάλωτο σε δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και άλλους επιβλαβείς παράγοντες. Ωστόσο υπάρχουν έρευνες που υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός συμπλόκων του mtDNA με ορισμένες πρωτεΐνες που μοιάζουν με ιστόνες, μπορεί να το προστατεύσει, για παράδειγμα, από τις ακτίνες X ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Gouliava *et al.*, 2006).

Εκτός όμως, από τις πληροφορίες που μπορεί να δώσει η αλληλούχηση των γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA, η διάταξη των μιτοχονδριακών γονιδίων είναι δυνατό να παρέχει πληροφορίες για τη «βαθιά» φυλογένεση (Boore *et al.*, 1995). Η οργάνωση των γονιδίων τους συνήθως παραμένει αμετάβλητη για μεγάλες χρονικές περιόδους εξελικτικού χρόνου. Συνεπώς, η σύγκριση της οργάνωσης των μιτοχονδριακών γονιδίων έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα πολύτιμη για την εξαγωγή αρχαίων εξελικτικών σχέσεων, αφού φαίνεται ότι η διάταξη των γονιδίων σε απόμακρες ταξινομικά ομάδες είναι μοναδική και έτσι είναι σχεδόν αδύνατο να συμβεί αυτό το γεγονός με τον ίδιο τρόπο σε ανεξάρτητες εξελικτικά γενεαλογίες (Boore, 1999).

Το μιτοχονδριακό γονίδιο κυτοχρωμική οξειδάση (COI) ως DNA barcode

Ο οργανισμός CBOL (Consortium of Barcode of Life) για το σχεδιασμό DNA barcodes, επέλεξε μετά από μελέτες, ένα τμήμα του γονιδίου της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) μήκους 648bp, από το 5' άκρο του γονιδίου.

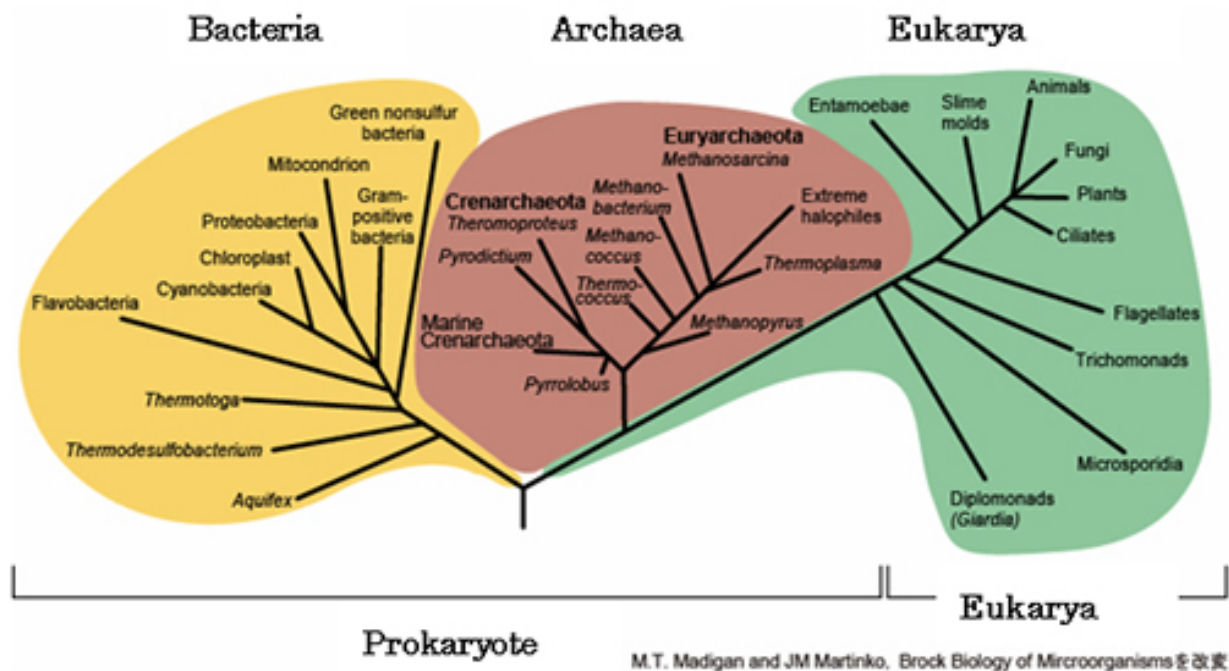
Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι μία μεγάλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη του μιτοχονδρίου. Η πρωτεΐνη αυτή είναι συντηρημένη σε μεγάλο βαθμό στα είδη που χρησιμοποιούν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ως βήμα του μεταβολισμού τους (Waugh, 2007). Η κυτοχρωμική οξειδάση λειτουργεί ως ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, καταλύοντας την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό και αντλώντας πρωτόνια μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αποτελείται από διάφορες υπομονάδες πυρηνικής προέλευσης και από τρεις υπομονάδες, οι οποίες συντίθενται στο μιτοχόνδριο (I, II και III).

Η υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης, είναι η καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου και είναι ενσωματωμένη στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Αυτή η δομή υποδεικνύει ένα υψηλό βαθμό περιορισμού τόσο σε επίπεδο δομής όσο και

σε επίπεδο λειτουργίας, δηλαδή τυχόν μεταλλάξεις θα μπορούσαν να την καταστήσουν μη λειτουργική. Παρόλα αυτά, η νουκλεοτιδική αλληλουχία του αντίστοιχου γονιδίου εμφανίζει σημαντική ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών.

Το γονίδιο της *COI* είναι το μεγαλύτερο από τα τρία γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης και είναι από τα μεγαλύτερα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των ζωικών οργανισμών. Όπως συμβαίνει και με άλλα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα νουκλεοτίδια της τρίτης θέσης του κωδικονίου εμφανίζουν μεγάλο βαθμό αλλαγών, οδηγώντας σε έναν εξελικτικό ρυθμό που είναι τρεις φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των *12S* και *16S rDNA*. (Hebert et al, 2003b). Το γονίδιο της *COI* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο για την αναγνώριση των ειδών και την επισήμανση κρυπτικών ειδών αλλά όσον αφορά την ανάλυση υψηλότερων ταξινομικών βαθμίδων χαρακτηρίζεται ως αναποτελεσματικό (Waugh, 2007).

Το γονίδιο *COI* δεν είναι το μόνο που χρησιμοποιείται ως DNA barcode. Το γονίδιο *16S rRNA* έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα ως δείκτης ταυτοποίησης ειδών καθώς και σε μελέτες φυλογένεσης. Το *16S rRNA* εμφανίζει υψηλό βαθμό συντήρησης ανάμεσα στα είδη. Για αυτό το λόγο, έχει αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για το διαχωρισμό των έμβιων οργανισμών σε τρεις επικράτειες: Αρχαία, Βακτήρια και Ευκαρυώτες (James, 2009). Επιπλέον, επειδή εμφανίζει μικρότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης σε σχέση με το *COI*, εμφανίζει μικρότερο βαθμό ενδοειδικού πολυμορφισμού.



Εικόνα 2. Διαχωρισμός σε Βακτήρια, Αρχαία και Ευκαρυώτες με τη χρήση του γονιδίου 16S rRNA.

Το γονίδιο *16S rRNA* έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές φυλογενετικές μελέτες (Siarkou et al., 2011, Case et al., 2007). Επίσης, χρησιμοποιείται συνδυαστικά με το *COI* (Vences et al., 2005, Arnason et al., 1993) αλλά και με το *cytb* (Botti and Giuffra, 2010, Acs et al., 2010), το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα, για την ταυτοποίηση ειδών και τη διερεύνηση των φυλογενετικών τους σχέσεων (Spice and Dunipace, 2003, Moore and Gosliner, 2011).

Σκοπός

Η ανεπαρκής διακριτική ικανότητα που παρουσιάζει το γονίδιο COI στις ανώτερες ταξινομικές βαθμίδες καθώς και η αναγκαιότητα χρησιμοποίησης περισσότερων του ενός μοριακών δεικτών για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων για την αναγνώριση και ταυτοποίηση ζωικών οργανισμών οδηγεί στην αναζήτηση επιπλέον μοριακών δεικτών. Η ανεύρεση, μάλιστα, ενός δείκτη που θα ενισχύεται με το ίδιο ζεύγος εκκινητών για όλα τα είδη (παγκόσμιος μοριακός δείκτης) αποτελεί ελκυστικό εγχείρημα για τους ερευνητές.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι ο έλεγχος ενός τμήματος ~250 bp του μιτοχονδριακού γονιδίου *16S rRNA* ως προς την καταλληλότητά του ως παγκόσμιο μοριακό δείκτη για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο διάκρισης διαφορετικών ειδών ενώ παράλληλα ελέγχθηκε η εμφάνιση ενδοειδικού πολυμορφισμού σε μερικά είδη. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 92 διαφορετικά είδη που ανήκουν στα φύλα των Χορδωτών (θηλαστικά, ερπετά ψάρια, πτηνά), των Μαλάκιων, των Αρθρόποδων και των Ανελίδων, τα οποία θα αναφερθούν αναλυτικά στη συνέχεια.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Ζωικά είδη

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 92 ζωικά είδη από 4 φύλα [Chordata (Χορδωτά), Mollusca (Μαλάκια), Arthropoda (Αρθρόποδα) και Annelida (Ανελίδες)]. Αναλυτικά τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν, ομαδοποιημένα κατά φύλο και κλάση σε κάποιες περιπτώσεις, φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση των ειδών

Χορδωτά		
Θηλαστικά	Ερπετά	Ψάρια
<i>Lepus timidus</i>	<i>Hierophis gemonensis</i>	<i>Mullus barbatus</i>
<i>Lepus brachyurus</i>	<i>Typhlops vermicularis</i>	<i>Mullus surmuletus</i>
<i>Lepus granatensis</i>	<i>Platycephalus najadum</i>	<i>Trachurus mediterraneus</i>
<i>Lepus mediterraneus</i>	<i>Hemidactylus turcicus</i>	<i>Micromesistius poutassou</i>
<i>Lepus saxatilis</i>	<i>Lacerta viridis</i>	<i>Sparus auratus</i>
<i>Lepus castroviejoi</i>		<i>Limanda aspera</i>
<i>Lepus capensis</i>	Πτηνά	<i>Merluccius merluccius</i>
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Turdus merula</i>	<i>Lophius budegassa</i>
<i>Lepus europaeus</i>	<i>Scolopax rusticola</i>	<i>Oblada melanura</i>
<i>Lepus victoriae</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Zeus faber</i>
<i>Capreolus capreolus</i>	<i>Anas platyrhynchos</i>	<i>Raja miraletus</i>
<i>Bos Taurus</i>	<i>Meleagris gallopavo</i>	<i>Scomber scombrus</i>
<i>Ovis aries</i>	<i>Passer montanus</i>	<i>Prionace glauca</i>
<i>Capra hircus</i>	<i>Columba livia</i>	<i>Sebastes viviparous</i>
<i>Sus scrofa</i>	<i>Streptopelia turtur</i>	<i>Carassius auratus</i>
<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Columba palumbus</i>	<i>Betta splendens</i>
<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Anas penelope</i>	<i>Salmo trutta</i>
<i>Bubalus bubalis</i>	<i>Anas crecca</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>
<i>Erinaceus europaeus</i>	<i>Tadorna tadorna</i>	<i>Engraulis encrasicolus</i>
<i>Felis silvestris</i>	<i>Phasianus colchicus</i>	<i>Sardinella aurita</i>
<i>Mus musculus</i>	<i>Gallinago gallinago</i>	<i>Trachurus trachurus</i>
<i>Martes martes</i>	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Spicara smaris</i>
<i>Mustela nivalis</i>	<i>Coturnix japonica</i>	<i>Boops boops</i>
<i>Ursus arctos</i>	<i>Alectoris graeca</i>	<i>Salmo salar</i>
<i>Rupicapra rupicapra</i>	<i>Anser anser</i>	<i>Lates niloticus</i>
<i>Equus caballus</i>	<i>Alectoris chukar</i>	<i>Merluccius hubbsi</i>
<i>Homo sapiens</i>		<i>Phycis phycis</i>
		<i>Trigla lucerna</i>
		<i>Katsuwonus pelamis</i>
		<i>Pagellus erythrinus</i>
		<i>Ladigesocypris ghigii</i>
		<i>Helicolenus dactylopterus</i>

Αρθρόποδα	Μαλάκια	Ανελίδες
<i>Callinectes sapidus</i>	<i>Sepia officinalis</i>	<i>Terrestris lumbricus</i>
<i>Astacus astacus</i>	<i>Loligo vulgaris</i>	
<i>Homarus gammarus</i>	<i>Helix aspersa</i>	
<i>Squilla mantis</i>		
<i>Nephrops norvegicus</i>		

Τα δείγματα προήλθαν από εκτροφεία, από θηράματα, από αλιεύματα και από την αγορά.

2. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

CH₃COONa 0,5M (200ml)

- 8,20 gr CH₃COONa
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Sodium Dodecyl Sulphate 5% (SDS)

- 5 gr SDS
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιούνται 50-100 mg ιστού και ακολουθήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες :

1. Τοποθετούμε τον ιστό αρκετά τεμαχισμένο σε σωλήνα erpendorf των 2 ml και προσθέτουμε 0,6 ml CH₃COONa 0,2 M, 50 μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K 10 mg/ml.
2. Επωάζουμε τα δείγματα υπό ανάδευση στους 55°C για μια ώρα.
3. Προσθέτουμε 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Αναδεύουμε έντονα τα δείγματα.
4. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 min στους 4°C

5. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθέτουμε 1 ml χλωροφορμίο/ισοαμυλική αλκοόλη. Αναδεύουμε έντονα.
6. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 5 min στους 4°C.
7. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωλήνα erpendorf.
8. Προσθέτουμε 1 ml παγωμένη ισοπροπανόλη. Αναδεύουμε ήπια.
9. Τοποθετούμε τα δείγματα στους -20°C για 30 min.
10. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 20 min στους 4°C
11. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσπαθώντας να διατηρήσουμε ανέπαφο το ίζημα.
12. Προσθέτουμε 1 ml παγωμένη αλκοόλη 70%, αναδεύουμε ήπια.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 5 min στους 4°C.
14. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
15. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 37° C, ώστε να ξηρανθεί το ίζημα.
16. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100 μl ddH₂O και τοποθετούμε τα δείγματα είτε στο ψυγείο (4°C) είτε στην κατάψυξη (-20°C).

Το διάλυμα οξικού νατρίου χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων ρυθμίζοντας την ωσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών. Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης ενώ παράλληλα αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας το DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεϊνάση K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, προστατεύοντας το DNA από τη δράση νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης pH7 που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατινή φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω

μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 70%.

3. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Η συνολική ποσότητα του DNA στο εκάστοτε δείγμα ελέγχεται είτε με φωτομέτρηση του δείγματος είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v.

Η φωτομέτρηση βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος 260nm. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49 μl ddH₂O. Στη συνέχεια, οι προκύπτουσες τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 1,8 σε δείγματα υψηλής καθαρότητας, κατάλληλα για χρήση.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης θα περιγραφεί στην παράγραφο 5.

4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος που επιτρέπει τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιείται ένα κατάλληλο ζεύγος εκκινητών (primers), οι οποίοι είναι συνθετικά μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15 – 30 βάσεων, με αλληλουχία συμπληρωματική το καθένα για μία από τις αλυσίδες του DNA, και οριοθετούν την αλληλουχία

που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Παρουσία του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών, περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού.

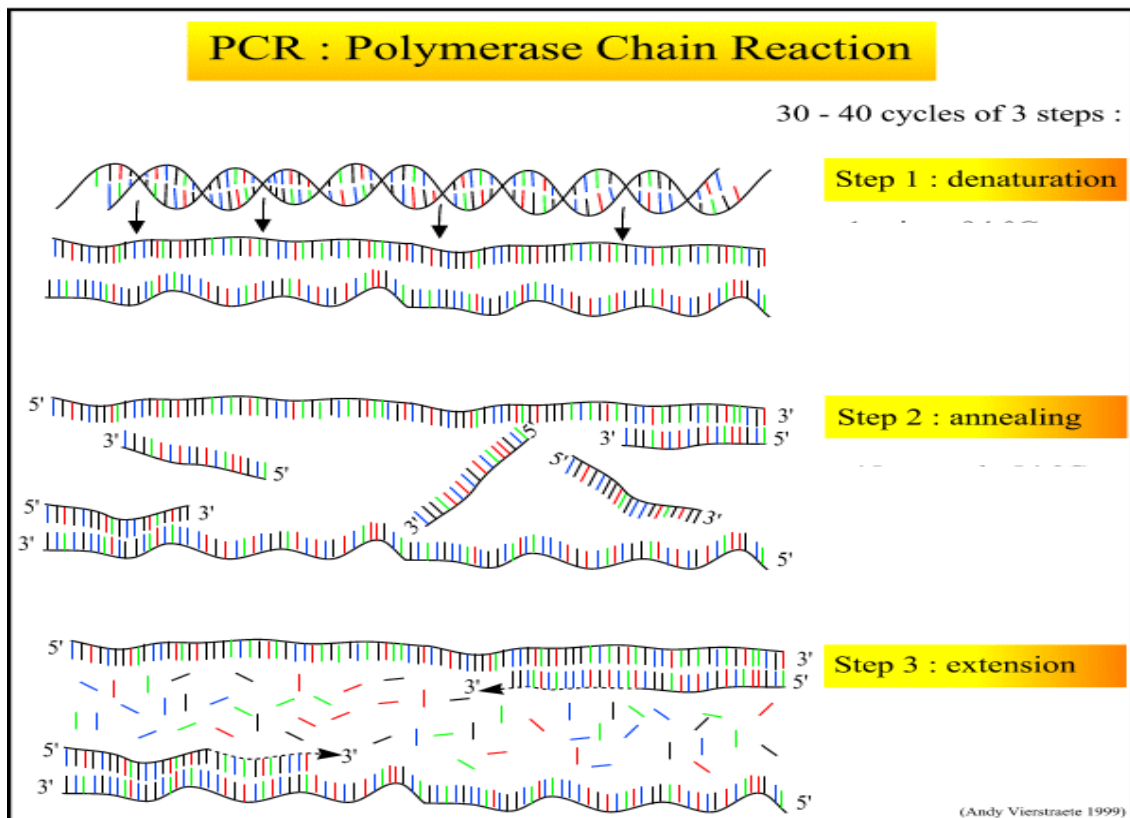
Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια και έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

Τα τρία στάδια του κάθε κύκλου της PCR είναι τα ακόλουθα:

Αποδιάταξη: το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο, μέσω της θέρμανσής του σε υψηλή θερμοκρασία (94°-95°C).

Υβριδοποίηση εκκινητών: οι δύο εκκινητές υβριδοποιούνται με τις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών (50°-65°C).

Επέκταση των εκκινητών (πολυμερισμός): σύνθεση DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση.



Εικόνα 3. Τα τρία στάδια της αντίδρασης PCR
(<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif>).

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε το ανάλογο ζεύγος εκκινητών:

Forward primer: **5' – AYAAGACGAGAAGACCC – 3'**

Reverse primer: **5' – GATTGCGCTGTTATTCC – 3'**

Όπου Y = C ή T

Οι εκκινητές αυτοί προέρχονται από τη μεταπτυχιακή διατριβή «Ταυτοποίηση ειδών σε τυποποιημένα κρέατα με ανάλυση γενετικών δεικτών» του Βασίλη Δ. Γκοντοσόπουλου. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν σε συντηρημένες περιοχές του *16S rRNA* συγκρίνοντας *in silico* αλληλουχίες από θηλαστικά, πτηνά και ψάρια.

Τα συστατικά της αντίδρασης PCR φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Συστατικά αντίδρασης PCR.

Συστατικά αντίδρασης PCR	Ποσότητες συστατικών αντίδρασης PCR
DNA εκμαγείο	~ 200 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X	5 μ l
MgCl₂ (50mM)	2 μ l
dNTPs (10mM each)	1 μ l
Εκκινητής Forward (50pmol/ml)	1 μ l
Εκκινητής Reverse (50pmol/ml)	1 μ l
Taq DNA πολυμεράση (5U/μl)	0,2 μ l
ddH₂O	έως τα 50 μ l

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* είναι:

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec

Υβριδοποίηση: 53° C για 40 sec

Επιμήκυνση: 72° C για 40 sec

Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

} 35 κύκλοι

5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (πχ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοικτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωση που φθορίζει υπό υπεριώδες φως.

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2 M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05 M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0,1% w/v

TBE 1X

Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,6gr αγαρόζης σε 30ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 3ml βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 1 μg / ml. Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδες φως. Η πηκτική τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση, και να κατακάθονται τα δείγματα στις θέσεις της πηκτής λόγω της μεγαλύτερης πυκνότητάς τους.

Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά μετά την απομόνωση του DNA από τους ιστούς των ζωικών οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν, για τον έλεγχο του μιτοχονδριακού DNA και έπειτα, μετά την ολοκλήρωση της PCR, για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης.

Σε 5 μl προϊόντος PCR (το 10% της συνολικής ποσότητας) προστίθεται loading buffer τελικής συγκέντρωσης 1X. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 80 volts και ακολουθεί παρατήρηση και φωτογράφιση των δειγμάτων υπό υπεριώδες φως.

6. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στη πηκτή και έχει διακριτική ικανότητα ενός νουκλεοτιδίου. Η διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα οφείλεται στη διαφορετική δομή που λαμβάνουν μονόκλιωνα μόρια DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και κατά μόνο μία βάση. Έτσι, τμήματα DNA του ίδιου γονιδίου που έχουν ενισχυθεί με PCR, από διαφορετικά άτομα και που παρουσιάζουν νουκλεοτιδικές διαφορές, θα έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση και επομένως θα είναι δυνατή η διάκρισή τους.

Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής.

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα:

Αποδιατακτικό διάλυμα

Formamide 95%

Bromophenol blue 0,05%

Xylene Cyanol 0,05%

NaOH 10 mM

Σε 5-7 μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) προστίθενται 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος και τα δείγματα αποδιατάσσονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της

αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλινα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλινη κατάσταση.

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (100ml)

Ακρυλαμίδη 37,5g
Bis-acrylamide 1g
ddH₂O έως τα 100ml

TBE 10x (2lt)

Tris Base 0,5 M
Boric acid 0,04 M
EDTA 0,02 M
ddH₂O έως τα 2lt

Glycerol 50% v/v

APS 20% w/v

Ammonium Persulfate 2gr
ddH₂O έως τα 10ml

TEMED (Tetramethylethylenediamine)

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 10%.

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 10% αναγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3 : Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 10%

	Ποσότητα	Τελικές συγκεντρώσεις
Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	16 ml	10%
Glycerol 50%	6,25 ml	5%
TBE 10x	5 ml	0,8%
TEMED	62,5 μ l	
APS 20%	310 μ l	0,1%
ddH₂O	Έως τα 62,5 ml	
Συνολικός όγκος	62,5 ml	

7. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΰδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο (Sambrook et al, 2000). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 2%

Acetic Acid 0,125%

ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)

Διάλυμα AgNO₃ 1gr/lt

Διάλυμα 3 (200ml)

NaOH 0,015 M

NaBH₄ 50 μ M

Formaldehyde 0,2%

ddH₂O έως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτιζονται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με απεσταγμένο νερό για 1 min υπό ανάδευση. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα νιτρικού αργύρου και οι πηκτές επωάζονται για 15 min υπό ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1 min η κάθε μία υπό ανάδευση. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

8. Αλληλούχηση και ανάλυση αλληλουχιών

Τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) ώστε να απομακρυνθούν εκκινητές, διαλύματα, Taq πολυμεράση κτλ, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την αλληλουχία.

Η τεχνική της αλληλούχησης σήμερα βασίζεται σε μια παραλλαγή της μεθόδου Sanger. Η αλληλούχηση γίνεται σε μια αντίδραση, όπου κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ή ddTTP) σημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, οπότε και εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Έτσι με τη χρήση ενός ανιχνευτή laser, καταγράφεται ο φθορισμός και τελικά λαμβάνεται η αλληλουχία, με τη μορφή χρωματογραφήματος.

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων της αλληλούχησης πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μία) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαράτιθενται με τη χρήση

κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (Thompson et al, 1997) (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή.

Για τη σύγκριση των αλληλουχιών και τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ τους, καθώς και για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της σύγκρισης μέσω φυλογενετικού δέντρου, χρησιμοποιείται το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al, 2007). Με τη χρήση αυτού του προγράμματος, είναι δυνατή η πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών και η εύρεση των πολυμορφικών και συντηρημένων θέσεων. Το πρόγραμμα προσφέρει την δυνατότητα της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου με το επιθυμητό μοντέλο (NJ: neighbor-joining, UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages, MP: maximum parsimony), όπως και τον έλεγχο bootstrap για το κατασκευασμένο δέντρο, ο οποίος είναι ενδεικτικός για την αξιοπιστία των δέντρων που προκύπτουν.

Συνοπτικά τα βασικότερα στοιχεία για τα πιο συνηθισμένα μοντέλα κατασκευής δέντρων παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Η μέθοδος συσχέτισης μη σταθμισμένων ομάδων ανά ζεύγη με αριθμητικούς μέσους όρους (UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages) είναι η πιο απλή και προϋποθέτει σταθερούς ρυθμούς εξέλιξης μεταξύ των γενεαλογικών γραμμών` έτσι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ των εξελικτικών αποστάσεων και του χρόνου διάσπασης (Αλαχιώτης, 2007).

Η μέθοδος σύνδεσης γειτόνων (NJ: neighbor joining) αποτελεί μια από τις δημοφιλέστερες μεθόδους κατασκευής φυλογενετικών δέντρων. Ανήκει στις μεθόδους ομαδοποίησης αλλά δε βασίζεται σε ίσους ρυθμούς εξέλιξης των αλληλουχιών DNA των υπό διερεύνηση γενεαλογικών γραμμών(Αλαχιώτης, 2007). Στην εργασία, το δέντρο κατασκευάστηκε με αυτή τη μέθοδο.

Η μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας (MP: maximum parsimony) βασίζεται στην αρχή της αξιοποίησης των μικρότερων εξελικτικών αλλαγών που απαιτούνται για να εξηγηθούν οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ταξινομικών μονάδων (Αλαχιώτης, 2007).

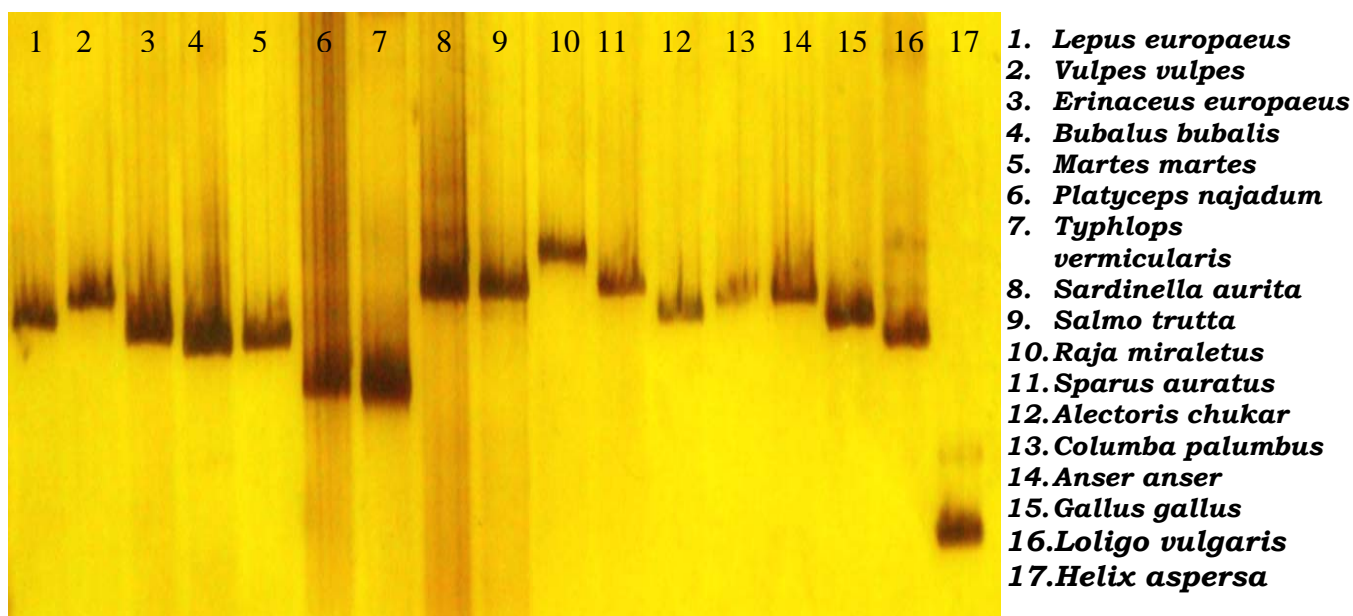
Ο γενικός κανόνας για το έλεγχο της αξιοπιστίας των φυλογενετικών δέντρων είναι ότι, αν από τη μια ομάδα δεδομένων προκύπτει το ίδιο δέντρο (ή πανομοιότυπα δέντρα) μετά από ανάλυση με δυο ή τρεις διαφορετικές μεθόδους κατασκευής δέντρων, τότε αυτό το δέντρο μπορεί να θεωρηθεί αρκετά αξιόπιστο. Είναι επίσης πιθανό διαφορετικά τμήματα των δέντρων να προσδιοριστούν με διαφορετικό βαθμό εμπιστοσύνης. Οι δοκιμασίες bootstrap επιτρέπουν την κατά προσέγγιση εκτίμηση αυτού του βαθμού εμπιστοσύνης με ποσοτικό τρόπο. Η διαδικασία μιας δοκιμασίας bootstrap είναι απλή: ένα υποσύνολο των αρχικών δεδομένων επιλέγεται με τυχαίο τρόπο από την αρχική ομάδα δεδομένων και κατασκευάζεται ένα δέντρο με τα δεδομένα αυτού του υποσυνόλου. (Αλαχιώτης, 2007)

Αποτελέσματα και Συζήτηση

1. Έλεγχος του διαδεδεικτού πολυμορφισμού του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA

Τα προϊόντα της PCR ηλεktροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% παράλληλα με μάρτυρα τμημάτων γνωστών μοριακών μεγεθών, για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου 16S rRNA και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος PCR.

Παρατηρήθηκε πως τα προϊόντα PCR που προέρχονται από διαφορετικά ζωικά είδη, ειδικά σε εξελικτικά απομακρυσμένα είδη, παρουσιάζουν ποικιλομορφία μεγέθους. Για μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, ηλεktροφορήθηκαν επιλεκτικά προϊόντα PCR από είδη που ανήκουν στο φύλο των Χορδωτών (θηλαστικά, ερπετά, ψάρια και πτηνά) και στο φύλο των Μαλάκιων, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ηλεktροφόρηση προϊόντων PCR σε ακρυλαμίδη. Φαίνεται η διαφορετικότητα μεγεθών του υπό μελέτη τμήματος του γονιδίου 16S rDNA μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Παρατηρούμε πως το μέγεθος του τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* που ενισχύθηκε, κυμαίνεται από ~90 bp στο *Helix aspersa* μέχρι ~250 bp στο *Lates niloticus*.

Στη συνέχεια, τα προϊόντα PCR, αφού καθαρίστηκαν με τη χρήση kit, στάλθηκαν για αλληλούχηση (20 μl από το κάθε δείγμα), με τους ίδιους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων είναι οι παρακάτω :

Lepus timidus TATGGAGCTTTAATTATTTAATTC AATATTTTCACAACTTCACCCACAG GAGCTTAACCAAGAAAATCCCT GAAT TAAAAATTTTGGTTG
 Lepus brachyurus A.C.....C.....TTA.....
 Lepus granatensisT.....TT.....
 Lepus mediterraneusT.....G.....C.T..G.C.....TT.....
 Lepus saxatilisT.....T.T...T...C.....TT.....
 Lepus castroviejoiT.....T.....
 Lepus capensisTC.....G..T.....C.....TT.....
 Oryctolagus cuniculusCC.....C.C..C.TTT.T.CT...T...AT...C.....G.....GG.....
 Lepus europaeusG.....TC.....TTA.....
 Lepus victoriaeT.....C..T...G.C.....TT.....
 Capreolus capreolusC..C...CC...AAGA.A T.GAC.T.AC.AC..AG.TA.A...T.TC..TA..GG...C.G.....
 Bos taurusC..ACC..CC...AAGAGAA T.GA..T.AC.ATT.AG..A.A...C.TC...A...G...GGT.G...C.....
 Ovis ariesC..AG..C...AGGA.AA T.A...AC.AC..AG..A...C.CTCCTTA...G...C.G..C.....
 Capra hircusC..AC..G.C...AA.G.AA T.A...T.AC.AC..AG..A...C.TCC.TTA..G.C..GC.G.....
 Sus scrofaAC..T.C...AA.GT.AA AC.AC..AC.ACA.AG.ATAA...TA.CTTAA.A...G.C..GC.....C.....
 Anser anserG...A..A...AA.C.ACG.CCACTCGAA.C.T...TCAAC.C...T.G.GC.ACT...TCGC.GAG.CTG.TCG.AT.TTT..C.....
 Turdus merulaG...A..C...AA.C.GCTGCCACCC.AAA...TACA.C...C.G.TT.ACTTA..C.T..GC.A..TG.C.C.GC.TTT..C.....
 Scolopax rusticolaG...A..A...AA.C.G.CCACT.T.A...ACT.CAA..CT...CAG.CC.A.T...C.T..C.A.A..TG.CCC.AC.TTT..C.....
 Gallus gallusG...A...AA.C.CG.CCAGCT..CAAC.TT.CACAGC.C...T.G.TC.ACCEA...C.T.A..CTG.CCG.AC.TTT..C.....
 Anas platyrhynchosG...A..A...AA.C.ACGGCCACCCGAACCT.AG..AA..C...C.G.GCTAC.GA...TCGC.GAG.ATG.CCG.AT.TTT..C.....
 Meleagris gallopavoG...A..A...AA...CG.CCACCT.TCCAC...CAACAC.C...T.GACC.ACCCA...T...A.G.C.TG.TCG.AC.TTT..C.....
 Vulpes vulpesG...A...A..GCC.AACTT.GAAC.T.T.AC...C...T.G..ATAAC.T.CT.CC.TGT.AT.GGC...C...A.....
 Canis lupus familiarisA...CC..AACTC..GGA.A..T.GA...AC.T...AG.CATAAC..T.C.CC..TAT.AT.GG...GC...A.....
 Mullus barbatusG.....GACACC.G GGCAGGCTGTG.GAATA..ACCTGAATA.GGA...CAG.A...C.G.CG...T.CCC.A.TGT.....
 Mullus surmuletusG.....GACAC...GGCAGACTAG..AATA.C.CCT.GA.A.AG...A..A...TG.C...CT.CCC.GC.TGT.....
 Trachurus mediterraneusG.....GACACA..G.CAGATCATG..AA..C.CC.TAATA.AG...C...A.TTA.TG...T.CT.TCC...TGTC..C.....
 Micromesistius poutassouG.....GAC..C...AGTAAGTCACG...A...TGC.ACAT..ATAG TAA..A.TTAGTG..ATAA.TTACTG.A.GTGT.....
 Sparus auratusG.....GCGGCC.G A.CAGCTCAGC.CAA...C.CC.G.ATA.AG.G AA...A.C.AGTGGA...CT.CTC...GTGT.....
 Limanda asperaG.....GACACAC..GGTGGCCATG.CAA.T...CC.CGCTA.GG...C.G.A.T.AGTGGAG..CT.CC...G.TGTC..C.....
 Merluccius merlucciusG.....GAC..C...A.TAAACCAG...A.T.TAC.A.AGTT..ATAG AA..A.TTAGTGGATAT.TTATTA.A.GTGT.....
 Lophius budegassaG.....GACACC...GGCAGACTAG..AA.A.C.CC.GAATA.GG...AA...A...TG.AG.A.CT.CCC...TGT.....
 Oblada melanuraG.....GACGCC.G G.CAGCTACG..AA..C.CCA.AATA.AG...AAA..A.C.AGT..AT..CT.TTC...GTGT.....
 Zeus faberG.....GAC..C...TGCACTCCAGAA.A.AT...TTGATA.AGAAA..GAA..G.TCA.TGGCT..CT.C.C.GCCTGT.....
 Raja miraletusG.....AACAC.T.AGTTACTATC.TAC..AT...A..A.TCTA.AGACCTAACCTC..CTA.T.G.AG.CTAACT..A.TGT..C.....
 Scomber scombrusG.....GACAC...GCCATATCA.G..AA..C.CC..AA.A.GG...AC...A.TTATTG.AAT.ATT.GCC.GT.TGTC..C.....
 Prionace glaucaG.....C.AACAC.T.AATTAATTATGTAACCT.C.T...C.AGG.AAT.AACA..AT.TAC..CA.TTCTAATT..A.CTGT.....
 Sebastes viviparusG.....GACACC...AGAAGATCCTG.CAAGT...CC.TTATA.GG...C...A.T.ATGG.AT..CTTCCC...TGTC.....
 Hierophis gemonensisG.....G.G.AGCT.A...ACTAA.CTA.T.AA.CAT.T.A..TAATT...CTT.C.....
 Bubalus bubalisG.....C..A.C.GCC...AAGA.AAA..T.ACCA.AC.GCT.AG..A.G...C.CTC.T.A...GC...G.C.G..C.....
 Typhlops vermicularisG.....G.G.AGCT.A...A.AATCT...T.AT.CT.CT.A...GGAGT...CTT..A.....
 Passer montanusG.....A...A...AACCC.GCA.CCACCCT..AAAC...CACA.C.C...T.G.CC.ACTG.T..AT..GC.A..TG.TC.GCGTTT..C.....
 Erinaceus europaeusG.....G.ATAA...C.A.A...ATT..CT.CT.ACAAT.TAA.G.TA..C...AT...TAAC..T.G...T..C.....
 Columba liviaG.....A...A...AA.C.GCAGCCACCTCGCAAC..A...A..C.T...TAG.CT.ACC.G...C.TGATG..TG.CTC.GC.TTT..C.....
 Platyceps najadumG.....G.G.AGCT.A...ATTAA.CTA.T.AATCAC.T.A..TA.CT...CTT.C.....
 Hemidactylus turcicusG.....AT...AC..CACGCACTAT.AC.AGC..A.C.CA.CAA.AGGTTACTA.ACC..A.CT..T.A...TA.GC..A.GTT.A.A.....
 Lacerta viridisTGTGGAGCTT.AA...ATC.CC.AGCACT.TTCA.TGG.T...A.....
 Carassius auratusT.....A..GGTACA...ACTCAACCAG..AAG...CA.TAA.AGT GA..A.TTTGTGGAA..AT..GA..TTT.CC..C.....
 Betta splendensA..A...A..TAGATC.TG..AA...TA.CTTAATT.A.A..AG.G.A.CGA..G.AT..CTATCA.T.TGT.....
 Felis silvestrisG.....ACCG.CC...AAGAGACCAT.TG.ACC..AC.G...GA..AC...ACCTC.ATA...GGC.GC...A.....
 Streptopelia turturG.....A...A...AA.C.GCAGCCACCCCGCAAC..A...CCAG.C...TAG.CC.ACC..T...C..GATGT.TG.CTC.AC.TTT..C.....
 Mus musculusG.....A...C..T.TC...ATTT..T..ATTAAAC.TAATG..CC...C..ACT.TAGTA..A.G..TG...C.....
 Salmo truttaG.....GACACC...GGCAGATCAGC.CAAG...C.TGAATT.ACAA..TAA..A.GCAGT.C...TA.CCC..AT.TGTC.....
 Dicentrarchus labraxG.....GACACA.G GG.AGACTAC...AATT.C.CCTGGATA.AG...GCA..AGTA..GG.AG..CCTCCC.C.GCCTC.....
 Engraulis encrasicolusG.....GACAC..GCCA.CTGTG.ATAAGCG..TGAACCTGAA.A.GTCC..TAA.TA.C.CCG.GC.TTATG.TGA..GT.GTC..A.....
 Sardinella auritaG.....GACGCCC.CCACCAGC.A.AAGCAG.CTACCT.AA.AGAT.C..TC...A...CGCGG...T..G.T.C.A..CGTC..C.....
 Trachurus trachurusG.....GACACA..G.CAGATCAG..AA..C.CC.CAATA.AG...C...A.TTA.TG...T..CT.TCC...TGTC..C.....
 Spicara smarisG.....A.GACGCC.G G.CAGCTCAGC..AA..C.CCTTGATA.AG...AA..A.CGATG.A..T..CT.CCC.C.GTGT.....
 Boops boopsG.....A.GACGCC.G GG.CAGCTCAGC..AA..GC.CCT.AATA.AG.A..A.A.A.CTAGTG.A..T..CT.CTC...TGTC.....
 Salmo salarG.....GACACC...GGCAGATCAGC.CAAGT...C.TGAATT.ACAA..TAA..A.GCAGT.C...TA.CCC..AT.TGTC.....
 Lates niloticusG.....GACGCC.G G.TAGCTATG..AAGACC.CCT.AATA.AG...C.G.A.TTAGTG.C...CTATTC...TGTC..C.....
 Merluccius hubbsiG.....GAC..C...A.TAAACCAG...A.T.TAC.A.AATT..ATAG AA..A.TTAGTGGG.AT.TTATT..A.GTGT.....
 Martes martesG.....C...AC..CC...TAG..AA.A...TTAAC..AC.A.C.G..TC...GA.CCT.A.TAAT..G...GC...A.....
 Mustela nivalisG.....C...AC..CC...TA...ACCA..TT.AC.T.AC.A.TAG..TC...TA.CTT.ATTACT.GG...GC...A.....
 Ursus arctosG.....C...A..GC...A.AGGA..T.TTTACCAGAC.G...GA..AC...T.TTCCTT.CAT..GC...GC...A.....
 Rupicapra rupicapraG.....C..AC..GCC...AAGA.AA...AC..AC.AC.AG...A...C.CTC.T.A...G.C...GC.G.....
 Columba palumbusG.....A...A...AA.C.ACAGCCACCTC.CAAC..A.T.CA..CT..CAG.CT.ACC.A..AC.TGATG..TG.CTC.AC.TTT..C.....
 Terrestris lumbricusT.TAGAG..TT.TTTT.A.CAA...GCCAGAAAATTT.TA.T...A..C.....
 Sepia officinalisA.TGAGCT..A.AATTTT.T T.TT.TTAT.TA..AT.TT.TA..AGT..AAA.G...A.....
 Loligo vulgarisACTGACT..A.AATTTT.T TATT.TT.TT..TT.TTGGAGCAGT..A.T...AA.....
 Callinectes sapidusATAAAGCT.TA.AAATTT.T TAATTT.GTTT.TT..TTATT.T.T.ATGA.GAT..GAG..TTTA.....
 Helicolenus dactylopterusG.....GACACC...AGAAGTCCCTG.CAA.T...CCTCAATA.GG...C.G.A.T.ATGG.AT..CTTCCC...TGTC.....
 Phycis phycisG.....C.GAC..C..A.TAATTTATG...A.T.CAC.GGGAAT.TCAG...A..A.TTA.T..ATAA.TTATTG..G.GTGT.....
 Trigla lucernaG.....GACAC...AGCAGCTCATG.CAA.A.C.C.GCAATA.A...ACCG.A.C.A.TG.G...CT.CCC...TGTC.....
 Helix aspersaTAGAAACT.A.TGTG.....T.....
 Homo sapiensTA...G...AACAG.A...CTAACA.AC...GT CCT..A.CT.CC.AA...C.....
 Katusuwonus pelamisG.....GACACC...GGCATATCATG..AA..C.CCT.AATA.AG...ACC..A.C.A.TG.AT.T..AT.CCC.CC.TGTC.....
 Equus caballusG.....AC.G...CAAAA.ACAACA...ACCT.AC.TT...G..AC...A.CTT.TGA.T...C.GC.....
 Anas penelopeG...A..A...AA.C.ACGGCCACCCGGAA.CT.AG...AA..C..TC.G.C.AC..A..TCGC.GAG.ATG.CCG.AC.TTT..C.....
 Anas creccaG...A..A...AA.C.ACGGCCACCCGGAACT.AG..AA..C...C.G..C.AC..A..TCGC.GAG.ATG.CCG.AT.TTT..C.....
 Tadorna tadornaG...A..A...AA.C.ACGGCCACCCGGAACT.AG..AA..C...C.G.T.ACT..T.TCGC.AGG.ATG.CCG.AT.TTT..C.....
 Nephrops norvegicusATAAAGCT..A.AATTT.TA.ATAA...G.TAA.TTAA..GTT.T..T.T.TAT.TAT...TTA...C.....
 Ladigesocypris ghigiiT.....A..GGTACA...GTTCAACCAG..AA..G...CT..ATA.AGC...AGG.A.TTAGTGCCG.A.AT..C..TTT.CC..C.....
 Phasianus colchicusG...A..A...AA...CG.TCACCTCC.CAC...CAC.GC.C...C.G.CTTACCCA..C...ATA.CTGATCG.AC.TTT..C.....
 Gallinago gallinagoG...A..A...AA.C.G.AGCCACTGCTCACA..ACTA.AA..CT..ATAG.CC.ACT.A.C.T...ATG..TG.CTC.AC.TTT..C.....
 Coturnix coturnixG...A..A...AA.C..CG.CCACC.TA.AGTTAC.TACAC.C...C.G.CA.A.CCG..CT..CA...TG.TCG.AC.TTT..C.....
 Coturnix japonicaG...A..A...AA.C..CG.CCACC.TA.AATTTAC.T.CAC.C...C.G.CA.A.CCA..CT..CA...TG.TCG.AC.TTT..C.....
 Squilla mantisTA..AAGCT..ATAAFACT.C...TTTT.TA.A.AATTTT..CT.TTA...T.T..CT.ATT.TAA.GAT.GT.TTA...TAC..
 Astacus astacusATAAAGCT..A..ATTT.AAAGTAAATG..ATT.TTA...T.TT...GATT.TATT.T.T...TA...TA...
 Homarus gammarusATAAAGCT..A.AATTT.GTA.ATAATT.G.TGAGTTAA..GTT.T..T..TAT.TAT.TAC.G..TTA...C.....
 Pagellus erythrinusG.....A..GACG.A.G AGCAGCTCATG.AAAG..C.CCTGAA.A.AG...AAA..A.C.A.TG.AA...CT.CCC...TGTC.....
 Alectoris graecaG...A...AA...CA.CCACCT.CCCAC..ACCT...C.C.A.A..GACT.ACCTATG..C...G.ATCTG.TTG.AC.TTT..C.....
 Alectoris chukarG...A...AA...CA.CCACCT.CCCAC..GCCT...C.C.A.A..G.CC.ACCTATG..T...ATCTG.TTG.AC.TTT..C.....

Sequence alignment showing DNA bases (A, C, G, T) for various species across positions 110 to 200. The alignment is displayed in a grid format with gaps indicated by dashes. Species listed include Lepus timidus, Capreolus capreolus, and many others. The alignment shows conserved regions and polymorphisms across the species.

	210	220	230	240	250	260	270	280
Lepus timidus	AAGC	ATTAGAAATC	ATAAAA	TTGACCCAAATCC	TTT	TGATCAACGGAA	CAAGTTACCC	TA
Lepus brachyurus	...	C...G...T.T...
Lepus granatensisA...C...
Lepus mediterraneusA...T...
Lepus saxatilisA...T...
Lepus castroviejoiA...	C...	...C...
Lepus capensisGA...T...
Oryctolagus cuniculus	...	A.TAT...AA...
Lepus europaeusA...C...
Lepus victoriae	...	A.AT...T...
Capreolus capreolus	C...	TCGCAC...	G.TT...	...T...AAA...
Bos taurus	...	TCACTCT...	GCTC...	...T...AAA...	C...
Ovis aries	...	CCA.ACC...	GCTT...	...T...AAA...	C...
Capra hircus	...	TCA.ATT...	GCTT...	...T...AAA...	AC...
Sus scrofa	...	ATAACCATA.C...	CTT...	...T...AA...
Anser anser	...	T GC .AC.G.G	CC...	...TATAAA	T...T.T.C...	C...C...	C...	C...
Turdus merula	...	T GC .AC.GCA	CC...	...TATAAA	T...T.T.C...	C...C...	C...	C...
Scolopax rusticola	...	C.T...C...AT.G.A	CC...	...TATAAA	T...CA.T.C...	C...C...	C...	C...
Gallus gallus	...	T...CC.AC.G.A	CC...	...TATAAA	T...G.T.C...	C...C...	C...	C...
Anas platyrhynchos	...	T GC .AT.G.G	CC...	...TATAAA	T...T.T.C...	C...C...	C...	C...
Meleagris gallopavo	...	T...C...AT.G.A	TT...	...TATAAA	T...T.T.A.C...	C...C...	C...	C...
Vulpes vulpes	...	GTACC...	CTT...	...T...TAAT	C...
Canis lupus familiaris	...	ACA.C...	CTT...	...T...TAAT
Mullus barbatus	...	GCT-G.CAGA.CT.TG.CCT	ACAA.T.GGCCA	A.GCC...T...	CAG...	C...	C...	C...
Mullus cauratus	...	CT-A.CAGA.CT.TG.CCT	ATAA.T.GGC.G	ACGCC...	C.G...	C...	C...	C...
Trachurus mediterraneus	...	GCT-A.CAGA.CT.TTG.CCTT	ATA.T.GGCG	ACGCC...	C...	C...	C...	C...
Micromesistius poutassou	...	T-A.CAGA.T.TG.CTTT	TC...T.GGTAT	AACC...	A.C.G...	C...	C...	C...
Sparus auratus	...	TA-A.CAGA.CT.TG.CC	C-AA.T.GGCA	ACGCC...	C.G...	C...	C...	C...
Limanda aspera	...	C.AGCAGA.T.TG.CC	AAA.T.GGTA	A.ACC...	A.C...	C...	C...	C...
Merluccius merluccius	...	A.CAGA.T.TG.CCT	AC...T.GGTAT	AACC...	T...A.C.C...	C...	C...	C...
Lophius budegassa	...	TT-ATCAGA.C...TG.CC	AA.T.GGC	AAGCC...	C.G...	C...	C...	C...
Oblada melanura	...	TA-A.CAGA.TT.TG.CC	C-AA.T.GGCA	G.GCC...	C.G...	C...	C...	C...
Zeus faber	...	T-A.CAGA.T.TG.CCT	AA...T.GGGAA	ACC...	A.C.G...	C...	C...	C...
Raja miraletus	G.T	A.A.CAGA.T...TA.CG	TAA...T.GGG.TAC	ACCC...	T.A.C...	C...	C...	C...
Scomber scombrus	...	CA-A.CAGA.TT.TG.CC	TAA...T.GGCA	ACGCC...	C...	C...	C...	C...
Prionace glauca	...	TT-A.A.A.C...TTACCG	AAA...T.GGATT	CC...	T.A.C...	C...	C...	C...
Sebastes viviparus	...	TT-A.CAGA.T...TG.CC	TAA...T.GGCA	A.GCC...	C.G...	C...	C...	C...
Hierophis gemonensis	...	CAA-GCC.A...CT	...GCA.AG	C...AA.TT.A.C...	T.C...	C...	C...	C...
Bubalus bubalis	...	TCGCTCT...GCTC	...T...AAA
Typhlops vermicularis	...	CAA-G.C.ACC...	...GTATAA	C...A.T.A.C...	T.C...	C...	C...	C...
Passer montanus	...	C.T GC .AT.G.A	CCC...	...TATAAA	T...G.T.C...	C...C...	C...	C...
Erinaceus europaeus	...	ATGA.CA...CTT	...GTAAAT	AC...
Columba livia	...	C.T...C...AC.G.A	CC...	...TATAAA	T...C...T.C...	C...C...	C...	C...
Platyceps najadum	...	CAA-GCC.AC...AT	...GCATAG	C...A.TT.A.C...	T.C...	C...	C...	C...
Hemidactylus turcicus	...	TAG-CC.A...T	...GTA.A	C...A.A.C...	C...	C...	C...	C...
Lacerta viridis	...	ATTT.C.TAT.GATCC.GC	A.A.TTTT.T.TAT	C...T.A.C...	C...	C...	C...	C...
Carassius auratus	...	C.CAGA.C...TG.CC	ATA...T.GGC.AATACAAGCC	...	A.C...	C...	C...	C...
Betta splendens	...	TTTA.CAGA.TT.TG.CCT	A...T.GGCA	A.GCC...	C.G...	C...	C...	C...
Felis silvestris	...	A-G.ACT.C...CTT	...T...AAA	CC...
Streptopelia turtur	...	C.T...C...AC.G.A	CC...	...TATAAA	T...T...C...	C...C...	C...	C...
Mus musculus	...	TAA.A.CA.C.A	TCTT...	...G.ATA...	C...	C...	C...	C...
Salmo trutta	...	ACCAGA.T...TG.CC	ATA...T.GGCGA	ACGCC...	C.G...	C...	C...	C...
Dicentrarchus labrax	...	G.A.CAGA.CT.TTG.CC	TCAA...T.GGCA	CGCC...	A.C.G...	C...	C...	C...
Engraulis encrasicolus	...	CGCA.A.TT.TTG.CTG	AA...T.GGT.GAA	AAACC...	T...A.C...	C...	C...	C...
Sardinella aurita	...	T.C.A.A...TTG.CCG	CAA...T.GGC.TAC	G.CC...	C...	C...	C...	C...
Trachurus trachurus	...	GCT-A.CAGA.CT.TTG.CCTT	ATA...T.GGCG	ACGCC...	C...	C...	C...	C...
Spicara smaris	...	TT-A.CAGA.TT.TG.CC	G.CTA.T.GGCA	A.GCC...	G...	C...	C...	C...
Boops boops	...	TG-A.CAGA.CT.TGGCC	T.A.T.A.T.GGTA	AAACC...	A.C.G...	C...	C...	C...
Salmo salar	...	T-ACCAGA.TT.TG.CC	AAA...T.GGCAT	ACGCC...	C.G...	C...	C...	C...
Lates niloticus	...	TTT-A.CAGA.T.TG.CC	CAA...T.GGCA	A.GCC...	C...	C...	C...	C...
Merluccius hubbsi	...	A.CAGA.T.TG.CCTC	AC...T.GGTA	AGCC...	T...A.C.C...	C...	C...	C...
Martes martes	...	GCACTCCT...TC	...T...TAA	C...
Mustela nivalis	...	GCGTTCT...TC	...T...TAA
Ursus arctos	...	GCTC.C...CTT	...T...A.TT	C...
Rupicapra rupicapra	...	CCC.ATT...GCTT	...T...AAA	AC...
Columba palumbus	...	C.T GC .AT.G.A	CC...	...TATAAA	T...C...T.C...	C...C...	C...	C...
Terrestris lumbricus	...	CT...G.ACCCC.TA	A.C...	A...AA.T...C...	T...	C...	C...	C...
Sepia officinalis	...	TTA...G...ACC.AT	TT...	TATTG.TTATA.TAG	...	A...
Loligo vulgaris	...	T.A...G...ACC.ATAA	GTT.CATGATTATTGT.ATAA	ATATTG.TTATA.TAT	...	A...
Callinectes sapidus	...	TA...A.ATTGATC	CTC...	AAGAGATT.AA.C...	TT...
Helicolenus dactylopterus	G.TT	A.CAGA.T...TG.CC	TAA...T.GGCA	A.GCC...	C.G...	C...	C...	C...
Phycis phycis	...	T-A.CAGA.T.TG.CTTT	A...T.GGTAT	ACC...	C.G...	C...	C...	C...
Trigla lucerna	...	A.CAGA.CT.TG.CCT	T.A...T.GGCA	A.GCC...	A.C.G...	C...	C...	C...
Helix aspersa	G.TTAAG...	CTCTA
Homo sapiens	...	G...ACTACT.A	C.C...	...T...TAA	C...	C...	C...	C...
Katsuwonus pelamis	...	TT-A.CAGA.TT.TG.CC	TAA...T.GGCA	ACGCC...	C.G...	C...	C...	C...
Equus caballus	...	A...ATAT...	CTT...	...T...A	CA...
Anas penelope	...	T GC .AT.G.G	CC...	...TATAAA	T...T.T.C...	C...C...	C...	C...
Anas crecca	...	T GC .AT.G.G	CC...	...TATAAA	T...T.T.C...	C...C...	C...	C...
Tadorna tadorna	...	T GC .AT.G.G	CC...	...TATAAA	T...T.T.C...	C...C...	C...	C...
Nephrops norvegicus	GT.T	A.GATCC	TT.TT	TTGA-T.AAATTT	TT..GGGATAACAGCGCAATC
Ladigesocypris ghigii	G..	CGCAGA.C...TG.CC	GAA...T.GGC.AATA	AAGCC...	A.C...	C...	C...	C...
Phasianus colchicus	...	T...C...AT.G.A	CT...	...TATAAA	T...CTG.T.A.C...	C...C...	C...	C...
Gallinago gallinago	...	C.T...C...AC.G.A	CC...	...TATAAA	T...A.T.C...	C...C...	C...	C...
Coturnix coturnix	...	T CC .AC.G.A	CT...	...TATAAA	T...T.T.C...	C...C...	C...	C...
Coturnix japonica	...	T CC .AC.G.A	CT...	...TATAAA	T...T.T.C...	C...C...	C...	C...
Squilla mantis	...	T.TAA...GATCCATT	ATT	ATGA...CAA...	TT...
Astacus astacus	GT	A.A.GATCT	TA.GT	AGGA-AT.AA.TT	TT...
Homarus gammarus	GT.T	A.GATCC	TT.GTTG	TTGA-T.AAATTT	TT...
Pagellus erythrinus	...	TA.A.CAGA.T...TG.CC	C-AA...T.GGCA	A.GCC...	C.G...	C...	C...	C...
Alectoris graeca	...	T...C...AT.G.A	T...	...TATAAA	T...C...T.C...	C...C...	C...	C...
Alectoris chukar	...	T...C...AT.G.A	T...	...TATAAA	T...C...T.C...	C...C...	C...	C...

Οι αλληλουχίες του τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* που μελετήθηκαν, εμφανίζουν πολυμορφισμό μεγέθους επιβεβαιώνοντας έτσι και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης που παρατέθηκαν προηγουμένως. Το μέγεθος των αλληλουχιών κυμαίνεται από 93 bp στο *Helix aspersa* μέχρι 252 bp στο *Lates niloticus*.

Στο τμήμα που ενισχύθηκε εμφανίζεται πολυμορφισμός μεγέθους σε διάφορα σημεία. Η κύρια περιοχή που εμφανίζει πολυμορφισμό είναι μία περιοχή περίπου 40 bp λίγο μετά τη μέση του ενισχυμένου τμήματος. Το γονίδιο *16S rRNA* έχει μέγεθος 1557 bp στο *H. sapiens* (περιοχή 1672-3229 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος). Το τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* που μελετήθηκε έχει μέγεθος 202 bp και βρίσκεται στην περιοχή 2730-2932 του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Συνεπώς, βρίσκεται κοντά στην 3' περιοχή του γονιδίου *16S rRNA*.

Ο πολυμορφισμός μεγέθους που παρατηρείται σχετίζεται με την ταξινομική ομάδα στην οποία ανήκει το κάθε είδος. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία και το μήκος του τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* που αντιστοιχεί στο καθένα.

Πίνακας 4. Το μέγεθος του ενισχυμένου τμήματος του γονιδίου 16S rRNA που αντιστοιχεί σε κάθε είδος.

<i>Lepus timidus</i> 209 bp	<i>Gallus gallus</i> 217 bp	<i>Sebastes viviparus</i> 227 bp	<i>Sardinella aurita</i> 229 bp
<i>Lepus brachyurus</i> 210 bp	<i>Anas platyrhynchos</i> 217 bp	<i>Hierophis gemonensis</i> 166 bp	<i>Trachurus trachurus</i> 249 bp
<i>Lepus granatensis</i> 210 bp	<i>Meleagris gallopavo</i> 215 bp	<i>Bubalus bubalis</i> 204 bp	<i>Spicara smaris</i> 229 bp
<i>Lepus mediterraneus</i> 210 bp	<i>Vulpes vulpes</i> 208 bp	<i>Typhlops vermicularis</i> 155 bp	<i>Boops boops</i> 229 bp
<i>Lepus saxatilis</i> 210 bp	<i>Canis lupus familiaris</i> 209 bp	<i>Passer montanus</i> 216 bp	<i>Salmo salar</i> 231 bp
<i>Lepus castroviejo</i> 209 bp	<i>Mullus barbatus</i> 226 bp	<i>Erinaceus europaeus</i> 202 bp	<i>Lates niloticus</i> 252 bp
<i>Lepus capensis</i> 211 bp	<i>Mullus surmuletus</i> 227 bp	<i>Columba livia</i> 213 bp	<i>Merluccius hubbsi</i> 226 bp
<i>Oryctolagus cuniculus</i> 209 bp	<i>Trachurus mediterraneus</i> 249 bp	<i>Platycephalus najadum</i> 169 bp	<i>Martes martes</i> 205 bp
<i>Lepus europaeus</i> 210 bp	<i>Micromesistius poutassou</i> 225 bp	<i>Hemidactylus turcicus</i> 211 bp	<i>Mustela nivalis</i> 204 bp
<i>Lepus victoriae</i> 210 bp	<i>Sparus auratus</i> 229 bp	<i>Lacerta viridis</i> 176 bp	<i>Ursus arctos</i> 205 bp
<i>Capreolus capreolus</i> 201 bp	<i>Limanda aspera</i> 241 bp	<i>Carassius auratus</i> 229 bp	<i>Rupicapra rupicapra</i> 203 bp
<i>Bos taurus</i> 202 bp	<i>Merluccius merluccius</i> 225 bp	<i>Betta splendens</i> 225 bp	<i>Columba palumbus</i> 214 bp
<i>Ovis aries</i> 202 bp	<i>Lophius budegassa</i> 225 bp	<i>Felis silvestris</i> 204 bp	<i>Terrestris lumbricus</i> 144 bp
<i>Capra hircus</i> 203 bp	<i>Oblada melanura</i> 228 bp	<i>Streptopelia turtur</i> 216 bp	<i>Sepia officinalis</i> 160 bp
<i>Sus scrofa</i> 207 bp	<i>Zeus faber</i> 226 bp	<i>Mus musculus</i> 207 bp	<i>Loligo vulgaris</i> 189 bp
<i>Anser anser</i> 217 bp	<i>Raja miraletus</i> 237 bp	<i>Salmo trutta</i> 230 bp	<i>Callinectes sapidus</i> 179 bp
<i>Turdus merula</i> 217 bp	<i>Scomber scombrus</i> 234 bp	<i>Dicentrarchus labrax</i> 228 bp	<i>Helicolenus dactylopterus</i> 226 bp
<i>Scolopax rusticola</i> 213 bp	<i>Prionace glauca</i> 234 bp	<i>Engraulis encrasicolus</i> 229 bp	<i>Phycis phycis</i> 225 bp
<i>Trigla lucerna</i> 227 bp	<i>Helix aspersa</i> 93 bp	<i>Homo sapiens</i> 203 bp	<i>Katsuwonus pelamis</i> 227 bp
<i>Equus caballus</i> 207 bp	<i>Anas penelope</i> 217 bp	<i>Anas crecca</i> 217 bp	<i>Tadorna tadorna</i> 218 bp
<i>Nephrops norvegicus</i> 192 bp	<i>Ladigesocypris ghigii</i> 227 bp	<i>Phasianus colchicus</i> 215 bp	<i>Gallinago gallinago</i> 214 bp
<i>Coturnix coturnix</i> 217 bp	<i>Coturnix japonica</i> 217 bp	<i>Squilla mantis</i> 183 bp	<i>Astacus astacus</i> 166 bp
<i>Homarus gammarus</i> 175 bp	<i>Pagellus erythrinus</i> 228 bp	<i>Alectoris graeca</i> 217 bp	<i>Alectoris chukar</i> 217 bp

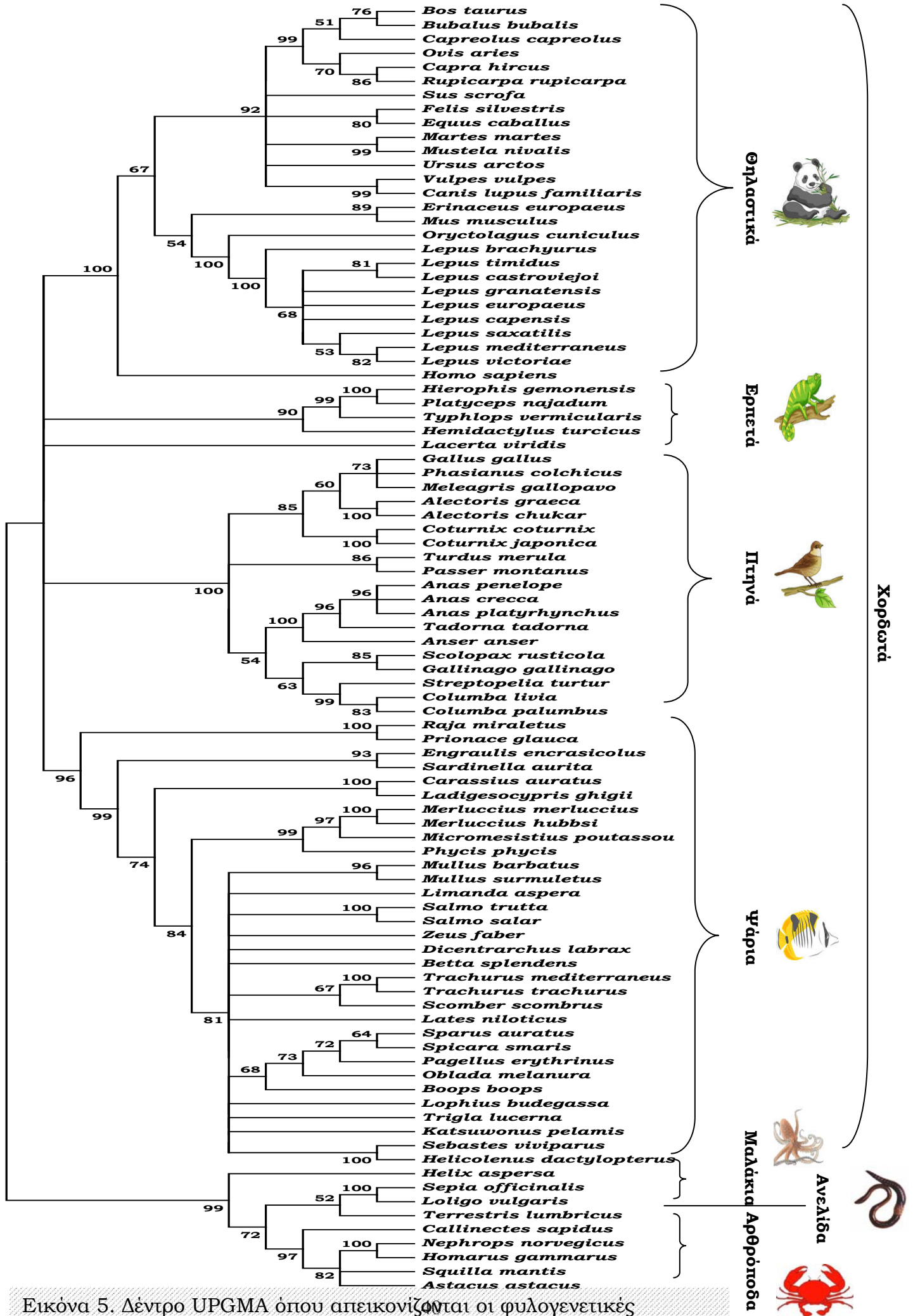
Ενδεικτικά, επισημαίνονται δυο ομάδες ειδών που εμφανίζουν κοινό μέγεθος στην αλληλουχία του γονιδίου που ενισχύθηκε. Παρατηρείται πως ο πολυμορφισμός του μεγέθους ομαδοποιεί ως ένα σημείο τα είδη που μελετήθηκαν

αφού τα είδη με ροζ σκίαση ανήκουν στην κατηγορία των πτηνών και με μωβ σκίαση στην κατηγορία των ψαριών. Με προσεκτικότερη παρατήρηση του πίνακα 4 φαίνεται πως είδη που ανήκουν στο ίδιο φύλο και στην ίδια κλάση δεν εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις μεγέθους προϊόντος PCR.

Ο πολυμορφισμός μεγέθους που παρατηρείται σε αυτό το τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* μπορεί να δικαιολογηθεί από τη φύση του προϊόντος του γονιδίου. Το γονίδιο *16S rRNA* δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνη αλλά κωδικοποιεί για ένα μόριο ριβοσωμικού RNA. Πολυμορφισμός μεγέθους δεν απαντάται σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες γιατί με αυτόν τον τρόπο θα ήταν πιθανή η μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και ο σχηματισμός μη λειτουργικής πρωτεΐνης ή ακόμα και η παντελής έλλειψη γονιδιακού προϊόντος, κάτι που θα ήταν καταστρεπτικό για το κύτταρο. Ακόμα και στο γονίδιο *COI* που εμφανίζει υψηλότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης από το γονίδιο *16S rRNA*, δεν εμφανίζεται πολυμορφισμός μεγέθους. Συνεπώς, το γεγονός πως το γονίδιο *16S rRNA* δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνη αποτελεί μια πιθανή εξήγηση στον παρατηρούμενο πολυμορφισμό του μεγέθους.

Επιπρόσθετα, μία σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός πως κάθε αλληλουχία είναι μοναδική για το κάθε είδος. Δεν εμφανίζονται δηλαδή ταυτόσημες αλληλουχίες μεταξύ των διαφορετικών ζωικών οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το επιλεγμένο τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* είναι ικανό να διαχωρίζει ζωικά είδη, τουλάχιστον αυτά που μελετήθηκαν.

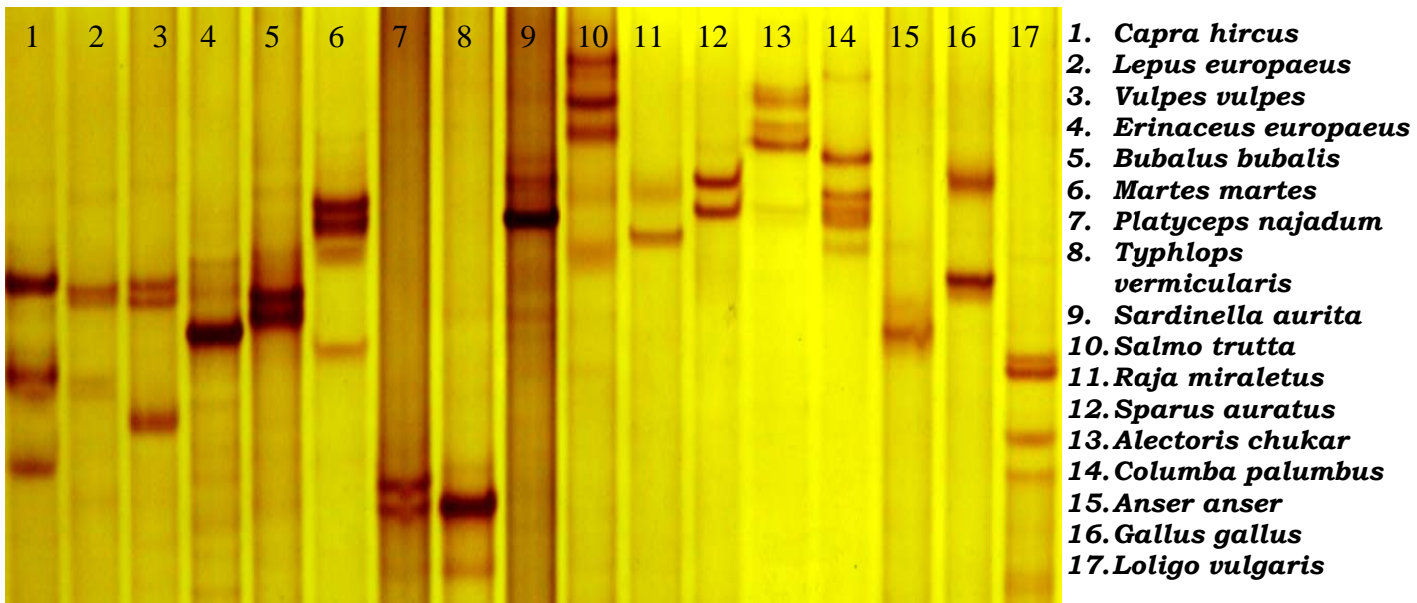
Για την απεικόνιση αυτού του αποτελέσματος κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο UPGMA όπου φαίνεται η ταξινόμηση των ζωικών οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν βάσει των αλληλουχιών τους (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Δέντρο UPGMA όπου απεικονίζονται οι φυλογενετικές σχέσεις, βάσει των αλληλουχιών του τμήματος 16S rRNA.

Μελετώντας το φυλογενετικό δέντρο είναι φανερό πως όλα τα είδη διαχωρίζονται μεταξύ τους, χωρίς να εμφανίζονται όμοιες αλληλουχίες μεταξύ των ειδών. Το γεγονός αυτό ισχύει ακόμα και μεταξύ ειδών που ανήκουν στο ίδιο γένος, όπως για παράδειγμα τα 9 είδη του γένους *Lepus* που διαχωρίζονται εμφανώς.

Εκτός από την ανάλυση των αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR-SSCP για τον έλεγχο ικανού διαχωρισμού των ειδών με αυτή τη μέθοδο, που αποτελεί πιο οικονομική και άμεση επιλογή από την αλληλούχηση των προϊόντων PCR. Στην εικόνα 6 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης SSCP ενδεικτικά σε ορισμένα είδη.

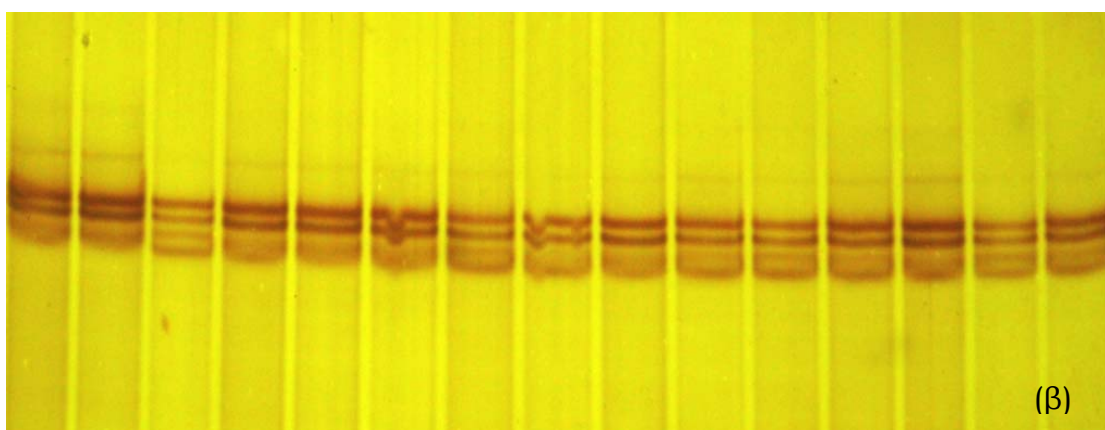
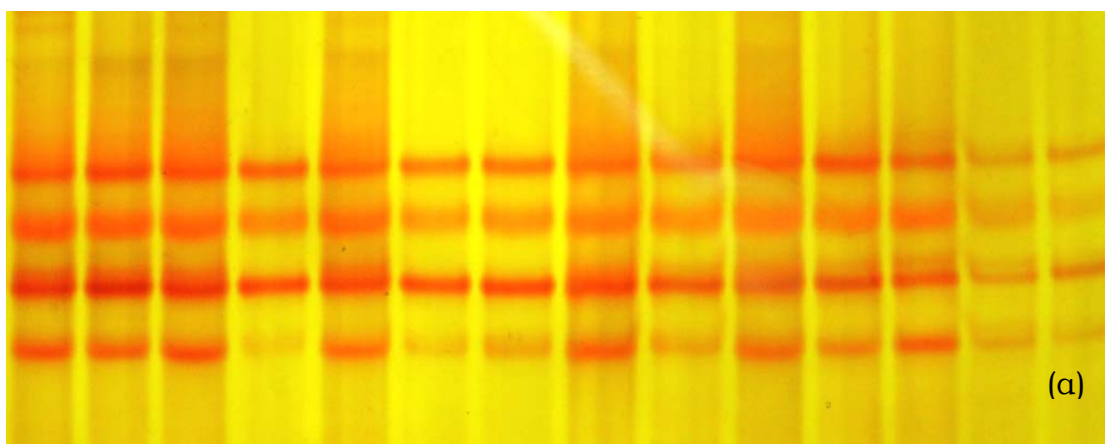


Εικόνα 6. Αποτελέσματα της ανάλυσης SSCP. Τα πρότυπα των ζωνών που προκύπτουν διαφέρουν μεταξύ των ειδών.

Αυτή η διαδικασία ακολουθήθηκε για περίπου 30 είδη, συμπεριλαμβανομένων αυτών που απεικονίζονται στην εικόνα 6. Το αποτέλεσμα ήταν ο ικανός διαχωρισμός των ειδών, με την ανάλυση PCR-SSCP. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατός ο διαχωρισμός των ειδών αλλά όχι η ταυτοποίησή τους.

2. Έλεγχος του ενδοειδικού πολυμορφισμού του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA.

Για τον έλεγχο ύπαρξης ενδοειδικού πολυμορφισμού πραγματοποιήθηκε πληθυσμιακή ανάλυση σε μερικά από τα είδη με τη χρήση της τεχνικής SSCP. Στην εικόνα 8 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης SSCP ενδεικτικά για έναν πληθυσμό *Alectoris chukar* (Εικόνα 7α) και για έναν πληθυσμό *Lepus europaeus* (Εικόνα 7β).



Εικόνα 7. Ανάλυση SSCP ενός πληθυσμού 14 ατόμων *Alectoris chukar* (α) και ενός πληθυσμού 15 ατόμων *Lepus europaeus* (β).

Τα άτομα που ανήκουν στο ίδιο είδος είναι εμφανές πως δεν παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα μεταξύ τους. Συνδυαστικά με πειράματα που έχουν γίνει παράλληλα στο εργαστήριο, έχουν ελεγχθεί συνολικά 15 διαφορετικά είδη για

εμφάνιση ενδοειδικού πολυμορφισμού και το αποτέλεσμα που εμφανίζεται είναι ο γενετικός μονομορφισμός εντός των ειδών. Συνεπώς, τουλάχιστον στο επίπεδο που ελέγχθηκε δεν εμφανίζεται ενδοειδικός πολυμορφισμός για τους συγκεκριμένους πληθυσμούς με τη χρήση του τμήματος του γονιδίου *16S rRNA*.

Συνδυάζοντας λοιπόν, τα παρατιθέμενα αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα πως το τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* που επιλέχθηκε είναι ικανό να διακρίνει τα διαφορετικά είδη, και τουλάχιστον στο επίπεδο και για τα είδη που ελέγχθηκαν, δεν εμφανίζει ενδοειδικό πολυμορφισμό.

Ο αριθμός των διαφορετικών ειδών που χρησιμοποιήθηκαν θεωρείται επαρκής για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων όσον αφορά την ικανότητα του τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* να διακρίνει και να ταυτοποιεί διαφορετικά είδη. Αντίθετα, ο αριθμός των ατόμων που ελέγχθηκε για εμφάνιση ενδοειδικού πολυμορφισμού είναι περιορισμένος (15 άτομα ανά είδος) για να εξαχθεί αξιόπιστο αποτέλεσμα για τον ενδοειδικό πολυμορφισμό που εμφανίζει το τμήμα αυτό του γονιδίου *16S rRNA*. Για αυτό το λόγο, θεωρείται αναγκαίος ο έλεγχος περισσότερων ατόμων από κάθε είδος για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και μία συγκριτική μελέτη χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* παράλληλα με το γονίδιο *COI* για την εξακρίβωση των αποτελεσμάτων αλλά και την ανάδειξη των ορίων ταυτοποίησης ζωικών οργανισμών του κάθε γονιδίου σε μεγαλύτερο εύρος οργανισμών.

Το DNA barcoding όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή αποτελεί σημαντικό εργαλείο με ποικίλες εφαρμογές που σχετίζονται τόσο με την επιστημονική κοινότητα όπως θέματα μοριακής οικολογίας, όσο και με καθημερινά ζητήματα όπως ο έλεγχος εμπορίας και λαθραίας θήρευσης ειδών υπό εξαφάνιση. Το DNA barcoding μπορεί να βρει εφαρμογή και στον έλεγχο ποιότητας διατροφικών προϊόντων. Προκαταρκτικές μελέτες του εργαστηρίου μας, δείχνουν πως

το τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* που μελετήθηκε σε αυτή την εργασία είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί τόσο στον έλεγχο επεξεργασμένων τροφίμων όσο και στον έλεγχο μιγμάτων διατροφικών προϊόντων, αφού προσφέρει τη δυνατότητα ενίσχυσης με PCR ταυτόχρονα όλων των ειδών που περιλαμβάνονται στο μίγμα (λόγω του παγκόσμιου χαρακτήρα των εκκινητών).

Συμπεράσματα

Σε αυτή την εργασία, ελέγχθηκε η καταλληλότητα ενός τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* ως παγκόσμιου μοριακού δείκτη για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών και προέκυψαν οι παρακάτω παρατηρήσεις:

- Το τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* εμφανίζει πολυμορφισμό μεγέθους, κάτι που έγινε φανερό τόσο από την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων όσο και από τη σύγκριση των αλληλουχιών. Ακόμα όμως και στα είδη που δεν εμφανίζουν πολυμορφισμό μεγέθους μεταξύ τους, παρατηρείται πολυμορφισμός σε επίπεδο αλληλουχίας (νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις).
- Κατά τη σύγκριση των αλληλουχιών 92 διαφορετικών ζωικών ειδών δεν εμφανίστηκαν ταυτόσημες αλληλουχίες, κάτι που συνεπάγεται τον ικανό διαχωρισμό ειδών με τη χρήση αυτού του τμήματος του γονιδίου *16S rRNA*.
- Η ανάλυση SSCP παρουσιάζει διαφορετικά πρότυπα ανάμεσα στα 30 είδη που ελέγχθηκαν ενώ ενδοειδικά δεν παρουσιάζεται πολυμορφισμός. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως το τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* που χρησιμοποιήθηκε παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης ειδών που δεν ανήκουν στο ίδιο είδος χωρίς να είναι απαραίτητη η αλληλούχηση τους.

Συνεπώς, το γονίδιο *16S rRNA* πληροί τις προϋποθέσεις για να λάβει το χαρακτήρα του παγκόσμιου μοριακού δείκτη για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών.

Βιβλιογραφία

- Acs Z., Challis R.J., Bihari P., Blaxter M., Hayward A., Melika G., Csóka G., Péntzes Z., Pujade-Villar J., Nieves-Aldrey J.L., Schönrogge K., Stone G.N. (2010). Phylogeny and DNA barcoding of inquiline oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palaearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Volume 55, Issue 1.
- Ballard J.O., Olsen G.J., Faith D.P., Odgers W.A., Rowell D.M., Atkinson P. (1992). Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods. *Science* 258: 1345-1348.
- Boore J.L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 15;27(8):1767-80.
- Boore J.L., Collins T.M., Stanton D., Daehler L.L., Brown W.M. (1995). Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature* 376:163–165.
- Botti S. and Giuffra E. (2010). Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: identification of tuna and other scombrid species in food products. *BMC Biotechnology* 10:60.
- Budwole, B., Allen, R.C. Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis of DNA fragments, *Molecular Biology in Medicine* (1990), Volume 7.
- Case R.J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W.F., Kjelleberg S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol.* 2007 January; 73(1): 278–288.
- Conway S. (2003). *Life's Solution. Inevitable Humans in a Lonely Universe.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frézal L. and Leblois R., (2008). Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* Volume 8, Issue 5.
- Gouliaeva N.A., Kuznetsova E.A., Gaziev A.I. (2006). Proteins associated with mitochondrial DNA protect it

- against X-rays and hydrogen peroxide. *Biophysics* 51(4): 620–623.
- Hebert P., Cywinska, A., Ball ,S., deWaard, J. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc.R.SocLond B* (2003) 270:313.
 - James T. (2009). Staley Universal species concept: pipe dream or a step toward unifying biology?. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:1331–1336.
 - Moore J., Willmer P. (1997). Convergent evolution in invertebrates. *Biol. Rev.* 72: 1–60.
 - Moore E.J. and Gosliner T.M. (2011). Molecular phylogeny and evolution of symbiosis in a clade of Indopacific nudibranchs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Volume 58, Issue 1.
 - Rokas A., Ladoukakis E., Zouros E. (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18(8): 411-417.
 - Russell, J. *iGenetics A Mendelian Approach* (2006).
 - Siarkou,V., Stamatakis, A., Kappas I., Hadweh P.,Laroucau, K. (2011) Evolutionary Relationships among *Chlamydomonas* abortus Variant Strains Inferred by rRNA Secondary Structure-Based Phylogeny, *PLoS One.* 6(5): e19813.
 - Spicer G., Dunipace L. (2004). Molecular phylogeny of songbirds (Passeriformes) inferred from mitochondrial 16S ribosomal RNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Volume: 30, Issue: 2, Publisher: Elsevier, Pages:325-335.
 - Stoeckle M. (2003). Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *Bioscience - BIOSCIENCE* , vol. 53, no. 9.
 - Tamura. K., Dudley, J., Nei, M, Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and evolution* (2007) 24:1596.
 - Thompson J., Gibbson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. The CLUSTAL_X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acid research* (1997) Vol25: 4876.
 - Árnason Ú., Grétarsdóttir S. and Gullberg A. (1993). Comparisons between the 12S rRNA, 16S

rRNA, NADH1 and COI genes of sperm and fin whale mitochondrial DNA. *Biochemical Systematics and Ecology* Volume 21, Issue 1.

- Waugh J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays*. 29(2):188-97.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697-703.
- Henning W. (1966). *Phylogenetic Systematics*.
- Vences M., van der Meijden T.M., Chiari Y., Vieites D.R., (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool.* 16;2(1):5.
- Αλαχιώτης Σ. (2007). Εισαγωγή στην Εξέλιξη
- Αλαχιώτης Σ. (2005). Εισαγωγή στη γενετική.