

Εθνικό Κέντρο Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης – Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών - Παραδοτέο 4.4.1

Πολύ-κριτηριακό πρότυπο αξιολόγησης αυθεντικότητας τοπικών προϊόντων

Θεσσαλονίκη, 2020



Interreg



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

Ελλάδα-Κύπρος

Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης



ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ



ΠΟΛΥ-ΚΡΙΤΗΡΙΑΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΠΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ (Π.Ε 4.4.1)

«Το πρότυπο συντάχθηκε με τη συνεργασία του Εθνικού Κέντρου Έρευνας & Τεχνολογικής Ανάπτυξης/Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, ΓΧΚ και ΤΕΠΑΚ υπό το γενικό συντονισμό του ΕΚΕΤΑ»



Συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΤΠΑ) και από Εθνικούς Πόρους της Ελλάδας και της Κύπρου

Παραδοτέο 4.4.1

Πολύ-κριτηριακό πρότυπο αξιολόγησης αυθεντικότητας των τοπικών προϊόντων Βορείου Αιγαίου και Κύπρου

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	4
2. Βασικά κριτήρια ταυτοποίησης αυθεντικότητας και πεδία εφαρμογής	7
2.1. Γενετική ταυτότητα-Αλληλουχία του DNA	7
2.2. Ισοτοπικό αποτύπωμα.....	12
2.3. Μικροβιακό αποτύπωμα	16
3. Συμπληρωματικά κριτήρια (βιοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά προϊόντων).....	18
4. Χωρική διάσταση εφαρμογής των βασικών και συμπληρωματικών κριτηρίων.....	19
5. Τεχνικές και μέσα λήψης και μεταφοράς δειγμάτων	31
5.1. Λήψη δειγμάτων.....	31
5.2. Απαιτούμενος εξοπλισμός.....	31
5.3. Προετοιμασία και φύλαξη δειγμάτων.....	32
Συλλογή δειγμάτων γάλακτος	32
Συλλογή δειγμάτων χαλουμιών, τυριών και αλλαντικών	32
Συλλογή δειγμάτων ελιών	33
Συλλογή δειγμάτων σταφυλιών	34
Συλλογή δειγμάτων αγροτικών προϊόντων φυτικής προέλευσης	35
Συλλογή δειγμάτων που προορίζονται για ισοτοπικό χαρακτηρισμό	35

6.	Πρωτόκολλα αναλύσεων και διαχείρισης δεδομένων.....	36
6.1.	Απομόνωση DNA.....	36
6.2.	Ανάλυση DNA με τη μέθοδο του Γραμμωτού Κώδικα (DNA Barcoding)	36
6.3	SNIF-NMR ανάλυση ισοτοπικών λόγων του δευτερίου	37
6.4	Προσδιορισμός ισοτοπικής αναλογίας άνθρακα	38
6.5	Προσδιορισμός ισοτοπικής αναλογίας οξυγόνου	38
6.6	Χημειομετρική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	38
6.7	Πρωτόκολλο μεταγονιδιωματικής ανάλυσης.....	39
7.	Συνδυαστικό μοντέλο πολύ-κριτηριακής ανάλυσης	41
8.	Έλεγχος και διασφάλιση ποιότητας.....	41
9.	Βιβλιογραφία	44
10.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	44

1. Εισαγωγή

Τα αγροτικά προϊόντα, φυτικής προέλευσης, που προορίζονται για κατανάλωση, είτε ως ακατέργαστα προϊόντα, είτε ως μεταποιημένα τρόφιμα, αποτελούν τη βάση της ανθρώπινης διατροφής. Ο έλεγχος της αυθεντικότητας και η ανίχνευση νοθείας των αγροτικών προϊόντων συμπεριλαμβανομένων των δημητριακών, οσπρίων, λαχανικών, ελαιόλαδου, φρούτων, ξηρών καρπών, κρασιού και οινικών προϊόντων, μελιού και αρωματικών φυτών και αρτυμάτων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάδειξη της αξίας τους, και την αποτροπή δόλιων πρακτικών και αθέμιτου ανταγωνισμού. Απώτερος σκοπός αποτελεί η ταυτοποίηση, ιχνηλασιμότητα και ανίχνευση τυχόν νοθείας για την προστασία του καταναλωτή και του παραγωγού αλλά και η αύξηση της αξίας του προϊόντος.

Όσον αφορά στην αυθεντικότητα, πολλά φυτικά είδη έχουν υψηλή προστιθέμενη αξία λόγω των ανώτερων ποιοτικών τους χαρακτηριστικών που απορέουν μεταξύ άλλων και από τις ιδιαίτερες θρεπτικές τους ιδιότητες και τη συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία. Ενώ ταυτόχρονα αρκετά από αυτά έχουν αναγνωριστεί για την υψηλή τους αξία και τους έχει αποδοθεί ο τίτλος Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) ή Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε) ή Ιδιότυπο Παραδοσιακό Προϊόν (Ι.Π.Π.), διασφαλίζοντας αυξημένες τιμές στην αγορά και βελτιώνοντας το εισόδημα των παραγωγών. Ταυτόχρονα, προστατεύουν το ίδιο το προϊόν και τους καταναλωτές, παρέχοντάς τους προϊόντα πιστοποιημένα ως προς τον τρόπο παραγωγής και επεξεργασίας, καθώς και την γεωγραφική καταγωγή και τη βοτανική τους προέλευση. Παράλληλα, οι διάφορες περιπτώσεις δόλιων πρακτικών όπως η νοθεία και η λανθασμένη ή και παραπλανητική επισήμανση των τροφίμων έχουν αρνητικό αντίκτυπο τόσο στην εμπιστοσύνη των καταναλωτών όσο και στο δίκαιο εμπόριο. Επομένως, η διασφάλιση της ιχνηλασιμότητας των μη εξεργασμένων υλικών που χρησιμοποιούνται στην μεταποίηση των τροφίμων είναι υψίστης σημασίας, αποτρέποντας όχι μόνο απόπειρες νοθείας που αποτελούν κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών καθώς μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα και αλλεργικά επεισόδια αλλά και απόπειρες οικονομικής απάτης. Με την εισαγωγή της ζώνης ελεύθερων συναλλαγών στην παγκόσμια αγορά, το ενδιαφέρον για την πιστοποίηση της αυθεντικότητας αυξήθηκε ιδιαίτερα και αναζητούνται συνεχώς πιο εξελιγμένες μέθοδοι που να μπορούν να εντοπίζουν μικρές διαφορές που σχετίζονται με την προέλευση των τροφίμων ή να εντοπίζουν τη νοθεία σε ίχνη.

Ο τομέας της αγροδιατροφής στη διασυνοριακή περιοχή Ελλάδας Κύπρου παρουσιάζει μία σειρά ειδικών οικονομικών, περιβαλλοντικών, πολιτιστικών και κοινωνικών χαρακτηριστικών, η αποτελεσματική αξιοποίηση των οποίων είναι σε θέση να τον μετατρέψει σε έναν από τους πλέον δυναμικούς και εξωστρεφείς κλάδους της οικονομίας. Σύμφωνα με τον ΣΕΒΕ (2013) ο αγροδιατροφικός τομέας αποτελεί το 91% του όγκου εξαγωγών της Περιφέρειας Βορείου Αιγαίου και 25% στην Κύπρο. Στο πλαίσιο αυτό τα τοπικά προϊόντα αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα των στρατηγικών τοπικής ανάπτυξης καθώς συνεισφέρουν στην υιοθέτηση της ‘ταυτότητας’ μιας περιοχής, δημιουργώντας δεσμούς μεταξύ των προϊόντων, των χαρακτηριστικών και του πολιτισμού του τόπου παραγωγής, διατηρώντας έτσι την τοπική ‘αγροδιατροφική’ κληρονομιά, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για τις γεωγραφικές περιοχές του Β. Αιγαίου και τις Κύπρου. Τα τελευταία χρόνια καταγράφεται μία στροφή των καταναλωτών προς τοπικά – παραδοσιακά προϊόντα, τα οποία και θεωρούνται ανώτερης ποιότητας. Η αύξηση της ζήτησης τέτοιων προϊόντων αποτελεί οικονομική ευκαιρία για περιοχές ικανές να διαφοροποιήσουν κατάλληλα τα προϊόντα τους αξιοποιώντας το ενδογενές δυναμικό του τόπου για την παραγωγή και την προβολή τους. Το ενδιαφέρον αυτό ωστόσο γίνεται αρκετές φορές προϊόν εκμετάλλευσης καθώς υπάρχουν προϊόντα που εμφανίζονται στην αγορά ως τοπικά-παραδοσιακά χωρίς να είναι στην πραγματικότητα. Η επιστημονική τεκμηρίωση της αυθεντικότητας των τοπικών προϊόντων σε σχέση με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τον τόπο παραγωγής, τόσο για τα πιστοποιημένα (ΠΟΠ, ΠΓΕ, ΕΠΠΕ, ΟΠΑΠ) όσο και για τα μη πιστοποιημένα προϊόντα, αποτελεί άμεση προτεραιότητα εθνικού και τοπικού προγραμματισμού, ειδικά των RIS3 και S3CY (2014), καθώς δύναται να αποτελέσει βασικό μοχλό ανάπτυξης του αγροδιατροφικού τομέα στην περιοχή. Επιπλέον με τη Ζώνη Ελεύθερων Συναλλαγών, το ενδιαφέρον για την τεκμηρίωση της αυθεντικότητας αυξήθηκε κατακόρυφα. Έτσι, αναζητούνται εξελιγμένες μέθοδοι, ταυτοποίησης της αυθεντικότητας προκειμένου να ωφελούνται οι παραγωγοί από την προστιθέμενη αξία διαφοροποίησης των προϊόντων τους και παράλληλα να διασφαλίζονται οι καταναλωτές.

Στο πλαίσιο αυτό, το έργο ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ θέτει ως κύριες ομάδες στόχους παραγωγούς, ΜΜΕ, συνεταιρισμούς και ενώσεις παραγωγής, μεταποίησης και εμπορίας προϊόντων αγροδιατροφής και εστιάζει στην ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου συστήματος για την ταυτοποίηση αυθεντικότητας τοπικών προϊόντων Βορείου Αιγαίου και Κύπρου ως

επιχειρησιακού εργαλείου ενίσχυσης της ανταγωνιστικότητας αυτών στις εγχώριες και διεθνείς αγορές.

Η καινοτομία του έργου βασίζεται στη συνδυασμένη χρήση: α) Γενετικής ταυτότητας-DNA, β) Ισοτοπικού αποτυπώματος και γ) Μικροβιακού προφίλ (μικροβίωμα), που καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη ταυτοποίηση της μοναδικότητας του προϊόντος με βάση το DNA, του τόπου παραγωγής με βάση τους λόγους ισotόπων και της ποιότητας με βάση το μικροβίωμα. Στόχος του έργου «ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ» είναι η ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας των επιχειρήσεων του αγροδιατροφικού τομέα μέσω της ταυτοποίησης της αυθεντικότητας των τοπικών παραδοσιακών προϊόντων των νησιών της Περιφέρειας Βορείου Αιγαίου και της Κύπρου, που θα έχει ως αποτέλεσμα την εμπορική τους αξιοποίηση, τόσο στις εγχώριες όσο και στις διεθνείς αγορές. Η καινοτόμος προσέγγιση του έργου βασίζεται στη συνδυασμένη χρήση: α) Γενετικής ταυτότητας, β) Ισοτοπικού αποτυπώματος και γ) Μικροβιακού προφίλ, που καθιστούν δυνατή την ταυτοποίηση αυθεντικότητας σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των προϊόντων, τα μέσα παραγωγής και την βοτανική & γεωγραφική προέλευσή τους. Το παρόν παραδοτέο αφορά στην ανάπτυξη ενός πολύ-κριτηριακού προτύπου βάσει του οποίου θα γίνεται η αξιολόγηση αυθεντικότητας τοπικών προϊόντων.

Το παραδοτέο 4.4.1 με τίτλο «**Πολύ-κριτηριακό πρότυπο αξιολόγησης αυθεντικότητας των τοπικών προϊόντων Βορείου Αιγαίου και Κύπρου**» αφορά στην σύνταξη προτύπου βάσει του οποίου θα πραγματοποιείται η αξιολόγηση αυθεντικότητας τοπικών προϊόντων. Το πρότυπο θα συνταχθεί με τη συνεργασία ΕΚΕΤΑ, ΓΧΚ και ΤΕΠΑΚ υπό το γενικό συντονισμό του ΕΚΕΤΑ και θα περιλαμβάνει:

- Ανάλυση των βασικών κριτηρίων ταυτοποίησης αυθεντικότητας και του πεδίου εφαρμογής αυτών. Στα κριτήρια αυτά περιλαμβάνονται:
 - Η αλληλουχία του DNA
 - Η αναλογία ισotόπων
 - Το μικροβιακό αποτύπωμα
- Προσδιορισμός απαιτούμενων συμπληρωματικών κριτηρίων όπως βιοχημικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών προϊόντων

- Ανάλυση της χωρικής διάστασης εφαρμογής των βασικών και συμπληρωματικών κριτηρίων
- Τεχνικές και μέσα λήψης και μεταφοράς των δειγμάτων
- Πρωτόκολλα αναλύσεων και διαχείρισης δεδομένων
- Ανάπτυξη συνδυαστικού μοντέλου πολύ-κριτηριακής ανάλυσης αποτελεσμάτων για τον καθορισμό των απαιτούμενων συνδυασμών κριτηρίων, του εύρους τιμών αυτών καθώς και των δεδομένων αναφοράς που θα πιστοποιούν την αυθεντικότητα προέλευσης ανά εξεταζόμενο προϊόν.
- Διαδικασίες ελέγχου και διασφάλισης ποιότητας

2. Βασικά κριτήρια ταυτοποίησης αυθεντικότητας και πεδία εφαρμογής

2.1. Γενετική ταυτότητα-Αλληλουχία του DNA

Μέθοδοι βασιζόμενοι στη γενετική ταυτοποίηση των τροφίμων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) είναι διαθέσιμες για την ταυτοποίηση της αυθεντικότητας και ιχνηλασιμότητας εκμεταλλευόμενες τη γενετική παραλλακτικότητα των διαφορετικών ειδών ακόμη και ποικιλιών. Το γενετικό υλικό (DNA) είναι κατάλληλο ως μέσο ιχνηλασιμότητας καθώς είναι εξαιρετικά σταθερό βιομόριο που μπορεί να ανακτηθεί από ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών δειγμάτων ακόμη και εάν αυτά δεν έχουν διατηρηθεί σε ιδανικές συνθήκες. Δύο βασικές τεχνικές γενετικής ταυτοποίησης αποτελούν οι μοριακοί δείκτες (molecular markers) και ο γραμμωτός κώδικας DNA (DNA barcoding), που αφορούν στη μοριακή ταυτοποίηση ποικιλιών και ειδών αντίστοιχα.

Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες (DNA markers) ανιχνεύουν διαφορές στην αλληλουχία του DNA που μπορούν να διακρίνουν ενδο- και δια-ειδική ποικιλομορφία. Η ανάλυση των μοριακών δεικτών πολυμορφισμού βρίσκει εφαρμογή στην αξιολόγηση και στον χαρακτηρισμό της γενετικής ποικιλότητας, στη δημιουργία μοριακών χαρτών, στην απομόνωση γονιδίων και στην προστασία των ποικιλιών. Οι μοριακοί δείκτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αυτούς που βασίζονται: α) στον υβριδισμό των νουκλεϊκών οξέων, όπως οι δείκτες Πολυμορφισμού Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων DNA (RFLP),

β) στον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας με PCR που περιλαμβάνουν τους δείκτες Τυχαίου Ενισχυόμενου Πολυμορφικού DNA (RAPD), Πολυμορφισμού Μήκους Ενισχυόμενων Τμημάτων (AFLP), Μικροδορυφόροι ή Απλές Επαναλαμβανόμενες Αλληλουχίες (SSR), και Πολυμορφισμοί Μεταξύ Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών (ISSR).

γ) στην διαφοροποίηση σε επίπεδο νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία του DNA όπως οι Πολυμορφισμοί Μονού Νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms -SNP) που είναι εφικτό να αναγνωριστούν με καμπύλες τήξης υψηλής ανάλυσης (High Resolution Melting-HRM) του DNA.

Στις παραπάνω περιπτώσεις η ανάλυση των αποτελεσμάτων περιλαμβάνει την ανάλυση των PCR προϊόντων σε πηκτή αгарόζης ή ακρυλαμιδίου, τη φωτογράφιση της πηκτής και την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μια άλλη τεχνική αποτελεί η χρήση των καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης. Η μέθοδος των καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης (HRM), είναι μια ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων και νουκλεοτιδικών αλλαγών στην αλληλουχία του DNA (Wilhelm και Pingoud 2003), και αποτελεί μία οικονομικά αποδοτική και ταχεία εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές «μετά την PCR» μεθόδους γενοτύπησης (SSCP, HPLC και RFLP). Πιο συγκεκριμένα, η ταχεία αξιόπιστη και αποτελεσματική ανίχνευση ενός εκτεταμένου φάσματος SNPs και μικρών εισαγωγών και διαγραφών (indels) επιτρέπει την εφαρμογή της HRM ανάλυσης για την διάκριση ποικιλιών/ειδών (Distefano et al., 2012; Ganopoulos et al., 2011b, 2012) και τη γενετική χαρτογράφηση (Studer et al., 2009; Wu et al., 2008). Παράδειγμα αποτελεί η γενοτύπηση της τομάτας που βασίστηκε στους μοριακούς δείκτες πολυμορφισμού νουκλεοτιδίου (SNP) και επέτρεψε τον χαρακτηρισμό και τη διάκριση των τοπικών πληθυσμών και ποικιλιών (Corrado et al., 2013, 2014; Sim et al., 2012) καθώς και ο εντοπισμός νοθείας σε σπόρους κακάο με χρήση SNPs (Fang et al., 2014). Η HRM ανάλυση των μικροδορυφορικών περιοχών (SSR-HRM) έχει εφαρμοστεί σε παραδοσιακά προϊόντα Π.Ο.Π όπως είναι τα φασόλια πλακέ μεγαλόσπερμα Πρεσπών και η φακή Εγκλουβής, για τον εντοπισμό νοθείας στο ρύζι μπασμάτι (Ganopoulos et al., 2011a) καθώς και για την αξιολόγηση ενδο- και δια-ποικιλιακής ποικιλομορφίας στην ελληνική καλλιεργούμενη κερασιά (*Prunus avium* L.) (Ganopoulos et al., 2010).

DNA barcoding

Πέραν του πυρηνικού γονιδιώματος, το γονιδίωμα των οργανιδίων, όπως οι χλωροπλάστες (cpDNA) και τα μιτοχόνδρια (mtDNA), αποτελούν μέσα ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αυθεντικότητας και χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη βιομηχανία τροφίμων και στην χρήση ετικέτας στην αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων, υποστηρίζοντας την ασφάλεια τροφίμων και την ανίχνευση νοθείας των φρέσκων και μεταποιημένων προϊόντων.

Το φυτικό μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν είναι το ίδιο αποτελεσματικό όσο το χλωροπλαστικό γονιδίωμα στην διάκριση ειδών, πιθανόν λόγω του ενδο-μοριακού ανασυνδυασμού που χαρακτηρίζει το μιτοχονδριακό DNA αλλά και του υψηλού βαθμού συντήρησης που παρουσιάζει μεταξύ των ειδών. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ευρέως το χλωροπλαστικό γονιδίωμα, το οποίο βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα μέσα σε κάθε κύτταρο και καθίσταται ευκολότερη η ανάκτηση πληροφοριών ακόμη και σε αλλοιωμένα δείγματα ή μεταποιημένα προϊόντα φυτικής προέλευσης. Η μέθοδος με την οποία γίνεται η ταυτοποίηση ονομάζεται γραμμωτός κώδικας DNA (DNA barcoding) και είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των ειδών βασιζόμενος στις διαφορές που εντοπίζονται σε μικρές αλληλουχίες περιοχών του γονιδιώματος. Μία τέτοια αλληλουχία για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γραμμωτός κώδικας θα πρέπει να τηρεί τα ακόλουθα κριτήρια: α) ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας σε επίπεδο είδους για να είναι εφικτός ο διαχωρισμός των ειδών, β) ύπαρξη μίας μικρού μήκους αλληλουχίας που θα παρουσιάζει ποικιλότητα σε επίπεδο αλληλουχίας DNA μεταξύ των ειδών και γ) παρουσία συντηρημένων πλευρικών περιοχών για την ανάπτυξη των καθολικών εκκινήτων. Για την επιλογή της καταλληλότερης περιοχής για Barcoding στα φυτά έχουν προταθεί επτά χλωροπλαστικές περιοχές (*rpoC1<rpoB<atpF-atpH<rbcl<,matK<psbK-psbI<trnH-psbA*) αλλά έχουν προεπιλεγεί οι ακόλουθες τρεις:

- 1) *rbcl*: είναι εύκολη στη χρήση αλλά έχει μικρή διαχωριστική ικανότητα
- 2) *matK*: έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα αλλά μικρότερη καθολικότητα
- 3) *trnH-psbA*: έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, καλή καθολικότητα αλλά μεταβλητό μέγεθος και οι αλληλουχίες διακόπτονται από μικροδορυφόρους (SSRs)

Μία ακόμη περιοχή που χρησιμοποιείται ευρέως ως γραμμωτός κώδικας είναι και το χλωροπλαστικό ιντρόνιο του *trnL* (Taberlet et al., 2007), η οποία χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση στενώς συγγενικών ειδών. Παρόλο που δεν αποτελεί μία από τις πιο ποικιλόμορφες μη-κωδικές περιοχές του χλωροπλαστικού γονιδιώματος, η εξέλιξη της εν λόγω περιοχής έχει μελετηθεί εκτενώς σε φυλογενετικές μελέτες. Η δευτεροταγής δομή της

αλληλουχίας του *trnL* επιτρέπει την στοίχιση αλληλουχιών διαφορετικών οργανισμών για τον σχεδιασμό νέων μοριακών δεικτών υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Επιπλέον λόγω του μικρού μεγέθους (περίπου 70 ζευγών βάσεων) παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης ειδών σε επεξεργασμένα τρόφιμα όπου αναμένεται το DNA να έχει αποικοδομηθεί. Πα'όλα αυτά για τον διαχωρισμό ειδών με τη μέθοδο του γραμμωτού κώδικα χρησιμοποιείται επιτυχώς ο συνδυασμός πυρηνικών και χλωροπλαστικών περιοχών (Chase et al., 2005). Η πλέον χρησιμοποιούμενη πυρηνική περιοχή είναι η Internal Transcribed Spacer (*ITS*) περιοχή του 18S–5.8S–26S ριβοσωμικού πολυκιστρονίου (Álvarez and Wendel, 2003). Συνεπώς, η χλωροπλαστική περιοχή *trnL* σε συνδυασμό με την πυρηνική περιοχή *ITS2* θα χρησιμοποιηθούν κυρίως για τον προσδιορισμό της γενετικής ταυτότητας, των προϊόντων Βορείου Αιγαίου και Κύπρου.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου του γραμμωτού κώδικα DNA είναι ότι αρκούν πολύ μικρές ποσότητες οποιουδήποτε φυτικού ιστού, και ότι λόγω της μικρής απαιτούμενης ποσότητας DNA είναι δυνατή η αναγνώριση ειδών ακόμη και σε εμπορικά προϊόντα όπως αλεύρι, μαρμελάδες, λάδι κ.α.. Ως εκ τούτου, το DNA barcoding είναι ένα πολύ ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο που μπορεί να εφαρμοστεί σε νωπά ή επεξεργασμένα προϊόντα για ταυτοποίηση και οριοθέτηση ειδών όπου άλλες μέθοδοι είναι αναποτελεσματικές. Επιπρόσθετα, μπορεί να εφαρμοστεί στη διάκριση ειδών σε μίγματα αρτυμάτων και βοτάνων με στόχο την μοριακή ιχνηλάτηση εκούσιας ή ακούσιας νοθείας, λάθος ετικετοποίησης, και παράνομης εμπορίας. Η βιομηχανική επεξεργασία αυτών των προϊόντων δεν επηρεάζει την επιτυχία στην απομόνωση, στον πολλαπλασιασμό και στην αλληλούχηση του DNA, επιτρέποντας την ανάλυση των φυτικών περιεχομένων μέσω της μεθόδου DNA barcoding.

Το DNA barcoding έχει εφαρμοστεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας διαχωρισμού τοξικών από εδώδιμα είδη στο γένος *Solanum* (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.) και *Prunus* (*Prunus armeniaca* L., *Prunus avium* L., *Prunus cerasus* L., *Prunus domestica* L.) αποδεικνύοντας τον μοριακό διαχωρισμό ειδών του κάθε γένους (Ganopoulos et al., 2013). Οι De Mattia et al., (2011), κατάφεραν να διαχωρίσουν μέρος του συνόλου των δειγμάτων μέντας που ανήκαν σε μορφολογικώς ταυτοποιημένα είδη του ίδιου γένους. Οι ίδιοι, σε δείγματα ρίγανης (*Origanum* L.) παρατήρησαν ότι η μέθοδος διαχωρισμού των ειδών με DNA barcoding δεν κρίθηκε κατάλληλη για τον διάκριση μέσα στο γένος λόγω της υψηλής γενετικής παραλλακτικότητας. Αντίθετα, ο διαχωρισμός του είδους *Ocimum basilicum* L. από τα είδη *Ocimum gratissimum* L. και *Ocimum tenuiflorum* L. ήταν επιτυχής.

Πρόσφατα αναδείχθηκε η αποτελεσματικότητα του DNA barcoding με τον χλωροπλαστικό δείκτη *trnL* σε συνδυασμό με την HRM ανάλυση για την διάκριση και ποσοτικοποίηση των περιεχόμενων στο χυμό ειδών φρούτου (πορτοκάλι, μάνγκο, ροδάκινο, αχλάδι και ανανά) (Faria et al., 2013).

Μία επιπρόσθετη εφαρμογή του DNA barcoding είναι ο εντοπισμός αλλεργιογόνων συστατικών μέσα στα επεξεργασμένα τρόφιμα, όπως ίχνη ξηρών καρπών. Η αλλεργία στο φουντούκι, για παράδειγμα, είναι πολύ κοινή σε άτομα με αλλεργία στη γύρη σημύδας, φουντουκιάς και άλνου, προκαλώντας αναπνευστικά προβλήματα και επομένως η επιμόλυνση με ίχνη φουντουκιού αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών. Έχει εφαρμοστεί η μέθοδος DNA barcoding με χρήση των χλωροπλαστικών δεικτών *trnL* σε συνδυασμό με την ανάλυση HRM για την ποσοτικοποίηση των αλλεργιογόνων συστατικών στα εμπορικά προϊόντα, όπου ήταν εφικτός ο διαχωρισμός μεταξύ διαφορετικών ειδών αλλά και ποσοστού της τάξης του 0.01% επιμόλυνσης με φουντούκι (Madesis et. al 2013). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για τη νοθεία του κρόκου Κοζάνης (Bosmali et al. 2017)

Η συνδυασμένη μέθοδος DNA barcoding με την HRM ανάλυση (Bar-HRM) έχει χρησιμοποιηθεί για την μοριακή ιχνηλασιμότητα και εντοπισμό νοθείας της “φάβας Σαντορίνης” (*Lathirus clymenum*), ενός κοινού ψυχανθούς φυτού της Μεσογειακής διατροφής που έχει αναγνωριστεί ως Π.Ο.Π για την υψηλή θρεπτική του αξία (Ganopoulos et al., 2012). Το κόστος της “φάβας Σαντορίνης” είναι τέσσερις φορές υψηλότερο συγκριτικά με την κοινή “φάβα” προερχόμενη από τα είδη *Vicia faba* και *Pisum sativum*, καθιστώντας το προϊόν αυτό στόχο νοθείας. Η προσέγγιση βασίστηκε στις περιοχές DNA barcoding, *trnL* και *rpoC* συνδυαστικά με την ανάλυση HRM, όπου ήταν εφικτός ο διαχωρισμός διαφορετικών συγγενικών ειδών του *L. clymenum* αλλά και η ανίχνευση ενός ποσοστού της τάξης 1:100 μη-φάβα Σαντορίνης προς φάβα Σαντορίνης, αντίστοιχα, σε εμπορικά προϊόντα.

Αναμενόμενες βάσεις δεδομένων που θα δημιουργηθούν

Η εφαρμογή των πιο πάνω μεθόδων σε τοπικές ποικιλίες, είδη και προϊόντα τους και η πιλοτική εφαρμογή σε άλλα είδη τροφίμων θα οδηγήσει σε δεδομένα τα οποία θα εμπλουτιστούν και αναμένεται να δημιουργήσουν βάσεις δεδομένων, αποτελούμενες από αλληλουχίες DNA αυθεντικών τοπικών ποικιλιών ειδών και προϊόντων

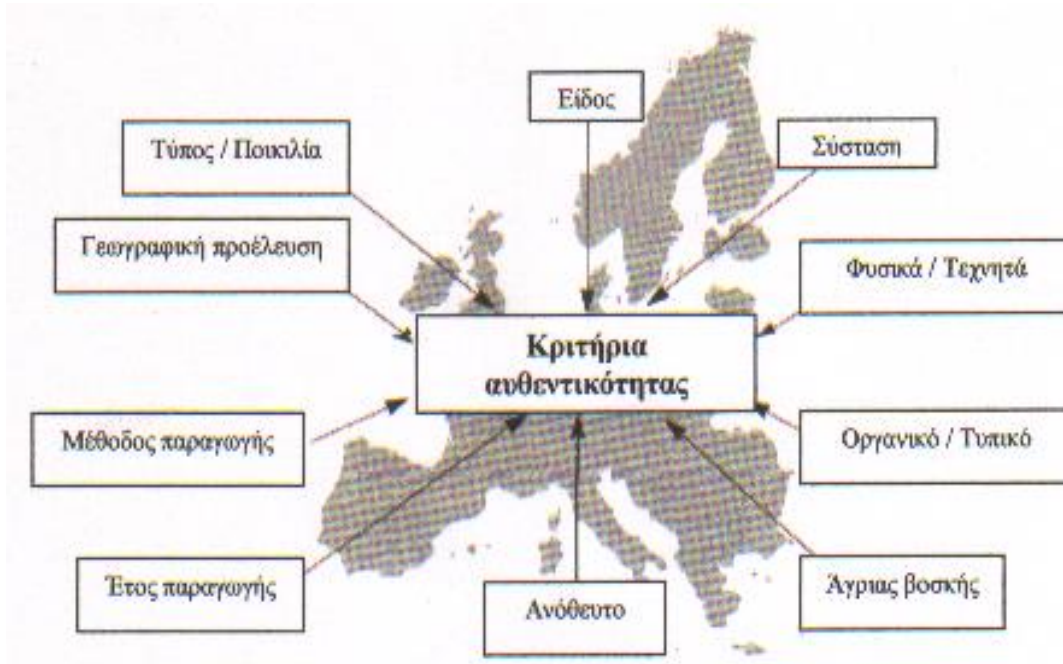
Οι αναμενόμενες βάσεις δεδομένων που θα προκύψουν, θα περιλαμβάνουν αυθεντικά δείγματα από την Κύπρο και τα νησιά του Βορείου Αιγαίου και θα μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμο εργαλείο για τους αρμόδιους φορείς ελέγχου, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στον εμπλουτισμό των φακέλων για την κατοχύρωσή τους.

2.2. Ιστοτοπικό αποτύπωμα

Η έννοια της αυθεντικότητας τροφίμων και ποτών είναι πολύπλοκη και τα κριτήρια που την ορίζουν είναι αριθμητικά πολλά και διαφέρουν για κάθε είδος. Οπωσδήποτε πρέπει να υπάρχει συμμόρφωση του παραγωγού ως προς την ετικέτα του τελικού προϊόντος, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 1169/2011. Για τον προσδιορισμό της αυθεντικότητας, οι αρμόδιοι φορείς ελέγχου καλούνται να εφαρμόσουν συνδυασμό διαφόρων μεθόδων ανάλυσης, χωρίς να υπάρχει μία επίσημη μέθοδος. Με εξαίρεση τους οίνους, για την αυθεντικότητα των οποίων εφαρμόζεται ο προσδιορισμός των σταθερών ισωτόπων του δευτερίου, του άνθρακα και του οξυγόνου που αποτελεί νομοθετική υποχρέωση των Κρατών και διέπεται από τον Κανονισμό 555/2008. Αυτό προϋποθέτει τη δημιουργία Κοινής Ιστοτοπικής Τράπεζας, η οποία δημιουργείται με το συντονισμό του Κοινού Κέντρου Ερευνών της ΕΕ, ενώ παράλληλα το κάθε Κράτος-Μέλος δημιουργεί τη δική του εθνική βάση δεδομένων.

Εφαρμόζονται οι φασματοσκοπικές τεχνικές SNIF-NMR και IR-MS και τα αποτελέσματα αναλύονται στατιστικά με τη χρήση διαφόρων τεχνικών της χημειομετρίας. Με κατάλληλη τροποποίηση της πιο πάνω μεθοδολογίας, οι ερευνητές προχώρησαν στη μελέτη των ιστοτοπικών λόγων και σε άλλα τρόφιμα και ποτά όπως οι χυμοί και το μέλι. Βασική προϋπόθεση, ο προηγούμενος χαρακτηρισμός αυθεντικών δειγμάτων ίδιας γεωγραφικής προέλευσης και ίδιας πρώτης ύλης.

Σύμφωνα με το «Food Authenticity Issues and Methodologies, European Commission, 1998»:



Φασματοσκοπία SNIF-NMR

Η μέθοδος SNIF-NMR βασίζεται στην παρατήρηση του δευτερίου, λόγω του φυσικού ισοτοπικού διαχωρισμού του, σαν συνάρτηση του μεταβολισμού των φυτών και του γεωκλιματικού περιβάλλοντός τους. Είναι ο υπολογισμός των ισοτοπικών λόγων $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$ και R στις δύο θέσεις του μορίου της αιθανόλης, μέσω της παραλαβής του φάσματος NMR με τη χρήση εσωτερικού προτύπου γνωστού ισοτοπικού λόγου.

Η ισοτοπική αναλογία του δευτερίου στο μεθύλιο της αιθανόλης $(D/H)_I$ χαρακτηρίζει κυρίως το φυτικό είδος που έχει συνθέσει το σάκχαρο (από το οποίο πάρθηκε η αιθανόλη) και σε μικρότερο βαθμό τη γεωγραφική θέση του τόπου συγκομιδής (φύση του ύδατος που χρησιμοποιήθηκε κατά τη φωτοσύνθεση). Η ισοτοπική αναλογία του δευτερίου στο μεθυλένιο της αιθανόλης $(D/H)_{II}$ αντιπροσωπεύει τα κλιματολογικά χαρακτηριστικά του τόπου παραγωγής (φύση των ομβρίων υδάτων και μετεωρολογικές συνθήκες) και σε μικρότερο βαθμό τη συγκέντρωση του σακχάρου στα κρασιά. Τέλος, η αναλογία $R = 2(D/H)_{II} / (D/H)_I$, εκφράζει τη

σχετική κατανομή του δευτερίου στις θέσεις I και II. Η παράμετρος R μετράται απ' ευθείας από την ένταση h των σημάτων στα επιμέρους φάσματα, οπότε: $R = 3h_{II} / h_I$.

Κατά την φωτοσύνθεση, η αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα από τα φυτά γίνεται με δύο βασικούς τύπους μεταβολισμού α) τον C3 κύκλο και β) τον C4 κύκλο. Σάκχαρα από C3 παρουσιάζουν αυξημένη φυσική αφθονία σε D (σακχαρότευτλα, μήλα, σταφύλι) ενώ σάκχαρα από C4 έχουν μειωμένη ποσότητα σε D (σακχαροκάλαμο, καλαμπόκι).

Επίσημα, η μέθοδος εφαρμόζεται προς το παρόν μόνο για την ανάλυση των οίνων και μπορεί να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για σύγκριση αγνώστων ύποπτων δειγμάτων με αυθεντικά. Παράλληλα, γίνεται τροποποίηση της μεθοδολογίας από τους ερευνητές, για την εφαρμογή της και σε άλλα είδη τροφίμων και ποτών.

Φασματοσκοπία IR-MS

Ο ισοτοπικός λόγος του $^{13}C/^{12}C$ και του $^{18}O/^{16}O$ από 2 διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού, σε συνδυασμό με τις πληροφορίες που λαμβάνονται με την τεχνική SNIF-NMR, χαρακτηρίζουν τη βοτανική προέλευση των σακχάρων στην αλκοόλη και του νερού αντίστοιχα, μετά από τη δημιουργία των σχετικών βάσεων δεδομένων.

Τα προϊόντα που προέρχονται από τα φυτά του C4 κύκλου (σακχαροκάλαμο, ισογλυκόζη αραβόσιτου) παρουσιάζουν υψηλότερες περιεκτικότητες σε ^{13}C από εκείνες των ομολόγων τους που προέρχονται από τα φυτά του C3 κύκλου (σταφύλι, σακχαρότευτλο).

Η κύρια πηγή του οξυγόνου στα φυτά είναι το ατμοσφαιρικό οξυγόνο που αφομοιώνεται κατά τη φωτοσύνθεση και το νερό του εδάφους ως αποτέλεσμα των κλιματολογικών συνθηκών (βροχή, χιόνι κλπ). Η ισοτοπική τιμή του νερού του εδάφους επηρεάζεται άμεσα από τις καιρικές συνθήκες και τη γεωγραφική θέση (γεωγραφικό πλάτος, γεωγραφικό μήκος και απόσταση από τη θαλάσσια ακτή). Επιπλέον, κατά τη διαδικασία της διαπνοής και της φωτοσύνθεσης που γίνεται την περίοδο τής ωρίμανσης των καρπών, εμπλουτίζεται ο ισοτοπικός διαχωρισμός τόσο του οξυγόνου, όσο και του υδρογόνου στα φυτά και στα φρούτα. Ως αποτέλεσμα των πιο πάνω, η τιμή του $\delta^{18}O$ του νερού επηρεάζεται από τις γεωκλιματικές συνθήκες.

Συμπερασματικά, η εφαρμογή των σταθερών ισοτόπων (με SNIF-NMR και IR-MS) μπορεί να οδηγήσει στην πιστοποίηση της προέλευσης τροφίμων και ποτών, τόσο βοτανική όσο και γεωγραφική. Τα μοναδικά τους χαρακτηριστικά οδηγούν στην κατοχύρωσή τους, ενώ η διαταραχή των λόγων τους αποτελεί ένδειξη νοθείας.

Απαραίτητες πληροφορίες κατά τη δειγματοληψία

Καθώς οι τιμές των ισοτοπικών λόγων έχουν άμεση επίδραση από τις γεωκλιματικές συνθήκες, είναι απαραίτητη κατά τη δειγματοληψία η συλλογή σχετικών πληροφοριών για το περιβάλλον παραγωγής της πρώτης ύλης (π.χ. ποικιλία, ηλικία και είδος εδάφους του αμπελώνα, θερμοκρασία και βροχόπτωση κατά τη συγκομιδή, γεωγραφικές συντεταγμένες, υψόμετρο κ.ά.) καθώς και τυχόν ιδιαιτερότητες κατά τη διαδικασία παραγωγής (μέθοδος, αποθήκευση, παλαίωση κ.ά.) οι οποίες συμβάλλουν στην εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων για άγνωστα/ ύποπτα δείγματα. Επίσης, είναι σημαντική η προσκόμιση της δήλωσης του παραγωγού ή της ετικέτας αν πρόκειται για συσκευασμένα είδη.

Σε πρώτη φάση και μέχρι τη δημιουργία της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων για την καταχώρηση των δεδομένων, είναι απαραίτητη η συμπλήρωση του σχετικού εντύπου δειγματοληψίας.

Χημειομετρική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα που θα προκύψουν από τους ισοτοπικούς χαρακτηρισμούς, σε συνδυασμό και με άλλα αριθμητικά αποτελέσματα και πληροφορίες, θα αναλυθούν στατιστικά για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων ως προς την αυθεντικότητα των προϊόντων.

Αναμενόμενες βάσεις δεδομένων που θα δημιουργηθούν

Η εφαρμογή των πιο πάνω μεθόδων σε γηγενείς ποικιλίες οίνων και η πιλοτική εφαρμογή σε άλλα είδη τροφίμων, θα οδηγήσει σε δεδομένα τα οποία θα μπορούν να εμπλουτιστούν και αναμένεται να δημιουργήσουν βάσεις δεδομένων αυθεντικών τοπικών οίνων/οινικών προϊόντων (ξύδι, σουτζούκος), αλκοολούχων ποτών, μελιού, νερού, χυμών φρούτων, γαλακτοκομικών προϊόντων κ.ά. Οι αναμενόμενες βάσεις δεδομένων που θα προκύψουν, θα περιλαμβάνουν αυθεντικά δείγματα από την Κύπρο και τα νησιά του Βορείου Αιγαίου και θα μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμο εργαλείο για τους αρμόδιους φορείς ελέγχου, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στον εμπλουτισμό των φακέλων για την κατοχύρωσή τους.

2.3. Μικροβιακό αποτύπωμα

Η ανάπτυξη των τεχνολογιών high-throughput sequencing (ή next generation sequencing—NGS), έχει επιτρέψει την ταξινομική και φυλογενετική αναγνώριση, καθώς και τη μελέτη της αφθονίας σε βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών που αποικούν ποικίλα μικροπεριβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων και των τροφίμων, την οποία οι υπάρχουσες τεχνολογίες καθιστούσαν ελλειμματική. Η εφαρμογή τους αποτελεί μια οικονομικά αποδοτική μέθοδο ταυτόχρονου πολλαπλασιασμού περίπου 250 δειγμάτων σε ένα πείραμα, παρέχοντας επίσης τη δυνατότητα αναγνώρισης ειδών που οι υπάρχουσες μέθοδοι ανάλυσης του μικροβιώματος αδυνατούσαν να εντοπίσουν. Οι τεχνολογίες αυτές στηρίζονται στην ενίσχυση καλά συντηρημένων γονιδιακών περιοχών των μικροβίων, οι οποίες παρεμβάλλονται από υπερμεταβαλλόμενες περιοχές, με τη μέθοδο της PCR. Η μετέπειτα αλληλούχιση των συγκεκριμένων περιοχών επιτρέπει την αναγνώριση των μικροβίων ενός δείγματος. Μετέπειτα, οι αλληλουχίες χωρίζονται ταξινομικά σε Operational Taxonomic Units (OTU), οι οποίες αναγνωρίζονται με τη βοήθεια γνωστών βάσεων δεδομένων.

Η χρήση της πλατφόρμας αλληλούχισης MiSeq (η οποία παρέχεται από την Illumina) υπερβαίνει προηγούμενους τεχνικούς περιορισμούς των υπαρχόντων μεθόδων αλληλούχισης, συμπεριλαμβανομένης της αδυναμίας ταξινομικής και φυλογενετικής αναγνώρισης διαφόρων μικροβίων εξαιτίας του μικρού μεγέθους των τμημάτων που ενισχύονται και της χαμηλής ποιότητας των αλληλουχιών που προκύπτουν. Η ταυτόχρονη ανάγνωση του γονιδίου και από τις δύο κατευθύνσεις (paired-end sequencing), έχει επιτρέψει τη μείωση του ποσοστού των λαθών της αλληλούχισης σε 1 στις 1000 βάσεις, με αποτέλεσμα να προκύπτουν υψηλής ποιότητας αλληλουχίες. Ταυτόχρονα, παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αλληλουχιών, με μέγιστη απόδοση μέχρι και 80,000 πλήρους μεγέθους 16S rRNA γονιδιακές αλληλουχίες, με τη χρήση του 600 cycle MiSeq v3 kit, με μεγάλο αριθμό εξειδίκευσης (>99.999%).

Αλληλούχιση βακτηρίων

Για την ταξινομική αναγνώριση των βακτηρίων ενός τροφίμου χρησιμοποιείται το γονίδιο 16S rDNA το οποίο αποτελείται από εννιά υπερμεταβαλλόμενες περιοχές (V1-V9), ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλονται συντηρημένες περιοχές. Η ύπαρξη των περιοχών αυτών επιτρέπει την δημιουργία εκκινήτων, οι οποίοι στοχεύοντας τις συντηρημένες περιοχές,

ενισχύουν τις υπερμεταβαλλόμενες περιοχές, επιτρέποντας την μετέπειτα αλληλούχισή της και την αναγνώριση της σχετικής αφθονίας των βακτηρίων που υπάρχουν σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Το πλήρες μέγεθος του 16S rRNA γονιδίου αποτελείται από περίπου 1,500 ζεύγη βάσεων. Ωστόσο, με τη χρήση της μεθόδου PCR μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση μόνο ενός τμήματος του γονιδίου 16S rRNA, της τάξης των 100 μέχρι 600 βάσεων και στη συνέχεια να διαβαστεί με την πλατφόρμα MiSeq. Οι πιο κοινοί εκκινητές που εφαρμόζονται συμπεριλαμβάνουν τους: F27-R534, F9-R534 (στοχεύουν την V1-V3 περιοχή), οι F515-R926 (στοχεύουν την V4-V5 περιοχή) and οι F357-R926 (στοχεύουν την V3-V5 περιοχή). Το τμήμα Γεωπονικών Επιστημών Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου έχει επιλέξει την εφαρμογή των εκκινητών που στοχεύουν τις συντηρημένες αλληλουχίες που επιτρέπουν την ενίσχυση της V3-V4 υπερμεταβαλλόμενης περιοχής, οι οποίοι προτείνονται από την illumina και έχουν εφαρμοστεί αξιόπιστα σε ποικίλες μελέτες ανάλυσης του μικροβιώματος των τροφίμων.

Αλληλούχηση μυκήτων

Για την ταξινομική αναγνώριση της βιοποικιλότητας των μυκήτων που εντοπίζονται σε ένα τρόφιμο χρησιμοποιούνται το γονίδιο *18S rDNA*, η περιοχή D1-D2 του γονιδίου *26S rRNA* και η Internal Transcribed Spacer (*ITS*). Κυρίως, χρησιμοποιείται η *ITS* περιοχή που παρεμβάλλεται μεταξύ της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας και της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας (rRNA) του ριβοσώματος. Περιλαμβάνει τις περιοχές *ITS1* και *ITS2*, ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλεται το γονίδιο *5.8S*, και εντοπίζεται ανάμεσα στα γονίδια *18S* (SSU) και *28S* (LSU) στην επαναλαμβανόμενη υπομονάδα rDNA. Ωστόσο, ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων της περιοχής *ITS* ανά κύτταρο (μέχρι και 250 αντίγραφα) καθιστά δύσκολη την εκτίμηση της σχετικής αφθονίας των μυκήτων που εντοπίζονται σε ένα δείγμα, περιορίζοντας την ακρίβειά της ανάλυσης σε δείγματα όπου η ποσότητα του DNA είναι χαμηλή. Το μέγεθος ολόκληρης της περιοχής *ITS* κυμαίνεται μεταξύ 450 και 700 ζεύγη βάσεων. Επομένως με τη χρήση της πλατφόρμας MiSeq είναι δυνατή η αλληλούχηση μόνο της περιοχής *ITS1* ή *ITS2*. Συνεπώς, για την ακριβέστερη εκτίμηση της σχετικής αφθονίας των μυκήτων που υπάρχουν σε ένα δείγμα συνεισάται η χρήση συνδυασμού ζευγών εκκινητών, οι οποίοι να στοχεύουν τόσο την γονιδιακή περιοχή *ITS1* ή *ITS2* όσο και την περιοχή *18S rRNA genes*.

Επίπεδα πληροφορίας αναφορικά με το μικροβίωμα

Για κάθε προϊόν που συλλέγεται θα πρέπει να υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά του προϊόντος, την γεωγραφική του προέλευση (φωτογραφία από δορυφόρο) και τη σχετική αφθονία των μικροβίων του. Πχ. Αιγινό γάλα, Ανώγυρα. Για την αναπαράσταση της σχετικής αφθονίας των μικροβίων θα πρέπει δημιουργηθούν πίνακες οι οποίοι να δείχνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές (p value & mean representation 1 compare to mean representation 2, 3, 4) σε επίπεδο οικογένειας, γένους και είδους (family, genus and species level). Παράλληλα, μπορούν να δημιουργηθούν πίνακες ή/και ραβδογράμματα (bar charts) να δείχνουν σε κάθε περίπτωση σε τι σχετική αφθονία (relative abundance) εντοπίζεται το βασικό μικροβίωμα (core microbiome), σε κάθε δείγμα.

3. Συμπληρωματικά κριτήρια (βιοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά προϊόντων)

Σε ορισμένες περιπτώσεις θα μπορούσαν συμπληρωματικά να προστεθούν και φυσικοχημικές αναλύσεις με τη βοήθεια χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης, υγρής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και αέριας χρωματογραφίας. Οι παραπάνω αναλύσεις προσφέρουν μετρήσεις σχετικές με ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως σάκχαρα και δευτερογενείς μεταβολίτες που σχετίζονται με το άρωμα και τη γεύση ή και την υψηλή διατροφική ποιότητα ενός προϊόντος. Τέτοιες αναλύσεις περιλαμβάνουν:

- Πρωτεϊνικές αναλύσεις: βασίζονται σε ανοσολογικές μεθόδους, ηλεκτροφορητική και χρωματογραφική ανάλυση πρωτεϊνών.
- Μεταβολομικές αναλύσεις: βασίζονται στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC), στην αέρια χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (HPLC), στην αέρια χρωματογραφία (GS), στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (Nuclear magnetic resonance) (NMR) και Φασματομετρία Μαζών (Mass spectrometry) (MS).
- Υπολογισμός διατροφικής αξίας μετά από διάφορες αναλύσεις σύστασης (π.χ. υγρασία, λίπος, τέφρα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και διαιτητικές ίνες).
- Αναλύσεις μετάλλων (π.χ. ασβέστιο, κάλιο, νάτριο, μαγνήσιο, φωσφόρος, χαλκός, σίδηρος, μαγγάνιο και ψευδάργυρος), καθώς και βαρέων μεττάλλων (π.χ. κάδμιο, μόλυβδος, υδράργυρος) που χαρακτηρίζουν το έδαφος.

Τέλος, η φασματοσκοπία υπεράθρου FT-IR ή/και FT-NIR όπου εφαρμόζεται, μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο, γρήγορο εργαλείο ενδεικτικό της αυθεντικότητας των προς μελέτη προϊόντων, ικανό να χρησιμοποιηθεί ως πρώτο “screening” πριν από την εφαρμογή των ισοτοπικών τεχνικών. Η μέθοδος χρήζει μελέτης για την εφαρμογή της ανά είδος, ώστε να αναπτυχθεί το φασματοσκοπικό προφίλ για το αντίστοιχο αυθεντικό προϊόν. Ως φθηνή και μη καταστροφική, εφαρμόζεται σε πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, κυρίως με την τεχνική ATR, που αποδείχθηκε ικανή για τη διάκριση του παραδοσιακού αυθεντικού προϊόντος ζιβανία, από το φθηνό υποκατάστατο “eau-de-vie”, καθώς και κυπριακών χαρουπιών από μη κυπριακών.

4. Χωρική διάσταση εφαρμογής των βασικών και συμπληρωματικών κριτηρίων

Όσον αφορά στη χωρική διάσταση της εφαρμογής των βασικών κριτηρίων ταυτοποίησης της αυθεντικότητας των αγροτικών προϊόντων θα πρέπει να τονιστεί η ανάγκη για τη συλλογή δειγμάτων από περισσότερες από μια περιοχές και κατά το δυνατών απομακρυσμένες. Ιδανικά θα πρέπει να συλλεχθούν δείγματα από 3 τουλάχιστον περιοχές για κάθε είδος, ποικιλία ή προϊόν και φυσικά περισσότερα από ένα δείγματα ανά περιοχή. Με τη μεθοδολογία αυτή είναι δυνατή η αντιπροσωπευτική ανάλυση και καταγραφή της ποικιλότητας. Η καταγραφή αυτή είναι απαραίτητη για την πλήρη ταυτοποίηση ενός είδους, ποικιλίας ή προϊόντος και η απόδοση της μοριακής ταυτότητάς του έτσι ώστε να μπορεί να δοθεί το σήμα του πιστοποιημένου αυθεντικού προϊόντος. Σε περίπτωση που το είδος, ποικιλία ή προϊόν βρίσκεται σε μια μόνο τοποθεσία τότε η έλλειψη πρέπει να αντισταθμίζεται από μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων από την μία μοναδική περιοχή.

Η συλλογή δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται με τρόπο συστηματικό, έτσι ώστε να επιτευχθεί η απαιτούμενη γεωγραφική κάλυψη των περιοχών παραγωγής των δειγμάτων σε αντιπροσωπευτικό επίπεδο και αριθμό. Προκειμένου να υπάρξει αντιπροσωπευτική ανάλυση και καταγραφή της μικροβιακής βιοποικιλότητας, διαφορών στο γενετικό υπόβαθρο, καθώς και στο ισοτοπικό προφίλ, κατά τη συλλογή δειγμάτων πρέπει να συμπεριληφθούν τουλάχιστον τρεις επαρχίες της Κύπρου ή τρία πιθανά διαφορετικά «terroir», στην περίπτωση των κρασιών και των ελιών. Επιπρόσθετα, απαιτείται η συλλογή περισσότερων του ενός δειγμάτων από κάθε περιοχή, προκειμένου να διαπιστωθούν διαφορές στη βιοποικιλότητα, οι οποίες να πηγάζουν

από την άσκηση διαφορετικής επιλεκτικής πίεσης στο μικροβίωμα ή να οφείλονται σε διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο. Στους πίνακες που ακολουθούν θα συμπληρωθούν οι αντίστοιχες πληροφορίες για τη συλλογή δειγμάτων. Στις περιπτώσεις που η φύση των δειγμάτων το επιτρέπει, θα ακολουθήσει επαναληπτική δειγματοληψία σε επόμενη φάση καρποφορίας/ παραγωγής.

A. Γάλατα:

Πίνακας 1: Δείγματα γάλακτος που θα συλλεχθούν στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”.

Κωδικός δείγματος	Προέλευση γάλακτος	Φυλή	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Περιοχή	Αριθμός δειγμάτων	Περίοδος δειγματοληψίας

Όλα τα δείγματα θα συλλέγονται με τη συγκατάθεση των γαλακτοπαραγωγών. Στην παρούσα μελέτη δεν εμπλέκονται ζώα, παρά μόνο ζωικά προϊόντα. Κατά τη συλλογή δειγμάτων θα πρέπει να καταγράφονται ο κωδικός του προϊόντος, η περιοχή δειγματοληψίας, η ημερομηνία δειγματοληψίας, ο τύπος του δείγματος, η ημερομηνία παραγωγής του προϊόντος, ο παραγωγός, αν έγινε πρόσφατη χρήση αντιβιοτικών και ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή δείγματος.

B. Χαλούμια – Τυριά:

Πίνακας 2: Δείγματα χαλουμιών που θα συλλεχθούν στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”.

Κωδικός δείγματος	Τύπος προϊόντος	Παραγωγός	Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία παραγωγής	Ημερομηνία λήξης	Αριθμός δειγμάτων	Περίοδος δειγματοληψίας

Κατά τη συλλογή δειγμάτων πρέπει να καταγράφονται ο κωδικός του προϊόντος, η περιοχή δειγματοληψίας, η ημερομηνία δειγματοληψίας, ο τύπος του δείγματος, η ημερομηνία παραγωγής και η ημερομηνία λήξης του προϊόντος, ο αριθμός παρτίδας, ο παραγωγός και τα συστατικά του προϊόντος.

Γ. Αλλαντικά:

Πίνακας 3: Δείγματα αλλαντικών (λουκάνικα, λούντζα, χοιρομέρι) που θα συλλεχθούν στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”.

Κωδικός δειγμάτων	Τύπος προϊόντος	Παραγωγός	Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία παραγωγής	Ημερομηνία λήξης	Αριθμός δειγμάτων

Κατά τη συλλογή δειγμάτων πρέπει να καταγράφονται ο κωδικός του προϊόντος, η περιοχή δειγματοληψίας, η ημερομηνία δειγματοληψίας, ο τύπος του δείγματος, η ημερομηνία παραγωγής και η ημερομηνία λήξης του προϊόντος, το Lot number, ο παραγωγός και τα συστατικά του προϊόντος.

Δ. Ελιές:

Πίνακας 4: Δείγματα ελιών (καρπός) που θα συλλεχθούν στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”.

Κωδικός δείγματος	Τύπος προϊόντος	Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Ημερομηνία έναρξης ζύμωσης	Αριθμός δειγμάτων

Κατά τη συλλογή των δειγμάτων πρέπει να καταγράφονται ο κωδικός του προϊόντος, η περιοχή δειγματοληψίας, η ημερομηνία δειγματοληψίας, ο τύπος του δείγματος, ο παραγωγός και η ημερομηνία έναρξης της ζύμωσης.

Ε. Κρασί:

Πίνακας 5: Δείγματα κρασιών και μούστου που θα συλλεχθούν στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”

Κωδικός δείγματος	Τύπος προϊόντος	Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Ποσοστό αλκοόλης με λήξη ζύμωσης	Αριθμός δειγμάτων

Κατά τη συλλογή δειγμάτων πρέπει να καταγράφονται ο κωδικός του προϊόντος, η περιοχή δειγματοληψίας, η ημερομηνία δειγματοληψίας, ο τύπος του δείγματος, ο παραγωγός και το ποσοστό αλκοόλης με τη λήξη της ζύμωσης.

Επιπροσθέτως, θα γίνει οινοποίηση αυθεντικών δειγμάτων από γηγενείς και διεθνείς ποικιλίες, στο πρότυπο οινοποιείο του Υπουργείου Γεωργίας της Κύπρου. Κάτω από σταθερές συνθήκες παραγωγής, θα μελετηθεί η επίδραση των ισοτοπικών λόγων του νερού και της αλκοόλης στο κυπριακό κρασί, ανάλογα με την ποικιλία και τη γεωγραφική θέση. Προγραμματίζεται επανάληψη της δειγματοληψίας τουλάχιστον κατά 30%.

Για όλα τα δείγματα θα πρέπει να συμπληρωθεί το έντυπο δειγματοληψίας και να ληφθούν οι γεωγραφικές συντεταγμένες, το υψόμετρο του αμπελώνα, η ηλικία, το έδαφος, η μέθοδος κλαδέματος και η δυνατότητα παραγωγής, καθώς και οι ιδιαιτερότητες κατά την οινοποίηση (πίεση σταφυλιών, φιλτράρισμα, προσθήκη θειώδους κ.ά.)

Πίνακας 6: Δείγματα αυθεντικών κρασιών (διαφόρων ποικιλιών) που θα συλλεχθούν στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”

α/α	Αρ. ΓΧΚ	Τύπος	Ποικιλία	Περιοχή

ΣΤ. Ξύδια:

Πίνακας 7: Δείγματα αυθεντικών ξυδίων για ανάπτυξη μεθοδολογίας.

A/A	Κωδικός ΓΧΚ	ΧΡΩΜΑ	Εμπορικό Όνομα

Z. Μέλια:

Πίνακας 8: Δείγματα εμπορικών μελιών των οποίων θα προσδιορισθούν οι ισοτοπικοί λόγοι στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”.

α/α	Αρ. ΓΧΚ	Εμπορική Ονομασία/ Περιγραφή

Η. Αλκοολούχα ποτά αποστάγματα:

Πίνακας 9: Αλκοολούχα ποτά – αποστάγματα που θα αναλυθούν στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”

α/α	Αρ. ΓΧΚ	Εμπορική Ονομασία/ Περιγραφή

Θ. Αγροτικά προϊόντα φυτικής προέλευσης:

Πίνακας 10: Δείγματα φυτικού υλικού αγροτικών προϊόντων που θα συλλεχθούν στα πλαίσια του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ”

Κωδικός δείγματος	Κατηγορία Προϊόντος	Είδος	Τοπική ονομασία	Περιοχή	Παραγωγός

5. Τεχνικές και μέσα λήψης και μεταφοράς δειγμάτων

5.1. Λήψη δειγμάτων

Η δειγματοληψία θα πρέπει να πραγματοποιείται με γάντια για την αποφυγή επιμόλυνσης και μεταφοράς μικροοργανισμών και φυτικού ιστού. Ιδιαίτερα σημαντικό κρίνεται, το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό, κάτι που εξαρτάται από την ομοιογένεια του προϊόντος, το μέγεθος του και την διακύμανση της παραμέτρου ελέγχου. Μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο θα πρέπει να χειρίζονται σε αποστειρωμένο πάγκο. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα εργαλεία. Εάν δεν είναι δυνατή η χρήση διαφορετικών εργαλείων για κάθε δείγμα τότε προτείνεται η ενδιάμεση των δειγμάτων απολύμανση με φλόγα. Τα δείγματα θα πρέπει να διατηρούνται κρύα και να μεταφέρονται το συντομότερο δυνατό σε θερμοκρασίες $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Στην περίπτωση που τα δείγματα συλλέγονται για RT-PCR θα πρέπει να γίνεται άμεση ψύξη και η μεταφορά τους να πραγματοποιείται με ξηρό πάγο, λόγω της εξαιρετικής ευαισθησίας του RNA σε ένζυμα παρόντα στο δείγμα.

5.2. Απαιτούμενος εξοπλισμός

- Γάντια
- Περιέκτες κατάλληλοι για την δειγματοληψία (σακούλες ή δοχεία αποθήκευσης), οι οποίοι όπου χρειάζεται πρέπει να είναι αποστειρωμένοι
- Δειγματολήπτες (πχ. Ψαλίδια, κλαδευτήρια, λαβίδες)
- Μέσα σήμανσης δείγματος (ιχνηλασιμότητα)
- Μέσα σφράγισης (όπου απαιτείται)

- Μέσα συντήρησης & μεταφοράς δείγματος (παγοκύστες, ισοθερμικά δοχεία, υγρό άζωτο)
- Πάγος

5.3. Προετοιμασία και φύλαξη δειγμάτων

Η φύλαξη των δειγμάτων όταν αυτά πρόκειται να αναλυθούν σύντομα, μπορεί να γίνει με ψύξη στους -20°C και μετέπειτα λειοτρίβηση με υγρό άζωτο ή λειοφυλλίωση. Εναλλακτικά μπορεί να γίνει άμεση ψύξη στο χωράφι σε υγρό άζωτο και μεταφορά στους -80°C . Επίσης δείγματα που είναι ήδη αποξηραμένα δεν χρειάζονται κάποια άλλη επεξεργασία και μπορούν να διατηρηθούν σε ένα δροσερό χώρο ή αν υπάρχει διαθέσιμο, σε ψυγείο και μετέπειτα λειοτρίβηση των δειγμάτων με υγρό άζωτο. Κάθε δείγμα θα πρέπει να αποθηκεύεται χωριστά και να έχει διακριτή ονομασία. Μετά την άφιξη των δειγμάτων στο εργαστήριο θα πρέπει να γίνεται μία καταγραφή σε μορφή αρχείου .xlsx.

Συλλογή δειγμάτων γάλακτος

Φρέσκα δείγματα γάλακτος πρέπει να συλλέγονται από την αίθουσα αρμέγματος τοποθετώντας αποστειρωμένη πιπέτα σε αποστειρωμένα 50 ml falcon tubes και να τοποθετούνται σε αποστειρωμένες σακούλες συλλογής δειγμάτων, και έπειτα μέσα σε ισοθερμικά κουτιά πολυστερίνης, τα οποία περιέχουν πάγο. Πάνω στα falcon tubes θα πρέπει να αναγράφεται το είδος του δείγματος, και η ημερομηνία συλλογής του δείγματος. Τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται εις διπλούν. Ακολούθως, να μεταφέρονται στον καταψύκτη του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, που βρίσκεται στο εργαστήριο επιστημών φυτικής παραγωγής 210, με θερμοκρασία -80°C μέχρι περεταίρω επεξεργασίας τους. Τέλος, θα πρέπει να υποβάλλονται σε διαδικασία freeze dry για να σταλούν στη Θεσσαλονίκη για περεταίρω επεξεργασία.

Συλλογή δειγμάτων χαλουμιών, τυριών και αλλαντικών

Σφραγισμένα δείγματα χαλουμιών και αλλαντικών θα πρέπει να συλλέγονται από τους παραγωγούς, είτε από την υπεραγορά και να τοποθετούνται μέσα σε ισοθερμικά κουτιά πολυστερίνης, τα οποία περιέχουν πάγο. Πάνω στα δείγματα πρέπει να αναγράφεται ο κωδικός του δείγματος. Τα δείγματα θα πρέπει να κόβονται σε κομμάτια 5-20 γρ, να τοποθετούνται σε αποστειρωμένες vacuum bags και να σφραγίζονται σε vacuum sealer. Ακολούθως, πρέπει να

μεταφέρονται στον καταψύκτη του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, που βρίσκεται στο εργαστήριο επιστημών φυτικής παραγωγής 210, με θερμοκρασία -80°C μέχρι περεταίρω επεξεργασίας τους. Όσα δείγματα θα σταλούν για επεξεργασία στη Θεσσαλονίκη πρέπει να τοποθετούνται σε ισοθερμικά κουτιά πολυστερίνης στα οποία περιέχεται ξηρός πάγος και στέλνονται με TNT-Fedex.

Συλλογή δειγμάτων ελιών

Όριμες ελιές θα συλλέγονται από της περιοχές παραγωγής τους μέσα σε αποστειρωμένες σακούλες συλλογής δειγμάτων, και έπειτα τοποθετούνται μέσα σε ισοθερμικά κουτιά πολυστερίνης, τα οποία περιέχουν πάγο. Πάνω στις σακούλες θα πρέπει να αναγράφεται το είδος του δείγματος, και η ημερομηνία συλλογής του δείγματος. Ακολούθως τα δείγματα θα μεταφέρονται στο ψυγείο του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, που βρίσκεται στο εργαστήριο επιστημών φυτικής παραγωγής 210, με θερμοκρασία 4°C μέχρι περεταίρω επεξεργασίας τους.

Ποσότητα ελιών θα πρέπει να τοποθετείται σε beaker 1L και να ξεπλένεται με τρεχούμενο νερό. Από τις ελιές επιλέγονται οι καθαρές μία-μία με το χέρι, απομακρύνοντας όσες δεν ήταν καλές. Όσων αφορά στις ελιές ποικιλίας Καλαμών η χάραξή τους γίνεται με κοφτερό μαχαίρι ή κοπίδι, κάνοντας τρεις χαραγματιές γύρω-γύρω, κατά μήκος της ελιάς και σε κλίση. Αναφορικά με τις τσακιστές ελιές, οι οποίες αφορούν στις ποικιλίες Κυπριακή και Πικουάλ, η μέθοδος που ακολουθείται είναι η εξής: Πάνω σε αποστειρωμένο με 70% αιθανόλη ξύλο κοπής τοποθετούνται 5-10 ελιές κάθε φορά. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πέτρα με επίπεδη επιφάνεια χτυπιέται το κρέας, και οι ελιές τσακίζονται ελέγχοντας τη δύναμη του χτυπήματος, ώστε να μην σπάσει το κουκούτσι. Δηλαδή σπάει η σάρκα τους ώστε να υπάρξει μια χαραγματιά συνήθως στο κέντρο, που θα επιτρέψει στο νερό και την άλμη αργότερα, να εισχωρήσουν και να αντιδράσουν με την ελιά, ώστε να την κάνουν βρώσιμη. Ακολούθως οι ελιές τοποθετούνται σε αλατόνερο συγκέντρωσης άλατος 20% και αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 120 ημέρες. Η συλλογή δείγματος πραγματοποιείται σε 3 χρονικά σημεία: α) Χρονικό σημείο 0, πριν από την επεξεργασία, β) χρονικό σημείο 60 ημερών από την τοποθέτηση στο αλατόνερο και γ) χρονικό σημείο 120 ημερών από την τοποθέτηση στο αλατόνερο.

Τα δείγματα ελιών θα τοποθετούνται σε αποστειρωμένες vacuum bags και σφραγίζονται σε vacuum sealer. Ακολούθως, θα μεταφέρονται στον καταψύκτη του τμήματος Γεωπονικών

Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, που βρίσκεται στο εργαστήριο επιστημών φυτικής παραγωγής 210, με θερμοκρασία -80°C μέχρι περεταίρω επεξεργασίας τους. Όσα δείγματα θα σταλούν για επεξεργασία στη Θεσσαλονίκη τοποθετούνται σε ισοθερμικά κουτιά πολυστερίνης στα οποία περιέχεται ξηρός πάγος και στέλνονται με TNT-Fedex.

Συλλογή δειγμάτων σταφυλιών

Δείγματα σταφυλιών θα πρέπει να συλλέγονται από της περιοχές παραγωγής τους μέσα σε αποστειρωμένες σακούλες συλλογής δειγμάτων, και έπειτα να τοποθετούνται χωρίς να πιέζονται μέσα σε ισοθερμικά κουτιά πολυστερίνης, τα οποία περιέχουν πάγο. Πάνω στις σακούλες θα πρέπει να αναγράφεται το είδος του δείγματος, και η ημερομηνία συλλογής του δείγματος. Ακολούθως τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται στο ψυγείο του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, που βρίσκεται στο εργαστήριο επιστημών φυτικής παραγωγής 210, με θερμοκρασία 4°C μέχρι περεταίρω επεξεργασίας τους.

Κατά τη διάρκεια του αλέσματος πιέζονται τα σταφύλια έτσι ώστε να επιτευχθεί το σπάσιμο των ράγων και να απελευθερωθεί ο χυμός, ο οποίος θα έρθει σε επαφή με τους σακχαρομύκητες που βρίσκονται στις φλούδες. Η πίεση να γίνεται με προσοχή, καθώς το υπερβολικό άλεσμα μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση ανεπιθύμητων αρωμάτων, ενώ το ανεπαρκές να καθυστερήσει την έναρξη και την ταχύτητα της ζύμωσης. Θα πρέπει να επιλέγονται μόνο οι ράγες για το άλεσμα και οι βόστρυχοι να απομακρύνονται. Τα αλεσμένα σταφύλια τοποθετούνται σε αποστειρωμένα γυάλινα μπουκάλια και επωάζονται στους 25°C (λευκά κρασιά) ή στους 20°C (κόκκινα κρασιά). Με τη διαπίστωση έναρξης καθώς και με τη λήξη της ζύμωσης δείγμα μούστου θα συλλέγεται και φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 5 λεπτά, προκειμένου να διαχωριστεί το κρασί από τις φλούδες και μεταφέρεται για καταμέτρηση του ποσοστού αλκοόλης στον Κλάδο Αμπελουργίας και Οινολογίας του Υπουργείου Γεωργίας. Δείγματα χυμού πριν από τη ζύμωση και μούστου με το τέλος της ζύμωσης θα μεταφέρονται στον καταψύκτη του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, που βρίσκεται στο εργαστήριο επιστημών φυτικής παραγωγής 210, με θερμοκρασία -80°C μέχρι περεταίρω επεξεργασίας τους. Όσα δείγματα θα σταλούν για επεξεργασία στη Θεσσαλονίκη υποβάλλονται σε διαδικασία freeze dry για να σταλούν στη Θεσσαλονίκη για περεταίρω επεξεργασία.

Συλλογή δειγμάτων αγροτικών προϊόντων φυτικής προέλευσης

- Συλλογή 8 – 10 δειγμάτων ανά είδος, για την ταυτοποίηση ειδών
- Συλλογή 15 δειγμάτων ανά είδος, για την ταυτοποίηση ποικιλιών
- Για κάθε δείγμα, συλλέγονται 5 γρ. ιστού από νεαρά φύλλα ενός φυτού
- Το κάθε δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό σακουλάκι το οποίο αριθμείται.
 - Για παράδειγμα, για τη ταυτοποίηση είδους "X" χρειάζεται φυτικός ιστός από 8 διαφορετικά φυτά, τα οποία τοποθετούνται σε 8 διαφορετικά σακουλάκια αριθμημένα από 1.1 έως 1.8.
- Τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται σε συνθήκες ψυγείου (4°C)
- Η αποστολή των δειγμάτων πρέπει να γίνεται, άμεσα, μέσα σε 1-2 μέρες με courier στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) στη Θεσσαλονίκη.

Συλλογή δειγμάτων που προορίζονται για ισοτοπικό χαρακτηρισμό

- **ΝΕΡΟ:** Συλλογή 20 τουλάχιστον δειγμάτων νερού (σε ποσότητα 10ml) από κάθε νησί, σε γυάλινο ή πλαστικό φιαλίδιο ερμητικά κλειστό.
- **ΚΡΑΣΙ & ΚΟΥΜΑΝΔΑΡΙΑ:** Συλλογή 20 τουλάχιστον συνολικά δειγμάτων κρασιού (σε ποσότητα 650ml) από τα νησιά, σε γυάλινο κατά προτίμηση μπουκάλι, ερμητικά κλειστό.
- **ΜΟΥΣΤΟΣ:** Συλλογή 20 τουλάχιστον συνολικά δειγμάτων μούστου (σε ποσότητα 650ml) από τα νησιά, σε γυάλινο κατά προτίμηση μπουκάλι, ερμητικά κλειστό.
- **ΞΥΔΙΑ:** Συλλογή 10 τουλάχιστον συνολικά δειγμάτων ξυδιού (σε ποσότητα 700ml) από τα νησιά, σε γυάλινο ή πλαστικό μπουκάλι, ερμητικά κλειστό.
- **ΜΕΛΙΑ:** Συλλογή 20 τουλάχιστον συνολικά δειγμάτων μελιού (σε ποσότητα 100ml) από τα νησιά, σε γυάλινο ή πλαστικό μπουκάλι, ερμητικά κλειστό
- **ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ:** Συλλογή 10 τουλάχιστον συνολικά δειγμάτων παραδοσιακών ποτών (σε ποσότητα 350 ml) από τα νησιά, κατά προτίμηση σε γυάλινο, ερμητικά κλειστό.

6. Πρωτόκολλα αναλύσεων και διαχείρισης δεδομένων

6.1. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικό ιστό θα ακολουθηθεί το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Doyle and Doyle (1987). Λειοτριβημένος φυτικός ιστός 100-200 mg τοποθετείται σε 1,5 ml Eppendorf παρουσία 800 μ L CTAB, β -mercaptoethanol (10 μ l/ 800 μ l CTAB), και 2 μ L RNase (10mg/ml). Έπειτα από έντονη ανακίνηση των δειγμάτων και επώασή τους στους 65° C για 40 λεπτά γίνεται φυγοκέντρηση στις 16000 rpm για 10 λεπτά και λήψη της υπερκείμενης φάσης σε 2 ml Eppendorf. Ακολούθως προστίθενται 800 μ l χλωροφορμίου και τα δείγματα ανακινούνται έντονα και φυγοκεντρούνται στις 7000 rpm για 20 λεπτά. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο 2 ml Eppendorf. Ο διαχωρισμός με χλωροφόρμιο επαναλαμβάνεται για ακόμα μία φορά και η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε 1,5 ml Eppendorf. Ακολουθεί κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και ακετικό νάτριο και τα δείγματα τοποθετούνται στους -20° C για 12 ώρες. Έπειτα, φυγοκεντρούνται στις 16000 rpm για 10 λεπτά και καθαρίζονται 2 φορές με 70% αιθανόλη. Τα δείγματα επαναδιαλύονται σε 100 μ L 1X TE και 2 μ L RNase (10mg/ml) και επωάζονται στους 37° C για περίπου 40 λεπτά. Εντέλει, η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων θα γίνει με τη μέθοδο μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του DNA (OD_{260}/OD_{280}) και η ποιότητά τους θα ελεγχθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

6.2. Ανάλυση DNA με τη μέθοδο του Γραμμωτού Κώδικα (DNA Barcoding)

Για την ανάλυση των δειγμάτων DNA με τη μέθοδο του γραμμωτού κώδικα θα πραγματοποιηθεί αρχικά η ενίσχυση της χλωροπλαστικής *trnL* και της πυρηνικής *ITS2* περιοχής με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Για την ενίσχυση των επιθυμητών αλληλουχιών θα ακολουθήσουμε τη παρακάτω αντίδραση:

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
KAPA Taq Buffer A 10X	1X
dNTPs (10mM)	0,2 mM
Forward Primer (10 μM)	0,2 μ M
Reverse Primer (10 μM)	0,2 μ M

SYTO™ 9 Green (INVITROGEN)	0,6 μl SYTO ανά 20 μl αντίδρασης
Ταq DNA Polymerase (KAPABIOSYSTEMS)	1 U
5U/μl	
DNA	20 ng
dH₂O	Μέχρι 20 μl τελικό όγκο

Οι συνθήκες πολυμερισμού θα είναι οι ακόλουθες:

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min:sec)	Κύκλοι
Αποδιάταξη	94	03:00	1
Αποδιάταξη	94	00:30	45
Υβριδισμός εκκινητών	55 (για trnL)/ 52 (για ITS2)	00:30	45
Επιμήκυνση	72	00:30	45
Επιμήκυνση	72	05:00	1

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιείται με τη χρήση του forward εκκινητή και του kit αλληλούχησης BigDye Terminator DNA (Applied Biosystems, Thermofisher, USA). Οι αλληλουχίες DNA αναλύονται σε μορφή χρωματογραφήματος με τη χρήση του προγράμματος BioEdit7 (Hall, 2011) και γίνεται *in silico* καθαρισμός τους. Η ταυτοποίηση των αλληλουχιών επαληθεύεται με τη χρήση του αλγορίθμου Blast στο NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Οι αλληλουχίες θα ομαδοποιηθούν ανά κατηγορία φυτικού-αγροτικού προϊόντος και θα στοιχηθούν με τη χρήση του προγράμματος MEGAX (Kumar et al., 2018). Επίσης, θα δημιουργηθούν και φυλογενετικά δενδρογράμματα με τη μέθοδο ομαδοποίησης "neighbor joining" (Saitou and Nei, 1987).

6.3 SNIF-NMR ανάλυση ισοτοπικών λόγων του δευτερίου

Ο προσδιορισμός των λόγων του δευτερίου με την τεχνική SNIF-NMR®, γίνεται στο μόριο της αλκοόλης, σύμφωνα με τον Κανονισμό 555/2008. Επομένως, αρχικά παραλαμβάνεται η

αλκοόλη μετά από απόσταξη του κρασιού (με χρήση του συστήματος απόσταξης ADCS, και αφού ελεγχθεί η καθαρότητά της με έμμεσο προσδιορισμό με Karl-Fisher ή με άμεσο προσδιορισμό με τη χρήση ηλεκτρονικού πυκνομέτρου 5 δεκαδικών και του λογισμικού “EURODENS”, προετοιμάζεται το σωληνάκι για μέτρηση στο μαγνήτη με χρήση του λογισμικού “PREPSAMP”. Σε αυτό τοποθετούνται 1.3 ml αποστάγματος αλκοόλης και 3.0 ml εσωτερικού προτύπου TMU και lock solution, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του φάσματος και τη σταθεροποίηση του πεδίου. Στη συνέχεια, το δείγμα εισάγεται στο μαγνήτη 400MHz και γίνεται η καταγραφή του φάσματος με χρήση του συστήματος “TOPSPIN”. Το αναλογικό φάσμα μετατρέπεται σε ψηφιακό και με τη χρήση ειδικού λογισμικού “EUROSPEC” γίνεται ο προσδιορισμός των ισοτοπικών λόγων.

Σημείωση: Αν πρόκειται για μέλια ή γλυκό κρασί ή χαρουπόμελο, τότε απαιτείται πρώτα η μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη, η οποία γίνεται με τη χρήση κατάλληλων ζυμομυκήτων.

6.4 Προσδιορισμός ισοτοπικής αναλογίας άνθρακα

Ο προσδιορισμός των λόγων του άνθρακα με την τεχνική ^{13}C -IRMS, γίνεται στο μόριο της αλκοόλης. Αφού παραληφθεί η αιθανόλη όπως περιγράφεται παραπάνω, στη συνέχεια εισάγεται στο φασματογράφο ισοτοπικής αναλογίας μαζών, με χρήση ειδικών καψιδίων. Ο λόγος των ισοτόπων $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ υπολογίζεται μετά από καύση και είναι ενδεικτικός της φωτοσύνθεσης από την οποία προήλθαν τα σάκχαρα.

6.5 Προσδιορισμός ισοτοπικής αναλογίας οξυγόνου

Ο προσδιορισμός των λόγων του οξυγόνου με την τεχνική ^{18}O -IRMS, γίνεται κατευθείαν στο νερό και στο νερό του κρασιού ή το χυμό ή το ξύδι. Ο δείγμα εισάγεται ως έχει στο φασματογράφο ισοτοπικής αναλογίας μαζών, με χρήση ειδικών σωληναρίων. Ο λόγος των ισοτόπων $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ υπολογίζεται στους 40°C , μετά από την αποκατάσταση ισορροπίας.

6.6 Χημειομετρική ανάλυση αποτελεσμάτων

Όλα τα αποτελέσματα εισάγονται στην Excel, λόγω της συμβατότητάς της με το ειδικό λογισμικό “SIMCA” Umetrics, το οποίο εφαρμόζει ειδικούς αλγόριθμους. Γίνεται ο τελικός

χαρακτηρισμός των δειγμάτων ανάλογα με τη συμπεριφορά τους σε ομάδες, δηλαδή με παρόμοιες ιδιότητες.

6.7 Πρωτόκολλο μεταγονιδιωματικής ανάλυσης

Η διαδικασία της απομόνωσης DNA των δειγμάτων θα πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο επιστημών φυτικής παραγωγής 210, του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, στον απαγωγό κάτω από ασηπτικές συνθήκες και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Δείγματα γάλακτος

Δείγμα γάλακτος 1 ml αναμειγνύεται με 9 ml 2% sodium citrate. Αφήνεται στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκεντρείται στις 13000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Η ανώτερη στιβάδα λίπους απομακρύνεται με αποστειρωμένα cotton tips και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Το DNA απομονώνεται/ εκχυλίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο ακόλουθο εγχειρίδιο χρήσης: DNeasy PowerFood Microbial Kit της κατασκευάστριας εταιρίας MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA, catalog number 21000-100, με την εξής τροποποίηση: Το pellet μετά από τη φυγοκέντρηση επαναδιαλύεται σε 450 µl Solution MBL και το εναιώρημα μεταφέρεται σε PowerBead Tube. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 65 °C και για 10 λεπτά στους 95 °C. Ακολούθως το DNA εκχυλίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Δείγματα τυριών - χαλουμιών

5 γρ. δείγματος τυριού αναμειγνύονται σε 45 ml 2% sodium citrate μέσα σε Sto-Circul-Bag stomacher bags και ομογενοποιούνται με τη βοήθεια stomacher στις 200 rpm για 2 λεπτά. Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 g για 10 λεπτά (ή στις 5500 για 30 λεπτά) στους 4°C. Η ανώτερη στιβάδα λίπους απομακρύνεται με αποστειρωμένα cotton tips και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Το DNA απομονώνεται/ εκχυλίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο ακόλουθο εγχειρίδιο χρήσης: DNeasy PowerFood Microbial Kit της κατασκευάστριας εταιρίας MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA, catalog number 21000-100, με την εξής τροποποίηση: Το pellet μετά από τη φυγοκέντρηση επαναδιαλύεται σε 450 µl Solution MBL και το εναιώρημα μεταφέρεται σε

PowerBead Tube. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 65 °C και για 10 λεπτά στους 95 °C. Ακολούθως το DNA εκχυλίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Δείγματα αλλαντικών

5 γρ. δείγματος αλλαντικών αναμειγνύονται σε 45 ml BPW μέσα σε stomacher bags. Ακολουθεί ομογενοποίηση σε stomacher στις 200 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA απομονώνεται/ εκχυλίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο ακόλουθο εγχειρίδιο χρήσης: DNeasy PowerFood Microbial Kit της κατασκευάστριας εταιρίας MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA, catalog number 21000-100, με την εξής τροποποίηση: Το pellet μετά από τη φυγοκέντρηση επαναδιαλύεται σε 450 μl Solution MBL και το εναιώρημα μεταφέρεται σε PowerBead Tube. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 65 °C και για 10 λεπτά στους 95 °C. Ακολούθως το DNA εκχυλίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Δείγματα ελιών

Η ομογενοποίηση δειγμάτων ελιών και η συλλογή των κυττάρων των μικροβίων πραγματοποιείται με τη χρήση αποστειρωμένου γουδιού και γουδοχέρη. Το DNA απομονώνεται/ εκχυλίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο ακόλουθο εγχειρίδιο χρήσης: DNeasy PowerFood Microbial Kit της κατασκευάστριας εταιρίας MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA, catalog number 21000-100, με την εξής τροποποίηση: Το pellet μετά από τη φυγοκέντρηση επαναδιαλύεται σε 450 μl Solution MBL και το εναιώρημα μεταφέρεται σε PowerBead Tube. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 65 °C και για 10 λεπτά στους 95 °C. Ακολούθως το DNA εκχυλίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Δείγματα κρασιών

Τα δείγματα μούστων φυγοκεντρώνται για 30 min στις 14 000 g, στους 4°C, και το υποκείμενο διαλύεται σε 2 ml TE buffer. Οι μούστοι φυγοκεντρώνται και πάλι για 15 λεπτά στις 14 000 g στους 4°C, και το υποκείμενο επαναδιαλύεται σε 300 μl TE buffer. Το DNA απομονώνεται/ εκχυλίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο ακόλουθο εγχειρίδιο χρήσης: DNeasy PowerFood Microbial Kit της κατασκευάστριας εταιρίας MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA, catalog number 21000-100, με την εξής τροποποίηση: Το pellet μετά από τη φυγοκέντρηση επαναδιαλύεται σε 450 μl Solution MBL και το εναιώρημα μεταφέρεται σε PowerBead Tube. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 65 °C και για 10 λεπτά στους 95 °C. Ακολούθως το DNA εκχυλίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε περίπτωση που

η εκχύλιση του DNA οδηγεί σε χαμηλή ποσότητα (μικρότερη από 10 ng/μl) ή χαμηλή ποιότητα (260/230 ratio μικρότερο από 1.9), η διαδικασία της εκχύλισης επαναλαμβάνεται προσθέτοντας μικρή ποσότητα rolivinilpirrolidone και αναδεύοντας το μούστο για 15 s, και επωάζοντας στους 60°C για 1 ώρα, προκειμένου να απομακρυνθούν οι τανίνες και πολυφαινόλες. Ακολουθώς προστίθονται από 1.1 μl μέχρι 100 μl β-mercaptoethanol για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών πριν από την εκχύλιση με τη χρήση του DNeasy PowerFood Microbial Kit.

7. Συνδυαστικό μοντέλο πολύ-κριτηριακής ανάλυσης

Τα κριτήρια για την ταυτοποίηση της αυθεντικότητας των τροφίμων περιλαμβάνουν, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, αναλύσεις σε επίπεδο ισοτόπων, πρωτεϊνών, μεταβολιτών και DNA. Μεμονωμένες οι ισοτοπικές, πρωτεϊνικές και μεταβολομικές αναλύσεις επηρεάζονται από το εκάστοτε καλλιεργητικό σύστημα και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, αλλά και από τις μεθόδους μεταποίησης. Αντίθετα, οι μέθοδοι που βασίζονται στην αλληλουχία του DNA, είναι περισσότερο αξιόπιστες ως προς την ταυτοποίηση αυθεντικότητας και της ιχνηλασιμότητας των βασικών συστατικών που εισέρχονται στην διατροφική αλυσίδα. Συνεπώς, ο συνδυασμός αυτών μπορεί να αποτελέσει ένα ισχυρό εργαλείο πολύ-κριτηριακής αξιολόγησης της αυθεντικότητας και την ανάδειξη της οικονομικής αξίας των τοπικών αγρο-προϊόντων Βορείου Αιγαίου και Κύπρου.

8. Έλεγχος και διασφάλιση ποιότητας

Ο έλεγχος ποιότητας αποτελεί κύριο βήμα κατά τη διαδικασία διασφάλισης της ποιότητας των μοριακών αναλύσεων ξεκινώντας από τη συλλογή των δειγμάτων από το χωράφι. Είναι σημαντικό η συλλογή των δειγμάτων να πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που περιγράφονται στο κεφάλαιο 5.

Σχετικά με τις μοριακές αναλύσεις:

- Οι επιφάνειες του εργαστηρίου θα πρέπει να είναι απολυμασμένες για την υδρόλυση πιθανόν επιμολύνσεων DNA.

- Όλος ο επαναχρησιμοποιήσιμος εξοπλισμός (πιπέτες, tips, racks) θα πρέπει να απολυμαίνεται με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) για τουλάχιστον 30 λεπτά μετά τη χρήση τους.
- Είναι αναγκαία η χρήση γαντιών και η συχνή αλλαγή τους για την αποτροπή επιμόλυνσης ενισχυμένου DNA και νουκλεάσες που βρίσκονται στο δέρμα μας και οδηγούν στην μετουσίωση του DNA.
- Οι πιπέτες θα πρέπει να προορίζονται αποκλειστικά για DNA ή RNA χρήση και να υπάρχουν διαφορετικές πιπέτες για πριν και μετά την ενίσχυση με PCR.
- Είναι αναγκαία η παροχή χωριστών χώρων αποθήκευσης δειγμάτων RNA και DNA, ενισχυμένο DNA, και PCR αντιδραστήρια.
- Καινούριοι μοριακοί δείκτες θα πρέπει να ελέγχονται με γνωστούς θετικούς ή αρνητικούς μάρτυρες πριν τη χρήση τους.
- Συχνή απόρριψη σκουπιδιών που περιέχουν ενισχυμένα προϊόντα DNA.
- Ποσοτικοποίηση του DNA

Τα απομονωμένα προϊόντα πρέπει να ποσοτικοποιούνται με τη χρήση σπεκτοφωτόμετρου για την διασφάλιση της ποσότητας και ποιότητας του DNA ή RNA.

- **Διερμηνευση των αποτελεσμάτων της PCR**

Η χρήση κατάλληλων δειγμάτων ελέγχου (controls) είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της ακεραιότητας των αποτελεσμάτων της

1. Ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις μπορεί να προκύψουν από μη επαρκή απομόνωση DNA, υπερβολική ποσότητα DNA, αναστολείς της PCR, ακατάλληλες συνθήκες PCR, ή ανθρωπογενές σφάλμα (π.χ. σφάλμα κατά την φόρτωση των δειγμάτων).
2. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από επιμόλυνση γειτονικών δειγμάτων ή από προϋπάρχοντα ενισχυμένα τμήματα DNA.

Σχετικά με τις ιστοπικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται, όλες είναι διαπιστευμένες.

Πίνακας: Συγκεντρωτικός πίνακας των αναλύσεων που θα πραγματοποιηθούν στο πλαίσιο του προγράμματος “ΑΓΡΟ-ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ” για τα αγροτικά προϊόντα Βορείου Αιγαίου και Κύπρου ανά κατηγορία και τύπο δείγματος.

Κατηγορία δείγματος	Ισότοπα	Μοριακή Ταυτοποίηση	Μεταγονιδιωματική	Τύπος δείγματος	Ποσότητα
Όινος	X		X	Όινος	650 ml
Μούστος	X		X	Μούστος	650 ml
Παραδοσιακά κρασιά-κουμανδαριά	X		X	Όινος	650 ml
Μέλι	X	(X)		Μέλι	100 ml
Ξύδι	X			Ξύδι	700 ml
Αλκοολούχα ποτά	X			Ποτό	350 ml
Ακρόδρυα		X		Φύλλα	5 γρ.
Αμπελόφυλλα		X		Φύλλα	5 γρ.
Αρωματικά φυτά		X		Φύλλα/Άνθη	5 γρ.
Εσπεριδοειδή		X		Φύλλα	5 γρ.
Όσπρια		X		Φύλλα/Καρποί	5 γρ.
Ακρόδρυα		X		Φύλλα/Καρποί	5 γρ.
Σιτηρά		X		Καρποί/αλεύρι	5 γρ.
Ελιές	X		X	Καρπός	5 γρ.
Αλλαντικά	X	X	X	Τρόφιμο	250 γρ.
Χαλούμια	X	X	X	Τρόφιμο	250 γρ.
Τυριά	X	X	X	Τρόφιμο	250 γρ.
Γάλατα	X		X	Τρόφιμο	250 ml

9. Βιβλιογραφία

- Álvarez, I., and Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 417–434. doi:10.1016/S1055-7903(03)00208-2.
- I Bosmali, SA Ordoudi, MZ Tsimidou, P Madesis (2017) Greek PDO saffron authentication studies using species specific molecular markers. *Food Research International* 100, 899-907
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N., et al. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 1889–1895. doi:10.1098/rstb.2005.1720.
- Christou C., Agapiou A. and Kokkinofta R., “Use of FTIR spectroscopy and chemometrics for the classification of carobs origin”, *Journal of Advanced Research, DOI, 10.1016/j.jare. 2017.*
- Corrado, G., Caramante, M., Piffanelli, P., and Rao, R. (2014). Genetic diversity in Italian tomato landraces: Implications for the development of a core collection. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 168, 138–144. doi:10.1016/j.scienta.2014.01.027.
- Corrado, G., Piffanelli, P., Caramante, M., Coppola, M., and Rao, R. (2013). SNP genotyping reveals genetic diversity between cultivated landraces and contemporary varieties of tomato. *BMC Genomics* 14. doi:10.1186/1471-2164-14-835.
- De Mattia, F., Bruni, I., Galimberti, A., Cattaneo, F., Casiraghi, M., and Labra, M. (2011). A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of Lamiaceae. *FRIN* 44, 693–702. doi:10.1016/j.foodres.2010.12.032.
- Distefano, G., Caruso, M., La Malfa, S., Gentile, A., and Wu, S.-B. (2012). High Resolution Melting Analysis Is a More Sensitive and Effective Alternative to Gel-Based Platforms in Analysis of SSR – An Example in Citrus. *PLoS One* 7, e44202. doi:10.1371/journal.pone.0044202.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987). Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf. 11–15.
- Fang, W., Meinhardt, L. W., Mischke, S., Bellato, C. M., Motilal, L., and Zhang, D. (2014). Accurate determination of genetic identity for a single cacao bean, using molecular markers with a nanofluidic system, ensures cocoa authentication. *J. Agric. Food Chem.* 62, 481–487. doi:10.1021/jf404402v.
- Faria, M. A., Magalhães, A., Nunes, M. E., and Oliveira, M. B. P. P. (2013). High resolution melting of trnL amplicons in fruit juices authentication. *Food Control* 33, 136–141. doi:10.1016/J.FOODCONT.2013.02.020.

- Ganopoulos, I., Argiriou, A., and Tsaftaris, A. (2011a). Adulterations in Basmati rice detected quantitatively by combined use of microsatellite and fragrance typing with High Resolution Melting (HRM) analysis. *Food Chem.* 129, 652–659. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.109.
- Ganopoulos, I., Argiriou, A., and Tsaftaris, A. (2011b). Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control* 22, 532–541. doi:10.1016/j.foodcont.2010.09.040.
- Ganopoulos, I., Madesis, P., Darzentas, N., Argiriou, A., and Tsaftaris, A. (2012). Barcode High Resolution Melting (Bar-HRM) analysis for detection and quantification of PDO “Fava Santorinis” (*Lathyrus clymenum*) adulterants. *Food Chem.* 133, 505–512. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2012.01.015.
- Ganopoulos, I., Tsaballa, A., Xanthopoulou, A., Madesis, P., and Tsaftaris, A. (2013). Sweet Cherry Cultivar Identification by High-Resolution-Melting (HRM) Analysis Using Gene-Based SNP Markers. *Plant Mol. Biol. Report.* 31, 763–768. doi:10.1007/s11105-012-0538-z.
- Ganopoulos, I. V., Avramidou, E., Fasoula, D. A., Diamantidis, G., and Aravanopoulos, F. A. (2010). Assessing inter- and intra-cultivar variation in Greek *Prunus avium* by SSR markers. *Plant Genet. Resour.* 8, 242–248. doi:10.1017/S1479262110000298.
- Hall, T. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bull. Biosci.* 2, 60–61. doi:10.1017/S0317167100012865.
- Kokkinofota R., Fotakis C., Zervou M, Zoumboulakis P., Savvidou C., Poulli K., Louka C., Econommidou N., Tzioni E., Damianou K., Loupasaki S. and Kefalas P., “Isotopic and Elemental authenticity markers: a case study on Cypriot wines”, *Food Analytical Methods*, 10.1007/s12161-017-0959-2, 2017.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- P Madesis, I Ganopoulos, I Bosmali, A Tsaftaris (2013) Barcode High Resolution Melting analysis for forensic uses in nuts: A case study on allergenic hazelnuts (*Corylus avellana*). *Food research international* 50 (1), 351-360
- Papaefstathiou E., Agapiou A., Giannopoulos S., Kokkinofota R., “Nutritional characterization of carobs and traditional carob products”, *Food Science & Nutrition*, 6(8), DOI, 10.1002/fsn3.776. 2018.

- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sim, S. C., van Deynze, A., Stoffel, K., Douches, D. S., Zarka, D., Ganai, M. W., et al. (2012). High-Density SNP Genotyping of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Reveals Patterns of Genetic Variation Due to Breeding. *PLoS One* 7, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0045520.
- Studer, B., Jensen, L. B., Fiil, A., and Asp, T. (2009). “Blind” mapping of genic DNA sequence polymorphisms in *Lolium perenne* L. by high resolution melting curve analysis. *Mol. Breed.* 24, 191–199. doi:10.1007/s11032-009-9291-x.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., et al. (2007). Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* 35. doi:10.1093/nar/gkl938.
- Wu, Y., Bhat, P. R., Close, T. J., and Lonardi, S. (2008). Efficient and Accurate Construction of Genetic Linkage Maps from the Minimum Spanning Tree of a Graph. *PLoS Genet* 4, 1000212. doi:10.1371/journal.pgen.1000212.

Παράρτημα Ι

ΥΠΟΔΕΙΓΜΑ ΕΝΤΥΠΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Α/Α Δείγματος:

Κατηγορία Προϊόντος:

- Γαλακτοκομικά τυροκομικά προϊόντα
 Οίνοι
 Μελισσοκομικά προϊόντα
 Όσπρια
 Σιτηρά
 Φρούτα/Καρποί – Δενδροκομία
 Αρωματικά φυτά – Αιθέρια έλαια
 Λάδι
 Ελιές
 Μαστίχα
 Αλκοολούχα ποτά/αποστάγματα
 Αλιεία/Υχθιοκαλλιέργειες
 Προϊόντα οικοτεχνίας (Ζυμαρικά/Αρτοσκευάσματα κλπ)
 Νερό
 Αναψυκτικά/χυμοί
 Αλλαντικά/Κρεατοσκευάσματα
 Άλλο _____

Τύπος δείγματος:

Εμπορικό δείγμα (τυποποιημένο)

Μη εμπορικό δείγμα / Διευκρινίστε (πχ καρπός, φύλλα).....

Θέση δειγματοληψίας:.....

Ημερομηνία δειγματοληψίας:

Περιγραφή/χαρακτηριστικά δείγματος (συμπλήρωση κατά περίπτωση)

- Γενική περιγραφή:
- Εμπορικό όνομα:
- Τύπος συσκευασίας:
- Ημερομηνία παραγωγής:
- Περιοχή καλλιέργειας/προέλευσης πρώτης ύλης:
- Βάρος δείγματος:
- Ποικιλία:
- Ιδιαιτερότητες παραγωγικής διαδικασίας (πχ βιολογικό):
- Άλλο:

Επωνυμία Επιχείρησης/Παραγωγού:

Στοιχεία επικοινωνίας:

Ο Εκπρόσωπος
επιχείρησης/Παραγωγός

Ο υπεύθυνος
δειγματοληψίας

.....

.....

Όνομ/νυμ

Όνομ/νυμο