

Η Συμβολή της Βιοτεχνολογίας και της Μοριακής Βιολογίας στην Προστασία και Διαχείριση του Περιβάλλοντος

Δρ Ζήσης Μαμούρης
Καθηγητής Γενετικής
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

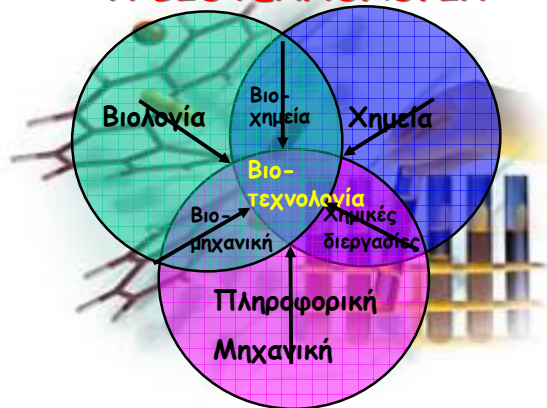


Μοριακή Βιολογία και Γενετική Μηχανική: Μελέτη, Ανάλυση, Τροποποίηση του DNA και του RNA

Έχουμε τα «εργαλεία»



Η ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ



Ο 6ος Μαζικός Αφανισμός

Τα γεωλογικά δεδομένα υποδεικνύουν 5 μαζικούς αφανισμούς ειδών

Επί του παρόντος είμαστε μάρτυρες του 6ου μαζικού αφανισμού

Βασικός υπεύθυνος οι ανθρωπογενείς παρεμβάσεις:

- Καταστροφές ή/και κατακερματισμός φυσικού περιβάλλοντος
- Κυνήγι

Ταξονομική ομάδα	Αριθμός αφανισμών	% των ομάδων που χάθηκαν	% των ειδών που απειλούνται
Θηλαστικά	85	2.1	24
Πτηνά	113	1.3	12
Ερπετά	21	0.3	62
Αμφίβια	2	0.05	39
Ψάρια	23	0.1	49
Ασπόνδυλα	98	0.01	~70
Φυτά	384	0.2	~70

Αφανισμοί που καταχωρήθηκαν από το 1900

Ο ρυθμός των αφανισμών επιταχύνεται

Θερμά σημεία Βιοποικιλότητας – περιοχές με υψηλή συγκέντρωση ενδημικών ειδών, στις οποίες καταγράφεται ταχεία απώλεια ενδιαιτημάτων



Μοριακή Οικολογία

Η Μοριακή Οικολογία χρησιμοποιεί τεχνικές μοριακής γενετικής για να λύσει προβλήματα οικολογίας, εξέλιξης και συμπεριφοράς, κάτω από το πρίσμα και την προοπτική της διατήρησης της βιοποικιλότητας

Μοριακοί Δείκτες

Αναδιπλασιασμός του DNA



Μικρές περιοχές του γονιδιώματος που χρησιμοποιούνται ως δείκτες γενετικής ποικιλομορφίας

Είναι χρήσιμοι μόνο όταν είναι **πολυμορφικοί στους πληθυσμούς**

3 εκατ. πολυμορφικές θέσεις

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

...AGTTCGATTGCTCGATAGCACGAT
 ...AGTTC**A**ATTGCTTGATAGCACGAT...
 ...AGTTCGATTGCT**T**GATAGCTCGAT...

Repeats

...AGTTCAAT**TGCTT**GATAGCGCGAT...
 ...AGTTCAAT**TGCTTGCCTT**GATAGCGCGAT...

Deletions

...AGTTCAAT**T**GATAGCGCGAT...

Γιατί μοριακοί δείκτες:

- Ενυπάρχουν στα άτομα (δεν μπορούν να χαθούν)
- Κληρονομήσιμοι (ταυτοποίηση απογόνων)
- Δεν καταστρέφεται το δείγμα (δεν απαιτείται θανάτωση του ζώου)

Πολλοί διαφορετικοί δείκτες:

- Ισοένζυμα
- Αλληλουχίες μιτοχονδριακού (mt) DNA
- Αλληλουχίες χλωροπλαστικού (cp) DNA
- Μικροδορυφορικό DNA
- Αλληλουχίες πυρηνικού DNA

Πυρηνικό DNA

Μικροδορυφορικό DNA

“Μικροδορυφόροι” είναι τόποι όπου μικρές αλληλουχίες DNA επαναλαμβάνονται στη σειρά η μια αμέσως μετά την άλλη.

Χρωμόσωμα Y

Μικρό χρωμόσωμα που προσδιορίζει το φύλο ενός ατόμου. Έμβρυα με χρωμόσωμα Y γίνονται αρσενικά. Έτσι, η γενετική πληροφορία του χρωμοσώματος Y είναι μόνο πατρικής προέλευσης.

Μιτοχονδριακό DNA


Το σπέρμα δίνει μόνο και όχι κυτταρικά ορόλο το mtDNA προελεύσεως.



mtDNA

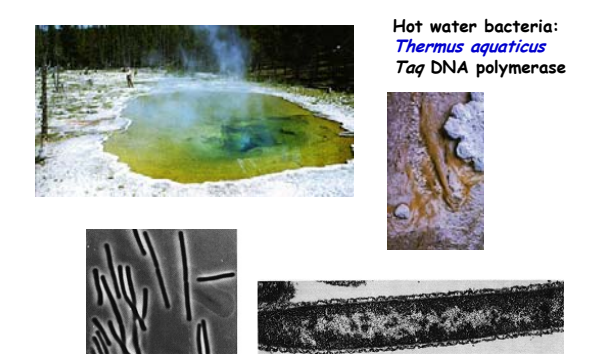
Polymerase Chain Reaction (PCR)

- ✓ Ability to generate identical high copy number DNAs made possible in the 1970s by recombinant DNA technology (i.e., cloning).
- ✓ Cloning DNA is time consuming and expensive.
- ✓ Probing libraries can be like hunting for a needle in a haystack.
- ✓ PCR, “discovered” in 1983 by Kary Mullis, enables the **amplification** (or duplication) of millions of copies of any DNA sequence with known **flanking sequences**.
- ✓ Requires only simple, inexpensive ingredients and a couple hours.
 - DNA template
 - Primers (anneal to flanking sequences)
 - DNA polymerase
 - dNTPs
 - Mg²⁺
 - Buffer
- ✓ Can be performed by hand or in a machine called a **thermal cycler**.
- ✓ 1993: Nobel Prize for Chemistry



Hot water bacteria: *Thermus aquaticus*

Taq DNA polymerase



Life at High Temperatures
 by Thomas D. Brock
 Biotechnology in Yellowstone
 © 1994 Yellowstone Association for Natural Science
<http://www.bact.wisc.edu/Bact303/b27>

What PCR means for molecular ecology

- DNA can be amplified from a single copy
 - non-destructive for small animals, insects
 - microbes
 - sperm or eggs
 - hair
 - bone
 - saliva, urine and faeces
 - museum specimens (ancient DNA)
- specific sequences can be targeted
 - mitochondrial genes
 - nuclear genes and repetitive DNA

Γιατί ΤΟΣΟΙ ΠΟΛΛΟΙ μοριακοί δείκτες:

Γονιδιώματα πολύ διαφορετικά
 - Συμπαγή γονιδιώματα:
 λιγότερο πολλαπλομορφικοί δείκτες

Ποικιλία πληθυσμιακών καταστάσεων

- Πρόσφατοι στενωποί: μικρή ενδοπληθυσμιακή ποικιλότητα

Ποικιλία καταστάσεων
 - Εξημερωμένοι και φυσικοί πληθυσμοί διαχωρισμένοι για γενιές: μεγάλη γενετική διαφοροποίηση

Διαφορετικοί τύποι γενετικών δεικτών

- Υπερέχοντες, συνυπερέχοντες, δι-, πολύ-αλληλομορφικοί...

Ποικιλία τεχνικών για ατομική γενοτύπηση

- Ξηνή/ακριβή τεχνικά εύκολη/δύσκολη...

Σωστή επιλογή = γνώση της βιολογίας του είδους

Έχει η φαινοτυπική ποικιλότητα πάντα γενετικό υπόβαθρο:



Η περίπτωση της κουσομούρας (*Mullus barbatus*)

Characters	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Maximum body depth	0.35791	0.09052	0.48305
Minimum body depth	0.28481	-0.27115	0.37595
Caudal peduncle length	-0.12308	-0.78787	0.11119
Head length	0.83885	0.11571	0.12085
Diameter of eye	0.12526	0.09444	0.56564
Preeorbital distance	0.50736	0.05115	-0.06224
Postorbital distance	0.87070	0.28517	0.16361
Predorsal fin distance	0.71718	0.18214	0.40285
Dorsal fin height	0.19471	0.69036	0.21067
Dorsal fin base length	0.02997	0.30689	0.64023
Anal fin height	0.13320	0.78211	0.28267
Anal fin base length	0.00520	0.14473	0.60754
Pectoral fin length	0.06093	0.74802	0.39251

Η μορφολογική ποικιλότητα δεν συμβαδίζει πάντα με τη γενετική διαφοροποίηση

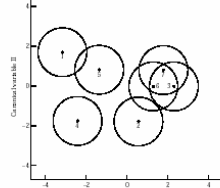


FIG. 2. Discriminant analysis plot using the 10 morphometric characters (see text). 1. Taramania, 2. Corfu, 3. Allakou, 4. Anaxakou, 5. Korai, 6. Pliakou, 7. Chalkida. Circles include 95% of the specimens.

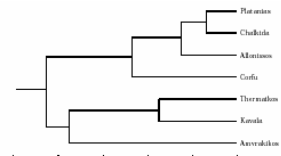
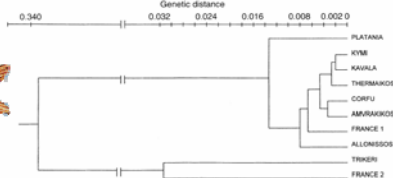
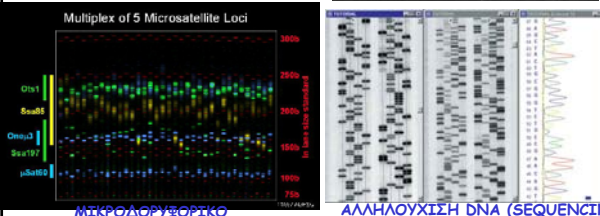
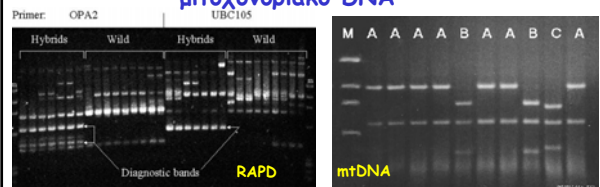


FIG. 3. UPGMA cluster analysis based on Mahalanobis' distances between the morphometric characters. Genetic distance.



Γενετική ποικιλότητα στο πυρηνικό και το μιτοχονδριακό DNA



Μοριακή ταυτοποίηση: Είδη, Άτομα και Ψύλο

- Αντιστοίχιση ατόμων σε πληθυσμούς
- Ταυτοποίηση υβριδίων μεταξύ ειδών
- Ταυτοποίηση λείας σε στομάχια θηρευτών
- Ταυτοποίηση φορέων ασθενειών
- Ιατροδικαστικές έρευνες σε φυσικούς ζωικούς πληθυσμούς
- Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών

Οικολογία Συμπεριφοράς

- Προσδιορισμός τύπων ζευγαρώματος
Πολυγαμία / Μονογαμία
- Διμορφισμός και αναλογία φύλου
- Μοριακή ανίχνευση επιλογής συντρόφου (Π.χ. ΜΗΣ)
- Διαμάχες μεταξύ φύλων
- Εκτίμηση διασποράς των ζώων


Πληθυσμιακή Γενετική και Εφαρμοσμένη Φυλογεωγραφία

- Εκτίμηση δομής, δραστικού μεγέθους και κατανομής πληθυσμών και μεταπληθυσμών
- Γονιδιακή ροή και ρυθμοί μετανάστευσης
Προσδιορισμός και ταυτοποίηση μεταναστών
- Πληθυσμιακές στενωποί
- Ταξινομικές αποφάσεις
- Ανίχνευση του μητρικού πληθυσμού εισαγόμενων ειδών

Γενετική της Διατήρησης εσπευδόμενων ειδών

- Εκτίμηση γενετικής διαφοροποίησης σε μικρούς πληθυσμούς
- Αιμομικτική κατάπτωση και γενετικό φορτίο
- Εκτίμηση ανάγκης - επιτυχίας εμπλουτισμών και εισαγωγής ειδών και πληθυσμών
- Γενετική της αποκατάστασης των ειδών
Κρυσταλλοποίηση γαμετών, τεχνητή γονιμοποίηση, κλωνοποίηση

Χρήση Μοριακών Δεικτών για Προσδιορισμό των «Μονάδων Διατήρησης» σε Απειλούμενους Φυσικούς Πληθυσμούς

	ΤΥΑΤΑΡΑ (<i>Sphenodon</i>) αρχαία σειρά ερπετών	Θαλάσσιοι Ελέφαντες	
	Πάνθηρας της Florida	100δες είδη πτηνών	
	Τσίτα (<i>Acinonyx jubatus</i>)	100δες είδη εντόμων	
	Γκρίζος Λύκος Και δυστυχώς ο κατάλογος συνεχώς μεγαλώνει...	

Μοριακά εργαλεία για αποκάλυψη απάτης Γενετική ανάλυση κρέατος φάλαινας

Το πρόβλημα
Παράνομη διακίνηση κρέατος στις παγκόσμιες αγορές
Παράνομη διακίνηση ιστών από προστατευόμενα είδη

Οι συνέπειες
Δραματική μείωση των πληθυσμών
Διεθνείς διαμάχες για την προστασία

Η λύση
Ταυτοποίηση είδους με mtDNA ανάλυση



DNA Barcode:

Μικρές τυποποιημένες αλληλουχίες που θα βοηθήσουν στη διάκριση των ειδών σε ένα ευρύ φάσμα ζωντανών οργανισμών

Δεν φιλοδοξεί να περιγράψει τα είδη, αλλά να προσδιορίσει τα όριά τους



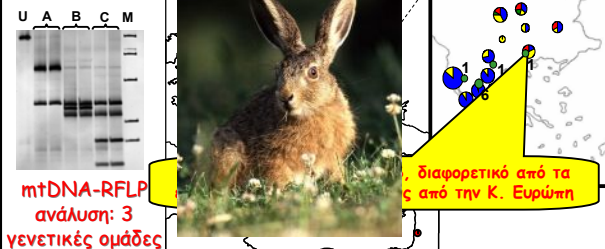
Απελευθερώσεις λαγών εκτροφείου

Το πρόβλημα
Ανεξέλεγκτες απελευθερώσεις λαγών εκτροφείου

Οι συνέπειες
Γενετική ρύπανση της ποικιλομορφίας


Η λύση

mtDNA-RFLP ανάλυση: 3 γενετικές ομάδες



... διαφορετικό από τα ... από την Κ. Ευρώπη

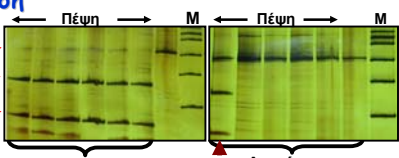
Διάκριση διαφόρων φυλών χοίρων

Το πρόβλημα 

Οι συνέπειες *Sus scrofa* × *Sus scrofa domestica* → **Υβρίδιο**

Ανεξέλεγκτη εκτροφή αγριόχοιρων
Γενετική ρύπανση από εμπλουτισμούς
Διατροφική απάτη

Η λύση



PCR-RFLP και SSCP ανάλυση του υποδοχέα της μελανοκορτίνης (MC1R)

Εκτρεφόμενοι χοίροι Υβρίδιο Αγριόχοιροι

Ταυτοποίηση Φύλου σε Γεράκια (*Accipiter cooperii*)

Το πρόβλημα Αρσενικό → ZZ
Ενήλικος Φυλετικός Διαμορφισμός
Θηλυκό
ZW

Η λύση




PCR-SSCP ανάλυση ενός τμήματος 400bp του γονιδίου CHD

Οι συνέπειες
Στα πτηνά η ταυτοποίηση φύλου είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση και διαχείριση των ειδών

Διάκριση συγγενών ειδών του γένους *Macrolophus*

Το πρόβλημα **Η λύση**



• RFLP-PCR για τη διάκριση αυτών των ειδών και ενηλικίων σε συγγενή είδη *Macrolophus*

M. melanotoma
M. pygmaeus
M. costalis

mtDNA analysis

Οι συνέπειες
Αδυναμία μελέτης της οικολογίας των αρπακτικών (μετακινήσεις, προτιμήσεις καλλιιεργειών, φυτά-καταφύγια) που θα βοηθούσε στην ορθολογικότερη διαχείρισή τους.

Διατήρηση του Γκιζανιού, ενδημικού ψαριού της Ρόδου

Το πρόβλημα Εξαιτίας ανθρωπογενών παρεμβάσεων θεωρείται απειλούμενο είδος υψηλής προτεραιότητας από την Ε.Ε.

Η λύση



Ανάλυση RAPD και λειτουργικών γονιδίων (MHC): Πολύ χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού, αιμομικτική κατάπτωση, κίνδυνος εξαφάνισης



Μελέτη της Βιολογίας και της Γενετικής των υπαρχόντων πληθυσμών και διατύπωση διαχειριστικών προτάσεων

Ιχνηλασιμότητα των ΓΤΟ


Γιατί ο έλεγχος για ΓΤΟ:

Νομοθεσία


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

Πως ελέγχουμε για ΓΤΟ

PCR: Έλεγχος για παρουσία εισαγόμενου ξένου DNA
Υπέρ: σταθερότητα DNA
Κατά: Ακριβό, χρονοβόρο



ELISA: Έλεγχος παρουσίας πρωτεϊνών από τη γενετική τροποποίηση
Υπέρ: Γρήγορο, φθινό,
Κατά: Εξειδίκευση για κάθε φυτό, σταθερότητα πρωτεΐνης



Ανάπτυξη και Εφαρμογή Μοριακών Δεικτών για την Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος στην Αλυσίδα Εμπορίας τους

ή πιο απλά: Ιχνηλασιμότητα τροφών

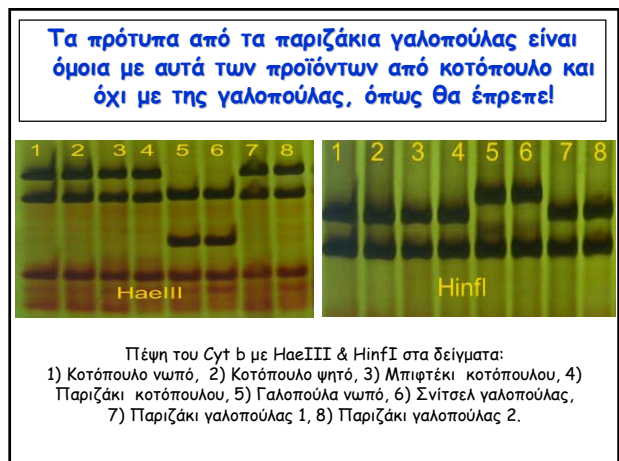
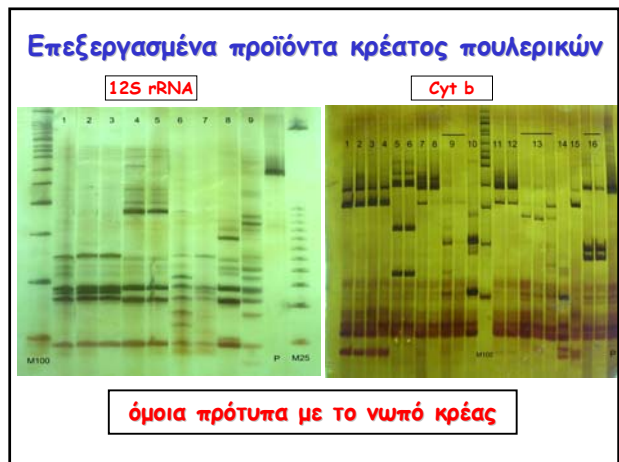
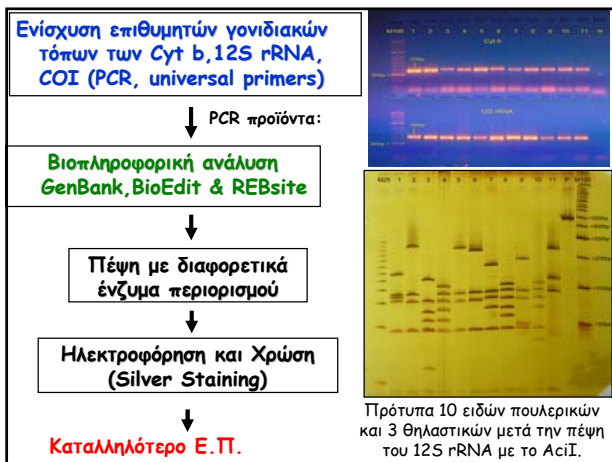




Η Αναγκαιότητα της Ταυτοποίησης

- Διατροφικές Κρίσεις (BSE, γρίπη πουλερικών).
- Νοθεία (ηλιέλαιου, γάλακτος, κρεατοσκευασμάτων).
- Τροφικές αλλεργίες - δηλητηριάσεις.
- Γ.Τ. τρόφιμα.

- ❖ Αύξηση της ανησυχίας και του ενδιαφέροντος των καταναλωτών για την σύσταση & ποιότητα των τροφίμων.
- ❖ Απαραίτητη η ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων πιστοποίησης της αυθεντικότητας των συστατικών.
- ❖ Προστασία της υγείας των καταναλωτών, οικονομικοί & θρησκευτικοί λόγοι.



Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον

Η βιοτεχνολογία μπορεί να βοηθήσει αποτελεσματικά στην επίλυση περιβαλλοντικών προβλημάτων ή στην εφαρμογή βιομηχανικών μεθόδων ή διεργασιών που περιορίζουν την ρύπανση ή μόλυνση του περιβάλλοντος

1. Βιολογική Αποκατάσταση

Η χρήση της μεταβολικής ικανότητας μικροοργανισμών με στόχο την αποκατάσταση και εξυγίανση ρυπασμένων εδαφών, υδροφόρων και λοιπών οικοσυστημάτων

2. Ανάπτυξη βιομηχανικών διεργασιών

Χρήση μικροοργανισμών φιλικών προς το περιβάλλον αντί τοξικών χημικών και γενικά προϊόντων που δημιουργούν περιβαλλοντικά προβλήματα

Τι περιλαμβάνει η βιολογική απορρύπανση

- Χρήση άγριων στελεχών ή γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών με ιδιαίτερες ικανότητες διάσπασης υπολειμματικών και ιδιαίτερα τοξικών οργανικών ρύπων

1. Πολυαρωματικοί Υδρογονάνθρακες
2. Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια
3. Πολυχλωριωμένες φαινόλες
4. Γεωργικά Φάρμακα



Βακτήρια «δείκτες»



- ✓ ανίχνευση μόλυνσης και ρύπανσης του περιβάλλοντος
- ✓ μικροοργανισμοί ευαίσθητοι σε συγκεκριμένους ρυπαντές

Βιοτεχνολογία στην ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών βιομηχανικών διεργασιών

- Βιολογική επεξεργασία Υγρών και Στερεών Αποβλήτων
- Παραγωγή Βιοαιθανόλης, Βιοαερίου
- Παραγωγή Βιοπλαστικών
- Βιολογική ανάκτηση μετάλλων
- Παραγωγή βιολογικών γεωργικών φαρμάκων

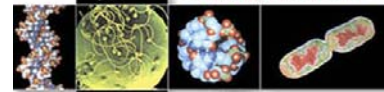
Τι κοινό έχουν όλα τα παραπάνω: Χρησιμοποιούν μικροοργανισμούς ή ένζυμα τους αντί τοξικών χημικών και γενικά προϊόντων που δημιουργούν περιβαλλοντικά προβλήματα

Σας ευχαριστώ για την προσοχή σας Καλό Απόγευμα

ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
UNIVERSITY OF THESSALY



DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY &
BIOTECHNOLOGY

