



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΔΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τρόποι προσέγγισης ανάλυσης πραγματικών σειρών γενετικών-μοριακών
δεδομένων με χρήση διαφόρων στατιστικών λογισμικών

Παλαιοκώστας Χρήστος

ΒΟΛΟΣ 2007

**Τρόποι προσέγγισης ανάλυσης πραγματικών σειρών γενετικών-
μοριακών δεδομένων με χρήση διαφόρων στατιστικών λογισμικών**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.**
- **Δημήτριος Βαφείδης, Επίκουρος Καθηγητής, Βιοποικιλότητα Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση-έμμεση χρησιμότητά τους, Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.**
- **Γεώργιος Δήμου, Καθηγητής, Τοπολογία στη Διαφορική και Αλγεβρική Γεωμετρία, Ολική Ανάλυση και Εφαρμογές των Διαφορικών Εξισώσεων και Γραμμικής Άλγεβρας στον Προγραμματισμό, Υπολογιστές και Υπολογιστικές Μεθόδους, Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας και κυρίως τους γονείς μου για την ηθική και υλική συμπαράσταση, που χωρίς τη δική τους προσφορά και υπομονή δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί αυτό το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Βαφείδη και τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Δήμο για την πολύτιμη και αμέριστη βοήθεια τους, το χρόνο που μου αφιέρωσαν και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νέστορα Καπετάνιο και την κ. Βαλέρια Παπαγεωργίου για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την πορεία της παρούσας διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της γενετικής παραλλακτικότητας του αχινού *Paracentrotus lividus* και του ασκιδίου *Microcosmus sabatieri*. Δεδομένα των παραπάνω ειδών τα οποία προήλθαν χρησιμοποιώντας την τεχνική των RAPD αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας λογισμικά προγράμματα επεξεργασίας γενετικών δεδομένων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά GenAlex, TFPGA, PopGene, Phylip και Arlequin. Από τα παραπάνω λογισμικά υπολογίστηκαν η μέση ετεροζυγωτία, τα ποσοστά πολυμορφικών γενετικών τόπων, οι δείκτες γενετικής απόστασης και άλλοι δείκτες γενετικού πολυμορφισμού. Επιπλέον έγιναν AMOVA, exact test, neutrality test, homogeneity test, Mantel test και κατασκευάστηκαν δένδρογράμματα για το κάθε είδος. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι τα RAPD αποτελούν κατάλληλη τεχνική για την μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού στα παραπάνω είδη. Ο αχινός εμφάνισε μεγαλύτερα επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού και γονιδιακής ροής σε σχέση με το ασκίδιο γεγονός που συνηγορεί στην άποψη ότι ο αχινός αποτελεί πανμικτικό είδος, παρουσιάζοντας μικρές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών που εξετάστηκαν. Αντίθετα στο ασκίδιο εντοπίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπό εξέταση πληθυσμών, γεγονός το οποίο συνηγορεί στην άποψη ότι υπάρχουν διακριτοί πληθυσμοί του παραπάνω είδους οι οποίοι χρήζουν προσεκτικής διαχείρισης. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία και με το γεγονός ότι οι λάρβες του αχινού είναι πλαγκτοτροφικές, ενώ του ασκιδίου λεκιθοτροφικές.

Λέξεις Κλειδιά: RAPD, *Paracentrotus lividus*, *Microcosmus sabatieri*, γενετική απόσταση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	7
1.1 Μοριακές Τεχνικές για εύρεση γενετικής ποικιλομορφίας.....	9
1.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	10
1.1.2 Ηλεκτροφόρηση.....	11
1.2 Κατηγορίες Μοριακών Δεικτών	12
1.2.1 Αλλοένζυμα.....	15
1.2.2 Μιτοχονδριακό DNA.....	17
1.2.3 RFLPs.....	18
1.2.4 Μικροδορυφόροι.....	19
1.2.5 Πολυμορφισμοί απλών βάσεων.....	22
1.2.6 Μίνιδορυφόροι.....	24
1.2.7 RAPD.....	24
1.2.8 AFLPs.....	26
1.3 Βήματα στην επεξεργασία γενετικών δεδομένων.....	28
1.4 Στατιστικά μέσα και κατανομές πιθανοτήτων.....	29
1.4.1 Είδη στατιστικών.....	29
1.4.2 Κατανομές πιθανοτήτων στη γενετική.....	33
1.4.3 Έλεγχος υποθέσεων από στατιστικά τεστ.....	34
1.4.4 χ^2 τεστ.....	36
1.4.5 Χρήσιμες μέθοδοι επεξεργασίας δεδομένων.....	36
1.4.6 AMOVA.....	39
1.5 Τρόποι υπολογισμού γενετικής ποικιλομορφίας.....	40
1.5.1 Μέση ετεροζυγωτία.....	40
1.5.2 Μοντέλο Hardy-Weinberg.....	41
1.5.3 F-Statistics.....	44
1.5.4 Δενδρογράμματα.....	47
1.6 Breeding.....	48
1.7 Γενικά στοιχεία για αχινό (<i>Paracentrotus lividus</i>).....	50

1.8 Γενικά στοιχεία για ασκίδιο (<i>Microcosmus sabatieri</i>).....	52
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	54
2.1 Δειγματοληψία.....	54
2.2 Παραδοχές στην επεξεργασία δεδομένων.....	55
2.3 Επεξεργασία δεδομένων.....	56
2.3.1 GenAlex.....	56
2.3.2 TFPGA.....	57
2.3.3 PopGene.....	58
2.3.4 Phylip.....	59
2.3.5 Arlequin.....	59
3. Αποτελέσματα.....	60
3.1 Αχινός (<i>Paracentrotus lividus</i>).....	60
3.2 Ασκίδια (<i>Microcosmus sabatieri</i>).....	76
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	93
5. Βιβλιογραφία.....	104
6. Abstract.....	112

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στόχος οποιασδήποτε έρευνας είναι η συλλογή και ανάλυση πληροφοριών για όλα τα στοιχεία που θέλουμε να μελετήσουμε. Το σύνολο των στοιχείων αυτών αποτελούν τον πληθυσμό (population) της μελέτης. Για πρακτικούς λόγους είναι αδύνατη η συλλογή στοιχείων από ολόκληρο τον πληθυσμό, με συνέπεια να επιλέγετε ένα δείγμα (sample), δηλαδή ένα μέρος του πληθυσμού. Στη συνέχεια γίνεται στατιστική ανάλυση των πληροφοριών και με βάση τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης είναι δυνατή η γενίκευση και άντληση συμπερασμάτων για τον πληθυσμό.

Ο γενικός στόχος της στατιστικής είναι η παροχή αριθμών-τιμών που περιληπτικά περιγράφουν μία ή περισσότερες μεταβλητές ή τη σχέση μεταξύ δύο ή περισσότερων μεταβλητών. Αν οι αριθμοί αυτοί υπολογίζονται από δεδομένα του πληθυσμού, λέγονται παράμετροι (parameters). Όλες οι τιμές που υπολογίζονται από δεδομένα δείγματος λέγονται στατιστικά (statistics). Τα στατιστικά διαιρούνται σε δύο γενικές κατηγορίες: τα περιγραφικά στατιστικά (descriptive statistics) και τα επαγωγικά στατιστικά (inferential statistics). Τα περιγραφικά στατιστικά είναι οι τιμές ή οι δείκτες που αντιστοιχούν στις παραμέτρους, αλλά υπολογίζονται από δεδομένα του δείγματος. Τα επαγωγικά στατιστικά είναι οι τεχνικές και οι τιμές που χρησιμοποιούνται για να κάνουμε γενικεύσεις από τα περιγραφικά στατιστικά στις παραμέτρους.

Σύμφωνα με τους Allendorf & Luikart η γενετική μπορεί να οριστεί ως επιστήμη των πιθανοτήτων και της στατιστικής. Η γενετική εξετάζει τις

διαφορές μεταξύ ατόμων στο χώρο και στο χρόνο. Η ποικιλομορφία μεταξύ ατόμων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εξέλιξη. Η κλασική γενετική ανάλυση που βασίζεται σε συγκεκριμένα στελέχη αφορά τα αλληλόμορφα απλών γενετικών τόπων και στηρίζεται στην παραδοχή ότι ορισμένες αναλογίες είναι θεωρητικά αναμενόμενες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η πρόβλεψη των αναλογιών των γενοτύπων ή των αλληλόμορφων, δηλαδή οι γενοτυπικές ή γονιδιακές συχνότητες, στην επόμενη γενιά είναι απλές. Με τη μελέτη της γενετικής σύστασης πληθυσμών του ίδιου είδους και τους νόμους που ελέγχουν τις γενετικές αλλαγές από γενιά σε γενιά ασχολείται η Πληθυσμιακή Γενετική. Ορισμένες φορές καλύπτεται από τον όρο Εξελικτική Γενετική που αφορά κυρίως πληθυσμούς διαφορετικών ειδών. Τα στάδια από τα οποία περνάει ένας οργανισμός κατά τη διάρκεια της ζωής του (οντογένεση) δεν αποτελούν εξέλιξη. Εξελίσσεται ο πληθυσμός των ατόμων. Οι πληθυσμιακές αλλαγές αποτελούν εξέλιξη αν μπορούν να μεταβιβαστούν από μια γενεά στην άλλη μέσω των μηχανισμών της κληρονομικότητας.

Η μελέτη ενός πληθυσμού αρχίζει με την εξέταση των γενοτύπων και φαινοτύπων των μελών του. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη αλληλόμορφων, δηλαδή η ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας. Για να είναι δυνατή η γενετική περιγραφή ενός πληθυσμού πρέπει να είναι γνωστή η γενετική φύση και ο τρόπος κληρονόμησης των υπό εξέταση χαρακτήρων. Η πληθυσμιακή γενετική μέχρι και το μεγαλύτερο μέρος του 20^{ου} αιώνα περιοριζόταν σε είδη που μπορούσαν να παρατηρηθούν άμεσα στο εργαστήριο. Τα πειράματα πληθυσμιακής γενετικής αφορούσαν κυρίως είδη του γένους *Drosophila* και αφορούσαν κυρίως στον προσδιορισμό της γενετικής βάσης στην οποία οφείλονταν οι φαινοτυπικές διαφορές των

ατόμων. Μελέτες σε είδη με μεγάλο χρόνο αναπαραγωγής δεν ήταν δυνατές. Ωστόσο η πληθυσμιακή γενετική γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη από το 1960 και έπειτα χάρις σε βιοχημικές τεχνικές οι οποίες επέτρεπαν να μελετηθεί η γενετική ποικιλομορφία κατευθείαν από φυσικούς πληθυσμούς χωρίς να είναι απαραίτητος ο εγκλιματισμός των ειδών στο εργαστήριο και η αναμονή για μετέπειτα γενιές.

Στις μέρες μας οι μοριακές τεχνικές επιτρέπουν τη μελέτη διαφορών σε επίπεδο αλληλουχίας DNA για το κάθε είδος. Σε εξέλιξη βρίσκονται πολλά ερευνητικά προγράμματα που έχουν ως στόχο την αλληλούχιση ολόκληρου του γενώματος, για πολλούς οργανισμούς. Παρόλα αυτά ακόμα και αυτό το επίπεδο λεπτομέρειας δεν είναι σε θέση από μόνο του να παρέχει επαρκείς πληροφορίες για την κατανόηση της σημασίας της γενετικής ποικιλομορφίας σε φυσικούς πληθυσμούς. Η εξέλιξη πιστεύεται ότι λαμβάνει χώρα σταδιακά στους πληθυσμούς προκαλώντας βαθμιαίες μεταβολές στη μορφολογία, στη φυσιολογία και στη συμπεριφορά. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά συνήθως ελέγχονται από τον συνδυασμό πολλών γονιδίων και περιβάλλοντος ταυτόχρονα, κάνοντας ιδιαίτερα δύσκολο τον προσδιορισμό μεμονωμένων γονιδίων που συνεισφέρουν στην γενετική ποικιλομορφία μεταξύ ατόμων για τα περισσότερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν ενδιαφέρον.

1.1 Μοριακές Τεχνικές για εύρεση γενετικής ποικιλομορφίας

Τα τελευταία χρόνια εμφανίζονται με αυξανόμενο ρυθμό ολοένα και περισσότερες μοριακές τεχνικές με στόχο την εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας σε επίπεδο DNA. Προτού παρουσιαστούν αναλυτικά οι

μοριακές τεχνικές πρέπει να τονιστεί η σημασία δύο ανακαλύψεων, χωρίς τις οποίες δεν θα ήταν δυνατή καμιά από τις παρακάτω τεχνικές. Η ηλεκτροφόρηση και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

1.1.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η δυνατότητα χρησιμοποίησης μοριακών τεχνικών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ανακάλυψη της PCR. Η νέα τεχνική γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης διεκπεραιώνεται τελείως *in vitro* χωρίς να χρειάζονται κύτταρα. Με την τεχνική αυτή μια ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA που την περιέχει. Η PCR βασίζεται στη χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό ενός εκμαγείου DNA σε επανειλημμένους κύκλους αντιγραφής. Το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται να αντιγραφεί από βραχεία ολιγονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές (*primers*) τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας DNA. Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν πρέπει ο κύκλος αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί πολλές φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Διαχωρισμός των δύο κλώνων με θέρμανση του αντιδρώντος μίγματος στους 94 °C περίπου. Το αντιδρών μίγμα περιέχει το δίκλωνο DNA, τους εκκινητές, τους τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες και DNA πολυμεράση. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, έτσι ώστε

να μη μειώνεται η δράση της κατά τους διάφορους κύκλους εξαιτίας της θέρμανσης.

2. Ψύξη του μίγματος για να υβριδιστούν οι εκκινητές με τους δύο κλώνου. Η θερμοκρασία ψύξης είναι καθοριστική για την εξειδίκευση της μεθόδου, για αυτό η ακριβής θερμοκρασία (30-65 °C) και ο απαιτούμενος χρόνος ψύξης ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος της πολλαπλασιαζόμενης αλληλουχίας.
3. Θέρμανση του μίγματος στους 72 °C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της συγκεκριμένης πολυμεράσης, οπότε λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA.

Η PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη καθώς μπορεί να ανιχνεύσει έστω και ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, επαυξάνοντας το τόσο πολύ ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλη χρώση μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση πηκτής.

1.1.2 Ηλεκτροφόρηση

Όταν ένα ηλεκτρικό φορτίο εφαρμόζεται σε διάλυμα που περιέχει μόρια πρωτεϊνών, τότε τα μόρια θα μεταναστεύσουν σε μια ορισμένη κατεύθυνση και με ταχύτητα που αντανακλά το μέγεθος και το καθαρό φορτίο τους. Η αρχή αυτή αποτελεί τη βάση της τεχνικής που αναφέρεται ως ηλεκτροφόρηση. Η πιο απλή μορφή ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται σε πηκτική πολυακρυλαμίδης μιας διάστασης. Στην περίπτωση που το δείγμα περιλαμβάνει πολύπλοκα μείγματα πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η τεχνική της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε πηκτή.

Για την εξέταση μορίων DNA μετά το κόψιμο ενός μεγάλου μορίου DNA σε μικρότερα κομμάτια με τη χρησιμοποίηση μιας νουκλεάσης περιορισμού, τα κλάσματα του DNA πρέπει να διαχωριστούν το ένα από το άλλο. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή που διαχωρίζει τα κλάσματα με βάση το μήκος τους. Το μείγμα των κλασμάτων του DNA τοποθετείται στο ένα άκρο μιας λεπτής φέτας πηκτής αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης που περιέχει ένα μικροσκοπικό δίκτυο πόρων. Στη συνέχεια ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται διαμέσου της πηκτής. Επειδή το DNA έχει αρνητικό φορτίο, τα κλάσματα μεταναστεύουν προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Τα μεγαλύτερα κλάσματα μετακινούνται βραδύτερα, επειδή η πορεία τους παρακωλύεται από το στρώμα της αγαρόζης, σχηματίζοντας ζώνες. Για να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA πάνω στην πηκτή της αγαρόζης ή της πολυακρυλαμίδης, το DNA πρέπει με κάποιο τρόπο να σημανθεί ή να χρωσθεί. Μια ευαίσθητη μέθοδος χρώσης του DNA συνίσταται σε έκθεσή του σε μια χρωστική που προσδένεται στο DNA και φθορίζει κάτω από το υπεριώδες φως. Μια ακόμα πιο ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης περιλαμβάνει την ενσωμάτωση ενός ραδιοϊσοτόπου στα μόρια του DNA πριν από την ηλεκτροφόρηση.

1.2 Κατηγορίες μοριακών δεικτών (molecular markers)

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μοριακοί δείκτες που σχετίζονται με γονίδια γνωστής λειτουργίας, ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν αυτοί με τμήματα του γονιδιόματος για τα οποία δεν υπάρχουν πληροφορίες ως προς την λειτουργία τους και την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων.

Από τα παραπάνω στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται οι παρακάτω δείκτες:

- Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)
- RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- Αλλοένζυμα

Στη δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται οι παρακάτω δείκτες:

- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
- AFLPs
- Μικροδορυφόροι (Microsatellites)
- Μινιδορυφόροι (Minisatellites)
- SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

Πρέπει να σημειωθεί ότι ο παραπάνω διαχωρισμός δεν είναι απόλυτος π.χ σε ορισμένες περιπτώσεις οι Μικροδορυφόροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη γονιδίων γνωστής λειτουργίας οπότε θα ανήκαν στην πρώτη κατηγορία.

Αν και η σημασία των δεικτών της πρώτης κατηγορίας ήταν αναμφισβήτητη στην πληθυσμιακή γενετική η χρήση τους σε ζητήματα που παρουσίαζαν ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες ήταν αρχικά περιορισμένη. Σήμερα είναι πλέον ξεκάθαρο ότι αυτοί οι δείκτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι και σε αυτόν τον κλάδο και πιο συγκεκριμένα σε μελέτες που έχουν ως στόχο τα λεγόμενα QTL (Quantative Trait Loci), δηλαδή γενετικοί τόποι που ελέγχουν ποσοτικά χαρακτηριστικά (π.χ βάρος). Επίσης οι παραπάνω δείκτες βρίσκουν εφαρμογή σε μελέτες σύγκρισης γονιδιόματος, εξέλιξης του γονιδιόματος και αναγνώρισης γονιδίων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον.

Σε γενικές γραμμές οι δείκτες της δεύτερης κατηγορίας θεωρείται ότι συνήθως βρίσκονται σε μη κωδικοποιήσιμα τμήματα του DNA και άρα είναι ουδέτεροι ως προς τη φυσική επιλογή. Οι παραπάνω δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην πληθυσμιακή γενετική όπου αποτελούν τη βάση για την εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας είτε μέσα σε έναν πληθυσμό είτε μεταξύ πληθυσμών και εξακρίβωσης για αν παρατηρείται η ισορροπία Hardy-Weinberg. Επιπλέον οι παραπάνω δείκτες έχουν εφαρμογή όπως και οι αντίστοιχοι της πρώτης κατηγορίας σε προγράμματα εκτροφής (breeding studies) και σε μελέτες εξακρίβωσης του είδους εξεταζόμενων ατόμων. Είναι απαραίτητο να θυμάται κανείς ότι δεν υπάρχει κάποια τεχνική που να θεωρείται ότι δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις. Η καλύτερη τεχνική καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά της εκάστοτε έρευνας (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Εφαρμογές μοριακών δεικτών (Πηγή: Liu & Cordes 2004)

<i>Σκοπός έρευνας</i>	<i>Καταλληλότερη Τεχνική</i>	<i>Άλλες χρήσιμες τεχνικές</i>
Αναγνώριση είδους	RAPD	AFLP, Μικροδορυφόροι, Αλλοένζυμα
Αναγνώριση στελέχους (strain)	AFLP, Μικροδορυφόροι	RAPD
Αναγνώριση υβριδίων	RAPD	AFLP, Μικροδορυφόροι, mtDNA
Αναγνώριση γονέων	Μικροδορυφόροι	
Εξακρίβωση γενετικού πολυμορφισμού	AFLP, Μικροδορυφόροι	RAPD
Χαρτογράφηση γονιδιόματος (Genetic mapping)	Δείκτες της 1 ^{ης} κατηγορίας, Μικροδορυφόροι, SNP	AFLP, RFLP
Συγκρίσεις γονιδιομάτων (Comparative mapping)	Δείκτες της 1 ^{ης} κατηγορίας	Μικροδορυφόροι (από συντηρητικούς γενετικούς τόπους)

1.2.1 Αλλοένζυμα

Τα αλλοένζυμα είναι οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν. Είναι αλληλόμορφα ενός γενετικού τόπου, δηλαδή είναι οι διαφορετικές παραλλαγές της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί ένας γενετικός τόπος. Τα αλληλόμορφα παρατηρούνται εξαιτίας διαφορών στην αλληλουχία των αμινοξέων που αποτελούν την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι παραπάνω διαφορές αντικατοπτρίζουν διαφορές στην αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη. Οι διαφορές στα αμινοξέα των πρωτεϊνών έχουν πολλές φορές ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να κινούνται με διαφορετική

ταχύτητα στο gel ηλεκτροφόρησης, με συνέπεια να παρατηρούνται διακριτές μπάντες (αλληλόμορφα) στο gel.

Ο παρατηρούμενος πολυμορφισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον υπολογισμό της γενετικής ποικιλομορφίας, στη διάκριση ατόμων σε επίπεδο πληθυσμού, είδους και άλλων ταξινομικών μονάδων. Επίσης τα αλλοένζυμα βρίσκουν εφαρμογή σε μελέτες εξέτασης ενδογαμίας (inbreeding), αναγνώρισης διαφορετικών stock (σε ιχθυοτροφεία) και στις λεγόμενες parentage analysis (αναλύσεις για την εύρεση των γονιών ενός ατόμου).

Τα κυριότερα μειονεκτήματα της τεχνικής των αλλοενζύμων περιλαμβάνουν την εσφαλμένη σε πολλές περιπτώσεις έλλειψη ετεροζύγωντων εξαιτίας της παρουσίας μηδενικών αλληλόμορφων (null alleles), δηλαδή ανενεργών ενζυματικά αλληλόμορφων, καθώς και τις μεγάλες ποσότητες ιστού που απαιτούν για τη διεξαγωγή των αναλύσεων. Επίσης τα υπό εξέταση δείγματα πρέπει να είναι ποιοτικός σε καλή κατάσταση. Επιπλέον υπάρχουν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA οι οποίες δεν μεταφράζονται σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα του παρατηρούμενου πολυμορφισμού. Εκτός από τις αλλαγές στην αλληλουχία του DNA που δε μεταβάλλουν την κωδικοποιημένη πρωτεΐνη υπάρχουν και αλλαγές οι οποίες αν και προκαλούν ορισμένες αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων δεν είναι ορατές στο gel καθώς δεν μεταβάλλουν την ταχύτητα κίνησης της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατος ο διαχωρισμός των παραπάνω αλληλόμορφων. Σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί και το γεγονός ότι οι περισσότεροι γενετικοί τόποι που εξετάζει η τεχνική εμφανίζουν μικρό αριθμό αλληλόμορφων συνήθως δύο ή τρία. Αν και τα αλλοένζυμα είναι

codominant δείκτες, είναι εύκολη η χρήση τους και έχουν χαμηλό κόστος η χρήση τους έχει περιοριστεί σημαντικά.

1.2.2 Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Οι πρώτες μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας σε επίπεδο DNA αφορούσαν το mtDNA, καθώς είναι ένα σχετικά μικρό κυκλικό μόριο το οποίο μπορεί να απομονωθεί ευκολότερα από το πυρηνικό DNA και απαντάται σε χιλιάδες αντίγραφα στο κύτταρο. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι στο mtDNA συσσωρεύονται πολυμορφισμοί με ταχύτερο ρυθμό από ότι στο πυρηνικό DNA. Το παραπάνω οφείλεται στους υψηλότερους ρυθμούς μετάλλαξης σε σχέση με το πυρηνικό DNA, εξαιτίας της απουσίας διορθωτικών μηχανισμών κατά την αντιγραφή του DNA, καθώς και λόγω του μικρότερου δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους (N_e) (Liu & Cordes 2004).

Από τεχνικής άποψης οι μοριακοί δείκτες του mtDNA είναι οι ίδιοι με αυτούς των RFLPs με μόνη διαφορά ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση το υπό μελέτη μόριο είναι το mtDNA ενώ στην άλλη περίπτωση στόχος είναι το πυρηνικό DNA. Πολλά χαρακτηριστικά του mtDNA το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σε πολλές μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας. Το mtDNA είναι απλοειδές και στα ζωικά κύτταρα κληρονομείται από το θηλυκό που σημαίνει ότι οι απόγονοι κληρονομούν έναν mtDNA γενότυπο. Το mtDNA είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην κατασκευή φυλογενετικών δέντρων καθότι δεν λαμβάνει χώρα ανασυνδυασμός κατά την αντιγραφή του σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA. Αν και οι γενετικοί τόποι στη συγκεκριμένη τεχνική εμφανίζουν μεγάλο αριθμό

αλληλόμορφων, ο περιορισμένος αριθμός διαθέσιμων δεικτών στο mtDNA μόριο έχουν περιορίσει τη χρήση της τεχνικής τα τελευταία χρόνια.

1.2.3 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Η ανακάλυψη των ενζύμων περιορισμού το 1968 από τους Meselson and Yuan σηματοδότησε μια νέα εποχή στη γενετική μηχανική (πχ το κόψιμο και 'ράψιμο' κομματιών DNA από διαφορετικά χρωμοσώματα ή και οργανισμούς. Τα ένζυμα περιορισμού ή αλλιώς ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα που απαντώνται σε βακτήρια και χρησιμεύουν στην απομάκρυνση ξένου DNA όπως το DNA ενδοκυτταρικών βακτηριοφάγων, αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Το DNA των βακτηριών προστατεύεται από το κόψιμο γιατί μεθυλιώνεται. Το πιο κοινό ένζυμο περιορισμού είναι το EcoRI από το βακτήριο *Escherichia coli*. Κόβοντας ένα κομμάτι DNA με κάποιο ένζυμο περιορισμού κάποια άτομα θα έχουν μία θέση στην αλληλουχία του DNA τους που θα κοπεί από το ένζυμο, ενώ άλλα θα έχουν δύο ή περισσότερες με αποτέλεσμα να φαίνεται αντίστοιχος αριθμός κομματιών DNA στο gel ηλεκτροφόρησης τα οποία διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Τα παραπάνω αποτελούν τη βάση της τεχνικής RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Συνήθως το DNA που εξετάζεται είναι το προϊόν της PCR. Η αντικατάσταση μιας βάσης στην αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο εξαιτίας μιας μετάλλαξης θα συντελέσει στην απώλεια της συγκεκριμένης θέσης στο άτομο, καθώς το ένζυμο δεν θα μπορεί πλέον να κόψει το DNA στο συγκεκριμένο σημείο. Ως

αποτέλεσμα συγκρίνοντας διαφορετικά άτομα στις θέσεις αυτές θα παρατηρηθεί πολυμορφισμός.

Πρέπει να σημειωθεί ότι κάθε ένζυμο περιορισμού κόβει συγκεκριμένη αλληλουχία DNA (συνήθως μήκους 4-6 ζευγών βάσεων). Σήμερα είναι εμπορικά διαθέσιμα πάνω από 400 ένζυμα περιορισμού. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των RFLPs είναι ότι είναι codominant δείκτες επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη διάκριση των αλληλόμορφων σε ένα άτομο. Επιπλέον καθώς συνήθως οι διαφορές στο μήκος των αλληλόμορφων είναι μεγάλες το σκοράρισμα είναι σχετικά εύκολο (Liu & Cordes 2004). Ωστόσο η τεχνική παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα με κυριότερο τα χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού που μπορεί να διακρίνει. Επιπλέον για να είναι δυνατή η χρήση της απαιτούνται εκ των προτέρων πληροφορίες για το υπό εξέταση DNA (π.χ πληροφορίες ως προς την αλληλουχία του DNA), κάνοντας με αυτόν τον τρόπο δύσκολη και χρονοβόρα τη χρήση σε είδη για τα οποία δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες.

1.2.4 Μικροδορυφόροι (Microsatellites)

Οι μικροδορυφόροι αποτελούν τους πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενους μοριακούς δείκτες στην πληθυσμιακή γενετική. Είναι γνωστοί και ως VNTRs (variable number of tandem repeats) ή SSRs (simple sequence repeats). Οι μικροδορυφόροι είναι συνεχώς επαναλαμβανόμενες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Η ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία αποτελείται συνήθως από 2 μέχρι 6 νουκλεοτίδια. Ο αριθμός των επαναλήψεων κυμαίνεται συνήθως από 5 έως 100. Ο παρατηρούμενος πολυμορφισμός στους υπό εξέταση

γενετικούς τόπους οφείλεται σε διαφορές ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων. Το παραπάνω πιστεύεται ότι οφείλεται σε λάθη κατά την αντιγραφή του DNA από την πολυμεράση. Σε γενικές γραμμές οι μικροδορυφόροι με τις περισσότερες επαναλήψεις εμφανίζουν και τα υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού. Οι μικροδορυφόροι εμφανίζονται σε αφθονία σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Ειδικότερα στα ψάρια υπολογίζεται ότι εμφανίζονται σε συχνότητες που μπορεί να φθάνουν 1 σε κάθε 10 kb (Iyengar et al 2000, Wright 1993).

Στη συγκεκριμένη τεχνική σχεδιάζονται εκκινητές για την PCR οι οποίοι υβριδίζονται με τη συντηρητική περιοχή του DNA στα άκρα των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Τα προϊόντα της PCR κυμαίνονται συνήθως από 75 μέχρι 300 ζεύγη βάσεων, ανάλογα με τον εκάστοτε γενετικό τόπο. Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στην οποία οι μικροδορυφόροι σχηματίζουν διακριτές μπάντες ανάλογα με τον αριθμό των επαναλήψεων από τις οποίες αποτελούνται.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των μικροδορυφόρων βρίσκονται στο ότι είναι ιδιαίτερα πολυμορφικοί δείκτες ακόμα και σε μικρούς πληθυσμούς και σε είδη υπό εξαφάνιση και εμφανίζονται σε μεγάλη αφθονία στο γένομα. Τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού οφείλονται στους υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης που παρατηρούνται σε αυτές τις θέσεις. Οι μεταλλάξεις συνήθως οδηγούν σε αλλαγή του αριθμού των επαναλήψεων. Οι ρυθμοί μετάλλαξης υπολογίζεται ότι κυμαίνονται περίπου μία μετάλλαξη κάθε 1000 ή 10.000 μειώσεις. Επίσης είναι codominant δείκτες.

Επιπλέον ζεύγη εκκινητών που σχεδιάζονται για κάποιο είδος χρησιμοποιούνται συχνά και για συγγενικά είδη καθώς οι θέσεις που

υβριδίζονται οι εκκινήτες είναι ιδιαίτερα συντηρητικές. Ενδεικτικά περίπου 50% των εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για τα βοοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε πρόβατα και κατσίκες τα οποία διαφοροποιήθηκαν εξελικτικά πριν από περίπου 20 εκατομμύρια χρόνια περίπου (Maudet et al 2001). Σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής όπως εξακρίβωσης της γενετικής δομής ενός πληθυσμού η εφαρμογή τους θεωρείται αποτελεσματική (Junior et al 2006). Σε μελέτες που έχουν ως στόχο τον προσδιορισμό των γονέων μιας ομάδας ατόμων οι μικροδορυφόροι θεωρούνται ως η αποτελεσματικότερη τεχνική. Οι παραπάνω μελέτες έχουν ιδιαίτερη σημασία για την υλοποίηση προγραμμάτων επιλογής γεννητόρων στις υδατοκαλλιέργειες (Bravington & Ward 2004, Jerry et al 2006, Jackson et al 2003). Επίσης οι παραπάνω μελέτες επιτρέπουν την ιχνηλασιμότητα των προϊόντων, ενώ παράλληλα υποβοηθούν στην λήψη αποτελεσματικών μέτρων κατά των περιόδου εκτροφής (Miggiano et al 2005). Επίσης η χρήση τους είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη χαρτογράφηση του γονιδιόματος (genetic linkage map). Οι μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλά είδη υδρόβιων οργανισμών. Ενδεικτικά οι Moen et al (2004) χρησιμοποίησαν 54 δείκτες μικροδορυφόρων για τη χαρτογράφηση του γονιδιόματος του σολωμού του Ατλαντικού (*Salmo salar*), οι Christiakov et al (2005) χρησιμοποιώντας 174 δείκτες μικροδορυφόρων σχημάτισαν genetic linkage map για το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*).

Ωστόσο η χρήση των μικροδορυφόρων προαπαιτεί έρευνα η οποία μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και δύσκολη. Ο γενετικός τόπος είναι απαραίτητο να έχει αναγνωρισθεί εκ των προτέρων, ενώ απαιτούνται και πληροφορίες για την αλληλουχία των γειτονικών του τμημάτων DNA για να μπορούν να

σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές. Στην εφαρμογή της τεχνικής εμφανίζεται και η τεχνική δυσκολία της ενίσχυσης (amplification) δευτερογενών προϊόντων DNA στην αντίδραση της PCR ανεξάρτητων από το γενετικό τόπο του μικροδορυφόρου. Ωστόσο η παραπάνω δυσκολία ξεπερνιέται από τους περισσότερους ερευνητές έπειτα από προσεκτική βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR. Μία επιπλέον δυσκολία που παρουσιάζει η χρήση των μικροδορυφόρων είναι η εμφάνιση των λεγομένων stutter bands. Τα τελευταία φαίνεται να προκαλούνται από αποκόλληση (slippage) της πολυμεράσης στην PCR, εμφανίζοντας παραπροϊόντα τα οποία διαφέρουν από το κανονικό αλληλόμορφο κατά μία ή περισσότερες επαναλαμβανόμενες μονάδες. Αυτά τα παραπροϊόντα σε ορισμένες περιπτώσεις δύναται να εμφανίσουν στο gel ηλεκτροφόρησης την ίδια φωτεινότητα με τα υπάρχοντα αλληλόμορφα με συνέπεια να καθιστάται δύσκολος ο ακριβής χαρακτηρισμός γενοτύπων, κυρίως σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής. Ειδικότερα σε αυτές τις μελέτες και εξαιτίας του γεγονότος ότι οι μικροδορυφόροι εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού απαιτούνται μεγάλα μεγέθους δείγματα ώστε να αποφευχθούν εσφαλμένα συμπεράσματα εξαιτίας του δειγματοληπτικού σφάλματος.

1.2.5 Πολυμορφισμοί απλών βάσεων (Single Nucleotide Polymorphisms SNPs)

Οι SNPs είναι οι πλέον συχνοί πολυμορφισμοί στο γένωμα, με συχνότητα σε πολλά είδη έναν κάθε 500 ζεύγη βάσεων περίπου (Morin et al 2004). Αν και η ύπαρξη αυτού του είδους του πολυμορφισμού ήταν γνωστή από τη

δεκαετία του 1970 η χρήση της τεχνικής σε μεγάλη κλίμακα δεν ήταν εφικτή εξαιτίας τεχνολογικών αδυναμιών ως προς την ταχεία αλληλούχιση πολλών δειγμάτων. Ωστόσο η τεχνολογική πρόοδος των τελευταίων ετών (π.χ gene chip technology) έχει φέρει στο προσκήνιο την τεχνική των SNPs.

Οι SNPs πολυμορφισμοί εμφανίζονται ως συνέπεια σημειακών μεταλλάξεων οι οποίες προκαλούν την αντικατάσταση της βάσης στη συγκεκριμένη θέση. Το φαινόμενο αντικατάστασης πουρίνης με πουρίνη ($A \leftrightarrow G$) και πυριμιδίνης με πυριμιδίνη ($C \leftrightarrow T$) καλείται transition. Αντίστοιχα αντικατάσταση πουρίνης με πυριμιδίνη ή αντίθετα καλείται transersion. Αν και υπάρχουν διπλάσιες πιθανότητες για transversions σε σχέση με transitions οι περισσότεροι SNPs στα περισσότερα είδη είναι transitions. Θεωρητικά ο κάθε γενετικός τόπος μπορεί να έχει έως και τέσσερα αλληλόμορφα (A, T, C και G). Ωστόσο στην πράξη οι περισσότεροι SNPs γενετικοί τόποι εμφανίζουν δύο αλληλόμορφα, είτε τις δύο πουρίνες είτε τις δύο πυριμιδίνες

Οι SNPs παρουσιάζουν πολλές δυνατότητες για την μελέτη της ποικιλομορφίας σε φυσικούς πληθυσμούς. Πιστεύεται μάλιστα ότι στο μέλλον θα αντικαταστήσουν τους μικροδορυφόρους ως μοριακός δείκτης επιλογής. Είναι codominant δείκτες και παρουσιάζουν μεγάλη χρησιμότητα σε περιπτώσεις μερικώς κατεστραμμένου DNA (πχ DNA από αρχαία δείγματα) καθώς είναι μικρού μήκους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δείγματα DNA μικρότερα από 50 βάσεις. Ωστόσο η εξαγωγή συμπερασμάτων χρειάζεται προσοχή καθώς στην περίπτωση π.χ που το δείγμα αποτελείται από μικρό αριθμό ατόμων τότε γενετικοί τόποι με σπάνια αλληλόμορφα δεν θα συμπεριληφθούν στα αποτελέσματα με συνέπεια πχ οι ερευνητές να οδηγηθούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα όπως έλλειψη ετεροζυγωτίας και

ύπαρξη στενωπού (bottleneck) (Allendorf & Luikart 2007). Οι SNPs θεωρούνται ως οι καταλληλότεροι δείκτες στη χαρτογράφηση γονιδιόματος και στον εντοπισμό των QTL. Ωστόσο ο εξοπλισμός που απαιτεί η τεχνική είναι ιδιαίτερα ακριβός, κάνοντας ανέφικτη τη χρήση τους για πολλά επιστημονικά εργαστήρια.

1.2.6 Μινιδορυφόροι (Minisatellites)

Οι μινιδορυφόροι είναι συνεχώς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους από 20 έως αρκετές εκατοντάδες νουκλεοτιδία. Οι μινιδορυφόροι παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι σε περιπτώσεις ταυτοποίησης ατόμων καθώς και στις parentage analysis που έχουν ιδιαίτερη χρησιμότητα στα προγράμματα εκτροφής (breeding). Τα αλληλόμορφα αναγνωρίζονται από τον αριθμό των επαναλήψεων της προκύπτουσας αλληλουχίας.

Τα κυριότερα μειονεκτήματα της τεχνικής βρίσκονται στη δυσκολία αναγνώρισης αλληλόμορφων που ανήκουν σε ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο, καθώς σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζονται μπάντες (αλληλόμορφα) από πολλούς γενετικούς τόπους. Επίσης εξαιτίας του γεγονότος ότι οι μινιδορυφόροι είναι μεγάλου μήκους δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση δειγμάτων DNA μικρότερων από περίπου 300 ζεύγη βάσεων.

1.2.7 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Η τεχνική των RAPDs περιλαμβάνει την χρήση τυχαίων εκκινητών στη PCR χωρίς να είναι γνωστή η αλληλουχία του υπό εξέταση DNA. Σε κάθε αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται ένα είδος εκκινητή μήκους περίπου 10 ζευγών βάσεων. Ο εκκινητής λειτουργεί ταυτόχρονα και ως forward και ως reverse. Οι εκκινητές υβριδίζονται σε εκατοντάδες σημεία του γενόματος. Ωστόσο ενίσχυση (amplification) λαμβάνει χώρα μεταξύ σημείων που απέχουν λιγότερο από περίπου 2 kb (το μεγαλύτερο δυνατό μήκος για τα προϊόντα της PCR) (Allendorf & Luikart 2007).

Οι συνθήκες της PCR διαλέγονται ούτως ώστε 10-20 κομμάτια DNA να ενισχυθούν από τον κάθε εκκινητή. Με αυτόν τον τρόπο λίγοι διαφορετικοί εκκινητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πολλών διαφορετικών προϊόντων PCR από πολλούς γενετικούς τόπους του γενόματος. Εξαιτίας του μικρού μήκους των εκκινητών και των σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing temperatures περίπου 35-40 °C) παράγεται μεγάλος αριθμός προϊόντων (αλληλόμορφων) από την PCR. Κάθε ένα προϊόν θεωρείται ότι αναπαριστά και διαφορετικό γενετικό τόπο. Οι RAPD είναι dominant δείκτες και ο προσδιορισμός του γενετικού πολυμορφισμού επιτυγχάνεται με βάση την παρουσία/απουσία αλληλόμορφου στον κάθε γενετικό τόπο.

Πολυμορφισμός παρατηρείται εξαιτίας αντικατάστασης βάσεων στα σημεία που υβριδίζονται οι εκκινητές ή εξαιτίας πρόσθεσης ή αφαίρεσης τμημάτων DAN (indels) μεταξύ των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών. Η τεχνική παρουσιάζει υψηλή δυνατότητα στην εύρεση πολυμορφισμού. Χρησιμοποιώντας σετ εκκινητών είναι δυνατή η εξέταση ολόκληρου του γενόματος με βάση τα διαφορετικά προφίλ με μπάντες που εμφανίζονται για

κάθε εκκινητή. Η τεχνική των RAPD μπορούν να χρησιμοποιηθεί για κάθε είδος, χωρίς να υπάρχουν πληροφορίες για την αλληλουχία του DNA του. Η τεχνική θεωρείται ως η καταλληλότερη, αν συνυπολογιστεί και ο οικονομικός παράγοντας, σε περιπτώσεις αναγνώρισης και ταυτοποίησης ειδών.

Ωστόσο τα RAPD παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα όπως η δυσκολία αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων, εξαιτίας των χαμηλών θερμοκρασιών υβριδοποίησης των εκκινητών. Δηλαδή επανάληψη του πειράματος είναι δύσκολο να εμφανίσει τα ίδια αποτελέσματα, κάνοντας δύσκολη την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και συγκρίσεων παρόμοιων ερευνών. Επίσης σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί και η αδυναμία διάκρισης των ομοζύγων, στο κυρίαρχο αλληλόμορφο, από τα ετεροζύγωτα. Αν και σε μερικές περιπτώσεις οι μπάντες μπορεί να παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη φωτεινότητά τους ο διαχωρισμός σε γενικές γραμμές δεν είναι εφικτός. Επιπλέον είναι δύσκολο να συμπεράνει κανείς αν τα αλληλόμορφα, που παρατηρούνται με τη μορφή μπάντας στο gel, προέρχονται από τον ίδιο ή από διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Δηλαδή αλληλόμορφα διαφορετικών γενετικών τόπων τα οποία έχουν ίδιο μήκος και άρα δεν μπορούν να διαχωριστούν στην ηλεκτροφόρηση. Το τελευταίο είναι ιδιαίτερα πιθανό στην περίπτωση που ο δείκτης έχει προέλθει από πρόσθεση ή αφαίρεση τμήματος DNA στον εξεταζόμενο γενετικό τόπο, παρά αν έχει προέλθει από μετάλλαξη στο σημείο υβριδισμού του εκκινητή (Liu & Cordes 2004).

1.2.8 AFLPs

Η τεχνική των AFLPs κάνει χρήση της PCR για να παράγει αποτυπώματα DNA (DNA fingerprints), δηλαδή προφίλ με μπάντες από πολλαπλούς γενετικούς τόπους ταυτόχρονα. Τα AFLPs συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των RFLPs και RAPDs ξεπερνώντας ταυτόχρονα τις αδυναμίες των παραπάνω τεχνικών. Τα παραπάνω επιτυγχάνονται με επιλεκτική PCR amplification κομματιών DNA που παράγονται μετά από κόψιμο του γενομικού DNA. Η κυριότερη διαφορά της τεχνικής των AFLPs με τις προαναφερθείσες έγκειται στη χρήση κομματιών DNA γνωστής αλληλουχίας (adaptors) τα οποία ενώνονται με τα κομμάτια του εξεταζόμενου DNA, τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψη με ένζυμα. Αρχικά το DNA του δείγματος κόβεται με δύο διαφορετικά ένζυμα (συνήθως χρησιμοποιούνται τα EcoRI και MseI). Στη συνέχεια προσθέτονται οι adaptors οι οποίοι ενώνονται στα άκρα των παραγόμενων κομματιών του γενομικού DNA. Εξαιτίας του υπερβολικά μεγάλου αριθμού κομματιών DNA οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται έχουν στο 3' άκρο τους επιπρόσθετα κάποια γνωστή βάση. Με αυτόν τον τρόπο τα κομμάτια του DNA που θα ενισχυθούν στην αντίδραση της PCR μειώνεται στο ¼ καθώς ο εκκινητής θα υβριδιστεί μόνο με τα κομμάτια DNA που έχουν συμπληρωματική βάση ως προς της επιπλέον που έχει στο 3' άκρο του. Αντίστοιχα στην περίπτωση που απαιτεί ακόμα μεγαλύτερη μείωση των προϊόντων της PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκινητές στους οποίους έχουν προστεθεί περισσότερες επιπλέον βάσεις (Liu & Cordes 2004).

Το κύριο πλεονέκτημα των AFLPs έγκειται στο γεγονός ότι πολλοί πολυμορφικοί δείκτες μπορούν να παραχθούν γρήγορα για τα περισσότερα είδη ακόμα και στην περίπτωση όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες για την

αλληλουχία του DNA. Επιπλέον η τεχνική παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία ως προς την εύρεση επιπέδων πολυμορφισμού.

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα AFLPs εμφανίζουν μόνο δύο αλληλόμορφα σε κάθε γενετικό τόπο και επεξεργάζονται ως dominant δείκτες, αν και υπάρχουν λογισμικά πακέτα (AFLP QuantaPro, Key Gene) που επιτρέπουν το σκοράρισμα ως codominant δείκτες. Το παραπάνω σκοράρισμα είναι δυνατό μόνο για οικογένειες οργανισμών για τις οποίες υπάρχουν ικανοποιητικές πληροφορίες, αλλά είναι ιδιαίτερα δύσκολο σε μελέτες που αφορούν ολόκληρο τον πληθυσμό. Συμπερασματικά οι AFLPs θεωρούνται ως dominant δείκτες με αποτέλεσμα σε ορισμένες περιπτώσεις να μην είναι δυνατός ο διαχωρισμός των ετεροζύγων από τα ομοζύγωτα στο κυρίαρχο αλληλόμορφο (Moen et al 2004). Παρόλα αυτά τα AFLPs είναι γρηγορότερα, απαιτούν λιγότερη δουλειά εργαστηρίου και παρέχουν περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με άλλες κοινώς χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Επιπλέον τα αποτελέσματα των AFLPs είναι περισσότερο αναπαραγόμενα σε σχέση με αυτά των RAPDs, εξαιτίας των υψηλότερων θερμοκρασιών υβριδοποίησης των εκκινητών.

1.3 Βήματα στην επεξεργασία γενετικών δεδομένων

- Υπολογισμός των επιπέδων πολυμορφισμού και συχνοτήτων αλληλόμορφων σε κάθε γενετικό τόπο με τη χρήση των κατάλληλων μοριακών δεικτών.
- Εφαρμογή στατιστικού τεστ (πχ χ^2 τεστ για διαπίστωση αν οι υπό εξέταση πληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg).

- Υπολογισμός στατιστικών όπως F-statistics για προσδιορισμό π χ της γενετικής ποικιλομορφίας, προσδιορισμό του επιπέδου της γονιδιακής ροής.
- Υπολογισμός γενετικής απόστασης.
- Κατασκευή δένδρογράμματος.

1.4 Στατιστικά μέσα και κατανομές πιθανοτήτων

1.4.1 Είδη Στατιστικών

Μπορούμε να κατατάξουμε τα στατιστικά που χρησιμοποιούμε στην πληθυσμιακή γενετική στις παρακάτω πέντε κατηγορίες

1. Περιγραφικά στατιστικά.
2. Τεστ για εντοπισμό διαφορών.
3. Τεστ για εντοπισμό σχέσεων μεταξύ των δεδομένων.
4. Πολυμεταβλητές μέθοδοι εξερεύνησης δεδομένων (Multivariate Exploratory Methods).
5. Εκτιμητές πληθυσμιακών παραμέτρων (Statistical estimators) (Dytham 2003).

Περιγραφικά στατιστικά

Τα περιγραφικά στατιστικά υπολογίζονται κατά τα αρχικά στάδια της έρευνας από τα δεδομένα χωρίς να χρειάζονται υποθέσεις για τον αν τα δεδομένα ακολουθούν κάποια γνωστή κατανομή πιθανότητας ή κάποιο μοντέλο. Δεν χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο υποθέσεων. Ωστόσο αποτελούν σημαντικό τμήμα της ανάλυσης των δεδομένων καθιστώντας δυνατό τον εντοπισμό

σημαντικών παραμέτρων των δεδομένων. Παραδείγματα περιγραφικών στατιστικών αποτελούν ο αριθμητικός μέσος όρος και η διασπορά.

Τεστ για εντοπισμό διαφορών

Τα παραπάνω τεστ χρησιμοποιούνται κυρίως είτε για να δώσουν την πιθανότητα διαφοράς μεταξύ διαφόρων σειρών δεδομένων είτε για να δώσουν την πιθανότητα τα δεδομένα να ακολουθούν κάποια γνωστή κατανομή. Η μηδενική υπόθεση θεωρεί πάντα ότι δεν υπάρχουν διαφορές. Τα παραπάνω τεστ εμφανίζουν ευρεία χρήση στην πληθυσμιακή γενετική π.χ εξετάζοντας αν η γενετική ποικιλομορφία ενός πληθυσμού διαφέρει από αυτήν ενός άλλου.

Τεστ για εντοπισμό σχέσεων μεταξύ των δεδομένων

Τα τεστ αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούνται για την εξεύρεση σχέσεων μεταξύ δύο παραμέτρων που επηρεάζουν τα δεδομένα της έρευνας. Π.χ για τον έλεγχο αν η αρμοστικότητα ενός πληθυσμού εξαρτάται από τα επίπεδα ενδογαμίας. Η μηδενική υπόθεση θεωρεί ότι οι εξεταζόμενοι παράμετροι δεν συσχετίζονται. Τα παραπάνω τεστ διαχωρίζονται στα τεστ συσχετισμού (correlation) και στα τεστ παλινδρόμησης (regression). Στα πρώτα υπολογίζεται μόνο ο βαθμός συσχετισμού των παραμέτρων, ενώ στα δεύτερα οι παράμετροι σχετίζονται με αριθμητική σχέση (π.χ γραμμική παλινδρόμηση) από την οποία είναι δυνατός ο υπολογισμός της τιμής της μίας παραμέτρου αν είναι γνωστή η τιμή της άλλης. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι στη

γενετική είναι δύσκολος ο συσχετισμός δύο παραμέτρων λόγω και της συνεχούς αλληλεπίδρασης με περιβαλλοντικούς παράγοντες (Allendorf 2007).

Τα τεστ διαφορών και σχέσεων χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- Παραμετρικά Τεστ
- Μη Παραμετρικά Τεστ

Τα παραμετρικά θεωρούν ότι τα δεδομένα θεωρούν ότι τα δεδομένα ακολουθούν κάποια γνωστή κατανομή πιθανοτήτων όπως π.χ την κανονική κατανομή. Συνήθως οι παραμετρικές κατανομές μπορούν να περιγραφούν πλήρως από λίγους παραμέτρους όπως ο αριθμητικός μέσος και η διασπορά. Τα παραμετρικά τεστ εμφανίζουν μεγαλύτερη στατιστική αξιοπιστία σε σχέση με τα μη παραμετρικά. Για τον παραπάνω λόγω η χρήση τους είναι προτιμότερη στην περίπτωση που τα δεδομένα ακολουθούν κάποια θεωρητική κατανομή. Από τα πλέον γνωστά παραμετρικά τεστ είναι το t-test κλπ.

Τα μη παραμετρικά τεστ δεν απαιτούν πληροφορίες για την κατανομή των δεδομένων και παρόλο που έχουν χαμηλότερη στατιστική αξιοπιστία από τα παραμετρικά, δίνουν ασφαλέστερα συμπεράσματα στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες για την κατανομή που ακολουθούν τα δεδομένα. Στην πληθυσμιακή γενετική τα μη παραμετρικά τεστ χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς σε πολλές περιπτώσεις τα δεδομένα δεν ακολουθούν κάποια γνωστή κατανομή. Από τα πλέον γνωστά μη παραμετρικά τεστ είναι το χ^2 τεστ και το Wilcoxon's signed-ranks τεστ.

Πολυμεταβλητές μέθοδοι εξερεύνησης δεδομένων (Multivariate Exploratory Methods)

Ο κυριότερος σκοπός των παραπάνω μεθόδων είναι να συνθέσουν και να επεξεργαστούν τις σχέσεις μεταξύ των παρατηρήσεων με τέτοιο τρόπο, ώστε αυτές να γίνουν φανερές στον ερευνητή. Με τη χρήση των παραπάνω μεθόδων είναι δυνατός ο εντοπισμός χρήσιμων υποθέσεων που πρέπει να ελεγχθούν σε μεγάλα σετ δεδομένων με πολλές μεταβλητές στα οποία θα ήταν δύσκολη η διατύπωση υποθέσεων εξαιτίας του μεγάλου πλήθους δυνατών υποθέσεων. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι είναι καταλληλότερες για την διατύπωση υποθέσεων παρά για τον έλεγχο καθώς δεν δίνουν κάποια πιθανότητα για το αν ισχύει η υπόθεση (Dytham 2003). Από τις πλέον γνωστές μεθόδους είναι η PCA (Principal Component Analysis), η AMOVA (Analysis of Molecular Variation) κλπ.

Εκτιμητές πληθυσμιακών παραμέτρων (Statistical estimators)

Οι εκτιμητές πληθυσμιακών παραμέτρων συμπεραίνουν την τιμή μιας πληθυσμιακής παραμέτρου χρησιμοποιώντας δεδομένα που σχετίζονται με αυτήν την παράμετρο. Π.χ ο υπολογισμός του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους N_e από την αλλαγή στις συχνότητες των αλληλόμορφων μεταξύ δύο

γενεών. Οι διαφορές στις συχνότητες των αλληλόμορφων εξαρτώνται από το N_e , ωστόσο μπορεί να οφείλονται στο μέγεθος του εξεταζόμενου δείγματος, την πληθυσμιακή δομή, τη δημογραφική κατάσταση και τους ρυθμούς επιλογής και μετάλλαξης. Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για τον υπολογισμό της τιμής μιας πληθυσμιακής παραμέτρου όπως βάση ενός στατιστικού (π.χ F_{st}), maximum likelihood, Bayesian methods κλπ (Allendorf 2007).

1.4.2 Κατανομές πιθανοτήτων στην πληθυσμιακή γενετική

Κανονική κατανομή

Η κανονική κατανομή είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη κατανομή σε όλες τις βιολογικές επιστήμες. Είναι γνωστή για το συμμετρικό κωδωνοειδές της σχήμα. Ο λόγος της ευρείας εφαρμογής της οφείλεται στο κεντρικό θεώρημα σύμφωνα με το οποίο η κατανομή του μέσου ενός δείγματος προσεγγίζει την κανονική κατανομή όσο αυξάνεται το μέγεθος των παρατηρήσεων ανεξαρτήτως αν η παρατηρούμενη μεταβλητή ακολουθεί την κανονική κατανομή.

Διωνυμική κατανομή

Μια σημαντική κατανομή πιθανοτήτων στη γενετική είναι η διωνυμική. Χρησιμοποιείται για διακριτά δεδομένα και συγκεκριμένα για μοντελοποίηση δυαδικών δεδομένων π.χ Αρσενικό ή Θηλυκό, 1 για παρουσία αλληλόμορφου 0 για απουσία στην παρουσίαση δεδομένων μοριακών δεικτών όπως τα RAPD. Η διωνυμική κατανομή δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των φορών που λαμβάνει χώρα ένα γεγονός με συγκεκριμένη πιθανότητα, στο σύνολο

των παρατηρήσεων. Για μεγάλα δείγματα η παραπάνω κατανομή προσεγγίζει την κανονική.

Poisson κατανομή

Η Poisson είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο σε πολλές έρευνες για διακριτά δεδομένα. Είναι μια κατανομή που περιγράφει τον αριθμό των φορών που λαμβάνει χώρα ένα συμβάν στη μονάδα του χρόνου ή του χώρου. Ο λόγος που ελέγχεται αν τα δεδομένα ακολουθούν την Poisson είναι για να εξακριβωθεί η ανεξαρτησία των παρατηρήσεων ως προς το χώρο ή το χρόνο. Μια σημαντική ιδιότητα της Poisson κατανομής είναι ότι ο μέσος συμπίπτει με τη διασπορά (Dytham 2003).

1.4.3 Έλεγχος υποθέσεων από τα στατιστικά τεστ

Ο έλεγχος υποθέσεων βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στη γενετική όπως και στους περισσότερους επιστημονικούς κλάδους. Περιλαμβάνει αρχικά τη διατύπωση μιας υπόθεσης η οποία καλείται μηδενική υπόθεση (H_0). Στη συνέχεια εφαρμόζεται κάποιο στατιστικό τεστ το οποίο υπολογίζει την πιθανότητα να είναι σωστή η υπόθεση. Η μηδενική υπόθεση αντιπροσωπεύει μια αρνητική δήλωση, ακριβώς την αντίθετη δηλαδή από αυτήν που θέλει να ελέγξει ο ερευνητής πχ στην περίπτωση ελέγχου αν ένας πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg η μηδενική υπόθεση θα ήταν ότι ο πληθυσμός δεν διαφέρει, δηλαδή βρίσκεται σε ισορροπία.

Λάθη στην απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης μπορούν να προκύψουν για δύο κυρίως λόγους. Εξαιτίας του ότι το δείγμα είναι μικρό και δεν

αντιπροσωπεύει τον πληθυσμό και εξαιτίας του ότι τα στατιστικά τεστ δεν παρέχουν κάποιο ακριβές αποτέλεσμα, αλλά την πιθανότητα που υπάρχει να είναι η υπόθεση σωστή. Η αιτία λάθους διαχωρίζεται σε δύο κατηγορίες (Πιν 2).

- Τύπου I
- Τύπου II

Τα λάθη της πρώτης κατηγορίας παρατηρούνται όταν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση τη στιγμή που είναι σωστή. Τα λάθη της δεύτερης κατηγορίας παρατηρούνται όταν μια λανθασμένη μηδενική υπόθεση αποδέχεται ως σωστή.

Πίνακας 2. Είδη σφάλματος κατά τον έλεγχο της μηδενικής υπόθεσης (Πηγή: Dytham 2003)

	Αποδοχή	Μη Αποδοχή
H₀ Σωστή	Σωστό	Σφάλμα Τύπου I
H₀ Λάθος	Σφάλμα Τύπου II	Σωστό

Στα περισσότερα στατιστικά τεστ έχει επικρατήσει να χρησιμοποιείται η τιμή $\alpha=0,05$ ως όριο για την απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης. Όσο χαμηλότερη η τιμή α τόσο μειώνεται και η πιθανότητα του Τύπου I σφάλματος, ενώ αυξάνεται παράλληλα η πιθανότητα για Τύπου II σφάλμα. Συνήθως στις περισσότερες περιπτώσεις είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται τιμές που ελαττώνουν τον πρώτο τύπο σφάλματος. Το παραπάνω ωστόσο δεν είναι απόλυτο. Συγκεκριμένα στη γενετική διατήρηση είναι πιο επικίνδυνο το σφάλμα του δεύτερου τύπου καθώς μπορεί να οδηγήσει στην εξαφάνιση ενός

είδους στην περίπτωση που ο ερευνητής θεωρήσει σωστή μια μηδενική υπόθεση που (π.χ ο πληθυσμός είναι σταθερός) είναι λανθασμένη (Allendorf 2007). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε $\alpha=0,01$.

1.4.4 χ^2 Τεστ

Αποτελεί έναν από τους απλούστερους μη παραμετρικούς ελέγχους. Βασίζεται στην ιδέα ελέγχου όλων των δεδομένων και όχι μόνον, για παράδειγμα του μέσου. Το τεστ αυτό εφαρμόζεται με σκοπό:

- Τον έλεγχο καλής προσαρμογής (goodness of fit)
- Τον έλεγχο ανεξαρτησίας
- Τον έλεγχο ομογένειας.

Ο πρώτος έλεγχος συγκρίνει μια δειγματική κατανομή σε σχέση με κάποια εξειδικευμένη πληθυσμιακή κατανομή. Δηλαδή, σύμφωνα με την πρώτη εφαρμογή ελέγχουμε αν κάποια δεδομένα προσαρμόζονται σε κάποια θεωρητική κατανομή που θα αναμενόταν σύμφωνα με τις υποθέσεις και τη θεωρία. Ο δεύτερος έλεγχος πραγματοποιείται όταν κάθε τμήμα του δείγματος μπορεί να ταξινομηθεί σε τουλάχιστον δύο κατηγορίες. Όταν τα δεδομένα ταξινομούνται σε περισσότερα από ένα χαρακτηριστικά, τότε μπορούν να παρασταθούν με πίνακες που λέγονται πίνακες συνάφειας. Τέλος στον έλεγχο ομογένειας έχουμε ταξινόμηση που περιλαμβάνει τη διαίρεση κάποιου συνόλου (πληθυσμός) σε υποσύνολα (υποπληθυσμούς) σύμφωνα με κάποιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό.

1.4.5 Χρήσιμες μέθοδοι επεξεργασίας γενετικών δεδομένων

Στη επεξεργασία γενετικών δεδομένων βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή τα τελευταία χρόνια οι δύο ακόλουθες μέθοδοι:

- ML (Maximum likelihood)
- Bayesian approaches and MCMC (Markov chain Monte Carlo)

Με τον όρο likelihood εννοείται η πιθανότητα να παρατηρήσει κανείς τα δεδομένα δίνοντας σε μια παράμετρο συγκεκριμένη τιμή (π.χ $N_m=10$) κάτω από ένα θεωρούμενο μοντέλο. Οι ML μέθοδοι υπολογίζουν την τιμή της παραμέτρου για την οποία γίνεται μέγιστη η πιθανότητα να παρατηρηθούν τα δεδομένα κάτω από τις συνθήκες που απαιτεί το εκάστωτε μοντέλο. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των παραπάνω μεθόδων είναι ότι σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα στατιστικά τεστ χρησιμοποιούν όλα τα δεδομένα και δεν βασίζονται σε ένα γενικό στατιστικό μέτρο (π.χ F_{st}). Είναι δυνατό δύο διαφορετικά σετ δεδομένων να δώσουν ίδιο π.χ F_{st} , κάτι το οποίο είναι λιγότερο πιθανό με τις ML μεθόδους. Για τον παραπάνω λόγο οι ML μέθοδοι θεωρητικά είναι και πιο ακριβής από τις προηγούμενες. Παρόλα αυτά οι παραπάνω μέθοδοι απαιτούν μεγάλα σετ δεδομένων καθώς στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται σε μικρά δείγματα δίνουν λιγότερη ακριβή αποτελέσματα από τις κλασικές μεθόδους.

Οι Bayesian μέθοδοι διαφέρουν από τις προηγούμενες σε δύο σημεία κυρίως.

1. Η πιθανότητα που δίνουν ερμηνεύεται διαφορετικά από αυτήν που δίνουν τα στατιστικά τεστ που έχουν προαναφερθεί. Στα τελευταία η P ουσιαστικά αντιπροσωπεύει το μέσο αποτέλεσμα που αναμένεται έπειτα από συνεχόμενες επαναλήψεις του πειράματος. Στην περίπτωση των Bayesian η πιθανότητα που δίνει η μέθοδος είναι

ευκολότερο να ερμηνευθεί. Μια $P=0,8$ για παράδειγμα συνεπάγεται ότι υπάρχει 95% πιθανότητα η εξεταζόμενη παράμετρος π.χ N_e να είναι κάτω από 100.

2. Οι παραπάνω μέθοδοι έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν και προγενέστερα δεδομένα και πληροφορίες (π.χ ρυθμό μετάλλαξης από δημοσιευμένες επιστημονικές εργασίες) στον υπολογισμό της πιθανότητας για την απόρριψη ή μη μιας υπόθεσης (Box & Tiao 1992).

Η τελευταία ιδιότητα των μεθόδων εκτός από το σημαντικότερο πλεονέκτημά τους έχει γίνει αιτία για κριτική των παραπάνω μεθόδων καθώς πολλοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το είδος των προγενέστερων πληροφοριών που θα χρησιμοποιηθούν με συνέπεια να χάνουν σε αντικειμενικότητα. Ωστόσο οι επιδράσεις που ασκούν προγενέστερες πληροφορίες μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με τη λεγόμενη ανάλυση ευαισθησίας (sensitivity analysis) (Allendorf 2007).

Οι υπολογισμοί των Bayesian μεθόδων γίνονταν χρησιμοποιώντας πολύπλοκα μοντέλα και χρονοβόρα μοντέλα. Η ενσωμάτωση των υπολογιστικών μεθόδων MCMC (Markov chain Monte Carlo) έχει διευκολύνει σημαντικά την εφαρμογή των Bayesian μεθόδων. Η MCMC αποτελεί μια μεθοδολογία, η οποία κάνει χρήση και στοχαστικής θεωρίας, για την δημιουργία κατανομών πιθανοτήτων σε πολύπλοκες περιπτώσεις με μεγάλο πλήθος μεταβλητών, κάτι το οποίο θα ήταν ιδιαίτερα δύσκολο έως αδύνατο με αναλυτικές εξισώσεις. Η MCMC συνδυάζει το Markov chain μοντέλο, το οποίο θεωρεί τα στοιχεία ως μέλη μιας αλυσίδας στην οποία το στοιχείο εξαρτάται από το προηγούμενο, με τη διαδικασία Monte Carlo η οποία επιλέγει ένα

τυχαίο νούμερο το οποίο είναι απαραίτητο για το κάθε βήμα της αλυσίδας Markov (Beaumont & Rannala 2004).

1.4.6 AMOVA (Analysis of Molecular Variance)

Η AMOVA είναι μια μεθοδολογία ανάλυσης της ποικιλομορφίας η οποία χρησιμοποιεί μοριακά δεδομένα από την ανάλυση του DNA με μοριακούς δείκτες. Η AMOVA διαφέρει από την ανάλυση διασποράς ANOVA στο ότι έχει τη δυνατότητα να ενσωματώσει εναλλακτικές υποθέσεις ως προς την εξέλιξη. Επίσης ο έλεγχος των υποθέσεων γίνεται χρησιμοποιώντας permutational μεθόδους με συνέπεια να μην απαιτείται τα δεδομένα να ακολουθούν την κανονική κατανομή. Η AMOVA ομαδοποιεί τους πληθυσμούς σε γκρουπ και στη συνέχεια υπολογίζει τις διαφορές σε τρία επίπεδα. Διαφορές μεταξύ ατόμων του πληθυσμού, διαφορές μεταξύ πληθυσμών που ανήκουν στο ίδιο γκρουπ και τέλος διαφορές μεταξύ γκρουπ πληθυσμών. Για τα παραπάνω χρησιμοποιεί αντίστοιχα τους παρακάτω συντελεστές Φ_{ST} , Φ_{SC} και Φ_{CT} . Συνοπτικά τα βήματα που ακολουθούνται στην AMOVA είναι τα ακόλουθα:

1. Σκοράρισμα των αλληλόμορφων που προκύπτουν από το χρησιμοποιούμενο molecular marker.
2. Υπολογισμός πίνακα γενετικής απόστασης.
3. Διατύπωση υπόθεσης ως προς το διαχωρισμό του γενετικού πολυμορφισμού (ομαδοποίηση πληθυσμών σε γκρουπ).
4. Έλεγχος της υπόθεσης (Mengoni & Bazzicalupo 2002).

1. 5 Τρόποι Υπολογισμού της γενετικής ποικιλομορφίας

1.5.1 Μέση Ετεροζυγωτία

Η μέση ετεροζυγωτία είναι από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μέτρα γενετικού πολυμορφισμού. Συνήθως χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος για την εύρεση της μέσης αναμενόμενης ετεροζυγωτίας σε n γενετικούς τόπους ενός πληθυσμού:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Είναι ευκολότερο να υπολογιστεί η ετεροζυγωτία αφαιρώντας την αναμενόμενη ομοζυγωτία καθώς υπάρχουν λιγότερα ομοζύγωτα από ότι ετεροζύγωτα. Το παραπάνω φαίνεται καθαρά στις περιπτώσεις όπου σε ένα γενετικό τόπο υπάρχουν περισσότερα από δύο αλληλόμορφα. Υπάρχουν πολλά χαρακτηριστικά της μέσης ετεροζυγωτίας που την καθιστούν ιδιαίτερα πολύτιμο μέτρο μέτρησης της γενετικής ποικιλομορφίας όπως το ότι φαίνεται να αποτελεί σχετικά αξιόπιστο μέτρο μέτρησης της αντίδρασης ενός πληθυσμού στη φυσική επιλογή, καθώς επίσης και μέτρο υπολογισμού των συντελεστών ενδογαμίας.

Εκτός από τη μέση ετεροζυγωτία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση του γενετικού πολυμορφισμού η αναλογία των πολυμορφικών γενετικών τόπων καθώς και ο αριθμός αλληλόμορφων

ενός γενετικού τύπου. Ένας γενετικός τύπος θεωρείται πολυμορφικός όταν σε αυτόν παρατηρούνται περισσότερα του ενός αλληλόμορφα.

1.5.2 Μοντέλο Hardy-Weinberg

Το μοντέλο Hardy-Weinberg αποτελεί το απλούστερο και συνάμα το πιο θεμελιώδες μοντέλο της θεωρίας της πληθυσμιακής γενετικής. Το μοντέλο απαιτεί να ικανοποιούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις

- Τυχαία σύζευξη μεταξύ των ατόμων που απαρτίζουν τον πληθυσμό.
- Απουσία μεταλλάξεων.
- Μέγεθος πληθυσμού που τείνει στο άπειρο.
- Απουσία φυσικής επιλογής.
- Απουσία γονιδιακής ροής.

Πληθυσμός που ικανοποιεί τις παραπάνω προϋποθέσεις θα διατηρήσει τις συχνότητες των αλληλόμορφων του σταθερές από γενιά σε γενιά και δεν θα εμφανίσει εξέλιξη. Επιπλέον οι συχνότητες των πιθανών γενοτύπων θα περιγράφονται από διωνυμικής μορφής συναρτήσεις των συχνοτήτων των αλληλόμορφων. Στην απλούστερη περίπτωση εξέτασης ενός γενετικού τύπου με δύο αλληλόμορφα έστω A και a με συχνότητες p και q αντίστοιχα που βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg οι συχνότητες των γενοτύπων της επόμενης γενιάς δίνονται από τη σχέση $(p+q)^2$ (Πιν 3).

Πίνακας 3. Συχνότητες γενοτύπων σύμφωνα με Hardy-Weinberg.

Γενότυπος	AA	Aa	aa
Συχνότητα	p^2	$2pq$	q^2

Οι παραπάνω συχνότητες θα διατηρηθούν σταθερές στις επόμενες γενιές με αποτέλεσμα να μην υπάρξει εξέλιξη. Το μοντέλο Hardy-Weinberg μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί και σε περισσότερα αλληλόμορφα με βάση τους δύο παρακάτω κανόνες:

1. Η αναμενόμενη συχνότητα για κάθε ομοζύγωτο δίνεται από τη συχνότητα του εκάστωτε αλληλόμορφου στο τετράγωνο.
2. Η αναμενόμενη συχνότητα για κάθε ετεροζύγωτο δίνεται από το διπλάσιο γινόμενο των συχνοτήτων των δύο αλληλόμορφων.

Το μοντέλο Hardy-Weinberg διευκολύνει σημαντικά την περιγραφή της γενετικής ποικιλομορφίας των πληθυσμών, καθώς επιτρέπει την περιγραφή του πληθυσμού με βάση τις συχνότητες των αλληλόμορφων που εμφανίζονται σε κάποιο γενετικό τόπο, αντί της περιγραφής του με βάση τους πιθανούς γενότυπους που προκύπτουν. Η παραπάνω διευκόλυνση φαίνεται καθαρά ακόμη και στη σχετικά απλή περίπτωση των 10 γενετικών τόπων με δύο αλληλόμορφα ο καθένας όπου υπάρχουν 59.049 διαφορετικοί γενότυποι (Allendorf 2007).

Στην επεξεργασία των γενετικών δεδομένων αφού υπολογιστούν οι συχνότητες των αλληλόμορφων που εμφανίζουν οι μοριακοί δείκτες, ελέγχεται αν αυτές παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις συχνότητες που δίνει το μοντέλο Hardy-Weinberg. Τα πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενα τεστ είναι οι διάφορες παραλλαγές του χ^2 τεστ. Στα παραπάνω τεστ η

μηδενική υπόθεση θεωρεί πάντα ότι ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Οι βαθμοί ελευθερίας ισούνται με τη διαφορά του πλήθους των πιθανών γενοτύπων με το πλήθος των αλληλόμορφων. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα δεδομένα πρέπει να είναι σε γενοτυπική μορφή για να εφαρμοστεί το μοντέλο Hardy-Weinberg. Επίσης τα δεδομένα πρέπει να προέρχονται από codominant δείκτες όπως οι μικροδορυφόροι, καθώς σε διαφορετική περίπτωση δεν είναι δυνατή η διάκριση ομοζύγων στο κυρίαρχο αλληλόμορφο από τα ετεροζύγωτα.

Στις περιπτώσεις που ο εξεταζόμενος πληθυσμός αποκλίνει από την ισορροπία Hardy-Weinberg διακρίνουμε δύο περιπτώσεις είτε έλλειψη ετεροζυγωτίας είτε πλεόνασμα ετεροζυγωτίας. Οι λόγοι για τα παραπάνω είναι πολλοί και πολύπλοκοι. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι έλλειψη ετεροζυγωτίας παρατηρείται σε περιπτώσεις μικρών πληθυσμών στους οποίους έχει μεγάλη επίδραση η γενετική παρέκκλιση, παρατηρείται μη τυχαία σύζευξη, μεγάλο ποσοστό ενδογαμίας, φαινόμενο Wahlund κλπ. Πλεόνασμα ετεροζυγωτίας μπορεί να εμφανιστεί σε περιπτώσεις όπου παρατηρείται διασταύρωση μεταξύ γενετικά απομακρυσμένων πληθυσμών, διαφορές στις συχνότητες αλληλόμορφων ανάμεσα στα φυλετικά χρωμοσώματα (Allendorf 1994). Ωστόσο είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι η απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες όπως μη αντιπροσωπευτικό δείγμα, παρουσία μηδενικών αλληλόμορφων με αποτέλεσμα να υπάρχει υπερεκτίμηση των ομοζύγων κ.α. με συνέπεια να είναι δύσκολη η διεξαγωγή συμπερασμάτων. Ο αποτελεσματικότερος τρόπος για να διακριθεί αν η έλλειψη ετεροζυγωτίας οφείλεται σε μη τυχαία σύζευξη ή σε μηδενικά αλληλόμορφα είναι να εξεταστεί αν η έλλειψη ετεροζυγωτίας

παρατηρείται στους ίδιους γενετικούς τόπου για άτομα διαφορετικών πληθυσμών, οπότε υπάρχουν πιθανότατα στους παραπάνω γενετικούς τόπου μηδενικά αλληλόμορφα (Allendorf 2007).

1.5.3 F-Statistics

Τα F-statistics αποτελούν μέσα εκτίμησης του γενετικού πολυμορφισμού. Δημιουργήθηκαν από τον Sewall Wright (1931,1951) και χρησιμοποιούνται ευρέως μέχρι σήμερα. Τα F-statistics θεωρούν ότι ο συνολικός γενετικός πολυμορφισμός ενός είδους διαχωρίζεται στον πολυμορφισμό που απαντάται μέσα σε έναν πληθυσμό του είδους και στον πολυμορφισμό μεταξύ πληθυσμών. Τα F-statistics αποτελούνται από τους παρακάτω συντελεστές:

- F_{IS} ο οποίος είναι δείκτης μέτρησης της έλλειψης ετεροζυγωτίας μεταξύ ατόμων ενός πληθυσμού. Δίνεται από τη σχέση: $F_{IS}=1-(H_o/H_s)$, όπου H_o η μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία των πληθυσμών και H_s η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία όλων των πληθυσμών. Παίρνει θετικές τιμές για περιπτώσεις ελλείμματος ετεροζυγωτίας και αρνητικές αν υπάρχει πλεόνασμα ετεροζυγωτίας.
- F_{ST} : Εκφράζει τη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ πληθυσμών και δίνεται από τη σχέση $F_{ST}=1- (H_s/H_T)$ όπου H_T η συνολική αναμενόμενη ετεροζυγωτία αν θεωρήσουμε ότι υπάρχει πανμιξία, δηλαδή δεν υπάρχουν διαφορετικοί πληθυσμοί.
- F_{IT} : Εκφράζει τη συνολική γενετική ποικιλομορφία, δηλαδή τη γενετική ποικιλομορφία που παρατηρείται μεταξύ υποπληθυσμών και τη

ποικιλομορφία που παρατηρείται μεταξύ ατόμων ενός υποπληθυσμού.

Δίνεται από τη σχέση $F_{IT}=1 - (H_O/H_T)$

Οι παραπάνω συντελεστές αποτελούν μέσα μέτρησης του ελλείμματος ετεροζυγωτίας σε σχέση με την αναμενόμενη ετεροζυγωτία του μοντέλου Hardy-Weinberg. Από τους παραπάνω δείκτες ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος είναι ο F_{ST} ο οποίος παίρνει τιμές από 0 έως 1. Για τιμές που πλησιάζουν το μηδέν οι υπό εξέταση πληθυσμοί παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες, ενώ για τιμές που πλησιάζουν το 1 υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Στις περιπτώσεις που παρατηρείται γονιδιακή ροή ο F_{ST} δίνεται από τη σχέση: $F_{ST} = \frac{1}{4mN + 1}$ όπου m ο ρυθμός γονιδιακής ροής και N το μέγεθος του πληθυσμού. Πρέπει να σημειωθεί ότι η γονιδιακή ροή παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην πληθυσμιακή γενετική καθώς χαμηλή γονιδιακή ροή θα οδηγήσει σε ενδογαμία (inbreeding), ενώ και η πολύ υψηλή γονιδιακή ροή μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αρμοστικότητας του ενδημικού πληθυσμού προκαλώντας το φαινόμενο outbreeding depression (Allendorf 2007). Οι παραπάνω συντελεστές προσδιορίστηκαν αρχικά από τον Wright για την περίπτωση γενετικού τόπου με δύο αλληλόμορφα και στη συνέχεια επεκτάθηκαν για τρία ή περισσότερα αλληλόμορφα από τον Nei, ο οποίος ονόμασε τους συντελεστές G_{IS} , G_{ST} και G_{IT} . Σήμερα πάντως οι F και G συντελεστές χρησιμοποιούνται συχνά χωρίς διάκριση στη βιβλιογραφία (Allendorf 1996).

Περιορισμοί του συντελεστή F_{ST} και χρήση εναλλακτικών συντελεστών

Η αξιοπιστία του F_{ST} ελαττώνεται στην περίπτωση όπου οι εξεταζόμενοι γενετικοί τόποι παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού όπως συμβαίνει στην περίπτωση των μικροδορυφόρων, όπου ο συντελεστής δίνει χαμηλότερες τιμές από αυτές που ισχύουν. Ένας επιπλέον περιορισμός του F_{ST} είναι ότι δεν λαμβάνει υπόψη την ταυτότητα των εξεταζόμενων αλληλόμορφων (π.χ γενεαλογικές πληροφορίες, μήκος αλληλόμορφου κλπ).

Ο συντελεστής R_{ST} είναι ανάλογος του F_{ST} και προσδιορίζεται ως η αναλογία της διασποράς στο μήκος των αλληλόμορφων που οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των εξεταζόμενων πληθυσμών. Ο παραπάνω συντελεστής θεωρεί ότι κάθε μετάλλαξη μεταβάλλει το μήκος ενός αλληλόμορφου κατά ένα βήμα τη φορά (πχ προστίθεται ή αφαιρείται CA). Η σημασία του παραπάνω έγκειται στο ότι πληθυσμοί των οποίων τα αλληλόμορφα διαφέρουν κατά λίγα βήματα θα έχουν σημαντική γονιδιακή ροή μεταξύ τους. Ο συντελεστής R_{ST} δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα όταν τα δεδομένα προέρχονται από μικροδορυφορικούς γενετικούς τόπους.

Ένας άλλος δείκτης είναι και ο Φ_{ST} ο οποίος λαμβάνει υπόψη και γενεαλογικές πληροφορίες των αλληλόμορφων. Ο Φ_{ST} όπως και ο R_{ST} πολλαπλασιάζουν την τιμή του F_{ST} με έναν συντελεστή ο οποίος αντιπροσωπεύει τα επίπεδα διαφοροποιήσεις μεταξύ των αλληλόμορφων, χρησιμοποιώντας γενεαλογικές πληροφορίες και πληροφορίες για το μήκος των αλληλόμορφων στο gel ηλεκτροφόρησης αντίστοιχα. Ένα άλλο κοινώς χρησιμοποιούμενο μέτρο εύρεσης της γενετικής απόστασης μεταξύ πληθυσμών είναι ο δείκτης D (Nei 1988). Ο παραπάνω δείκτης δημιουργήθηκε για απομονωμένους πληθυσμούς στους οποίους η γονιδιακή

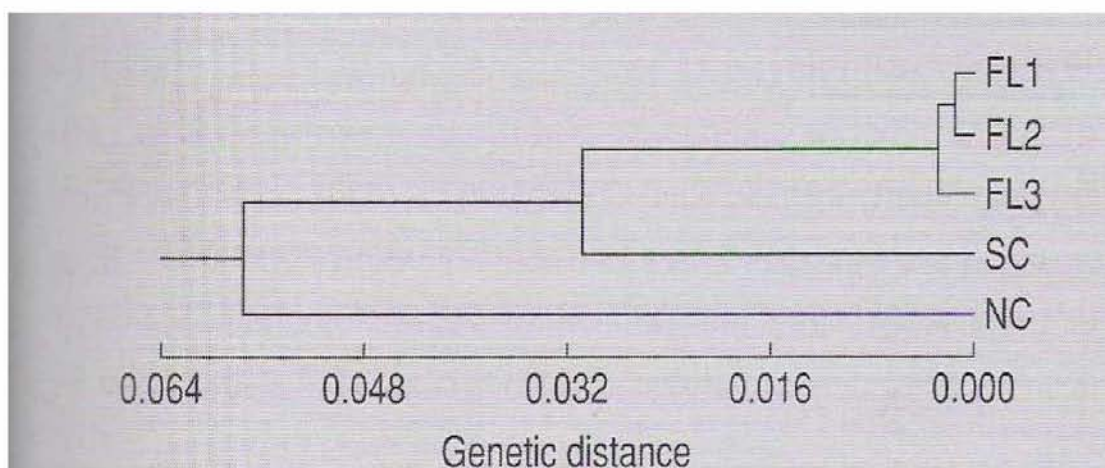
ροή είναι η ελάχιστη. Ωστόσο φαίνεται να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα και για μη απομονωμένους πληθυσμούς (Paetkau et al 1997).

1.5.4 Δενδρογράμματα

Κατά την παρουσίαση δεδομένων πληθυσμιακής γενετικής είναι πολύ συχνή η χρήση δενδρογραμμάτων. Για την κατασκευή ενός δενδρογράμματος υπολογίζεται αρχικά ένας πίνακας εισόδου γενετικών αποστάσεων (genetic distance matrix Εικ 1) και στη συνέχεια με τη χρήση αλγορίθμων όπως UPGMA στην Εικ 2 (unweighted pair group method with arithmetic averages) και ο Neighbor-joining. Ο τελευταίος είναι ιδιαίτερα χρήσιμος σε δεδομένα τα οποία περιλαμβάνουν πληθυσμούς οι οποίοι εξελίχθηκαν με σημαντικές διαφορές ως προς το ρυθμό εξέλιξής τους. Για την κατασκευή δενδρογραμμάτων συχνή είναι η χρήση των μεθόδων parsimony. Η αρχή των παραπάνω μεθόδων θεωρεί ότι το καταλληλότερο δενδρόγραμμα, από το πλήθος των δυνατών δενδρογραμμάτων, είναι αυτό που απαιτεί το λιγότερο δυνατό επίπεδο εξέλιξης (Allendorf 2007).

Πίνακας 4. Γενετική απόσταση (D, Nei 1972) για πέντε πληθυσμού πέστροφας από λίμνη στην περιοχή Maine των ΗΠΑ. Από: Godt et al 1997.

	FL1	FL2	FL3	SC	NC
FL1	–				
FL2	0.001	–			
FL3	0.003*	0.002*	–		
SC	0.029	0.032	0.030	–	
NC	0.059	0.055	0.060	0.062	–



Εικόνα 1. Δενδρόγραμμα με βάση τον αλγόριθμο UPGMA. Από: Godt et al 1997.

1. 6 Breeding

Στις υδατοκαλλιέργειες υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τον εντοπισμό του γενετικού πολυμορφισμού ο οποίος έχει επιπτώσεις στη φυσική επιλογή. Υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό των γενετικών τύπων οι οποίοι καθορίζουν ποσοτικά χαρακτηριστικά (π.χ βάρος, μήκος). Το πρόβλημα με τα παραπάνω είναι ότι στην πληθώρα των περιπτώσεων τα ποσοτικά χαρακτηριστικά ελέγχονται από πολλαπλούς γενετικούς τύπους οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα να είναι και δύσκολο να προσδιοριστούν. Το πρόβλημα γίνεται ακόμα πιο πολύπλοκο καθώς η

γενετική ποικιλομορφία αλληλεπιδρά με το φυσικό περιβάλλον. Αν και η έρευνα βρίσκεται σε πρωταρχικά στάδια ακόμα οι μοριακοί δείκτες που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη χρησιμότητα είναι τα SNPs, Microsatellites και AFLPs. Τα δεδομένα των παραπάνω δεικτών μπορούν να επεξεργαστούν με τα στατικά τεστ του Πιν 4

Πίνακας 5. Περιγραφή διαθέσιμων τεστ για τον προσδιορισμό γενετικών τόπων που επιδρούν στη φυσική επιλογή (Πηγή: Guinand et al 2004)

Όνομασία Τεστ	Προέλευση δεδομένων	Βασική αρχή τεστ	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Lewontin-Krakauer	Multilocus	Παρατηρούμενη διασπορά F_{ST} μεταξύ των γενετικών τόπων	Απλό στη χρήση	Επίδραση δομής των πληθυσμών. Υπάρχουν Δημοσιεύσεις μόνο για αλλοένζυμα
Beaumont-Nichols	Multilocus	Κατανομή F_{ST} συναρτήσεσι του ρυθμού μετάλλαξης	Δεν επηρεάζεται από τη δομή του πληθυσμού	Απαιτεί μεγάλο σετ δεδομένων
Vitalis et al	Multilocus	Παρατηρούμενη διασπορά F_{ST} μεταξύ των γενετικών τόπων λαμβάνοντας υπόψη φυλογενετικές πληροφορίες	Εύκολη ανίχνευση γενετικών τόπων στους οποίους επιδρά η επιλογή	Δημοσιεύσεις μόνο για αλλοένζυμα. Απαιτεί μεγάλο σετ δεδομένων
Schlotterer	Multilocus	Στην ποικιλομορφία των επαναλήψεων σε γενετικούς τόπους μικροδορυφόρων	Ειδικά σχεδιασμένο για μικροδορυφόρους. Δεν επηρεάζεται από το ρυθμό μετάλλαξης	Μεγάλος όγκος δεδομένων.
Akey et al	Multilocus	Διασπορά F_{ST} σε SNPs γενετικούς τόπους	Δεν επηρεάζεται από δημογραφικούς παράγοντες	Απαιτεί προϋπάρχουσα γνώση του γονιδιόματος

1.7 Γενικά στοιχεία για τον αχινό (*Paracentrotus lividus*)

Η ζήτηση των αχινών συνεχώς αυξάνεται, κυρίως για να ικανοποιηθεί η Ιαπωνική αγορά. Δυο είδη παραδοσιακά καταναλώνονται στις Μεσογειακές Χώρες το *Paracentrotus lividus* και το *Echinus esculentus*. Παρόμοια είδη καταναλώνονται στη Μέση Ανατολή, ιδίως την Ιαπωνία, τη Χιλή και τη Νέα Ζηλανδία. Λόγω της αυξημένης ζήτησης είδη του Βόρειου Ατλαντικού εισάγονται στην Ιαπωνία, και έχει αναπτυχθεί η αλιεία αχινών στα νερά της Αυστραλίας από Ιαπωνικά πλοία (Thorpe *et al.*, 2000).

Οι γονάδες των αχινών αποτελούν είδος πολυτελείας στις αγορές της Νότιας Ευρώπης (1000 τόνοι ετησίως) και της Ασίας, με ιδιαίτερα υψηλές τιμές (Grosjean *et al.*, 1998). Το 1996 η ποσότητα αχινών που καταγράφηκε στις ιχθυόσκαλες σε παγκόσμιο επίπεδο ανήλθε στους 112.000 τόνους. Η Χιλή κατέχει την πρώτη θέση με 54.000 τόνους ετησίως και ακολουθούν οι ΗΠΑ με 33.000 τόνους, η Ιαπωνία με 14.000, ο Καναδάς με 1.400 τόνους, η Ισλανδία με 923 τόνους και η Νέα Ζηλανδία με 800 τόνους. Στην Ελλάδα τα είδη αχινού που καταναλώνονται κυρίως είναι τα *Sphaerechinus spp.*, *Paracentrotus spp.* και *Psammechinus spp.* (Keesing & Hall, 1998). Επίσημα στοιχεία για τις

αλιευμένες ποσότητες στην χώρα μας δεν υπάρχουν. Ωστόσο εκτιμάται ότι αλιεύονται το χρόνο πάνω 7,5 tn (Βαφείδης, αδημοσίευτα στοιχεία). Στη χώρα μας υπάρχει νομοθεσία που απαγορεύει την αλιεία του αχινού σε ορισμένες περιοχές, ενώ υπάρχουν επίσης όρια ως προς το μέγεθος των αλιευμένων ατόμων (86/98 FEK 78).

Το *Paracentrotus lividus* απαντάται μέχρι βάθος 60 m και αλιεύεται συνήθως χρησιμοποιώντας καταδυτικό εξοπλισμό. Εξαιτίας της πίεσης που δέχονται τα αποθέματα του αχινού καθώς και εξαιτίας της εμπορικής του αξίας τα τελευταία χρόνια παρατηρούνται σε παγκόσμιο επίπεδο προσπάθειες ελεγχόμενης εκτροφής του. Στην εργασία των Guidetti et al (2004) εμφανίστηκε το φαινόμενο ύπαρξης μικρότερου μεγέθους αχινών σε περιοχές όπου λάμβανε χώρα αλιεία τους σε σχέση με περιοχές όπου δεν αλιεύονταν. Ωστόσο η μέση πυκνότητα των ατόμων ήταν ίδια και στην δύο περιπτώσεις συνηγορώντας στην άποψη ότι τα αποθέματα δεν βρίσκονται προς το παρόν τουλάχιστον σε κίνδυνο. Στην χώρα μας βρίσκονται σε εξέλιξη προσπάθειες εκτροφής του είδους, οι οποίες αν και ακόμη βρίσκονται σε πρωταρχικό στάδιο εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα (προσωπική ενημέρωση).

Στο *Paracentrotus lividus* παρατηρούνται δυο κύριες περίοδοι αναπαραγωγής, η άνοιξη και το φθινόπωρο, αλλά σε όλη τη διάρκεια τους έτους παρατηρείται μικρός αριθμός γεννητικών ώριμων ατόμων, ειδικά στις νοτιότερες περιοχές (Pancucci, 1996). Το είδος είναι γονοχωριστικό. Ο διαχωρισμός των αρσενικών και θηλυκών ατόμων γίνεται από το χρώμα των γονάδων. Τα θηλυκά άτομα παρουσιάζουν έντονο πορτοκαλί χρώμα γονάδων σε αντίθεση με τα αρσενικά των οποίων είναι πιο άσπρες. Εκτός των περιόδων αναπαραγωγής υπάρχουν πολλά ανώριμα άτομα των οποίων οι

γονάδες είναι πολύ μικρές και μαύρες ή είναι σχεδόν ανύπαρκτες. Το *Paracentrotus lividus* στην ενήλικη φάση της ζωής του αποτελεί εδραίο οργανισμό με μικρές μετακινήσεις. Ωστόσο οι λάρβες του είναι πλαγκτονοτροφικές γεγονός που του δίνει τη δυνατότητα να μετακινηθεί σε μεγάλες αποστάσεις (Pancucci, 1996). Η διάρκεια της παραπάνω φάσης κυμαίνεται από 20 έως 40 ημέρες περίπου (Duran et al 2004).

1.8 Γενικά στοιχεία για το ασκίδιο (*Microcosmus sabatieri*)

Τα ασκίδια είναι από τα πιο σημαντικά βενθικά είδη της Μεσογείου. Τρέφονται φιλτράροντας το νερό, κυρίως με σωματίδια μεγέθους 0,5-2 μm, αν και υπάρχουν περιπτώσεις όπου δύναται να τραφούν και με μεγαλύτερα σωματίδια. Σε περιπτώσεις όπου εμφανίζονται σε μεγάλους αριθμούς η παρουσία τους έχει μεγάλη επίπτωση στο διαθέσιμο πλαγκτόν και στην οργανική ύλη της περιοχής. Οι Petersen and Riisgård (1992) εκτιμούν ότι οι πληθυσμοί του ασκιδίου *Ciona intestinalis*, προς το τέλος του καλοκαιριού φτάνουν πυκνότητες που τους επιτρέπουν να φιλτράρουν σε καθημερινή βάση όγκο νερού ίσο με αυτόν ενός σχετικά ρηχού Δανέζικου φιόρδ. Οι Harl & Ott (1999) διαπίστωσαν ότι αποικίες ασκιδίων έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν τη διαθεσιμότητα του φυτοπλαγκτού στο νερό σε ολόκληρες παραλίες. Τα ασκίδια καταναλώνονται σε πολλές περιοχές του κόσμου. Ειδικότερα στην Ευρώπη τα εδώδιμα είδη είναι τα *Microcosmus sabatieri* and *Microcosmus vulgaris*. Στην χώρα μας καταναλώνεται το *Microcosmus sabatieri* κυρίως στο νότιο Αιγαίο και ιδιαίτερα στην Κάλυμνο όπου υπάρχουν 35 σκάφη περίπου τα οποία χρησιμοποιούνται για την αλιεία του. Αν και δεν

υπάρχουν επίσημα στοιχεία για τις αλιευμένες ποσότητες εκτιμάται ότι αλιεύονται σε ετήσια βάση 576-768 τόνοι/έτος (Βαφειδής αδημοσίευτα στοιχεία). Οι αλιευμένες ποσότητες καταναλώνονται στην εγχώρια αγορά κυρίως των Δωδεκανήσων χωρίς να λαμβάνουν χώρα εξαγωγές.

Η αναπαραγωγική περίοδος είναι αφυλετική και συνήθως συμπίπτει με την περίοδο στην οποία παρατηρείται και η μεγαλύτερη ανάπτυξη του φυτοπλαγκτόν. Η παραπάνω περίοδος εμφανίζεται το φθινόπωρο στη Μεσόγειο. Οι υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού προκαλούν στρωματοποίηση της θάλασσας με αποτέλεσμα την εξάντληση των αποθεμάτων τροφής για τους βενθικούς οργανισμούς όπως τα ασκίδια. Ωστόσο καθώς οι θερμοκρασίες πέφτουν το φθινόπωρο και ελαττώνεται η ισχύς του θερμοκλινούς παρατηρείται μίξη των θαλάσσιων στρωμάτων με συνέπεια την αφθονία θρεπτικών και την άνθηση της πρωτογενούς παραγωγής (Becerro and Turon 1992; reviewed in Coma et al. 2000). Αν και τα ενήλικα ασκίδια είναι εδραίοι οργανισμοί, όπως και οι αχινοί στα πρώτα στάδια της ζωής του εμφανίζονται με τη μορφή λαρβών οι οποίες διαθέτουν κολυμβητικές ικανότητες. Η διαφορά με τους αχινούς έγκειται στο γεγονός ότι στην προκειμένη περίπτωση οι λάρβες είναι λεκιθοτροφικές γεγονός που περιορίζει τη διάρκεια της παραπάνω μορφής κάτω από τις 12 ώρες. Το *Microcosmus sabatieri* απαντάται μέχρι βάθη 200 μέτρων περίπου.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δειγματοληψία

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν στοιχεία από αχινό (*Paracentrotus lividus*) και ασκίδια (*Microcosmus sabatieri*) τα οποία προήλθαν χρησιμοποιώντας τη μοριακή τεχνική των RAPD.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από επαγγελματίες δύτες, όχι σε μεγάλη απόσταση από τη ξηρά. Οι περιοχές από τις οποίες έγιναν οι δειγματοληψίες είναι:

1. Παγασητικός Κόλπος
2. Αμβρακικός Κόλπος
3. Αστυπάλαια
4. Χαλκιδική
5. Άγιος Νικόλαος
6. Τρίκερι
7. Πλατανιάς
8. Μαλιακός

Για τον αχινό (*Paracentrotus lividus*) συνολικά συλλέχθηκαν 185 άτομα. Στον Παγασητικό Κόλπο πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο του 2005 και συλλέχθηκαν 74 άτομα. Στην Αστυπάλαια πραγματοποιήθηκαν δυο δειγματοληψίες. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε τον Ιούλιο του 2005 και συλλέχθηκαν 21 άτομα και η δεύτερη τον Ιούλιο του 2006 και συλλέχθηκαν 19 άτομα. Η δειγματοληψία στην Χαλκιδική πραγματοποιήθηκε τον Νοέμβριο του 2005 με 32 άτομα και του Αμβρακικού Κόλπου τον ίδιο μήνα με 39 άτομα. Κατά την επεξεργασία με δείκτες RAPD παρατηρήθηκαν 8 γενετικοί τόποι.

Για τα ασκίδια (*Microcosmus sabatieri*) συνολικά συλλέχθηκαν 198 άτομα. Στον Άγιο Νικόλαο πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο του 2005 και συλλέχθηκαν 20 άτομα. Στην Αστυπάλαια πραγματοποιήθηκαν δυο δειγματοληψίες. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε τον Ιούλιο του 2005 και συλλέχθηκαν 32 άτομα και η δεύτερη τον Ιούλιο του 2006 και συλλέχθηκαν 28 άτομα. Η δειγματοληψία στον Πλατανιά πραγματοποιήθηκε τον Νοέμβριο του 2005 με 61 άτομα και στο Τρίκερι με 28 άτομα. Στην δειγματοληψία στο Μαλιακό συλλέχθηκαν 29 άτομα. Κατά την επεξεργασία με δείκτες RAPD παρατηρήθηκαν 11 γενετικοί τόποι.

2.2 Παραδοχές στην επεξεργασία των δεδομένων

Για την επεξεργασία των δεδομένων έγιναν οι παρακάτω υποθέσεις:

1. Στο σκοράρισμα το 1 αναπαριστά παρουσία μπάντας στο gel της ηλεκτροφόρισης και το 0 απουσία μπάντας.
2. Σε όλους τους γενετικούς τόπους παρουσιάζεται κυριαρχία.
3. Όλοι οι γενετικοί τόποι μπορούν να έχουν μέχρι δύο αλληλόμορφα.

4. Αλληλόμορφα από διαφορετικούς τόπους δεν εμφανίζονται στην ίδια θέση στο gel της ηλεκτροφόρησης.
5. Όλοι οι τόποι ακολουθούν τους μεντελικούς κανόνες κληρονομικότητας.
6. Οι πληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Η τελευταία υπόθεση είναι απαραίτητη, καθώς δεν είναι δυνατή η διάκριση των ομοζύγων στο κυρίαρχο αλληλόμορφο από τα ετεροζύγωτα, σε στοιχεία που προέρχονται από την τεχνική των RAPD (Apte et al 2003).

2.3 Επεξεργασία δεδομένων

Για την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά:

2.3.1 GenAlEx

Αποτελεί add-in του Excel με δυνατότητες επεξεργασίας στοιχείων από codominant και dominant markers. Με το παραπάνω λογισμικό υπολογίστηκαν

- Οι συχνότητες των αλληλόμορφων σε κάθε γενετικό τόπο σε όλους τους πληθυσμούς και η αναμενόμενη ετεροζυγωτία για dominant markers.
- Το ποσοστό των πολυμορφικών γενετικών τόπων
- Σχεδίαση αναμενόμενης ετεροζυγωτίας για dominant δείκτες.
- Πίνακες γενετικής απόστασης σε όλους τους πληθυσμούς για dominant δείκτες με βάση τη μέθοδο του Huff et al 1993.
- Ο δείκτης γενετικής απόστασης D κατά Nei.

- Πίνακες γενετικής απόστασης και γενετικής ομοιότητας για όλους τους πληθυσμούς με βάση το δείκτη D κατά Nei.
- AMOVA με βάση τις μεθόδους των Excoffier et al (1992). Από τις παραπάνω αναλύσεις υπολογίστηκε ο δείκτης Φ_{PT} ο οποίος είναι ο αντίστοιχος του F_{ST} για dominant markers. Ο δείκτης Φ_{PT} είναι χρήσιμος και για τη σύγκριση δεδομένων από codominant markers με dominant. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο δείκτης Φ_{PT} υπολογίστηκε από τους πίνακες γενετικής απόστασης της μεθόδου των Huff et al (1993) καθώς η AMOVA χρειάζεται μετρήσεις απόστασης που βασίζονται στην Ευκλείδεια γεωμετρία (Peakall & Smouse 2005).
- Από το δείκτη Φ_{PT} υπολογίστηκε η γονιδιακή ροή Nm σύμφωνα με τους Peakall & Smouse (2005).

2.3.2 TFPGA

Αποτελεί από ένα από τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα λογισμικά για επεξεργασία δεδομένων από RAPD. Επίσης έχει τη δυνατότητα για επεξεργασία δεδομένων από codominant markers. Με το παραπάνω λογισμικό υπολογίστηκαν :

- Δείκτες ετεροζυγωτίας σε κάθε γενετικό τόπο και σε όλους τους πληθυσμούς. Το λογισμικό υπολογίζει ετεροζυγωτία, unbiased ετεροζυγωτία και direct count ετεροζυγωτία.
- Ποσοστά πολυμορφισμού.
- Υπολογισμός του δείκτη θ οποίος είναι αντίστοιχος του F_{ST} για δεδομένα από dominant markers. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική jackknifing για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης και η

τεχνική bootstrap (1000 replication) για να δώσει ανώτερο και κατώτερο επίπεδο της θ κάτω από επίπεδο σημαντικότητας 95%.

- Υπολογισμός των δεικτών γενετικής απόστασης κατά Nei (original και unbiased 1972,1978 αντίστοιχα) και κατά Rogers (modified από Wright 1978).
- Κατασκευή δενδρογραμμάτων με τη μέθοδο UPGMA για τους παραπάνω δείκτες γενετικής απόστασης.
- Exact tests για έλεγχο της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των υπό εξέταση πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τις συχνότητες των αλληλόμορφων. Χρησιμοποιώντας το Fisher's Combined Probability test δίνεται και η πιθανότητα P της μηδενικής υπόθεσης (H_0 : οι πληθυσμοί δεν διαφέρουν) για κάθε γενετικό τόπο. Στα παραπάνω το demorization step ρυθμίστηκε στο 1000, number of batces στο 10 και permutation per batch στο 2000.

2.3.3 PopGene

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απλοειδή ή διπλοειδή δεδομένα που προέρχονται από dominant ή codominant markers. Με το παραπάνω λογισμικό υπολογίστηκαν :

- Συχνότητες αλληλόμορφων για κάθε πληθυσμό σε όλους τους γενετικούς τόπους.
- Εντοπισμός γενετικών τόπων που εμφανίζουν πολυμορφισμό.
- Ο δείκτης h (gene diversity, Nei 1973) για κάθε γενετικό τόπο.
- Ο δείκτης I (Shannon Information Index, Lewontin 1972). Ο παραπάνω δείκτης είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για συγκρίσεις δεδομένων RAPD με

δεδομένα από codominant markers όπως π.χ αλλοένζυμα (Nguyen et al 2005).

- Ο δείκτης G_{ST} , ο οποίος είναι αντίστοιχος του F_{ST} .
- Η γονιδιακή ροή Nm από το δείκτη G_{ST} .
- Δείκτες γενετικής απόστασης (original και unbiased, Nei 1972, 1978).
- Κατασκευή δενδρογραμμάτων με τη μέθοδο UPGMA για τους παραπάνω δείκτες γενετικής απόστασης.
- Homogeneity πληθυσμιακά τεστ.

2.3.4 Phylip

Από τα πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενα λογισμικά στον εντοπισμό φυλογενετικών σχέσεων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή δενδρογραμμάτων και genetic distance matrix. Το παραπάνω λογισμικό αποτελείται από 30 διαφορετικά προγράμματα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω προγράμματα:

- Neighbor για την κατασκευή δενδρογραμμάτων με τη μέθοδο UPGMA και Neighbor Joining.

2.3.5 Arlequin

Λογισμικό με μεγάλες δυνατότητες στην επεξεργασία δεδομένων κυρίως από codominant markers, καθώς περιέχει μεθόδους ανάλυσης δεδομένων που δεν συναντώνται σε άλλα λογισμικά. Καθώς το Arlequin σε αντίθεση με τα προηγούμενα λογισμικά δεν παρέχει δυνατότητα επεξεργασίας δεδομένων από RAPD τα πρωτογενή στοιχεία εισήχθησαν με τη μορφή συχνοτήτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν:

- Neutrality tests (Ewens-Watterson homozygosity test, Ewens-Watterson-Slatkin exact test).
- Mantel test για την εύρεση συσχέτισης μεταξύ πινάκων γεωγραφικής απόστασης με πίνακες γενετικής απόστασης.

3. Αποτελέσματα

3.1 Αχινός (*Paracentrotus lividus*)

Όπως έχει αναφερθεί στα RAPD δεν είναι δυνατός ο απευθείας υπολογισμός της ετεροζυγωτίας για αυτό το λόγο ακολουθείται στους υπολογισμούς η μέθοδος των Lynch & Ritland (1999). Ο δείκτης p αναπαριστά την παρουσία μπάντας και ο δείκτης q την απουσία μπάντας, δηλαδή τους γενότυπους AA και aa αντίστοιχα όπου A το κυρίαρχο αλληλόμορφο και a το υποτελές αλληλόμορφο. Στον Πίνακα 6 εμφανίζεται η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e) και οι συχνότητες των αλληλόμορφων στους υπό εξέταση γενετικούς τόπους όλων των πληθυσμών. Τα υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού παρατηρούνται στα δείγματα από την Αστυπάλαια και τον Αμβρακικό (P 100%) και τα χαμηλότερα στα δείγματα από τη Χαλκιδική (P 25%) (Πίνακας 7). Η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e) παρουσιάζει διαφορά ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο λογισμικό (Πίνακας 7, Εικόνα2). Τα αποτελέσματα από το λογισμικό GenAlEx δείχνουν ότι τα δείγματα του Παγασητικού έχουν H_e $0,338 \pm 0,077$, της Χαλκιδικής $0,12 \pm 0,079$, της Αστυπάλαιας (2005) $0,482 \pm 0,009$, της Αστυπάλαιας (2006) $0,448 \pm 0,022$ και του Αμβρακικού $0,468 \pm 0,012$. Στο TFGA υπολογίστηκαν τρεις διαφορετικοί δείκτες

ετεροζυγωτίας (Πίνακας 7). Κανένας από τους χρησιμοποιούμενους δείκτες δεν δίνει τα ίδια αποτελέσματα. Ωστόσο όλοι οι δείκτες δίνουν ότι ο πληθυσμός από τη Χαλκιδική έχει τα χαμηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας. Επίσης όλοι οι δείκτες συμφωνούν ότι ο πληθυσμός από την Αστυπάλαια (2005) παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας. Ο δείκτης direct count από το TFGA δίνει ίδια ποσοστά ετεροζυγωτίας για τον πληθυσμό από την Αστυπάλαια (2005) και από τον Αμβρακικό. Στο PopGene υπολογίστηκαν επιπλέον το effective number αλληλόμορφα, ο δείκτης gene diversity (Nei 1973) και ο δείκτης Shannon για κάθε γενετικό τόπο ξεχωριστά και για όλους τους πληθυσμούς (Πίνακας 8,9,10,11,12) . Ο τελευταίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη σύγκριση δεδομένων από codominant markers με δεδομένα από dominant markers.

Πίνακας 6. Συχνότητες αλληλόμορφων και αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e).

Πηγή: GenAlEx.

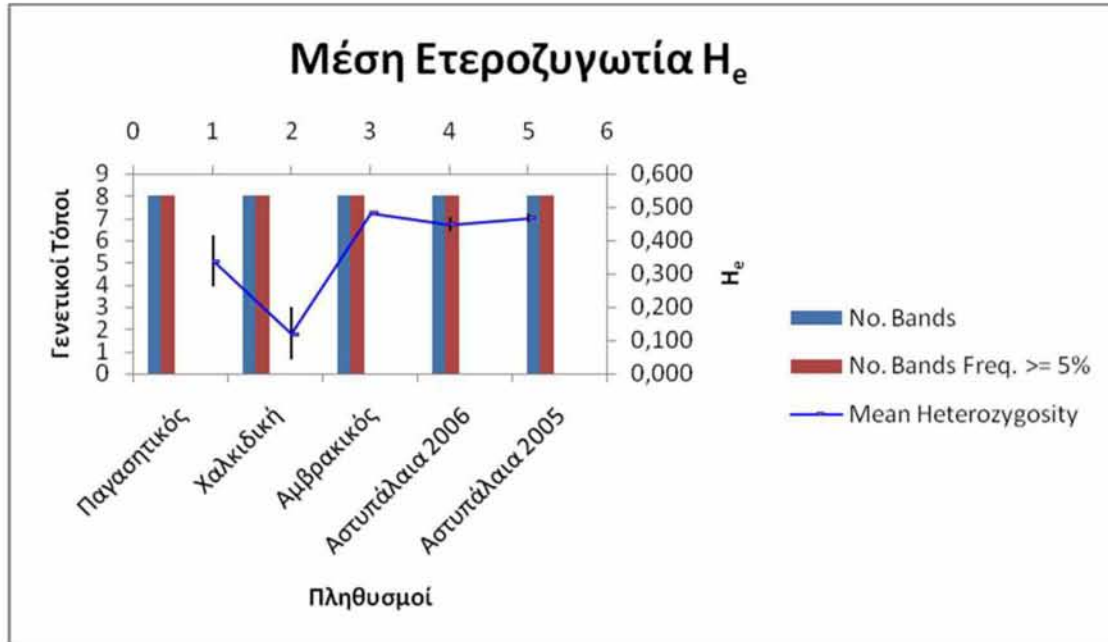
Πληθυσμός	Γενετικός Τόπος	N	p	q	H_e
Παγασητικός	Locus1	74	0,565	0,435	0,492
	Locus2	74	1,000	0,000	0,000
	Locus3	74	1,000	0,000	0,000
	Locus4	74	0,493	0,507	0,500
	Locus5	74	0,521	0,479	0,499
	Locus6	74	0,768	0,232	0,357
	Locus7	74	0,768	0,232	0,357
	Locus8	74	0,535	0,465	0,498
Χαλκιδική	Locus1	32	1,000	0,000	0,000
	Locus2	32	1,000	0,000	0,000
	Locus3	32	1,000	0,000	0,000
	Locus4	32	0,414	0,586	0,485
	Locus5	32	1,000	0,000	0,000
	Locus6	32	1,000	0,000	0,000
	Locus7	32	1,000	0,000	0,000
	Locus8	32	0,605	0,395	0,478
Αμβρακικός	Locus1	21	0,512	0,488	0,500
	Locus2	21	0,465	0,535	0,498

	Locus3	21	0,564	0,436	0,492
	Locus4	21	0,465	0,535	0,498
	Locus5	21	0,383	0,617	0,473
	Locus6	21	0,310	0,690	0,428
	Locus7	21	0,465	0,535	0,498
	Locus8	21	0,622	0,378	0,470
Αστυπάλαια 2006	Locus1	19	0,771	0,229	0,354
	Locus2	19	0,676	0,324	0,438
	Locus3	19	0,603	0,397	0,479
	Locus4	19	0,603	0,397	0,479
	Locus5	19	0,603	0,397	0,479
	Locus6	19	0,487	0,513	0,500
	Locus7	19	0,487	0,513	0,500
	Locus8	19	0,771	0,229	0,354
Αστυπάλαια 2005	Locus1	39	0,547	0,453	0,496
	Locus2	39	0,608	0,392	0,477
	Locus3	39	0,608	0,392	0,477
	Locus4	39	0,547	0,453	0,496
	Locus5	39	0,576	0,424	0,488
	Locus6	39	0,680	0,320	0,435
	Locus7	39	0,608	0,392	0,477
	Locus8	39	0,723	0,277	0,401

Πίνακας 7. Τιμές Μέσης Ετεροζυγωτίας (H_e) και ποσοστά πολυμορφισμού.

Πηγή GenAlEx, TFPGA, PopGene.

Πληθυσμός	Παγασητικός	Αμβρακικός	Χαλκιδική	Αστυπάλαια 2006	Αστυπάλαια 2005
H_e (GenAlEx)	0,338	0,12	0,482	0,448	0,468
H_e (TFPGA)	0,341	0,128	0,511	0,483	0,476
H_e unbiased (TFPGA)	0,343	0,13	0,523	0,496	0,483
H_e direct count (TFPGA)	0,34	0,117	0,47	0,447	0,471
Πολυμορφισμός (%)	75,00	25,00	100,00	100,00	100,00



Εικόνα 2. Μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e). Πηγή GenAlEx.

Πίνακας 8. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Παγασητικού. Πηγή PopGene. * n_a = Παρατηρούμενος αριθμός αλληλόμορφων. * n_e = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τόπος	n_a^*	n_e^*	h^*	I^*
Locus1	2,000	1,4426	0,3068	0,4850
Locus2	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Locus3	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Locus4	2,0000	1,6172	0,3817	0,5696
Locus5	2,0000	1,5478	0,3539	0,5389
Locus6	2,0000	1,1139	0,1023	0,2103
Locus7	2,0000	1,1139	0,1023	0,2103
Locus8	2,0000	1,5127	0,3389	0,5221
Μέσος	1,7500	1,2935	0,1982	0,3170
S.D	0,4629	0,2609	0,1632	0,2412

Πίνακας 9. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Χαλκιδικής. Πηγή PopGene. * n_a = Παρατηρούμενος αριθμός αλληλόμορφων. * n_e = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τόπος	n_a^*	n_e^*	h^*	I^*
Locus1	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000

Locus2	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Locus3	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Locus4	2,0000	1,8221	0,4512	0,6435
Locus5	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Locus6	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Locus7	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Locus8	2,0000	1,3581	0,2637	0,4334
Μέσος	1,2500	1,1475	0,0894	0,1346
S.D	0,4629	0,3000	0,1729	0,2555

Πίνακας 10. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Αμβρακικού. Πηγή PopGene. * na = Παρατηρούμενος αριθμός αλληλόμορφων. * ne = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τόπος	na*	ne*	h*	I*
Locus1	2,0000	1,5694	0,3628	0,5489
Locus2	2,0000	1,6897	0,4082	0,5983
Locus3	2,0000	1,4459	0,3084	0,4869
Locus4	2,0000	1,6897	0,4082	0,5983
Locus5	2,0000	1,8927	0,4717	0,6645
Locus6	2,0000	1,9955	0,4989	0,6920
Locus7	2,0000	1,6897	0,4082	0,5983
Locus8	2,0000	1,3243	0,2449	0,4101
Μέσος	2,0000	1,6621	0,3889	0,5747
S.D	0,0000	0,2191	0,0828	0,0918

Πίνακας 11. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Αστυπάλαιας (2006). Πηγή PopGene. * na = Παρατηρούμενος αριθμός αλληλόμορφων. * ne = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τόπος	na*	ne*	h*	I*
Locus1	2,0000	1,1108	0,0997	0,2062

Locus2	2,0000	1,2321	0,1884	0,3365
Locus3	2,0000	1,3623	0,2659	0,4362
Locus4	2,0000	1,3623	0,2659	0,4362
Locus5	2,0000	1,3623	0,2659	0,4362
Locus6	2,0000	1,6335	0,3878	0,5763
Locus7	2,0000	1,6335	0,3878	0,5763
Locus8	2,0000	1,1108	0,0997	0,2062
Μέσος	2,0000	1,3509	0,2452	0,4013
S.D	0,0000	0,2034	0,1118	0,1441

Πίνακας 12. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Αστυπάλαιας (2005). Πηγή PopGene. * na = Παρατηρούμενος αριθμός αλληλόμορφων. * ne = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τόπος	na*	ne*	h*	I*
Locus1	2,0000	1,4839	0,3261	0,5074
Locus2	2,0000	1,3520	0,2604	0,4293
Locus3	2,0000	1,3520	0,2604	0,4293
Locus4	2,0000	1,4839	0,3261	0,5074
Locus5	2,0000	1,4175	0,2945	0,4706
Locus6	2,0000	1,2256	0,1841	0,3307
Locus7	2,0000	1,3520	0,2604	0,4293
Locus8	2,0000	1,1655	0,1420	0,2712
Μέσος	2,0000	1,3541	0,2567	0,4219
S.D	0,0000	0,1133	0,0650	0,0830

Από τα homogeneity test (Πίνακας 12) φαίνεται ότι οι μόνοι γενετικοί τόποι που δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών είναι ο L4 ($p \approx 0,57$) και ο L8 ($p \approx 0,2$) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,01$.

Πίνακας 13. Homegeneity Test. Πηγή PopGene.

Τόποι/Στατιστικά	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8
χ^2	10,082	25,568	19,059	2,892099	13,439	35,315	17,745	5,566
Df	4	4	4	4	4	4	4	4
P	0,039	0,0	0,001	0,576042	0,009	0,0	0,001	0,234
G^2	15,013	27,788	23,593	2,924974	18,51	31,037	19,268	6,049
Df	4	4	4	4	4	4	4	4
P	0,005	0,0	0,0	0,57	0,001	0,0	0,001	0,196

Με το TFPGA πραγματοποιήθηκαν exact tests για έλεγχο της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των υπό εξέταση πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τις συχνότητες των αλληλόμορφων (Πίνακας 14). Exact tests (Raymond and Rousset 1995). Dememorization steps: 1000, batches: 10, permutations per batch: 2000. Τα αποτελέσματα είναι συγκεντρωτικά ως προς τον κάθε γενετικό τόπο για όλους τους πληθυσμούς. Οι πληθυσμοί Αστυπάλεια 2005 και Αστυπάλεια 2006 δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επίσης οι πληθυσμοί Αστυπάλεια 2005 και Χαλκιδική καθώς και οι Αστυπάλεια 2006 και Χαλκιδική δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,01$.

Πίνακας 14. Τιμές P από Exact test. Πηγή TFPGA

Παγασητικός	Χαλκιδική	Αμβρακικός	Αστυπάλεια 2006	Αστυπάλεια 2005	
*****					Παγασητικός
0,0143	*****				Χαλκιδική
0,0000	0,0000	*****			Αμβρακικός
0,0005	0,0001	0,4643	*****		Αστυπάλεια 2006
0,0006	0,0001	0,0854	0,9344	*****	Αστυπάλεια

Με το λογισμικό Arlequin 3.11 έγιναν neutrality test, για να διαπιστωθεί αν οι υπό εξέταση πληθυσμοί βρίσκονται κάτω από την επίδραση της φυσικής επιλογής. Πιο συγκεκριμένα έγιναν τα τεστ *Ewens-Watterson homozygosity* και *Ewens-Watterson-Slatkin exact*. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα δεδομένα εισήχθησαν με τη μορφή συχνοτήτων για κάθε απλότυπο καθώς το Arlequin δεν έχει τη δυνατότητα επεξεργασίας δεδομένων τα οποία προέρχονται από dominant markers όπως τα RAPD. Στα παραπάνω τεστ η μηδενική υπόθεση θεωρεί ότι στους πληθυσμούς δεν ασκείται εξελικτική πίεση. Στον Πίνακα 15 δίνονται οι τιμές της πιθανότητας p για τον κάθε πληθυσμό και για τα δύο τεστ. Κάτω από επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,01$ παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μόνο για τον πληθυσμό του Παγασητικού για την p που δίνει το τεστ του Slatkin ($p < 0,01$). Ωστόσο στο αντίστοιχο τεστ του Watterson δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p > 0,01$).

Πίνακας 15. Neutrality test. Πηγή Arlequin 3.11. *** στατιστικώς σημαντικές διαφορές

	Παγασητικός	Χαλκιδική	Αμβρακικός	Αστυπάλαια 2005	Αστυπάλαια 2006
Watterson p-value	0,049	1,00	0,11	0,987	0,783
Slatkin's exact p-value	0,003**	0,999	0,113	0,987	0,588

Η AMOVA που εκτελέστηκε από το λογισμικό GenAlEx (Πίνακας 16) έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του γενετικού πολυμορφισμού οφείλεται σε διαφορές μέσα στους πληθυσμούς (92%) και κατόπιν σε διαφορές μεταξύ πληθυσμών που ανήκουν σε μια περιοχή (4%) και σε σε διαφορές μεταξύ περιοχών (4%). Οι τιμές του συντελεστή F_{PT} παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα δυαδικής αντιστοίχισης (Πίνακας 16). Από τις παραπάνω τιμές

φαίνεται ότι τα δείγματα από Αστυπάλαια 2006 και Αστυπάλαια 2005 δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για το δείκτη Φ_{PT} ($p=0,402$). Για όλα τα υπόλοιπα δείγματα προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς το δείκτη Φ_{PT} σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,01$. Οι μεγαλύτερες τιμές για τον συντελεστή Φ_{PT} παρατηρήθηκαν μεταξύ Παγασητικού και Αμβρακικού (0,141) και μεταξύ Χαλκιδικής και Αμβρακικού (0,246). Από το μενού F-Statistics του προγράμματος TFPGA υπολογίστηκε, θεωρώντας ότι οι πληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, ο μέσος συντελεστής θ για όλους τους πληθυσμούς ο οποίος βρέθηκε ίσος με **0,17**. Με την τεχνική jackknifing υπολογίστηκε η μέση τιμή του $\theta=0,168\pm 0,0436$ με επίπεδο σημαντικότητας 95%. Από τον συντελεστή Φ_{PT} υπολογίστηκε η γονιδιακή ροή (Nm) (Πίνακας 17). Με εξαίρεση την ευνόητη ροή που παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών της Αστυπάλαιας (2005 και 2006) η μεγαλύτερη γονιδιακή ροή μεταξύ Παγασητικού και Αστυπάλαιας 2005. Η μικρότερη γονιδιακή ροή παρατηρείται μεταξύ Χαλκιδικής και Αμβρακικού (Nm=0,767).

Πίνακας 16. Αποτελέσματα AMOVA. Πηγή GenAlEx.

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%	Stat	Value	Prob
AmongRegions	2	9,048	4,524	0,042	4%	Φ_{ST}	0,043	0,001
Among Pops/Regions	2	4,235	2,118	0,038	4%	Φ_{CT}	0,040	0,005
Within Pops	180	161,463	0,897	0,897	92%	Φ_{PT}	0,082	0,001

Πίνακας 17. Τιμές του δείκτη Φ_{PT} (κάτω από τη διαγώνιο) και των αντίστοιχων πιθανοτήτων P (τιμές πάνω από τη διαγώνιο, οι τιμές βασίστηκαν σε permutation τιμής 999). Πηγή GenAlEx.

	Παγασητικός	Χαλκιδική	Αμβρακικός	Αστυπάλαια 2006	Αστυπάλαια 2005
Παγασητικός	0,000	0,008	0,001	0,009	0,025

Χαλκιδική	0,053	0,000	0,001	0,002	0,001
Αμβρακικός	0,141	0,246	0,000	0,206	0,020
Αστυπάλαια 2006	0,070	0,138	0,019	0,000	0,402
Αστυπάλαια 2005	0,027	0,085	0,052	0,000	0,000

Πίνακας 18. Γονιδιακή ροή (Nm) μεταξύ πληθυσμών. Πηγή GenAlEx.

	Παγασητικός	Χαλκιδική	Αμβρακικός	Αστυπάλαια 2006	Αστυπάλαια 2005
Παγασητικός	0,000				
Χαλκιδική	4,471	0,000			
Αμβρακικός	1,529	0,767	0,000		
Αστυπάλαια 2006	3,329	1,565	12,781	0,000	
Αστυπάλαια 2005	8,953	2,687	4,596	****	0,000

Με το λογισμικό PopGene υπολογίστηκε στο σύνολο των πληθυσμών για τον κάθε γενετικό τόπο ο δείκτης $G_{ST}=0,089$, ο οποίος είναι αντίστοιχος με τον F_{ST} και στη συνέχεια η γονιδιακή ροή $Nm=5,13$ (Πίνακας 18). Ο γενετικός τόπος L4 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη γονιδιακή ροή (22,238) και ο γενετικός τόπος L6 τη μικρότερη γονιδιακή ροή (1,9695).

Πίνακας 19. Γονιδιακή ροή στον κάθε γενετικό τόπο. Πηγή PopGene.

* $Nm =$ υπολογισμός γονιδιακής ροής από G_{ST} . $Nm = 0.5(1 - G_{ST})/G_{ST}$

Γενετικός Τόπος	Μέγεθος Δείγματος	H_i	H_s	G_{ST}	Nm^*
L1	185	0,2365	0,2191	0,0735	6,2996
L2	185	0,1942	0,1714	0,1174	3,7573

L3	185	0,1807	0,1669	0,0762	6,0596
L4	185	0,3748	0,3666	0,0220	22,2380
L5	185	0,3073	0,2772	0,0980	4,6028
L6	185	0,2942	0,2346	0,2025	1,9695
L7	185	0,2569	0,2317	0,0980	4,6024
L8	185	0,2247	0,2178	0,0304	15,9382
Μέσος		0,2587	0,2357	0,0889	5,1263
St. Dev		0,0041	0,0040		

Οι δείκτες γενετικής απόστασης και γενετικής ομοιότητας (Nei 1972) που υπολογίστηκαν από το GenAlex παρουσιάζονται στον Πίνακα 19. Ο δείκτης γενετικής ομοιότητας υπολογίζεται από τη σχέση $I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$, όπου:

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^k p_{ix} p_{iy}$$

$$J_x = \sum_{i=1}^k p_{ix}^2$$

$J_y = \sum_{i=1}^k p_{iy}^2$ όπου p_{ix} και p_{iy} οι συχνότητες του i αλληλόμορφου στους πληθυσμούς x και y αντίστοιχα. Για πολλαπλούς γενετικούς τόπους αθροίζονται τα αποτελέσματα από τον κάθε γενετικό τόπο και στη συνέχεια το προκύπτων άθροισμα διαιρείται με το συνολικό αριθμό των γενετικών τόπων.

Στη συνέχεια ο δείκτης γενετικής απόστασης υπολογίζεται από τη σχέση:

$$D = -\ln(I).$$

Οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις (D , Nei 1972) παρατηρούνται μεταξύ Παγασητικού και Αστυπάλαιας 2005 ($D=0,061$) και μεταξύ Χαλκιδικής και Αστυπάλαιας 2005 ($D=0,09$). Η μικρότερη γενετική απόσταση παρατηρείται μεταξύ των δειγμάτων από την Αστυπάλεια 2006 και του Αμβρακικού ($D=0,011$) (Πίνακας 20).

Οι τιμές για τη γενετική απόσταση των πληθυσμών (Πίνακας 21 Nei, 1972) που δίνονται από το TFPGA διαφέρουν από αυτές που δίνει το GenAIEx. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις τα δείγματα που παρουσίασαν μεταξύ τους τη μεγαλύτερη γενετική απόσταση ήταν αυτά της Χαλκιδικής με την Αστυπάλαια (2005) σε σχέση με την γενετική απόσταση άλλων πληθυσμών. Με το TFPGA υπολογίστηκαν επίσης και ο δείκτης γενετικής απόστασης unbiased (Πίνακας 22, Εικόνα 4 Nei 1978), ο δείκτης γενετικής απόστασης κατά Rogers (Πίνακας 23, Εικόνα 5, Rogers1972) και ο τροποποιημένος δείκτης του τελευταίου κατά Wright (Πίνακας 24, Εικόνα 6, Wright 1978). Με το λογισμικό rhyllip 3.67 σχεδιάστηκε το δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης (Εικόνα 7) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Neighbour joining.

Πίνακας 20. Γενετική απόσταση πληθυσμών σύμφωνα με το δείκτη D (Nei 1972). Πηγή GenAIEx.

	<i>Παγασητικός</i>	<i>Χαλκιδική</i>	<i>Αμβρακικός</i>	<i>Αστυπάλαια 2006</i>	<i>Αστυπάλαια 2005</i>
Παγασητικός	0,000				
Χαλκιδική	0,014	0,000			
Αμβρακικός	0,061	0,090	0,000		
Αστυπάλαια 2006	0,030	0,033	0,029	0,000	
Αστυπάλαια 2005	0,013	0,023	0,038	0,011	0,000

Πίνακας 21. Γενετική Απόσταση (Nei 1972). Πηγή ΤΡΡΓΑ.

Παγασητικός	Χαλκιδική	Αμβρακικός	Αστυπάλαια 2006	Αστυπάλαια 2005	
*****					Παγασητικός
0,0838	*****				Χαλκιδική
0,1914	0,3937	*****			Αμβρακικός
0,1134	0,1902	0,0557	*****		Αστυπάλαια 2006
0,0791	0,1657	0,0615	0,0266	*****	Αστυπάλαια 2005

Πίνακας 22. Γενετική απόσταση unbiased (Nei 1978). Πηγή ΤΡΡΓΑ.

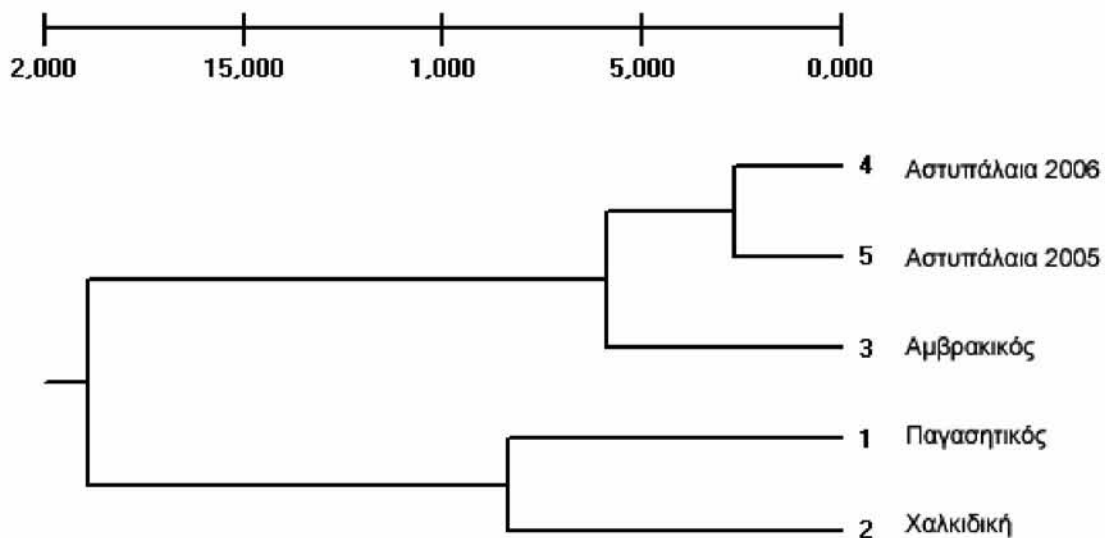
Παγασητικός	Χαλκιδική	Αμβρακικός	Αστυπάλαια 2006	Αστυπάλαια 2005	
*****					Παγασητικός
0,0808	*****				Χαλκιδική
0,1767	0,3797	*****			Αμβρακικός
0,0989	0,1763	0,0301	*****		Αστυπάλαια 2006
0,0714	0,1586	0,0427	0,0079	*****	Αστυπάλαια 2005

Πίνακας 23. Γενετική απόσταση Rogers (1972). Πηγή ΤΡΡΓΑ

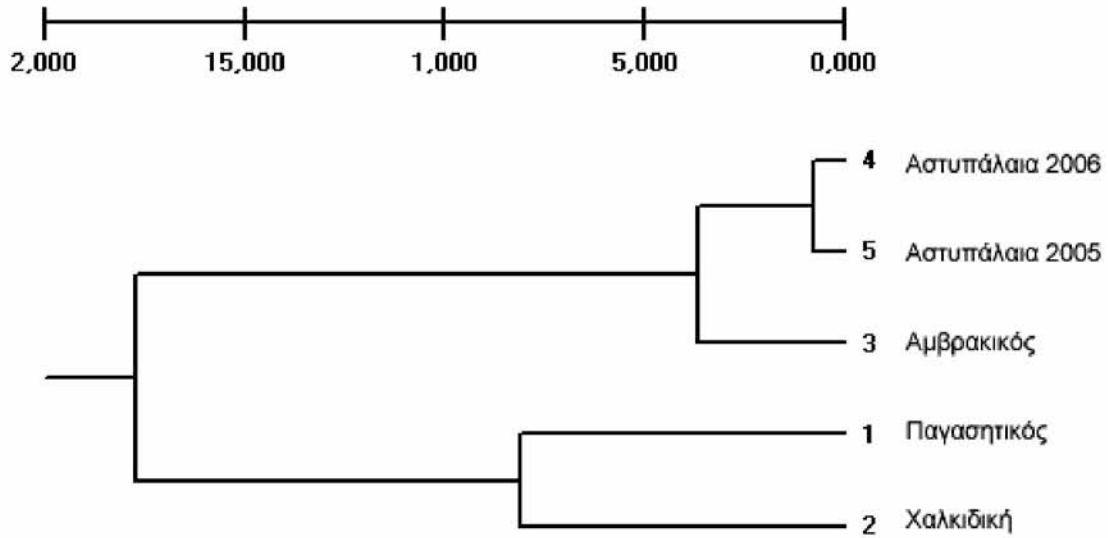
Παγασητικός	Χαλκιδική	Αμβρακικός	Αστυπάλαια 2006	Αστυπάλαια 2005	
*****					Παγασητικός
0,1928	*****				Χαλκιδική
0,2628	0,4295	*****			Αμβρακικός
0,2372	0,3491	0,1492	*****		Αστυπάλαια 2006
0,1689	0,3319	0,1445	0,0906	*****	Αστυπάλαια 2005

Πίνακας 24. Γενετική απόσταση Rogers modification (Wright 1978). Πηγή ΤΡΡΑ.

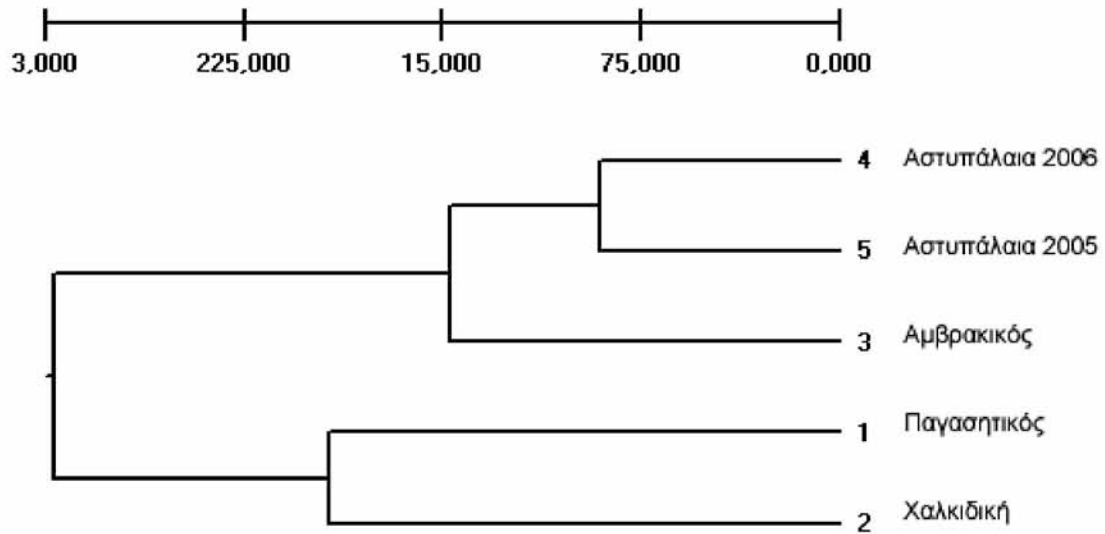
Παγασητικός	Χαλκιδική	Αμβρακικός	Αστυπάλαια 2006	Αστυπάλαια 2005	
*****					Παγασητικός
0,2614	*****				Χαλκιδική
0,3244	0,4899	*****			Αμβρακικός
0,2587	0,3732	0,1657	*****		Αστυπάλαια 2006
0,2204	0,3539	0,1746	0,1170	*****	Αστυπάλαια 2005



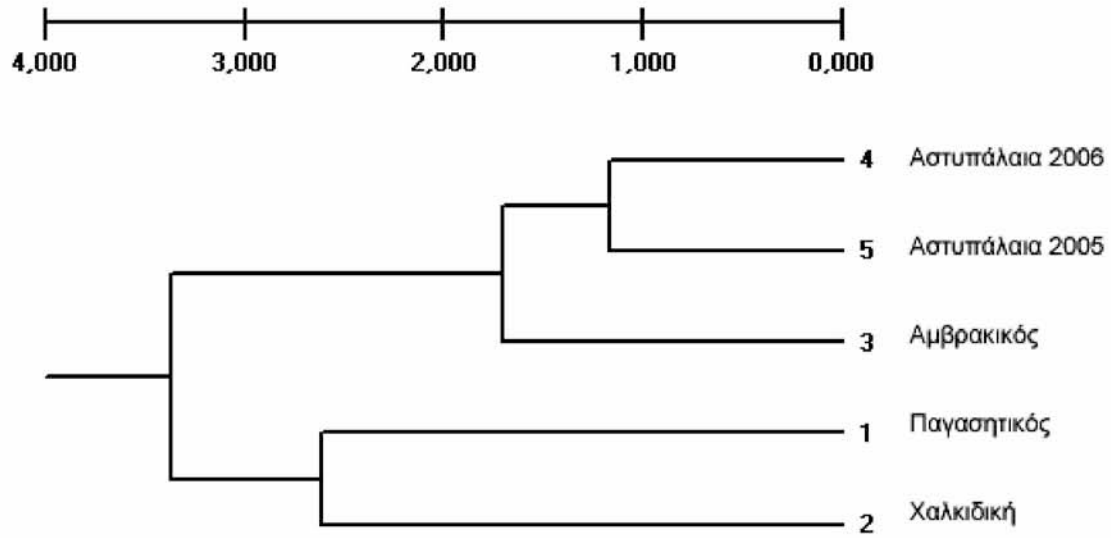
Εικόνα 3. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης (Nei 1972) με τον αλγόριθμο UPGMA. Πηγή ΤΡΡΑ.



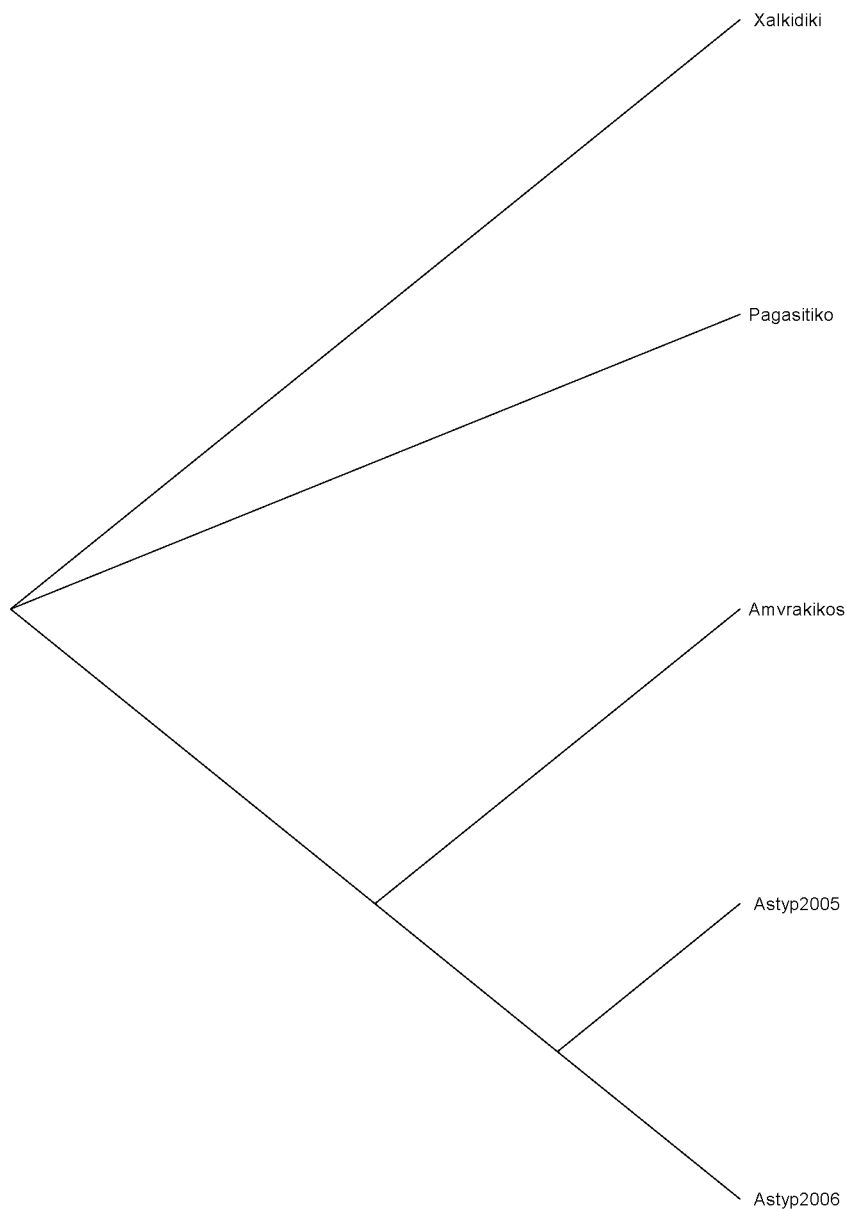
Εικόνα 4. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη unbiased (Nei 1978) με τον αλγόριθμο UPGMA. Πηγή TFPGA.



Εικόνα 5. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη Rogers (Rogers 1972) με τον αλγόριθμο UPGMA.



Εικόνα 6. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη Rogers modified (Wright 1978) με τον αλγόριθμο UPGMA.



Εικόνα 7. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης (Nei 1972) με τον αλγόριθμο Neighbour joining. Πηγή Phylip 3.67.

Τα Mantel test από το Arlequin δεν έδειξαν συσχέτιση μεταξύ γεωγραφικής και γενετικής απόστασης ($r^2=0,3$, $p=0,17$).

3.2 Ασκήδια (*Microcosmus sabatieri*)

Στα RAPD δεν είναι δυνατός ο απευθείας υπολογισμός της ετεροζυγωτίας για αυτό το λόγο ακολουθείται στους υπολογισμούς η μέθοδος των Lynch & Ritland (1999). Ο δείκτης p αναπαριστά την παρουσία μπάντας και ο δείκτης q την απουσία μπάντας, δηλαδή τους γενότυπους AA και aa αντίστοιχα όπου A το κυρίαρχο αλληλόμορφο και a το υποτελές αλληλόμορφο. Στον Πίνακα 25 εμφανίζεται η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e) και οι συχνότητες των αλληλόμορφων στους υπό εξέταση γενετικούς τόπους όλων των πληθυσμών. Τα υψηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού παρατηρούνται στα δείγματα από τον Πλατανιά (90,91%) και στη συνέχεια στα δείγματα από τον Αγ. Νικόλαο (P 60,64%) και τα χαμηλότερα στα δείγματα από το Μαλιακό (P 27,27%) (Πίνακας 24). Η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e) παρουσιάζει διαφορά ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο λογισμικό (Πίνακας 26, Εικόνα 8). Τα αποτελέσματα από το λογισμικό GenAlEx δείχνουν ότι τα δείγματα της Αστυπάλαιας (2005) έχουν H_e 0,241, της Αστυπάλαιας (2006) 0,241, το Τρίκερι 0,163, του Μαλιακού 0,107, του Αγ. Νικολάου 0,295 και του Πλατανιά 0,424. Στο TFPGA υπολογίστηκαν τρεις διαφορετικοί δείκτες ετεροζυγωτίας (Πίνακας 27). Όλοι οι δείκτες δίνουν ότι ο πληθυσμός από το Μαλιακό έχει τα χαμηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας. Επίσης όλοι οι δείκτες συμφωνούν ότι ο πληθυσμός από τον Πλατανιά παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας. Οι πληθυσμοί από την Αστυπάλεια εμφανίζουν τις ίδιες τιμές μεταξύ τους ανεξαρτήτως χρησιμοποιούμενου δείκτη ετεροζυγωτίας. Στο PopGene υπολογίστηκαν επιπλέον το effective number αλληλόμορφα, ο δείκτης gene diversity (Nei 1973) και ο δείκτης Shannon για κάθε γενετικό τόπο ξεχωριστά και για όλους τους πληθυσμούς (Πίνακας 27,28,29,30,31) . Ο

τελευταίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη σύγκριση δεδομένων από codominant markers με δεδομένα από dominant markers.

Πίνακας 25. Συχνότητες αλληλόμορφων και αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e). Πηγή GenAlEx.

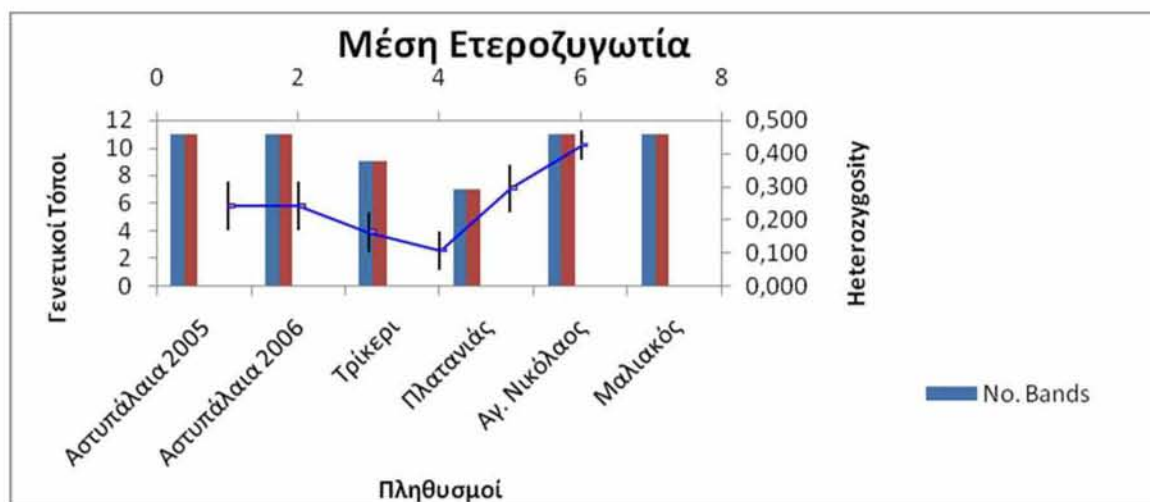
Πληθυσμός	Locus	N	Band Freq.	p	q	He
Αστυπάλαια 2005	Locus1	32	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus2	32	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus3	32	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus4	32	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus5	32	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus6	32	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus7	32	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus8	32	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus9	32	0,500	0,293	0,707	0,414
	Locus10	32	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus11	32	0,250	0,134	0,866	0,232
Αστυπάλαια 2006	Locus1	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus2	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus3	28	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus4	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus5	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus6	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus7	28	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus8	28	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus9	28	0,500	0,293	0,707	0,414
	Locus10	28	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus11	28	0,250	0,134	0,866	0,232
Τρίκερι	Locus1	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus2	28	0,000	0,000	1,000	0,000
	Locus3	28	0,000	0,000	1,000	0,000
	Locus4	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus5	28	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus6	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus7	28	0,500	0,293	0,707	0,414
	Locus8	28	0,500	0,293	0,707	0,414
	Locus9	28	0,250	0,134	0,866	0,232
	Locus10	28	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus11	28	0,250	0,134	0,866	0,232
Πλατανιάς	Locus1	29	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus2	29	0,000	0,000	1,000	0,000
	Locus3	29	0,000	0,000	1,000	0,000

Αγ. Νικόλαος	Locus4	29	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus5	29	0,517	0,305	0,695	0,424
	Locus6	29	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus7	29	0,724	0,475	0,525	0,499
	Locus8	29	0,276	0,149	0,851	0,254
	Locus9	29	0,000	0,000	1,000	0,000
	Locus10	29	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus11	29	0,000	0,000	1,000	0,000
	Locus1	20	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus2	20	0,500	0,293	0,707	0,414
	Locus3	20	1,000	1,000	0,000	0,000
Πλατανιάς	Locus4	20	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus5	20	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus6	20	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus7	20	0,500	0,293	0,707	0,414
	Locus8	20	0,750	0,500	0,500	0,500
	Locus9	20	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus10	20	0,500	0,293	0,707	0,414
	Locus11	20	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus1	61	1,000	1,000	0,000	0,000
	Locus2	61	0,803	0,556	0,444	0,494
	Locus3	61	0,803	0,556	0,444	0,494
Locus4	61	0,803	0,556	0,444	0,494	
Locus5	61	0,803	0,556	0,444	0,494	
Locus6	61	0,607	0,373	0,627	0,468	
Locus7	61	0,902	0,686	0,314	0,431	
Locus8	61	0,902	0,686	0,314	0,431	
Locus9	61	0,590	0,360	0,640	0,461	
Locus10	61	0,803	0,556	0,444	0,494	
Locus11	61	0,492	0,287	0,713	0,409	

Πίνακας 26. Τιμές Μέσης Ετεροζυγωτίας (H_e) και ποσοστά πολυμορφισμού.

Πηγή GenAlEx, TFPGA, PopGene.

Πληθυσμός	Αστυπάλαια	Αστυπάλαια	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
	2005	2006				
H_e (GenAlEx)	0,241	0,241	0,163	0,107	0,295	0,424
H_e (TFPGA)	0,242	0,242	0,166	0,111	0,296	0,426
H_e unbiased (TFPGA)	0,246	0,246	0,169	0,113	0,304	0,43
H_e direct count (TFPGA)	0,239	0,239	0,162	0,103	0,291	0,425
Πολυμορφισμός (%)	54,55	54,55	45,45	27,27	63,64	90,91



Εικόνα 8. Μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e)

Πίνακας 27. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Αστυπάλαιας (2005,2006). Πηγή PopGene. *ne = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τόπος	ne*	h*	I*
Locus1	1,0000	0,0000	0,0000
Locus2	1,0000	0,0000	0,0000
Locus3	1,6	0,3750	0,5623
Locus4	1,0000	0,0000	0,0000
Locus5	1,0000	0,0000	0,0000
Locus6	1,0000	0,0000	0,0000
Locus7	1,6000	0,3750	0,5623
Locus8	1,6000	0,3750	0,5623
Locus9	2,0000	0,5000	0,6931
Locus10	1,6000	0,3750	0,5623
Locus11	1,6000	0,3750	0,5623
Μέσος	1,3636	0,2159	0,3186
S.D	0,3668	0,2098	0,3074

Πίνακας 28. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Τρίκερι. Πηγή PopGene. * ne = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τόπος	ne*	h*	I*
Locus1	1,0000	0,0000	0,0000
Locus2	1,0000	0,0000	0,0000
Locus3	1,6000	0,3750	0,5623
Locus4	1,0000	0,0000	0,0000
Locus5	1,0000	0,0000	0,0000
Locus6	1,0000	0,0000	0,0000
Locus7	1,6000	0,3750	0,5623
Locus8	1,6000	0,3750	0,5623
Locus9	2,0000	0,5000	0,6931
Locus10	1,6000	0,3750	0,5623
Locus11	1,6000	0,3750	0,5623
Μέσος	1,3636	0,2159	0,3186
S.D	0,3668	0,2098	0,3074

Πίνακας 29. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Μαλιακού. Πηγή PopGene.

* ne = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τύπος	ne^*	h^*	I^*
Locus1	1,0000	0,0000	0,0000
Locus2	1,0000	0,0000	0,0000
Locus3	1,0000	0,0000	0,0000
Locus4	1,0000	0,0000	0,0000
Locus5	1,9976	0,4994	0,6926
Locus6	1,0000	0,0000	0,0000
Locus7	1,6653	0,3995	0,5890
Locus8	1,6653	0,3995	0,5890
Locus9	1,0000	0,0000	0,0000
Locus10	1,0000	0,0000	0,0000
Locus11	1,0000	0,0000	0,0000
Μέσος	1,2117	0,1180	0,1701
S.D	0,3725	0,2038	0,2925

Πίνακας 30. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Αγ. Νικόλαος. Πηγή

PopGene. * ne = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τύπος	ne^*	h^*	I^*
Locus1	1,6000	0,3750	0,5623
Locus2	2,0000	0,5000	0,6931
Locus3	1,0000	0,0000	0,0000
Locus4	1,6000	0,3750	0,5623
Locus5	1,6000	0,3750	0,5623
Locus6	1,0000	0,0000	0,0000
Locus7	2,0000	0,5000	0,6931
Locus8	1,6000	0,3750	0,5623
Locus9	1,0000	0,0000	0,0000
Locus10	2,0000	0,5000	0,6931
Locus11	1,0000	0,0000	0,0000
Μέσος	1,4909	0,2727	0,3935
S.D	0,4230	0,2223	0,3167

Πίνακας 31. Δείκτες Πολυμορφισμού από πληθυσμό Πλατανιά. Πηγή PopGene.
 * n_e = Effective number αλληλόμορφων (Kimura and Crow 1964). * h = Nei's (1973) gene diversity. * I = Shannon's Information index (Lewontin 1972).

Γενετικός Τύπος	n_e^*	h^*	I^*
Locus1	1,0518	0,0492	0,1178
Locus2	1,9216	0,4796	0,6726
Locus3	1,9551	0,4885	0,6816
Locus4	1,1862	0,1570	0,2928
Locus5	1,4496	0,3102	0,4890
Locus6	1,2707	0,2130	0,3693
Locus7	1,6449	0,3921	0,5809
Locus8	1,7432	0,4263	0,6176
Locus9	1,9927	0,4982	0,6913
Locus10	1,4366	0,3039	0,4817
Locus11	1,8615	0,4628	0,6555
Μέσος	1,5922	0,3437	0,5137
S.D	0,3322	0,1510	0,1866

Από τα homogeneity test (Πίνακας 32) φαίνεται όλοι οι γενετικοί τύποι παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους στο σύνολο των πληθυσμών σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,01$.

Πίνακας 32. Homegeneity Test. Πηγή PopGene

Τόποι/Στατιστικά	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11
χ^2	45,653	136,951	112,479	27,407	31,12	61,336	22,243	42,24	57,467	27,618	60,812
df	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G^2	24,168	178,133	141,953	32,985	38,999	64,484	22,647	42,382	76,521	35,037	76,052
df	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
p	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Με το TFPGA πραγματοποιήθηκαν exact tests (Dememorization steps: 1000, batches: 10, permutations per batch: 2000) για έλεγχο της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των υπό εξέταση πληθυσμών, χρησιμοποιώντας τις συχνότητες των αλληλόμορφων (Πίνακας 33). Τα αποτελέσματα είναι συγκεντρωτικά ως προς τον κάθε γενετικό τόπο για όλους τους πληθυσμούς. Οι μόνοι πληθυσμοί για τους οποίους ισχύει η μηδενική υπόθεση, δηλαδή δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους είναι αυτοί που προέρχονται από τα δείγματα Αστυπάλεια 2005 και 2006. Για όλους τους υπόλοιπους πληθυσμούς παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,01$.

Πίνακας 33. Τιμές P από Exact test. Πηγή TFPGA.

	Αστυπάλεια 2005	Αστυπάλεια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Αστυπάλεια 2005	*****					
Αστυπάλεια 2006	1,0000	*****				
Τρίκερι	0,0000	0,0000	*****			
Πλατανιάς	0,0000	0,0000	0,0351	*****		
Αγ. Νικόλαος	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	*****	
Μαλιακός	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	*****

Με το λογισμικό Arlequin 3.11 έγιναν neutrality test, για να διαπιστωθεί αν οι υπό εξέταση πληθυσμοί βρίσκονται κάτω από την επίδραση της φυσικής επιλογής. Πιο συγκεκριμένα έγιναν τα τεστ *Ewens-Watterson homozygosity* και *Ewens-Watterson-Slatkin exact*. Στα παραπάνω τεστ η μηδενική υπόθεση θεωρεί ότι στους πληθυσμούς δεν ασκείται εξελικτική πίεση. Στον Πίνακα 34 δίνονται οι τιμές της πιθανότητας p για τον κάθε πληθυσμό και για τα δύο τεστ. Κάτω από επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,01$ δεν παρατηρούνται στατιστικώς

σημαντικές διαφορές σε όλους τους πληθυσμούς εκτός από τους πληθυσμούς στην Αστυπάλεια 2005 και Αστυπάλεια 2006. Στους υπόλοιπους πληθυσμούς δηλαδή Τρίκερι, Πλατανιά, Άγιο Νικόλαο και Μαλιακό απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση και βγαίνει το συμπέρασμα ότι στους παραπάνω πληθυσμούς επιδρά η φυσική επιλογή.

Πίνακας 34. Neutrality test. Πηγή Arlequin 3.11

	Αστυπάλεια 2005	Αστυπάλεια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Watterson p-value	0,063	0,037	0,00***	0,002***	0,00***	0,00***
Slatkin's exact p-value	0,05	0,034	0,00***	0,002***	0,00***	0,00***

*** στατιστικώς σημαντικές διαφορές

Η AMOVA που εκτελέστηκε από το λογισμικό GenAlEx (Πίνακας 35) έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του γενετικού πολυμορφισμού οφείλεται σε διαφορές μέσα στους πληθυσμούς (62%) και κατόπιν σε διαφορές μεταξύ πληθυσμών που ανήκουν σε μια περιοχή (37%) και σε σε διαφορές μεταξύ περιοχών (1%). Οι τιμές του συντελεστή F_{PT} παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα δυαδικής αντιστοίχισης (Πίνακας 33). Από τις παραπάνω τιμές φαίνεται ότι τα μόνα δείγματα που δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά για το δείκτη F_{PT} ($p=0,325$) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,01$ είναι από Αστυπάλεια 2006 και Αστυπάλεια 2005. Για όλα τα υπόλοιπα δείγματα προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς το δείκτη F_{PT} . Από το μενού F-Statistics του προγράμματος υπολογίστηκε, θεωρώντας ότι οι πληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, ο μέσος συντελεστής θ για όλους τους πληθυσμούς ο οποίος βρέθηκε ίσος με **0,363**. Με την τεχνική jackknifing

υπολογίστηκε η μέση τιμή του $\theta=0,362\pm 0,06$ με επίπεδο σημαντικότητας 95%. Η μεγαλύτερη γονιδιακή ροή (Πίνακας 34) παρατηρείται μεταξύ Αστυπάλαιας (2006) και Πλατανιά ($Nm=2,56$) και μεταξύ Αστυπάλαιας (2005) και Πλατανιά ($Nm=2,469$). Η μικρότερη γονιδιακή ροή παρατηρείται μεταξύ Μαλιακού και Αγ. Νικολάου.

Πίνακας 35. Αποτελέσματα AMOVA. Πηγή GenAlEx.

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%	Stat	Value	Prob
AmongRegions	3	116,913	38,971	0,776	37%	Φ_{ST}	0,366	0,001
Among Pops/Regions	2	3,984	1,992	0,023	1%	Φ_{CT}	0,017	0,144
Within Pops	192	253,401	1,320	1,320	62%	Φ_{PT}	0,377	0,001

Πίνακας 36. Τιμές του δείκτη Φ_{PT} (κάτω από τη διαγώνιο) και των αντίστοιχων πιθανοτήτων P (τιμές πάνω από τη διαγώνιο, οι τιμές βασίστηκαν σε permutation τιμής 999). Πηγή GenAlEx.

	Αστυπάλεια 2005	Αστυπάλεια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Αστυπάλεια 2005	0,000	0,325	0,001	0,001	0,001	0,001
Αστυπάλεια 2006	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001
Τρίκερι	0,435	0,434	0,000	0,016	0,001	0,001
Πλατανιάς	0,548	0,552	0,110	0,000	0,001	0,001
Αγ. Νικόλαος	0,328	0,324	0,510	0,650	0,000	0,001
Μαλιακός	0,092	0,089	0,388	0,478	0,218	0,000

Πίνακας 37. Γονιδιακή ροή (Nm) μεταξύ πληθυσμών. Πηγή GenAlEx.

	Αστυπάλαια 2005	Αστυπάλαια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Αστυπάλαια 2005	0,000					
Αστυπάλαια 2006	***	0,000				
Τρίκερι	0,325	0,326	0,000			
Πλατανιάς	0,206	0,203	2,029	0,000		
Αγ. Νικόλαος	0,512	0,521	0,240	0,134	0,000	
Μαλιακός	2,469	2,560	0,394	0,273	0,896	0,000

Με το λογισμικό PopGene υπολογίστηκε στο σύνολο των πληθυσμών για τον κάθε γενετικό τόπο ο δείκτης G_{ST} και στη συνέχεια η γονιδιακή ροή N_m (Πίνακας 38). Ο γενετικός τόπος L7 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη γονιδιακή ροή (4.6418) και ο γενετικός τόπος L2 τη μικρότερη γονιδιακή ροή (0.1895).

Πίνακας 38. Γονιδιακή ροή στον κάθε γενετικό τόπο. Πηγή PopGene.

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ Τόπος	Μέγεθος Δείγματος	H_i	H_s	G_{ST}	N_m^*
L1	198	0,0799	0,0625	0,2174	1,8000
L2	198	0,4949	0,1360	0,7252	0,1895
L3	198	0,4949	0,1777	0,6410	0,2801
L4	198	0,1378	0,1152	0,1643	2,5429
L5	198	0,3159	0,2609	0,1740	2,3734
L6	198	0,1225	0,0795	0,3509	0,9250
L7	198	0,4296	0,3878	0,0972	4,6418
L8	198	0,4522	0,3670	0,1885	2,1530
L9	198	0,4986	0,3098	0,3787	0,8205
L10	198	0,3193	0,2610	0,1827	2,2371
L11	198	0,4681	0,2708	0,4214	0,6865
Μέσος		0,3467	0,2207	0,3633	0,8763
St. Dev		0,0266	0,0128		

* N_m = υπολογισμός γονιδιακής ροής από G_{ST} . $N_m = 0.5(1 - G_{ST})/G_{ST}$.

Ο δείκτης γενετικής απόστασης (Nei 1972) που υπολογίστηκε από το GenAlex παρουσιάζεται στον Πίνακα 39. Για τον υπολογισμό του ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στο δείκτη γενετικής απόστασης στην περίπτωση των αχινών. Οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις (D, Nei 1972) παρατηρούνται μεταξύ Μαλιακού και Αγ. Νικολάου (0,587), μεταξύ Τρίκερι και Αγ. Νικολάου (0,404) και μεταξύ Αστυπάλαιας (2005,2006) και Μαλιακού. Οι πληθυσμοί από την Αστυπάλαια δεν παρουσιάζουν διαφορά μεταξύ τους.

Οι τιμές για τη γενετική απόσταση των πληθυσμών (Πίνακας 40, Εικόνα 9 Nei, 1972) που δίνονται από το TFPGA διαφέρουν από αυτές που δίνει το GenAlEx. Ωστόσο και στην προκειμένη περίπτωση η μεγαλύτερη γενετική απόσταση παρατηρείται μεταξύ Μαλιακού και Αγ. Νικολάου και στη συνέχεια μεταξύ Τρίκερι και Αγ. Νικολάου. Με το TFPGA υπολογίστηκαν επίσης και ο δείκτης γενετικής απόστασης unbiased (Πίνακας 41, Εικόνα 10 Nei 1978), ο δείκτης γενετικής απόστασης κατά Rogers (Πίνακας 42, Εικόνα 11, Rogers 1972) και ο τροποποιημένος δείκτης του τελευταίου κατά Wright (Πίνακας 43, Εικόνα 12, Wright 1978). Με το λογισμικό phylip 3.67 σχεδιάστηκε το δένδρογραμμα γενετικής απόστασης (Εικόνα 13) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Neighbour joining.

Πίνακας 39. Γενετική απόσταση πληθυσμών σύμφωνα με το δείκτη D (Nei 1972). Πηγή GenAlEx.

	Αστυπάλαια 2005	Αστυπάλαια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Αστυπάλαια 2005	0,000					
Αστυπάλαια 2006	0,000	0,000				
Τρίκερι	0,241	0,241	0,000			
Πλατανιάς	0,301	0,301	0,030	0,000		
Αγ. Νικόλαος	0,189	0,189	0,404	0,587	0,000	
Μαλιακός	0,047	0,047	0,279	0,353	0,145	0,000

Πίνακας 40. Γενετική Απόσταση (Nei 1972). Πηγή TFRGA

	Αστυπάλαια 2005	Αστυπάλαια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Αστυπάλαια 2005	0,000					
Αστυπάλαια 2006	0,000	0,000				
Τρίκερι	0,2394	0,2388	0,000			
Πλατανιάς	0,2756	0,2741	0,0120	0,000		
Αγ. Νικόλαος	0,4279	0,4363	0,5629	0,6600	0,000	
Μαλιακός	0,1503	0,1514	0,2486	0,2633	0,3454	0,000

Πίνακας 41. Γενετική απόσταση unbiased (Nei 1978). Πηγή TFRGA.

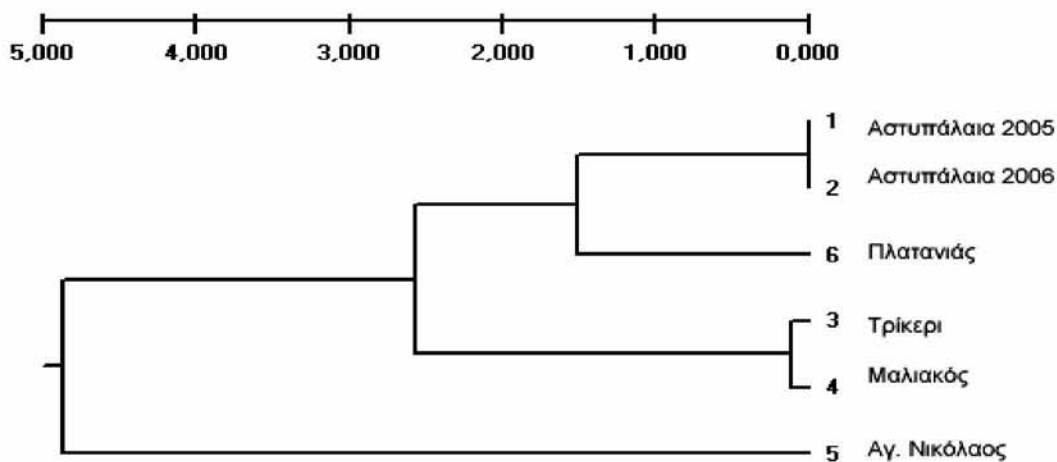
	Αστυπάλαια 2005	Αστυπάλαια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Αστυπάλαια 2005	0,000					
Αστυπάλαια 2006	-,0054	0,000				
Τρίκερι	0,2350	0,2341	0,000			
Πλατανιάς	0,2720	0,2701	0,0091	0,000		
Αγ. Νικόλαος	0,4200	0,4280	0,5556	0,6534	0,000	
Μαλιακός	0,1447	0,1455	0,2437	0,2591	0,3369	0,000

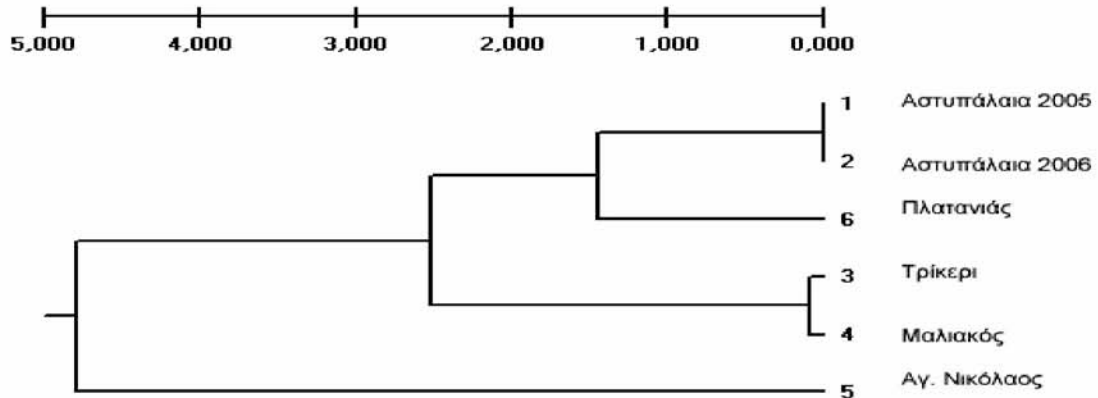
Πίνακας 42. Γενετική απόσταση Rogers (1972). Πηγή TFPGA.

	Αστυπάλαια 2005	Αστυπάλαια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Αστυπάλαια 2005	0,000					
Αστυπάλαια 2006	0,003	0,000				
Τρίκερι	0,284	0,281	0,000			
Πλατανιάς	0,319	0,317	0,069	0,000		
Αγ. Νικόλαος	0,424	0,426	0,453	0,518	0,000	
Μαλιακός	0,24	0,243	0,353	0,3879	0,374	0,000

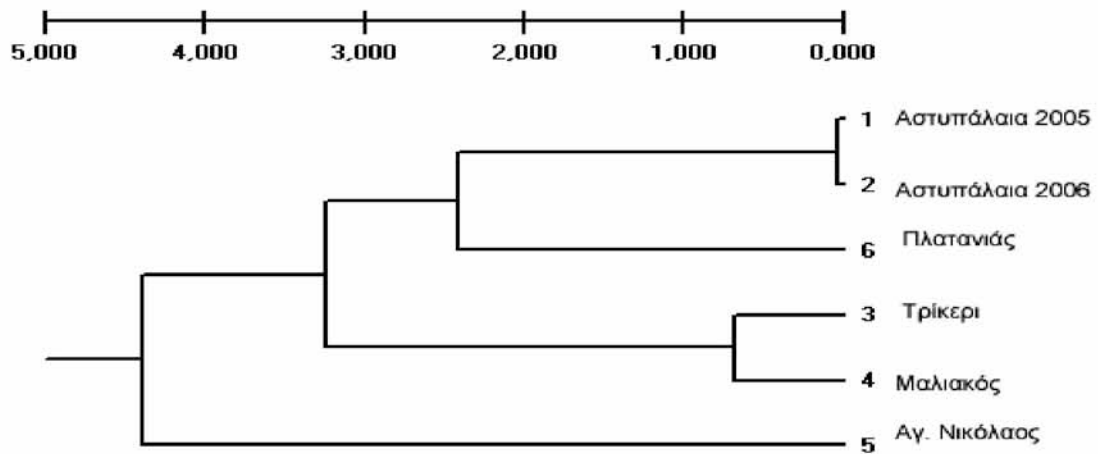
Πίνακας 43. Γενετική απόσταση Rogers modification (Wright 1978). Πηγή TFPGA.

	Αστυπάλαια 2005	Αστυπάλαια 2006	Τρίκερι	Πλατανιάς	Αγ. Νικόλαος	Μαλιακός
Αστυπάλαια 2005	0,000					
Αστυπάλαια 2006	0,0079	0,000				
Τρίκερι	0,4126	0,4121	0,000			
Πλατανιάς	0,4476	0,4466	0,1034	0,000		
Αγ. Νικόλαος	0,5048	0,5087	0,5767	0,6225	0,000	
Μαλιακός	0,3138	0,3148	0,4055	0,4272	0,4346	0,000

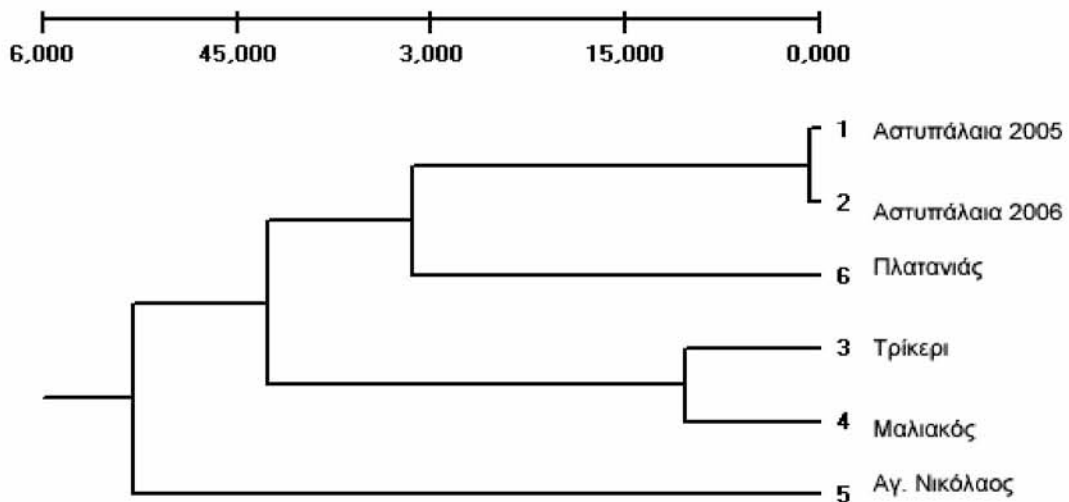
**Εικόνα 9.** Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης (Nei 1972) με τον αλγόριθμο UPGMA. Πηγή TFPGA.



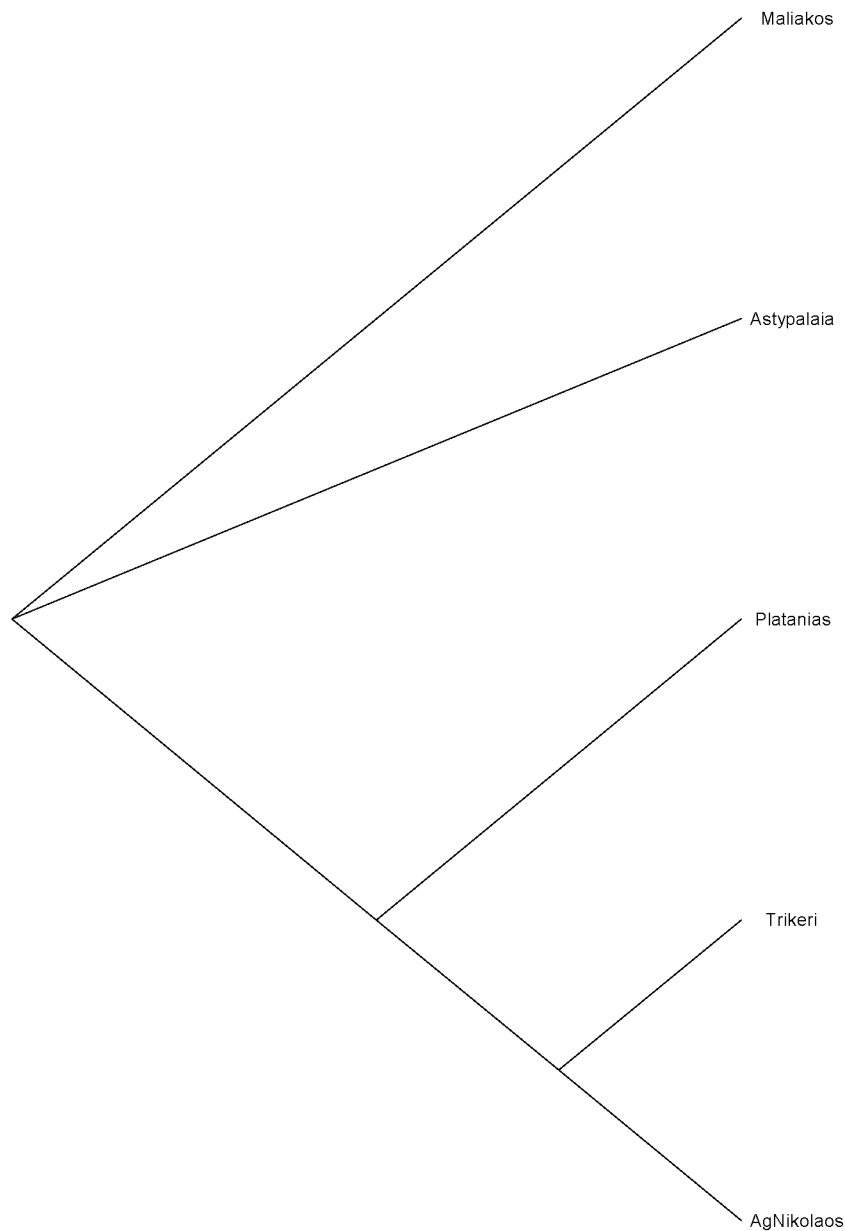
Εικόνα 10. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη unbiased (Nei 1978) με τον αλγόριθμο UPGMA. Πηγή TFPGA.



Εικόνα 11. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη Rogers (Rogers 1972) με τον αλγόριθμο UPGMA. Πηγή TFPGA.



Εικόνα 12. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη Rogers modified (Wright 1978) με τον αλγόριθμο UPGMA. Πηγή TFPGA.



Εικόνα13. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης (Nei 1972) με τον αλγόριθμο Neighbour joining. Πηγή Phylip 3.67.

Τα Mantel test από το Arlequin δεν έδειξαν συσχέτιση μεταξύ γεωγραφικής απόστασης και γενετικής απόστασης ($r^2=0,007$, $p=0,32$).

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία σε πρώτη φάση επιχειρήθηκε να γίνει αξιολόγηση της τεχνικής των RAPD. Η τεχνική των RAPD ήταν αποτελεσματική στον εντοπισμό διαφορών μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών αχινού καθώς και μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών ασκιδίων. Διαφορές δεν ήταν δυνατό να εντοπιστούν μόνο στην περίπτωση των ασκιδίων για το διαχωρισμό του πληθυσμού από την Αστυπάλεια του 2005 με αυτόν της Αστυπάλειας του 2006. Τα RAPD μπορούν να ανιχνεύσουν γενετικό πολυμορφισμό και μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους εκτός από ανίχνευση γενετικού πολυμορφισμού μεταξύ συγγενικών ειδών, παρόλα τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν (Rodrigues et al 2002). Δηλαδή την αδυναμία διαχωρισμού των ομοζύγων στο κυρίαρχο αλληλόμορφο από τα ετεροζύγωτα καθώς και άλλα που έχουν προαναφερθεί. Οι Das et al (2005) χρησιμοποίησαν επιτυχώς την τεχνική των RAPD για τον εντοπισμό γενετικού πολυμορφισμού μεταξύ συγγενικών ειδών κυπρινοειδών του γένους *Labeo* στην Ινδία καθώς και μεταξύ διαφορετικών stock του ίδιου είδους, γεγονός που είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στα breeding programs που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες. Ωστόσο οι Barman et al (2003) στην εξέταση του γενετικού πολυμορφισμού κυπρινοειδών του γένους *Labeo* προτείνουν τα RAPD να χρησιμοποιούνται ως ένα πρώτο βήμα στην εκτίμηση του γενετικού πολυμορφισμού και στη συνέχεια να χρησιμοποιούνται και άλλοι μοριακοί δείκτες. Η τεχνική των RAPD ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική στην εργασία των Basavaraju et al (2007), όπου εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών stock εκτρεφόμενου κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) στην Ινδία.

Οι Yan et al (2005) χρησιμοποίησαν αποτελεσματικά τα RAPD για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ τεχνητά παραγόμενων διπλοειδών ολοθηλυκών ατόμων και τετραπλοειδών ατόμων του κυπρινοειδούς *Carassius auratus* στην Κίνα. Οι Mamuris et al (1997) στην εργασία τους για τον γενετικό πολυμορφισμό στην κουτσουμούρα (*Mullus barbatus*) κατέληξαν ότι τα RAPD είναι πιο αποτελεσματικά από τα αλλοένζυμα, ενώ παράλληλα κατόρθωσαν να συσχετίσουν θετικά το δείκτη γενετικής απόστασης κατά Nei με τις γεωγραφικές αποστάσεις των υπό μελέτη πληθυσμών κάτι που δεν κατέστη δυνατό στην παρούσα εργασία. Οι Borowsky & Vidthaynon (2001) κατόρθωσαν να εντοπίσουν γενετικό πολυμορφισμό σε πληθυσμούς ψαριών γλυκού νερού στην Ταϊλάνδη κάνοντας χρήση των RAPD τη στιγμή που προηγούμενες προσπάθειες με αλλοένζυμα είχαν αποτύχει.

Οι Liu et al (1998) χρησιμοποίησαν με επιτυχία τα RAPD για την εξακρίβωση γενετικού πολυμορφισμού μεταξύ διαφορετικών stock γατόψαρων *Ictalurus punctatus* στις ΗΠΑ εξετάζοντας μεγάλο αριθμό γενετικών τόπων. Στην παραπάνω εργασία τα αποτελέσματα ήταν σε γενικές γραμμές αναπαραγόμενα. Οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι οι μεγαλύτερες μπάντες μπορούσαν να αναπαραχθούν σε μετέπειτα επαναλήψεις της πειραματικής διαδικασίας πιο εύκολα από ότι οι μικρότερου μοριακού βάρους μπάντες. Οι Wasko et al (2004) μελέτησαν το γενετικό πολυμορφισμό άγριων και εκτρεφόμενων πληθυσμών του ψαριού *Brycon cephalus* στη Βραζιλία χρησιμοποιώντας την τεχνική των RAPD. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί παρουσίασαν χαμηλότερο γενετικό πολυμορφισμό και φαινόμενα υψηλής ενδογαμίας σε σχέση με τον άγριο πληθυσμό. Τα χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς

αποδόθηκαν στη συχνή πρακτική των ιχθυοκαλλιεργητών να χρησιμοποιούν μικρό αριθμό ψαριών για γεννήτορες με αποτέλεσμα στις επόμενες γενιές να εμφανίζονται υψηλοί δείκτες ενδογαμίας οι οποίοι έχουν συνδεθεί σε πολλές περιπτώσεις με χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, μειωμένη γονιμότητα, ευαισθησία σε παθογόνους μικροοργανισμούς κ.α.

Τα RAPD αποδείχθηκαν αποτελεσματικά στην εργασία των Callejas & Ochando (1998, 2001) για τον διαχωρισμό 8 συγγενικών ειδών του γένους *Barbus* στην Ιβηρική χερσόνησο των οποίων ο διαχωρισμός με μορφολογικά κριτήρια είναι ιδιαίτερα δύσκολος. Πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο έπειτα από αποτελεσματικό διαχωρισμό των παραπάνω συγγενικών ειδών και των πληθυσμών που αποτελούν το κάθε είδος είναι δυνατός ο σχεδιασμός αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης των ιχθυαποθεμάτων με στόχο την αειφορική ανάπτυξη. Οι Jug et al (2004) διαπίστωσαν ότι τα RAPD ήταν ιδιαίτερα χρήσιμα στο διαχωρισμό ατόμων της πέστροφας *Salmo marmoratus* και των υδρυβίων της με την πέστροφα *Salmo trutta*. Τα υβρίδια στις περισσότερες περιπτώσεις παρουσίασαν συνδυασμό των μπάντων των γονιών, με ελάχιστες περιπτώσεις να εμφανίζουν καινούριες μπάντες. Στην εργασία του Jayasankar (2004) τα RAPD χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ 27 συγγενικών ειδών του διακοσμητικού ψαριού clown fish του γένους *Amphiprion*.

Οι Stott et al (1997) χρησιμοποίησαν τα RAPD ως μέσο για την εξέταση της κληρονομικότητας στην πέστροφα *Salvelinus namaycush* στον Καναδά. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα RAPD ακολουθούν, τουλάχιστον στη συγκεκριμένη περίπτωση τους μεντελικούς κανόνες κληρονομικότητας, και είναι αποτελεσματικά στην εξεύρεση της πληθυσμιακής δομής των υπό

εξέταση οργανισμών. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και ο Faugeron (2001) σύμφωνα με τον οποίο οι ουδέτεροι μοριακοί δείκτες, δηλαδή οι δείκτες που δεν βρίσκονται σε ενεργές περιοχές του γονιδιόματος όπως τα RAPD, είναι εξαιρετικά αποτελεσματικοί στη διερεύνηση του υπάρχοντος γενετικού πολυμορφισμού. Η κυριότερη αιτία φαίνεται να είναι ότι στην περίπτωση που οι δείκτες δεν είναι ουδέτεροι ο γενετικός πολυμορφισμός χάνεται καθώς είναι έντονη η επίδραση της φυσικής επιλογής.

Στην εργασία των Arpe et al (2003) που είχε ως στόχο την εξακρίβωση γονιδιακής ροής μεταξύ εκτρεφόμενων πληθυσμών και άγριων πληθυσμών του μυδιού *Perna canaliculus* στη Νέα Ζηλανδία χρησιμοποιήθηκαν οι μοριακοί δείκτες RFLPs και RAPD. Τα RAPD υπήρξαν πιο ευαίσθητοι δείκτες και αποκάλυψαν ύπαρξη γονιδιακής ροής μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων πληθυσμών η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλισμό των άγριων πληθυσμών και σε ελάττωση της βιοποικιλότητας. Οι Kano et al (2001) εντόπισαν γενετικό πολυμορφισμό μεταξύ 7 πληθυσμών του ασκιδίου (*Ciona intestinalis*) από την Ιαπωνία με την τεχνική των RAPD, αν και η γενετική απόσταση η οποία υπολογίστηκε ήταν σχετικά χαμηλή σε σχέση με άλλες περιπτώσεις. Η μεγαλύτερη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών στις περιοχές Torihama και Onagawa.

Οι Nguyen et al (2005) χρησιμοποίησαν τα αλλοένζυμα, τα RFLPs και τα RAPD για να εντοπίσουν γενετικό πολυμορφισμό σε πληθυσμούς της καραβίδας *Cherax destructor* στην Αυστραλία. Ο γενετικός πολυμορφισμός υποδιαιρέθηκε σε πολυμορφισμό που οφείλονταν σε άτομα που ανήκαν σε κάποιο πληθυσμό, σε πολυμορφισμό που οφείλονταν μεταξύ πληθυσμών μιας περιοχής και σε πολυμορφισμό που οφείλονταν μεταξύ περιοχών. Τα

παραπάνω έγιναν με σκοπό να πραγματοποιηθεί η AMOVA. Σε επίπεδο ατόμων πληθυσμού τα αλλοένζυμα αποκάλυψαν μεγαλύτερα επίπεδα πολυμορφισμού, γεγονός που δεν ήταν αναμενόμενο. Στα υπόλοιπα επίπεδα οι δείκτες έφεραν περίπου όμοια αποτελέσματα. Παρόλα αυτά μόνο τα στοιχεία από τα RAPD κατέστη δυνατό να συσχετιστούν με γεωγραφικές αποστάσεις με αποτέλεσμα να δώσουν καλύτερη εικόνα της δομής των πληθυσμών. Στην εργασία των Ruzainah et al (2003) τα RAPD χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για τη διάκριση των μορφολογικά όμοιων διακοσμητικών ψαριών *Pangio filinaris* και *Pangio riperata*. Στο πρώτο είδος το ποσοστό των πολυμορφικών γενετικών τόπων κυμάνθηκε περίπου στο 83% και στο δεύτερο στο 60%. Η γενετική απόσταση των δύο ειδών (Nei 1972) κυμάνθηκε στο $0,566 \pm 0,04$. Τα RAPD ήταν αποτελεσματικότερα στον εντοπισμό γενετικού πολυμορφισμού σε σχέση με τα RFLPs στην εργασία των Degram et al (2002) σε πληθυσμούς του ψαριού *Horplias malabaricus* το οποίο διαβιεί σε γλυκά νερά στη Βραζιλία. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι διαφορές μεταξύ των πληθυσμών πιθανότατα οφείλονται σε πολλούς παράγοντες όπως διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, εξαιτίας διαφορετικής έντασης φυσικής επιλογής, φαινόμενα γενετικής παρέκκλισης και φαινόμενα ιδρυτού. Τα τελευταία παρατηρούνται έπειτα από περιπτώσεις στενωπού (bottleneck) όπου ο πληθυσμός μειώνεται απότομα και τα λίγα εναπομείναντα άτομα καλούνται να δημιουργήσουν καινούριο πληθυσμό.

Οι Keyvanshokoo et al (2006) χρησιμοποίησαν την τεχνική των RAPD στη μελέτη πληθυσμών του στουργιονιού *Rutilus rutilus caspicus* από δύο διαφορετικές περιοχές στο Ιράν. Τα ποσοστά γενετικών τόπων με πολυμορφισμό βρέθηκαν 41,5% και 43,6% αντίστοιχα. Η γενετική απόσταση

των πληθυσμών κατά τον συντελεστή του Nei βρέθηκε ίση με 0,04, αν και η γεωγραφική απόσταση των δύο πληθυσμών είναι μεγάλη. Η μέση γενετική απόσταση που δίνεται μεταξύ πληθυσμών του ίδιου είδους κυμαίνεται σύμφωνα με τους Thorpe & Sol-Cave (1994) από 0,002-0,07, ενώ μεταξύ συγγενικών ειδών κυμαίνεται από 0,03-0,6. Στην εργασία των Hatanaka & Galetti (2003) τα RAPD χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο για την εξακρίβωση των επιπτώσεων που είχε η κατασκευή φράγματος σε περιοχή της Βραζιλίας στο γενετικό πολυμορφισμό πληθυσμών του ψαριού *Prochilodus marginatus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατασκευή του φράγματος μείωσε σημαντικά το γενετικό πολυμορφισμό που διαβιεί στη συγκεκριμένη περιοχή σε σχέση με πληθυσμούς που διαβιούν σε άλλες τοποθεσίες. Κάνοντας χρήση των RAPD οι Gomes et al (1998) εξέτασαν το γενετικό πολυμορφισμό και τη πληθυσμιακή δομή του ψαριού flyingfish (*Hirundichthys affinis*) στον κεντρο-δυτικό Ατλαντικό. Στην παραπάνω εργασία από τα δεδομένα που προέκυψαν από τα RAPD υπολογίστηκε και η γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών, η οποία βρέθηκε χαμηλή. Σε αυτήν την εργασία διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν τρεις διακριτοί πληθυσμοί του παραπάνω ψαριού οι οποίοι χρειάζονται διαφορετικές στρατηγικές διαχείρισης (managing). Η τεχνική των RAPD αποδείχθηκε αποτελεσματική στον εντοπισμό γενετικού πολυμορφισμού μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών τιλάπιας στην Αίγυπτο (Hassanien et al 2004). Τα ποσοστά πολυμορφικών γενετικών τόπων κυμάνθηκαν από 24% έως 44,84%.

Στην παρούσα εργασία οι πληθυσμοί του αχινού παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές ετεροζυγωτίας σε σχέση με τους πληθυσμούς του ασκιδίου. Η μέση ετεροζυγωτία δεν επηρεάζεται στον ίδιο βαθμό όσο άλλα μέτρα μέτρησης του

γενετικού πολυμορφισμού από το μέγεθος του δείγματος, με συνέπεια να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη σύγκριση διαφορετικού μεγέθους δειγμάτων. Το μεγαλύτερο ίσως μειονέκτημα της μέσης ετεροζυγωτίας είναι ότι δε δίνει ακριβή αποτελέσματα σε περιπτώσεις στενωπού (bottleneck), καθώς η απώλεια ετεροζυγωτίας εξαρτάται μόνο από το χρόνο που απαιτείται για να ξαναφτάσει ο πληθυσμός σε ένα σχετικά μεγάλο μέγεθος ατόμων (Allendorf 1986) και όχι τόσο από την απώλεια πολυμορφισμού που λαμβάνει χώρα τη στιγμή του στενωπού.

Η ακριβής αιτία για την διαφορά στην ετεροζυγωτία μεταξύ των δύο ειδών δεν μπορεί να προσδιοριστεί. Ωστόσο η μέση ετεροζυγωτία αυξάνεται στις περιπτώσεις όπου παρατηρείται σημαντική γονιδιακή ροή και σε μεγαλύτερη χρονική κλίμακα λόγω μεταλλάξεων, ενώ μειώνεται λόγω γενετικής παρέκκλισης, ενδογαμίας και λόγω του φαινομένου Wahlund. Το φαινόμενο Wahlund θεωρεί ότι η έλλειψη ετεροζυγωτίας που παρατηρείται σε σχέση με την ισορροπία Hardy-Weinberg οφείλεται στο ότι ο εξεταζόμενος πληθυσμός αποτελείται από σχετικά απομονωμένους αναπαραγωγικά υποπληθυσμούς (Allendorf 2007).

Το ότι η μέση ετεροζυγωτία αυξάνεται σε περιπτώσεις όπου υπάρχει σημαντική γονιδιακή ροή είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας στην οποία βρέθηκε ότι για τον αχινό η μέση γονιδιακή ροή είναι 5,13 άτομα/γενιά, ενώ στο ασκίδιο είναι κάτω από 1 άτομο/γενιά (0,88). Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με το γεγονός ότι στον αχινό οι λάρβες είναι πλαγκτονοτροφικές με αποτέλεσμα να δύνανται να διανύσουν πολύ μεγαλύτερες αποστάσεις από τις λάρβες του ασκιδίου οι οποίες είναι λεκιθοτροφικές.

Στην παρούσα εργασία ο δείκτης F_{ST} (G_{ST}) για τους αχινούς βρέθηκε ίσος με 0,089. Από τα αποτελέσματα της AMOVA φάνηκε ότι το 92% του γενετικού πολυμορφισμού στους αχινούς οφείλονταν σε διαφορές μεταξύ των ατόμων των ιδίων πληθυσμών, γεγονός που συνηγορεί στην άποψη ότι το *Paracentrotus lividus* είναι πανμικτικό είδος. Σε παρόμοιο αποτέλεσμα κατέληξαν και οι Duran et al (2004) οι οποίοι εξέτασαν πληθυσμούς του παραπάνω είδους στη Μεσόγειο και στον Ατλαντικό. Συγκεκριμένα στην παραπάνω εργασία διαπιστώθηκε η πανμιξία του είδους για πληθυσμούς στη Μεσόγειο και για πληθυσμούς στον Ατλαντικό. Οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν ότι υπάρχουν στην ουσία δύο πληθυσμοί που παρουσιάζουν γενετικό πολυμορφισμό μεταξύ τους, αυτός της Μεσογείου και αυτός του Ατλαντικού. Σε μελέτη γενετικής δομής του πράσινου αχινού *Strongylocentrotus droebachiensis* με τη χρήση μικροδορυφορικών (Microsatellites) δεικτών δεν βρέθηκαν γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των πληθυσμών από τον Ατλαντικό μέχρι τον Καναδά αλλά υπήρχε μεγάλη διαφοροποίηση κατά μήκος του Βορείου Ατλαντικού και μεταξύ των δειγμάτων του Ατλαντικού και του Ειρηνικού Ωκεανού (Addison & Hart, 2003). Στην εργασία του Debenham (1997) διαπιστώθηκε πανμιξία σε πληθυσμούς του αχινού *Strongylocentrorus lividus* από την Αλάσκα μέχρι την Καλιφόρνια. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασία έρχονται σε συμφωνία και με την εργασία των McCartney et al (2000) στην οποία διαπιστώθηκε πανμιξία μεταξύ πληθυσμών του αχινού *Echinometra vanbrunti* στο Μεξικό και στον Παναμά μελετώντας μιτοχονδριακό DNA.

Η γενετική απόσταση στα ασκίδια (Nei 1972) κυμάνθηκε από 0 έως 0,587, ενώ παράλληλα δεν βρέθηκαν στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των

πληθυσμών της Αστυπάλαιας και μεταξύ του Τρίκερι και Πλατανιά. Στην εργασία των Kano et al (2001) η γενετική απόσταση μεταξύ πληθυσμών του ασκιδίου *Ciona intestinalis* κυμάνθηκε μεταξύ 0,1 και 0,222 και όλοι οι υπό εξέταση πληθυσμοί παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p < 0,001$). Ωστόσο στην παραπάνω εργασία οι υπό εξέταση πληθυσμοί απείχαν μεγαλύτερη γεωγραφική απόσταση μεταξύ τους. Επιπλέον τα επίπεδα πολυμορφισμού διακυμάνθηκαν από 47% έως 92%, ενώ στην παρούσα εργασία από 27% έως 90% περίπου. Η γονιδιακή ροή που βρέθηκε για τα ασκίδια στην παρούσα εργασία έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα στην εργασία των Ayre et al (1997) όπου βρέθηκε γονιδιακή ροή (Nm) περίπου ίση με 1 μεταξύ πληθυσμών του ασκιδίου *Stolonica australis*. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και στην εργασία των Tarjuelo et al (2004) στην οποία η γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών του ασκιδίου *Pseudodistoma crucigaster* βρέθηκε 1,05. Αντίθετα στην εργασία των Tarjuelo et al (2001) στο ασκίδιο *Clavelina lepadiformis*, η γονιδιακή ροή βρέθηκε τετραπλάσια από τα παραπάνω αποτελέσματα (Nm=4,54)

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα αποτελέσματα από τα neutrality test τα οποία για τους πληθυσμούς του αχινού δεν έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την εξελικτική πίεση που βρίσκονται οι παραπάνω πληθυσμοί. Σε αντίθεση στην περίπτωση του ασκιδίου τα παραπάνω τεστ έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική πιθανότητα οι πληθυσμοί στο Τρίκερι, Άγιο Νικόλαο, Πλατανιά και Μαλιακό να υφίστανται εξελικτική πίεση. Ωστόσο το κυριότερο μειονέκτημα των παραπάνω τεστ έγκειται στο γεγονός ότι δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της αιτίας αυτής της εξελικτικής πίεσης. Με άλλα λόγια δεν είναι δυνατή η εξακρίβωση αν η

πίεση που ασκείται στους παραπάνω πληθυσμούς οφείλεται σε ανθρωπογενείς παράγοντες όπως εντατική αλιεία ή σε μη ανθρωπογενείς παράγοντες όπως η φυσική εμφάνιση αλληλόμορφων σε γενετικούς τόπους τα οποία υπερέχουν σε σχέση με άλλα αλληλόμορφα (π.χ ανθεκτικότητα σε ασθένειες κλπ).

Στη χώρα μας δεν υπάρχουν επίσημα στοιχεία για τις αλιευμένες ποσότητες των παραπάνω ειδών με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για το αν τα παραπάνω είδη βρίσκονται κάτω από έντονη αλιευτική πίεση. Παρόλα αυτά με βάση τα αποτελέσματα της παραπάνω εργασίας δεν φαίνεται να υπάρχει αλιευτική πίεση τουλάχιστον για τους πληθυσμούς του αχινού καθώς ο αχινός είναι πανμικτικό είδος. Όσον αφορά τους πληθυσμούς των ασκιδίων παρόλα τα μεγαλύτερα ποσοστά ετεροζυγωτίας πρέπει να σημειωθεί ότι η αλιεία τους, η οποία γίνεται συνήθως με καταδυτικό εξοπλισμό δεν ξεπερνά συνήθως τα 50 m. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα παραπάνω ασκίδια διαβιούν σε βάθος μέχρι 200 m δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική πίεση στα αποθέματα καθώς οι υπό εκμετάλλευση πληθυσμοί έχουν τη δυνατότητα να ανακάμψουν. Τα παραπάνω ωστόσο δεν σημαίνουν σε καμία περίπτωση ότι η αλιεία των παραπάνω ειδών μπορεί να γίνεται ανεξέλεγκτα.

Ο κυριότερος στόχος της εργασίας ήταν να χρησιμοποιηθούν δεδομένα από RAPD για να εξακριβωθεί αν υπάρχουν διακριτοί πληθυσμοί μεταξύ των διαφόρων περιοχών δειγματοληψίας. Διακριτοί πληθυσμοί δεν μπόρεσαν να εξακριβωθούν μόνο στην περίπτωση του Αμβρακικού και της Αστυπάλαιας και του Παγασητικού και της Χαλκιδική για τον αχινό όπως έδειξαν τα exact tests. Ωστόσο οι τιμές των υπολοίπων πληθυσμών είναι χαμηλές

συνηγορώντας ότι παρά τις όποιες διαφορές στη συχνότητα των αλληλόμορφων μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών ο αχινός είναι πανμικτικό είδος. Ο λόγος της σημασίας που έχει ο εντοπισμός διακριτών πληθυσμών έγκειται στο γεγονός ότι σε αυτήν την περίπτωση είναι δυνατή η πιο αποτελεσματική διαχείρισή του. Γνωρίζοντας κανείς ότι κάποιοι πληθυσμοί διαφέρουν γενετικά μπορεί να αποφύγει κανείς να υποπέσει σε σημαντικά λάθη τα οποία έγιναν σε πολλές περιπτώσεις στο παρελθόν. Τα παραπάνω λάθη αναφέρονται κυρίως στους εμπλουτισμούς οι οποίοι σε πολλές περιπτώσεις έγιναν χωρίς να λάβουν υπόψη τη γενετική απόσταση μεταξύ των πληθυσμών με αποτέλεσμα και να αποτύχουν και να εξαφανίσουν αυτόχθονα είδη. Με βάση τα παραπάνω δεν διαφαίνεται κίνδυνος ενίσχυσης κάποιου από τους υπό εξέταση πληθυσμούς αχινού, εφόσον ελαττωθεί στο μέλλον, με άτομα άλλων πληθυσμών. Για την περίπτωση των ασκιδίων ωστόσο απαιτούνται επιπλέον στοιχεία.

Συνοψίζοντας η παραπάνω εργασία έδειξε ότι υπάρχουν διακριτοί πληθυσμοί στην περίπτωση των ασκιδίων οι οποίοι χρήζουν προσεκτικής διαχείρισης. Επίσης δεν κατέστη δυνατή η εξακρίβωση αν κάποιος από τους υπό εξέταση πληθυσμούς βρίσκεται κάτω από αλιευτική πίεση. Ως μελλοντική κατεύθυνση κρίνεται απαραίτητη η επεξεργασία των δειγμάτων και με άλλους μοριακούς δείκτες όπως οι *microsatellites* για την ασφαλέστερη διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Βιβλιογραφία

Addison J. A. & Hart M. W. 2003. Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites. *Marine Biology* **144**: 243-251.

Allendorf, F.W. & Luikart, G. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing.

Apte, S., Star, B. & Gardner, J.P.A. 2003. A comparison of genetic diversity between cultured and wild populations, and a test for genetic introgression in the New Zealand greenshell mussel *Perna canaliculus* (Gmelin 1791). *Aquaculture* **219**: 193-220.

Ayre, D.J., Davis, A.R., Billingham, M., Llorens, T. & Styan, C. 1997. Genetic evidence for contrasting patterns of dispersal in solitary and colonial ascidians. *Marine Biology* **130**: 51-61

Barman, K.H., Barat, A., Yadav, B.M., Banerjee, S., Meher, P.K., Reddy, P.V.G.K. & Jana, R.K. 2003. Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture* **217**: 115-123.

Basavaraju, Y., Prasad, D.T., Rani, K., Kumar, S.P, Naika, U.D. Jahageerdar, S., Srivastava, P.P., Penman, D.J. & Mair, G.C. 2007. Genetic diversity in common carp stocks assayed by random-amplified polymorphic DNA markers. *Aquaculture Research* **38**: 147-155.

Beaumont, M.A. & Rannala, B. 2004. The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics* **5**: 251-261.

Borowsky, R.L. & Vidthayanon, C. Nucleotide diversity in populations of balitorid cave fishes from Thailand. 2001. *Molecular Ecology* **10**: 2799-2805.

Bravington, M.V. & Ward, R.D. 2004. Microsatellite DNA markers: evaluating their potential for estimating the proportion of hatchery-reared offspring in a stock enhancement programme. *Molecular Ecology* **13**: 1287-1297.

Callejas, C. & Ochando, M.D. 1998. Identification of Spanish barbell species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology* **53**: 208-215.

Callejas, C. & Ochando, M.D. 2001. Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Biology* **59**: 1589-1599.

Christiakov, D.A., Hellemans, B., Haley, C.S., Law, A.S., Tsigenopoulos, C.S., Kotoulas, G., Bertotto, D., Libertini, A. & Volckaert, F.A.M. 2005. A Microsatellite Linkage Map of the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics* **170**: 1821-1826.

Das, P., Prasad, H., Meher, P.K., Barat, A. & Jana, R.K. 2005. Evaluation of genetic relationship among six *Labeo* species using randomly amplified polymorphic DANN (RAPD). *Aquaculture Research* **36**: 564-569.

Debenham P. 1997. Molecular approaches to assessing red sea urchin (*Strongylocentrotus franciscianus*) populations: Implications of sequence variation for evolution and population genetics of the species. Unpublished thesis, University of California, Santa Barbara.

Degram, J.A., Paiva, S.R., Schaeffer, C.E., Godinho, A.L. & Vieira, F. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplías malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **25**: 379-387.

Duran, S., Palacin, C., Becerro, M.A., Turon, X. & Giribets, G. 2004. Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin

Paracentrotus lividus (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology* **13**: 3317-3328.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* **131**: 479-491.

Faugeron, S. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides*. *J. Phycol.* **37**: 705-716.

Gomes, C., Dales, R.B.G. & Oxenford, H.A. 1998. The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Molecular Ecology* **7**: 1029-1039.

Guidetti, P., Terlizzi, A. & Boero, F. 2004. Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). *Fisheries Research* **66**: 287-297.

Guinand, B., Lemaire, C. & Bonhomme, F. 2004. How to detect polymorphisms undergoing selection in marine fishes? A review of methods and case studies, including flatfishes. *Journal of Sea Research* **51**: 167-182.

Hassanien, H.A., Elnady, M., Obeida, A. & Itriby, H. 2004. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DANN (RAPD). *Aquaculture Research* **35**: 587-593.

Hatanaka, T. & Galetti, P.M. 2003. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology* **26**: 19-25.

Huff, D.R., Peakall, R., Smouse, P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Theoretical and Applied Genetics* **86**: 927-934.

Jackson, T.R., Martin-Robichaud, D.J. & Reith, M.E. 2003. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* **220**: 245-259.

Jayasankar, P. 2004. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting resolves species ambiguity of domesticated clown fish (genus: *Amphiprion*, family: Pomacentridae) from India. *Aquaculture Research* **35**: 1006-1009.

Jerry, D.R., Preston, N.P., Crocos, P.J., Keys, S., Meadows, J.R.S. & Li, Y. 2006. Application of DNA parentage analysis for determining relative growth rate of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds. *Aquaculture* **254**: 171-181.

Jug, T., Dovc, P., Pohar, J. & Snoj, A. 2004. RAPD analysis as a tool for discriminating marble trout from hybrids (marble trout x brown trout) in the zones of hybridization. *J. Anim. Breed. Genet.* **121**: 156-162.

Junior, P.M.G., Molina, W.F., Affonso, P.R.A.M. & Aguilar, C.T. 2006. Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers. *Genetica* **126**: 161-177.

Kano, S., Chiba, S. & Satoh, N. Genetic Relatedness and Variability in Inbred and Wild Populations of the Solitary Ascidian *Ciona intestinalis* Revealed by Arbitrarily Polymerase Chain Reaction. 2001. *Mar. Biotechnol.* **3**: 58-67.

Keyvanshokoo, S. & Kalbassi, M.R. 2006. Genetic variation of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran on random amplified polymorphic DNA markers: a preliminary study. *Aquaculture Research* **37**: 1437-1440.

Liu, Z.J. & Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**: 1-37.

Liu, Z., Li, P., Argue, B.J. & Dunham, R.A. 1998. Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2 and backcross hybrids. *Animal Genetics* **29**: 58-62.

Lyengar, A., Piyapattanakorn, S., Stone, D.M., Heipel, D.A, Howell, B.R., Baynes, S.M. & Maclean, N. 2000. Identification of Microsatellite Repeats in Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dover Sole (*Solea solea*) using a RAPD-Based Technique: Characterization of Microsatellite Markers in Dover Sole. *Mar. Biotechnol.* **2**: 49-56.

Lynch, M. & Ritland, K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Evolution* **43**: 258-275.

Mamuris, Z., Apostolidis, A.P., Theodorou, A.J. & Triantaphyllidis, C. 1998. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Biology* **132**: 171-178.

Maudet, C., Luikart, G. & Taberlet, P. 2001. Development of microsatellite multiplexes for wild goats using primers designed for domestic Bovidae. *Genetics Selection Evolution* **33**: 193-203.

McCartney M.A., Keller G. & Lessios H.A. 2000. Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchins of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology* **9**: 1391–1400.

Mengoni, A. & Bazzicalupo, M. 2002. The statistical treatment of data and the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) in molecular microbial ecology. *Annals of Microbiology* **52**: 95-101.

Miggiano, E., Innocentiis, S., Ungaro, A., Sola, L. & Crosetti, D. 2005. AFLP and microsatellites as genetic tags to identify cultured gilthead seabream escapees: data from a simulated floating cage breaking event. *Aquaculture International* **13**: 137-146.

Miller, Mark. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA).

Moen, T., Hoyheim, B., Munck, H. & Gomez-Raya, L. 2004. A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Animal Genetics* **35**: 81-92.

Morin, P., Luikart, G., Wayne, R.K. & SNP workshop group. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 208-216.

Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, **106**: 283-292.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583-590.

Nguyen, T.T.T., Burrige, C.P. & Austin, C.M. 2005. Population genetic studies on the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Crustacea: Parastacidae) using allozyme and RAPD markers. *Aquat. Living Resour.* **18**: 55-64.

Paetkau, D., Waits, L.P., Clarkson, P.L., Craighead, L. & Strobeck, C. 1997. An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* **147**:1943-1957.

- Peakall, R. and Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.
- Ruzainah, A., Azizah, M.N.S., Patimah, I. & Amirrudin, A. 2003. RAPD fingerprinting of the eel-loaches *Pangio filinaris* and *Pangio piperata*: preliminary evaluation. *Aquaculture Research* **34**: 959-965.
- Rodrigues, F.M., Diniz-Filho, J.A.F., Bataus, L.A.M. & Bastos, R.P. 2002. Hypothesis testing of genetic similarity based on RAPD data using Mantel tests and model matrices. *Genetics and Molecular Biology* **25**: 435-439.
- Stott, W., Ihssen, P.E. & White, B.N. Inheritance of RAPD molecular markers in lake trout *Salvelinus namaycush*. 1997. *Molecular Ecology* **6**: 609-613.
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X. 2004. Phylogeography and speciation of colour morphs in the colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*. *Molecular Ecology* **13**: 3125-3136.
- Tarjuelo I, Posada D, Crandall KA, Pascual M, Turon X. 2001. Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean. *Marine Biology* **139**: 455-462.
- Thorpe, J.P. & Sol-Cave, A.M. 1994. The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. *Zoologica Scripta* **23**: 3-18.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Senhorini, J.A. & Foresti, F. 2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish matracha (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J. Appl. Ichtyol.* **20**: 48-52.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**: 395-420.

Yan, J. Liu, S., Sun, Y., Zhang, C., Luo, K. & Liu, Y. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*)x common carp (*Cyprinus caprio*). *Aquaculture* **243**: 49-60.

ABSTRACT

The aim of present work was the determination of genetic polymorphism of sea urchin *Paracentrotus lividus* and askidian *Microcosmus sabatieri*. Data of above species came by using the technique of RAPD, which were analyzed using suitable software for the treatment of genetic data. In more detail in the present work were used the software GenAlex, TFPGA, PopGene, Phylip and Arlequin. With the help of the above software were estimated the medium heterozygosity, the percentages of polymorphic genetic locus, the estimators of genetic distance and other estimators of genetic polymorphism. Moreover in the present work was conducted AMOVA, exact test, neutrality test, homogeneity test, Mantel test and the appropriate dendograms for the each estimator of genetic distance. From the results was proved that RAPD constitute a suitable technique for the study of genetic polymorphism in sea urchin and askidian. The sea urchin presented greater levels of genetic polymorphism and gene flow than the askidian. The above contribute to the fact that the sea urchin is a panmictic species, with small differences between the populations that were examined. On the contrary in askidian were observed statistically important differences between the populations of the study, which contributes to the opinion that in this species exist distinguishable populations at least from the genetic point of view which require careful management. The above results come in agreement with the fact that the larvae of sea urchin are planktonotrophic, while those of the askidian are lekithotrophic.

Keywords: RAPD, *Paracentrotus lividus*, *Microcosmus sabatieri*, genetic distance