

---

---

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

---

---

*ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ*

*ΜΕ ΘΕΜΑ:*

"Γενετική μελέτη ιχθυαποθεμάτων της κουτσομούρας με τη μέθοδο RAPD ( Random Amplified Polymorphic DNA ) "

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Δ. ΣΤΑΜΑΤΗΣ

Επιβλέπων Καθηγητής: ΑΘ. ΘΕΟΔΩΡΟΥ

Επιτροπή

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ Λέκτορας

Π. ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗ Λέκτορας

ΒΟΛΟΣ 1998



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4/1

Ημερ. Εισ.: 24-07-2003

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ

1998

ΣΤΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070070

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛ
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	I
ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	III
1. ΓΕΝΙΚΑ .....	1
1.1. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΙΧΘΥΟΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ .....	1
1.2. ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ .....	1
1.2.1. Εισαγωγή και ιστορική αναδρομή .....	1
1.2.2. Προσδιορισμός των ιχθυοαποθεμάτων με μοριακές τεχνικές .....	3
1.2.3. Εφαρμογές των μοριακών τεχνικών στις υδατοκαλλιέργειες .....	6
1.2.4. Εφαρμογές στην αναγνώριση και διάκριση των ειδών .....	8
1.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR .....	9
1.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ RAPD .....	17
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	26
2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ, ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΚΟΥΤΣΟΜΟΥΡΑΣ .....	26
2.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΚΟΥΤΣΟΜΟΥΡΑ .....	27
2.3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	28
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	29
3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ .....	29
3.2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA .....	29
3.3. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ RAPD .....	31
3.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	35
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	36
4.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΠΗΚΤΕΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....	36

4.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΠΗΚΤΕΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ .....	36
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	43
5.1. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ RAPD .....	43
5.2. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ .....	44
5.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ .....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	IV

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Διπλωματική Διατριβή αυτή, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Γενικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τα ακαδημαϊκά έτη 1996-1998.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Καθηγητή κ. Ζ. Μαμούρη , ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του , αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή, καθώς και για την καθοδήγηση, επίβλεψη και αμέριστη βοήθεια που μου πρόσφερε, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Α. Θεοδώρου, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του, συμμετέχοντας στην ανάθεση της εργασίας αυτής, καθώς και για το ενδιαφέρον που έδειξε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Καθηγήτρια κ. Π. Παναγιωτάκη για την συμπαράσταση και το ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής, αυτής, εργασίας.

---

# 1. ΓΕΝΙΚΑ

## 1.1. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΙΧΘΥΟΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ

Από τις βασικότερες παραμέτρους στη διαχείριση και προστασία των αλιευτικών πηγών είναι ο προσδιορισμός των διαφορετικών ιχθυαποθεμάτων στα εμπορικώς σημαντικά είδη, καθώς επίσης και η γνώση της γενετικής τους δομής. Αν και τα είδη αυτά μπορεί να έχουν εκτεταμένη γεωγραφική εξάπλωση, πιθανόν να αποτελούνται από διαφορετικούς πληθυσμούς οι οποίοι έχουν διαφορετικά πεδία αναπαραγωγής. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει στη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών, δηλαδή, στην ύπαρξη γενετικά διακριτών ιχθυαποθεμάτων.

Σήμερα μεταξύ των διαφόρων ερευνητών δεν υπάρχει συμφωνία ως προς την έννοια του ιχθυαποθέματος. Έτσι, από τη Διαχειριστική σκοπιά, ως ιχθυαπόθεμα νοείται η ομάδα των ψαριών που αλιεύεται σ' ένα συγκεκριμένο γεωγραφικό χώρο ή με μια συγκεκριμένη αλιευτική τεχνική. Από τη Βιολογική πλευρά, ως ιχθυαπόθεμα ορίζεται η φυσικά αναπαραγώμενη ομάδα ψαριών ενός είδους, η οποία είναι σε κάποιο βαθμό αναπαραγωγικά απομονωμένη και γενετικά διαφοροποιημένη από άλλες ομάδες του ίδιου είδους. Ένα από τα σημαντικά, για τη διαχείριση των ιχθυοπληθυσμών, ερωτήματα δεν είναι το κατά πόσο υπάρχουν διακριτοί ιχθυοπληθυσμοί αλλά εάν αυτή η διαφοροποίηση είναι διαρκής, ούτως ώστε να έχουν συσσωρευτεί γενετικές αλλαγές μεταξύ των πληθυσμών (Altukhov 1981, Smith et al. 1989, Carvalho και Hauser, 1994).

## 1.2. ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ

### 1.2.1. Εισαγωγή και ιστορική αναδρομή

Οι πρώτες μοριακές γενετικές προσεγγίσεις άρχιζαν να εφαρμόζονται στα ψάρια το 1950. Οι αρχικές μελέτες, που αφορούσαν σε διάφορες

---

παραλλαγές των ομάδων αίματος και εφαρμόστηκαν, κυρίως, σε τόνους, σε σαλμονίδες και σε μουρούνες (αναφορά από De Ligny, 1969), απέδειξαν επιτυχώς, την ύπαρξη γενετικά ελεγχόμενου πολυμορφισμού, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις δομής των πληθυσμών.

Εντούτοις, οι διαδικασίες αυτές δεν έγιναν αποδεκτές με ενθουσιασμό από τους βιολόγους και οι περισσότερες εγκαταλείφθηκαν στη συνέχεια, προς χάριν μεθόδων ηλεκτροφόρησης, οι οποίες αποκάλυπταν γενετικά καθορισμένους πρωτεϊνικούς πολυμορφισμούς.

Ενας από τους πρωτοπόρους των ερευνών αυτών ήταν ο Sick (1961), ο οποίος περιέγραψε τις μεταβολές της αιμοσφαιρίνης στο ταούκι (*Gadus merlangus*, *Gadidae*) και τη μουρούνα (*Gadus morhua*, *Gadidae*), αλλά η ώθηση για περισσότερο εκτενή έρευνα δόθηκε από τις εργασίες του Harris (1966) και των Lewontin και Hubby (1966). Αυτοί απέδειξαν ότι ο άνθρωπος και η φρουτόμυγα (*Drosophila pseudoobscura*) ήταν εξαιρετικά πολυμορφικοί για διάφορα ισοένζυμα, τα οποία ανιχνεύονταν μετά από ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αποδείχθηκε γρήγορη, σχετικά φθηνή και σταθερά αναπαραγόμενη.

Πολλά είδη φυτών και ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών και των οστρακοειδών με εμπορική αξία, έδειξαν αρκετή μεταβλητότητα, έτσι ώστε, η δομή των πληθυσμών τους να μπορεί να εξεταστεί γρήγορα.

Ωστόσο, οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών και ισοενζύμων παρέχουν μια έμμεση εκτίμηση της μεταβλητικότητας του πυρηνικού DNA. Άμεσες εκτιμήσεις της μεταβλητικότητας του DNA επιτεύχθηκαν με την απομόνωση των ενδονουκλεάσεων περιορισμού.

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα που "κόβουν" το DNA σε ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, παράγοντας τμήματα DNA μεταβλητού μεγέθους, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν πάνω σε πηκτές ηλεκτροφόρησης, επιτρέποντας έτσι την άμεση μελέτη της μεταβλητικότητας των αλληλουχιών DNA.

Οι περισσότερες από τις αρχικές εφαρμογές της τεχνολογίας αυτής, εξέταζαν μιτοχονδριακό DNA (mt DNA) (π.χ. Lansman *et al.*, 1981 Avise, 1987). Η ανάπτυξη της ανάλυσης του mt DNA οφείλεται κατά πολύ στο μικρό

---

μέγεθος και την ευκολία εξαγωγής αυτού του μορίου, αλλά η ανάλυση μέσω των ενζύμων περιορισμού εφαρμόζεται με συνεχώς αυξανόμενους ρυθμούς και στο πυρηνικό DNA (n DNA). Πιο πρόσφατα, η ανάπτυξη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έχει αυξήσει σημαντικά τον αριθμό των διαθέσιμων εργαλείων για τους μοριακούς γενετιστές, επιτρέποντας απειροελάχιστες ποσότητες DNA να ενισχυθούν και να αναλυθούν.

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες πάνω στη εφαρμογή των ισοενζύμων και των δεικτών DNA στα ψάρια. Οι Waldman και Wirgin (1994) έχουν αναφέρει την χρήση των αναλύσεων DNA (όχι όμως των ισοενζύμων), στη διαχείριση των αποθεμάτων των ψαριών και ο Skibinski (1994) έχει αναφέρει την εφαρμογή των αναλύσεων DNA στα θαλάσσια ασπόνδυλα ζώα.

Η μελέτη των γενετικών δεικτών έχει σημαντικές επιδράσεις σε τρεις περιοχές της ιχθυολογίας, ειδικότερα:

- ◆ την ανάλυση της δομής των αποθεμάτων των ψαριών
- ◆ τις υδατοκαλλιέργειες
- ◆ την ταξινόμια - συστηματική.

Επίσης έχουν γίνει μελέτες που αφορούσαν στη γενετική των εισαγόμενων ειδών, των σπανίων και υπό εξαφάνιση ειδών καθώς και στις επιδράσεις της αλιείας και της μόλυνσης στην γενετική ποικιλότητα των ειδών.

### **1.2.2. Προσδιορισμός των ιχθυοαποθεμάτων με μοριακές τεχνικές**

Η επιδίωξη αυτών που ασχολούνται με τη διαχείριση των ιχθυοαποθεμάτων είναι η εξασφάλιση της διατήρησης των πόρων, με παράλληλη μεγιστοποίηση των οικονομικών κερδών. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, οι διαχειριστές χρειάζεται να εξετάσουν ένα ευρύ φάσμα από επιστημονικά, οικονομικά και κοινωνικά θέματα, συμπεριλαμβανομένων και πληροφοριών για τη δομή των πληθυσμών (Carvalho και Hauser, 1994).

Η ιδέα της διαρκούς παραγωγής των αλιευτικών πηγών (αειφορία) κυριαρχεί στις θαλάσσιες επιστήμες τα τελευταία 50 χρόνια. Η κεντρική ιδέα



---

είναι ότι, κάθε διαφορετικός πληθυσμός ενός είδους ψαριού έχει ένα πλεόνασμα και εάν η αλίευση αυτού του πλεονάσματος δεν υπερβεί κάποιο όριο η επιπλέον παραγωγή μπορεί να διατηρηθεί επ' άπειρον. Το κάθε είδος δεν αποτελείται από έναν ομοιογενή πληθυσμό, αλλά από διακριτούς πληθυσμούς (ιχθυαποθέματα), οι οποίοι, πιθανόν, αντιδρούν διαφορετικά στην αλιευτική πίεση (Lannan *et al.* 1989).

Οι ιδέες αυτές οδηγούν στην ανάγκη καθορισμού των διαφορετικών ιχθυαποθεμάτων των οικονομικώς σημαντικών ειδών ψαριών. Έτσι, η έννοια του ιχθυαποθέματος σχετίζεται με την προσπάθεια να γνωρίζουμε την ισορροπία που πρέπει να υπάρχει μεταξύ αλίευσης (παραγωγής) και διατήρησης αυτής της παραγωγής (Carvalho και Hauser, 1994).

Η αλιευτική τακτική που ακολουθείται π.χ. αλίευση μεγαλύτερων σε μέγεθος άρα και σε ηλικία ατόμων ή η υπεραλίευση των πληθυσμών μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στη γενετική δομή των πληθυσμών. Γενικά θεωρείται ότι τα μεγαλύτερα σε ηλικία ψάρια έχουν μεγαλύτερο μέσο αριθμό αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο. Η απομάκρυνση αυτών των ατόμων από τους φυσικούς πληθυσμούς οδηγεί στη μείωση του βαθμού του γενετικού πολυμορφισμού τους. Η υπεραλίευση των φυσικών πληθυσμών των ψαριών μπορεί να προκαλέσει μείωση του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού. Η μείωση αυτή συνήθως οδηγεί σε δραματική μείωση του βαθμού του γενετικού πολυμορφισμού ιδιαίτερα σε είδη που συγκροτούν μεγάλους σε μέγεθος πληθυσμούς. Αυτές οι αλλαγές στη γενετική δομή των πληθυσμών μπορεί να οδηγήσουν στη μελλοντική μείωση της ικανότητας επιβίωσης των πληθυσμών ή ακόμη και στην εξαφάνισή τους (Ryman *et al.* 1994).

Ένα από τα σημαντικότερα ερωτήματα που τίθενται είναι με ποιό τρόπο θα καθορισθεί ένα ιχθυαπόθεμα. Αν και για τον καθορισμό των ιχθυαποθεμάτων έχουν, κατά καιρούς, χρησιμοποιηθεί διάφοροι παράμετροι (όπως οικολογικά, φυσιολογικά, μορφολογικά χαρακτηριστικά ή μαρκαρίσματα ψαριών) (Ihssen *et al.* 1981), η χρήση τεχνικών που ανιχνεύουν τον πολυμορφισμό πρωτεϊνών και ενζύμων και η ανάλυση του DNA είναι οι μέθοδοι που αποδείχθηκαν περισσότερο αποτελεσματικές (Park και Moran, 1994).

---

Έτσι, πληθώρα εργασιών έχει δημοσιευθεί τα τελευταία χρόνια, που αφορούν στη μελέτη της γενετικής δομής και στον καθορισμό ιχθυαποθεμάτων διαφόρων εμπορικής σημαντικών ειδών ψαριών με τη χρήση μοριακών τεχνικών. Είδη όπως η ρέγγα (*Clupea harengus*), η μουρούνα (*Gadus morhua*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) έχουν μελετηθεί σημαντικά στο ενζυμικό και πρωτεϊνικό επίπεδο (King *et al.* 1983, Ryman *et al.* 1984, Mork *et al.* 1985, Jorstad και Naevdal 1989, Benharrat *et al.* 1983, Child 1992). Τα σολομοειδή (*Salmonidae*) έχουν επίσης μελετηθεί σε σημαντικό βαθμό (Beacham *et al.*, 1987) καθώς και ένας μεγάλος αριθμός τροπικών ειδών ψαριών (Smith *et al.* 1990).

Οι εκτεταμένες αυτές ισοενζυμικές μελέτες δεν έχουν αποδειχθεί μόνο πολύτιμες για τον καθορισμό διαφορετικών ιχθυαποθεμάτων, αλλά επίσης έδειξαν τη σπουδαιότητα των εξελικτικών δυνάμεων που δρουν και διαφοροποιούν τα ιχθυαποθέματα. Αυτές οι πληροφορίες είναι σημαντικές όταν πρόκειται να προταθούν μέτρα για τη διαχείριση των ιχθυαποθεμάτων.

Η ισοενζυμική ανάλυση παρέχει το πλεονέκτημα να γίνει γνωστή η γενετική δομή των πληθυσμών ενός είδους, να εκτιμηθούν ορισμένες παράμετροι όπως ο βαθμός ετεροζυγωτίας, το ποσοστό των πολυμορφικών γονιδιακών τόπων ή ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο. Ακόμη μπορεί να δώσουν πληροφορίες όπως εάν τα άτομα ενός δείγματος προέρχονται όλα από έναν παμμικτικό πληθυσμό, που βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, ή από γενετικά διακριτές ομάδες. Είναι επίσης δυνατόν να βρεθούν αλληλόμορφα, μοναδικά για κάθε πληθυσμό, τα οποία να χαρακτηρίζουν αυτόν τον πληθυσμό και να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες. Επιπλέον μπορεί να υπολογισθεί ο βαθμός της διαπληθυσμιακής διαφοροποίησης και ο βαθμός της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών, καθώς επίσης, να εκτιμηθούν οι πιθανές επιπτώσεις των επεμβάσεων και χειρισμών του ανθρώπου στη γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών (Smith *et al.* 1989, Spanakis *et al.* 1989).

Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα σχετικά μικρό σε μέγεθος μόριο, το οποίο μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Παρουσιάζει ταχύτερο ρυθμό αλλαγών, σε σχέση με το πυρηνικό DNA, στην αλληλουχία των βάσεων του. Έτσι,

---

μπορούν να εντοπισθούν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ακόμη και σε περιπτώσεις όπου οι πληθυσμοί είναι ίδιοι στο επίπεδο του πυρηνικού DNA. Αυτό δίνει τη δυνατότητα να βρεθούν ειδικοί δείκτες οι οποίοι και θα ταυτοποιούν τα διαφορετικά ιχθυαποθέματα (Gyllenstein και Wilson 1987, Park και Moran 1994).

Η μελέτη του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) άρχισε αρχικά σε είδη ζώων της ξηράς, όπου και βρέθηκε να υπάρχουν διαφορετικοί τύποι mtDNA σε σχέση με τη γεωγραφική κατανομή των ειδών (Avisé, 1987). Ωστόσο, η εφαρμογή των μεθόδων αυτών στα ψάρια της θάλασσας έδειξε ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών ήταν μικρή (Graves *et al.* 1984, Ovenden, 1990). Πρόσφατα όμως η ανάπτυξη της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και η εφαρμογή της στην ανάλυση του mtDNA βοήθησε στην καλύτερη ανάλυση της διαφοροποίησης των πληθυσμών των ψαριών (Kocher *et al.* 1989, Carr και Marshall 1991, Karl και Avisé 1993). Μελέτες που αφορούν στα σολομοειδή έδειξαν τη μεγάλη διακριτική ικανότητα αυτών των μεθόδων (Bermingham *et al.* 1992).

Στην Ελλάδα, μελέτες ισοενζύμων έχουν γίνει για τη σαρδέλα (*Sardina pilchardus*), το γαύρο (*Engraulis encrasicolus*) (Spanakis *et al.* 1989, Μαγουλάς Α. 1990) και τη κουτσομούρα (*Mamuris et al.* 1997).

Παρόλα αυτά, η επέκταση της ανάλυσης των ισοενζύμων και του mtDNA σε θαλάσσια είδη ψαριών, αποδείχθηκε ανεπαρκής για την αποκάλυψη πολυμορφισμού. Για το λόγο αυτό, οι ερευνητές στράφηκαν σε μεθόδους ανάλυσης του πυρηνικού DNA, όπως η ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA και η μέθοδος RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), η οποία θα αναλυθεί με περισσότερες λεπτομέρειες στη συνέχεια.

---

### **1.2.3. Εφαρμογές των μοριακών τεχνικών στις υδατοκαλλιέργειες**

#### **♦ Έλεγχος των επιπέδων της γενετικής ποικιλότητας**

Στα εκκολαπτήρια των ιχθυοαποθεμάτων, πρέπει να γίνονται τακτικοί έλεγχοι των επιπέδων της γενετικής ποικιλότητας, ώστε τα προγράμματα αναπαραγωγής να μην οδηγούν σε μείωση της γενετικής μεταβλητότητας .

Τέτοιοι έλεγχοι συγκρίνουν διάφορα δείγματα ιχθυοαποθεμάτων, επιλεγμένα, είτε από προηγούμενες γενεές, είτε από πατρικούς άγριους πληθυσμούς, με αποτέλεσμα η διαδικασία να μοιάζει πολύ με τη μελέτη της δομής των ιχθυοαποθεμάτων.

Οι έλεγχοι γίνονται με βάση τις αναλύσεις ισοενζύμων και τις αναλύσεις μιτοχονδριακού ή πυρηνικού DNA, με τα όποια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου.

#### **♦ Έλεγχος των εισαγόμενων ή μεταφερόμενων πληθυσμών**

Τα ψάρια που παράγονται στα εκκολαπτήρια ή προέρχονται από άλλες περιοχές, χρησιμοποιούνται συνήθως για την αύξηση των υπαρχόντων φυσικών πληθυσμών. Εάν τα εισαγόμενα ψάρια μεταφέρουν μοναδικούς γενετικούς δείκτες, τότε μπορούν να μελετηθούν οι υβριδισμοί μεταξύ των εισαγόμενων και των γηγενών πληθυσμών.

Παρόλα αυτά, υπήρξαν κάποιες ανησυχίες για την εισαγωγή ψαριών με «εξωτικούς» γενότυπους σε ήδη υπάρχοντες πληθυσμούς (Hindar *et al.*, 1991, Phillip, 1991).

Οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της «τύχης» των εισαγόμενων πληθυσμών, έγκαιρα και αποτελεσματικά.

#### **♦ Άλλες εφαρμογές στις υδατοκαλλιέργειες**

Από τη στιγμή που οι υδατοκαλλιέργειες έγιναν μια πολύ σημαντική

---

πηγή ζωικής πρωτεΐνης, έχουν αυξηθεί και οι προσπάθειες για την ανάπτυξη βελτιωμένων στελεχών. Οι δείκτες πυρηνικού DNA, που παράγονται από τα ισοένζυμα ή από τις τεχνικές ανάλυσης του mtDNA, του μικροδορυφορικού DNA και των δεικτών RAPD, έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμοι στη χαρτογράφηση και τις αναλύσεις σύνδεσης, στις διακρίσεις μεταξύ στελεχών και στον προσδιορισμό σχέσεων μεταξύ γενετικής μεταβλητότητας και προσαρμοστικότητας. (Mitton και Grant, 1984, Bardakci και Skibinski, 1994).

Επίσης, πολλές εφαρμογές των μοριακών τεχνικών, αφορούν στον χειρισμό του φύλου, ο οποίος είναι πολύ σημαντικός για πολλά εκτρεφόμενα είδη, διότι μπορεί να εξαλείψει πολλά προβλήματα στην αναπαραγωγή και την εκτροφή των ειδών αυτών (Delvin *et al.*, 1991).

#### **1.2.4. Εφαρμογές στην αναγνώριση και διάκριση των ειδών**

Οι μοριακές γενετικές προσεγγίσεις έχουν αποδειχθεί πολύτιμες τόσο στη διαλεύκανση δύσκολων ταξινομικών προβλημάτων όσο και στην αναγνώριση των αυγών και των ιχθυδίων. Όσον αφορά την ταξινομία: όταν δύο τάξα είναι αναπαραγωγικώς απομονωμένα το ένα από το άλλο, δικαιολογώντας το καθεστώς των ειδών, τότε, θα συσσωρεύσουν τις γενετικές διαφορές κατά τη διάρκεια της απομόνωσής τους, με αποτέλεσμα το γενετικό διαχωρισμό τους.

Όταν δύο τάξα αναπαράγονται στην ίδια περιοχή, τότε η γενετική διαφοροποίηση παρέχει ισχυρές ενδείξεις του διαχωρισμού των ειδών.

Πολλές φορές είναι δύσκολο να καταψυχθούν και να διατηρηθούν κατεψυγμένα δείγματα, προκειμένου αυτά να αναλυθούν και να μελετηθούν περαιτέρω. Εντούτοις, η μέθοδος PCR επιτρέπει την ενίσχυση και την ανάλυση DNA, το οποίο προέρχεται από ιστούς διατηρημένους σε αλκοόλη. Επίσης μπορεί να γίνει σαφής αναγνώριση αυγών και ιχθυδίων, που είναι συντηρημένα σε αλκοόλη, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει πολύ τις μελλοντικές έρευνες για την ταξινόμηση αυγών και ιχθυδίων.

---

### 1.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR

#### Εισαγωγικά

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA, ιδιαίτερα δε στην αρχή ότι ο χρόνος επανασύνδεσης εξαρτάται από την συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμβαλλομένων συμπληρωματικών αλυσίδων, που περιέγραψαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60. Για την καθοριστική του συμβολή στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR, ο Δρ. K. Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993.

#### Αρχή της μεθόδου

Με την μέθοδο PCR επιτυγχάνεται η «in vitro» σύνθεση ενός τμήματος DNA, που ονομάζεται και «DNA στόχος», εντός ολίγων ωρών. Κάθε κύκλος της PCR αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Έτσι, από αρχική ποσότητα δείγματος DNA μη ανιχνεύσιμου με κλασσικές τεχνικές υβριδισμού (Southern και Northern blotting), ο DNA στόχος ενισχύεται με την PCR σε σημείο που γίνεται ευχερώς ανιχνεύσιμος.

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA στόχου, κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Ακολουθεί θερμική επαναδιάταξη του DNA, κατά την οποία τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (μήκους 15-25 βάσεων), τα οποία ονομάζονται και εκκινητικά μόρια, οδηγοί ή «primers», συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου (2ο στάδιο). Παρουσία θερμοαντοχής DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβονουκελοτιδίων, προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις στα 3' άκρα των οδηγών και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου (3ο στάδιο). Το σύνολο των τριών σταδίων: 1. μετουσίωσης - αποδιάταξης (denaturation), 2. υβριδισμού - πρόσδεσης των οδηγών (annealing) επί των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA

---

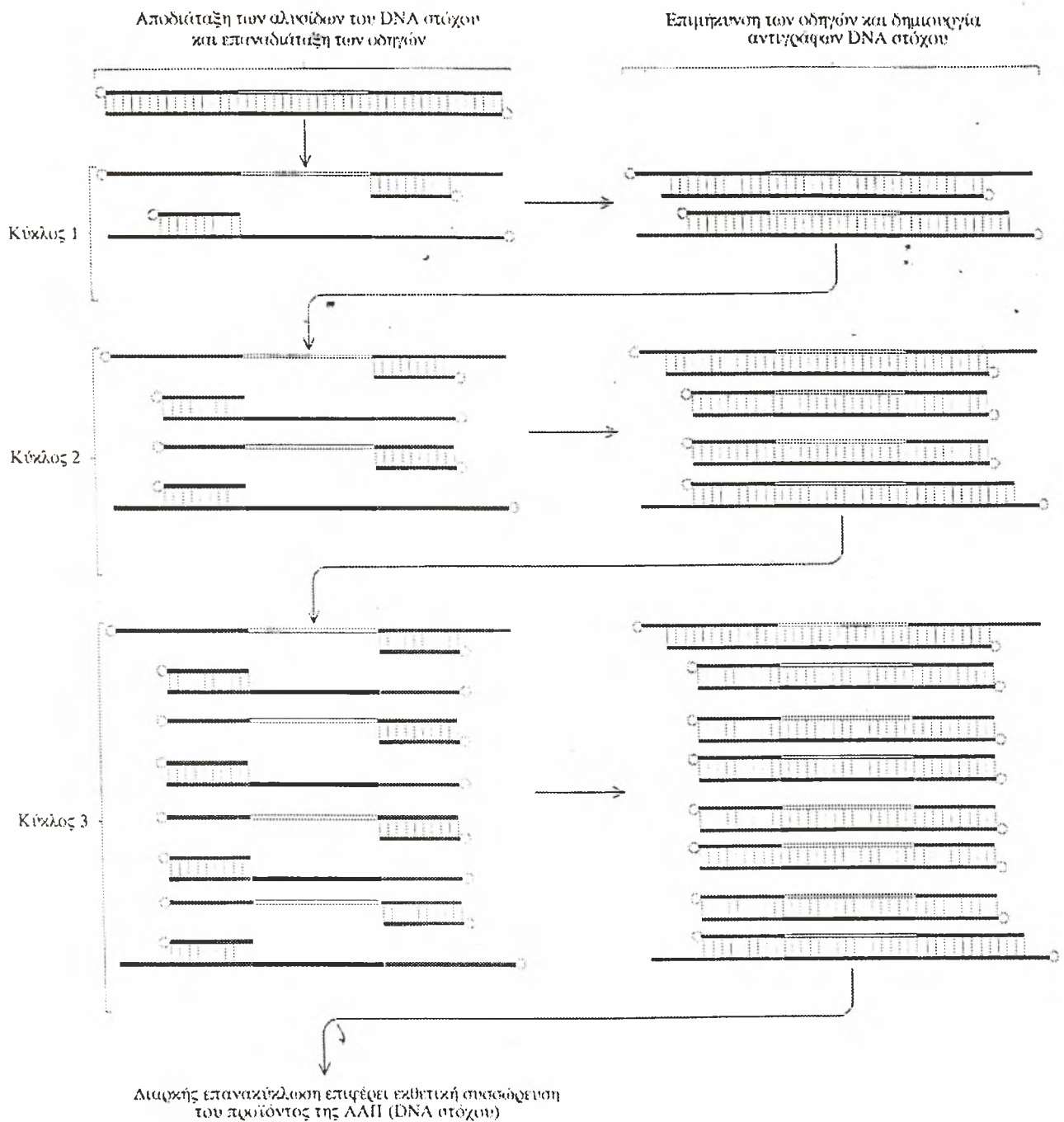
στόχου και 3. επέκτασης - πολυμερισμού των προσδεδεμένων οδηγών-εκκινητών (extension), αποτελεί ένα κύκλο της αντίδρασης PCR.

Η PCR περιέχει στον ίδιο σωλήνα υπόστρωμα - DNA στόχο, οδηγούς, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, θερμοάντοχη DNA πολυμεράση, ιόντα  $Mg^{++}$  και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, απαραίτητο για την ενζυμική δράση. Η πρώτη θερμοάντοχη DNA πολυμεράση απομονώθηκε από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus* (Taq). Η Taq DNA πολυμεράση διατηρεί τη δραστηριότητά της στους  $95^{\circ}C$  για 40' τουλάχιστον λεπτά.

Ο πρώτος κύκλος της PCR αποδίδει 4 κλώνους DNA στόχου (δύο του αρχικού υποστρώματος και δύο αντίγραφα), που αποτελούν πρότυπα καλούπια για την σύνθεση νέων κλώνων DNA στόχου στο 2ο κύκλο. Συνεπώς, στο τέλος του 2ου κύκλου οι κλώνοι του DNA στόχου θα είναι 8 και σε κάθε νέο κύκλο θα αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά  $2^n$ , όπου n, ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης (Σχήμα I).

Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία στάδια αποδιάταξης, υβριδισμού και επέκτασης. Η αποδιάταξη του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία  $92-95^{\circ}C$  για 30" δευτερόλεπτα περίπου, ο υβριδισμός, ανάλογα με την περιεκτικότητα των οδηγών σε A/T-G/C, σε θερμοκρασία από  $50-65^{\circ}C$  για 1' - 2' λεπτά και τέλος η επέκταση των οδηγών σε θερμοκρασία  $70-78^{\circ}C$  για 1' - 2' λεπτά. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας κατά την PCR, πραγματοποιούνται ταχύτατα με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμικών ανανυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών (η θερμοκρασία των δειγμάτων μεταβάλλεται, αυξομειώνεται, κατά  $40^{\circ}C$  σε λιγότερο από 1' λεπτό).

Συνήθως 100 ng ολικού DNA επαρκούν για την επέκταση του DNA στόχου, που αποτελεί κατά κανόνα ελάχιστο μέρος του DNA που συμμετέχει στην αντίδραση. Η αλληλουχία του DNA στόχου πρέπει να είναι ακέραια ώστε να επιτευχθεί η αντιγραφή της. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA στόχου μπορεί να είναι εν πολλοίς άγνωστη, πρέπει απαραίτητως όμως οι αλληλουχίες των δυο άκρων του DNA στόχου να είναι γνωστές για να σχεδιαστούν τα απαραίτητα για την μέθοδο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια - οδηγοί.



ΣΧΗΜΑ I.



---

Στόχος της PCR μπορεί να αποτελέσει και το RNA, αφού προηγουμένως μετατραπεί με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase, RT) σε συμπληρωματικό DNA (complementary, cDNA). Με τον συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφάσης - PCR (RT/PCR), είναι δυνατή η ποσοτική καταγραφή και απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης δεδομένου γονιδίου και η ανίχνευση γονιδιωμάτων RNA ιών.

Ο σχεδιασμός και η επιλογή των κατάλληλων εκκινητικών μορίων - οδηγών γίνεται με βάση τις σταθερές περιοχές του DNA στόχου. Οι οδηγοί πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 τουλάχιστον ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (melting temperature,  $T_m$ ). Η θερμοκρασία τήξεως δίκλωνου DNA είναι συνάρτηση της αλληλουχίας του μορίου, υπολογίζεται όμως και κατά προσέγγιση με βάση την περιεκτικότητα του μορίου σε πουρίνες και πυριμιδίνες σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:  $T_m = (4 \times \text{αριθμός βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός βάσεων A+T})$ . Επιθυμητά  $T_m$  κυμαίνονται κατά κανόνα μεταξύ 55-65 °C. Η ειδικότητα της αντίδρασης οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στην θερμοκρασία επαναδιάταξης ( $T_a$ , annealing temperature) των εκκινητικών μορίων. Η  $T_a$  επιλέγεται χαμηλότερα της  $T_m$  κατά 5-10 °C. Τέλος, η παρασκευή των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων γίνεται σε αυτόματες συσκευές σύνθεσης DNA.

Η PCR ολοκληρώνεται συνήθως σε 25-40 κύκλους οπότε το τμήμα του DNA στόχου επεκτείνεται κατά  $2^n$  (όπου  $n$  ο αριθμός των κύκλων). Αν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους έχουμε την παραγωγή  $2^{25}$  (33,554,432) αντιγράφων, ενώ μετά από 40 κύκλους έχουμε την παραγωγή  $2^{40}$  (1,099,511,627,716) μονόκλωνων συμπληρωματικών αντιγράφων DNA στόχου (Πίνακας 1).

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι  
ΕΠΕΚΤΑΣΗ DNA ΣΤΟΧΟΥ ΜΕ ΑΑΠ

Αριθμός κύκλων ΑΑΠ	Αριθμός μονόκλωνων αντιγράφων DNA στόχου
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824
31	2.147.483.648
32	4.294.967.296
33	8.589.934.592
34	17.179.869.184
35	34.359.738.368
36	68.719.476.736
37	137.438.953.472
38	274.877.906.944
39	549.755.813.888
40	1.099.511.627.776

---

Ο άριστος αριθμός κύκλων, εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον άριστο, οδηγεί συνήθως στην αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη ανίχνευση του DNA στόχου. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι όταν ο αριθμός των μορίων του στόχου σε ένα βιολογικό υλικό είναι  $10^5$  απαιτούνται 30 κύκλοι, όταν είναι  $10^4$  απαιτούνται 35 κύκλοι ενώ όταν είναι  $10^3$  ή μικρότερος απαιτούνται 40-45 κύκλοι. Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους οδηγούς. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR, σε ζεύγη βάσεων, ισούται με το άθροισμα των βάσεων του ζεύγους των εκκινητικών μορίων και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου που επεκτείνεται. Είναι δυνατόν, κατά τους πρώτους κύκλους της PCR να σχηματισθούν αλυσίδες DNA μακρύτερες από το τελικό μήκος του DNA στόχου, οι οποίες όμως αποτελούν ελάχιστο ποσοστό του προϊόντος της PCR και συνεπώς δεν είναι ανιχνεύσιμες.

### Χαρακτηριστικά της μεθόδου

Η ειδικότητα της PCR εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία υβριδισμού ( $T_a$ ), η οποία εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων με το DNA στόχο. Όσο πλησιέστερη είναι η  $T_a$  προς την  $T_m$  τόσο μεγαλύτερη είναι η ειδικότητα της αντίδρασης. Η ειδικότητα εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{++}$ , τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση καθώς και από τη συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων και του DNA στόχου. Η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης πιστοποιείται με την παρουσία ομοιογενούς προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1  $\mu g/ml$ ). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών βάσεων της διπλής έλικας και διευκολύνει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR σε περιβάλλον υπεριώδους φωτισμού.

Ο συνηθέστερος τρόπος ταυτοποίησης του προϊόντος της PCR είναι ο

---

υβριδισμός με γνωστό ανιχνευτή (probe) σημασμένο με  $^{32}\text{P}$ , ή βιοτίνη, ή φλουορεσκίνη, ή αλκαλική φωσφατάση, ή υπεροξειδάση, ή κάποια άλλη εύκολα ανιχνεύσιμη ουσία. Εναλλακτικά, η ταυτότητα του προϊόντος της γονιδιακής επέκτασης, μπορεί να εξακριβωθεί και με ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων διάσπασης από κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.

Το κύριο χαρακτηριστικά της PCR είναι η τεράστια ευαισθησία της μεθόδου. Χρησιμοποιώντας ραδιενεργό σήμανση του μορίου ανιχνευτή (probe), είναι δυνατή η ανίχνευση έως 1 pg DNA. Η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί στο 1 fg με την τεχνική της επανεντοπισμένης PCR (nested PCR). Στην τεχνική αυτή 1-2 μl του προϊόντος της PCR, υποβάλλοντας σε δεύτερη PCR με νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων, εσωτερικό (inner primers) των αρχικών (outer primers), με αποτέλεσμα όταν η πρώτη PCR γίνει για 25 κύκλους και το προϊόν της υποβληθεί σε επανεντοπισμένη PCR για 25 ακόμα κύκλους, να παράγονται  $1.1 \times 10^{15}$  αντίγραφα DNA στόχου. Θεωρητικά η επανεντοπισμένη PCR, έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει 1 αντίγραφο προϊόν HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) σε  $1 \times 10^6$  κύτταρα.

Πιθανή επιμόλυνση της PCR μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Αυτό οφείλεται στην μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής και ιδιαίτερα της επανεντοπισμένης παραλλαγής της. Η επιμόλυνση είναι δυνατό να προέλθει και από αιωρούμενο (aerosol) DNA ή πλασμίδιο στο χώρο εργασίας. Η αποτελεσματική πρόληψη των επιμολύνσεων απαιτεί προσεκτική προετοιμασία των χώρων εκτέλεσης της τεχνικής. Για τη μείωση των επιμολύνσεων συνιστάται: 1. χρήση διαφορετικά χώρων επεξεργασίας των δειγμάτων και διεξαγωγής των αντιδράσεων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις διαδοχικών PCR, 2. χρησιμοποίηση διαφορετικών συσκευών καθέτου νηματικής ροής (Laminar flow hood) για την απομόνωση του DNA και τη προετοιμασία των αντιδραστηρίων και 3. αποστείρωση αντιδραστηρίων και σωληναρίων, προσεκτικό καθαρισμό πιπιετών με αιθανόλη και έκθεση του ή των χώρων εργασίας με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μετά το τέλος της εργασίας για 12 τουλάχιστον ώρες. Οι διαγνωστικές εφαρμογές της PCR και των επανεντοπισμένων παραλλαγών της, πρέπει να εκτελούνται με ιδιαίτερη προσοχή. Σε κάθε αντίδραση PCR, πρέπει να περιλαμβάνονται πολλοί

---

αρνητικοί μάρτυρες και να μην αξιολογείται κάποιο δείγμα σαν θετικό αν δεν επαληθευθεί και επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα δυο τουλάχιστον φορές ιδανικά με δυο διαφορετικά ζεύγη οδηγών.

Η επιλογή του προς επέκταση στόχου, καθώς και ο σχεδιασμός των κατάλληλων οδηγών και ανιχνευτών έχει μεγάλη σημασία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ανίχνευσης ποικιλιών ιών όπως ο HIV, και γονιδιακών περιοχών έντονων ανακατανομών και μεταλλαξιμότητας, όπως διαφόρων εύθραυστων αυτοσωματικών περιοχών, των ψευδοαυτοσωματικών περιοχών του Υ χρωμοσώματος κλπ. Επί θετικών δειγμάτων, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα από 4 διαφορετικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, όπως συνηθίζεται για την επέκταση διαφορετικών γονιδιακών περιοχών, τότε η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι δυνατόν να υπερβεί το 97%.

### **Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR**

Η τεχνική PCR είναι μια γρήγορη και απλή μέθοδος, η οποία μπορεί να εκτελεστεί πάνω σε ελάχιστες ποσότητες ιστού χωρίς να χρειάζεται η θανάτωση του ζώου.

Για παράδειγμα, λέπια, προερχόμενα από ζωντανό ψάρι, παρέχουν αρκετή ποσότητα DNA, αν και πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι πάντα αναγκαίο να θανατώνεται το ζώο για τις αναλύσεις μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA, και ισοενζύμων (Billington και Hober, 1990 Carmichael *et al.* 1992).

Επίσης η τεχνική PCR είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σε DNA το οποίο εξάγεται από στεγνό ιστό προσκολλημένο σε ιστορικές συλλογές ωτόλιθων, κάνοντας δυνατό τον προσδιορισμό γενετικών δομών από πληθυσμούς του παρελθόντος. (C. Taggart, R. Doyle και P. Bentzen).

Η PCR εντάσσεται μαζί με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και τη διαγονιδιακή τεχνολογία, στις βιοτεχνολογικές μεθόδους συνθετικής προσέγγισης του φαινομένου της ζωής. Η σύγχρονη συνθετική μεθοδολογία στηρίζεται στην κατανόηση και αξιοποίηση των γνώσεων της αναλυτικής μεθοδολογίας, από την οποία προέρχεται και της οποίας αποτελεί λογική

---

συνέχεια και ολοκλήρωση. Την τεράστια σημασία της PCR υποδηλώνουν το ευρύ φάσμα εφαρμογών (Βιοτεχνολογία, Βιοϊατρική, βιολογικός έλεγχος περιβάλλοντος, κλπ) και οι απεριόριστες δυνατότητες εξελικτικών προσαρμογών της μεθόδου. Η ταχύτατη διεθνοποίηση του όρου PCR σε σχεδόν ισότιμο των όρων DNA και RNA, είναι επίσης ενδεικτική της σημασίας της μεθόδου.

#### **1.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ RAPD**

##### **Εισαγωγικά**

Τα τελευταία χρόνια οι γενετικές μοριακές προσεγγίσεις έχουν γίνει απαραίτητες σε μελέτες της βιολογίας των ζωικών και φυτικών πληθυσμών. Ωστόσο, παρά τη σταθερή πρόοδο της μεθοδολογίας, η εφαρμογή της ανάλυσης DNA για την επίλυση προβλημάτων, που αφορούν στη συμπεριφορά και την οικολογία των πληθυσμών, είναι περιορισμένη, εξαιτίας τεχνικών δυσκολιών. (Lewin 1989 , Kirby 1990 , Burke *et al.* 1991, Pemberton *et al.* 1991).

Πιθανές εφαρμογές συχνά ματαιώνονται, εξαιτίας της απαίτησης για σημαντικές ποσότητες DNA, στην περίπτωση της ανάλυσης RFLP (πολυμορφισμός μήκους των περιοριστικών τμημάτων του DNA) ή από την έλλειψη πληροφοριών, σχετικών με την αλληλουχία του DNA, στην περίπτωση των συμβατικών τεχνικών που βασίζονται στη μέθοδο PCR (Weatherhead και Montgomerie, 1991).

Μια τεχνική, που χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια για τις ανάγκες της πληθυσμιακής γενετικής, βασίζεται στη χρήση των δεικτών RAPD, που παράγονται με τη μέθοδο PCR (Williams *et al.* 1990, Welsh και McClelland, 1990). Αυτή η μέθοδος, που επιτρέπει την εξέταση της γενωμικής ποικιλότητας, έχει εφαρμοσθεί, επιτυχώς, για την ανίχνευση ποικιλότητας σε διάφορους οργανισμούς, όπως βακτήρια, μύκητες, φυτά, αφίδες και μυρμήγκια. Στα ψάρια, η μέθοδος RAPD έχει οδηγήσει στην αναγνώριση ειδών και υποειδών στη τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) (Bardakci και

---

Skibinski, 1994, Sultmann *et al.* 1995), καθώς και στον έλεγχο του γενετικού πολυμορφισμού στο λαυράκι κατά τον εγκλιματισμό του σε γλυκό νερό (Allegrucci *et al.* 1995).

Επιπλέον, μια συγκριτική μελέτη των δεικτών RAPD και των πολυγονιδιακών αποτυπωμάτων του DNA σε στελέχη της τιλάπιας, αποκάλυψαν όμοιες γενετικές σχέσεις, αποδεικνύοντας ότι η μέθοδος RAPD, παρόλες τις τεχνικές δυσκολίες, μπορεί να είναι αρκετά αποτελεσματική και αξιόπιστη (Naish *et al.* 1995).

### Αρχές της μεθόδου RAPD

Η μέθοδος RAPD (τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA), βασιζόμενη στην τεχνική του PCR, αποτελεί ένα ενδιαφέρον συμπλήρωμα στις ήδη υπάρχουσες τεχνικές ανάλυσης του DNA. Η μέθοδος βασίζεται στα εξής: Ποσότητες γενωμικού DNA, της τάξεως των νανογραμμαρίων, υποβάλλονται στην τεχνική PCR, χρησιμοποιώντας ως εκκινητικά μόρια, μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, τυχαίων αλληλουχιών. Το πρωτόκολλο της ενίσχυσης διαφέρει από τις τυπικές συνθήκες PCR πρώτον, στο ότι χρησιμοποιείται ένα απλό, αυθαίρετο νουκλεοτίδιο ως εκκινητικό μόριο, δεύτερον, στο ότι δεν χρειάζεται καμία προγενέστερη γνώση του γενώματος, που υπόκειται στην ανάλυση και τρίτον, στο ότι οι συνθήκες υβριδισμού (annealing) του DNA στόχου και των εκκινητών είναι πολύ χαμηλότερες από τις κλασσικές (36-38°C).

Όταν το εκκινητικό μόριο είναι μικρό, τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα το γονιδίωμα να περιέχει αρκετές θέσεις εκκίνησης τη μία κοντά στην άλλη, οι οποίες έχουν αντιστραμμένο προσανατολισμό. Η τεχνική RAPD κάνει ουσιώδη ανίχνευση του γονιδιώματος για τις μικρές αυτές αντιστραμμένες επαναλήψεις και ενισχύει τα παρεμβαλλόμενα τμήματα DNA μεταβλητού μήκους.

Το «προφίλ» των προϊόντων ενίσχυσης εξαρτάται από το συνδυασμό DNA στόχου - εκκινητικού μορίου και κάτω από αυστηρά, ελεγχόμενες συνθήκες, αναπαράγεται για κάθε δεδομένο συνδυασμό.

Τα προϊόντα ενίσχυσης αναλύονται σε πηκτές αγαρόζης ή ακρυλαμίδης

---

και οι πολυμορφισμοί προσφέρονται σαν κυρίαρχοι γενετικοί δείκτες, οι οποίοι κληρονομούνται βάσει των νόμων του Μέντελ.

## Εφαρμογές της μεθόδου RAPD

### α. Προσδιορισμός των ταξινομικών ταυτοτήτων

Από την εφαρμογή διαφορετικών εκκινητικών μορίων, μπορούν να παραχθούν διάφοροι μοριακοί δείκτες οι οποίοι είναι διαγνωστικοί για διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα. Για κάθε εκκινητικό μόριο, τα προϊόντα ενίσχυσης (τμήματα DNA) της μεθόδου RAPD μπορούν βασικά, να χωριστούν σε δυο ομάδες:

- ◆ στα μεταβλητά (πολυμορφικά)
- ◆ στα σταθερά (μονομορφικά)

Για παράδειγμα, ας θεωρήσουμε μια ανάλυση RAPD με αρκετά άτομα μέσα σε ένα είδος και αρκετά είδη μέσα σε ένα δεδομένο γένος. Μπορεί να αναγνωριστούν κάποια σταθερά τμήματα, διαγνωστικά για ένα γένος, καθώς και τμήματα που είναι πολυμορφικά μεταξύ ειδών μέσα στο γένος. Και οι δυο τύποι των προϊόντων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση των σχέσεων σε επίπεδο ταξινομίας (σχήμα II).

Ομοίως, τα πολυμορφικά τμήματα στο επίπεδο του είδους, θα αναγνωρίσουν τα άτομα ενός δεδομένου είδους, εάν το τμήμα είναι σταθερό για όλα τα άτομα αυτού του είδους (σχήμα II).

Επίσης, τα πολυμορφικά τμήματα μεταξύ ατόμων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό της ταυτότητας του κλώνου όπως απαιτείται συχνά, για τους μη - σεξουαλικά αναπαραγωγικούς οργανισμούς. Συνεπώς τα προϊόντα RAPD μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί μοριακοί χαρακτήρες σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα.

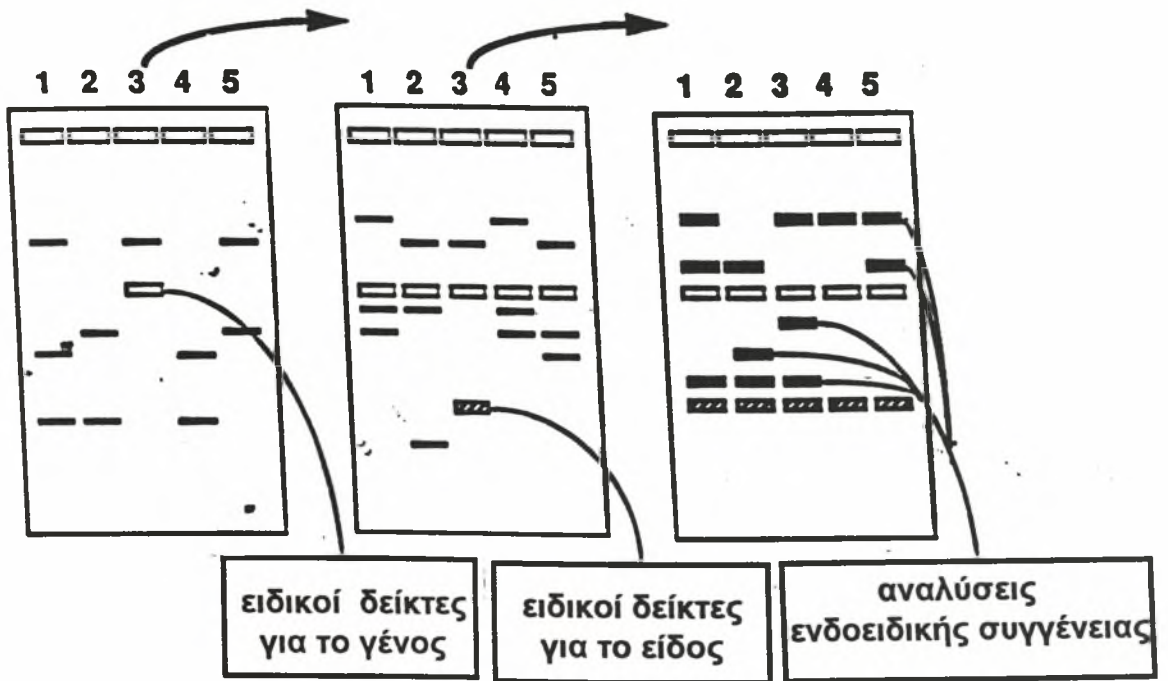
Παρόλα αυτά, ο προσδιορισμός των συστηματικών ομάδων από διαγνωστικούς δείκτες RAPD, μπορεί να επιτευχθεί μόνο μετά από σύγκριση με ένα σετ γενοτύπων ενός γνωστού «προφίλ» ενίσχυσης RAPD για το δεδομένο εκκινητικό μόριο.



A : Γένος

B : Είδη

C : Άτομα



ΣΧΗΜΑ II. Χρήση των πολυμορφικών και μη-πολυμορφικών τμημάτων RAPD για την ανάλυση του γενώματος.

---

## **β. Ανάλυση της ενδοειδικής ροής γονιδίων και του υβριδισμού**

Η μέθοδος RAPD μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση της συγχώνευσης γενοτύπων σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα. Στο επίπεδο του ατόμου, οι δείκτες RAPD μπορούν να εφαρμοστούν στην ανάλυση καταγωγής, σε επίπεδο πληθυσμού ή είδους, οι δείκτες RAPD μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση υβριδικών πληθυσμών ή ειδών. Η ανίχνευση των γενοτυπικών υβριδίων βασίζεται πάνω στην αναγνώριση των διαγνωστικών δεικτών RAPD για τους πατρικούς γενότυπους.

## **γ. Ανίχνευση της πατρότητας και των σχέσεων συγγένειας**

Ένα συχνό πρόβλημα στην οικολογία συμπεριφοράς είναι ο προσδιορισμός του πραγματικού «πατέρα» από έναν αριθμό πιθανών «πατέρων».

Αναλύοντας τμήματα τα οποία είναι πολυμορφικά μέσα σε άτομα, η ανάλυση RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της πατρότητας και των σχέσεων συγγένειας μέσα σε μεγάλα δείγματα απογόνων.

Για τις στατιστικές αναλύσεις, ο αριθμός των πολυμορφικών δεικτών μπορεί να αυξηθεί με αύξηση του αριθμού των διαγνωστικών εκκινητικών μορίων.

Επίσης, μπορούν να παραχθούν συνθετικοί απόγονοι αναμιγνύοντας ίσες ποσότητες DNA από την μητέρα και τον πιθανό πατέρα.

Τα προϊόντα ενίσχυσης από τους συνθετικούς απογόνους θα περιέχουν ολόκληρο τον αριθμό των ζωνών, οι οποίες θα εμφανίζονται σε κάθε απόγονο από αυτούς τους γονείς.

## **δ. Ανάλυση δειγμάτων μικρού γονιδιώματος**

Η τεχνική RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ποσοτικών εκτιμήσεων των σχετικών αναλογιών των διαφορετικών

---

γονιδιωμάτων σε δείγματα μικτού DNA.

Δείγματα μικτού DNA υπάρχουν σε πολυγαμικά συστήματα σύζευξης, όπως έντομα, ψάρια, όπου λαμβάνει χώρα ανταγωνισμός σπέρματος και μικτή πατρότητα.

#### **ε. Παραγωγή νέων ειδικών ανιχνευτών**

Κάθε διαγνωστικός δείκτης RAPD μπορεί να απομονωθεί από την πηκτή αγαρόζης, να ενισχυθεί ξανά και να αναλυθεί με ραδιοανάλυση. Αυτές οι ειδικές αναλύσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποκλειστεί η πιθανότητα κάποια τμήματα διαφορετικών αλληλουχιών αλλά ίδιου μεγέθους, να κινούνται μέσα στην πηκτή με την ίδια ταχύτητα με αποτέλεσμα να μην διακρίνονται μεταξύ τους. Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν αναπτύξεις μελετών για ταξινομικές αναλύσεις ή ποσοτικές εκτιμήσεις της παρουσίας ενός ορισμένου γονιδιώματος σε ένα μικτό δείγμα.

#### **Δυσκολίες και περιορισμοί στην τεχνική RAPD**

##### **α) Το μέγεθος του εκκινητικού μορίου**

Ο βαθμός ειδίκευσης στην λεπτομερή ανίχνευση ενός γονιδιώματος προσδιορίζεται από το μέγεθος του εκκινητικού μορίου. Είναι γνωστό ότι τα εκκινητικά μόρια μικρού μεγέθους ενισχύουν έναν πολύ μεγάλο αριθμό αλληλουχιών και τα μεγάλα εκκινητικά μόρια ενισχύουν τόσο μικρό αριθμό αλληλουχιών όσο χρειάζεται για να είναι αυτές κατατοπιστικές.

Πέρα από ένα ορισμένο μέγεθος εκκινητικού μορίου (περίπου 10-15 νουκλεοτίδια), ελατώνοντας το μήκος του μορίου, μπορεί να αυξηθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του μορίου, συνεπώς θα αυξηθεί και η πιθανότητα της τυχαίας ενίσχυσης μη αναπαραγώμενων προτύπων.

Ολες οι έρευνες, όπου χρησιμοποιήθηκαν τις τυπικές συνθήκες RAPD με διαχωρισμό των τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης, έχουν αποδείξει ότι τα εκκινητικά μόρια, μεγέθους 10 bp είναι τα πιο αποτελεσματικά.

---

## **β) Η ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης**

Οι κυριότεροι περιορισμοί της τεχνικής RAPD προέρχονται από την ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης της PCR. Ακόμη και οι μικρότερες αλλαγές στις συνθήκες μπορεί να επιδράσουν στην αναπαραγωγή των προϊόντων ενίσχυσης.

Η τεχνική είναι ευαίσθητη:

α) στον τύπο του «προφίλ» της θερμοκρασίας

β) στον τύπο της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται και

γ) στη συγκέντρωση των ιόντων Mg. Το «προφίλ» της ενίσχυσης είναι ευπαθές στις συγκεντρώσεις της Taq πολυμεράσης και του DNA.

Ο τύπος του θερμοκρασιακού «προφίλ» είναι μια ιδιότητα των θερμικών κύκλων της PCR και θα πρέπει να τυποποιείται. Μόνο αυστηρά τυποποιημένες συνθήκες αντίδρασης θα εξασφαλίσουν αναπαραγόμενα προϊόντα ενίσχυσης. Επίσης έχει βρεθεί ότι η ιδανική συγκέντρωση DNA στόχου μπορεί να μεταβάλλεται σε σχέση με τις τυπικές συνθήκες (25 ngr ανά αντίδραση), εξαρτώμενη από το συνδυασμό εκκινητικού μορίου - DNA στόχου που χρησιμοποιείται.

## **γ) Η πιθανότητα της ταυτόχρονης μετατόπισης κάποιων ζωνών DNA**

Υπάρχει η πιθανότητα, με την εφαρμογή της τεχνικής RAPD, να ενισχυθούν κάποια τμήματα διαφορετικών αλληλουχιών αλλά ίδιου μεγέθους, οπότε η ανίχνευση τους σε πηκτή αгарόζης ως ξεχωριστά τμήματα, να είναι αδύνατη, λόγω της μετακίνησής τους με την ίδια ταχύτητα. Για τον διαχωρισμό των ζωνών αυτών, χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές ραδιοεντοπισμού ή ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

---

## **δ) Μη αναπαραγώμενα προϊόντα ενίσχυσης**

Όπως συμβαίνει και σε άλλους γενετικούς δείκτες, έτσι και στην τεχνική RAPD, μερικά τμήματα είναι ασαφή και δυσδιάκριτα. Αυτά τα μη αναπαραγώμενα προϊόντα ενίσχυσης δεν χρησιμοποιούνται ως γενετικοί δείκτες. Παρόλα αυτά, όλες οι εργασίες που έχουν χρησιμοποιήσει την τεχνική RAPD έχουν δείξει ότι, όταν η ενίσχυση RAPD εφαρμοστεί για δυο ή περισσότερες φορές, η πλειονότητα των δεικτών αναπαράγονται σωστά και εντοπίζονται πολύ εύκολα.

Σε πολλές περιπτώσεις της χρήσης της τεχνικής PCR, τα προϊόντα ενίσχυσης, μερικές φορές, εντοπίζονται ακόμη και με έλλειψη προτύπου DNA στην αντίδραση.

Παρόλα αυτά σε όλες τις δημοσιευμένες έρευνες, αυτές οι ζώνες - «φαντάσματα», εξαφανίζονται όταν έχει σίγουρα, προστεθεί πρότυπο DNA στην αντίδραση.

## **Δυνατές μελλοντικές εφαρμογές**

**1. Προσδιορισμός φύλου.** Σε πολλές οικολογικές εφαρμογές θα ήταν χρήσιμο να έχουμε διαθέσιμους δείκτες για φυλοδιάγνωση. Αναμένεται όμως να υπάρχουν κάποιες δυσκολίες στην εφαρμογή των δεικτών RAPD με αυτά τα χαρακτηριστικά.

**2. Παραγωγή ειδικών εκκινητικών μορίων PCR για ανώνυμα γονιδιώματα.** Ένας μεγάλος περιορισμός της εφαρμογής PCR σε οικολογικά προβλήματα είναι η απουσία πληροφοριών για τις αλληλουχίες DNA στην πλειονότητα των οργανισμών. Αυτή η δυσκολία μπορεί να υπερνικηθεί σε πολλές εφαρμογές, χρησιμοποιώντας μια τεχνική βασιζόμενη στο RAPD, για ανάπτυξη επιδιωκόμενων εκκινητικών μορίων PCR.

**3. Ποσοτικές αναλύσεις μικτών βιολογικών δειγμάτων** Σε αναλογία με τις αναλύσεις δειγμάτων μικτής πατρότητας, μπορεί να γίνουν αναλύσεις

---

δειγμάτων πεδίου σε διαφορετικά είδη (π.χ. δείγματα πλαγκτού).

4. Φυλογένεση Οι δείκτες RAPD μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμοι χαρακτήρες για κλαδιστική ανάλυση.

---

## **2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ, ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΚΟΥΤΣΟΜΟΥΡΑΣ**

Η κουτσομούρα *Mullus barbatus* L. είναι ένα από τα πιο σημαντικά είδη ψαριών που αλιεύονται στο Μεσόγειο θάλασσα. Στις ελληνικές θάλασσες η αλιευτική παραγωγή της κουτσομούρας ανέρχεται σε 3.015 τόνους αποτελώντας το 1,5-2% της συνολικής αλιευτικής παραγωγής (Stergiou *et al.*, 1997, υπό δημοσίευση).

Είναι βενθικό ψάρι, το οποίο σχηματίζει κοπάδια, με μεγάλη, σε διάρκεια, αναπαραγωγική περίοδο (Απρίλιος - Σεπτέμβριος). Αν και αποθέτει τα αυγά στο βυθό, οι μεταπρονύμφες του είναι πελαγικές, γεγονός που συντελεί στη διασπορά των ατόμων και πιθανόν, στην ομογενοποίηση των διαφορετικών ιχθυοπληθυσμών.

Η συστηματική κατάταξη της κουτσομούρας (*Mullus barbatus*) είναι η εξής:

ΚΛΑΣΗ:	<b><i>Osteichthyes</i></b>
ΜΕΣΟΚΛΑΣΗ:	<b><i>Teleostei</i></b>
ΤΑΞΗ:	<b><i>Perciformes</i></b>
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:	<b><i>Mullidae</i></b>
ΓΕΝΟΣ:	<b><i>Mullus</i></b>
ΕΙΔΟΣ:	<b><i>Mullus barbatus</i></b>

Η κουτσομούρα κατανέμεται στο Ατλαντικό ωκεανό, από τα Βρετανικά νησιά (βόρεια) μέχρι το Ντακάρ (νότια), καθώς επίσης στη Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα (Whitehead *et al.*, 1986).

---

## **2.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΚΟΥΤΣΟΜΟΥΡΑ**

Το είδος έχει μελετηθεί σε κάποιο βαθμό για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως η σχέση μήκους - βάρους (Pettrakis και Stergiou, ) ή βιολογικά χαρακτηριστικά όπως οι τροφικές συνήθειες (Caragitsou και Tsimenides 1982, Vassilopoulou 1989), ή η ηλικία αναπαραγωγής (Vassilopoulou, 1987).

Οι πρώτες μελέτες της γενετικής δομής της κουτσομούρας βασίστηκαν στην ποικιλότητα της ηλεκτροφορικής ανάλυσης των ισοενζύμων όπως αυτή αποκαλύφτηκε εξετάζοντας ένα μικρό αριθμό γονιδιακών τόπων (Basaglia και Callegarini, 1988, Cammarata *et al.*, 1991). Αυτές οι μελέτες εστιάστηκαν κυρίως στην εύρεση πιθανών διαγνωστικών τόπων μεταξύ των κουτσομούρας και του μπαρμπουνιού (*Mullus surmuletus*). Επίσης, οι μελέτες αυτές περιορίστηκαν σ' ένα σχετικά μικρό δείγμα ατόμων που προήλθαν από τη κεντρική Μεσόγειο. Έτσι, λίγες μόνο πληροφορίες που αφορούν τη γενετική τους δομή και ποικιλότητα είναι προς το παρόν διαθέσιμες. Πρόσφατα, σε μια άλλη εργασία μελετήθηκαν σε ισοενζυμικό επίπεδο 8 πληθυσμοί κουτσομούρας, αλλά δεν βρέθηκαν γενετικοί δείκτες που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην ταυτοποίηση των διαφορετικών ιχθυοπληθυσμών (Mamuris *et al.* 1998).

Μέχρι σήμερα καμιά μελέτη δεν έχει πραγματοποιηθεί στο επίπεδο του πυρηνικού DNA, πράγμα που καθιστά χρήσιμη τη μελέτη του για να υπάρχει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της γενετικής δομής της κουτσομούρας.



---

### 2.3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην εργασία αυτή, χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες RAPD για την εκτίμηση της ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας, σε μοριακό επίπεδο, μεταξύ 8 πληθυσμών κουτσομούρας από τη Μεσόγειο Θάλασσα.

Επίσης, έγινε μια προσπάθεια για την ανίχνευση ειδικών δεικτών RAPD, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση των πληθυσμών αυτών.

Δεδομένου ότι οι ίδιοι πληθυσμοί έχουν μελετηθεί σε ισοενzymικό επίπεδο (Mamuris *et al.* 1998), επιχειρήθηκε μια συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων των δυο εργασιών, προκειμένου να διαπιστωθεί ο βαθμός αποτελεσματικότητας των δύο μεθόδων (RAPD-ισοένζυμα) στην μελέτη του ενδοειδικού γενετικού πολυμορφισμού.

---

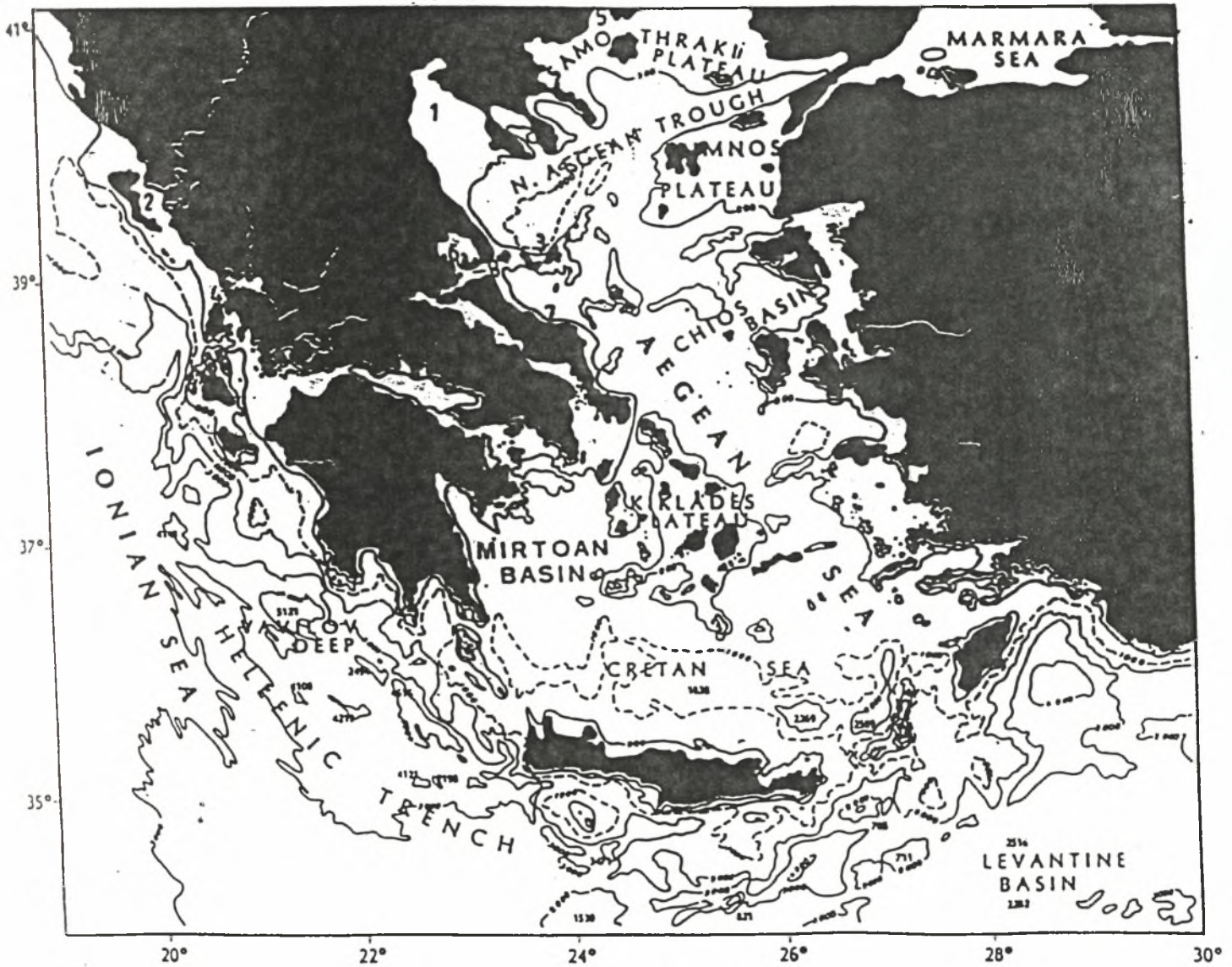
### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ**

Οι πληθυσμοί της κουτσομούρας συλλέχθηκαν με εμπορικές τράτες (εκτός από το δείγμα του Αμβρακικού που συλλέχθηκε με δίχτυα) από 7 περιοχές της Ελλάδας (5 από το Αιγαίο και 2 από το Ιόνιο πέλαγος) και μια από τον κόλπο της Λυών, στη Γαλλία (εικ.1). Επιπλέον, στην ανάλυση συμπεριλήφθηκε ένα δείγμα μπαρμπουνιού (*Mullus surmuletus*) από το Τρίκερι (εικ.1), ως πληθυσμός ελέγχου. Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, περιείχαν μόνο ενήλικα άτομα.

#### **3.2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA**

Η εξαγωγή και η απομόνωση του ολικού DNA, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Cenis *et al.* (1993), μετά από κάποιες τροποποιήσεις. Σε ένα σωλήνα Eppendorf, ομογενοποιήθηκαν περίπου 50 mg λευκού μυϊκού ιστού (αποθηκευμένο στους  $-40^{\circ}\text{C}$ ) σε 200 μl buffer απομόνωσης (200 mM Tris -HCL, pH=8,5, 200 mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS), προστέθηκαν 200 μl οξικού νατρίου 3M, pH=5,2, και ο σωλήνας τοποθετήθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά. Μετά από μια φυγοκέντρηση 15 λεπτών στις 13.000 rpm, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο σωλήνα. Εν συνεχεία, το DNA καθαρίστηκε με διαδοχικές εκχυλίσσεις με φαινόλη, φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη (25V: 1V) και χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη (24V:1V). Μετά από καθίζηση με παγωμένη αιθανόλη 100% (2 ώρες στους  $-20^{\circ}\text{C}$ ), το ίζημα του DNA συγκεντρώθηκε με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 λεπτά. Ακολούθησε πλύση με 70% αιθανόλη και λυοφιλοποίηση. Τέλος το DNA επαναιωρήθηκε σε 100 μl buffer T.E. (100 mM Tris-Hcl, 1mM EDTA, pH=8,0).



Εικόνα 1. Χάρτης της Ανατολικής Μεσογείου, όπου φαίνονται τα σημεία δειγματοληψίας για την κουτσομούρα (1. Θερμαϊκός, 2. Κέρκυρα, 3. Αλλόνησος, 4. Αμβρακικός, 5. Καβάλα 6. Πλατανιά, 7. Κύμη) και για το μπαρμπούνι (8. Τρίκερι) (εκτός του δείγματος της Γαλλίας). Φαίνονται επίσης και ορισμένα βαθυμετρικά χαρακτηριστικά.

### 3.3. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ RAPD

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν 29 εκκινητικά μόρια, των οποίων η προμήθεια έγινε από την Operon Technologies, Alameda, CA, USA (πιν.ΙΙ).

Προκειμένου να προσδιορισθούν γενετικοί δείκτες, που θα μπορούσαν, ενδεχομένως, να ταυτοποιήσουν (ή να διαχωρίσουν) τους πληθυσμούς, ελέγχθησαν έξι άτομα από κάθε πληθυσμό, με όλους τους εκκινητές. Επιπλέον, για να εκτιμηθούν οι γενετικές ομοιότητες μεταξύ των πληθυσμών, ελέγχθησαν είκοσι άτομα από κάθε πληθυσμό με τέσσερις εκκινητές (OPA 02, OPA 09, OPE 11, OPE 12), οι οποίοι επιλέχθησαν τυχαία (πιν.ΙΙ).

Μετά από δοκιμαστικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιδράσεων των συγκεντρώσεων DNA, dNTPs, Mg<sup>++</sup> και Taq πολυμεράσης, καθώς, και τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας συγκόλλησης των εκκινητών, οι συνθήκες ενίσχυσης καθορίστηκαν ως εξής:

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε μίγμα αντίδρασης όγκου 25 μl, που περιείχε 30 ng «μήτρας» DNA, μια μονάδα Taq πολυμεράσης (Minotech, Ελλάδα), 0,25 buffer αντίδρασης (500 mM KCl, 100 mM Tris, pH= 9,0). Για τον έλεγχο της επιμόλυνσης των αντιδράσεων με ξένο DNA, πραγματοποιήθηκαν αρνητικοί έλεγχοι, παραλείποντας το DNA από το μίγμα αντίδρασης.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιλάμβαναν ένα σύνολο 35 κύκλων των 40 sec στους 94°C, 1 min στους 38 °C, 1 min στους 72 °C, χρησιμοποιώντας τις γρηγορότερες διαθέσιμες μεταβάσεις μεταξύ των θερμοκρασιών. Τέλος, το μίγμα τοποθετήθηκε στους 4 °C μέχρι την ηλεκτροφόρηση.

Για τον εντοπισμό συγκεκριμένων δεικτών RAPD μεταξύ των πληθυσμών της κουτσομούρας, διαχωρίστηκαν 10 μl του μίγματος των προϊόντων ενίσχυσης σε μια πηκτή αγαρόζης 1,4%, που περιείχε 0,5 μl.μl<sup>-1</sup> βρωμιούχο αιθύδιο σε buffer TAE (40mM Tris/acetate, 1mM EDTA).

Οι ζώνες εμφανίστηκαν σε συσκευή UV και φωτογραφήθηκαν (εικ.2). Μετά από άμεση παρατήρηση του προτύπου των ζωνών στη συσκευή UV, οι

---

φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση των ενισχυμένων προϊόντων.

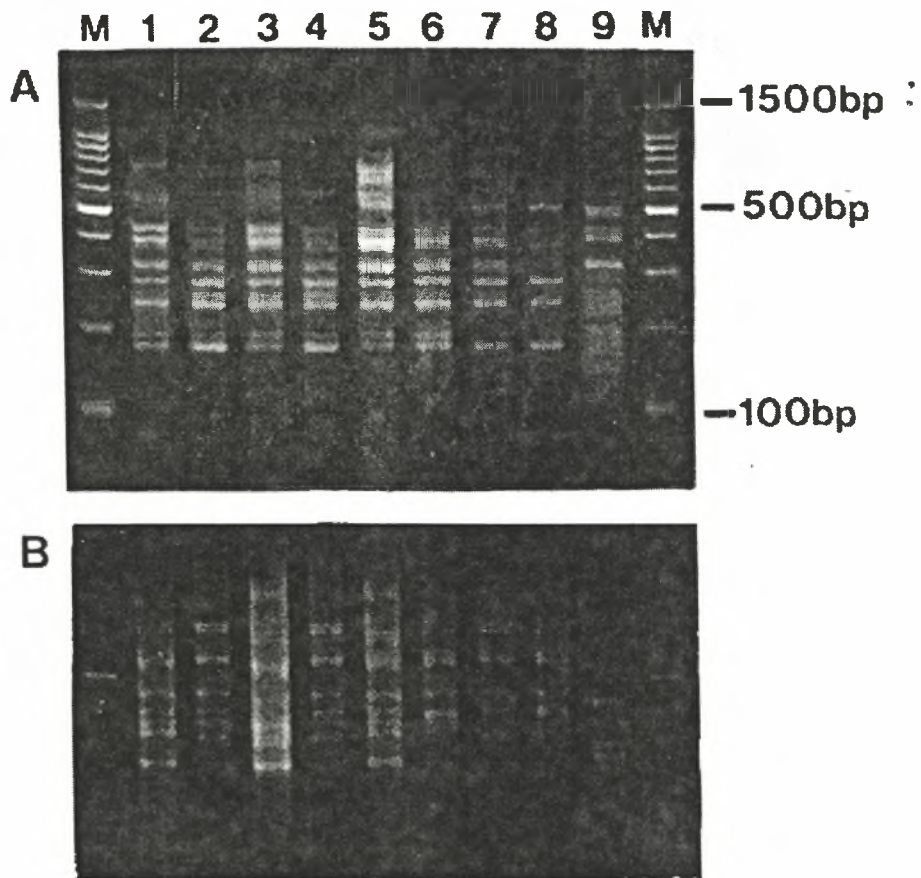
Για τον καθορισμό γενετικών διαφορών μεταξύ των πληθυσμών διαχωρίστηκαν άλλα 10 μl προϊόντων ενίσχυσης σε κάθετες πηκτές πολυακρυλαμίδης 6%, σε buffer TBE (0,89 M Tris, 0,89 M βορικό οξύ και 0,11 M EDTA, pH=8,3). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πηκτές μονιμοποιήθηκαν με 10% αιθανόλη και 0,5% οξικό οξύ, 2 φορές για 3 λεπτά, με 0,1% νιτρικό άργυρο για 10 λεπτά, καθαρίστηκαν 2 φορές με απεσταγμένο νερό και εμφανίστηκαν σε ένα αλκαλικό διάλυμα (1,5% NaOH, 0,1% NaBH<sub>4</sub> και 0,15% CH<sub>2</sub>O).

Προς αποφυγήν προβλημάτων, όπως η μεταβολή του αριθμού και της έντασης των προϊόντων ενίσχυσης, εξαιτίας των συγκεντρώσεων του DNA, MgCl<sub>2</sub>. Τα πολυμεράσια, dNTPs και των μεθόδων χρώσης των πηκτών, οι συγκρίσεις κινητικότητας των ζωνών έγιναν μόνο εντός των πηκτών και βασίστηκαν στην ίδια αντίδραση PCR.

Από την ανάλυση, αποκλείστηκαν οποιαδήποτε αταίριαστα πρότυπα DNA, που προέκυψαν εξαιτίας μη ικανοποιητικής ενίσχυσης.

Πίνακας II. Κωδικοί και αλληλουχίες των τυχαίων εκκινήτων της Oregon που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Κωδικοί	Αλληλουχία (5' to 3')
OPA 01	CAGGCCCTTC
OPA 02	TGCCGAGCTG
OPA 03	AGTCAGCCAC
OPA 04	AATCGGGCTG
OPA 05	AGGGGTCTTG
OPA 06	GGTCCCTGAC
OPA 07	GAAACGGGTG
OPA 08	GTGACGTAGG
OPA 09	GGGTAACGCC
OPA 10	GTGATCGCAG
OPA 11	CAATCGCCGT
OPA 12	TCGGCGATAG
OPA 13	CAGCACCCAC
OPA 14	TCTGTGCTGG
OPA 15	TTCCGAACCC
OPA 16	AGCCAGCGAA
OPA 17	GACCGCTTGT
OPA 18	AGGTGACCGT
OPA 19	CAAACGTCCG
OPA 20	GTTGCGATCC
OPE 02	GGTGCGGGAA
OPE 03	CCAGATGCAC
OPE 05	TCAGGGAGGT
OPE 11	GAGTCTCAGG
OPE 12	TTATCGCCCC
OPF 01	ACGGATCCTG
OPF 02	GAGGATCCCT
OPF 03	CCTGATCACC
OPF 04	GGTGATCAGG



**Εικόνα 2.** Πρότυπα ζωνών των εκκινητών OPA 10 (A) και OPF 02 (B) σε πηκτές αγαρόζης μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. 1. Θερμαϊκός, 2. Κέρκυρα, 3. Αλλόνησος, 4. Αμβρακικός, 5. Καβάλα, 6. Πλατανιά, 7. Κύμη, 8. Γαλλία, 9. Τρίκερι (μπαρμπούνι), M. 100bp δείκτης.

---

### **3.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Lynch και Milligan (1994). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, για την εκτίμηση ετεροζυγωτίας μέσα στους πληθυσμούς ελήφθησαν υπόψιν μόνο οι πολυμορφικές ζώνες, των οποίων οι συχνότητα ήταν μικρότερη από  $1 - (3/N)$ , όπου N είναι ο αριθμός των ατόμων που αναλύθηκε για κάθε πληθυσμό.

Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν ξεχωριστά, για τα δεδομένα κάθε εκκινητικού μορίου και για τα συνολικά δεδομένα από τα 4 εκκινητικά μόρια που μελετήθηκαν.

Οι γενετικές αποστάσεις, που εκτιμήθηκαν από κάθε εκκινητικό μόριο ξεχωριστά, συγκρίθηκαν, χρησιμοποιώντας το Mantel t-test (1967). Τελικά, για την εκτίμηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν οι γενετικές αποστάσεις και από τα 4 εκκινητικά μόρια και κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα με τη μέθοδο UPGMA (Sneath και Sokal 1973), χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο για H/Y, PHYLIP 3,5 (Felsenstein, 1993).



---

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **4.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΠΗΚΤΕΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Όλοι οι εκκινητές, εκτός από δυο (OPA 03 και OPA 07), παρείχαν ικανοποιητικά προϊόντα ενίσχυσης, σε όλα τα δείγματα που ελέχθηκαν. Κάθε εκκινητής παρήγαγε ένα ξεχωριστό πρότυπο ζωνών ενισχυμένου DNA: ορισμένες ζώνες εμφανίστηκαν έντονες και αναπαραγόμενες σε όλες τις αντιδράσεις PCR ενώ, ορισμένες άλλες εμφανίστηκαν περιστασιακά και ήταν ασθενείς. Οι ζώνες, οι οποίες εμφανίστηκαν σε τρεις, τουλάχιστον, επαναλήψεις, ανεξάρτητα από την έντασή τους, θεωρήθηκαν αξιόπιστες. Όλοι οι εκκινητές παρήγαγαν διαφορετικά και ευδιάκριτα πρότυπα ζωνών, βάσει των οποίων, ήταν δυνατόν να διακριθεί το μπαρμπούνι (*M. surmuletus*) από την κουτσομούρα (*M. barbatus*) (εικ.2).

Παρόλα αυτά, κανένας από τους εκκινητές δεν κατάφερε να δώσει κάποια διαγνωστική ζώνη, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναγνώριση των γεωγραφικών πληθυσμών της κουτσομούρας (εικ.2).

Μια διαφοροποίηση του προτύπου ζωνών, που παρατηρήθηκε με κάποιους εκκινητές, δεν ήταν σταθερή για όλα τα άτομα μέσα στους πληθυσμούς και θα πρέπει να αποδοθεί σε ενδοειδικό πολυμορφισμό.

### **4.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΠΗΚΤΕΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ**

Ο αριθμός των ατόμων που αναλύθηκαν για κάθε πληθυσμό κουτσομούρας και για κάθε εκκινητικό μόριο κυμάνθηκε μεταξύ 17 και 20 (πιν.III). Ο αριθμός των αναπαραγόμενων και ευδιάκριτων ζωνών που αναλύθηκε για κάθε εκκινητικό μόριο, σε όλους τους πληθυσμούς, κυμάνθηκε από 15 ως 28 (πιν.III). Ο αριθμός των μονομορφικών ζωνών, (ζώνες με σταθερή εμφάνιση σε όλα τα άτομα, διέφερε μεταξύ των εκκινητικών μορίων: 11/21 (52,38%) για τον OPA 02, 12/28 (42,8%) για τον OPA 09, 10/23 (43,47%) για τον OPE 11 και 9/15 (60%) για τον OPE 12 (πιν.III). Τα τμήματα

---

με μέγεθος μικρότερο των 1000 ζευγών βάσεων, εμφανίστηκαν περισσότερο πολυμορφικά από αυτά με μεγαλύτερο μέγεθος.

Παρατηρήθηκε διακύμανση του βαθμού ετεροζυγωτίας, εντός των πληθυσμών, για τα δεδομένα κάθε εκκινητικού μορίου, ξεχωριστά, αλλά και για τα συνολικά δεδομένα από όλα τα εκκινητικά μόρια (πιν.ΙV). Οι διαφορές μεταξύ των σετ δεδομένων, δεν ήταν σημαντικές για τα εξής ζεύγη εκκινητικών μορίων: OPA 02 - OPA 09, OPA 02 - OPE 12, OPA 09 - OPE 12 (Wilcoxon sign rank test,  $P > 0,05$ ), ενώ βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα εξής ζεύγη εκκινητικών μορίων: OPA 02 - OPE11, OPA09 - OPE11, OPE11 - OPE 12 (Wilcoxon sign rank test,  $P < 0,05$ ). Για την εκτίμηση των διαφορών στις συχνότητες των ζωνών μεταξύ των πληθυσμών, εφαρμόστηκε για κάθε ζώνη το  $\chi^2$  τεστ της ανεξαρτησίας. Μόνο 4 ζώνες RAPD (4,61%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορετικές συχνότητες, εξαιτίας της απουσίας και /ή της παρουσίας μονομορφικών τμημάτων σε διαφορετικά δείγματα (πιν.V). Οι τιμές της γενετικής απόστασης (D) μεταξύ των πληθυσμών (πιν.VI), όπως εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο του Nei (1978), ήταν διαφορετικές για κάθε εκκινητικό μόριο, αλλά οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές (Mantel t - tests)  $P < 0,05$  για όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των δειγμάτων), εκτός από τα σετ δεδομένων, μεταξύ των εκκινητικών μορίων OPA 02 και OPE11 (Mantel t-test,  $r = 0,584$ ,  $t=2,190$   $P=0,068$ ).

Οι γενετικές αποστάσεις, που υπολογίστηκαν από τα συνολικά δεδομένα για όλα τα εκκινητικά μόρια (πιν.VI), επιβεβαίωσαν ότι ο πληθυσμός του μπαρμπουνιού ήταν γενετικά διακριτός από τους πληθυσμούς της κουτσομούρας (μέση D = 0,42, για όλες τις συγκρίσεις ανά ζεύγη). Οι γενετικές αποστάσεις, εντός των πληθυσμών της κουτσομούρας κυμάνθηκαν από D = 0,0024 (Κύμη / Αλλόνησος), έως D = 0,0366 (Πλατανιά / Γαλλία). Το δείγμα της Γαλλία ήταν γενετικά το πιο διακριτό (μέση D = 0,031), και τα δείγματα από το Αιγαίο Πέλαγος έδειξαν να διαφέρουν από τα δείγματα του Ιονίου Πελάγους (μέση D = 0,014, για όλες τις συγκρίσεις ανά ζεύγη μεταξύ των δυο ομάδων των πληθυσμών). Οι γενετικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών φάνηκαν καθαρά στο δένδρογραμμα, το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών (σχήμα III).

Πίνακας III. Αριθμοί των ατόμων (N) και των ζωνών RAPD (n) που αναλύθηκαν για κάθε πληθυσμό κουτσομούρας και για κάθε τυχαίο εκκινητή και οι αριθμοί των μονομορφικών ζωνών (m) που βρέθηκαν για κάθε εκκινητή σε κάθε πληθυσμό.

Πληθυσμοί	ΟΡΑ 02			ΟΡΑ 09			ΟΡΕ 11			ΟΡΕ 12		
	N	n	m	N	n	m	N	n	m	N	n	m
ΠΛΑΤΑΝΙΑΣ	19	21	11	18	28	12	18	23	10	20	15	9
ΚΥΜΗ	19	21	11	20	28	12	19	23	10	17	15	9
ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ	20	21	11	19	28	12	18	23	10	18	15	9
ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	18	21	11	18	28	12	19	23	10	19	15	9
ΚΑΒΑΛΑ	18	21	11	17	28	12	17	23	10	19	15	9
ΚΕΡΚΥΡΑ	17	21	11	18	28	13	18	23	11	19	15	9
ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	17	21	11	20	28	13	18	23	11	20	15	9
ΓΑΛΛΙΑ	18	21	11	17	28	12	18	23	12	20	15	8

Πίνακας IV. Οι τιμές ετεροζυγωτίας που υπολογίστηκαν μέσα στους πληθυσμούς κουτσομούρας για τους εκκινητές ΟΡΑ 02, ΟΡΑ 09, ΟΡΕ 11, ΟΡΕ 12 και για τα συνδυασμένα δεδομένα όλων των εκκινητών (Σύνολο).

ΣΗΜΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΟΡΑ 02	ΟΡΑ 09	ΟΡΕ 11	ΟΡΕ 12	ΣΥΝΟΛΟ
ΠΛΑΤΑΝΙΑΣ	0.291	0.281	0.338	0.267	0.296
ΚΥΜΗ	0.268	0.264	0.337	0.267	0.284
ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ	0.264	0.271	0.338	0.269	0.286
ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	0.273	0.281	0.338	0.269	0.290
ΚΑΒΑΛΑ	0.271	0.278	0.338	0.270	0.290
ΚΕΡΚΥΡΑ	0.270	0.264	0.312	0.264	0.278
ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	0.275	0.265	0.312	0.266	0.279
ΓΑΛΛΙΑ	0.271	0.281	0.285	0.313	0.285

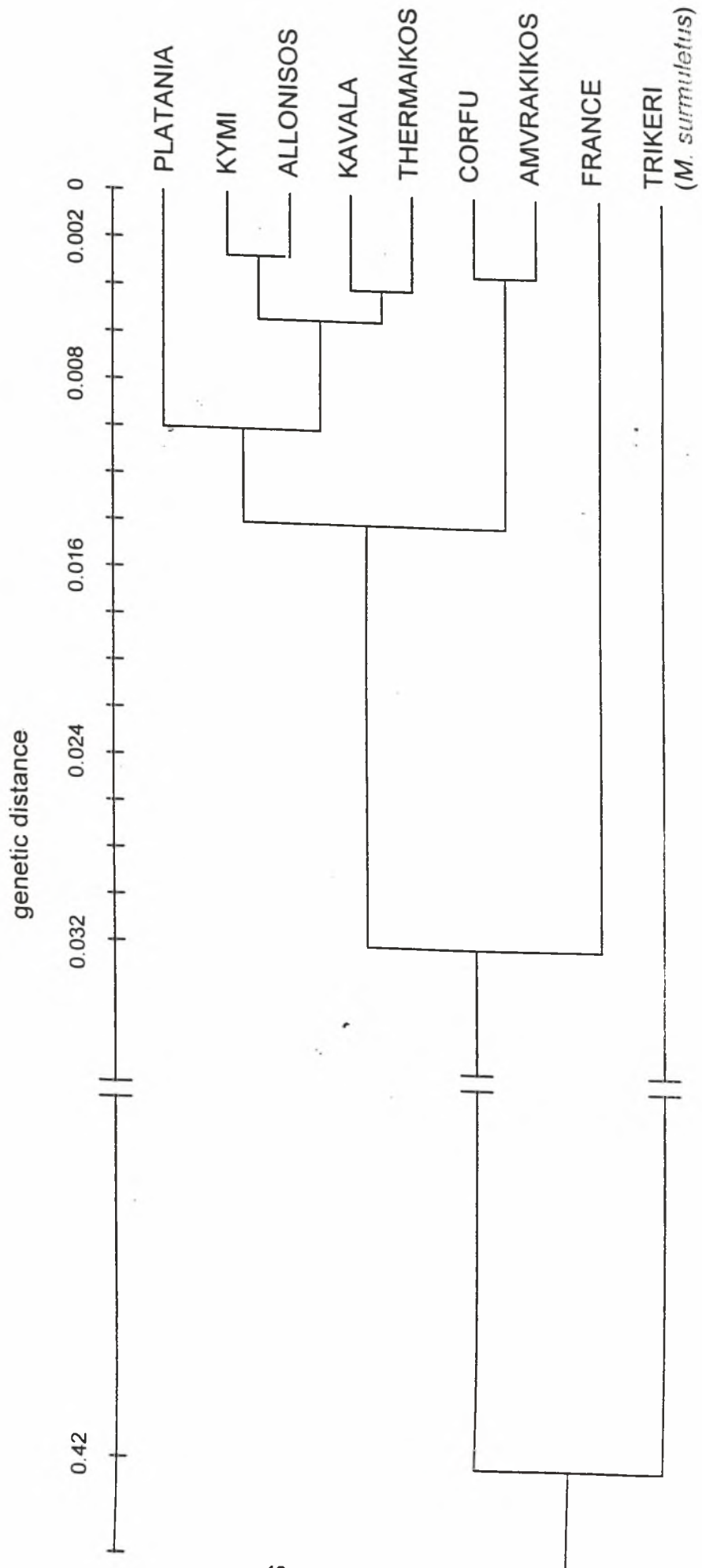
Πίνακας V. Διαφορές στους πολυμορφικούς (P) και μονομορφικούς (M) δείκτες που παρατηρήθηκαν μεταξύ των πληθυσμών της κουτσομούρας.

Εκκινήτ./b.p. του τμήματος	ΠΛΑΤΑΝ	ΚΥΜΗ	ΚΕΡΚ.	ΚΑΒΑΛΑ	ΑΛΛΟΝ.	ΑΜΒΡΑΚ.	ΓΑΛΛΙΑ	ΘΕΡΜ.
ΟΡΑ02 /~ 400	P	P	P	P	P	P	M	P
ΟΡΑ02 /~ 650	M	M	M	M	M	M	P	M
ΟΡΑ09 /~ 600	M	M	M	M	M	M	P	M
ΟΡΑ09 /~ 750	P	P	M	P	P	M	M	P
ΟΡΕ11 /~ 450	P	P	P	P	P	P	M	P
ΟΡΕ11 /~ 900	P	P	M	P	P	M	M	P
ΟΡΕ12 /~ 600	M	M	M	M	M	M	P	M

Πίνακας VI. Οι γενετικές αποστάσεις του Nei (1978) που υπολογίστηκαν, μέσα στους πληθυσμούς της κουτσομούρας και μεταξύ των πληθυσμών της κουτσομούρας και του μπαρμπουνιού, για τους εκκινητές OPA 02, OPA 09, OPE 11, OPE 12, για τα συνδιασμένα δεδομένα από όλους τους εκκινητές (Σύνολο) και για τα ισοένζυμα\* (δεδομένα από Mamuris *et al.* 1998).

ΣΗΜΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	OPA 02	OPA 09	OPE 11	OPE 12	ΣΥΝΟΛΟ	ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ*
ΠΛΑΤΑΝΙΑ/ΚΥΜΗ	0.0103	0.0171	0.0087	0.0067	0.0110	0.011
ΠΛΑΤΑΝΙΑ/ΚΕΡΚΥΡΑ	0.0155	0.0197	0.0277	0.0075	0.0187	0.012
ΠΛΑΤΑΝΙΑ/ΚΑΒΑΛΑ	0.0167	0.0071	0.0056	0.0096	0.0094	0.009
ΠΛΑΤΑΝΙΑ/ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ	0.0105	0.0110	0.0067	0.0038	0.0088	0.011
ΠΛΑΤΑΝΙΑ/ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	0.0164	0.0195	0.0239	0.0122	0.0187	0.011
ΠΛΑΤΑΝΙΑ/ΓΑΛΛΙΑ	0.0293	0.0369	0.0467	0.0296	0.0366	0.019
ΠΛΑΤΑΝΙΑ/ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	0.0157	0.0060	0.0065	0.0052	0.0083	0.009
ΚΥΜΗ/ΚΕΡΚΥΡΑ	0.0067	0.0147	0.0216	0.0009	0.0124	0.003
ΚΥΜΗ/ΚΑΒΑΛΑ	0.0079	0.0069	0.0034	0.0031	0.0057	0.000
ΚΥΜΗ/ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ	0.0043	0.0021	0.0016	0.0011	0.0024	0.004
ΚΥΜΗ/ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	0.0094	0.0157	0.0204	0.0033	0.0135	0.002
ΚΥΜΗ/ΓΑΛΛΙΑ	0.0242	0.0368	0.0323	0.0274	0.0310	0.005
ΚΥΜΗ/ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	0.0065	0.0067	0.0070	0.0052	0.0064	0.002
ΚΕΡΚΥΡΑ/ΚΑΒΑΛΑ	0.0100	0.0118	0.0158	0.0053	0.0114	0.003
ΚΕΡΚΥΡΑ/ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ	0.0089	0.0144	0.0305	0.0016	0.0150	0.007
ΚΕΡΚΥΡΑ/ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	0.0038	0.0018	0.0028	0.0031	0.0027	0.002
ΚΕΡΚΥΡΑ/ΓΑΛΛΙΑ	0.0317	0.0190	0.0189	0.0274	0.0234	0.003
ΚΕΡΚΥΡΑ/ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	0.0075	0.0137	0.0176	0.0072	0.0122	0.004
ΚΑΒΑΛΑ/ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ	0.0080	0.0037	0.0039	0.0029	0.0047	0.003
ΚΑΒΑΛΑ/ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	0.0077	0.0119	0.0152	0.0034	0.0105	0.001
ΚΑΒΑΛΑ/ΓΑΛΛΙΑ	0.0342	0.0339	0.0283	0.0309	0.0324	0.007
ΚΑΒΑΛΑ/ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	0.0055	0.0041	0.0036	0.0027	0.0041	0.000
ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ/ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	0.0096	0.0156	0.0288	0.0044	0.0156	0.005
ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ/ΓΑΛΛΙΑ	0.0221	0.0369	0.0420	0.0269	0.0334	0.011
ΑΛΛΟΝΗΣΟΣ/ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	0.0078	0.0046	0.0071	0.0022	0.0056	0.008
ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ/ΓΑΛΛΙΑ	0.0338	0.0191	0.0183	0.0297	0.0241	0.004
ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ/ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	0.0036	0.0148	0.0208	0.0077	0.0125	0.002
ΓΑΛΛΙΑ/ΘΕΡΜΑΙΚΟΣ	0.0270	0.0343	0.0403	0.0311	0.0338	0.006
ΤΡΙ(μπαρμπούνι)/ΠΛΑΤ	0.3703	0.4558	0.3837	0.4265	0.4243	0.326
ΤΡΙ(μπαρμπούνι)/ΚΥΜΗ	0.3809	0.4420	0.3734	0.4375	0.4142	0.327
ΤΡΙ(μπαρμπούνι)/ΚΕΡΚ	0.3789	0.4452	0.3795	0.4237	0.4103	0.335
ΤΡΙ(μπαρμπούνι)/ΚΑΒ	0.3755	0.4510	0.3800	0.4302	0.4225	0.328
ΤΡΙ(μπαρμπούνι)/ΑΛΛΟΝ	0.3820	0.4435	0.3745	0.4310	0.4163	0.334
ΤΡΙ(μπαρμπούνι)/ΑΜΒΡ	0.3815	0.4502	0.3813	0.4284	0.4293	0.331
ΤΡΙ(μπαρμπούνι)/ΓΑΛΛ	0.3720	0.4448	0.3821	0.4253	0.4139	0.323
ΤΡΙ(μπαρμπούνι)/ΘΕΡΜ	0.3813	0.4492	0.3765	0.4320	0.4220	0.332

Δενδρόγραμμα UPGMA βασισμένο στις γενετικές αποστάσεις του Νει, όπου φαίνονται οι σχέσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς της κουτσμούρας και του μπαρμουιού.



---

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **5.1. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ RAPD**

Έχουν αναφερθεί, από πολλούς συγγραφείς, αρκετά τεχνικά προβλήματα από την εφαρμογή της τεχνικής RAPD, στον τομέα της γενετικής των πληθυσμών (Hadrys *et al.* 1992, Schierwater και Ender 1993, Lynch και Milligan 1994, Naish *et al.* 1995, Allegrucci *et al.* 1995). Παρόλα αυτά, αξίζει να αναφερθούν μερικά τεχνικά στοιχεία που εντοπίστηκαν, μετά από συγκριτικά πειράματα, κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας.

Για να ρυθμιστούν οι πειραματικές συνθήκες εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικές μέθοδοι εξαγωγής του DNA, χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικοί θερμικοί κυκλοποιητές και δυο διαφορετικές πολυμεράσεις. Η Taq πολυμεράση, της οποίας η προμήθεια έγινε από διαφορετικούς κατασκευαστές, παρήγαγε παρόμοια αποτελέσματα, όταν εφαρμόστηκε στο ίδιο άτομο.

Απεναντίας, διαφορετικές πολυμεράσεις (Taq και Vent exo<sup>-</sup>), καθώς και διαφορετικοί θερμικοί κυκλοποιητές, έχοντας διαφορετικά προφίλ θερμικών κύκλων, παρήγαγαν διαφορετικά πρότυπα ζωνών, σε όλα τα άτομα, που εφαρμόστηκαν. Επιπρόσθετα, η ενίσχυση DNA, του οποίου, η εξαγωγή έγινε με βάση διαφορετικά πρωτόκολλα, προερχόμενο όμως από το ίδιο άτομο, έδειξε ελαφρώς διαφορετικά πρότυπα ζωνών, τουλάχιστον, μετά την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αгарόζης.

Έτσι, ακόμα και αν η αναπαραγωγιμότητα των δεικτών RAPD μπορεί να επιτευχθεί μέσα σε ένα εργαστήριο, αυτό φαίνεται δύσκολο για διαφορετικά εργαστήρια, εκτός και αν όλες οι συνθήκες είναι όμοιες. Μια αναπόφευκτη επιπλοκή τέτοιων διαφορών είναι ότι ποιοτικές συγκρίσεις μεταξύ δεδομένων που έχουν παραχθεί από διαφορετικά εργαστήρια, δουλεύοντας πάνω στον ίδιο οργανισμό και με τα ίδια εκκινητικά μόρια, θα ήταν άσκοπες, ιδιαίτερα όταν η μέθοδος εφαρμόζεται για την εκτίμηση συγκεκριμένων δεικτών μεταξύ πληθυσμών.



---

## 5.2. ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΥΘΥΣΜΩΝ

Αρκετοί συγγραφείς έχουν αποδείξει ότι η μέθοδος RAPD - PCR είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την εκτίμηση των γενετικών δεικτών, οι οποίοι επιτρέπουν την διάκριση μεταξύ ειδών και υποειδών, σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών (Welsh και McClelland 1990, Black *et al.* 1992, Cenis *et al.* 1993, Bardakci και Skibinski 1994, Naish *et al.* 1995). Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, εφόσον, για όλα τα επιλεγμένα εκκινητικά μόρια, παρατηρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα ζωνών RAPD, μεταξύ των δυο ειδών που μελετήθηκαν (εικ.2). Παρόλα αυτά, όλα τα εκκινητικά μόρια παρήγαγαν παρόμοια πρότυπα, για όλα τα δείγματα κουτσομούρας (εικ.2), υπονοώντας ότι υπάρχει ροή γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών αυτών.

Ένα σοβαρό πρόβλημα που προκύπτει κατά την εφαρμογή της τεχνικής RAPD είναι η ομολογία μεταξύ ζωνών, που μετακινούνται ταυτόχρονα και οι οποίες παράγονται από το ίδιο εκκινητικό μόριο σε διαφορετικά άτομα (Handrys *et al.* 1992). Εντούτοις, στην παρούσα μελέτη, η ομολογία μεταξύ των ζωνών αποτελεί μια αξιόπιστη υπόθεση, αφού όλα τα άτομα ανήκουν στο ίδιο είδος.

Παρά το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν συγκεκριμένοι δείκτες που να διαφοροποιούν τους πληθυσμούς της κουτσομούρας, η ανάλυση των δεδομένων για γενετικό πολυμορφισμό, αποκάλυψε ένα βαθμό γενετικής απόκλισης μεταξύ αυτών (πιν.VI και σχήμα III). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια θετική και σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις γενετικές σχέσεις των πληθυσμών και τις γεωγραφικές αποστάσεις των περιοχών από τις οποίες αυτοί συλλέχθηκαν (Mantel t-test  $r=0,8531$ ,  $t=2,575$ ,  $P<0,05$  για συγκρίσεις μεταξύ γενετικών και γεωγραφικών αποστάσεων). Η επίδραση των γεωγραφικών αποστάσεων στη γενετική ετερογένεια φάνηκε, επίσης, και στο δένδρογραμμα (σχήμα III). Ο πληθυσμός της Γαλλίας εμφανίστηκε, γενετικά, διαφοροποιούμενος από όλους τους Ελληνικούς πληθυσμούς, ενώ εντός των Ελληνικών θαλασσών, οι πληθυσμοί του Ιονίου Πελάγους εμφανίστηκαν διαφορετικοί από τους πληθυσμούς του Αιγαίου Πελάγους. Παρόλο που αυτά

---

τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τη γενική ιδέα, ότι η σχετική έλλειψη φυσικών φραγμάτων στα θαλάσσια συστήματα έχει ως αποτέλεσμα μικρή ενδοειδική γενετική διαφοροποίηση ακόμα και σε σημαντικές γεωγραφικές αποστάσεις (Avisé 1989 Ward *et al.* 1994), φαίνεται ότι τα επίπεδα ροής των γονιδίων ήταν ανεπαρκή ώστε να ομογενοποιήσουν πλήρως τους συγκεκριμένους πληθυσμούς της κουτσομούρας.

Γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ ενδοειδικών πληθυσμών, σε κάποια ψάρια της θάλασσας, σε σχέση με τη γεωγραφική κατανομή έχουν αναφερθεί από διάφορους ερευνητές.

Χρησιμοποιώντας δείκτες μιτοχονδριακού DNA, οι Crosetti *et al.* (1994) μελετώντας τον κέφαλο και οι Okazaki *et al.* (1996) μελετώντας την σαρδέλλα, βρήκαν σημαντική ενδοειδική γενετική ετερογένεια, σε παγκόσμια κλίμακα, με σχεδόν, ασήμαντη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών. Ακόμη και σε μικρότερη κλίμακα αποστάσεων, οι Spanakis *et al.* (1989), αν και εργάστηκαν με ισοένζυμα, βρήκαν ένα βαθμό γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ πληθυσμών γαύρου από το Ιόνιο και το Αιγαίο Πέλαγος. Και σε αυτή την περίπτωση, οι γενετικές διαφορές αποδόθηκαν στις ωκεανογραφικές συνθήκες, που επικρατούν στους συγκεκριμένους υδάτινους όγκους.

Η γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, υποστηρίζει επιπλέον την υπόθεση ότι οι βαθυμετρικές και ωκεανογραφικές συνθήκες μπορεί να αποτελέσουν φυσικά φράγματα τα οποία αποτρέπουν μεταναστεύσεις μεγάλης κλίμακας των ενήλικων ατόμων κουτσομούρας και / ή τη μαζική μεταφορά αυγών και ιχθυδίων, μειώνοντας, μ' αυτό τον τρόπο, τη γονιδιακή ροή μεταξύ των δειγματοληπτικών περιοχών.

Το Ιόνιο Πέλαγος είναι η βαθύτερη θάλασσα της Μεσογειακής Λεκάνης. Το κυρίαρχο βαθυμετρικό χαρακτηριστικό στην ανατολική πλευρά του, είναι η βαθιά Ελληνική Τάφρος, όπου υπάρχουν βάθη από 3000 m - 4000 m, φθάνοντας σε μέγιστο βάθος των 5.121 m, μόλις νοτιοδυτικά της Πελοποννήσου (Vavilon Deep) (εικ.1) (Θεοδώρου 1990). Αυτοί οι βαθυμετρικοί περιορισμοί μπορεί να δρουν ως περιοχές ελέγχου, περιορίζοντας τις μεγάλης κλίμακας, μεταναστεύσεις των ενήλικων ατόμων κουτσομούρας, μεταξύ Αιγαίου και Ιονίου Πελάγους. Τα ενήλικα άτομα

---

κουτσομούρας είναι βενθικά και συναντώνται κυρίως, σε βάθη έως και 300m (Whitehead *et al.* 1986). Επομένως η μετανάστευσή τους από το Αιγαίο προς το Ιόνιο Πέλαγος μπορεί να γίνει μόνο μέσω δύο Στενών, από τα τρία Στενά των Κυθήρων: το Στενό της Ελαφοννήσου (180 m βάθος, 11 km πλάτος) και το Στενό των Κυθήρων (160 m βάθος, 33 km πλάτος) ενώ το Στενό των Αντικυθήρων είναι πολύ βαθύ (700 m βάθος, 32 km πλάτος), για να επιτρέψει κάποια μετανάστευση (εικ.1).

Επίσης, εξαιτίας των ωκεανογραφικών φραγμάτων, μπορεί να περιοριστεί και η μαζική μεταφορά των πελαγικών αυγών και ιχθυδίων της κουτσομούρας, μεταξύ του Αιγαίου και του Ιονίου Πελάγους. Η υδάτινη κυκλοφορία του ανωτέρου στρώματος της Κρητικής θάλασσας, των Στενών του δυτικού Κρητικού τόξου και της γειτονικής νοτιοανατολικής θάλασσας του Ιονίου καθορίζεται από: α) το έντονο αντικυκλωνικό σύστημα («Πέλοπας»), νότια της Ελλάδας και β) το Μυρτώο κυκλωνικό σύστημα της δυτικής Κρήτης (Θεοδώρου *et al.* 1997) (εικ.1).

Η επιφανειακή κυκλοφορία, στο Ιόνιο Πέλαγος, δείχνει μια διακριτή διαίρεση του πεδίου ροής, στην περιοχή με γεωγρ. πλάτος 37°30' Β. (Θεοδώρου 1991). Βορειότερα, η ροή είναι ευρέως κυκλωνική, ενώ στα νότια, επικρατεί ένας, μέσης κλίμακας, αντικυκλώνας, ο οποίος αποτελεί μια επέκταση του αντικυκλώνα «Πέλοπα» προς βορρά και κυριαρχεί στο τμήμα της υπό μελέτης περιοχής (εικ.1).

Εντούτοις, παραμένει απροσδιόριστη η αιτία της γενετικής διαφοροποίησης του δείγματος του Πλατανιά από τα άλλα δείγματα του Αιγαίου Πελάγους (μέση  $D = 0,0094$ ), ανεξάρτητα από τις γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ αυτών (πιν. VI, εικ.1 και σχήμα III). Εκτός απροόπτου, τόσο η ιστορική βιογεωγραφία όσο και η σύγχρονη ροή γονιδίων μπορεί να είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία της παρατηρούμενης γενετικής διαφοροποίησης. Αυτό, επίσης, επιβεβαιώνεται μετά από έρευνα ισοενζύμων (Mamuris *et al.* 1997b), η οποία κατέληξε στην ίδια διαφοροποίηση. Ωστόσο και στις δύο έρευνες (δείκτες RAPD και ισοένζυμα), δεν έχει ληφθεί υπόψιν, η ενδεχόμενη προσωρινή μεταβολή στις συχνότητες των αλληλομόρφων (Ward και Grewe, 1994), που οφείλεται σε χωροχρονικές παραμέτρους και μπορεί να οδηγήσει

---

σε λανθασμένη εκτίμηση των γενετικών σχέσεων, μεταξύ των δειγμάτων. Για την περαιτέρω διερεύνηση του θέματος, θα πρέπει να μελετηθούν δείγματα από την ίδια περιοχή, με διαφορετικούς χρόνους συλλογής.

### **5.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΙΣΟΕΝΖΥΜΩΝ**

Οι πληθυσμοί που ερευνήθηκαν, είχαν μελετηθεί προηγουμένως για ισοενζυμική ποικιλότητα. Έγινε μελέτη 16 ενζυμικών συστημάτων, τα οποία ανταποκρίνονταν σε 20 γονιδιακούς τόπους (Mamuris *et al.* 1998). Μέρος των ατόμων που εξετάστηκαν με την ισοενζυμική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν και για την παρούσα εργασία.

Τόσο τα ισοένζυμα, όσο και οι δείκτες RAPD, μπορούν να θεωρηθούν ως τυχαίοι δείκτες για το γονιδίωμα της κουτσομούρας. Θα ήταν επομένως ενδιαφέρον, να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των δυο μεθόδων για τα ίδια άτομα. Και οι δυο μέθοδοι ήταν επιτυχείς, όσον αφορά την αποκάλυψη μιας γενετικής ετερογένειας μεταξύ των δειγμάτων, αλλά δεν κατάφεραν να παράγουν συγκεκριμένους δείκτες, οι οποίοι θα μπορούσαν να διακρίνουν τους πληθυσμούς.

Οι γενετικές αποστάσεις, που υπολογίστηκαν από την ανάλυση των RAPD, ήταν μεγαλύτερες από εκείνες που υπολογίστηκαν από την ανάλυση των ισοενζύμων και οι δυο ομάδες δεδομένων δεν συσχετίζονταν σημαντικά (Mantel t-test  $r=0,476$ ,  $t=1,476$ ,  $P=0,127$ ) (πιν.VI). Επιπλέον, με βάση τα στοιχεία της ανάλυσης των ισοενζύμων, η γενετική ετερογένεια μεταξύ των δειγμάτων ήταν τυχαία, σε σχέση με τις γεωγραφικές αποστάσεις ανάμεσα στις περιοχές συλλογής ενώ, όταν χρησιμοποιήθηκαν τα στοιχεία της ανάλυσης RAPD, εμφανίστηκε μία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις γεωγραφικές αποστάσεις και τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των δειγμάτων. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι δείκτες RAPD αποκαλύπτουν ένα διαφορετικό, ενδοπληθυσμιακό, γενετικό πολυμορφισμό, σε σύγκριση με τα ισοένζυμα. Πολλοί συγγραφείς, έχουν επισημάνει, ότι η εφαρμογή της τεχνικής RAPD, μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική, από ότι τα ισοένζυμα, στην εκτίμηση γενετικού πολυμορφισμού σε διαφορετικούς οργανισμούς, μεταξύ υποειδών

---

και στελεχών, ή πληθυσμών του ίδιου είδους (Black *et al.* 1992· Cenis *et al.* 1993· Bardakci και Skibinski, 1994· Naish *et al.* 1995· Allegrucci *et al.* 1995). Εντούτοις, τα συμπεράσματα που εξάγονται από την άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων, πρέπει να αναλύονται με προσοχή, γιατί υπάρχει πάντα ο κίνδυνος της λανθασμένης εκτίμησης, εξαιτίας των διαφορετικών υποθέσεων, στις οποίες στηρίζεται η κάθε μέθοδος (Lynch και Milligan 1994· Allegrucci *et al.* 1995).

Η απόκλιση που παρατηρείται στα αποτελέσματα των δυο μεθόδων θα μπορούσε να οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες. Κάποια παραλλακτικότητα οφείλεται στην κυρίαρχη ιδιότητα των δεικτών RAPD, εφ' όσον η μέθοδος δεν μπορεί να διακρίνει το δείκτη / δείκτη ομοζυγώτη από τον δείκτη / σιγούντα ετεροζυγώτη. Γι' αυτό, οι εκτιμώμενες συχνότητες γονιδίων, που υπολογίζονται από τα δεδομένα της τεχνικής RAPD, είναι λιγότερο ακριβείς από αυτές των συγκυρίαρχων δεικτών, όπως τα ισοένζυμα, εκτός και αν ελεγχθούν, 2 ως 10 φορές περισσότερα άτομα σε σύγκριση με τα ισοένζυμα (Lynch και Milligan, 1994). Επιπρόσθετα, εξαιτίας της ανάγκης για περικοπή γονιδιακών τόπων με χαμηλή συχνότητα σιγούντων αλληλομόρφων, χρειάζεται να εξεταστούν περισσότεροι γονιδιακοί τόποι με την τεχνική RAPD από ότι με τα ισοένζυμα (Lynch και Milligan, 1994).

Στην παρούσα μελέτη, αν και μελετήθηκε ένας μικρότερος αριθμός ατόμων για κάθε γονιδιακό τόπο, σε σχέση με τα ισοένζυμα (περίπου 20 έναντι 40 άτομα ανά πληθυσμό), για την εκτίμηση γενετικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών, ελέγχθηκε, σχεδόν 4πλάσιος αριθμός γονιδιακών τόπων (87 έναντι 20 γονιδιακοί τόποι ανά άτομο).

Μια άλλη πηγή παραλλακτικότητας προκύπτει από το γεγονός ότι, οι δυο μέθοδοι, πιθανόν, να παράγουν δείκτες, οι οποίοι σχετίζονται με διαφορετικά τμήματα του γονιδιώματος της κουτσομούρας.

Τα περισσότερα ισοένζυμα προέρχονται από μοναδικές περιοχές του γονιδιώματος, έχοντας σοβαρό αντίκτυπο σε σημαντικούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες και γι' αυτό υπόκεινται πιο εύκολα σε πίεση επιλογής. Από την άλλη πλευρά η τεχνική RAPD, από τη φύση της (Williams *et al.* 1990), εκτός από μοναδικές περιοχές DNA, ενισχύει DNA από περιοχές με υψηλή

---

επαναληψιμότητα. Είναι επομένως πιθανό, πολλοί από τους δείκτες RAPD να είναι προϊόντα ενίσχυσης λιγότερο λειτουργικών περιοχών του γονιδιώματος, οι οποίες δεν ανταποκρίνονται βίαια στην επιλογή σε φαινοτυπικό επίπεδο. Τέτοιες περιοχές DNA, μπορεί να φέρουν περισσότερες μεταλλάξεις, σε σχέση με αυτές που κωδικοποιούν για τα ισοένζυμα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους προκύπτουν νέοι δείκτες RAPD δεν είναι γνωστοί, αλλά πιθανόν να προκύπτουν από αλλαγές νουκλεοτιδίων στις θέσεις ενάρξεως (Naish *et al.* 1995). Γι' αυτό, οι δείκτες RAPD μπορούν να διακρίνουν ένα πιο έντονο γενετικό πολυμορφισμό μεταξύ γεωγραφικά απόμακρων δειγμάτων κουτσομούρας, από ότι τα ισοένζυμα, με την προϋπόθεση ότι οι προηγούμενες συνθήκες ισχύουν και ότι το επίπεδο της γονιδιακής ροής δεν είναι ικανό να εξαλείψει τις συνέπειες νέων μεταλλάξεων. Η τελευταία υπόθεση ενισχύεται περισσότερο από τον εντοπισμό συγκεκριμένων ειδών, σε οργανισμούς, όπως οι αφίδες (Black *et al.* 1992· Cenis *et al.* 1993), και κολεόπτερα (Cognato *et al.* 1995), όπου τα ισοένζυμα έχουν αποδειχθεί πολύ ασθενή στην εκτίμηση γενετικών διαφορών. Δεδομένου ότι, η τεχνική RAPD είναι λιγότερο επίπονη, σε σύγκριση με άλλες μοριακές τεχνικές, παράγει αποτελέσματα με μικρότερο στατιστικό σφάλμα, και δεν απαιτεί προηγούμενη γνώση των αλληλουχιών DNA, μπορεί να αποδειχθεί μια πολλά, υποσχόμενη μέθοδος εκτίμησης των γενετικών συγγενειών σε μοριακό επίπεδο μεταξύ πληθυσμών σε είδη ψαριών. Παρόλα αυτά, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι ενισχύσεις PCR πραγματοποιούνται σε μη αυστηρές συνθήκες, η επαναληψιμότητα των παρατηρήσεων απαιτεί προσεκτικό έλεγχο των πειραματικών συνθηκών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allegrucci, G., Cacccone, A., Cataudella, S., Powell, J.R.** (1995). Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Mar Biol* 121: 591-599.
- Altukhov, Y.** (1981). The stock concept from the Viewpoint of Population. *Genetic Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38:1523-1538.
- Avise, J. C.** (1987). Identification and interpretation of mitochondrial DNA stocks in marine species. In Kumpf H.E., Vaught R.N. and Grimes C. eds *Proc of the Stock Identification workshop*. pp 105-136.
- Avise, J.C.** (1989) Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43: 1192-1208.
- Bardakci, F., Skibinski, D.O.F.** (1994) The application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73: 117-123.
- Basaglia, F., Callegarini, C.,** (1988). Biochemical characteristics of red mullet of the central Mediterranean. *Comperative Biochemical Physiology* 89B, 731-736.
- Beacham, T., Gould, A. Withler R., Murray, C. and Barner L.** (1987). Biochemical genetic survey and stock identification of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in British Columbia. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 44: 1702-1713.
- Bembo, D.G., Carvalho, G.R., Cingolani, N., Pitcher, T.J.** (1996) Electrophoretic analysis of stock structure in Northern Mediterranean anchovies, *Engraulis encrasicolus*. *ICES J mar Sci* 53: 115-128 .
- Benharrat, K., Pasteur, N., Siau, Y., and A. Bouain** (1983). Polymorphisme biochimique de Loups (*Dicentrarchus labrax*) originaires de quatre populations naturelles et d'un élevage. *Compt. Rendu des Travaux du GIS-ARM*. vol I: 1-10.
- Bermingham, E., Forbes, S., Fiedland, K., and C. Pla** (1992). Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North America and European origin using restriction analysis of mitochondrial DNA. *Can. J. Aquat. Sci.* 48: 884-893.
- Billington, N. and Hebert, P.D.N.** (1990). Technique for determining mitochondrial DNA markers in blood samples from walleyes. *Am. Fish. aquat. Sci.* 48, 884-93.
- Black, W.C., DuTeau N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R., Pettorini, J.M.** (1992) Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 151-159.
- Black, I.V. W.C., DuTeau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R., Pettorini, J.M.** (1992) Use of the RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull Ent Res* 82: 151-159.
- Borowsky, R.L., McClelland, M., Cheng, R., Welsh, J.** (1995) Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in Vertebrates: the *Xiphophorus* model. *Mol Biol Evol* 12: 1022-1032 .

- Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A.J., Worff, R.** (eds) (1991b). DNA fingerprinting: Approaches and Applications. Birkhauser, Basel.
- Cammarata, M., Parrinello, N., Arcuelo, M.** (1991). Biochemical taxonomic differentiation between *Mullus barbatus* and *Mullus surmuletus* (Pisces, Mullidae). *Comperative Biochemical Physiology* 99B, 719-722.
- Caragitsou, E. and Tsimenides, N.** (1982). Seasonal changes and comparative analysis of the food of the red mullet (*Mullus barbatus*) in the gulfs of Saronikos and Thermaikos. *Thalassographica* 5(2) 41-61.
- Carmichael, G.J., Schmidt, M.E. and Morizot, D.C.** (1992). Electrophoretic identification of genetic markers in channel catfish blue catfish by use low-risk tissues. *Trans. Am. Fish. Soc.* 121, 26-35.
- Carr, S., and H. Marshall** (1991). A direct approach to the measurement of genetic variation in fish population: applications of the polymerase chain reaction to studies of Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. Fish Biol.* 39: 101-107.
- Carvalho, G. and L. Hauser** (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish. Biol. Fisheries* 4: 326-350. **Cenis JL, Perez P, Fereres A** (1993) Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Ann Entomol Soc Am* 86: 545-550.
- Cenis, J.L., Perez, P., Fereres, A.** (1993) Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Ann Entomol Soc Am* 86: 545-550.
- Child, A.** (1992). Biochemical polymorphism in bass, *Dicentrarchus labrax*, in the waters around the British Isles. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 72: 357-364.
- Cognato, A.I., Rogers, S.O., Teale, S.A.** (1995) Species diagnosis and phylogeny of the *Ips grandicollis* group (Coleoptera: Scotylidae) using random amplified polymorphic DNA. *Ann Entomol Soc Am* 88: 397-405
- Crosetti, D., Nelson, W.S., Avise, J.C.** (1994) Pronounced genetic structure of mitochondrial DNA among populations of the circumglobally distributed grey mullet (*Mugil cephalus*). *J. Fish Biol* 44: 47-58.
- Delvin, R.H., McNeil, B.K., Groves, T.D. and Donaldson, E.M.** (1991). Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 48, 1606-12.
- Dewayne Shoemaker, D. Ross, K.G., Arnold, M.L.** (1994) Development of RAPD markers in two introduced fire ants, *Solenopsis invicta* and *S. richteri*, and their application to the study of a hybrid zone. *Molec Ecol* 3:531-539
- Ferguson, M.** (1994). The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 4, no 3: 351-373.
- Felsenstein, J.** (1993) PHYLIP: (phylogeny inference package) version 3.5c. University of Washington, Seattle, WA.
- Graves, J. E., Ferris, S. and A. Dizon** (1984). Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) demonstrated with restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* 89: 315-319.



- Gyllenstein, U. and A. Wilson** (1987). Mitochondrial DNA of Salmonids : Inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. In Ryman N, and F. Utter (eds). Population Genetics and Fishery Management pp 301-317. Seattle. University of Washington.
- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B.** (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molec Ecol* 1: 55-64.
- Harris, H.** (1966). Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc.* 164B, 298-310.
- Hindar, K., Ryman, N. and Utter, F.** (1991). Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 48, 945-57.
- Ihssen, P., Booke, H., Casselman, J., McGlade, J., Payne, N., and F Utter.** (1981). Stock Identification: Materials and Methodes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1838-1855.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Snihsky, J.J., White, T.J.,** (1990). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press Inc.
- Jorstad, K., and G. Naevdal** (1989). Genetic variation and population structure of cod *Gadus morhua* L., in some Fjords in northern Norway. *J. Fish Biol.* 35 (Sup): 245-252.
- Karl, S., and J. Avise** (1993). PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single copy-nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. *Mol. Biol. Evol.* 10: 342-361.
- King, D.** (1983). Genetic analysis of enzyme polymorphisms in herring (*Clupea harengus* L.). *Heredity* 52: 121-131.
- Kirby, L.T.** (1990). DNA fingerprinting: An Introduction. Stockton Press, New York.
- Kocher, T., Thomas, W., Meyer, A., Edwards, S., Paabo, S., Villablanca, F., and Wilson A.** (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS* 86: 6196-6200.
- Lanfranco, L., Wyss, P., Marzachi, C., Bontante, P.** (1995) Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhiza fungus. *Molec Ecol* 4: 61-68.
- Lannal, J., Gall. G., Thorpe J., Nash C., and Ballachey B.** (1989). Genetic recourse management of fish. *Genome* 31, 798-804.
- Lansman, R.A., Shade, R.O., Sharipa, J.F. and Avise ,J.C.** (1981). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations . III. Techniques and potential applications. *J. mol. Evol.* 17. 214-26.
- Lewin, R.** (1989) . Limits to DNA fingerprinting. *Science*, 243, 1549-1551.
- Lewontin, R.C. and Hubby, J.L.** (1966). A molecular approach to the study of genic variation in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54 , 595-609.
- Lighy, W. de** (1969). Serological and biochemical studies in fish population. *Oceanogr. mar. Biol. Ann. Rev.* 7, 411-513.

**Lynch, M., Milligan, B.G.** (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molec Ecol* 3: 91-99.

**Μαγουλάς, Α.** (1990). Ποικιλότητα του μιτοχονδριακού DNA στους πληθυσμούς σαρδέλας *Sardina pilchardus* και γαύρου *Engraulis encrasicolus* των ελληνικών θαλασσών και φυλογενετικά συμπεράσματα. Διδακτορική διατριβή, Ηράκλειο, Κρήτη.

**Mailer, R.J., Scarth, R., Fristensky, B.** (1994). Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor Appl Genet* 87: 697-704 .

**Mamuris, Z., Apostolidis, A.P., Panagiotaki, P., Theodorou, A.J., Triantaphyllidis, C.** (1997a). Morphological variation between red mullet populations in Greece. *J Fish Biol* .

**Mamuris, Z., Apostolidis, A.P., Triantaphyllidis, C.** (1997b) Genetic protein variation in red mullet (*Mullus barbatus* L.) and striped red mullet (*M. surmuletus*, L.) populations from the Mediterranean Sea. *Mar Biol*.

**Mantel, N.A.** (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.

**Mitton, J.B., and Grant, M.C.** (1984). Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *A. Rev. Ecol. Syst.* 15, 479-99.

**Mork, J., Ryman, N., Stahl, G., Utter, F., and G. Sundnes** (1985). Genetic variation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout its range. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1580-1587.

**Mullis, K.B., Faloona, F.A.,** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155, 335-350.

**Naish, K.A., Warren, M., Bardakci, F., Skibinski, D.O.F., Carvalho, G.R., Mair, G.C.** (1995) Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Molec Ecol* 4: 271-274.

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

**Okazaki, T., Kobayashi, T., Uozumi, Y.** (1996) Genetic relationships of pilchards (genus: *Sardinops*) with anti-tropical distributions. *Mar Biol* 126: 585-590.

**Ovenden, J.** (1990). Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Aust. J. Mar. Fresh. Res.* 41: 835-853.

**Παπατριανταφύλλου Σ., Μαμούρης Ζ., Καρακούσης Ι., Αποστολίδης Α., Τριανταφυλλίδης Κ.** (1996). Προκαταρκτική μελέτη του πολυμορφισμού του mtDNA ελληνικών πληθυσμών κουτσομούρας (*Mullus barbatus*). 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΕ, 17-19 Απριλίου 1996, Καλαμάτα.

**Park, L., and P. Moran** (1994). Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 4: 272-299.

**Pemberton, J. Bancroft, D. Amos, B.** (1991). Behavioural Ecology and DNA fingerprinting : the lab rats' riposte. *Trends in Ecology and Evolution.* 6, 299-300.

- Petrakis, G., and K., Stergiou.** (1995). Weight-length relationships for 33 fish species in the Greek waters. Fisheries Research .
- Phillip, D.P.** (1991). Genetic implications of introducing Florida largemouth bass, *Micropterus salmoides floridanus*. Can. J. Fish. aquat. Sci. 48. (Supp. 1), 58-65.
- Ryman, N., Lagercrantz, L., Anderson, R., Chakraborty R., and R. Rosenberg** (1984). Lack of correspondence between genetic and morphological variability patterns in atlantic herring (*Clupea harengus*). Heredity 53: 687-704.
- Schierwater, B., Ender, A.** (1993) Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. Nucleic Acids Res 21:4647-4648.
- Sick, K.,** (1961). Haemoglobin polymorphism in fishes. Nature, Lond. 192, 894-6.
- Skibinski, D.O.F.** (1994). The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In Beaumont, A.R., ed. Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. London: Chapman and Hall ,pp. 177-99.
- Smith, P., Jamieson, A., and Birley, A.** (1990). Electrophoretic studies and the stock concept in marine teleosts. J. Cons. int. Exp. Mer. 47: 231-245.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R.** (1973) Numerical Taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman and Co.
- Spanakis, E., Tsimenides, N., and Zouros, E.** (1989). Genetic differences between populations of sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Aegean and Ionian Seas. J. Fish Biol. 35: 417-437.
- Stergiou, K.I., Christou, E.D., Georgopoulos, D., Zenetos, A., Souvermezoglou, C.** (1997) The Hellenic seas: Physics, Chemistry, Biology and Fisheries. Oceanogr Mar Biol: Annual Review 35.
- Sultmann, H., Mayer, W.E., Figueroa, F., Tichy, H., Klein, J.** (1995) Phylogenetic analysis of Cichlid fishes using nuclear DNA markers. Mol Biol. Evol 12: 1033-1047.
- Taggart, J.B. and Ferguson , A.** (1986). Electrophoretic evaluation of a supplemental stocking programme for brown trout, *Salmo trutta* L. Aquacult. Fish. Manage. 17, 155-62.
- Theodorou, A.J.** (1990) The extent of the Atlantic water influence in the northeastern Ionian Sea (late winter / early spring 1986). Bollettino di Oceanologia Teorica ed Applicata 8: 237-250.
- Theodorou, A.J.** (1991) The circulation of Levantine Intermediate Water in the northern Ionian Sea (late winter / early spring 1986). J Marine Syst 1: 359-372.
- Theodorou, A.J., Theocharis, A., Balopoulos, E.** (1997) Circulation in the Cretan Sea and adjacent regions in late winter 1994. Oceanol Acta 20: 585-596.
- Vassilopoulou, V.** (1987). Sexual maturity of red mullet (*Mullus barbatus*) in the gulfs of Korinthiakos and Patraikos and in the Ionian Sea. Πρακ. Ελλ. Συμπ. Ωκεαν. Αλιείας. 2: 565-570.
- Vassilopoulou, V.** (1989). Red mullet (*Mullus barbatus*) diet in the Amvrakikos Gulf. Proc. Symp. Fish. Popul. Biol. Abs. 180.

- Waldman, J.R. and Wirgin, I.** (1994). Use of DNA analyses in the management of natural fish populations. In Garte, S.J., ed. *Molecular Environmental Biology*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp.29-64.
- Ward, R.D., Grewe, P.M.** (1994) Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev Fish Biol Fish* 4:300-325.
- Ward, R.D., Woodwark, M., Skibinski, D.O.F.** (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J Fish Biol* 44: 213-232.
- Weatherhead, P.J., Montgomerie, R.D.** (1991). Good news and bad news about DNA fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 6, 173-174.
- Welsh, J., McClelland, M.** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218.
- Welsh, J., Peterson, C., McClelland, M.** (1991) Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res* 19: 303-306.
- Whitehead, P.G.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese, E.** (Eds) (1986) *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Volumes I, II and III, Paris: UNESCO.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.** (1990). Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 218: 704-740.
- Weatherhead, P.J., Montgomerie, R.D.** (1991). Good news and bad news about DNA fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 6, 173-174.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

