

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ &
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Θεοπίστη Βλαχοδήμου

***Χρήση παγκόσμιων μοριακών δεικτών για την
ταυτοποίηση και το διαχωρισμό ζωικών ειδών***



ΛΑΡΙΣΑ 2010

**Χρήση παγκόσμιων μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση
και το διαχωρισμό ζωικών ειδών**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Μέλη: ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών
ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Βιοτεχνολογία- Ποιότητα Διατροφής & Περιβάλλοντος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ζήση Μαμούρη για την επιλογή του θέματος, τις υποδείξεις, τις διορθώσεις και την καθοδήγηση όσον αφορά το περιεχόμενο αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω κυρίως τον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Σταμάτη για την συνεχή καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια σε όλα τα στάδια της διατριβής μου. Επίσης ευχαριστώ τον Θεμιστοκλή Γιαννούλη για την προθυμία και την άψογη συνεργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Επίκουρο Καθηγήτρια Αικατερίνη Μούτου και την Λέκτορα Θεολογία Σαραφίδου για τις υποδείξεις στο κείμενο της διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη αμέριστη συμπαράσταση κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας μοριακής τεχνικής η οποία θα επέτρεπε τα γρήγορο, εύκολο και αποτελεσματικό διαχωρισμό μεταξύ 23 διαφορετικών ζωικών ειδών τα οποία παρουσιάζουν υψηλή εμπορική και διατροφική αξία. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο μιτοχονδριακό DNA σε τμήμα του γονιδίου 16S rRNA εφαρμόζοντας την τεχνική PCR-SSCP και με εκκινητές κοινούς για όλα τα δείγματα.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι το γονίδιο 16S rRNA είναι κατάλληλος μοριακός δείκτης σε μελέτες διαχωρισμού ζωικών ειδών (πτηνών – θηλαστικών) διότι με την τεχνική PCR-SSCP διαχωρίστηκαν επιτυχώς και τα 23 είδη, δίνοντας διαφορετικά πρότυπα για το κάθε είδος.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να γίνει εφαρμογή της ίδιας μεθόδου αλλά και του γονιδίου σε περισσότερα άτομα τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά είδη.

ABSTRACT

The aim of this specific project was the development of a molecular technique which would allow the quick, easy and effective separation among 23 different animal species, which appear high commercial and nutritional value.

The analysis was carried out to the mitochondrial DNA in a part of the gene 16S rRna applying the technique PCR-SSCP with primers which are common for all the samples.

By the analysis of the results we infer that the gene 16S rRna is the appropriate molecular marker in studies about the separation of animal species (birds- mammals) because with this technique PCR-SSCP all the 23 species were separated successfully giving different profiles for each species.

For the confirmation of the results the same method and the gene could be applied to individuals who belong to different species.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Πτηνά.....	8
1.2 Θηλαστικά.....	8
1.3 Είδη Πτηνών και Θηλαστικών.....	9
2. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.....	15
3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)-ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP).....	16
4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.....	18
5. ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΙΔΩΝ.....	20
6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	23
7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
7.1 Εξοπλισμός εργαστηρίου.....	24
7.2 Συσκευές.....	24
7.3 Αντιδραστήρια.....	25
8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
8.1 Δείγματα.....	27
8.2 Απομόνωση Μιτοχονδριακού DNA.....	28
8.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	29
8.4 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA του mtDNA με PCR.....	30
8.5 Ανάλυση SSCP.....	33
9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κρέας που προέρχεται από τα πτηνά και από τα θηλαστικά και τα προϊόντα του προτιμώνται από τους καταναλωτές έναντι άλλων τροφίμων για την γευστικότητα και την θρεπτική τους αξία. Επίσης, το κρέας είναι από τα λίγα τρόφιμα που μπορούν να ικανοποιήσουν τόσο γρήγορα και αποτελεσματικά το αίσθημα της πείνας και τις γευστικές απαιτήσεις του ανθρώπου, αποτελεί εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, περιέχει σίδηρο και ψευδάργυρο, που είναι εύκολα αφομοιώσιμα από τον ανθρώπινο οργανισμό και βιταμίνες του συμπλέγματος Β, ενώ είναι μια από τις λίγες αξιόλογες πηγές της βιταμίνης Β₁₂. Τέλος, περιέχει ουσίες, όπως το συζευγμένο λινελαϊκό οξύ και άλλες με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου (Μπλούκας, 2007).

Τα εκτρεφόμενα είδη θερμόαιμων ζώων, τα οποία αποτελούν και την κύρια πηγή κρέατος για τις αναπτυσσόμενες χώρες, είναι τα **βοοειδή**, οι **χοίροι**, το **πρόβατο** και οι **αίγες**, ενώ τα εκτρεφόμενα πουλερικά είναι οι **όρνιθες**, οι **γαλοπούλες**, οι **πάπιες** και οι **χήνες**. Το βοδινό/μοσχάρισιο, το χοιρινό και το αιγοπρόβειο κρέας χαρακτηρίζονται ως κόκκινα κρέατα, ενώ το κρέας των πουλερικών ως λευκό κρέας. Ωστόσο, σε διάφορες χώρες του κόσμου πηγή κρέατος αποτελούν και άλλα είδη εκτρεφόμενων ή μη ζώων, ανάλογα με τις τοπικές συνήθειες. Πηγή κρέατος αποτελεί επίσης το κυνήγι ζώων, όπως ο λαγός, το αγριογούρουνο και το ελάφι και πτηνών, όπως ο φασιανός, η πέρδικα και άλλα.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια μείωση στην κατανάλωση κόκκινων κρεάτων και ειδικότερα του βοδινού που οφείλεται κατά μεγάλο μέρος σε μια σειρά διατροφικών κρίσεων όπως για παράδειγμα η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών και η χρήση αντιβιοτικών στα χοιρινά, γεγονός τα οποία κλόνισαν την εμπιστοσύνη του καταναλωτή για την ασφάλεια του κρέατος. Ένας άλλος παράγοντας που συνέβαλε στην μείωση της κατανάλωσης των κόκκινων κρεάτων ήταν η ανησυχία των καταναλωτών για θέματα υγείας, όπως η απόδοση των κόκκινων κρεάτων σε θερμίδες και η συμβολή τους στην παχυσαρκία, καθώς και η περιεκτικότητά τους σε

κορεσμένα λίπη και σε χοληστερόλη που σχετίζονται με καρδιαγγειακές παθήσεις.

Σε αντίθεση με την κατανάλωση των κόκκινων κρεάτων, η κατανάλωση πουλερικών παρουσιάζει διεθνώς αυξητική τάση κάτι που οφείλεται κυρίως στην χαμηλή τιμή διάθεσης του προϊόντος εξαιτίας της εντατικής εκτροφής των πουλερικών και κυρίως στο γεγονός ότι το λευκό κρέας περιέχει λιγότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα να θεωρείται λιγότερο επιβλαβές για την υγεία του καταναλωτή (Μπλούκας, 2007).

1.1 ΠΤΗΝΑ

Η κλάση των πτηνών (Aves) ανήκει στο φύλο Χορδωτά (Chordota) και στο υποφύλο Σπονδυλωτά (Vertebrates).

Η κλάση περιλαμβάνει τις υποκλάσεις των Αρχαιορνίθων και Νεορνίθων. Στην πρώτη ανήκουν τα είδη Αρχαιοπτέρυξ και Αρχαιόρνηθα, ενώ στη δεύτερη ορισμένες τάξεις, τα είδη των οποίων έχουν εξαφανισθεί και όλα τα ζώοντα σήμερα είδη πτηνών. Αυτά ταξινομούνται σε 27 τάξεις και 71 οικογένειες. Αριθμούν 8700 περίπου είδη και ο πληθυσμός τους σ' ολόκληρο τον κόσμο υπολογίζεται σε 100 δισεκατομμύρια περίπου άτομα. Η υποκλάση των Νεορνίθων διαιρείται στα (α) ατροπιδοφόρα, που περιλαμβάνει είδη που δεν μπορούν να πετάξουν αλλά έχουν ανεπτυγμένα τα πόδια π.χ στρουθοκάμηλος και (β) τα τροπιδοφόρα, που έχουν αναπτυγμένους θωρακικούς μυς, καλά προσαρμοσμένους στο στέρνο και έχουν την ικανότητα να πετούν (Παπαγεωργίου, 1990).

Παρά την μεγάλη μορφολογική τους ποικιλομορφία, τα πτηνά αποτελούν την πιο ομοειδή ομάδα του ζωικού βασιλείου και διακρίνονται από τα εξής χαρακτηριστικά: είναι ωοτόκα, έχουν κεράτινο ράμφος χωρίς δόντια, το σώμα τους σκεπάζεται με φτερά, τα πάνω άκρα είναι διαμορφωμένα σε φτερούγες, με τις οποίες εξασφαλίζεται η πτήση και τέλος είναι ομοιόθερμα (41-43°C) ενώ ο πλήρης έλεγχος της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται λίγες μέρες μετά την εκκόλασή τους (Παπαγεωργίου, 1990).

1.2 ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

Η κλάση των θηλαστικών ανήκει στο φύλο Χορδωτά (Chordota) και στο υποφύλο Σπονδυλωτά (Vertebrates) και διαιρείται σε τρεις υποκλάσεις: τα

πρωτοθηρία (Prototheria), τα μεταθηρία (Metatheria) και τα θηρία (Eutheria). Η υποκλάση θηρία περιλαμβάνει όλες τις υπόλοιπες γνωστές σήμερα τάξεις των θηλαστικών.

Τα θηλαστικά με το μεγάλο μέγεθος του εγκεφάλου, το αναπτυγμένο νευρικό σύστημα, την αυξημένη νοημοσύνη και την εξειδίκευση των άλλων οργάνων αποτελούν την πιο εξελιγμένη κλάση του ζωικού βασιλείου.

Αντιπροσωπεύονται από 4600 περίπου είδη που ταξινομούνται σε 18 κλάσεις και 118 οικογένειες (Παπαγεωργίου, 1990).

Τα θηλαστικά διακρίνονται από τις άλλες τάξεις του ζωικού βασιλείου από τα εξής χαρακτηριστικά: το σώμα τους καλύπτεται με τρίχες, με εξαίρεση ορισμένα είδη όπως π.χ το δελφίνι στα οποία το τρίχωμα περιορίζεται σημαντικά ή λείπει τελείως κατά το στάδιο της ενηλικίωσης. Τα θηλυκά έχουν γαλακτογόνους αδένες, από το γάλα των οποίων τρέφονται τα νεογνά. Είναι ομοιόθερμα, η θερμοκρασία δηλαδή του σώματός τους διατηρείται σταθερή (36-38°C) ανεξάρτητα από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος (Παπαγεωργίου, 1990).

1.3 ΕΙΔΗ ΠΤΗΝΩΝ ΚΑΙ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Παρακάτω αναφέρονται τα κύρια χαρακτηριστικά όλων των δειγμάτων πτηνών και θηλαστικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

ΒΑΡΒΑΡΑ (*Tadorna tadorna*)

Έχει μεγάλο μέγεθος (50-55 cm) και μοιάζει με χήνα. Το ράμφος είναι κόκκινο και ελαφρά γυρισμένο προς τα πάνω (Εικ. 1). Στη βάση του ράμφους τα αρσενικά έχουν ένα κόκκινο εξόγκωμα που αποτελεί το μοναδικό διαγνωστικό στοιχείο των δυο φύλων (Παπαγεωργίου, 1990).

ΣΦΥΡΙΧΤΑΡΙ (*Anas penelope*)

Έχει μήκος ~35 cm. Το αρσενικό διακρίνεται από το καστανέρυθρο κεφάλι και την χρυσοκίτρινη λωρίδα στο μπροστινό μέρος (Εικ. 1). Η κοιλιά του είναι λευκή και το κάτω μέρος της ουράς μαύρο. Το ράμφος και τα πόδια είναι γκριζογάλαζα. Το θηλυκό διακρίνεται από το μικρότερο μέγεθος του σώματός του (Παπαγεωργίου, 1990).

ΚΙΡΚΙΡΙ (*Anas crecca*)

Έχει μήκος 30 cm. Το κεφάλι του αρσενικού είναι σκούρο καστανό με πλατιά πρασινωπή λωρίδα που ξεκινά από το μάτι και καταλήγει στο πίσω μέρος του λαιμού (Εικ. 1). Το πάνω μέρος του σώματος είναι γκριζο και το στήθος ανοιχτότερο με μαύρα στίγματα. Το θηλυκό είναι χρώματος καστανού με στίγματα (Παπαγεωργίου, 1990).

ΠΡΑΣΙΝΟΚΕΦΑΛΗ ΠΑΠΙΑ (*Anas platyrhynchos*)

Έχει μήκος 55-60 cm. Το αρσενικό έχει πράσινο κεφάλι, γκριζόλευκη κοιλιά και λευκή ουρά με γυριστά φτερά τα οποία είναι μαύρα και ράμφος κίτρινο (Εικ. 1). Ο βασικός χρωματισμός του θηλυκού είναι τεφρόφαιος ενώ το ράμφος είναι ανοιχτόφαιο (Παπαγεωργίου, 1990).

ΧΗΝΑ (*Anser anser*)

Έχει μήκος 75-90 cm. Το πάνω μέρος του σώματος είναι γκριζόφαιο ενώ το στήθος ανοιχτότερο (Εικ. 1). Τα άκρα των φτερών είναι ανοιχτότερου χρώματος, το κάτω μέρος της ουράς και το πίσω μέρος της κοιλιάς λευκά. Το ράμφος είναι πορτοκαλί (Παπαγεωργίου, 1990).

ΚΟΤΣΥΦΑΣ (*Turdus merula*)

Έχει μήκος ~25cm. Το αρσενικό διακρίνεται εύκολα από το μαύρο χρωματισμό του φτερώματος και το πορτοκαλοκίτρινο ράμφος (Εικ. 1). Το φτέρωμα του θηλυκού είναι σκούρο καφέ στο πάνω μέρος, ενώ στο κάτω είναι ανοιχτότερο και το ράμφος του είναι καφέ (Παπαγεωργίου, 1990).

ΤΣΙΧΛΑ (*Turdus philomelos*)

Έχει μήκος 23 cm. Το φτέρωμα καστανό ενώ το στήθος είναι κίτρινο με καφέ κηλίδες (Εικ. 1). Η κοιλιά είναι λευκή με σκούρες καφέ κηλίδες. Τα καλυπτήρια των φτερούγων στην κάτω πλευρά είναι κιτρινωπά ενώ το υπόλοιπο τμήμα τους είναι φαιό (Παπαγεωργίου, 1990).

ΟΡΤΥΚΙ (*Coturnix coturnix*)

Έχει μήκος 15-18 cm και φτέρωμα φαιό με κιτρινωπές και καφέ ραβδώσεις (Εικ. 1). Η διάκριση των φύλων γίνεται με την εξέταση του χρώματος του

στήθους. Το στήθος στα θηλυκά έχει μαύρα στίγματα και ραβδώσεις (Παπαγεωργίου, 1990).

ΦΑΣΙΑΝΟΣ (*Phasianus colchicus*)

Έχει μήκος 53-89 cm. Το φτέρωμα του αρσενικού είναι πράσινο (Εικ. 1). Το στήθος του είναι καστανέρυθρο. Στο πάνω μέρος του κεφαλιού έχει δυο μικρές τούφες από μακριά φτερά. Η περιοχή γύρω από τα μάτια είναι γυμνή και κόκκινη. Το θηλυκό είναι μικρότερου μεγέθους με μαύρες κηλίδες και ραβδώσεις (Παπαγεωργίου, 1990).

ΜΠΕΚΑΤΣΑ (*Scolopax rusticola*)

Έχει μήκος ~35 cm, φτέρωμα στο πάνω μέρος καφέ και ράχη σκουρότερη με μαύρες και μπεζ κηλίδες (Εικ. 1). Το κάτω μέρος είναι ανοιχτότερο με στενές καφέ λωρίδες. Το ράμφος είναι μακρύ και εύκαμπτο (Παπαγεωργίου, 1990).

ΝΗΣΙΩΤΙΚΗ ΠΕΡΔΙΚΑ (*Alectoris chucar*)

Έχει μήκος 32-35 cm. Το πάνω μέρος του σώματος και η κοιλιά είναι σταχτόχρωμα ενώ το στήθος γκριζόλευκο (Εικ. 1). Το μπροστινό τμήμα του λαιμού περιβάλλεται από μια μαύρη στενή λωρίδα που αρχίζει πάνω από το ράμφος, περιβάλλει τα μάτια και κατεβαίνει προς το λαιμό. Το ράμφος είναι κοντό και κόκκινο (Παπαγεωργίου, 1990).

ΚΟΤΑ (*Gallus gallus domesticus*)

Τα ενήλικα κοτόπουλα έχουν ένα σαρκώδες λοφίο στα κεφάλια τους που ονομάζεται λειρί και μια σαρκώδη προεξοχή κάτω από τα ράμφη τους (Εικ. 11). Το αρσενικό διαφοροποιείται από το θηλυκό από το εντυπωσιακό φτέρωμα που χαρακτηρίζεται από μακριές ουρές, το μεγαλύτερο λειρί και την πολύ δυνατή φωνή (Sherman *et al*, 2002).

ΓΑΛΟΠΟΥΛΑ (*Meleagris gallopavo*)

Έχουν μακριά πόδια και ψηλό λαιμό (Εικ. 1). Η ουρά είναι μεγάλη και το σχήμα της μοιάζει με βεντάλια. Οι αρσενικές γαλοπούλες έχουν αρκετά σκούρα φτερά. Στο κάτω μέρος του λαιμού υπάρχει ένας κόκκινος σαρκώδης λοβός (Dickson *et al*, 1995).

ΣΤΡΟΥΘΟΚΑΜΗΛΟΣ (*Struthio camelus*)

Τα αρσενικά έχουν μεγαλύτερο σωματικό βάρος από τα θηλυκά. Τα ενήλικα αρσενικά έχουν μαύρα φτερά με λευκές άκρες και καφετί ουρά (Εικ. 1). Τα θηλυκά και τα νεαρά αρσενικά έχουν καφέ και άσπρα φτερά. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ο πολύ ψηλός λαιμός και τα πολύ ψηλά πόδια (Marsahall *et al*, 1960).

ΛΑΓΟΣ (*Lepus europaeus*)

Έχει μήκος σώματος 55-60 cm (Εικ. 1). Το σώμα καλύπτεται με υποτρίχωμα και κυρίως τρίχωμα και γενικά ο χρωματισμός του είναι γκριζοκαστανωπός με ανάμικτες μαύρες τρίχες στο πάνω μέρος της ράχης. Τα αυτιά του είναι όρθια, ευκίνητα και μακρύτερα από το μήκος του κεφαλιού. Τα πίσω πόδια είναι μεγαλύτερα σε σύγκριση με τα μπροστινά (Παπαγεωργίου, 1990).

ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΟΣ ΛΑΓΟΣ (*Lepus capensis*)

Έχει λεπτό σώμα με καφετί τρίχωμα, τα αυτιά του είναι μεγάλα και μαύρα στο εσωτερικό τους (Εικ. 1). Τα πίσω πόδια είναι μεγαλύτερα από τα μπροστινά. Στην εσωτερική πλευρά τα πόδια είναι λευκά όπως και η κοιλιά. Στον αυχένα του λαιμού έχει λίγες κοκκινωπές τρίχες (Παπαγεωργίου, 1990).

ΟΡΕΙΝΟΣ ΛΑΓΟΣ (*Lepus timidus*)

Έχει συνολικό μήκος ~60 cm. Το τρίχωμα του έχει χρώμα γκρίζο (Εικ. 1). Έχει μακριά αυτιά ενώ η ουρά του είναι κοντή. Τα πίσω πόδια είναι πιο μακριά από τα μπροστινά και τα πέλματά του καλύπτονται από τρίχωμα (Παπαγεωργίου, 1990).

ΚΟΥΝΕΛΙ (*Oryctolagus cuniculus*)

Μοιάζει με τον λαγό αλλά είναι πιο μικρόσωμο. Έχει μήκος σώματος 35-40 cm (Εικ. 1). Έχει μεγάλα μάτια χρώματος καστανού. Τα αυτιά του είναι μικρότερα από το μήκος του κεφαλιού. Τα πίσω πόδια είναι μεγαλύτερα από τα μπροστινά και το τρίχωμα του είναι κοντό και γκριζοκάστανο ενώ το πάνω μέρος του σώματος είναι ανοιχτότερο (Παπαγεωργίου, 1990).

ΠΡΟΒΑΤΟ (*Ovis aries*)

Έχει μέτριο σώμα που καλύπτεται από πυκνό τρίχωμα (Εικ. 1) το οποίο είναι απαλό στην αφή, σγουρό ή ίσιο, μακρύ ή κοντό, λευκό, μαύρο, καστανό ή γκριζο. Τα θηλυκά γεννούν ένα με δύο ή σπανιότερα τρία με τέσσερα μικρά (Παπαγεωργίου, 1990).

ΚΑΤΣΙΚΙ (*Capra aegagrus hircus*)

Έχει λευκό τρίχωμα με πολύ λεπτή και μακριά τρίχα (Εικ. 1). Έχει κέρατα τα οποία είναι σπειροειδή με κατεύθυνση προς τα πίσω. Στέκονται στα οπίσθια πόδια για να τραφούν (Παπαγεωργίου, 1990).

ΜΟΣΧΑΡΙ (*Bos taurus*)

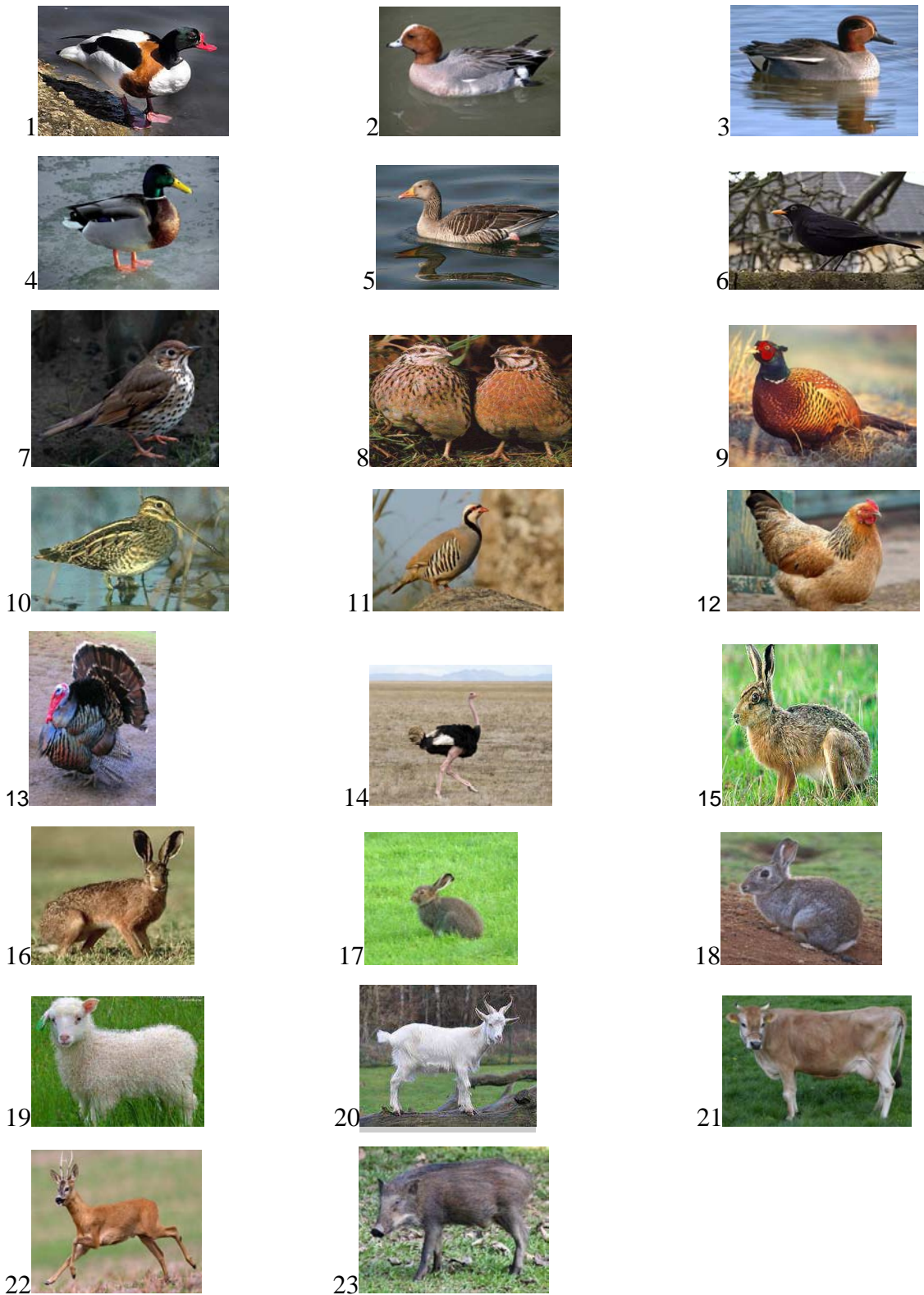
Το τρίχωμα έχει χρώμα καφέ (Εικ. 1). Η ουρά του είναι λεπτή και μακριά και στο τέλος έχει μαύρο τρίχωμα. Το νεογέννητο μοσχάρι ζυγίζει περίπου από 25 μέχρι 45 κιλά. (Brown *et al*, 2009).

ΖΑΡΚΑΔΙ (*Capreolus capreolus*)

Είναι το πιο μικρό είδος της οικογένειας των ελαφιδών. Έχει μήκος σώματος 1,0-1,4 m και ύψος 68-85 cm (Εικ. 1). Τα αρσενικά ξεπερνούν τα θηλυκά ως προς την σωματική ανάπτυξη και το βάρος. Το τρίχωμα το καλοκαίρι είναι λείο, κοντό και κοκκινόφαιο, ενώ το χειμώνα γίνεται μακρύτερο, πυκνότερο και γκριζωπό. Τα κάτω μέρη του σώματος έχουν ανοιχτότερο χρώμα (Παπαγεωργίου, 1990).

ΑΓΡΙΟΓΟΥΡΟΥΝΟ (*Sus scrofa*)

Μοιάζει με το οικόσιτο είδος, αλλά έχει πόδια πιο ψηλά και δέρμα πιο τριχωτό. Το μήκος σώματος είναι 110-180 cm και το ύψος 85-115 cm (Εικ. 1). Τα αρσενικά υπερέχουν σε μέγεθος και βάρος έναντι των θηλυκών. Χαρακτηριστικό του αγριογούρουνου είναι οι τέσσερις κυνόδοντες, που εμφανίζονται μετά την γέννησή του και διατηρούνται καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του (Παπαγεωργίου, 1990).



Εικ. 1: 1) Βαρβάρα, 2) Σφυριχτάρι, 3) Κιρκίρι, 4) Πρασινοκέφαλη, 5) Χήνα, 6) Κότσυφας, 7) Τσίγλα, 8) Ορτύκι, 9) Φασιανός, 10) Μπεκάτσα, 11) Νησιώτικη πέρδικα, 12) Κότα, 13) Γαλοπούλα, 14) Στρουθοκάμηλος, 15) Ευρωπαϊκός λαγός, 16) Αφρικάνικος λαγός, 17) Ορεινός λαγός, 18) Κουνέλι, 19) Πρόβατο, 20) Κατσίκα, 21) Μοσχάρι, 22) Ζαρκάδι, 23) Αγριογούρουνο

Η επίδραση που έχει η κατανάλωση προϊόντων ζωικής προέλευσης στην υγεία του καταναλωτή καθιστά απαραίτητη την ανάπτυξη μεθόδων οι οποίες επιτρέπουν τον έλεγχο αυτών των προϊόντων. Στο παρελθόν διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση της προέλευσης των προϊόντων (π.χ οργανοληπτική εξέταση) που σήμερα δίνουν την θέση τους σε μοριακές τεχνικές ανάλυσης (μοριακοί δείκτες). Η επιλογή του μοριακού δείκτη που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση και κατ' επέκταση για την ταυτοποίηση κάποιου είδους εξαρτάται κυρίως από το κόστος εφαρμογής της μεθόδου (μιας και αρκετές μεθοδολογίες απαιτούν υψηλό κόστος για να εφαρμοστούν) και από τη δυνατότητα που έχει κάθε μέθοδος να διαχωρίζει προϊόντα τα οποία υπέστησαν ένα είδος κατεργασίας π.χ με υψηλή θερμοκρασία.

2. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι μοριακοί δείκτες είναι επιλεγμένα τμήματα του DNA τα οποία είναι πολυμορφικά και μοναδιαία στο γονιδίωμα. Οι μοριακοί δείκτες είναι χρήσιμοι για την μελέτη της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών και διευκολύνουν πολύ την ταυτοποίηση ειδών. Επίσης χρησιμεύουν στην μελέτη της κληρονομικότητας γενετικών χαρακτηριστικών.

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Botstein *et al*, 1980). Η μεθοδολογία του RFLP βασίζεται στην πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού και ακολούθως είτε στην ανάλυση κατά Southern (Χατζόπουλος, 2001) είτε στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων τεμαχισμού. Αργότερα χρησιμοποιήθηκαν τα RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al*, 1990). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, ενισχύονται τμήματα DNA κάνοντας χρήση εκκινητών με τυχαία ακολουθία νουκλεοτιδίων και κάθε προϊόν ενίσχυσης προκύπτει από τον υβριδισμό των τυχαίων αυτών εκκινητών με τις συμπληρωματικές περιοχές του υπό εξέταση DNA (Williams *et al*, 1990).

Τη δεκαετία του '90 αναπτύχθηκαν δεύτερης γενιάς μοριακοί δείκτες όπως οι μικροδορυφόροι (Hearne *et al* 1992) και AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms, Vos *et al* 1995). Οι μικροδορυφόροι παράγονται μετά

από απομόνωση και ενίσχυση τμημάτων DNA με PCR, ο διαχωρισμός των ζωνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης ή αγαρόζης και η ανίχνευση του πολυμορφισμού με χρώση με άργυρο ή με βρωμιούχο αιθίδιο (Sprooner *et al*, 2005). Η μεθοδολογία AFLP βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υπομονάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά την πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού από ένα πολυσύνθετο σύνολο τμημάτων DNA του γονιδιώματος (Martinez *et al*, 1998).

Η μελέτη της ταυτοποίησης ειδών σε συνδυασμό με την ανάλυση PCR-SSCP και την χρήση πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση προτύπων. Τα πρότυπα που προκύπτουν από αυτή την ανάλυση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες αφού μας δίνουν πληροφορίες για την ποικιλομορφία που υπάρχει μεταξύ ατόμων πληθυσμών, επιτρέπουν την μελέτη ατόμων που ανήκουν στο ίδιο είδος (ενδοειδικός πολυμορφισμός) και τέλος μπορούν τα ταυτοποιήσουν κατεργασμένα προϊόντα και να διαχωρίσουν τα είδη που υπάρχουν σε αυτά.

3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)- ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ (SSCP)

Η μεθοδολογία SSCP αξιοποιεί την τάση του μονόκλωνου DNA να σχηματίζει ενδομοριακά ζεύγη βάσεων με αποτέλεσμα να προκύπτει μια συγκεκριμένη διαμόρφωση που εξαρτάται από την αλληλουχία. Έτσι, διαφοροποιήσεις της αλληλουχίας των βάσεων του DNA μεταξύ διαφόρων μορίων οδηγούν σε αλλαγές στη διαμόρφωση των μονόκλωνων μορίων DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν αλλαγές στη μετακίνηση των μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση και έτσι να εντοπιστεί ο πολυμορφισμός (Χατζόπουλος, 2001).

Η μέθοδος PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα το 1985 από τον Karry Mullis ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Σήμερα η PCR θεωρείται μια από τις πιο επαναστατικές επιστημονικές ανακαλύψεις του 20^{ου} αιώνα.

Η PCR είναι μια σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA με την βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση του DNA και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων που επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία και χρόνο (Mullis *et al*, 1994): αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, υβριδοποίηση των εκκινητών με την αλληλουχία στόχο και σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με την βοήθεια της Taq πολυμεράσης.

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA-υποστρώματος αυξάνοντας την θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92°C και 96 °C. Με αυτό τον τρόπο οι συμπληρωματικοί κλώνοι του DNA απομακρύνονται (Rolfs *et al*, 1992).

Στο δεύτερο βήμα με μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους 50-65 °C επιτυγχάνεται υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-30 βάσεων που αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές μεταξύ τους αλληλουχίες, οι οποίες υβριδοποιούνται ειδικά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.

Στο τρίτο, και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72 °C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με την χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που επιτρέπει την σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη της πολυμεράσης από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq polymerase). Η Taq πολυμεράση συνθέτει περίπου 2000 νουκλεοτίδια ανά λεπτό και συνεπώς ο χρόνος που απαιτείται για την αντιγραφή του DNA - στόχου εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος (Mullis *et al*, 1987).

Η ανίχνευση του προϊόντος γίνεται κατά κανόνα με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Σε ορισμένες περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στο διαχωρισμό των μορίων DNA (π.χ αλληλούχιση) προτιμάται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Dieffenbach *et al*, 2003).

Μαζί με την τεχνική της PCR-SSCP για την μελέτη της ταυτοποίησης ειδών συχνά χρησιμοποιείται το μιτοχονδριακό DNA και αυτό γιατί παρουσιάζει χαρακτηριστικά όπως είναι ο υψηλός αριθμός αντιγράφων στους ιστούς και

η μεγάλη ποικιλομορφία στα είδη. Για την ταυτοποίηση ειδών χρησιμοποιούνται γονίδια ή περιοχές του mtDNA που διαφέρουν μεταξύ των ειδών αλλά όχι μέσα στο ίδιο είδος, τέτοιες περιοχές είναι το κυτόχρωμα b, το 12S rRNA και το 16S rRNA.

4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

Το μιτοχόνδριο (Εικ. 2) είναι ένα οργανίδιο σφαιρικής ή κυλινδρικής μορφής που έχει δυο μεμβράνες: την εξωτερική και την εσωτερική, οι οποίες διαχωρίζουν το εσωτερικό του μιτοχονδρίου σε δυο διακριτές περιοχές: το χώρο μεταξύ των μεμβρανών που ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος και τον χώρο που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη που καλείται μήτρα. Μέσα στην μήτρα βρίσκονται τα ριβοσώματα του μιτοχονδρίου, πολλά αντίγραφα του γονιδιώματος (κυκλικό μόριο DNA) και τα ένζυμα για την βιοσύνθεση μέρους των πρωτεϊνών τους. Επίσης στην μήτρα βρίσκονται τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις του κύκλου του Krebs και την διάσπαση των λιπαρών οξέων (Διαμαντίδης, 1994). Στην εσωτερική μεμβράνη γίνονται οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξειδωτικό και οι αντιδράσεις της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που έχουν στόχο την μετατροπή της χημικής ενέργειας σε βιολογικά εύχρηστη μορφή (ATP). Πέρα από την βασική λειτουργία παραγωγής ATP, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στους μηχανισμούς διατήρησης της συγκέντρωσης ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα σε χαμηλά επίπεδα, στα τελικά στάδια σύνθεσης των λιπιδίων, ειδικότερα στα ζωικά κύτταρα και επιπλέον λειτουργούν ως μικρές εστίες παραγωγής θερμότητας τόσο στα θερμόαιμα όσο και στα ζώα που βρίσκονται σε χειμέρια νάρκη αλλά και ως μικρές πηγές νερού και ενέργειας για τα αποδημητικά πτηνά (Διαμαντίδης, 1994).

Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους γενετικό υλικό, που είναι ένα απλοειδές, δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA. Σε μερικά είδη φυτών το μιτοχονδριακό DNA (mt DNA) εκτός της βασικής κυκλικής μορφής, συναντάται και υπό γραμμική μορφή.

Το μιτοχονδριακό DNA των ζώων έχει μέγεθος της τάξης των 16 kb. Με λίγες εξαιρέσεις, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των ζώων περιέχει τα ίδια 37

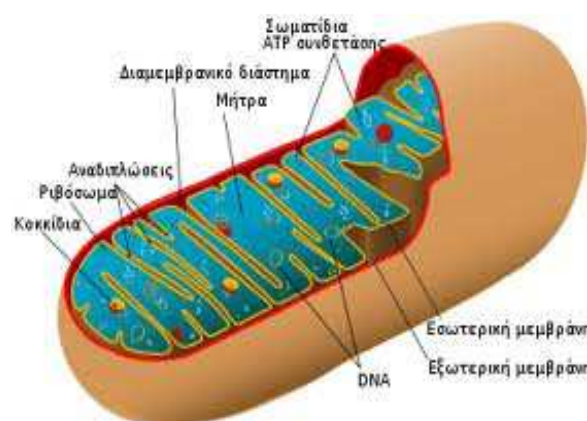
γονίδια: 2 για rRNAs (12S και 16S), 13 για πρωτεΐνες και 22 για tRNAs (Boore *et al*, 1999).

Το μιτοχονδριακό DNA των θηλαστικών κληρονομείται από την μητέρα (Hanswith *et al*, 1986). Ο εξελικτικός ρυθμός του mtDNA είναι 5 με 10 φορές γρηγορότερος από το πυρηνικό γονιδίωμα κυρίως γιατί τα μιτοχόνδρια δεν έχουν επιδιορθωτικά ένζυμα για λάθη και ζημιές στο DNA (Clayton *et al*, 1982). Για παράδειγμα ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA εκτιμάται ότι είναι 2% με 4%. Ο ρυθμός αυτός αφορά σε ανώτερα ταξινομικά τάξα, ενώ στα έντομα εκτιμάται ότι είναι μικρότερος καθώς επηρεάζεται από διάφορα γνωρίσματα, όπως ο μεταβολικός αριθμός, ο χρόνος γενιάς και το μέγεθος (Avise *et al*, 1992).

Το 16S rRNA είναι κατάλληλο για χαρακτηρισμό διαφόρων ειδών διότι: έχει συντηρημένες αλληλουχίες ανάμεσα στα είδη που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό γενικών εκκινητών για PCR, έχει μεταβλητές αλληλουχίες που παρέχουν τον πολυμορφισμό για χαρακτηρισμό σε επίπεδο είδους ή στελέχους (Μαρκουλάτος, 2009).

Το mtDNA θεωρείται κατάλληλο εργαλείο σε μελέτες ταυτοποίησης ειδών για τους παρακάτω λόγους:

- Ο μεγάλος ρυθμός μεταλλαγής έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πολυμορφισμών και την δημιουργία μεγάλης ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών αλλά και ανάμεσα στο ίδιο είδος.
- Σε κάθε κύτταρο μπορεί να υπάρχει μεγάλος αριθμός μιτοχονδρίων που φτάνει μέχρι και τα 1000 αντίτυπα. Έτσι με την τεχνική της PCR αυξάνεται η πιθανότητα επιτυχούς ενίσχυσης. (Scheffler *et al*, 2001).



Εικ. 2: Η δομή του μιτοχονδρίου
(από <http://www.ja.wikipedia.org>.)

5. ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΙΔΩΝ

Στο DNA barcoding μικρές ακολουθίες DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον διαχωρισμό των ειδών. Η περιοχή που χρησιμοποιείται πιο συχνά σαν barcode για τα περισσότερα ζώα είναι μια περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, η υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης C (COI). Εκτός από το COI ως barcode χρησιμοποιούνται και άλλες περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος όπως το 12S rRNA, το 16S rRNA και το κυτόχρωμα b (Lee *et al*, 2006).

Στο παρελθόν αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί οι οποίες ταυτοποιούν διάφορα ζωικά είδη χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές. Αρκετές από αυτές μελετούν τα θηλαστικά και εξετάζουν είδη όπως το πρόβατο, την κατσίκια και το μοσχάρι. Άλλες μελετούν τα πτηνά και τα χρησιμοποιούμενα είδη είναι κυρίως η κότα και η γαλοπούλα.

Οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται εμφανίζουν ορισμένα πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Η RAPD και η SSCP είναι απλές στην εφαρμογή τους, δεν απαιτούν πολύ χρόνο και κόστος. Η RFLP και AFLP είναι σχετικά πιο χρονοβόρες (Χατζόπουλος, 2001).

Στην συνέχεια αναφέρονται ορισμένες μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση πτηνών και θηλαστικών κάνοντας χρήση μοριακών τεχνικών.

Χρησιμοποιώντας την ανάλυση PCR-RFLP οι Meyer *et al.* (1995) διαχώρισαν εννέα ζωικά είδη (γουρούνι, μοσχάρι, αγριογούρουνο, βουβάλι, πρόβατο, κατσίκι, άλογο, κότα και γαλοπούλα). Για τον διαχωρισμό των ειδών εφαρμόστηκε PCR-RFLP σε τμήμα του κυτοχρώματος b 359 bp και πέψη με τέσσερα ένζυμα (*AluI*, *RsaI*, *Taq I* και *HinfI*). Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η μέθοδος ήταν αποτελεσματική αφού θα μπορούσε να εφαρμοστεί τόσο σε μείγματα κρέατος όπως προέκυψε από την ανάλυση λουκάνικου που περιείχε 3 διαφορετικά είδη όσο και σε προϊόντα τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία.

Μια άλλη έρευνα πραγματοποιήθηκε από τους Matsunaga *et al.* (1998) οι οποίοι εφαρμόζοντας PCR σε τμήμα του κυτοχρώματος b διαχώρισαν μοριακά, βάσει μεγέθους, έξι είδη κρέατος: μοσχάρι, γουρούνι, κότα, πρόβατο, κατσίκια και άλογο. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να δώσουν διαφορετικού μήκους τμήματα από τα έξι είδη. Τα προϊόντα έδειξαν πράγματι

διαφορετικού μεγέθους τμήματα DNA από κατσίκια, κοτόπουλο, μοσχάρι, πρόβατο, γουρούνι και άλογο. Επίσης, απέδειξαν ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη και για επεξεργασμένα προϊόντα (100⁰ C ή 120⁰ C για 30min).

Σε μια άλλη μελέτη από τους Patris *et al.* (1999) διαχωρίστηκαν 22 ζωικά είδη: μοσχάρι, βουβάλι, γουρούνι, πρόβατο, κατσίκια, κόκκινο ελάφι, άλογο, καγκουρό, κουνέλι, κότα, πάπια, στρουθοκάμηλο, γαλοπούλα, άνθρωπο, γάτα, σκύλο, κροκόδειλο και πέντε διαφορετικά είδη ψαριών κάνοντας χρήση της τεχνικής PCR-RFLP. Για τον σκοπό αυτό, ενισχύθηκε μια περιοχή του κυτοχρώματος b (359 bp) και ακολούθησε πέψη με τα ένζυμα *HaeIII* και *Hinfl*. Όλα τα είδη διακρίθηκαν χρησιμοποιώντας δυο περιοριστικά ένζυμα πλην όμως του καγκουρό και του βουβαλιού. Επιπλέον η μέθοδος αποδείχτηκε αποτελεσματική για τον διαχωρισμό επεξεργασμένων (π.χ μαγείρεμα) ιστών.

Μια εναλλακτική προσέγγιση εφάρμοσαν οι Sanz *et al.* (1999) οι οποίοι δημιούργησαν DNA αποτυπώματα (fingerprintings) χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR-RAPD για να ανιχνεύσουν διάφορα είδη ζώων σε προϊόντα κρέατος. Η τεχνική PCR-RAPD επέτρεψε την ανίχνευση τεσσάρων ζωικών ειδών (γουρούνι, αρνί, κοτόπουλο και γαλοπούλα) δίνοντας διακριτές ζώνες.

Μια περιοχή του κυτοχρώματος b (359 bp) του μιτοχονδριακού DNA και πέψη σε αυτό το τμήμα με περιοριστικά ένζυμα χρησιμοποίησαν και οι Vittorio *et al.* (2001). Με την ανάλυση PCR-RFLP προσδιορίστηκαν και διαχωρίστηκαν τα εξής είδη: κατσίκια, πρόβατο, κότα, γουρούνι και γαλοπούλα σε κρεατοάλευρα και ζωοτροφές.

Μια ακόμη έρευνα πραγματοποιήθηκε από τους Dalmasso *et al.* (2003) για την ανάλυση ζωοτροφών για τα εξής είδη: μηρυκαστικά, πουλερικά, ψάρια και χοιρινό χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναγνωρίζουν διαφορετικές περιοχές του μιτοχονδριακού DNA (12s rRNA, tRNA και 16s rRNA). Ανάλογα με την σύσταση της ζωοτροφής οι εκκινητές δημιούργησαν διαφορετικά τμήματα για τα μηρυκαστικά, πουλερικά, ψάρια και χοιρινό. Η πολλαπλή PCR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε έγκυρη για την ανάλυση των ζωοτροφών αφού κατάφερε να ταυτοποιήσει όλα τα είδη που υπήρχαν σε αυτές.

Η PCR-RFLP χρησιμοποιήθηκε και από τους Stamoulis *et al* (2009). για τον διαχωρισμό δέκα πτηνών: κότα, γαλοπούλα, πάπια, χήνα, φασιανός,

πέρδικα, μπεκάτσα, στρουθοκάμηλος, ορτύκι και τσίχλα. Ειδικότερα με PCR ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου 12s rRNA και ακολούθησε πέψη με το ένζυμο περιορισμού *AciI* το οποίο και διαχώρισε επιτυχώς τα δέκα πτηνά. Η μέθοδος κρίθηκε ικανή τόσο για την ταυτοποίηση του επεξεργασμένου κρέατος όσο και για την ταυτοποίηση μιγμάτων κρέατος.

Τέλος, μια πιο πρόσφατη μελέτη για την ταυτοποίηση ειδών έγινε από τους Kalisz *et al* (2010) οι οποίοι χρησιμοποίησαν βιολογικά υλικά (ιστό από δέρμα, κηλίδα αίματος, δείγματα κρέατος και γνάθου) για να ταυτοποιήσουν τα εξής ζωικά είδη: κατσίκια, ζαρκάδι, μοσχάρι και κόκκινο ελάφι. Για την διεξαγωγή των αναλύσεων χρησιμοποίησαν τμήματα του κυτοχρώματος b. Τα προϊόντα PCR τεμαχίστηκαν με τα ένζυμα *Tsp 509I* και *AluI*. Έτσι, χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR-RFLP ταυτοποιήθηκε η προέλευση των δειγμάτων και η μέθοδος αποδείχτηκε εξαιρετικά γρήγορη και αποτελεσματική.

Για την πραγματοποίηση όλων των παραπάνω μελετών χρησιμοποιήθηκε ένα άτομο από κάθε είδος ως δείγμα.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας εύκολης, γρήγορης, και αξιόπιστης μεθόδου η οποία θα επιτρέψει τον διαχωρισμό διαφορετικών ειδών. Συγκεκριμένα, η ανάλυση εφαρμόστηκε σε 23 είδη: πρόβατο, κατσίκι, μοσχάρι, ζαρκάδι, τρία είδη λαγού (ευρωπαϊκός λαγός, αφρικανικός λαγός και ορεινός λαγός), αγριογούρουνο, κουνέλι, γαλοπούλα, κοτσύφι, τέσσερα είδη πάπιας (πρασινοκέφαλη, σφυριχτάρι, κικίρι και βαρβάρα), κότα, ορτύκι, νησιώτικη πέρδικα, χήνα, φασιανό, μπεκάτσα, τσίχλα, στρουθοκάμηλο και θα μας έδινε την δυνατότητα να αποφανθούμε κατά πόσο το γονίδιο 16S rRNA το οποίο χρησιμοποιήσαμε είναι κατάλληλος μοριακός δείκτης σε μελέτες διαχωρισμού ζωικών ειδών.

Εφαρμόζοντας την ανάλυση PCR-SSCP και ενισχύοντας τμήμα του γονιδίου 16S rRNA καταφέραμε να επιτύχουμε τον διαχωρισμό και των 23 δειγμάτων (αφού πήραμε διαφορετικά πρότυπα σε όλα τα δείγματα) τα οποία λάβαμε από διάφορα είδη πτηνών και θηλαστικών καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τόσο το γονίδιο όσο και η τεχνική που χρησιμοποιήσαμε αποτελούν κατάλληλα εργαλεία σε μελέτες διαχωρισμού τέτοιων ειδών.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων θα μπορούσε μελλοντικά να πραγματοποιηθεί και αλληλούχιση των προϊόντων PCR.

7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε αυτό το κεφάλαιο αναφέρονται με λεπτομέρεια τα υλικά του εργαστηρίου, τα αντιδραστήρια-διαλύτες και τέλος οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε στάδιο της εργασίας.

7.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

7.1 α) Για την απομόνωση του DNA από ιστό κρέατος

- ❖ Αυτόματες πιπέττες ακριβείας (Gilson) των 20 μl & 1000μl με τα αντίστοιχα ακρορύγχια (tips)
- ❖ Φιαλίδια erpendorf των 1,5 & 2 ml

7.1 β) Για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

- ❖ Κωνική φιάλη
- ❖ Ογκομετρικός κύλινδρος
- ❖ Πιπέττα ακριβείας των 10 μl

7.1 γ) Για την PCR

- ❖ Πιπέττες ακριβείας των 2 μl, 10 μl, 20 μl και 100 μl με τα αντίστοιχα tips.
- ❖ Φιαλίδια erpendorfs των 200 μl.

7.1 δ) Για την ανάλυση SSCP

- ❖ Ποτήρι ζέσεως
- ❖ Μαγνήτης ανάδευσης
- ❖ Ογκομετρικοί κύλινδροι
- ❖ Χωνί μετάγγισης
- ❖ Χαρτί διήθησης
- ❖ Μεταλλικό δοχείο χρώσης
- ❖ Μαγνήτης ανάδευσης

7.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

7.2 α) Για την απομόνωση του DNA από ιστό κρέατος

- ❖ Κυκλικός αναδευτήρας

- ❖ Κλίβανος
- ❖ Ψυχόμενη φυγόκεντρος [Eppendorf – 5810R]
- ❖ Καταψύκτης
- ❖ Απαγωγός εστία εργασίας
- ❖ Αναδευτήρας Vortex

7.2 β) Για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

- ❖ Συσκευή παρασκευής του πηκτώματος
- ❖ Φούρνος μικροκυμάτων
- ❖ Συσκευή παροχής υπεριώδους (U.V.) ακτινοβολίας
- ❖ Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό μηχανήμα

7.2 γ) Για την PCR

- ❖ Θερμικοί κυκλοποιητές (Eppendorf – Mastercycler epgradient S)
- ❖ Φυγόκεντρος

7.2 δ) Για την ανάλυση SSCP

- ❖ Συσκευή παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμίδης
- ❖ Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας (Yellow line)
- ❖ Συσκευή καθέτου ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό
- ❖ Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης
- ❖ Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
- ❖ Συσκευή εκπομπής ορατού φωτός
- ❖ Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή

7.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

7.3 α) Για την απομόνωση του DNA από ιστό κρέατος

- ❖ TNES-Urea Buffer
- ❖ Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) (10μg/μl)
- ❖ Φαινόλη (Phenol) 90%
- ❖ Χλωροφόρμιο (Chloroform)
- ❖ Ισοαμυλική Αλκοόλη (isoamyl alcohol)
- ❖ Διάλυμα οξικού νατρίου 3M (Sodium Acetate Buffer Solution)
- ❖ Απόλυτη αιθανόλη (EtOH) 100%

- ❖ Αιθανόλη συγκέντρωσης 70%
- ❖ Αποστειρωμένο, διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O)
- **TNES-Urea Buffer** (200 ml) : 2 ml **Tris -HCl** (0,01M) (1M pH 7.5) + 5 ml **NaCl** (0,125M) (5 M) + 2 ml **EDTA-2Na** (0,005M)(0.5 M pH 7.5) + 10 ml **SDS** (0,5%)(10%) + 48.05 g **Urea** (4M) + **ddH₂O** έως τελικό όγκο 200 ml.

7.3 β) Για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

- ❖ Αγαρόζη
- ❖ TAE 1X
- ❖ Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr) (10mg/ml)
- ❖ Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer)
- **TAE 50X** (500ml): 121g **Tris Base** (1.98M) + 28.5ml **Acetic Acid** (0.95M) + 50ml **EDTA** (0,05M)0.5M + **ddH₂O** έως τελικό όγκο 500ml. Το TAE 1X παρασκευάζεται με αραίωση διαλύματος πυκνού TAE 50X (20 ml σε τελικό όγκο 1lt).
- **Loading buffer 6X** (10ml): 1ml **Bromophenol blue** 1%w/v (0,015M) + 0.5ml **TBE 20X** + 5ml **Glycerol** + **ddH₂O** έως τελικό όγκο 10ml.

7.3 γ) Για την PCR

- ❖ Αποστειρωμένο ddH₂O
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα (10X PCR Buffer)
- ❖ Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl₂) 50mM
- ❖ Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM το καθένα
- ❖ Εκκινητές (Primers)
- ❖ Taq DNA πολυμεράση 5U/μl

7.3 δ) Για την ανάλυση SSCP

- ❖ ddH₂O
- ❖ Ακρυλαμίδη 99%

- ❖ Δις- ακρυλαμίδη
- ❖ TBE 10X
- ❖ TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99%
- ❖ APS 20% w/v
- ❖ Loading buffer
- ❖ ddH₂O
- ❖ EtOH 100 %
- ❖ Οξικό οξύ 99%
- ❖ Νιτρικός άργυρος (AgNO₃)
- ❖ Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)
- ❖ Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄)
- ❖ Φορμαλδεϋδη 37%

➤ **TBE 10X (2lt) :** 216gr Tris Base (0,89M) + 110gr Boric Acid (0.89M) + 16,6 gr EDTA + ddH₂O έως τελικό όγκο τα 2lt.

8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1 Δείγματα

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 23 δείγματα ιστού νωπού κρέατος πτηνών και θηλαστικών πίνακας 1. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα ιστού (50-100mg) και η συντήρησή τους έγινε στους -20⁰C.

Πίνακας 1 : Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν

α/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ
1	<i>Ovis aries</i> (Πρόβατο)
2	<i>Capra aegagrus hircus</i> (Κατσίκι)
3	<i>Bos taurus</i> (Μοσχάρι)
4	<i>Capreolus capreolus</i> (Ζαρκάδι)
5	<i>Lepus europaeus</i> (Ευρωπαϊκός λαγός)
6	<i>Sus Scrofa</i> (Αγριογούρουνο)
7	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Κουνέλι)
8	<i>Meleagris gallopavo</i> (Γαλοπούλα)
9	<i>Turdus merula</i> (Κοτσύφι)
10	<i>Anas platyrhynchos</i> (Πρασινοκέφαλη)
11	<i>Gallus gallus domesticus</i> (Κότα)
12	<i>Coturnix coturnix</i> (Ορτύκι)

13	<i>Alectoris chucar</i> (Νησιώτικη πέρδικα)
14	<i>Anser anser</i> (Χήνα)
15	<i>Phasianus colchicus</i> (Φασιανός)
16	<i>Scolopax rusticola</i> (Μπεκάτσα)
17	<i>Turdus philomelos</i> (Τσίχλα)
18	<i>Tadorna tadorna</i> (Βαρβάρα)
19	<i>Anas crecca</i> (Κιρκίρι)
20	<i>Anas penelope</i> (Σφυριχτάρι)
21	<i>Struthio camelus</i> (Στρουθοκάμηλος)
22	<i>Lepus capensis</i> (Αφρικάνικος λαγός)
23	<i>Lepus timidus</i> (Ορεινός λαγός)

8.2 Απομόνωση μιτοχονδριακού DNA από ιστό

Αρχικά τεμαχίζουμε τον ιστό (από το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 50-100mg ιστού) και τον τοποθετούμε σε φιαλίδια erpendorf των 2ml. Στην συνέχεια προσθέτουμε 700μl ρυθμιστικού διαλύματος TNES-Urea και 10μl proteinase K (10mg/ml) και αναδεύουμε έντονα στο vortex. Τα δείγματα επωάζονται στους 55°C για 1h υπό ανάδευση σε κυκλικό αναδευτήρα.

Στην συνέχεια προσθέτουμε 350μl φαινόλη και 350μl χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη και αναδεύουμε τα δείγματα στον κυκλικό αναδευτήρα για 10min σε θερμοκρασία δωματίου (RT), ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10min στους 4°C και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2ml.

Εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο, επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Στο νέο φιαλίδιο erpendorf προσθέτουμε 700μl χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη, αναδεύουμε στον κυκλικό αναδευτήρα για 10min σε RT και στην συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4°C.

Στην συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε φιαλίδιο erpendorf του 1,5ml όπου προσθέτουμε 50μl διαλύματος οξικού νατρίου 3M και 1ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης, αναμιγνύουμε και τοποθετούμε τα δείγματα στην κατάψυξη στους -20°C για 20min. Στην περίπτωση που κατά την κατακρήμνιση εμφανίζονται ινίδια DNA, αυτά συλλέγονται και τοποθετούνται σε νέο φιαλίδιο. Εναλλακτικά, φυγοκεντρούμε (13000rpm για 10min στους 4°C), απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες.

Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος στους 37°C για 1h.

Τέλος επαναδιαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl αποστειρωμένο ddH₂O και αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

Σχετικά με τον ρόλο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο ισχύουν τα εξής:

- Το NaCl (που περιέχεται στο ρυθμιστικό διάλυμα TNES-Urea) ρυθμίζει την οσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε pH 7.5 το οποίο ρυθμίζεται από το Tris-HCl.
- Ο ρόλος του χηλικού παράγοντα EDTA είναι η δέσμευση των ιόντων Ca⁺⁺ και Mg⁺⁺ τα οποία συμβάλουν στην δράση των νουκλεασών.
- Το SDS, το οποίο είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό, συμβάλει στην διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες.
- Η πρωτεΐνάση K πέπτει τις πρωτεΐνες.
- Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση.
- Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλει επίσης στην μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA στην αιθανόλη οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στον συγκεκριμένο οργανικό διαλύτη.

8.3 Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης

Πρόκειται για μια διαδικασία ποιοτικού προσδιορισμού και διαχωρισμού τμημάτων DNA που μας δίνει την δυνατότητα να πάρουμε πληροφορίες για το μέγεθος των γραμμικών μορίων, την ποιότητα αλλά και την ποσότητα του DNA.

Βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα, τα οποία έχουν αρνητικό φορτίο, κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες (μικρά τμήματα έχουν την τάση

να κινούνται γρηγορότερα) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου διαμέσου των πόρων του πηκτώματος προς τον θετικό πόλο.

Για την παρασκευή του πηκτώματος, ογκομετρούμε 40 ml διαλύματος 1X TAE σε κωνική των 100ml και προσθέτουμε 0,6gr αγαρόζης. Το μίγμα θερμαίνεται (σε φούρνο μικροκυμάτων) για περίπου 1-2 λεπτά μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και στη συνέχεια προστίθενται 3 ml βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) έχει την ιδιότητα να φθορίζει στο υπεριώδες φως καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Έτσι δίνει πρότυπα ζωνώσεων που αντιστοιχούν στην ποσότητα του DNA. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλη μήτρα στην οποία έχουν τοποθετηθεί τα χτένια τα οποία δημιουργούν τις απαραίτητες θέσεις υποδοχής (πηγαδάκια) του DNA όπου και στερεοποιείται.

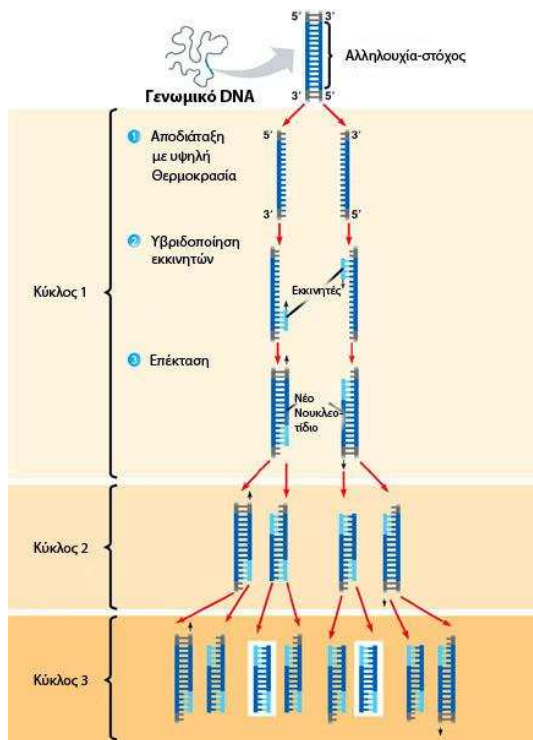
Η τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα αγαρόζης γίνεται αφού συμπληρωθεί η συσκευή με το ίδιο διάλυμα 1X TAE μέχρι το πήκτωμα να είναι πλήρως βυθισμένο στο διάλυμα αυτό. Για τον έλεγχο της PCR ακολουθεί ανάμιξη 3ml loading buffer με 5 μl προϊόντος PCR που αντιστοιχεί σε ποσοστό περίπου 10% της συνολικής ποσότητας ενώ για τον έλεγχο της απομόνωσης DNA ανάμιξη 3ml loading buffer με 3μl DNA που αντιστοιχεί σε ποσότητα ~600ng και τοποθέτησή τους προσεκτικά σε κάθε πηγαδάκι του πηκτώματος.

Η τάση που εφαρμόζεται είναι 100V και τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα. Τέλος, το πήκτωμα παρατηρείται υπό UV.

8.4 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA του μιτοχονδριακού

DNA με PCR

Με την PCR (Εικ. 3) επιτυγχάνεται η ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA (DNA στόχος), ενισχύεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Επειδή κατά την τεχνική της PCR γίνεται ενίσχυση του DNA, η αρχική ποσότητα που απαιτείται είναι πολύ μικρή.



Εικ. 3: Απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης
(Από <http://www.ja.wikipedia.org>.)

Για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rRNA χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές 16S RNA BM Rv και 16S RNA BM Fw. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA, όπου Y= C ή T

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
16S RNA BM Rv	5'-AYA AGA CGA GAA GAC CC-3'
16S RNA BM Fw	5'-GAT TGC GCT GTT ATC CC-3'

Για την διαδικασία της PCR το πρώτο βήμα είναι η παρασκευή ενός κοινού διαλύματος (master mix) το οποίο θα περιέχει, ανά δείγμα, τις ποσότητες αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Το διάλυμα παρασκευάζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Έπειτα τοποθετούμε σε φιαλίδια errendorf 1μl εκμαγείου DNA το οποίο αντιστοιχεί σε ποσότητα 200-700ng.

Πίνακας 3: Σύσταση διαλυμάτων αντιδράσεων για συνολικό όγκο αντίδρασης 50μl

DNA	1μl
Εκκινητής 16S RNA Rv	1μl
Εκκινητής 16S RNA Fw	1μl
Buffer 10X (Bioline)	5μl
MgCl ₂ (50mM) Bioline	1μl
dNTP (10 mM) το καθένα	1μl
Taq polymerase 5u/ul	1μl
ddH ₂ O	40μl

Στην συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε erpendorf που περιέχει το DNA, από 49μl του master mix. Επίσης, σε ένα erpendorf το οποίο δεν περιέχει DNA βάζουμε master mix (μάρτυρας) ώστε να συγκρίνουμε το προϊόν PCR με τον μάρτυρα. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή (Εικ. 4) ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας /χρόνου (πίνακας 4):



Εικ. 4: Θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για την αντίδραση PCR.

Πίνακας 4 : Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA

Στάδιο αντίδρασης	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	4 min	} Κύκλοι 35
Αποδιάταξη	95 °C	40 sec	
Υβριδοποίηση εκκινητών	52 °C	50 sec	
Επέκταση	72 °C	50 sec	
Τελική επέκταση	72 °C	10min	

Μετά το πέρας της PCR γίνεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, τα οποία διαθέτουν αρνητικό φορτίο, μετακινούνται προς το θετικό πόλο της ηλεκτροφορητικής συσκευής. Τα μεγαλύτερου μήκους τμήματα DNA μετακινούνται με μικρότερη ταχύτητα, επειδή συναντούν μεγαλύτερη αντίσταση κατά την δίοδό τους από το τρισδιάστατο δίκτυο που σχηματίζουν τα μόρια της αγαρόζης. Τελικά τα τμήματα του DNA καθίστανται εμφανή μετά από χρώση με ειδική φθορίζουσα χρωστική, το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Μετά τον διαχωρισμό των τμημάτων του DNA, το προϊόν της PCR μπορεί να ανιχνευθεί από το αναμενόμενο μέγεθός του, το οποίο προσδιορίζεται από την σύγκριση με τα τμήματα γνωστού μήκους του μάρτυρα ο οποίος ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα (Dieffenbach *et al*, 2003). Όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα (ανίχνευση ζωνών) χρησιμοποιούνται στην ποιοτική ανάλυση πολυμορφισμών με τη μέθοδο SSCP.

8.5 Ανάλυση SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η μέθοδος στηρίζεται στην διαφορετική δομή και συνεπώς διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα, που λαμβάνουν μονόκλωνα μόρια DNA που διαφέρουν μεταξύ τους έστω και κατά μόνο μια βάση.

Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης SSCP ακολουθούμε τα εξής 3 στάδια:

- A.** Αποδιάταξη
- B.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
- Γ.** Χρώση του πηκτώματος για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων

A. Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιάταξη των προϊόντων PCR

Τα προϊόντα που έχουν παραχθεί με PCR, πριν την ηλεκτροφόρησή τους, υφίστανται αποδιάταξη με θέρμανση ώστε να σχηματιστούν οι μονόκλωνες αλυσίδες και στη συνέχεια η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται απουσία αποδιατακτικού μέσου ώστε να επιτρέπονται μερικώς οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Έτσι η κινητικότητα του μορίου δεν εξαρτάται μόνο από το

μέγεθός του αλλά και από την τριτοταγή δομή του που με την σειρά της καθορίζεται από την αλληλουχία του κλώνου.

Σε eppendorf των 0,5 μl προσθέτονται:

- 5 μl PCR που αντιστοιχεί σε ποσοστό 10% της συνολικής ποσότητας.
- 10 μl loading buffer

Loading buffer

- 95% Formamide
- 0,05% Bromophenol blue
- 0,05 Xylene Cyanol
- 10 mM NaOH

Τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή του θερμοκυκλοποιητή, ώστε να πραγματοποιηθεί η πλήρης αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων στους 99 ° C για 7 λεπτά. Τα δείγματα τοποθετούνται αμέσως σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλωνη κατάσταση. Τέλος με μικροπιπέττα τα τοποθετούμε στα πηγαδάκια του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

B. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10%

Στην ανάλυση SSCP, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, ένα μονομερές το οποίο πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες παρουσία ελεύθερων ριζών οι οποίες με την σειρά τους διασυνδέονται παρουσία της N,N- μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδης, ενός μορίου διασυνδέτη και έτσι σχηματίζεται ένα πορώδες πήκτωμα. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης παίζει σημαντικό ρόλο στην SSCP και αυτό γιατί υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να μειώσουν το επίπεδο της διακριτικής ικανότητας, επομένως είναι πολύ σημαντικό η ηλεκτροφόρηση να πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία. Ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας είναι το pH. Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ακρυλαμίδης μειώνει το pH και το αποτέλεσμα είναι η αυξημένη ευαισθησία της SSCP (Kukita *et al*, 1997). Επίσης το μήκος των τμημάτων επηρεάζει την ανάλυση SSCP και για βέλτιστα αποτελέσματα το μέγεθος των τμημάτων DNA θα πρέπει να εμπίπτει εντός του εύρους 150 με 300 bp. Ωστόσο, η παρουσία γλυκερόλης στο πήκτωμα μπορεί να επιτρέψει ανάλυση και μεγαλύτερου μεγέθους τμήματα DNA σε αποδεκτή ευαισθησία. Τέλος,

σημαντική επίδραση στην διακριτική ικανότητα έχει το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος που επιλέγεται με βάση το μέγεθος του DNA και καθορίζεται από την συγκέντρωση του πηκτώματος (Sunnuks *et al*, 2000). Για την παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- ❖ 6 gr Ακρυλαμίδης
- ❖ 0,16 gr Δις- ακρυλαμίδης
- ❖ 6,25ml Γλυκερόλη
- ❖ 3,75ml TBE 10X
- ❖ 62,5ml ddH₂O
- ❖ 62,5 μl TEMED (Tetramethylethylenediamine)
- ❖ 375 μl APS 20% (Ammonium persulfate)

Η διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

- Προετοιμάζουμε την συσκευή παρασκευής του πηκτώματος.
- Σε ποτήρι ζέσεως αναδεύουμε τα παραπάνω υλικά με μαγνητάκι εκτός από τα TEMED, APS.
- Φιλτράρουμε με διηθητικό χαρτί και σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο ρίχνουμε προσεκτικά (ροή σταγόνας) το διάλυμα.
- Συμπληρώνουμε μέχρι τα 62,5 ml με νερό και μεταφέρουμε το διάλυμα σε κωνική φιάλη.
- Προσθέτουμε τα TEMED και APS. Τα διαλύματα αυτά πολυμερίζουν την ακρυλαμίδα. Μετά την προσθήκη γίνεται μια σύντομη ανάδευση του μίγματος, ρίχνουμε γρήγορα το διάλυμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούμε τα χτενάκια για να δημιουργήσουμε τα πηγαδάκια
- Περιμένουμε να πήξει το διάλυμα, αφαιρούμε τα χτενάκια και καθαρίζουμε τα πηγαδάκια.
- Προσθέτουμε 0.5X TBE στην συσκευή.
- Τοποθετούμε τα δείγματα στα πηγαδάκια και αρχίζει η ηλεκτροφόρηση στα 240V σε RT ολονύκτια.

Γ. Χρώση των πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση του πηκτώματος με διάλυμα νιτρικού αργύρου που έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα ανιχνεύοντας ποσότητες της τάξεως των λίγων νανογραμμάτων. Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στην συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη παρουσία βάσης (Sambrook *et al*, 2000). Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με χρώμα καφέ.

Για την χρώση πηκτωμάτων χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα:

ΔΙΑΛΥΜΑ 1: 20ml αλκοόλη + 780 ddH₂O +1 ml Οξικό οξύ

ΔΙΑΛΥΜΑ 2: 1gr/lit Νιτρικός άργυρος

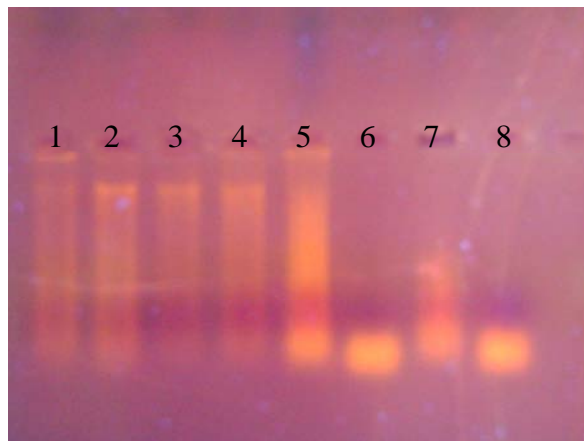
ΔΙΑΛΥΜΑ 3: 6gr Υδροξείδιο του Νατρίου + 0,025 gr Βοροϋδρίδιο του νατρίου + 2 ml Φορμαλδεΐδη + 400 ml ddH₂O

Η διαδικασία είναι η ακόλουθη και πραγματοποιείται υπό ανάδευση:

- Εμβαπτίζουμε το πήκτωμα σε 200ml Διαλύματος 1 για 3min.
- Απομακρύνουμε το διάλυμα με αναρρόφηση
- Επαναλαμβάνουμε τα δυο παραπάνω στάδια
- Ξεπλένουμε μία φορά με ddH₂O για 1min– απομακρύνουμε το νερό.
- Προσθέτουμε το Διάλυμα 2 για 10-15min.
- Απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε 2 φορές με ddH₂O για 1min.
- Απομακρύνουμε το νερό και προσθέτουμε το Διάλυμα 3 έως να εμφανιστούν ευκρινώς οι ζωνώσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

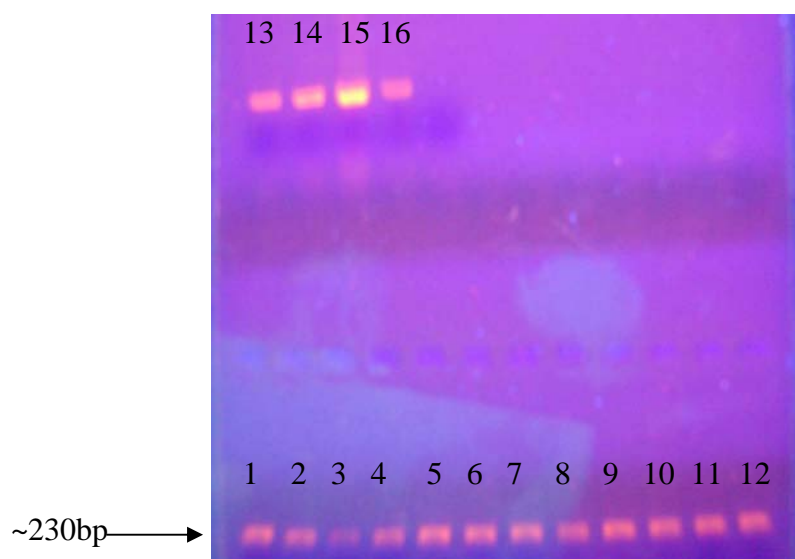
Η απομόνωση του DNA έγινε με την διαδικασία που έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην Εικ. 5 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης (Εικ. 5: 1, 2, 3) αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ένταση των ζωνών για τα δείγματα 1 (πρόβατο), 2 (κατσίκι), 3 (μοσχάρι), 4 (ζαρκάδι) και 5 (Ευρωπαϊκός λαγός) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν αρκετά καλή σε αντίθεση με τα δείγματα 6 (αγριογούρουνο), 7 (κουνέλι) και 8 (γαλοπούλα) στα οποία οι ζώνες δεν είναι τόσο έντονες ωστόσο το προϊόν ήταν αρκετό για PCR.



Εικ. 5: Ενδεικτική απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. 1) Πρόβατο 2) κατσίκι 3) μοσχάρι 4) ζαρκάδι 5) λαγός 6) αγριογούρουνο 7) κουνέλι 8) γαλοπούλα

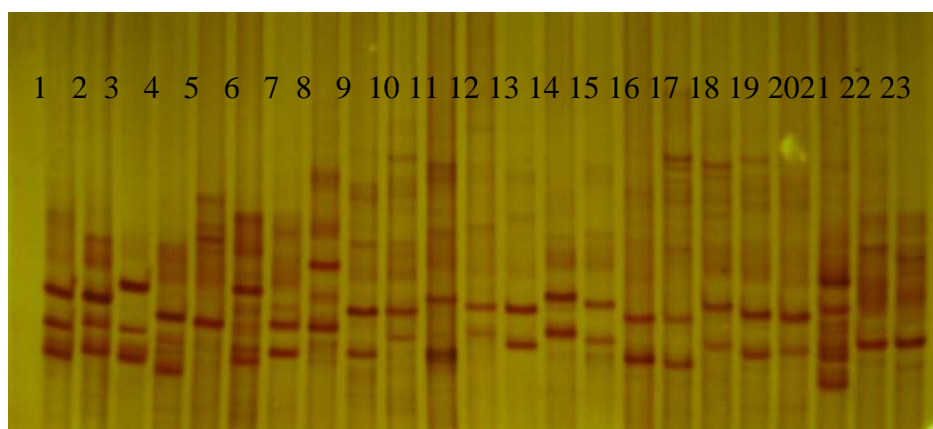
Στην συνέχεια με PCR πολλαπλασιάσαμε τμήμα μεγέθους περίπου 230bp του γονιδίου 16s RNA του μιτοχονδρίου για όλα τα δείγματα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε είναι σχεδιασμένοι βάσει αλληλουχιών από διαφορετικά είδη ψαριών, πτηνών και θηλαστικών σε περιοχές που είναι συντηρημένες δηλαδή περιοχές που είναι παρόμοιες σε όλα τα είδη, και γι' αυτό το λόγο μπορούν και δίνουν προϊόν σε πολλά διαφορετικά είδη. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήσαμε ως εκμαγείο κατά την PCR ήταν ~200ng/μl. Η Εικ. 6

είναι ενδεικτική της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



Εικ. 6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. 1) πρόβατο 2) κατσίκι 3) μοσχάρι 4) ζαρκάδι 5) λαγός 6) αγριογούρουνο 7) λαγός 8) γαλοπούλα 9) κοτσύφι 10) πρασινοκέφαλη πάπια 11) κότα 12) ορτύκι 13) νησιώτικη πέρδικα 14) χήνα 15) φασιανός 16) αρνητικός μάρτυρας

Στην συνέχεια ακολούθησε η τεχνική SSCP και για τα 23 δείγματα. Στην Εικ. 7 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.



Εικ.7: Ανάλυση SSCP όλων των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν: 1) πρόβατο 2) κατσίκι 3) μοσχάρι 4) ζαρκάδι 5) λαγός 6) αγριογούρουνο 7) κουνέλι 8) γαλοπούλα 9) κοτσύφι 10) πρασινοκέφαλη πάπια 11) κότα 12) ορτύκι 13) νησιώτικη πέρδικα 14) χήνα 15) φασιανός 16) μπεκάτσα 17) τσίχλα 18) βαρβάρα 19) κικίρι 20) σφυριχτάρι 21) στρουθοκάμηλος 22) Αφρικάνικος λαγός 23) ορεινός λαγός.

Στην παραπάνω εικόνα διακρίνονται τα πρότυπα όλων των δειγμάτων. Στην οικογένεια Leporidae ανήκουν τα τρία δείγματα λαγού που εξετάστηκαν και ειδικότερα το δείγμα 5 (Ευρωπαϊκός λαγός), το 22 (Αφρικάνικος λαγός) και το 23 (ορεινός λαγός) τα οποία ανήκουν και στο ίδιο γένος. Στην ίδια οικογένεια ανήκει επίσης και το δείγμα 7 (κουνέλι). Από τα τέσσερα δείγματα της ίδιας οικογένειας πήραμε διαφορετικά πρότυπα.

Όπως στην περίπτωση των λαγών έτσι και στην περίπτωση των πέντε δειγμάτων της ίδιας οικογένειας, πιο συγκεκριμένα της οικογένειας Anatidae, τα οποία εξετάστηκαν, δηλαδή τα δείγματα 10 (πρασινοκέφαλη πάπια), 19 (κιρκίρι), 20 (σφυριχτάρι) τα οποία ανήκουν και στο ίδιο γένος το δείγμα 18 (βαρβάρα) και 14 (χήνα), διαφορετικών γενών, τα πρότυπα που πήραμε ήταν διαφορετικά.

Διαφορετικά, επίσης, πρότυπα πήραμε για τα δείγματα 1 (πρόβατο), 2 (κατσίκα) και 3 (μοσχάρι), τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Bovidae, για τα άτομα της οικογένειας Phasianidae δηλαδή τα δείγματα 11 (κότα), 12 (ορτύκι), 13 (πέρδικα) και 15 (φασιανός) καθώς επίσης και για τα δείγματα της οικογένειας Turdidae, τα δείγματα 9 (κοτσύφι) και 17 (τσίχλα).

Τέλος διαφορετικά πρότυπα μας έδωσαν και τα άτομα τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Στην οικογένεια Cervidae στην οποία ανήκει το δείγμα 4 (ζαρκάδι), στην οικογένεια Suidae το δείγμα 6 (αγριογούρουνο), στην οικογένεια Meleagrididae το δείγμα 8 (γαλοπούλα), στην οικογένεια Scolopacidae το δείγμα 16 (μπεκάτσα) και στην οικογένεια Struthionidae το δείγμα 21 (στρουθοκάμηλος).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συνεχής αύξηση της κατανάλωσης του κρέατος τα τελευταία χρόνια καθιστά απαραίτητη τη δυνατότητα ελέγχου της αυθεντικότητάς του καθώς τα τελευταία χρόνια μια σειρά διατροφικών κρίσεων όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών έκαναν την εμφάνισή τους κλονίζοντας την εμπιστοσύνη των καταναλωτών. Για τους περισσότερους καταναλωτές είναι δύσκολος έως ανέφικτος ο έλεγχος των προϊόντων που καταναλώνουν αφού οι ετικέτες των προϊόντων δεν παρέχουν σαφείς πληροφορίες των συστατικών που περιέχουν.

Για τον σκοπό αυτό, τον έλεγχο δηλαδή της αυθεντικότητας των τροφίμων, το κατά πόσο δηλαδή αυτά που αναγράφονται στις ετικέτες των τροφίμων περιέχονται στην πραγματικότητα μέσα σε αυτά, κρίνεται σκόπιμη η ανάπτυξη μεθόδων οι οποίες θα επιτρέπουν την ταυτοποίηση των τυποποιημένων και επεξεργασμένων προϊόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση βέβαια αποτελεί η ταυτοποίηση των γνωστών ειδών με μοριακές τεχνικές ανάλυσης από την επεξεργασία των οποίων προκύπτουν τα διάφορα προϊόντα. Έτσι έχοντας στην διάθεση μας π.χ ένα πρότυπο που μας δίνει η ανάλυση της γαλοπούλας και εφαρμόσουμε μια μοριακή τεχνική όπως την PCR-RFLP στο σαλάμι γαλοπούλας μπορούμε εύκολα να δούμε αν το συγκεκριμένο προϊόν περιέχει μόνο ένα είδος ή κάποια πρόσμιξη συγκρίνοντας τα δυο πρότυπα.

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να πετύχουμε το διαχωρισμό μεταξύ 23 διαφορετικών ειδών κρέατος τα οποία έχουν άμεση σχέση με τη διατροφή του ανθρώπου αφού είτε καταναλώνει επεξεργασμένα προϊόντα των ειδών αυτών είτε δείγματα αυτών.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε στηρίχτηκε στο μιτοχονδριακό DNA, επειδή παρουσιάζει υψηλό ποσοστό αντιγράφων στους ιστούς των ζώων και μεγάλη ποικιλομορφία (Andrew *et al*, 1999), εφαρμόζοντας την ανάλυση SSCP, μια μέθοδος η οποία παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα: 1) είναι σχετικά γρήγορη 2) με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA με ηλεκτροφόρηση 3) είναι σχετικά εύκολη συγκριτικά με άλλες. Το τμήμα του γονιδίου που χρησιμοποιήσαμε ήταν το 16S rRNA το οποίο έδωσε πρότυπα σε όλα τα δείγματα και οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινοί για όλα τα δείγματα. Η χρήση κοινών

εκκινητών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο αφού με τον τρόπο αυτό απλοποιείται η διαδικασία κερδίζοντας έτσι πολύτιμο χρόνο και μειώνεται σημαντικά το κόστος. Επίσης, είναι απαραίτητη προϋπόθεση η χρήση κοινών εκκινητών στην τεχνική SSCP, για την ταυτοποίηση διαφορετικών προτύπων.

Στο παρελθόν αρκετοί ερευνητές προχώρησαν στην ταυτοποίηση και διαχωρισμό διαφόρων ειδών αναπτύσσοντας μοριακές τεχνικές οι οποίες στηρίχτηκαν σε γενετικούς δείκτες όπως RAPD (Sanz *et al*, 1999), AFLP, RFLP (Meyer *et al*, 1995). Οι περισσότερες τεχνικές έδιναν ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στο διαχωρισμό των ειδών κρέατος που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και ορισμένων που είχαν υποστεί κάποιο είδος επεξεργασίας π.χ μαγείρεμα, κάποιες άλλες όμως αποδείχτηκαν ανεπαρκείς όσον αφορά τον διαχωρισμό μειγμάτων κρέατος.

Τα 23 είδη που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα έδωσαν διαφορετικά πρότυπα. Τα πρότυπα που λάβαμε για τα είδη των θηλαστικών π.χ πρόβατο, κασίκι διαφέρουν αρκετά από εκείνα των πτηνών π.χ κότα, γαλοπούλα. Διαφορετικά επίσης πρότυπα εμφανίστηκαν και σε διαφορετικά είδη πάπιας και σε διαφορετικά είδη λαγών τα οποία όμως ανήκουν στο ίδιο γένος, κάτι που δείχνει ότι η συγκεκριμένη τεχνική εκτός του ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε διαφορετικά είδη είναι κατάλληλη και για την ταυτοποίηση ειδών τα οποία είναι συγγενή μεταξύ τους. Όσον αφορά τον ενδοειδικό πολυμορφισμό δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα μιας και άτομα που ανήκουν στο ίδιο είδος δεν εξετάστηκαν. Ενδεχομένως μελλοντικά η ίδια τεχνική να μπορεί να εφαρμοστεί και σε άτομα τα οποία ανήκουν στο ίδιο είδος δίνοντας εξίσου καλά αποτελέσματα εξετάζοντας με αυτό τον τρόπο και τον ενδοειδικό πολυμορφισμό.

Συμπερασματικά, στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε την τεχνική PCR-SSCP και αναπτύξαμε μια αξιόπιστη (αφού πήραμε διαφορετικά πρότυπα σε όλα τα δείγματα) και γρήγορη μέθοδο για τον διαχωρισμό γνωστών ειδών κρέατος. Ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR και με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης εμφανίστηκαν διαφορετικά για κάθε είδος και εύκολα συγκρίσιμα πρότυπα. Τα πρότυπα που προέκυψαν από τα γνωστά είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύγκριση με πρότυπα σκευασμάτων που περιέχουν ένα είδος κρέατος ή ακόμη και με πρότυπα σκευασμάτων τα οποία

περιέχουν περισσότερα από ένα είδη κρέατος δηλαδή μίγματα αλλά και επέκταση της ίδιας τεχνικής σε άλλα προϊόντα με σημαντική εμπορική αξία. Τέλος η ίδια τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για διαχωρισμό συγγενικών ειδών.

BIBΛIOΓPAΦIA

1. Andrew J, Hopwood, Karen S, Fairbrother, Andrew K, Lockley and Ronald G, Bardsley (1999):An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for the identification of chicken in meat mixtures.Meat Science 53:227-231.
2. Avise J.C, Bowen B.W., Lamb T., Meylan A.B., Bermingham E., (1992). Evolution at turtle's pace:evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the testudines.Molecular Biology and Evolution 9:457-473
3. Boore J. (1999).Animal mitochondrial genomes.Neucleic Acids Res.Vol (27)(8):1767-1780
4. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W.(1980).Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.Am J Hum Genet 32(3):314-31
5. Brown, David (2009). Scientists Unravel Genome of the Cow.
6. Clayton D.A (1982).Replication of animal mitochondrial DNA.Cell 28:693-705
7. Dalmaso A., Fontanella E., Piatti P., Civera T., Rosati S.,(2004).A Multiplex PCR assay for the identification of species in animal feedstuffs.Molecular and Cellular Probes(18):81-87
8. Dickson, J (1995). Return of wild turkey. US Geological Survey
9. Dieffenbach Cw., Dveksler GS. (1995).PCR Primer. A Laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press
10. Hanswith WW., Laipis P.J.(1986).Transmission genetics of mammalian mitochondria. A molecular model and experimental evidence. Achievements and Perspectives in Mitochondrial Research. New York.Elsevier, pp:49-60
11. Hearne G.M., Ghosh S. and Todd J.A.(1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. Trends Genet. (8):288-94
12. Kalisz B., Natonek-Wisniewska M., Stota E.,(2010).Use of cytochrome b polymorphism for species identification of biological material derived from cattle,sheep,goats, roe deer and red deer. Folia Biol. 58(1-2):47-50

13. Kukita Y., et al. (1997).SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low PH Gel. Human Mutations (10):400-7
14. Landegren M., Kaiser R., Sanders J and Hood L.(1998). DNA diagnostics molecular techniques and automation. Science: 242(4876):229- 37
15. Lee H., (2006). DNA Barcoding Korean Birds. Mol. Cells. Vol 22 : pp 323-327
16. Marshall, Alan john (1960). Biological and Comparative Physiology of Birds. Academic Press, 446
17. Martinez J. And Sllinas J. (1998).”Methods in Molecular Biology a High-Density Genetic Map Using the AFLP Technology” Human Press 82:157-171
18. Matsanaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J, Shinmura Y., (1999).Aquick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay.Meat Science 51:143-148
19. Meyer R., Hofelein C., Luthy J, Candrian U.(1995). Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism analysis :a simple method for species identification in food. J.AOAC. 78(6):1542-51
20. Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA. (1994).The polymerase chain reaction. Birkhauser
21. Mullis KB, Fallona F.A(1987).Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. Methods Enzymol 155:335-350
22. Patris L., Croan D., Guo Z., Clark R., Coldham T. and Murby J(2000). Evolution of DNA Fingerprinting method for determining the species origin of meats.Meat Science 54:369-376
23. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I.(1992).PCR:Clinical diagnostics and research. Spinger Laboratory.
24. Sambrook J. (2000), Molecular Cloning: Laboratory Manual (third edition)
25. Sanz Y., Saez R. And Toldra F. (2004).PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products.Meat Science (66):659-665

26. Scheffler I. (2001). Mitochondria make come back. *Advanced Drug Delivery Review* 49:3-26
27. Sherman, David M. (2002). *Tending animals in the global village*. Blackwell 46.
28. Spooner D., Van Treuen R., Devincente M. (2005). *Molecular Market for Genebank Management*. RGR technical bulletin No 10
29. Stamoulis P., C. Stamatis, T. Sarafidou and Z. Mamuris (2009). Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control* (21):1061-1065
30. Sunnucks P. et al. SSCP is not so difficult. The Application and Utility of single-strand conformation polymorphism in evolution biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* (2000) (9):1699-710
31. Vittorio M. Moretti., Federica Ballagamba, Sergio Comincini and Franco Valfre. (2001). *Meat Science* 49(8):3775-3781
32. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Homes M., Frijters A., Peleman J., Kuiper M., (1995). AFLP :a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* :23(21) :4407-14
33. Williams J.G.K., Kubelic 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
34. Διαμαντίδης, Γ. (1994). *Εισαγωγή στην Βιοχημεία*. Εκδόσεις University Studio Press. Θεσσαλονίκη.
35. Μαρκουλάτος Π. (2009), *Σημειώσεις του μαθήματος Ποιοτικές και Ποσοτικές Μέθοδοι Ανάλυσης- Βιοδείκτες, του ΜΠΣ*.
36. Μπλούκας Ι.(2007). *Τεχνολογία Κρέατος*. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
37. Παπαγεωργίου Ν.(1990). *Βιολογία Άγριας Πανίδας* Εκδόσεις University Studio Press. Θεσσαλονίκη.
38. Χατζόπουλος, Π. (2001). *Βιοτεχνολογία Φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα

