

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ &
ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Μ. Χ. Μπάνη

Η χρήση των μοριακών τεχνικών
για τη μελέτη των ιχθυοαποθεμάτων
του λιθρινιού, *Pagellus erythrinus* L.,
εντός και εκτός του Παγασητικού κόλπου

Βόλος, 2001



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

Αριθ. Εισ.: 1329/1

Ημερ. Εισ.: 01-07-2003

Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: Δ

597.015

ΜΠΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ &
ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Μ. Χ. Μπάνη

Η χρήση των μοριακών τεχνικών
για τη μελέτη των ιχθυοαποθεμάτων
του λιθρινιού, *Pagellus erythrinus* L.,
εντός και εκτός του Παγασητικού κόλπου

Βόλος, 2001

**Η χρήση των μοριακών τεχνικών για τη μελέτη των ιχθυοαποθεμάτων του
λιθρινιού, *Pagellus erythrinus* L., εντός και εκτός του Παγασητικού
Κόλπου**

Τα μέλη της επιτροπής

Χρήστος Νεοφύτου
Καθηγητής Π.Θ.

Ιχθυολογία-Υδροβιολογία

Ζήσης Μαμούρης
Επίκουρος Καθηγητής Π.Θ.

Βιολογία

Παναγιώτα Παναγιωτάκη
Λέκτορας Π.Θ.

Υδατοκαλλιέργειες

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μεταπτυχιακή αυτή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας κατά τη χρονική περίοδο 2000-2001.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ιχθυολογίας-Υδροβιολογίας κ. Χ. Νεοφύτου, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του, αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή, καθώς και για τις συμβουλές και υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας κ. Ζ. Μαμούρη. Το ενδιαφέρον, οι συμβουλές, οι παρατηρήσεις του και η συνεχής καθοδήγησή του καθ' όλο το διάστημα της εκπόνησης της διατριβής μου, ήταν καθοριστικοί παράγοντες για τη διεκπεραίωσή της.

Τη Λέκτορα Υδατοκαλλιεργειών κ. Π. Παναγιωτάκη για τη συμμετοχή της στην επιτροπή και το ενδιαφέρον που έδειξε για την επιτυχή εκπόνηση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κ. Σταμάτη για τη βοήθεια που μου προσέφερε μέχρι το πέρας της εργασίας αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η γενετική δομή δύο ιχθυοπληθυσμών του λιθρινιού (*Pagellus erythrinus*) με τη χρησιμοποίηση τριών μοριακών μεθόδων ανάλυσης του πολυμορφισμού: i) ισοένζυμα, ii) RAPD, iii) μιτοχονδριακό DNA. Σκοποί της έρευνας ήταν η εκτίμηση της ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας και μια γενικότερη συμβολή στη διαχείριση, προστασία και οικονομική εκμετάλλευση των δύο ιχθυοπληθυσμών. Και στις τρεις μοριακές μεθόδους μελετήθηκαν άτομα και από τους δύο ιχθυοπληθυσμούς, 30 άτομα από τον Παγασητικό και 30 άτομα από τον Πλατανιά.

Δεκατρία ενζυμικά συστήματα μελετήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση αμύλου (EST, AAT, AGP, ME, LDH, CK, PGM, PGI, SOD, XO, MDH, XDH, ADH), που αντιστοιχούν σε 23 γονιδιακούς τόπους. Ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο ήταν 1,5 ενώ το ποσοστό των πολυμορφικών τόπων ήταν 39,1 για τον Παγασητικό και 43,5 για τον Πλατανιά.

Έντεκα εκκινητικά μόρια (OPA 02, 04, 08, 09, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19) χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 30 ατόμων του Πλατανιά. Ο αριθμός των αναπαραγόμενων και ευδιάκριτων ζωνών, που αναλύθηκε για κάθε εκκινητικό μόριο και για τους δύο πληθυσμούς, κυμάνθηκε από 5 έως 18. Το μέγεθος των τμημάτων κυμάνθηκε από 0,18 μέχρι 1,4 Kb. Τα τμήματα με μέγεθος μικρότερο των 1000 ζευγών βάσεων εμφανίστηκαν περισσότερο πολυμορφικά από αυτά με μεγαλύτερο μέγεθος. Ο βαθμός ετεροζυγωτίας μεταξύ των δύο πληθυσμών Παγασητικού - Πλατανιά ήταν 0,280009 ενώ η γενετική απόσταση ήταν 0,01815.

Η ανάλυση με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού περιελάμβανε τον πολλαπλασιασμό με PCR 4 τμημάτων του μιτοχονδριακού DNA (D-Loop, (12s-16s)rRNA, COI, COII) και στη συνέχεια τις πέψεις με 14 ένζυμα περιορισμού (AclI, AluI, AseI, Avall, BanI, Bstul, DdeI, HaeIII, HhaI, HinfI, MboI, MseI, MspI, TaqI). Έντεκα, έντεκα, οκτώ και έντεκα από τα 14 ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν αποκάλυψαν πολυμορφισμό στα τμήματα D-Loop, (12s-16s)rRNA, COI, COII, αντίστοιχα. Συνολικά παρατηρήθηκαν 24 διαφορετικοί απλότυποι. Ο βαθμός ενδοπληθυσμιακής διαφοροποίησης ήταν $\delta = 0,91\%$ για τον Παγασητικό και $\delta = 0,92\%$ για τον Πλατανιά. Οι υψηλές αυτές τιμές

ετεροζυγωτίας σημαίνουν ότι το είδος έχει μια μακρόχρονη και αδιάκοπη παρουσία στον Παγασητικό χωρίς να επηρεάζεται από απότομες δραστικές μειώσεις των πληθυσμιακών μεγεθών του, οι οποίες αν υπάρχουν, αποκαθίστανται γρήγορα.

Η χρήση τριών μοριακών μεθόδων προσέγγισης βοήθησε στην εξαγωγή πιο ολοκληρωμένων συμπερασμάτων. Στους δύο πληθυσμούς, Παγασητικού και Πλατανιά, που αναλύθηκαν, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση με καμία από τις τρεις τεχνικές, ούτε προέκυψαν μοριακοί δείκτες που θα μπορούσαν να ταυτοποιήσουν με ακρίβεια τα άτομα ενός πληθυσμού.

Επίσης, όλα τα δεδομένα της έρευνας συγκλίνουν στο ότι υπάρχουν σημαντικές γενετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πληθυσμών εντός και εκτός Παγασητικού Κόλπου. Έτσι, πιθανή αλλοίωση της γενετικής δομής του πληθυσμού του Παγασητικού από απότομες περιβαλλοντικές μεταβολές, μπορεί γρήγορα να αποκατασταθεί με εισαγωγή άλλων και βασικά όμοιων φυσικών γενετικών αποθεμάτων από τους εκτός Κόλπου πληθυσμούς.

Ακόμη, από την παρούσα ανάλυση δεν προέκυψαν κάποιοι δείκτες που θα μπορούσαν να προταθούν για ένα μοντέλο συνεχούς παρακολούθησης.

Τέλος, τα γενετικά δεδομένα θα πρέπει να συγκριθούν με τις υπόλοιπες βιολογικές και πληθυσμιακές παραμέτρους του είδους (κύκλος ζωής, ρυθμός ανάπτυξης και θνησιμότητας, τρόποι και περιοχές αναπαραγωγής, κατά μήκος και κατά ηλικία σύνθεση των πληθυσμών), προκειμένου να υπάρξει μια πληρέστερη εικόνα των ιχθυοαποθεμάτων του Παγασητικού.

SUMMARY

This dissertation presents a study of the genotype of two distinct fish populations of *Pagellus erythrinus*.

Polymorphism analysis was performed utilizing three different methods: a) isozyme, b) RAPD, c) mitochondrial DNA. The objectives of this study were the analysis of the genetic variation of the two populations and furthermore an attempt to monitor, protect and commercially exploit those fish populations. In all three molecular methods of analysis, individuals of both fish populations were studied; 30 individuals derived from the Pagasitikos gulf and 30 individuals derived from Platanias area.

Thirteen enzyme systems were investigated with starch gel electrophoresis (EST, AAT, AGP, ME, LDH, CK, PGM, PGI, SOD, XO, MDH, XDH, ADH), corresponding to 23 putative loci. Mean number of alleles per locus per population was 1,5, whereas the percentage of polymorphic loci was 39,1 for Pagasitikos and 43,5 for Platanias respectively.

Eleven primers (OPA 02, 04, 08, 09, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19) were used to amplify the 30 samples derived from Pagasitikos and the 30 samples derived from Platanias. The number of the visible fragments in the 11 primers with repeatable fragment patterns ranged from 5 to 18 fragments per primer with the size of the fragments ranging from 0,18 to 1,4 Kb. Fragments that were smaller than 1000 base pairs exhibited a higher degree of polymorphisms than the bigger ones. The degree of heterozygosity between the two populations of Pagasitikos and Platanias was 0,280009, whereas the genetic distance was 0,01815.

Restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA consisted of the amplification with the Polymerase Chain Reaction of four regions of mtDNA (namely D - Loop, (12s - 16s) rRNA, COI, COII) followed by digestion with restriction enzymes. Fourteen restriction endonucleases were used (AclI, AluI, AseI, AvaI, BclI, BstI, DdeI, HaeIII, HhaI, HinfI, MboI, MseI, MspI, TaqI). Eleven, eleven, eight and eleven out of 14 restriction endonucleases were found to detect variability in the D - Loop, (12s - 16s) rRNA, COI, COII regions respectively. 24 different haplotypes were observed.

Interpopulational diversity was $\delta=0,91\%$ for Pagasitikos and $\delta=0,92\%$ for Platania. The high percentage of heterozygosity observed implies that the species has had a long and undisturbed presence in the Pagasitikos gulf. Its genetic makeup has not been influenced by sudden or drastic reductions in population numbers, which if occurred, have been restored relatively fast.

The choice of three different molecular methods of analysis for this study enabled complete, accurate and reproducible results. Neither diversity, nor molecular markers, for high precision identification of those two populations (Pagasitikos and Platania) have been found, using the three molecular biology techniques.

All results produced from this study imply that there are important genetic influences between the populations within and outside Pagasitikos gulf. Therefore, potential future genetic variability, within the fish population of Pagasitikos, due to environmental changes, can be easily restored by the introduction of new, but genetically similar populations from within and outside Pagasitikos.

Moreover, employed analytical techniques have not been able to establish molecular markers for fish stock monitoring. Finally, these results may be interpreted in combination with the rest of biological and population parameters (life cycle, developmental rate, mortality rate, methods of reproduction, population contents based on age and area), in order to successfully draw a final picture of the fish stock in Pagasitikos.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Έννοια του ιχθυοαποθέματος	12
2. Ιστορική αναδρομή της χρήσης των μοριακών τεχνικών στη γενετική πληθυσμών	13
3. Σημασία της χρήσης των μοριακών τεχνικών στον προσδιορισμό των ιχθυοαποθεμάτων	14
4. Εφαρμογές των μοριακών τεχνικών στις υδατοκαλλιέργειες	15
5. Εφαρμογές στην αναγνώριση και διάκριση των ειδών	16
6. Σκοπός της εργασίας	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

A. ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	19
1. Μελέτη των ισοενζύμων	19
B. ΤΕΧΝΙΚΗ RAPD	22
1. Ανάλυση και χρησιμότητα της τεχνικής RAPD	22
2. Δυσκολίες και περιορισμοί της τεχνικής RAPD	23
Γ. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA	24
1. Ανάλυση mtDNA	24
2. Έρευνες της ποικιλότητας του mtDNA	28
3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ανάλυσης DNA (mtDNA - nDNA)	29
Δ. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	31
1. Τεχνική PCR	31
2. Χαρακτηριστικά της τεχνικής PCR	36
3. Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR	37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό υλικό	38
2. Δειγματοληψία	39
A. ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ	41
1. Ισοενζυμική ανάλυση	41
2. Συστήματα ηλεκτροφόρησης ενζύμων	42
3. Ενζυμικά συστήματα	43
4. Ειδικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης	47
5. Ειδικές συνθήκες χρώσης για κάθε ενζυμικό σύστημα	48
B. ΤΕΧΝΙΚΗ RAPD	54
1. Εξαγωγή και απομόνωση του ολικού DNA	54
2. Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν και συνθήκες ενίσχυσης των δεικτών RAPD	55
Γ. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA	57
1. Εξαγωγή μιτοχονδριακού DNA	57
2. Πολλαπλασιασμός τμημάτων του mtDNA με τη χρήση PCR	59
3. Πέψεις των τμημάτων που ενισχύθηκαν με την PCR με ένζυμα περιορισμού	61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ	63
1. Ανάλυση ηλεκτροφορητικών δεδομένων	63
2. Πολυμορφισμός ενζυμικών συστημάτων	64
3. Ενδοπληθυσμιακός πολυμορφισμός	67
B. ΤΕΧΝΙΚΗ RAPD	70
1. Ηλεκτροφορήσεις σε πηκτές αγαρόζης	70
2. Ηλεκτροφορήσεις σε πηκτές πολυακρυλαμίδης	70
Γ. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA	77
1. Πολυμορφισμός του μιτοχονδριακού DNA που αποκαλύπτεται με τη χρήση ενζύμων περιορισμού	77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 86

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 89

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Έννοια του ιχθυοαποθέματος

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

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.*, 1990: Carvalho & Hauser, 1994).

Τα τελευταία χρόνια η χρησιμοποίηση μοριακών μεθόδων έχει αυξηθεί θεαματικά, εξαιτίας της αυξανόμενης διαθεσιμότητας τεχνικών και της καλύτερης κατανόησης της αξίας των γενετικών δεδομένων. Η περιγραφή της γενετικής ποικιλότητας των πληθυσμών, η οποία εντάσσεται μέσα σε μια γενικότερη προσπάθεια μελέτης της βιοποικιλότητας των οικοσυστημάτων, ενδιαιτημάτων, ειδών, πληθυσμών κ.λπ., είναι απαραίτητο βήμα τόσο για βασικούς (κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην προσαρμογή και εξέλιξη των ειδών), όσο και για εφαρμοσμένους σκοπούς (διαχείριση και προστασία των ιχθυοαποθεμάτων) (Avisé 1994).

2. Ιστορική αναδρομή της χρήσης των μοριακών τεχνικών στη γενετική πληθυσμών

Οι πρώτες μοριακές γενετικές τεχνικές λαμβάνουν χώρα στον τομέα της ιχθυολογίας το 1950. Αρχικά μελετήθηκαν παραλλαγές των ομάδων αίματος σε τόνους, σαλμονίδες και μουρούνες (de Ligny 1969) και παρατηρήθηκε γενετικά ελεγχόμενος πολυμορφισμός, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις δομής των πληθυσμών. Σταδιακά, οι βιολόγοι στράφηκαν στη χρήση μεθόδων ηλεκτροφόρησης, οι οποίες αποκαλύπτουν γενετικά καθορισμένους πρωτεϊνικούς πολυμορφισμούς. Ο Sick (1961) ήταν ο πρώτος που περιέγραψε τις μεταβολές της αιμοσφαιρίνης στο ταούκι (*Gadus morhua*). Αργότερα, οι Harris (1966) και Lewontin & Hubby (1966), με μελέτες στον άνθρωπο και τη φρουτόμυγα (*Drosophila pseudoobscura*) αντίστοιχα, απέδειξαν τον εξαιρετικό πολυμορφισμό των ειδών αυτών για διάφορα ισοένζυμα, τα οποία ανιχνεύονταν μετά από ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αποδείχθηκε γρήγορη, φθηνή και σταθερά αναπαραγόμενη.

Πολλά είδη φυτών και ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών και των οστρακοειδών με εμπορική αξία, είχαν αρκετή γενετική παραλλακτικότητα, ώστε η εξέταση της δομής των πληθυσμών ήταν γρήγορη. Όμως, οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών και ισοενζύμων παρέχουν μία έμμεση εκτίμηση της μεταβλητότητας του πυρηνικού DNA. Άμεσες εκτιμήσεις της μεταβλητότητας του DNA επιτεύχθηκαν με την απομόνωση των ενδοουκλεασών περιορισμού. Αυτές είναι ένζυμα που "κόβουν" το DNA σε ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες δίνοντας τμήματα DNA μεταβλητού μεγέθους, τα οποία διαχωρίζονται σε πηκτές ηλεκτροφόρησης, επιτρέποντας έτσι την άμεση μελέτη της μεταβλητότητας των αλληλουχιών DNA.

Το μιτοχονδριακό DNA εξετάστηκε πρώτο, λόγω του μεγέθους του και της ευκολίας απομόνωσής του. Στη συνέχεια εξετάστηκε το πυρηνικό (nuclear) DNA.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει απειροελάχιστες ποσότητες DNA να ενισχυθούν και να αναλυθούν. Μελέτες με εφαρμογή ισοενζύμων και δεικτών DNA στα ψάρια έχουν γίνει αρκετές. Οι Waldman & Wirgin (1994) έχουν αναφέρει τη χρήση των αναλύσεων DNA (όχι όμως των ισοενζύμων) στη διαχείριση των αποθεμάτων των ψαριών, ενώ 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:

1. Στον προσδιορισμό και την ανάλυση της δομής των ιχθυοαποθεμάτων.
2. Στις υδατοκαλλιέργειες.
3. Στην ταξινομία-συστηματική.

3. Σημασία της χρήσης των μοριακών τεχνικών στον προσδιορισμό των ιχθυοαποθεμάτων

Η επιδίωξη αυτών που ασχολούνται με την αειφορική 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 & Hauser, 1994).

Η ιδέα της διαρκούς εκμετάλλευσης 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, οι οποίοι πιθανόν αντιδρούν διαφορετικά στην αλιευτική πίεση (Lannal *et al.*, 1989).

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

Η αλιευτική τακτική που ακολουθείται, π.χ. αλίευση μεγαλύτερων σε μέγεθος άρα και σε ηλικία ατόμων ή υπεραλίευση των πληθυσμών, μπορεί να έχει 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.*, 1984).

Ένα από τα σημαντικότερα ερωτήματα που τίθενται είναι με ποιο τρόπο θα καθοριστεί ένας ιχθυοπληθυσμός. Για τον καθορισμό των ιχθυοπληθυσμών έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί διάφορες παράμετροι (όπως οικολογικοί, φυσιολογικοί, μορφολογικά χαρακτηριστικά ή μαρκαρίσματα ψαριών) (Ihssen *et al.*, 1981), καθώς επίσης η χρήση τεχνικών που ανιχνεύουν τον πολυμορφισμό πρωτεϊνών και ενζύμων και η ανάλυση του DNA, μέθοδοι που αποδείχθηκαν περισσότερο αποτελεσματικές (Park & Moran, 1994).

Η χρήση των μοριακών τεχνικών δεν έχει αποδειχθεί μόνο πολύτιμη για τον καθορισμό ιχθυοπληθυσμών, αλλά επίσης έδειξε τη σπουδαιότητα των εξελικτικών δυνάμεων που δρουν και διαφοροποιούν αυτούς. Αυτές οι πληροφορίες είναι σημαντικές όταν πρόκειται να προταθούν μέτρα για τη διαχείριση των ιχθυοπληθυσμών.

4. Εφαρμογές των μοριακών τεχνικών στις υδατοκαλλιέργειες

- **Έλεγχος των επιπέδων της γενετικής ποικιλότητας**

Στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, 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 επιλεγμένα δείγματα των ιχθυοπληθυσμών, επιλεγμένα, είτε από προηγούμενες γενιές, είτε από πατρικούς άγριους πληθυσμούς, με αποτέλεσμα η διαδικασία να μοιάζει πολύ με τη μελέτη της δομής των ιχθυοπληθυσμών.

Οι έλεγχοι γίνονται με βάση της 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 στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς ή προέρχονται από άλλες περιοχές, χρησιμοποιούνται συνήθως για την αύξηση των υπάρχοντων 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 μεταβλητότητας και προσαρμοστικότητας (Mitton & Grant, 1984; Bardacki & 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).

5. 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 ταξινόμια είναι γνωστό ότι όταν δύο τάξα είναι αναπαραγωγικά 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. Επίσης, 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.

6. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η εξέταση της επίδρασης του τρόπου αλιείας στους ιχθυοπληθυσμούς του λιθρινιού στον Παγασητικό και τον Πλατανιά και τις γενετικές παραμέτρους αυτών. Ο τρόπος αλιείας είναι διαφορετικός εντός και εκτός του Παγασητικού κόλπου. Στον Παγασητικό απαγορεύεται η αλιεία με μηχανότρατα κι έτσι τα λιθρίνια αλιεύονται μόνο με δίχτυα. Εκτός του κόλπου είναι δυνατή η αλιεία με μηχανότρατα και έτσι ο ιχθυοπληθυσμός του λιθρινιού στον Πλατανιά αλιεύτηκε με μηχανότρατα. Η εξέταση της γενετικής συγγένειας μεταξύ των δύο ιχθυοπληθυσμών του είδους *Pagellus erythrinus* έγινε μέσω της εκτίμησης της ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας. Ειδικότερα:

- Έρευνα της γενετικής δομής των δύο πληθυσμών του είδους *Pagellus erythrinus*.
- Εύρεση των κατάλληλων γενετικών δεικτών που θα επιτρέψουν την ταυτοποίηση των πληθυσμών αυτών.
- Εκτίμηση του βαθμού διαφοροποίησης στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA, όπως αυτός αποκαλύπτεται με την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του και τη χρησιμοποίηση ενζύμων περιορισμού.
- Σύγκριση των αποτελεσμάτων των τριών μεθόδων.
- Εκτίμηση της επίδρασης ανθρωπογενών δραστηριοτήτων στη γενετική δομή των δύο πληθυσμών του είδους *Pagellus erythrinus*.

- Συμβολή στη διαχείριση και οικονομική εκμετάλλευση των δύο πληθυσμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

A. ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

1. Μελέτη των ισοενζύμων

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για την περιγραφή και την ανάλυση γενετικών πληθυσμιακών παραμέτρων. Εδώ και 30 χρόνια έχει αποτελέσει μια πλούσια πηγή δεδομένων με τα οποία δόθηκαν απαντήσεις σε εξελικτικά και οικολογικά ερωτήματα, με σημαντικότερα απ' αυτά τον υπολογισμό των επιπέδων και της κατανομής της γενετικής ποικιλότητας μέσα στους φυσικούς πληθυσμούς φυτών και ζώων (π.χ. Ayala *et al.*, 1974; Guyomard & Krieg, 1983; Hamrick & Godt, 1989; Abatzopoulos *et al.*, 1993 κ.ά.).

Οι διαφορετικές μορφές των ενζύμων, που όμως έχουν την ίδια εξειδίκευση, ονομάζονται γενικά ισοένζυμα (Markert & Whitt, 1968). Τα ισοένζυμα καταλύουν την ίδια αντίδραση, αλλά διαφέρουν σε ορισμένες ιδιότητες, όπως θερμοανθεκτικότητα, συγγένεια με το υπόστρωμα, ευαισθησία σε αναστολείς, ιστοειδίκευση, δραστηριότητα κ.λ.π. Ο παραπάνω ορισμός είναι γενικός. Έτσι, έχει επικρατήσει πια να χρησιμοποιείται ο όρος *ισοένζυμα* για τις μορφές των ενζύμων που κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους και ο όρος *αλλοένζυμα* για αλληλόμορφα του ενζύμου που κωδικοποιούνται από τον ίδιο γονιδιακό τόπο (Shaklee *et al.*, 1990).

Η ηλεκτροφόρηση ισοενζύμων παραμένει ο κυρίαρχος τρόπος μελέτης της γενετικής ποικιλομορφίας. Συγκεκριμένα, η ισοενζυμική ανάλυση παρέχει το πλεονέκτημα να γίνει γνωστή η γενετική δομή των πληθυσμών των ειδών, να εκτιμηθούν παράμετροι όπως ο βαθμός ετεροζυγωτίας, το ποσοστό των πολυμορφικών γονιδιακών τόπων ή ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο. Ακόμα, όσον αφορά ένα είδος, μπορεί να δώσει πληροφορίες όπως εάν τα άτομα προέρχονται όλα από ένα παμμικτικό πληθυσμό που

βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, ή από γενετικά διακριτές ομάδες. Επίσης μπορεί να βρεθούν αλληλόμορφα μοναδικά για τους πληθυσμούς κάθε είδους τα οποία να το χαρακτηρίζουν και να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες. Επιπλέον μπορεί να υπολογισθεί ο βαθμός της διαπληθυσμιακής διαφοροποίησης και ο βαθμός της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών.

Η λογική της τεχνικής της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης της ενζυμικής ποικιλότητας είναι απλή. Τα ένζυμα αποτελούνται από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από μία ακολουθία αμινοξέων η οποία κωδικοποιείται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του DNA του αντίστοιχου γονιδιακού τόπου. Έτσι, αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA ενδέχεται να επηρεάσουν την αλληλουχία των αμινοξέων των ενζύμων που κωδικοποιούν. Αυτές οι μεταλλάξεις πιθανόν να μεταβάλουν το φορτίο, το μέγεθος ή το σχήμα των ενζύμων τροποποιώντας έτσι την κινητικότητά τους κάτω από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Στη συνέχεια, με τις κατάλληλες εξειδικευμένες ιστοχημικές χρώσεις, τα προϊόντα κάθε γονιδιακού τόπου μπορούν να ταυτοποιηθούν σε ένα μίγμα πρωτεϊνών από ένα ιστό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, χρειάζεται να μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός γονιδιακών τόπων, άρα και διαφορετικών ενζύμων. Ο αριθμός των 20-25 γονιδιακών τόπων θεωρείται ως ο ελάχιστος για τον υπολογισμό των γονιδιακών συχνοτήτων και την εκτίμηση του βαθμού ετεροζυγωτίας.

Τα πλεονεκτήματα της ισοενζυμικής ανάλυσης είναι πολυάριθμα. Αρχικά, η γρήγορη ανάλυση των δειγμάτων και το χαμηλό κόστος των χημικών που απαιτούνται. Δεδομένα εκατοντάδων ατόμων μπορούν να επεξεργαστούν σε λίγες μέρες ή εβδομάδες. Ο εξοπλισμός που απαιτείται είναι απλός και το προσωπικό μπορεί να εκπαιδευθεί γρήγορα εάν και σε μερικές περιπτώσεις το να εξηγήσει κανείς τα αποτελέσματα απαιτεί μεγάλη εμπειρία. Ας σημειωθεί ότι η ανάλυση πρωτεϊνών με γνωστή λειτουργία καθώς και η πληθώρα των αποτελεσμάτων για πολλά είδη που κανείς μπορεί να αντλήσει από τη βιβλιογραφία καθιστά ακόμα πιο αξιόπιστη τη μέθοδο των ισοενζύμων.

Η ισοενζυμική ανάλυση ήταν η κυρίαρχη γενετική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση των ειδών όπως συνέβη σε ορισμένους τελεόστεους, συμπεριλαμβανομένων των ειδών του γένους *Sprattus* (Clupeidae) από τη Νέα Ζηλανδία (Smith & Robertson, 1981), τους τροπικούς

καρχαρίες του γένους *Carharinus* (Carharinidae) της Βόρειας Αυστραλίας (Lavery & Shaklee, 1991) και άλλοι. Ενίοτε, τα ισoenζυμα χρησιμοποιήθηκαν για να επιβεβαιώσουν ήδη υπάρχουσες ταξινομικές κατηγορίες, με αποτέλεσμα διάφορες ταξινομικές ομάδες να συγχωνευτούν, ενώ διάφορες άλλες να διασπαστούν. Παραδείγματα από θαλάσσιους τελεόστεους περιλαμβάνουν το είδος *Maomao scorpis* (Kyphosidae) στη Νέα Ζηλανδία (Smith *et al.*, 1979) και την αθερίνα *Atherina* (Atherinidae) στην Ευρώπη (Creech 1991). Σε μερικές περιπτώσεις τα δεδομένα των ισoenζύμων οδηγούν στη συγχώνευση των ομάδων όπως με τα δύο είδη αστακού *Jasus edwardsii* και *Jasus novaehollandiae* από τη Νέα Ζηλανδία και την Αυστραλία αντίστοιχα (Booth *et al.*, 1990).

B. ΤΕΧΝΙΚΗ RAPD

1. Ανάλυση και χρησιμότητα της τεχνικής RAPD

Σαν επέκταση των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιούν πολυμορφικούς δείκτες DNA, η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) αποτελεί μία τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην μοριακή βιολογία για να καθορίσει την ταξινομική ταυτότητα των ειδών, να προσδιορίσει τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα σε είδη και να διαχωρίσει δείγματα ανάμικτου γονιδιώματος.

Η χρησιμοποίηση της μεθόδου RAPD έγινε εφικτή μετά τις προόδους στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η μέθοδος RAPD επιτρέπει την εξέταση της γενωμικής ποικιλότητας και έχει εφαρμοσθεί με απόλυτη επιτυχία στην εξέταση της ποικιλότητας σε πλήθος οργανισμών όπως στα βακτήρια (Welsh & Mc Clelland, 1990), στα φυτά (Mailer *et al.*, 1994), στα ποντίκια (Welsh *et al.*, 1991), στις αφίδες (Black *et al.*, 1992: Cenis *et al.*, 1993), στους μύκητες (Lanfranco *et al.*, 1995) και στα μυρμήγκια (Dewayne Shoemaker *et al.*, 1994). Στα ψάρια, η μέθοδος RAPD χρησιμοποιήθηκε στην αναγνώριση ειδών και υποειδών στην τιλάπια. Σαν ένα πολύ ευαίσθητο εργαλείο αναγνώρισης πυρηνικού DNA μπορεί να έχει καλύτερα αποτελέσματα από τα ισοένζυμα στον προσδιορισμό γενετικού πολυμορφισμού στα ψάρια ανάμεσα σε υποείδη ή σε πληθυσμούς του ίδιου είδους.

Τα πλεονεκτήματα της RAPD μεθόδου είναι:

1. Η δυνατότητα μελέτης αγνώστων γονιδιωμάτων.
2. Η μελέτη του DNA όταν μόνο περιορισμένες ποσότητες είναι διαθέσιμες.
3. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου και το μικρό κόστος της.

Η μέθοδος RAPD είναι αρκετά πρόσφατη. Χάρη στη χρήση της τεχνικής PCR έχει προσελκύσει το τεράστιο ενδιαφέρον των επιστημόνων, αποτελώντας σε πολλές έρευνες απαραίτητο συμπλήρωμα στις άλλες τεχνικές ανάλυσης του DNA. Η σύλληψη της ανάλυσης RAPD είναι απλή. Ποσότητες νανογραμμάτων ολικού γενωμικού DNA με τη χρήση μικρών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, γνωστά ως εκκινητικά μόρια (primers) που περιέχουν τυχαίες αλληλουχίες,

υποβάλλονται στην τεχνική PCR. Οι συνθήκες ενίσχυσης στο PCR δεν είναι οι τυπικές PCR συνθήκες γιατί ως εκκινητικό μόριο χρησιμοποιείται ένα τυχαίο ολιγονουκλεοτίδιο και δεν απαιτείται η γνώση της αλληλουχίας του.

Τα τυπικά εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιούνται στην τεχνική PCR για να ενισχύσουν τις άγνωστες περιοχές του πυρηνικού DNA είναι μήκους 10-20 ζευγών βάσεων (bp). Όταν το εκκινητικό μόριο είναι μικρό (10 ζεύγη βάσεων), αρκετές θέσεις εκκίνησης με αντεστραμμένο προσανατολισμό μπορεί να εμπεριέχονται στο γονιδίωμα. Η τεχνική RAPD ανιχνεύει τις αντεστραμμένες επαναλήψεις και ενισχύει τα παρεμβαλλόμενα τμήματα DNA μεταβλητού μήκους.

Το πρότυπο των προϊόντων ενίσχυσης εξαρτάται από τη σχέση DNA στόχου-εκκινητικού μορίου και αναπαράγεται για κάθε δεδομένο συνδυασμό. Τα προϊόντα ενίσχυσης αναλύονται σε πηκτές αγαρόζης ή ακρυλαμίδης και οι πολυμορφισμοί χρησιμοποιούνται σαν κυρίαρχοι γενετικοί δείκτες, με μενδελική κληρονομία.

2. Δυσκολίες και περιορισμοί της τεχνικής RAPD

Οι πιθανές δυσκολίες που θα προκύψουν σε μια μελέτη RAPD αναφέρονται:

1. Στο μέγεθος του εκκινητικού μορίου.
2. Στην ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης.
3. Στην πιθανότητα της ταυτόχρονης μετατόπισης ορισμένων ζωνών DNA.
4. Στα μη αναπαραγόμενα προϊόντα ενίσχυσης.

Γ. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

1. Ανάλυση mtDNA

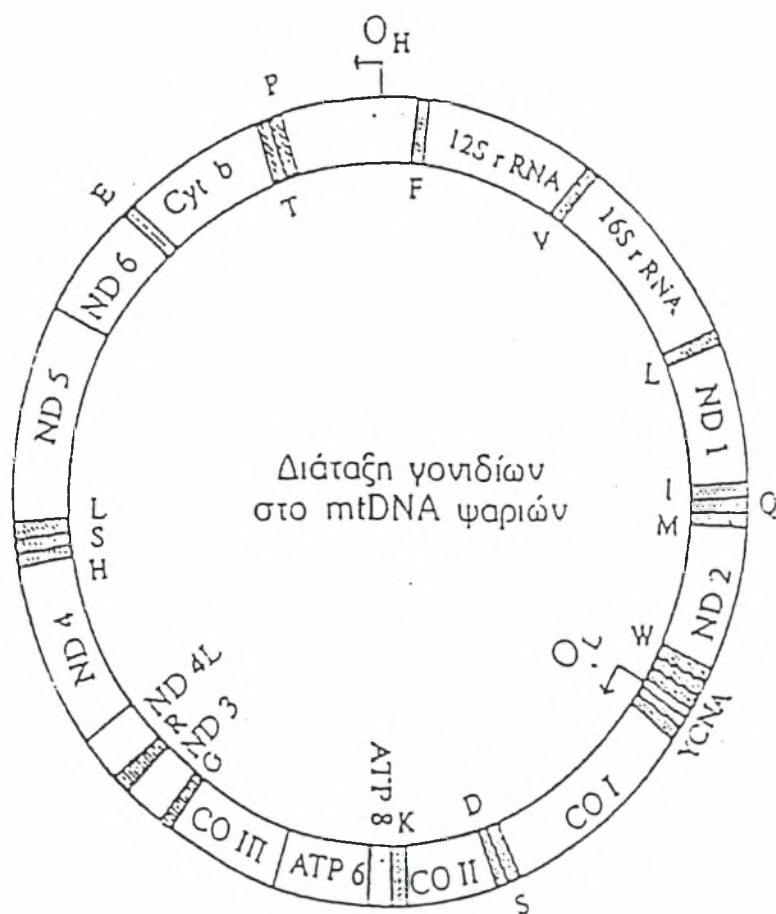
Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων τα οποία έχουν το δικό τους DNA, το μιτοχονδριακό (mt) DNA. Το mtDNA είναι απλοειδές, δίκλωνο, κυκλικό μόριο. Έχει σχετικά μικρό μέγεθος και μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Συγκεκριμένα, το μέγεθος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των ζώων κυμαίνεται από 14000 ζευγάρια βάσεων (14 Kb) (στο νηματώδες, *Caenorhabditis elegans*), μέχρι 42000 ζευγάρια βάσεων (42 kb) (στο χτένι, *Placopecten megellanicus*), ενώ στα περισσότερα ζώα είναι γύρω στις 16-20 kb (Wolstenholme 1992).

Η απομόνωση του mtDNA των 16-20 kb από τα δισεκατομμύρια άλλα νουκλεοτίδια του γονιδιώματος είναι σχετικά εύκολη λόγω φυσικού διαχωρισμού του. Το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται και μεταβιβάζεται σχεδόν αποκλειστικά μητρικά. Παρουσιάζει ταχύτερο ρυθμό αλλαγών σε σχέση με το πυρηνικό DNA, στην αλληλουχία των βάσεων του. Έτσι, μπορούν να εντοπιστούν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ακόμη και σε περιπτώσεις όπου οι πληθυσμοί είναι ίδιοι στο επίπεδο του πυρηνικού DNA (Awise *et al.*, 1987).

Το ζωικό mtDNA παρουσιάζει μία σαφή συντηρητικότητα ως προς τα γονίδια που περιέχει. Πράγματι, το mtDNA των σπονδυλωτών, εχινόδερμων και εντόμων περιλαμβάνει 13 γονίδια που μεταφράζονται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 2 γονίδια για ριβοσωμικά RNA (12s και 16s rRNA) και 22 γονίδια για μεταφορικά RNA (tRNA), όπως και μία περιοχή που δεν κωδικοποιεί, αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις για την αντιγραφή του mtDNA και τη μεταγραφή του σε RNA, γνωστή ως περιοχή ελέγχου ή βρόγχος D (D-loop). Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Αυτά είναι, οι 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), μία υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, III) και δύο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPάση 6, 8) (Εικ. 1). Για τη λειτουργία όμως των βιοχημικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων χρειάζονται περισσότερα ένζυμα, η

πλειοψηφία των οποίων καθορίζεται από το πυρηνικό DNA, συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και εισάγεται στα μιτοχόνδρια. Προφανώς το εξαρτώμενο από τον πυρήνα μιτοχονδριακό γονιδίωμα του σήμερα είναι αποτέλεσμα της προοδευτικής μεταφοράς του γενετικού ελέγχου στον πυρήνα από ένα προηγούμενο πιο σύνθετο και μεγαλύτερο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Meyer 1993).

Η απουσία ενδονίων, ψευδογονιδίων, επαναλαμβανόμενου DNA και μεγάλων ακολουθιών που να παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων του, καθιστά το mtDNA παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση. Εξάλλου, οι περισσότερες από τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι απλές αντικαταστάσεις βάσεων, άλλες είναι μικρές προσθήκες ή ελλείμματα (ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων), ενώ λιγότερες περιλαμβάνουν μεγάλες αλλαγές (μέχρι αρκετές 100άδες νουκλεοτίδια) στο μήκος του μορίου. Οι περισσότερες διαφορές μήκους περιορίζονται στην περιοχή ελέγχου του μορίου.



Εικόνα 1. Η "κοινής αποδοχής" διάταξη των γονιδίων στο μιτοχόνδριο των σπονδυλωτών που έχει επιβεβαιωθεί και στα ψάρια (Meyer 1993).

Στα σπονδυλωτά, οι δύο αλυσίδες mtDNA, γνωστές ως L (light-ελαφριά), και H (heavy-βαριά), παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο G+T. Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα γονίδια στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών κωδικοποιούνται από την αλυσίδα H. Έτσι από τα 37 γονίδια στο mtDNA των σπονδυλωτών μόνο ο τύπος tRNA και το γονίδιο ND 6 κωδικοποιούνται από την αλυσίδα L (Avisé *et al.*, 1987).

Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και στα ασπόνδυλα. Ενώ στα σπονδυλωτά λιγότερο από 10% του ολικού αριθμού των βάσεων που κωδικοποιούν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα βρίσκονται στην αλυσίδα L, στη *Drosophila* (Meyer 1993), το 50% περίπου βρίσκεται σε αυτή.

Η διάταξη των γονιδίων στο ζωικό mtDNA, τουλάχιστον μέσα σε μία ταξινομική τάξη ή φύλο, είναι εξαιρετικά σταθερή (Wilson *et al.*, 1985). Ωστόσο, μπορεί να υπάρξει ποικιλότητα στη σειρά των γονιδίων του mtDNA, ακόμα και μέσα στο ίδιο φύλο. Στα ψάρια, η διάταξη των γονιδίων στο mtDNA τους δεν διαφέρει από τη διάταξη των γονιδίων των σπονδυλωτών (Johansen *et al.*, 1990). Η σταθερότητα της διάταξης των γονιδίων στα ασπόνδυλα, όπως και η απουσία ιντρονίων και μεγάλων μεσογονιδιακών διαστημάτων, που κάνουν το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου να εμφανίζεται σταθερό σε μεγάλης έκτασης αναδιατάξεις, οφείλονται στη συμπαγή δομή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Brown 1985).

Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα (και τα ώριμα ωκύτταρα) περιέχουν 100άδες ή 1000άδες μόρια mtDNA, έτσι ώστε μία καινούργια μετάλλαξη θα προσθέσει ή θα δημιουργήσει μία κατάσταση ετεροπλασμίας κατά την οποία δύο ή περισσότεροι γενότυποι θα συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο. Αρχικά υπήρξε ο φόβος περιπτώσεων ετεροπλασμίας και πολυπλοκότητας της μελέτης του mtDNA, αλλά μόνο θεωρητικά. Στην πράξη, κάθε μιτοχόνδριο περιέχει μόνο ένα τύπο mtDNA (ομοπλασμία). Περιπτώσεις ετεροπλασμίας έχουν διαπιστωθεί σε διάφορες ομάδες οργανισμών, αλλά είναι σπάνιες και έτσι έχουν μικρή σημασία σε μελέτες του ζωικού mtDNA (Avisé *et al.*, 1987).

Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος και λιγότερο αυστηρός από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Υπάρχουν επίσης μικρές διαφορές στους γενετικούς κώδικες μεταξύ σπονδυλωτών, εχινοδέρμων και *Drosophila* (Meyer 1993). Ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA σε σχέση με αυτόν του μοναδικού πυρηνικού DNA (scnDNA) ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες ομάδες

οργανισμών. Το mtDNA εξελίσσεται 5-10 φορές ταχύτερα από το πυρηνικό DNA στα θηλαστικά, ενώ αντιθέτως mtDNA και nDNA έχουν παρόμοιους ρυθμούς εξέλιξης σε πολλά έντομα (Meyer 1993). Τα κύρια χαρακτηριστικά του υψηλού ρυθμού εξέλιξης του mtDNA των σπονδυλωτών είναι:

1. Το εξαιρετικά υψηλό ποσοστό (>90%) σιωπηλών αντικαταστάσεων.
2. Ο υψηλός λόγος μετατοπίσεων / μεταστροφών (ts / tv).
3. Η έντονη τάση για μεταπτώσεις C↔T στην αλυσίδα L (Gray 1989).

Έχει βρεθεί ότι ο λόγος μεταπτώσεων προς μεταστροφές μικραίνει όσο ο χρόνος απόκλισης των προς σύγκριση ειδών αυξάνει, πιθανόν ως αποτέλεσμα πολλαπλών αντικαταστάσεων στην ίδια θέση (Wilson *et al.*, 1985).

Ο ταχύτερος ρυθμός εξέλιξης του mtDNA εξηγείται από τους Wilson *et al.*, 1985 ως εξής:

α. Η πολυμεράση του mtDNA (πολυμεράση γ) δεν έχει ικανότητες επιδιόρθωσης ή το σύστημα επιδιόρθωσης έχει περισσότερη "ελευθερία λαθών", επειδή δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του mtDNA.

β. Η έλλειψη μηχανισμού ανασυνδυασμού, μέσω του οποίου η φυσική επιλογή θα μπορούσε να εξαλείψει τις ελαφρά βλαβερές μεταλλάξεις.

γ. Ο ταχύς ρυθμός εξέλιξης του mtDNA σε σχέση με το nDNA οφείλεται μόνο σε σιωπηρές μεταλλάξεις και οι αντικαταστάσεις αμινοξέων συσσωρεύονται στο μιτοχονδριακό και το πυρηνικό γονιδίωμα με παρόμοιους ρυθμούς (Brown & Simpson, 1982). Έτσι, η χαλαρή αναγνώριση κωδικονίων από τα αντικωδικόνια, το γεγονός ότι τα 4 νουκλεοτίδια είναι συχνά το ίδιο ανεκτά στην τρίτη θέση των κωδικονίων και αναγνωρίζονται από το ίδιο είδος tRNA και ότι οι μεταλλάξεις σε αυτές τις τρίτες θέσεις είναι πραγματικά σιωπηρές μπορεί να θεωρηθεί ένα είδος χαλαρής αυστηρότητας εναντίον αυτών των μεταλλάξεων. Αντίθετα, οι διαφορές που παρατηρούνται στο ρυθμό εξέλιξης του mtDNA και του μοναδικού πυρηνικού DNA στα σπονδυλωτά πιθανόν να οφείλονται σε καθυστέρηση μάλλον της εξέλιξης του scnDNA παρά στον ταχύ ρυθμό εξέλιξης του mtDNA (Moritz *et al.*, 1987)

Παρόλα αυτά, ούτε και ο ρυθμός της εξέλιξης του μιτοχονδριακού DNA είναι σταθερός (Martin & Palumbi, 1993). Για παράδειγμα, ο ρυθμός μεταλλάξεων στα θηλαστικά είναι 2% νουκλεοτιδική απόκλιση ανά ένα εκατομμύριο χρόνια, ενώ στα ψάρια και πιο συγκεκριμένα στην οικογένεια

Salmonidae, ο ρυθμός αυτός προτείνεται ότι είναι 1%. Παράγοντες που ίσως επηρεάζουν το ρυθμό μεταλλαξιγένεσης είναι το μέγεθος σώματος και ο μεταβολικός ρυθμός. Παρατηρήθηκε ότι υψηλοί ρυθμοί μεταλλάξεων συνδέονται με μικρό μέγεθος σώματος (με εξαίρεση τα πουλιά) και υψηλό μεταβολικό ρυθμό. Δεν έγινε όμως δυνατό να συσχετισθεί ο ρυθμός μεταλλάξεων με το χρόνο γενιάς.

Η πλειονότητα των μεταλλάξεων που συμβαίνουν στο μόριο του μιτοχονδριακού DNA αφορούν απλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων. Οι μεταπτώσεις υπερισχύουν των μεταστροφών σε συγκρίσεις στενά συγγενικών ειδών, αλλά η αναλογία μεταπτώσεων / μεταστροφών ελαττώνεται, καθώς η εξελικτική απόσταση μεταξύ των ειδών αυξάνεται. Πιο σπάνια συμβαίνουν προσθήκες ή ελλείμματα και μάλιστα συνήθως περιορίζονται στην περιοχή του βρόχου D, σε ασπόνδυλα και κατώτερα σπονδυλωτά (Moritz *et al.*, 1987), ακόμα και στα ψάρια (Lee *et al.*, 1995). Αυτές οι μικρές διαφορές μήκους οφείλονται κυρίως σε ολίσθηση κατά την αντιγραφή.

2. Έρευνες της ποικιλότητας του mtDNA

Το mtDNA είναι ένα από τα περισσότερο και καλύτερα μελετημένα τμήματα του ζωικού γονιδιώματος. Και αυτό χάρη στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του σε σχέση με το nDNA, τα οποία προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα στις πληθυσμιακές μελέτες. Το γεγονός ότι το δραστικό μέγεθος πληθυσμού του mtDNA (υποθέτοντας ίση αναλογία φύλων) είναι το 1/4 σε σύγκριση με το nDNA (Birky *et al.*, 1983), έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση εξαιτίας των φαινομένων της γενετικής παρέκκλισης και έτσι το καθιστά πιο ικανό στην αποκάλυψη ειδικών πληθυσμιακών δεικτών. Από φυλογενετική σκοπιά, η έλλειψη ανασυνδυασμού σημαίνει ότι οι δείκτες του mtDNA μπορεί να χρησιμοποιηθούν στο να διερευνηθεί εάν τα άτομα των πληθυσμών είναι οργανωμένα σε μητριαρχικές σειρές. Οι λόγοι αυτοί καθιέρωσαν το mtDNA ως το δημοφιλέστερο γενετικό υλικό για τη μελέτη της δομής των πληθυσμών, της γονιδιακής ροής, των ζωνών υβριδισμού, της βιογεωγραφίας και των φυλογενετικών σχέσεων σε ενδοειδικό και διαειδικό επίπεδο (Moritz *et al.*, 1987).

Οι πρώτες έρευνες της ποικιλότητας του mtDNA απαιτούσαν μεγάλες ποσότητες ιστού και χρησιμοποιούσαν χρονοβόρα πρωτόκολλα, ενώ ο αριθμός των ατόμων που εξετάζονταν ήταν περιορισμένος και συχνά ανεπαρκής για αξιόπιστες πληθυσμιακές μελέτες. Η χρησιμοποίηση κατάλληλων ανιχνευτών του mtDNA και πρόσφατα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία επιτρέπει την ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών του DNA, έκανε την εξέταση της ποικιλότητας του mtDNA σημαντικά ευκολότερη και γρηγορότερη.

Σήμερα υπάρχουν διαθέσιμοι αρκετοί "παγκόσμιοι" εκκινητές οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ικανοποιητικά για την ενίσχυση διαφόρων περιοχών του mtDNA (Kocher *et al.*, 1989; Cronin *et al.*, 1993). Τα ενισχυμένα αυτά τμήματα του DNA μπορούν στη συνέχεια να μελετηθούν είτε με τη βοήθεια των ενζύμων περιορισμού και την ανάλυση των RFLPs, είτε με την εύρεση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας τους (Sequencing = Ανάλυση πρωτοδιάταξης του μορίου του DNA).

3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ανάλυσης DNA (mtDNA-nDNA)

Στον Πίνακα 1 δίνονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της ανάλυσης των ισοενζύμων και του DNA .

Πίνακας 1. Σύγκριση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων της ανάλυσης των ισοενζυμικών και του DNA

Ισοενζυμική Ανάλυση	
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none"> • Η ανάλυση των δειγμάτων είναι γρήγορη • Σχετικά χαμηλό κόστος χημικών • Η εκμάθηση τεχνικών είναι εύκολη • Αναλύονται πρωτεΐνες με γνωστή λειτουργία • Πληθώρα αποτελεσμάτων για πολλά είδη υπάρχουν στη βιβλιογραφία 	<ul style="list-style-type: none"> • Απαιτείται συλλογή και αποθήκευση (απαιτούνται νωπά ή καταψυγμένα δείγματα) • Απαιτείται η συλλογή πολλών ιστών και σε μεγάλες σχετικά ποσότητες με αποτέλεσμα να χρειάζεται να θανατωθούν τα άτομα • Συνήθως ανιχνεύεται μικρός αριθμός αλληλομόρφων για κάθε γονιδιακό τόπο • Μπορεί να μελετηθούν μόνο πρωτεΐνες που χρωματίζονται με ιστοχημικές χρώσεις • Ορισμένοι γονιδιακοί τόποι υπόκεινται στη δράση της φυσικής επιλογής • Η ανάλυση των προτύπων μπορεί να είναι δυσχερής, ειδικά σε περιπτώσεις πολυπλοκειδίας • Οι δυνατότητες της μεθοδολογίας είναι περιορισμένες (μικρό εύρος δυνατοτήτων)
Ανάλυση του DNA	
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none"> • Μόνο ένας ιστός ή αίμα και σε μικρή σχετικά ποσότητα είναι αρκετός • Η ενίσχυση με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) ελαχιστοποιεί τις ποσότητες ιστών που απαιτούνται και επιτρέπει την εξέταση λεπτών καθώς και μουσειακών δειγμάτων • Το υλικό διατηρείται και αποθηκεύεται πιο εύκολα • Αρκετοί γονιδιακοί τόποι έχουν περισσότερα αλληλόμορφα από αυτά που αποκαλύπτονται με την ενζυμική ανάλυση • Ορισμένοι γονιδιακοί τόποι δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ως εκ τούτου ενδέχεται να μην υπόκεινται στη δράση της επιλογής • Μεταλλάξεις που δεν έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι ανιχνεύσιμες • Πληθώρα από πιθανούς γενετικούς δείκτες μπορεί να μελετηθεί • Δεν απαιτείται πάντοτε ο θάνατος των ατόμων 	<ul style="list-style-type: none"> • Η εφαρμογή της μεθοδολογίας είναι σχετικά αργή και συνεπάγεται υψηλό κόστος • Η εκμάθηση των μοριακών τεχνικών είναι δυσκολότερη • Στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμος μικρός αριθμός συγκριτικών πληροφοριών

Δ. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

1. Τεχνική PCR

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου) από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος (Saiki *et al.*, 1988). Στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένου, δίκλωνου DNA και κυρίως στην αρχή ότι ο χρόνος επανασύνδεσης εξαρτάται από την συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμβαλλόμενων συμπληρωματικών αλυσίδων. Έτσι από αρχική ποσότητα δείγματος DNA μη ανιχνεύσιμο με κλασσικές τεχνικές υβριδισμού το DNA ενισχύεται με την PCR ώστε να γίνεται εύκολα ανιχνεύσιμο.

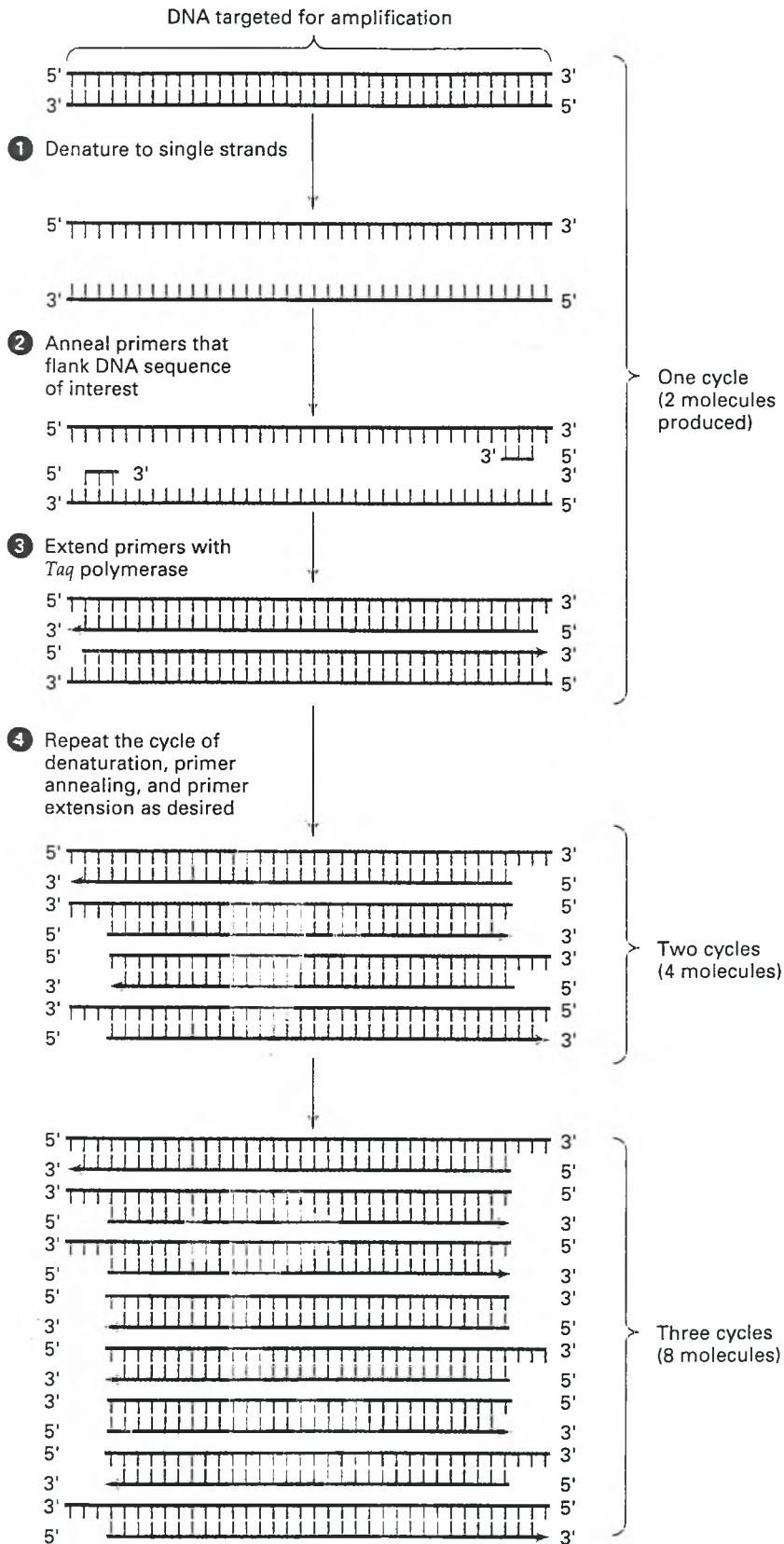
Το 1993, ο Dr K. Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας, για την καθοριστική συμβολή του στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Η αρχή της λειτουργίας της μεθόδου (Mullis *et al.*, 1987) στηρίζεται στη χρήση:

1. Ειδικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase) που έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο, *Thermus aquaticus*, και είναι θερμοσταθερή, διατηρώντας τη δραστηκότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95° C.
2. Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15 - 30 βάσεων) τα οποία ονομάζονται εκκινητικά μόρια ή οδηγοί (primers).
3. Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs).
4. Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂
5. Ειδικού διαλύματος για την Taq πολυμεράση.
6. Μικρής ποσότητας DNA, που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους (Εικ. 2). Κάθε κύκλος της PCR αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου και πραγματοποιείται σε στάδια-φάσεις. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA-στόχου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο της θερμικής επαναδιάταξης του DNA, οπότε τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια συνδέονται με τις δύο

The polymerase chain reaction (PCR) for selective amplification of DNA sequences.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση μιας πλήρους σειράς κύκλων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Russell 1992)

συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου, δηλαδή τις απλές αλυσίδες DNA. Κατά το τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση DNA (πολυμερισμός), με το διπλασιασμό του DNA - στόχου, παρουσία θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων, οπότε οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητικών μορίων και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Η σύνθεση DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5'→3'. Το σύνολο των τριών φάσεων α) μετουσίωσης-αποδιάταξης (denaturation), β) υβριδισμού-πρόσδεσης των εκκινητών επί των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου (annealing) και γ) επέκτασης (extension) -σύνθεσης, πολυμερισμού (polymerisation) των προσδεδμένων εκκινητών αποτελεί ένα κύκλο της αντίδρασης PCR. Στο τέλος της διαδικασίας, από μία δίκλωνη γονική έλικα DNA δημιουργούνται δύο θυγατρικές δίκλωνες έλικες DNA, στον αμέσως επόμενο κύκλο οι δίκλωνες έλικες DNA γίνονται 4 (δύο του αρχικού υποστρώματος και δύο αντίγραφα) που αποτελούν πρότυπα καλούπια για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA-στόχου στον επόμενο κύκλο. Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι θα αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2^n όπου η ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης. Ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται για 25-40 κύκλους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA-στόχου εκατομμύρια φορές σε λίγες ώρες. Μάλιστα, εάν 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} (1.099.511.627.776) μονόκλωνων συμπληρωματικών αντιγράφων DNA-στόχου (Πίν. 2).

Ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον ιδανικό, συνεπάγεται αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αριθμός αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη ανίχνευση του DNA-στόχου. Ας σημειωθεί ότι όταν ο αριθμός των μορίων του στόχου σε ένα βιολογικό υλικό είναι 10^5 απαιτούνται 30 κύκλοι ενώ όταν είναι 10^4 απαιτούνται 35 κύκλοι ενώ όταν είναι 10^3 ή μικρότερος απαιτούνται 40-45 κύκλοι (Mullis *et al.*, 1987).

Πίνακας 2. Ενίσχυση του DNA στόχου μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

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

Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR, σε ζεύγη βάσεων ισούται με το άθροισμα των βάσεων του ζεύγους των εκκινητών και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA-στόχου που επεκτείνεται.

Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία στάδια αποδιάταξης, υβριδισμού, πολυμερισμού. Η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασίες 92-95° C για 30 sec, ο υβριδισμός στους 50-65° C για 1-2 min ανάλογα με την περιεκτικότητα των οδηγών σε A/T, G/C και ο πολυμερισμός στους 70-78° C για 1-2 min. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών και είναι ταχύτερες, ώστε αυξομειώσεις της τάξεως των 40°C λαμβάνουν χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό (Mullis *et al.*, 1987).

Για την επέκταση του DNA-στόχου απαιτούνται 100 ng ολικού DNA. Η αλληλουχία του DNA-στόχου πρέπει να είναι ακέραια για να επιτευχθεί η αντιγραφή της. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA-στόχου μπορεί να είναι άγνωστη, αρκεί να είναι γνωστές οι αλληλουχίες των δύο άκρων του DNA-στόχου ώστε να σχεδιασθούν τα απαραίτητα για τη μέθοδο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές.

Ο σχεδιασμός και η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών γίνεται σύμφωνα με τις σταθερές περιοχές του DNA-στόχου. Οι οδηγοί πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή το 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (melting temperature, T_m). Η θερμοκρασία τήξεως δίκλωνου DNA είναι συνάρτηση της αλληλουχίας του μορίου και κατά προσέγγιση υπολογίζεται με βάση την περιεκτικότητα του μορίου σε πουρίνες και πυριμιδίνες ως εξής (Mullis *et al.*, 1987):

$$T_m = (4 \times \text{αριθμός βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός βάσεων A+T}).$$

Επιθυμητές T_m κυμαίνονται μεταξύ 55-65° C. Μεγάλο ρόλο στην τεχνική PCR παίζει και η θερμοκρασία επαναδιάταξης T_a (annealing temperature) των εκκινητικών μορίων. Η T_a είναι κατά κανόνα 5-10° C χαμηλότερη της T_m . Η παρασκευή των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων γίνεται σε αυτόματες συσκευές σύνθεσης DNA.

2. Χαρακτηριστικά της τεχνικής PCR

Η ευαισθησία της τεχνικής PCR είναι μεγάλη. Με ραδιενεργό σήμανση του μορίου ανιχνευτή/probe είναι δυνατή η ανίχνευση έως 1 pg DNA. Με την τεχνική της επανεντοπισμένης PCR (nested PCR), η ευαισθησία αυξάνεται στο 1 fg. Στην τεχνική αυτή 1-2 μl του προϊόντος της PCR, υποβάλλονται σε 2^η PCR με νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων, εσωτερικό των αρχικών (inner primers), ώστε 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 προϊόντος HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) σε 1×10^6 κύτταρα.

Μεγάλη είναι η ευαισθησία της τεχνικής PCR και στις μολύνσεις. Πιθανή επιμόλυνση της PCR μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η επιμόλυνση μπορεί να προκληθεί από αιωρούμενο DNA στον εργαστηριακό χώρο. Προς αποφυγή των επιμολύνσεων, η προετοιμασία των χώρων εκτέλεσης της τεχνικής πρέπει να είναι σχολαστική. Για τη μείωση των πιθανοτήτων επιμολύνσεων συνιστάται α) χρήση διαφορετικών χώρων επεξεργασίας των δειγμάτων και διεξαγωγής των αντιδράσεων, κυρίως σε περιπτώσεις διαδοχικών PCR, β) χρησιμοποίηση διαφορετικών συσκευών καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood) για την απομόνωση του DNA και την προετοιμασία των αντιδραστηρίων, γ) αποστείρωση αντιδραστηρίων και σωληναρίων, προσεκτικός καθαρισμός πιπετών με αιθανόλη και έκθεση του χώρου ή των χώρων εργασίας σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μετά το τέλος της εργασίας για 12 τουλάχιστον ώρες. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται πολλοί μάρτυρες και να μην αξιολογείται ένα δείγμα σαν θετικό εάν δεν επαληθευθεί και επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα 2 φορές τουλάχιστον κατά προτίμηση με 2 διαφορετικά ζεύγη οδηγών.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι η επιλογή του προς επέκταση στόχου, όπως και ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και ανιχνευτών κυρίως σε περιπτώσεις ανίχνευσης ποικιλιών ιών όπως ο HIV ή γονιδιακών περιοχών εντόνων ανακατανομών και μεταλλαξιμότητας, όπως διαφόρων εύθραυστων αυτοσωμικών περιοχών, των ψευδοσωματικών περιοχών του Υ

χρωμοσώματος κ.α. Σε περίπτωση θετικών δειγμάτων, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα από τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, όπως συνηθίζεται για την επέκταση διαφορετικών γονιδιακών περιοχών, τότε η ευαισθησία και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι δυνατόν να υπερβεί το 97%.

3. Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι γρήγορη, απλή, απαιτεί ελάχιστες ποσότητες ιστού και όχι τη θανάτωση του ζώου. Έτσι, λείπια από ζωντανό ψάρι παρέχουν αρκετή ποσότητα DNA ώστε δεν είναι απαραίτητο να θανατωθεί το ψάρι για τις αναλύσεις μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA. Η τεχνική της PCR έχει τη δυνατότητα εφαρμογής σε DNA το οποίο εξάγεται από στεγνό ιστό προσκολλημένο σε ιστορικές συλλογές ωτολίθων, καθιστώντας έτσι δυνατό τον προσδιορισμό γενετικών δεσμών από πληθυσμούς του παρελθόντος.

Η σημασία της μεθόδου είναι τεράστια και το φάσμα εφαρμογών της τεράστιο (Βιοϊατρική, Βιοτεχνολογία, Βιολογικός έλεγχος περιβάλλοντος). Η διεθνοποίηση του όρου PCR σε σχεδόν ισότιμο των όρων DNA, RNA έρχεται να επιβεβαιώσει τη σημασία της τεχνικής αυτής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό υλικό

Το υλικό που μελετήθηκε ήταν πληθυσμοί του είδους *Pagellus erythrinus* της οικογένειας Sparidae. Η οικογένεια Sparidae περιλαμβάνει 29 γένη με πληθώρα ειδών. Στις ελληνικές θάλασσες ζουν συνολικά 21 είδη, που ανήκουν σε 9 γένη. Ένα εξ αυτών είναι και το κοινό λιθρίνι *Pagellus erythrinus* (Linnaeus 1758).

Η συστηματική κατάταξη για την οικογένεια και το είδος *Pagellus erythrinus* έχει ως εξής:

Κλάση: Osteichthyes

Μεσοκλάση: Teleostei

Υπερτάξη: Acanthopterygii

Τάξη: Perciformes

Υποτάξη: Percoides

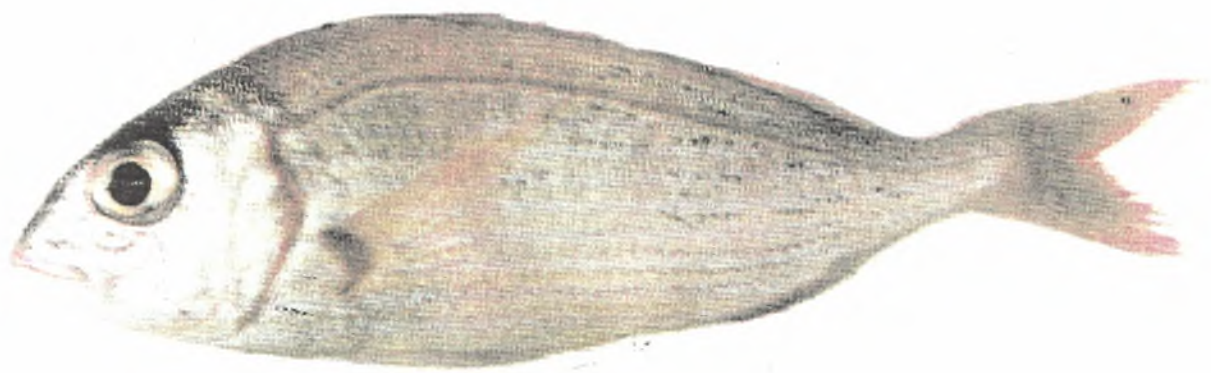
Οικογένεια: Sparidae

Είδος: *Pagellus erythrinus*

Το λιθρίνι έχει σώμα επίμηκες, ελαφρά ωοειδές, συμπιεσμένο. Το χρώμα του είναι κόκκινο λαμπερό, τονισμένο συχνά με μικρά μπλε στίγματα στο πάνω μέρος του σώματος. Όταν είναι τρομαγμένο εμφανίζει κάθετες κόκκινες ταινίες πάνω στο σώμα του. Στη βάση των πλευρικών πτερυγίων έχει μια κόκκινη κηλίδα. Μερικές φορές υπάρχει μια σκούρα κόκκινη κηλίδα στη βάση των τελευταίων ακτίων του ραχιαίου πτερυγίου. Το μήκος του φτάνει τα 50 cm (Εικ. 3).

Το λιθρίνι απαντά σε βυθούς βραχώδεις, αμμώδεις, χαλικώδεις και λασπώδεις, σε βάθη 10 έως 30 m το καλοκαίρι και μέχρι 200 m το χειμώνα. Είναι κοπαδιάρικο ψάρι. Προτιμά τις τραγάνες και τις ξέρες. Είναι παμφάγο, κυρίως όμως σαρκοφάγο. Τρέφεται με βενθικά ασπόνδυλα και μικρά ψάρια. Ψαρεύεται σε μεγάλες ποσότητες από τις μηχανότρατες στις νυχτερινές ιδίως καλάδες. Επίσης τη νύχτα με ψιλό παραγάδι, σε βάθη γύρω από τις 20 οργιές

και με δόλωμα καλαμάρι, γαρίδα, караβίδα, αθερίνα. Αναπαράγεται από την άνοιξη μέχρι το φθινόπωρο, ανάλογα με τις υδρολογικές συνθήκες της περιοχής. Στη Νότια Μεσόγειο είναι δυνατές δύο περίοδοι αναπαραγωγής. Βασικά είναι ερμαφρόδιτο πρωτογύναιο ψάρι. Είναι έτοιμο για αναπαραγωγή τον πρώτο ή δεύτερο χρόνο. Γεννά 31.000 έως 151.000 αυγά.



Εικόνα 3. Λιθρίνι, *Pagellus erythrinus*, Linnaeus 1758

Γεωγραφικά συναντάται στον τροπικό Ατλαντικό μέχρι τη Νορβηγία. Είναι είδος πολύ κοινό στη Μεσόγειο και τις ελληνικές θάλασσες. Σπανίζει στη Μαύρη Θάλασσα. Το κρέας του είναι άσπρο και εξαιρετικής ποιότητας.

Δειγματοληψία

Το υλικό στο συγκεκριμένο πείραμα προέρχεται από δύο πληθυσμούς . Ο πρώτος πληθυσμός 30 ατόμων αλιεύτηκε στον Παγασητικό Κόλπο. Ο δεύτερος πληθυσμός άλλων 30 ατόμων προέρχεται από το Αιγαίο και συγκεκριμένα από την περιοχή του Πλατανιά. Οι συλλογές των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν την άνοιξη του 1999. Τα ψάρια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο μέσα σε πάγο. Για την ισοενζυμική ανάλυση αφαιρέθηκαν δείγματα μυός, συκωτιού και ματιών. Πριν από την ηλεκτροφόρηση οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε ίσο όγκο αποσταγμένου νερού και φυγοκεντρήθηκαν. Το

υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση. Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μυός. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους και οι διεργασίες προετοιμασίας τους πραγματοποιήθηκαν μέσα σε πάγο.

A. ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ

1. Ισοενζυμική ανάλυση

- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αμύλου

Η παρασκευή της πηκτής αμύλου σε οριζόντιες πλάκες έγινε με τη χρησιμοποίηση υδρολυμένου αμύλου και του κατάλληλου για κάθε ένζυμο ρυθμιστικού διαλύματος. Η ποσότητα του αμύλου που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 10% της ποσότητας του ρυθμιστικού διαλύματος.

Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονταν 40 gr αμύλου και 400 ml ρυθμιστικού διαλύματος και στη συνέχεια θερμαίνονταν πάνω από φλόγα ώστε να περνάει από όλο τον πάτο και με συνεχή έντονη ανάδευση με το χέρι. Όταν το αιώρημα έφθανε σε σημείο βρασμού, σταματούσε η θέρμανση και ακολουθούσε απαέρωση σε αντλία κενού για λιγότερο από 1min. Έπειτα, το περιεχόμενο αδειάζοταν σε πλαίσιο διαστάσεων 20x21x1 cm και αφού παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min, αποθηκευόταν, σκεπασμένο με πλαστικό για να μη στεγνώσει, στο ψυγείο για τουλάχιστον 2h.

Πριν χρησιμοποιηθεί, η πηκτή κοβόταν γύρω - γύρω με μαχαίρι. Με ένα χάρακα κοβόταν η πηκτή στο 1/3. Έπειτα κομμάτια διηθητικού χαρτιού Wattman No 3, αφού είχαν προηγουμένως εμποτιστεί στο ομογενοποιημένο μείγμα και στεγνωθεί λίγο στο διηθητικό χαρτί τοποθετούνταν στην τομή. Στο τέλος, ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού εμποτιζόταν σε διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης για τον έλεγχο της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή στη συνέχεια προσαρμοζόταν ανάμεσα στα δοχεία των ηλεκτροδίων, τα οποία έφεραν το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, καλύπτονταν μέχρι ενός ορισμένου σημείου από κάθε πλευρά με Wettex, εμποτισμένα στο ρυθμιστικό διάλυμα των ηλεκτροδίων και σκεπαζόταν με πλαστική μεμβράνη καθώς και με μεταλλικό δοχείο με πάγο ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία σε όσο το δυνατόν χαμηλότερα επίπεδα.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή κοβόταν οριζόντια με λεπτό ανοξείδωτο σύρμα. Η ανίχνευση των ζωνών ενζυμικής δράσης γινόταν με κατάλληλη ιστοχημική χρώση. Κάθε κομμάτι πηκτής επωαζόταν στους 37° C σε κατάλληλο διάλυμα χρώσης που περιείχε: α) ρυθμιστικό διάλυμα, β) το

υπόστρωμα του ενζύμου, γ) κάποιο συνένζυμο και δ) κατάλληλο χρωμογόνο. Μετά τη χρώση οι πηκτές εμβαπτίζονταν σε διάλυμα οξικού οξέος 5%. Σε ορισμένες περιπτώσεις η μονιμοποίηση γινόταν σε διάλυμα μεθανόλης / οξικού οξέος / νερού σε αναλογία 4V / 1V / 5V. Στη συνέχεια, αφού οι πηκτές παρέμεναν στο διάλυμα του οξικού οξέος για 24h εμβαπτίζονταν σε διάλυμα 10% γλυκερόλης, στο οποίο παρέμεναν για άλλες 12h. Τέλος, οι πηκτές τοποθετούνταν πάνω σε γυάλινο πλαίσιο, ανάμεσα σε δύο ειδικού τύπου ζελατίνες και επωάζονταν στους 37° C για δύο ημέρες ώστε να αφυδατωθούν και να μείνει αποτυπωμένο το πρότυπο του ενζύμου.

2. Συστήματα ηλεκτροφόρησης ενζύμων

Τα ρυθμιστικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφορητική μελέτη των διαφόρων ενζύμων, για την παρασκευή των πηκτών και των διαλυμάτων των ηλεκτροδίων ήταν τα ακόλουθα:

1. Ρυθμιστικό σύστημα TCB

α. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (Taggart *et al.*, 1981)

0,3 M Βορικό οξύ

0,1 M LiOH

σε 1 lt H₂O, pH = 8,6.

β. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής

0,076 M Tris

0,005 M Κιτρικό οξύ

0,015 M Βορικό οξύ

0,005 M LiOH

σε 1 lt H₂O, pH = 8,6

2. Ρυθμιστικό σύστημα TP

α. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (Guyomard & Krieg, 1983)

0,1 M Tris

σε 1 lt H₂O, pH = 7,4 (το pH ρυθμιζόταν με NaH₂PO₄)

β. Το ρυθμιστικό διάλυμα της πηκτής παρασκευαζόταν με αραιώση 10 φορές του διαλύματος των ηλεκτροδίων.

3. Ρυθμιστικό σύστημα AM

α. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (Taggart *et al.*, 1981)

0.04 M Κιτρικό οξύ

σε 1 lt H₂O

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής

0,002 M Κιτρικό οξύ

σε 1 lt H₂O

Το pH των δύο διαλυμάτων ρυθμιζόταν σε 6,1 με N-(3-αμινοπροπυλ)-μορφολίνη. Στην αρχή παρασκευαζόταν το διάλυμα του κιτρικού οξέος και κατόπιν λίγο πριν χρησιμοποιηθεί ρυθμιζόταν το pH.

3. Ενζυμικά συστήματα

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν 13 ενζυμικά συστήματα σε 23 γονιδιακούς τόπους. Τα ενζυμικά αυτά συστήματα και η γενετική βάση αυτών είναι γνωστά αφού έχουν μελετηθεί από προηγούμενους ερευνητές. Παρακάτω δίνονται πληροφορίες για κάθε ένα από αυτά τα συστήματα.

1. Εστεράσες (EST)

Αυτά τα μονομερή ένζυμα αποτελούν μια ετερογενή ομάδα υδρολασών που ταξινομούνται σε διάφορες υποομάδες ανάλογα με την εξειδίκευσή τους σε υπόστρωμα, την ιστοειδίκευσή τους και την ευαισθησία τους σε αναστολείς. Καταλύουν την παρακάτω γενική αντίδραση:



2. Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AAT ή GOT)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει με συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη την αντίδραση:

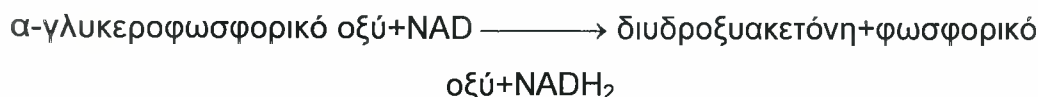
ασπαρτικό οξύ + α-κετογλουταρικό οξύ \longrightarrow οξαλοξικό οξύ + γλουταμινικό οξύ.

Έχουν περιγραφεί δύο διαφορετικές μορφές του ενζύμου, μία μιτοχονδριακή (mAAT) και μία κυτταροπλασματική (sAAT). Η m μορφή μετακινείται προς την κάθοδο σε ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερο pH, ενώ η s μορφή προς την άνοδο (Davidson *et al.*, 1970; Taggart *et al.*, 1981). Στο μυϊκό

ιστό με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο αναφέρεται η έκφραση ενός διπλασιασμένου γονιδιακού τόπου AAT-1, 2, ενώ στο συκώτι εκφράζεται ακόμη ένας γονιδιακός τόπος ο AAT-3 (Allendorf *et al.*, 1977; Taggart *et al.*, 1981).

3. α-γλυκεροφωσφορική αφυδρογονάση (AGP ή αGPDH ή G3PDH)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση:



Η AGP εκφράζεται στον μυϊκό ιστό.

4. Μαλικό ένζυμο (ME)

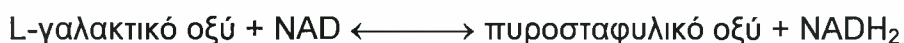
Αυτό το τετραμερές ένζυμο καταλύει την αντίδραση:



Στα ψάρια (Skorkowski 1988), έχουν αναφερθεί ως και τρεις γονιδιακοί τόποι που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή διαφορετικών μορφών του ενζύμου που συναντώνται στο κυτταρόπλασμα ή στα μιτοχόνδρια και που έχουν ως συνένζυμο το NAD ή το NADP. Επίσης, το ένζυμο παρουσιάζει ποικιλομορφία στη δομή του, από μονομερές μέχρι οκταμερές. Το ME εκφράζεται στο μυϊκό ιστό.

5. Γαλακτική αφυδρογονάση LDH

Είναι τετραμερές ένζυμο που καταλύει την αντίδραση:



Τα ισοένζυμα της γαλακτικής αφυδρογονάσης αποτελούν ένα από τα καλύτερα μελετημένα γονιδιακά συστήματα στα σπονδυλωτά. Όλα τα σπονδυλωτά εμφανίζουν δύο γονιδιακούς τόπους, τους A και B. Οι υπομονάδες του γονιδιακού τόπου A εκφράζονται στο μυ και παρουσιάζουν αξιόλογη ομοιότητα σε όλα τα είδη. Στενή ομολογία υπάρχει και στα προϊόντα του γονιδιακού τόπου B (Wilson *et al.*, 1964), τα οποία εκφράζονται κυρίως στο συκώτι. Στα περισσότερα ψάρια υπάρχει ένας γονιδιακός τόπος C που εκφράζεται είτε στο μάτι αποκλειστικά και παρουσιάζει ισχυρά ανοδική κινητικότητα, είτε στο συκώτι και το προϊόν του κινείται προς την κάθοδο (Shaklee *et al.*, 1973). Τα προϊόντα των τριών γονιδιακών τόπων πολύ συχνά

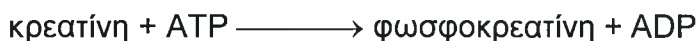
(αλλά όχι πάντα) συνδυάζονται, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα πρότυπο πολλών ζωνών.

Η υπόθεση που έχει προταθεί (Shaklee *et al.*, 1973: Markert *et al.*, 1975) για την εξέλιξη αυτής της οικογένειας γονιδίων είναι: ο γονιδιακός τόπος A είναι ο αρχέγονος (ή τουλάχιστον ο πιο όμοιος στον αρχέγονο) και μετά από διπλασιασμό σε κάποιο πρόγονο των σπονδυλωτών δημιουργήθηκε ο τόπος B. Στη συνέχεια, και πριν την εμφάνιση των οστεϊχθύων, ο γονιδιακός τόπος B διπλασιάστηκε, οπότε και προέκυψε ο γονιδιακός τόπος C, που η δράση του εξειδικεύτηκε αργότερα στο συκώτι ή στο μάτι των ψαριών. Η υπόθεση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι σε πολλές ιδιότητες (ανοσολογικές, κινητικές), ο τόπος C μοιάζει με τον B (Rehse & Davidson, 1986). Ο γονιδιακός τόπος C των θηλαστικών και των πουλιών έχει ανεξάρτητη προέλευση (Matson 1989, Goldberg 1990).

Ένα διαφορετικό εξελικτικό μοντέλο βασίζεται στα αποτελέσματα των Li *et al.*, 1983. Η μελέτη της πρωτοταγούς δομής προϊόντων και των τριών γονιδιακών τόπων σε ανώτερα σπονδυλωτά αποκάλυψε ότι οι υπομονάδες A και B μοιάζουν μεταξύ τους περισσότερο από ότι με τη C. Επίσης οι Baldwin & Lake, 1987 και οι Baldwin *et al.*, 1987 έδειξαν ότι ο μοναδικός γονιδιακός τόπος που εκφράζεται σε κατώτερα εξελικτικά "ψάρια" (lampreys) μοιάζει ανοσολογικά περισσότερο στον τόπο C παρά στους A ή B. Έτσι προτείνεται ότι ο αρχέγονος γονιδιακός τόπος είναι ο C.

6. Κρεατινική κινάση (CK)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει την αντίδραση:



Η CK των σπονδυλωτών παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την αργινική κινάση (AK) των ασπονδύλων. Ανοσολογικές μελέτες και η ομοιότητα των ενεργών θέσεων των δύο ενζύμων οδηγούν στην υπόθεση ότι η CK προήλθε από την AK με διπλασιασμό. Η CK εκφράζεται στο μυϊκό ιστό και το μάτι.

7. Φωσφογλυκομουτάση (PGM)

Η φωσφογλυκομουτάση είναι ένζυμο της γλυκολυτικής οδού και καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση:



Είναι μονομερές ένζυμο το οποίο κωδικοποιείται από ένα γονιδιακό τόπο. Η PGM εκφράζεται στο μυϊκό ιστό.

8. Γλυκοζοφωσφορική ισομεράση ή φωσφογλυκοϊσομεράση (PGI)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



Η PGI εκφράζεται στο μυϊκό ιστό και κωδικοποιείται από ένα γονιδιακό τόπο.

9. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

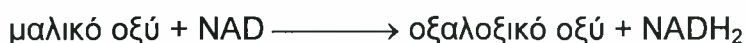
Είναι διμερές ένζυμο το οποίο καταλύει τη μετατροπή των ριζών του υπεροξειδίου (που παράγεται κατά την καταστροφή του DNA) και είναι ιδιαίτερα επιβλαβές για τα κύτταρα σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Σε ένα επόμενο στάδιο, το ένζυμο μετατρέπει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό με τη βοήθεια του ενζύμου καταλάση. Η SOD εκφράζεται στο συκώτι.

10. Οξειδάση της υποξανθίνης (XO)

Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση οξείδωσης της υποξανθίνης προς ξανθίνη και της ξανθίνης προς ουρικό οξύ (όπως και η XDH), μόνο που δεν χρειάζεται ως συνένζυμο το NAD επειδή είναι φλαβινοένζυμο. Η XO εκφράζεται στο συκώτι.

11. Μαλική αφυδρογονάση (MDH)

Αποτελεί διμερές ένζυμο που καταλύει την αντίδραση του κύκλου του κιτρικού οξέος:



Συναντάται τόσο στα ασπόνδυλα όσο και στα σπονδυλωτά σε δύο βασικές μορφές: μια κυτταροπλασματική (*s-MDH*) και μια μιτοχονδριακή (*m-MDH*). Αυτές οι δύο μορφές διαφέρουν στην ηλεκτροφορητική κινητικότητά τους, στην αμινοξική αλληλουχία τους, στις αντιγονικές ιδιότητές τους, στην κινητικότητά τους κατά την αντίδραση και κωδικοποιούνται από διαφορετικούς γονιδιακούς τόπους (Whitt 1970).

Αν και στα ερπετά, στα πουλιά και στα θηλαστικά η κυτταροπλασματική μορφή εμφανίζεται ως προϊόν ενός γονιδιακού τόπου, στα περισσότερα ψάρια

και αμφίβια κωδικοποιείται από δύο γονιδιακούς τόπους, τους *sMDH-A* και *sMDH-B* (Schwantes & Schwantes, 1982). Οι δύο αυτοί γονιδιακοί τόποι παρουσιάζουν ιστοειδίκευση, με τον *sMDH-A* να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς αλλά κυρίως στο συκώτι και τον *sMDH-B* στο μυ και αχνά σε άλλους ιστούς (Basaglia 1989). Μερικά είδη ψαριών εμφανίζουν περισσότερους γονιδιακούς τόπους ως αποτέλεσμα φαινομένων πολυπλοειδίας (Whitt 1970). Μελέτες στους τόπους αυτούς έχουν δείξει τη σημασία διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων (κυρίως της θερμοκρασίας) στη γονιδιακή ρύθμιση.

12. Αφυδρογονάση της υποξανθίνης (XDH)

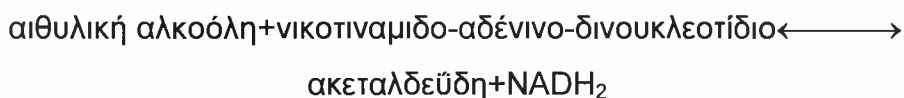
Το ένζυμο αυτό καταλύει τις αντιδράσεις:



Η XDH εκφράζεται στο συκώτι.

13. Αλκοολική δεϋδρογονάση ή αλκοολική αφυδρογονάση (ADH)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση:



Η ADH εκφράζεται στο συκώτι.

4. Ειδικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης κάθε ενζύμου, δηλαδή το ρυθμιστικό σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε, η αρχική τάση, η αρχική ένταση, η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης καθώς και ο ιστός όπου μελετήθηκε το κάθε ένζυμο, φαίνονται στον Πίνακα 3:

Πίνακας 3. Ειδικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης των ισοενζυμικών συστημάτων που μελετήθηκαν: ιστός και ρυθμιστικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκαν, αρχική τάση, αρχική ένταση και διάρκεια ηλεκτροφόρησης.

Ένζυμο	Ιστός	Ρυθ. Σύστ.	Τάση (V)	Ένταση (mA)	Διάρκεια (h)
<i>EST</i>	Σ	TP	160	100	6
<i>AAT</i>	M, Σ	TP	160	100	6
<i>AGP</i>	M	TP	160	100	6
<i>ME</i>	M	TP	160	100	6
<i>LDH</i>	M, Σ, E	TCB	180	110	16
<i>CK</i>	M, E	TCB	180	110	16
<i>PGM</i>	M	TCB	180	110	17
<i>PGI</i>	M	TCB	180	110	17
<i>SOD</i>	Σ	TCB	180	110	16
<i>XO</i>	Σ	TCB	180	110	16
<i>MDH</i>	Σ	AM	300	120	4
<i>XDH</i>	Σ	AM	300	120	4
<i>ADH</i>	Σ	AM	300	120	4

Σ = συκώτι, M = μυϊκός ιστός, E = μάτι.

5. Ειδικές συνθήκες χρώσης για κάθε ενζυμικό σύστημα

1. Εστεράσες (*EST*)

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα (Allendorf *et al.*, 1977).

150 ml φωσφορικού διαλύματος (pH = 6,2)

188 ml 0,1 N NaOH

13,6 gr KH_2PO_4

812 ml H_2O

5 ml α-οξικού ναφθυλεστέρα (1 gr / 50 ml ακετόνης + 50 ml H_2O)

5 ml β-οξικού ναφθυλεστέρα (1 gr / 100 ml ακετόνης)

4 ml FBBS 1%

4 ml FBRR 1%

Ακολουθούσε επώαση στους 37° C για 1 h.

2. Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AAT ή GOT)

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα (Harris & Hopkinson, 1976).

- 70 ml διαλύματος 0,2 M Tris - HCl (pH = 8,0)
- 30 ml H₂O
- 50 ml διαλύματος NaOH 0,1 M
- 200 mg α-κετογλουταρικό οξύ
- 400 mg L-ασπαρτικό οξύ
- 5 mg φωσφορική πυριδοξάλη

Μετά από επώαση στους 37° C για 30 min, ακολουθούσε προσθήκη 15 ml διαλύματος 0,03 M της χρωστικής FBBB (Fast Blue BB) και η επώαση συνεχιζόταν για άλλη 1 h.

3. α-γλυκεροφωσφορική αφυδρογονάση (αGPDH / G3PDH)

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα αντίδρασης (Allendorf *et al.*, 1977).

- 150 ml διαλύματος Tris - HCl 0,2 M (pH = 8,0)
- 1,5 gr DL-α γλυκεροφωσφορικό άλας
- 5 mg NAD
- 3 ml διαλύματος 0,012 M MTT
- 2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθούσε επώαση στους 37° C για 2 h.

4. Μαλικό ένζυμο (ME)

Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφηκε από τους Allendorf *et al.*, 1977.

- 100 ml διαλύματος 0,2 M Tris - HCl (pH = 8,0)
- 20 ml διαλύματος 0,2 M DL-μαλικού άλατος (pH = 7,0)
- 5 mg NADP
- 2 ml διαλύματος 0,5 M MgCl₂
- 3 ml διαλύματος 0,012 M MTT
- 2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι στους 37° C.

5. Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)

Μελετήθηκε στον μυϊκό ιστό, στο συκώτι και το μάτι.

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα (Harris & Hopkinson, 1976).

- 150 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCl pH = 8,0
- 2 ml άλατος νατρίου του DL-γαλακτικού οξέος
- 5 mg NAD
- 3 ml διαλύματος 0.012 M MTT
- 2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθούσε επώαση στους 37° C στο σκοτάδι για 30 min.

6. Κρεατινική κινάση (CK)

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επικάλυψης με άγαρ (Harris & Hopkinson, 1976).

Σε 50 ml διαλύματος 0,1 M Tris - HCl (pH = 7,0) θερμαινόταν 1 gr άγαρ μέχρι να διαλυθεί. Όταν η θερμοκρασία έπεφτε στους 56° C γινόταν προσθήκη των παρακάτω:

- 50 ml διαλύματος 0,1 M Tris - HCl (pH = 7,0)
- 100 mg γλυκόζης
- 100 mg φωσφοκρεατίνης
- 60 mg ADP
- 10 mg NADP
- 40 U αφυδρογονάσης της 6 φωσφορικής γλυκόζης
- 40 U εξοκινάσης
- 2 ml διαλύματος 0,5 M MgCl₂
- 3 ml διαλύματος 0,012 M MTT
- 2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι στους 37° C.

7. Φωσφογλυκομουτάση (PGM)

Διάλυμα:

- 25 ml 0,2 M Tris - HCl (pH = 8,0)
- 75 ml H₂O
- 1 gr άγαρ

Θερμαινόταν μέχρι να διαλυθεί το άγαρ. Όταν η θερμοκρασία έπεφτε στους 56° C ακολουθούσε προσθήκη του παρακάτω διαλύματος

- 9 ml διαλύματος 0,2 M Tris - HCl (pH = 8,0)
- 21 ml H₂O

- 1 gr 1-φωσφορικής γλυκόζης.
- 10 mg NADP
- 20 U αφυδρογονάσης της 6 φωσφορικής γλυκόζης
- 3 ml διαλύματος 0,5 M MgCl₂
- 3 ml διαλύματος 0,012 M MTT
- 2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι στους 37° C.

8. Φωσφογλυκοϊσομεράση (PGI)

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επικάλυψης με άγαρ (Harris & Hopkinson, 1976).

Σε 60 ml διαλύματος Tris - HCl (pH = 8,0) θερμαινόταν 1 gr άγαρ μέχρι να διαλυθεί. Διάλυμα 12 ml 0,05 M Tris - HCl (pH = 8,0) χωριζόταν στα δύο και ακολουθούσε προσθήκη στο ένα

100 mg 6-φωσφορικής φρουκτόζης.

και στο άλλο

- 20 U αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης
- 10 mg NADP
- 10 ml διαλύματος 0,5 M MgCl₂
- 3 ml διαλύματος 0,012 M MTT
- 2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Όταν η θερμοκρασία του πρώτου διαλύματος έπεφτε στους 56° C, αναμιγνυόταν τα 3 διαλύματα και καλυπτόταν η επιφάνεια της πηκτής. Ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι στους 37° C.

9. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφηκε από τους Harris & Hopkinson, 1976.

- 150 ml διαλύματος 0,2 M Tris - HCl (pH = 8,0)
- 3 ml διαλύματος 0,012 M MTT
- 2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Η πηκτική παρέμενε στο φως για μερικά λεπτά και ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι στους 37° C. Η διαδικασία επαναλαμβανόταν μέχρι να γίνουν εμφανείς οι ζώνες ενζυμικής δράσης.

10. Οξειδάση της ξανθίνης (XO)

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα (Guyomard & Krieg, 1983).

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris - HCl (pH = 8,0)

250 mg υποξανθίνη

Ζεσταίνουμε μέχρι να λιώσει. Στη συνέχεια προσθέτουμε

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθεί επώαση στους 37° C.

11. Μαλική αφυδρογονάση (MDH)

Χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη η μεθοδολογία που περιγράφηκε από τους Allendorf *et al.*, 1977.

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris - HCl, (pH = 8,0)

20 ml διαλύματος DL-malic acid (μαλικού άλατος, pH = 7,0)

5 mg NAD

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι στους 37° C.

12. Αφυδρογονάση της υποξανθίνης (XDH)

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα (Guyomard & Krieg, 1983).

Σε 150 ml διαλύματος 0,2 M Tris - HCl (pH = 8,0) θερμαινόταν μέχρι να διαλυθούν 150 mg υποξανθίνης. Όταν η θερμοκρασία έπεφτε κάτω από 50° C ακολουθούσε προσθήκη

10 mg NAD

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Το διάλυμα επωαζόταν στο σκοτάδι στους 37° C.

13. Αλκοολική αφυδρογονάση (ADH)

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα (Guyomard & Krieg, 1983).

10 mg NAD διαλύονταν σε 3 - 4 ml αιθανόλης και γινόταν ανάμιξη με

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris - HCl (pH = 8,0)

3 ml διαλύματος 0.012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι στους 37° C για 10-15 min.

B. ΤΕΧΝΙΚΗ RAPD

1. Εξαγωγή και απομόνωση του ολικού DNA

Η εξαγωγή και η απομόνωση του ολικού DNA που χρησιμοποιήθηκε, αποτελεί μια τροποποιημένη εφαρμογή του πρωτοκόλλου των *Cenis et al.*, 1993. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι:

1. Ομογενοποίηση σε εppendorfs μικρής ποσότητας ιστού, περίπου 0,1 gr (αποθηκευμένου στους -40° C) σε 300 μl buffer απομόνωσης (lysis buffer) (200 mM Tris - HCl, pH = 8,5, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS).
2. Μετά την ομογενοποίηση πρόσθεση άλλων 200 μl lysis.
3. Πρόσθεση 150 μl οξικού νατρίου 3 M, pH = 5,2.
4. Ανακίνηση κάθε δείγματος στο Vortex.
5. Τα εppendorfs στην κατάψυξη για 15 min.
6. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 min στους 4° C.
7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα εppendorfs.
8. Πρόσθεση σε κάθε εppendorf 1 ml φαινόλης.
9. Έντονη ανάδευση στο Vortex.
10. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 min στους 4° C.
11. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέα εppendorfs.
12. Πρόσθεση σε κάθε εppendorf 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφορμίου - ισοαμλικής αλκοόλης (24:1 v/v).
13. Ανάδευση στο Vortex.
14. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min στους 4° C.
15. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέα εppendorfs.
16. Πρόσθεση 1 ml χλωροφορμίου - ισοαμλικής αλκοόλης.
17. Ανάδευση στο Vortex.
18. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min στους 4° C.
19. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέα εppendorfs.
20. Πρόσθεση παγωμένης 99% αλκοόλης (~ 1 ml).
21. Ανάδευση στο Vortex.
22. Στους -20° C για όλη τη νύχτα στην κατάψυξη.
23. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 min στους 4° C.

24. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
25. Στέγνωμα του DNA στο φούρνο (~ 2-3 h στους 37° C).
26. Διάλυση του DNA σε 100 μl TE.
27. Συντήρηση στο ψυγείο.

2. Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν και συνθήκες ενίσχυσης των δεικτών RAPD

Κατά τη διάρκεια της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 11 εκκινητικά μόρια (primers) των οποίων η προμήθεια έγινε από την Operon Technologies, Alameda, CA, USA (Πίν. 4).

Οι τελικές συνθήκες ενίσχυσης αποφασίστηκαν ύστερα από δοκιμαστικά πειράματα για τον προσδιορισμό της επίδρασης των συγκεντρώσεων DNA, dNTPs, Mg, Taq πολυμεράσης καθώς και τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας συγκόλλησης των εκκινητών. Έτσι, τελικά οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε μίγμα αντίδρασης όγκου 30 μl που περιείχε 30 ng μητρικού DNA, μία μονάδα Taq πολυμεράσης, (Minotech, Crete), 3 μl buffer αντίδρασης (500 mM KCL, 200 mM Tris, pH = 8,4). Για τον έλεγχο της επιμόλυνσης των αντιδράσεων με ξένο DNA, πραγματοποιήθηκαν αρνητικοί έλεγχοι, παραλείποντας το DNA από το μίγμα αντίδρασης.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν 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.

Προκειμένου να προσδιορισθούν γενετικοί δείκτες που θα μπορούσαν να ταυτοποιήσουν ή να διαχωρίσουν τους πληθυσμούς ελέγχθηκαν 30 άτομα από κάθε πληθυσμό με όλους τους εκκινητές (OPA 02, 04, 08, 09, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19) σε πηκτή αγαρόζης και ακρυλαμίδης αντίστοιχα.

Για τον εντοπισμό συγκεκριμένων δεικτών RAPD μεταξύ των πληθυσμών, διαχωρίστηκαν 10 μl του μίγματος των προϊόντων ενίσχυσης σε μία πηκτή αγαρόζης 2%, που περιείχε 0,5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο σε buffer TAE (40 mM Tris / acetate, 1 mM EDTA).

Οι ζώνες εμφανίστηκαν σε συσκευή UV και φωτογραφήθηκαν. Μετά από άμεση παρατήρηση του προτύπου ζωνών στη συσκευή UV, οι φωτογραφίες

χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση των ενισχυμένων προϊόντων. Για τον καθορισμό γενετικών διαφορών μεταξύ των ειδών διαχωρίστηκαν άλλα 3 μl προϊόντων ενίσχυσης σε κάθετες πηκτές πολυακρυλαμίδης 6%, σε buffer TBE (0,89 M Tris, 0,89 M boric acid, 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 min, με 0,1% νιτρικό άργυρο για 10 min, καθαρίστηκαν 2 φορές με απεσταγμένο νερό και εμφανίστηκαν σε ένα αλκαλικό διάλυμα (1,5% NaOH, 0,1% NaBH₄ και 0,15% H₂O).

Προς αποφυγή προβλημάτων, όπως η μεταβολή του αριθμού και της έντασης των προϊόντων ενίσχυσης, εξαιτίας των συγκεντρώσεων των DNA, MgCl₂, Taq polymerase, 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 της μη ικανοποιητικής ενίσχυσης.

Πίνακας 4. Κωδικοί και αλληλουχίες των τυχαίων εκκινητών της *Operon* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Κωδικοί	Αλληλουχία (5' to 3')
OPA 02	TGCCGAGCTG
OPA 04	AATCGGGCTG
OPA 08	GTGACGTAGG
OPA 09	GGGTAACGCC
OPA 10	GTGATCGCAG
OPA 11	CAATCGCCGT
OPA 13	CAGCACCCAC
OPA 14	TCTGTGCTGG
OPA 17	GACCGCTTGT
OPA 18	AGGTGACCGT
OPA 19	CAAACGTCCG

Γ. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

Διαδικασία ανάλυσης του mtDNA

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία ανάλυσης του mtDNA.

1. Εξαγωγή μιτοχονδριακού DNA
2. Πολλαπλασιασμός τμημάτων του mtDNA με τη χρήση PCR
3. Πέψεις των τμημάτων που ενισχύθηκαν με την PCR με διάφορα ένζυμα περιορισμού
4. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

1. Εξαγωγή μιτοχονδριακού DNA

Η εξαγωγή του mtDNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Bernatchez *et al.*, 1988, μερικώς τροποποιημένο. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Ομογενοποίηση μικρής ποσότητας ιστού (0,3 gr μυ) (διατηρημένου στους -40° C) σε γυάλινο ομογενοποιητή με προσθήκη 2-3 ml STE.
2. Μεταφορά του ομογενοποιημένου σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης. Πλύση του ομογενοποιητή με 2-3 ml STE και μεταφορά στον πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης (επανάληψη 2-3 φορές έως τελικό όγκο 12 ml).
3. Φυγοκέντρηση στις 1.500 rpm για 5 min στους 4° C.
4. Μεταφορά του υπερκείμενου σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρησης. Φυγοκέντρηση στις 1.500 rpm για 5 min στους 4° C.
5. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρησης. Φυγοκέντρηση στις 1.500 rpm για 5 min στους 4° C.
6. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρησης. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 min στους 4° C.
7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.

8. Στο μιτοχονδριακό ίζημα: προσθήκη 0,1 ml (100 μl) διαλύματος ομογενοποίησης STE και ομογενοποίηση. Μεταφορά ομογενοποιημένου σε φιαλίδιο erpendorf.
9. Πρόσθεση 0,3 ml (300 λ) διαλύματος λύσης.
10. Πρόσθεση 40 μl διαλύματος 10% SDS.
11. Ανάδευση στο Vortex.
12. Επώαση σε υδατόλουτρο για 15 min στους 65° C.
13. Πρόσθεση 0,15 ml οξικό νάτριο.
14. Ανάδευση στο Vortex.
15. Επώαση στην κατάψυξη για 15 min.
16. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 min στους 4° C.
17. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorfs.
18. Πρόσθεση σε κάθε erpendorf 1 ml φαινόλης.
19. Έντονη ανάδευση στο Vortex.
20. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 min στους 4° C.
21. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέα erpendorfs.
22. Πρόσθεση σε κάθε erpendorf 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1 v/v).
23. Ανάδευση στο Vortex.
24. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min στους 4° C.
25. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέα erpendorfs.
26. Πρόσθεση 1 ml χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης.
27. Ανάδευση στο Vortex.
28. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min στους 4° C.
29. Μεταφορά της επάνω υδατικής φάσης σε νέα erpendorfs.
30. Πρόσθεση παγωμένης 99% αλκοόλης (~ 1 ml).
31. Ανάδευση στο Vortex.
32. Στους -20° C για όλη τη νύχτα στην κατάψυξη.
33. Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 min στους 4° C.
34. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
35. Στέγνωμα του DNA στο φούρνο (~ 2-3 h στους 37° C).
36. Διάλυση του DNA σε 100 μl TE.
37. Συντήρηση στο ψυγείο.

2. Πολλαπλασιασμός τμημάτων του mtDNA με τη χρήση PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση 4 περιοχών του μιτοχονδριακού γονιδιώματος,

- i) μια περιοχή (D-Loop) 1600 περίπου βάσεων,
- ii) μια περιοχή (12s-16s) rRNA 2000 περίπου βάσεων,
- iii) μια περιοχή (COI) 1300 περίπου βάσεων,
- iv) μια περιοχή (COII) 700 περίπου βάσεων.

Για τον πολλαπλασιασμό τμήματος 1600 περίπου βάσεων της περιοχής ελέγχου D-Loop χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζευγάρι εκκινητικών μορίων (Kocher *et al.*, 1989),

DL 1 5' > ATA GTG GGG TAT CTA ATC CCA < 3'

DL 2 5' > (AG)C(AG) CCC AAA GCT (AG)(AG)(AG) (AG)TT CTA < 3'

Για τον πολλαπλασιασμό του ριβοσωμικού RNA, (12s-16s) rRNA, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (Kocher *et al.*, 1989; Palumbi *et al.*, 1991),

L 1091 5' > AAA AAG CTT CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT < 3'

H 3080 5' > CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T < 3'

Για τον πολλαπλασιασμό της 1^{ης} υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (COI) χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητικών μορίων (Normark *et al.*, 1991),

L 5950 5' > ACA ATC ACA AAG A(CT)A T(CT)G G > 3'

H 7196 5' > AGA AAA TGT TG(AT) GGG AA(AG) AA > 3'

Τέλος, για τον πολλαπλασιασμό της 2^{ης} υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (COII) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (Normark *et al.*, 1991),

L 7450 5' > AAA GGA AGG AAT CGA ACC CCC < 3'

H 8055 5' > GCT CAT GAG TGG AGG ACG TCT T < 3'

Ο πολλαπλασιασμός του δίκλωνου DNA πραγματοποιήθηκε σε όγκους αντιδράσεων 50 μl σύμφωνα με τις συνθήκες που έχουν περιγραφεί από τους Bernatzhez *et al.*, 1995, και με μερικές τροποποιήσεις είναι:

- 1,5 μονάδες Taq DNA πολυμεράση,
- 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Taq 10 x [500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH = 8,4],
- 2,5 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs (από 2,5 για κάθε dNTP),

- 30 pμol από κάθε εκκινητή και
- 1 μl (περίπου 50 -100 ng DNA) από το DNA κάθε ατόμου.

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός των τεσσάρων τμημάτων του mtDNA πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Eppendorf ως εξής:

Αρχικά γινόταν αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95° C για 4 min. Αμέσως μετά ακολουθούσε μια διαδοχή από τρία στάδια διαφορετικών θερμοκρασιών (= 1 κύκλος) σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες για καθεμία από τις τέσσερις περιοχές:

- i) Για την περιοχή D-Loop
 - 95° C για 40 sec- αποδιάταξη των κλώνων του DNA
 - 51° C για 50 sec- σύνδεση των εκκινητών στο DNA
 - 72° C για 1,5 min- επιμήκυνση των νεοσχηματιζόμενων αλυσίδων του DNA

- ii) Για την περιοχή (12s-16s)rRNA
 - 95° C για 40 sec
 - 50° C για 1 min
 - 72° C για 2 min

- iii) Για την περιοχή COI
 - 95° C για 40 sec
 - 52° C για 40 sec
 - 72° C για 1,5 min και

- iv) Για την περιοχή COII
 - 95° C για 30 sec
 - 53° C για 30 sec
 - 72° C για 1 min

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε 35 τέτοιους επαναλαμβανόμενους κύκλους. Ολοκληρωνόταν με ένα τελικό στάδιο συμπληρωματικής επιμήκυνσης στους 72° C για 10 min.

Μετά τον πολλαπλασιασμό, ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γινόταν σε ηλεκτροφόρηση πηκτικής αγαρόζης 2% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 µg/ml) στα 100 Volts σε διάλυμα TAE. Στη συνέχεια τα τμήματα του mtDNA εξετάζονταν κάτω από υπεριώδες φως. Εφόσον το αποτέλεσμα ήταν θετικό, ακολουθούσαν πέψεις με ένζυμα περιορισμού.

3. Πέψεις των τμημάτων που ενισχύθηκαν με την PCR με ένζυμα περιορισμού

Τα τμήματα του mtDNA που πολλαπλασιάστηκαν με την τεχνική της PCR εξετάστηκαν στη συνέχεια για την ύπαρξη πολυμορφισμών με τις παρακάτω ενδονουκλεάσες περιορισμού: Acil Alul, AseI, Avall, BanI, Bstul, Ddel, HaeIII, HhaI, HinfI, MboI, MseI, MspI, TaqI (Πίν. 5).

Οι πέψεις έγιναν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρίας New England Biolabs (NEBiolabs, Gibco BRL). Συνοπτικά το διάλυμα της κάθε αντίδρασης (περίπου 15 µl) περιείχε:

- 1 µl κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα,
- 5 μονάδες ενζύμου,
- 5-10 µl από το προϊόν της PCR (πολ/σμένα τμήματα του mtDNA),
- dH₂O.

Ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι στους 37° C για περίπου 20 h.

Τα προϊόντα κάθε πέψης διαχωρίστηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτικής πολυακρυλαμίδης 8%, με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό τους.

Πίνακας 5. Ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μελέτη του μιτοχονδριακού DNA καθώς και η αλληλουχία αναγνώρισης αυτών.

Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης
<i>Aci I</i>	C↓CGC
<i>Alu I</i>	AG↓CT
<i>Ase I</i>	AT↓TAAT
<i>Ava II</i>	G↓G(AT)CC
<i>Ban I</i>	G↓G↓↓CC
<i>BstI</i>	CG↓CG
<i>Dde I</i>	C↓TNAG
<i>Hae III</i>	GG↓CC
<i>Hha I</i>	GCG↓G
<i>Hinf I</i>	G↓ANTC
<i>Mbo I</i>	↓GATC
<i>Mse I</i>	T↓TAA
<i>Msp I</i>	C↓CGG
<i>Taq I</i>	T↓CGA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ

1. Ανάλυση ηλεκτροφορητικών δεδομένων

Για την ερμηνεία των ηλεκτροφορητικών προτύπων έγιναν οι παρακάτω παραδοχές σύμφωνα με τους Shaklee *et al.*, (1990):

- Οι κύριες ζώνες που εμφανίζονται κατά τη χρώση οφείλονται στη δραστικότητα κάποιου ενζύμου, που η κληρονόμησή του ακολουθεί τους βασικούς Μεντελικούς Κανόνες Γενετικής.
- Ανάλογα: i) με τον αριθμό των γονιδιακών τόπων που κωδικοποιούν για το ένζυμο, ii) την ιστοειδίκευσή του, iii) τη δομή του (μονομερές, διμερές κ.λπ.) και iv) την ύπαρξη ενός ή περισσότερων αλληλομόρφων στους γονιδιακούς τόπους, κάθε ένζυμο εμφανίζει ένα συγκεκριμένο ηλεκτροφορητικό πρότυπο χαρακτηριστικό και επαναλήψιμο για κάθε άτομο.
- Τα αλληλόμορφα κάθε γονιδιακού τόπου είναι συνυπερέχοντα.
- Το πιο κοινό αλληλόμορφο κάθε γονιδιακού τόπου του είδους *Pagellus erythrinus* συμβολίζεται με τον αριθμό 100.
- Ο συμβολισμός των υπόλοιπων αλληλομόρφων γίνεται ως εξής: Έστω ότι α είναι η απόσταση του προϊόντος του αλληλομόρφου 100 (δηλαδή της ζώνης της ενζυμικής δραστηριότητας που αντιστοιχεί σ' αυτό) από την αρχή της ηλεκτροφόρησης και β είναι η απόσταση του προϊόντος ενός άλλου αλληλομόρφου. Η ονομασία του νέου αλληλομόρφου δίνεται από τον τύπο $\beta/\alpha \times 100$ (π.χ. 110 εάν είναι ανοδικότερο του 100 ή 90 εάν είναι καθοδικότερο του 100).
- Στις περιπτώσεις προϊόντων γονιδιακών τόπων που μεταναστεύουν προς την κάθοδο, ισχύουν τα ίδια, αλλά η αρίθμηση είναι αρνητική.

2. Πολυμορφισμός ενζυμικών συστημάτων

Στα πλαίσια αυτής της ανάλυσης μελετήθηκαν τα ισοενζυμικά πρότυπα 13 ενζύμων σε 60 άτομα, 30 άτομα από τον πληθυσμό του Παγασητικού και 30 άτομα από τον πληθυσμό του Πλατανιά (Πίν. 6).

Πίνακας 6. Πληθυσμοί που μελετήθηκαν, η συντομογραφία τους και το μέγεθος δείγματος κατά την ανάλυση ισοενζύμων (n_1), RAPD (n_2) και mtDNA (n_3)

Προέλευση	Συντ.	n_1	n_2	n_3
1. ΠΑΓΑΣΗΤΙΚΟΣ	ΠΑΓ.	30	30	30
2. ΠΛΑΤΑΝΙΑΣ	ΠΛΑΤ.	30	30	30
Σύνολο		60	60	60

Αναλυτικά τα αποτελέσματα για κάθε ένζυμο ξεχωριστά είναι:

1. Εστεράσες (EST)

Το ενζυμικό αυτό σύστημα μελετήθηκε στο συκώτι. Βρέθηκε ένας γονιδιακός τόπος, ο οποίος ήταν πολυμορφικός, περισσότερο μάλιστα για τον πληθυσμό του Πλατανιά. Τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν στον πληθυσμό του Πλατανιά ήταν τα 100 και 90 ενώ στον πληθυσμό του Παγασητικού τα 100, 90 και ένα επιπλέον αλληλόμορφο χαρακτηριστικό για τον πληθυσμό αυτό, το αλληλόμορφο 110 (εμφάνιση: 1 φορά). Διαπιστώθηκε η ύπαρξη ετερόζυγων ατόμων.

2. Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AAT ή GOT)

Το ενζυμικό αυτό σύστημα μελετήθηκε στο συκώτι και το μυ. Διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός γονιδιακού τόπου για κάθε ιστό, του sAAT, ο οποίος κωδικοποιεί την κυτταροπλασματική μορφή του ενζύμου. Τα προϊόντα του sAAT παρουσιάζουν ανοδική κινητικότητα. Στον ένα γονιδιακό τόπο sAAT-2 (συκώτι) βρέθηκε αλληλόμορφο χαρακτηριστικό για τον πληθυσμό του Πλατανιά (αλληλόμορφο 110) ενώ και για τους δύο πληθυσμούς βρέθηκαν επίσης τα αλληλόμορφα 100 και 90.

Στον άλλο γονιδιακό τόπο sAAT-1 (μυς) βρέθηκαν τα αλληλόμορφα 100 και 110 και για τις δύο περιοχές. Επίσης ένα ετερόζυγο άτομο για τον Πλατανιά και περισσότερα (5) για τον Παγασητικό.

3. α-γλυκεροφωσφορική αφυδρογονάση (AGP)

Μελετήθηκε στο μυ. Βρέθηκε ένας γονιδιακός τύπος. Και οι δύο πληθυσμοί παρουσίασαν το ίδιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο και ήταν μονομορφικοί.

4. Μαλικό ένζυμο (ME)

Το ένζυμο αυτό μελετήθηκε στο μυ. Διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός γονιδιακού τύπου. Και οι δύο πληθυσμοί εμφάνισαν το ίδιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο και ήταν μονομορφικοί.

5. Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)

Το ένζυμο αυτό μελετήθηκε στο μυ, το μάτι και το συκώτι. Ανιχνεύθηκαν 5 γονιδιακοί τύποι: οι LDH-A₁, LDH-A₂ εκφράζονται στο μυ, ο LDH-B στο συκώτι και οι LDH-C₁, LDH-C₂ στο μάτι. Οι γονιδιακοί τύποι LDH-A₁, LDH-A₂, LDH-C₁, LDH-C₂ εμφάνισαν το ίδιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο και στους δύο πληθυσμούς και ήταν μονομορφικοί. Ο γονιδιακός τύπος LDH-B ήταν πολυμορφικός και υπήρχαν και ετερόζυγα άτομα και στους δύο πληθυσμούς.

6. Κρεατινική κινάση (CK)

Το ένζυμο αυτό μελετήθηκε στο μάτι και το μυϊκό ιστό. Μελετήθηκαν τρεις γονιδιακοί τύποι: οι CK-1, CK-2 εκφράζονται στο μάτι και ο CK-3 στο μυ. Και για τους τρεις γονιδιακούς τύπους βρέθηκε ένα μόνο αλληλόμορφο.

7. Φωσφογλυκομουτάση (PGM)

Το ενζυμικό αυτό σύστημα μελετήθηκε στο μυϊκό ιστό. Διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός γονιδιακού τύπου, πολυμορφικού τόσο για τον Παγασητικό όσο και για τον Πλατανιά με τα αλληλόμορφα 100 και 75 και για τους δύο πληθυσμούς. Επίσης υπήρχαν ετερόζυγα άτομα και στους δύο πληθυσμούς.

8. Φωσφογλυκοϊσομεράση (PGI)

Το ενζυμικό αυτό σύστημα μελετήθηκε στο μυϊκό ιστό, όπου και εκφράστηκε ένας γονιδιακός τόπος, πολυμορφικός με αλληλόμορφα τα 100 και 110 και για τους δύο πληθυσμούς. Ετερόζυγα άτομα υπήρχαν και στον Παγασητικό και τον Πλατανιά.

9. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Το ενζυμικό αυτό σύστημα μελετήθηκε στο συκώτι και εκφράστηκε ένας γονιδιακός τόπος, μονομορφικός και για τους δύο πληθυσμούς (Παγασητικός - Πλατανιάς).

10. Οξειδάση της υποξανθίνης (XO)

Το ενζυμικό αυτό σύστημα μελετήθηκε στο συκώτι. Βρέθηκαν δύο γονιδιακοί τόποι, οι XO-1, XO-2, πολυμορφικοί, χωρίς χαρακτηριστικά για τους πληθυσμούς αλληλόμορφα (αλληλόμορφα 100 και 110 και για τους δύο πληθυσμούς). Επίσης βρέθηκαν ετερόζυγα άτομα.

11. Μαλική αφυδρογονάση (MDH)

Μελετήθηκε στο συκώτι. Διαπιστώθηκαν δύο γονιδιακοί τόποι, οι MDH-1 και MDH-2. Και οι δύο γονιδιακοί τόποι ήταν μονομορφικοί και για τους δύο πληθυσμούς.

12. Αφυδρογονάση της υποξανθίνης (XDH)

Μελετήθηκε στο συκώτι. Βρέθηκαν δύο γονιδιακοί τόποι, ο XDH-1 με καθοδική κινητικότητα και ο XDH-2 με ανοδική κινητικότητα. Ο XDH-1 παρουσίασε μονομορφικό πρότυπο σε όλα τα άτομα και των δύο πληθυσμών. Ο XDH-2 ήταν πολυμορφικός, εμφάνισε τα αλληλόμορφα 100, 110 και ετερόζυγα άτομα και στους δύο πληθυσμούς.

13. Αλκοολική αφυδρογονάση (ADH)

Το ενζυμικό αυτό σύστημα μελετήθηκε στο συκώτι. Διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός γονιδιακού τόπου, ο οποίος ήταν πολυμορφικός (αλληλόμορφα 100, 110, 120) τόσο για τον Παγασητικό όσο και για τον Πλατανιά. Δεν

παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικά αλληλόμορφα για κάποιον πληθυσμό. Τέλος, παρατηρήθηκαν ετερόζυγα άτομα και στους δύο πληθυσμούς.

3. Ενδοπληθυσμιακός πολυμορφισμός

Οι συντελεστές ενδοπληθυσμιακής ανάλυσης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου BIOSYS 1.7 (Swofford & Selander, 1989).

Συνολικά, τα 13 ενζυμικά συστήματα που μελετήθηκαν αντιστοιχούν σε 23 γονιδιακούς τόπους που εκφράζονται και στους δύο πληθυσμούς (Πίν. 7).

Δεκατρείς από τους 23 κοινούς γονιδιακούς τόπους ήταν μονομορφικοί για τους δύο πληθυσμούς (ME, AGP, LDH-A₁, LDH-A₂, LDH-C₁, LDH-C₂, CK-1, CK-2, CK-3, SOD, MDH-1, MDH-2, XDH-1). Οι υπόλοιποι δέκα γονιδιακοί τόποι (EST, sAAT-1, sAAT-2, PGM, PGI, LDH-B, XO-1, XO-2, XDH-2, ADH) ήταν πολυμορφικοί και στους δύο πληθυσμούς, βρέθηκαν δηλαδή παραπάνω από ένα αλληλόμορφα.

Σε αυτούς τους κοινούς γονιδιακούς τόπους βρέθηκαν 36 διαφορετικά αλληλόμορφα. Από αυτά το 1 συναντάται αποκλειστικά στον πληθυσμό του Πλατανιά και τα άλλα 35 είναι κοινά. Το 1 αυτό αλληλόμορφο που χαρακτήριζε τον πληθυσμό του Πλατανιά είναι το sAAT-2-110.

Ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων για κάθε γονιδιακό τόπο ήταν 1,5 και για τους δύο πληθυσμούς, ενώ το ποσοστό των πολυμορφικών τόπων ήταν 39,1 για τον Παγασητικό και 43,5 για τον Πλατανιά. Οι τιμές της παρατηρούμενης (H_o) ετεροζυγωτίας ήταν 0,118 για τον Παγασητικό και 0,155 για τον Πλατανιά ενώ της αναμενόμενης (H_e) ετεροζυγωτίας ήταν 0,169 και 0,190 αντίστοιχα.

Πίνακας 7. Συχνότητες αλληλομόρφων για όλους τους γονιδιακούς τόπους και μετρήσεις της γενετικής ποικιλομορφίας στους δύο πληθυσμούς. Ένας τόπος θεωρείται πολυμορφικός εάν η συχνότητα του πιο κοινού αλληλομόρφου δεν υπερβαίνει το 0,95. *H_o*: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, *H_e*: Hardy - Weinberg αναμενόμενη ετεροζυγωτία. Οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι τυπικές αποκλίσεις.

Γον. Τόποι	Αλληλ.	Παγασσητικός	Πλατανιάς
<i>EST</i>	110	0.017	0.000
	100	0.883	0.817
	90	0.100	0.183
<i>sAAT-2</i>	110	0.000	0.283
	100	0.983	0.667
	90	0.017	0.050
<i>ME</i>	100	1.000	1.000
<i>sAAT-1</i>	110	0.083	0.083
	100	0.917	0.917
<i>AGP</i>	100	1.000	1.000
<i>LDH-A₁</i>	100	1.000	1.000
<i>LDH-A₂</i>	100	1.000	1.000
<i>CK-3</i>	100	1.000	1.000
<i>PGM</i>	100	0.717	0.667
	75	0.283	0.333
<i>PGI</i>	110	0.367	0.583
	100	0.633	0.417
<i>LDH-C₁</i>	100	1.000	1.000
<i>LDH-C₂</i>	100	1.000	1.000
<i>CK-1</i>	100	1.000	1.000
<i>CK-2</i>	100	1.000	1.000

<i>LDH-B</i>	110	0.383	0.433
	100	0.617	0.567
<i>SOD</i>	100	1.000	1.000
<i>XO-1</i>	110	0.517	0.450
	100	0.483	0.550
<i>XO-2</i>	110	0.467	0.450
	100	0.533	0.550
<i>MDH-1</i>	100	1.000	1.000
<i>MDH-2</i>	100	1.000	1.000
<i>XDH-1</i>	100	1.000	1.000
<i>XDH-2</i>	110	0.483	0.350
	100	0.517	0.650
<i>ADH</i>	120	0.120	0.167
	110	0.400	0.183
	100	0.480	0.650
<i>Μέσος αριθμός δείγματος ανά γονιδιακό τόπο</i>		29,8 (0,2)	30 (0,0)
<i>Μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο</i>		1,5 (0,1)	1,5 (0,1)
<i>% Πολυμορφικοί τόποι</i>		39,1	43,5
<i>Ho</i>		0,118 (0,038)	0,155 (0,045)
<i>He</i>		0,169 (0,048)	0,190 (0,049)

B. ΤΕΧΝΙΚΗ RAPD

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

Για την εκτίμηση των γενετικών σχέσεων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο PHYLIP 3,5 (Felsenstein 1993).

1. Ηλεκτροφορήσεις σε πηκτές αγαρόζης

Ενισχύθηκαν 30 άτομα από τον Παγασητικό και 30 άτομα από τον Πλατανιά, χρησιμοποιώντας 11 εκκινητές (primers) (OPA 02, 04, 08, 09, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19). Όλοι οι εκκινητές παρείχαν ικανοποιητικά προϊόντα ενίσχυσης, σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν. Κάθε εκκινητής παρήγαγε ένα ξεχωριστό πρότυπο ζωνών ενισχυμένου DNA. Κάποιες ζώνες εμφανίστηκαν έντονες και αναπαραγόμενες σε όλες τις αντιδράσεις PCR, ενώ κάποιες άλλες εμφανίστηκαν περιστασιακά και ήταν ασθενείς. Οι ζώνες οι οποίες εμφανιζόταν κατ' επανάληψη, ανεξάρτητα από την έντασή τους, θεωρήθηκαν αξιόπιστες. Όλοι οι εκκινητές παρήγαγαν διαφορετικά και ευδιάκριτα πρότυπα ζωνών. Ωστόσο, κανένας από τους εκκινητές δεν κατάφερε να δώσει κάποια διαγνωστική ζώνη η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναγνώριση των γεωγραφικών πληθυσμών του λιθρινιού.

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.

2. Ηλεκτροφορήσεις σε πηκτές πολυακρυλαμίδης

Όλα τα εκκινητικά μόρια που εξετάστηκαν έδωσαν ικανοποιητικά προϊόντα ενίσχυσης με όλα τα δείγματα. Ο αριθμός των ατόμων που

αναλύθηκαν για κάθε πληθυσμό λιθρινιού και για κάθε εκκινητικό μόριο κυμάνθηκε μεταξύ 18 και 30 (Πίν. 8). Ο αριθμός των αναπαραγόμενων και ευδιάκριτων ζωνών που αναλύθηκε για κάθε εκκινητικό μόριο και για τους δύο πληθυσμούς κυμάνθηκε από 5 έως 18 (Πίν. 8). Ο αριθμός των μονομορφικών ζωνών (ζώνες με σταθερή εμφάνιση σε όλα τα άτομα) διέφερε μεταξύ των εκκινητικών μορίων (Πίν. 9). Το μέγεθος των τμημάτων κυμάνθηκε από 0,18 μέχρι 1,4Kb. Τα τμήματα με μέγεθος μικρότερο των 1000 ζευγών βάσεων εμφανίστηκαν περισσότερο πολυμορφικά από αυτά με μεγαλύτερο μέγεθος. Τελικά, αναλύθηκαν 114 ζώνες συνολικά σε ηλεκτροφορήσεις πολυακρυλαμίδης για τους δύο πληθυσμούς και με τους 11 εκκινητές (Πίν. 10). Στον ίδιο πίνακα δίνονται και οι εκτιμηθείσες συχνότητες των αλληλομόρφων. Ο βαθμός ετεροζυγωτίας μεταξύ των δύο πληθυσμών Παγασητικού - Πλατανιά σύμφωνα με τα συνολικά δεδομένα από όλα τα εκκινητικά μόρια ήταν 0,280009, ενώ η γενετική απόσταση που υπολογίστηκε από συνδυασμένα στοιχεία για όλα τα εκκινητικά μόρια ήταν 0,01815.

Πίνακας 8. Αριθμοί των ατόμων (N) και των ζωνών RAPD (n) που αναλύθηκαν για κάθε πληθυσμό λιθρινιού και κάθε τυχαίο εκκινητή και οι αριθμοί των μονομορφικών ζωνών (m) που βρέθηκαν για κάθε εκκινητή σε κάθε πληθυσμό.

Εκκινητής	Παγασητικός			Πλατανιάς		
	N	n	m	N	n	M
OPA 02	25	14	4	25	14	4
OPA 04	27	8	4	29	8	4
OPA 08	19	9	2	18	9	2
OPA 09	27	5	4	28	5	4
OPA 10	27	10	2	29	10	2
OPA 11	28	18	4	28	18	5
OPA 13	25	11	3	30	11	3
OPA 14	25	9	5	27	9	5
OPA 17	24	12	3	26	12	3
OPA 18	23	11	2	29	11	1
OPA 19	20	7	2	27	7	2

Πίνακας 9. Αριθμός (n) μονομορφικών ζωνών για κάθε εκκινητή και ποσοστό (%) αυτών στο σύνολο των ζωνών.

Εκκινητής	(n)	(%)
OPA 02 :	4/14	28,57
OPA 04 :	4/8	50,00
OPA 08 :	2/9	22,22
OPA 09 :	4/5	80,00
OPA 10 :	2/10	20,00
OPA 11 :	4/18	22,22
OPA 13 :	3/11	27,27
OPA 14 :	5/9	55,55
OPA 17 :	3/12	25,00
OPA 18 :	2/11	18,18
OPA 19 :	2/7	28,57

Πίνακας 10. Ο αριθμός (n) και οι συχνότητες (q) του μηδενικού αλληλόμορφου για τους 114 RAPD δείκτες που μελετήθηκαν στους 2 πληθυσμούς, οι αριθμοί (N) των ατόμων που αναλύθηκαν. Κάθε δείκτης αναφέρεται με το όνομα του εκκινητή και το μέγεθός του σε ζεύγη βάσεων.

RAPD δείκτες	Παγασσητικός			Πλατανιάς		
	n	N	q	n	N	q
OPA 02 ₇₃₀	16	25	0,800	14	25	0,748
OPA 02 ₆₅₀	0	25	0,000	0	25	0,000
OPA 02 ₆₃₀	20	25	0,894	17	25	0,825
OPA 02 ₅₀₀	0	25	0,000	0	25	0,000
OPA 02 ₄₈₀	11	25	0,663	6	25	0,490
OPA 02 ₄₂₀	0	25	0,000	0	25	0,000
OPA 02 ₃₈₅	6	25	0,490	9	25	0,600
OPA 02 ₃₈₀	12	25	0,693	9	25	0,600
OPA 02 ₃₁₅	18	25	0,849	16	25	0,800
OPA 02 ₃₁₀	6	25	0,490	9	25	0,600
OPA 02 ₃₀₅	14	25	0,748	17	25	0,825
OPA 02 ₂₇₀	1	25	0,200	4	25	0,400
OPA 02 ₂₆₅	17	25	0,825	19	25	0,872
OPA 02 ₁₈₀	0	25	0,000	0	25	0,000
OPA 04 ₉₅₀	13	27	0,694	15	29	0,719
OPA 04 ₆₅₀	19	27	0,839	13	29	0,670
OPA 04 ₅₂₀	15	27	0,745	12	29	0,643
OPA 04 ₅₀₀	0	27	0,000	0	29	0,000
OPA 04 ₄₆₀	0	27	0,000	0	29	0,000
OPA 04 ₃₁₀	0	27	0,000	0	29	0,000
OPA 04 ₃₀₀	4	27	0,385	4	29	0,371
OPA 04 ₂₈₀	0	27	0,000	0	29	0,000
OPA 08 ₁₀₀₀	4	19	0,459	6	18	0,577
OPA 08 ₉₅₀	7	19	0,607	6	18	0,577
OPA 08 ₈₀₀	1	19	0,229	3	18	0,408

RAPD δείκτες	Παγασητικός			Πλατανιάς		
	n	N	q	n	N	q
OPA 08 ₇₈₀	11	19	0,761	8	18	0,667
OPA 08 ₆₂₀	0	19	0,000	0	18	0,000
OPA 08 ₅₂₀	14	19	0,858	13	18	0,850
OPA 08 ₅₀₀	3	19	0,397	4	18	0,471
OPA 08 ₄₀₀	3	19	0,397	4	18	0,471
OPA 08 ₁₉₀	0	19	0,000	0	18	0,000
OPA 09 ₆₀₀	0	27	0,000	0	28	0,000
OPA 09 ₄₉₀	0	27	0,000	0	28	0,000
OPA 09 ₄₃₀	26	27	0,981	20	28	0,845
OPA 09 ₄₂₀	0	27	0,000	0	28	0,000
OPA 09 ₃₆₀	0	27	0,000	0	28	0,000
OPA 10 ₉₀₀	18	27	0,816	13	29	0,670
OPA 10 ₇₉₀	25	27	0,962	26	29	0,947
OPA 10 ₇₈₀	2	27	0,272	7	29	0,491
OPA 10 ₇₀₀	18	27	0,816	20	29	0,830
OPA 10 ₆₉₀	1	27	0,192	0	29	0,000
OPA 10 ₄₈₀	11	27	0,638	16	29	0,743
OPA 10 ₄₇₀	21	27	0,882	23	29	0,891
OPA 10 ₄₀₀	0	27	0,000	0	29	0,000
OPA 10 ₃₈₀	3	27	0,333	3	29	0,322
OPA 10 ₃₅₀	3	27	0,333	6	29	0,455
OPA 11 ₁₄₀₀	0	28	0,000	0	28	0,000
OPA 11 ₁₁₅₀	0	28	0,000	0	28	0,000
OPA 11 ₉₀₀	5	28	0,423	5	28	0,423
OPA 11 ₇₂₀	10	28	0,598	7	28	0,500
OPA 11 ₆₈₀	14	28	0,707	13	28	0,681
OPA 11 ₅₉₀	0	28	0,000	0	28	0,000
OPA 11 ₅₅₀	11	28	0,627	9	28	0,567
OPA 11 ₅₀₀	12	28	0,655	7	28	0,500
OPA 11 ₄₉₀	4	28	0,378	0	28	0,000

RAPD δείκτες	Παγασητικός			Πλατανιάς		
	N	N	q	n	N	q
OPA 11 ₄₃₀	5	28	0,423	6	28	0,463
OPA 11 ₄₁₀	10	28	0,598	6	28	0,463
OPA 11 ₄₀₀	11	28	0,627	11	28	0,627
OPA 11 ₃₂₀	0	28	0,000	0	28	0,000
OPA 11 ₂₉₀	7	28	0,500	8	28	0,535
OPA 11 ₂₈₀	18	28	0,802	18	28	0,802
OPA 11 ₂₇₀	2	28	0,267	5	28	0,423
OPA 11 ₂₃₀	15	28	0,732	15	28	0,732
OPA 11 ₂₀₀	6	28	0,463	3	28	0,327
OPA 13 ₈₅₀	0	25	0,000	0	30	0,000
OPA 13 ₇₂₀	0	25	0,000	0	30	0,000
OPA 13 ₅₀₀	0	25	0,000	0	30	0,000
OPA 13 ₄₁₅	12	25	0,693	10	30	0,577
OPA 13 ₄₁₀	8	25	0,566	13	30	0,658
OPA 13 ₄₀₅	19	25	0,872	17	30	0,753
OPA 13 ₃₈₀	13	25	0,721	8	30	0,516
OPA 13 ₃₇₀	1	25	0,200	7	30	0,483
OPA 13 ₃₀₀	11	25	0,663	12	30	0,632
OPA 13 ₂₇₀	9	25	0,600	9	30	0,548
OPA 13 ₂₃₀	7	25	0,529	9	30	0,548
OPA 14 ₇₅₀	0	25	0,000	0	27	0,000
OPA 14 ₇₀₀	11	25	0,663	8	27	0,544
OPA 14 ₆₀₀	7	25	0,529	11	27	0,638
OPA 14 ₅₀₀	0	25	0,000	0	27	0,000
OPA 14 ₄₈₀	0	25	0,000	0	27	0,000
OPA 14 ₄₆₀	7	25	0,529	5	27	0,430
OPA 14 ₂₇₀	0	25	0,000	0	27	0,000
OPA 14 ₂₅₀	13	25	0,721	13	27	0,694
OPA 14 ₂₁₀	0	25	0,000	0	27	0,000
OPA 17 ₁₁₀₀	0	24	0,000	0	26	0,000

RAPD δείκτες	Παγασητικός			Πλατανιάς		
	N	N	q	n	N	q
OPA 17 ₇₈₀	19	24	0,890	23	26	0,941
OPA 17 ₇₅₀	18	24	0,866	17	26	0,809
OPA 17 ₇₀₀	0	24	0,000	0	26	0,000
OPA 17 ₅₀₀	0	24	0,000	0	26	0,000
OPA 17 ₄₀₀	17	24	0,842	1	26	0,650
OPA 17 ₃₈₅	9	24	0,612	12	26	0,679
OPA 17 ₃₈₀	10	24	0,645	9	26	0,588
OPA 17 ₃₆₀	21	24	0,935	24	26	0,961
OPA 17 ₃₁₅	18	24	0,866	19	26	0,855
OPA 17 ₃₁₀	2	24	0,289	0	26	0,000
OPA 17 ₃₀₅	22	24	0,957	21	26	0,899
OPA 18 ₅₈₀	12	23	0,722	19	29	0,809
OPA 18 ₅₂₀	0	23	0,000	1	29	0,186
OPA 18 ₅₁₀	16	23	0,834	21	29	0,851
OPA 18 ₄₃₀	19	23	0,909	22	29	0,871
OPA 18 ₄₂₀	0	23	0,000	0	29	0,000
OPA 18 ₄₁₀	3	23	0,361	3	29	0,322
OPA 18 ₃₇₀	0	23	0,000	1	29	0,186
OPA 18 ₃₃₀	14	23	0,780	17	29	0,766
OPA 18 ₂₄₀	17	23	0,860	14	29	0,695
OPA 18 ₂₃₀	14	23	0,780	18	29	0,788
OPA 18 ₂₂₀	5	23	0,466	13	29	0,670
OPA 19 ₉₀₀	7	20	0,592	8	27	0,544
OPA 19 ₇₁₀	4	20	0,447	0	27	0,000
OPA 19 ₆₆₀	13	20	0,806	21	27	0,882
OPA 19 ₅₇₀	15	20	0,866	22	27	0,903
OPA 19 ₅₆₀	6	20	0,548	10	27	0,609
OPA 19 ₅₀₀	0	20	0,000	5	27	0,430
OPA 19 ₂₅₀	0	20	0,000	0	27	0,000

Γ. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

1. Πολυμορφισμός του μιτοχονδριακού DNA που αποκαλύπτεται με τη χρήση ενζύμων περιορισμού

Ερευνήθηκε η ύπαρξη πολυμορφισμού σε τέσσερις περιοχές του μιτοχονδριακού DNA ύστερα από ενίσχυσή τους με PCR. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν έδιναν έντονες και καθαρές ζώνες κάθε φορά. Τα πολλαπλασιαζόμενα τμήματα της περιοχής ελέγχου ή βρόγχου: D-Loop, του ριβοσωμικού RNA: (12s-16s)rRNA, της 1^{ης} υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c: COI και της 2^{ης} υπομονάδας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c: COII, είχαν ένα μέσο μέγεθος 1600, 2000, 1300 και 700 bp (ζευγάρια βάσεων) αντίστοιχα. Έντεκα, έντεκα, οκτώ και έντεκα από τα 14 ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τους δύο πληθυσμούς είχαν τουλάχιστον μία θέση αναγνώρισης στις περιοχές D-Loop, (12s-16s)rRNA, COI, COII αντίστοιχα. Τα 14 ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα: Acil, Alul, AseI, Avall, BanI, Bstul, Ddel, HaeIII, HhaI, Hinfl, MboI, MseI, MspI, TaqI. Από αυτά, εκείνα τα ένζυμα περιορισμού που δεν είχαν θέσεις κοπής και αποκλείστηκαν από τις περαιτέρω αναλύσεις ήταν για κάθε περιοχή του μιτοχονδριακού DNA τα εξής:

- | | | |
|------|------------------------|----------|
| i) | περιοχή D-Loop: | Msp, Ban |
| ii) | περιοχή (12s-16s)rRNA: | Mbo, Msp |
| iii) | περιοχή COI: | Ava, Hha |
| iv) | περιοχή COII: | Ava, Ban |

Τα περιοριστικά πρότυπα και τα μεγέθη των τμημάτων που προέκυψαν μετά τις πέψεις με κάθε ένζυμο περιορισμού στις περιοχές: D-Loop, (12s-16s) rRNA, COI, COII παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Μεγέθη (σε ζεύγη βάσεων) των τμημάτων για όλα τα περιοριστικά πρότυπα που παρατηρήθηκαν στο mtDNA για την περιοχή: i) D-Loop, ii) (12s - 16s)rRNA, iii) COI, iv) COII στους δύο πληθυσμούς που μελετήθηκαν.

D-Loop

<i>Acil</i>	A	B	<i>Alul</i>	A	B	C	<i>Ddel</i>	A	B	C	D
550	-		550	-		-	840			-	
510		-	400	-	-	-	650		-		-
500		-	360		-		540	-			
490	-		230	-	-	-	360	-	-	-	-
200	-	-	190		-		300	-			
100	-	-	180			-	210				-
70	-	-	120	-	-	-	200	-	-	-	
60	-	-	90	-	-		190		-		-
50	-	-	80	-	-	-	120	-	-	-	-
40	-	-	60	-	-		90	-	-	-	-
30		-	40	-	-	-	10	-	-	-	
			30	-	-						

<i>Hhal</i>	A	B	<i>Hinfl</i>	A	B	<i>Mbol</i>	A	B	C	D	E	F	G	H
1250	-		900	-	-	1640					-			
870		-	480	-		1390						-		
400	-	-	370		-	1030	-	-	-	-			-	-
380		-	260	-	-	670	-							
			110		-	540								-
			70	-	-	420		-						
						360			-	-			-	
						310				-		-		
						250		-	-					
						180								-
						130							-	-
						60			-		-			

<i>MseI</i>	A	B	C
300		-	
210			-
190	-		
170	-	-	-
160	-	-	-
150	-	-	-
140	-	-	-
130	-	-	-
120	-	-	-
100	-	-	-
90	-	-	-
80	-	-	-
70	-	-	-
65	-		-
45	-		-
30	-		-
20	-	-	

(12s - 16s)rRNA

<i>BanI</i>	A	B
2000	-	
1620		-
380		-

COI

<i>AluI</i>	A	B	<i>DdeI</i>	A	B	<i>MboI</i>	A	B
440		-	680		-	1060		-
350	-	-	430	-	-	620	-	
340	-		400	-		440	-	
290	-	-	280	-		240	-	-
160	-	-	70	-	-			
100	-		60	-	-			

COII

<i>Mbol</i>	A	B	<i>MspI</i>	A	B
700		-	700	-	
470	-		600		-
230	-		100		-

Για καλύτερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων οι απλότυποι (σύνθετοι γενότυποι) καθώς και ο αριθμός ατόμων και οι αντίστοιχες συχνότητές τους στους πληθυσμούς παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Από τους 24 απλότυπους που παρατηρήθηκαν συνολικά, 15 απλότυποι βρέθηκαν στον πληθυσμό του Παγασητικού και 15 απλότυποι βρέθηκαν στον πληθυσμό του Πλατανιά. Από το σύνολο των 24 απλοτύπων οι 18 ήταν μοναδικοί, δηλαδή παρατηρήθηκαν μόνο σε έναν πληθυσμό. Συγκεκριμένα, από τους 18 αυτούς μοναδικούς απλότυπους, οι 9 απλότυποι ήταν μοναδικοί για τον Παγασητικό και οι 9 για τον Πλατανιά. Οι υπόλοιποι 6 απλότυποι ήταν κοινοί για τους πληθυσμούς, δηλαδή παρατηρήθηκαν και σε άτομα του Παγασητικού και σε άτομα του Πλατανιά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν τρεις μοριακές μέθοδοι (ισοένζυμα, RAPD, μιτοχονδριακό DNA) προκειμένου να προσδιοριστούν οι γενετικές σχέσεις μεταξύ δύο ιχθυοπληθυσμών του λιθρινιού, *Pagellus erythrinus*. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν κατά την εφαρμογή των τριών αυτών προσεγγίσεων στα ίδια άτομα είναι σημαντική, δεδομένου ότι η κάθε μέθοδος παράγει δείκτες που ανήκουν σε διαφορετικά μέρη του γονιδιώματος. Τα περισσότερα από τα ισοένζυμα κωδικοποιούνται από περιοχές που είναι μοναδικά αντίγραφα του γονιδιώματος και εξελίσσονται πολύ πιο αργά απ' ό τι οι αλληλουχίες DNA που δεν αντιγράφονται. Η τεχνική RAPD, εκτός από μοναδικά τμήματα, ενισχύει επίσης το DNA από υψηλά επαναλαμβανόμενες μη κωδικοποιούσες περιοχές (Williams *et al.*, 1990), οι οποίες έχουν πολύ υψηλότερους ρυθμούς εξέλιξης. Το μιτοχονδριακό mtDNA είναι απλοειδές, σχεδόν μητρικά κληρονομούμενο και εξελίσσεται γρηγορότερα από το πυρηνικό DNA, παρόλο που οι περιοχές που εξετάζονται είναι γνωστό ότι είναι πολύ συντηρητικές μεταξύ των σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών (Kocher *et al.*, 1989).

Όλοι οι γονιδιακοί τόποι που εξετάστηκαν με την ισοενζυμική μέθοδο, παρήγαγαν συγκεκριμένα πρότυπα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε γνωστές δομές ενζυμικών υποομάδων. Ένα σοβαρό πρόβλημα το οποίο προκύπτει μετά την εφαρμογή της τεχνικής RAPD, εκτός από τη σχετική της αστάθεια, που έχει συζητηθεί εκτεταμένα (Hadrys *et al.*, 1992; Lynch & Milligan, 1994; Naish *et al.*, 1995), είναι η ομολογία μεταξύ συγχρόνως μετακινούμενων ζωνών που παράγονται από τον ίδιο τυχαίο εκκινητή σε διαφορετικά άτομα. Η ομολογία μεταξύ συγχρόνως μετακινούμενων ζωνών φαίνεται να είναι μια καλή υπόθεση όταν τα άτομα προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό ή είδος (όπως στην παρούσα μελέτη). Αντίθετα, αυτή η υπόθεση μπορεί να μην αληθεύει όταν τα άτομα που εξετάζονται ανήκουν σε διαφορετικά είδη ή προέρχονται από γενετικά αποκλίνοντες πληθυσμούς (Allegrucci *et al.*, 1995). Κατά τη διάρκεια

αυτής της μελέτης, εφόσον δε διεξήχθησαν έλεγχοι για όλες τις ταυτόχρονα μετακινούμενες ζώνες, πιθανώς να έγιναν κάποια λάθη στην εκτίμηση της προέλευσης των ζωνών αυτών. Παρόλα αυτά, δεδομένου ότι εξετάστηκε ένας μεγάλος αριθμός ζωνών, το στατιστικό λάθος είναι αμελητέο. Τέλος, όσον αφορά την ανάλυση του mtDNA, το κύριο πρόβλημα αφορούσε την επιλογή των τμημάτων του mtDNA. Έγινε αρχικά προσπάθεια ενίσχυσης ακόμα μιας περιοχής, της ND-5/6 περιοχής με ένα ζεύγος εκκινητικών μορίων (Cronin *et al.*, 1993), αλλά δεν ήταν δυνατή η παραγωγή προϊόντων ενίσχυσης για όλα τα άτομα των δύο ιχθυοπληθυσμών.

1. Η γενετική ενδοπληθυσμιακή ποικιλομορφία του είδους

Σε φυσικούς πληθυσμούς, μια από τις παραμέτρους της γενετικής ευρωστίας ενός είδους είναι και ο βαθμός της ενδοπληθυσμιακής γενετικής διαφοροποίησης. Όσο περισσότερους γενότυπους συμπεριλαμβάνει ένας συγκεκριμένος πληθυσμός, τόσο μεγαλύτερες πιθανότητες έχει να ανταποκριθεί σε απότομες περιβαλλοντικές αλλαγές και να αποφύγει την εξαφάνισή του. Ένας δείκτης για τη μέτρηση της γενετικής ποικιλομορφίας ενός πληθυσμού είναι ο βαθμός ετεροζυγωτίας του (H_o) ή ο βαθμός ενδοπληθυσμιακής διαφοροποίησης (δ).

Στην παρούσα μελέτη, αν και συνολικά οι δύο αυτοί δείκτες βρέθηκαν ελαφρώς μικρότεροι, κατά μέσο όρο, στον πληθυσμό του Παγασητικού σε σχέση με τον πληθυσμό του Πλατανιά, εξακολουθούν να είναι σε πολύ ικανοποιητικά επίπεδα για όλους τους μοριακούς δείκτες, δεδομένου ότι η μέση ετεροζυγωτία, σε ισοενζυμικό επίπεδο, που εκτιμήθηκε παγκοσμίως για θαλάσσια είδη είναι $H_o = 0,059$ (Ward and Grewe, 1994). Στην παρούσα μελέτη ήταν $H_o = 0,18$ για τον Παγασητικό και $H_o = 0,155$ για τον Πλατανιά. Σε επίπεδο mtDNA, ανάλογα με την τεχνική που χρησιμοποιείται, ο βαθμός ενδοπληθυσμιακής διαφοροποίησης κυμαίνεται από 0,3 έως 0,7%, εδώ ήταν $\delta = 0,91\%$ για τον Παγασητικό και $\delta = 0,92\%$ για τον Πλατανιά. Επομένως, οι υψηλές τιμές ετεροζυγωτίας σημαίνουν ότι το είδος έχει μια μακρόχρονη και αδιάκοπη παρουσία στον Παγασητικό, χωρίς να επηρεάζεται από απότομες δραστικές μειώσεις των πληθυσμιακών μεγεθών του, οι οποίες, αν υπάρχουν, αποκαθίστανται πολύ γρήγορα (Gyllensten 1985).

2. Η γενετική διαπληθυσμιακή ποικιλομορφία του είδους

Η γενετική διαπληθυσμιακή ποικιλομορφία αποτελεί ένα δείκτη εκτίμησης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πληθυσμών ενός είδους. Όσο μικρότερες είναι οι αλληλεπιδράσεις, τόσο αυξάνει η γενετική απομόνωση και διαφοροποίηση των πληθυσμών. Στους δύο πληθυσμούς που αναλύθηκαν, δεν υπάρχει διαφοροποίηση με καμία από τις τρεις τεχνικές. Η τιμή F_{st} που παρατηρήθηκε ($F_{st}=0,025$) είναι μικρότερη από το μέσο παγκόσμιο όρο (0,062) (Ward and Grewe, 1994). Ωστόσο, διαφαίνεται μια τάση διαφοροποίησης του πληθυσμού του Παγασητικού, η οποία αντικατοπτρίζεται στις τιμές των ανταλλαγών μεταναστών $N_e m$. Οι ανταλλαγές $N_e m$ μεταξύ των πληθυσμών εντός και εκτός του Παγασητικού Κόλπου δίνονται με βάση την τιμή F_{st} και σύμφωνα με τον τύπο: $N_e m = [(1/F_{st}) - 1] / 4$ (Waples 1987). Έτσι, οι ανταλλαγές μεταξύ των πληθυσμών βρέθηκαν να είναι $N_e m = 9,75$, πολύ χαμηλότερες από το γενικό παγκόσμιο μέσο όρο ($N_e m = 22,6$) των θαλάσσιων ψαριών (Ward and Grewe, 1994), αλλά βρίσκονται αρκετά κοντά με τις τιμές που εκτιμήθηκαν για άλλα θαλάσσια είδη στη Μεσόγειο, όπως τα *Engraulis encrasicolus* ($N_e m = 8,6$ Bembo *et al.*, 1996), *Mullus barbatus* ($N_e m = 5,6$) (Mamuris *et al.*, 1998 a, b) και *Mugil cephalus* ($N_e m = 7,26$) (Rossi *et al.*, 1998). Οι ανταλλαγές αυτές είναι αρκετά μικρές ώστε να επιτρέπουν τη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών, αλλά αρκετά μεγάλες, ώστε να αποτρέπεται ο πλήρης γενετικός διαχωρισμός των πληθυσμών.

3. Διαγνωστικοί δείκτες

Από την παρούσα μελέτη δεν προέκυψαν μοριακοί δείκτες που θα μπορούσαν να ταυτοποιήσουν με ακρίβεια τα άτομα ενός πληθυσμού. Σε αρκετές περιπτώσεις υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις αλληλομορφικές ή τις απλοτυπικές συχνότητες μεταξύ των πληθυσμών εντός και εκτός Παγασητικού, αλλά σε καμία περίπτωση οι διαφορές αυτές δεν ήταν απόλυτες. Σύμφωνα με όλα τα στοιχεία της έρευνας, η διαφοροποίηση των πληθυσμών δεν είναι αρκετή ώστε να δημιουργήσει καθλωμένα αλληλόμορφα ή απλότυπους σε οποιονδήποτε πληθυσμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν οι ακόλουθοι:

α) Να προσδιοριστούν τα γενετικά δεδομένα που αφορούν τα ιχθυοαποθέματα του είδους και θα προκύψουν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των τριών τεχνικών (ισοένζυμα, RAPD, mtDNA), όπως:

- i. βαθμός γενετικού πολυμορφισμού του κάθε ιχθυοαποθέματος,
- ii. βαθμός γενετικής διαφοροποίησης του ιχθυοαποθέματος του Παγασητικού σε σύγκριση με το εκτός Κόλπου ιχθυοαπόθεμα,
- iii. αριθμός σπάνιων ή καθιερωμένων γονιδίων στον πληθυσμό του Παγασητικού.

Από τα αποτελέσματα της έρευνας προέκυψε ότι όλες οι προηγούμενες παράμετροι του πληθυσμού του Παγασητικού βρίσκονται σε αρκετά ικανοποιητικά επίπεδα σε σχέση με τον εκτός του Κόλπου πληθυσμό, αλλά και γενικότερα σε σχέση με συγκεντρωτικά δεδομένα που αφορούν θαλάσσια είδη με παγκόσμια κατανομή. Όλοι οι δείκτες βρέθηκαν υψηλότεροι από το μέσο όρο, γεγονός που υποδηλώνει ότι αφενός κάτω από τις παρούσες συνθήκες υπάρχει γενετική ευρωστία και αφετέρου ότι παρελθόντα γεγονότα δεν προκάλεσαν μη αναστρέψιμες γενετικές βλάβες. Παρόλα αυτά, δεδομένης της απουσίας των γενετικών δεδομένων που να αφορούν τα ιχθυοαποθέματα του Παγασητικού είναι αδύνατο να γίνουν συγκρίσεις με προηγούμενες καταστάσεις του Κόλπου. Η απουσία σπάνιων ή καθηλωμένων γονιδίων στον πληθυσμό του Παγασητικού, στερεί μεν ένα εργαλείο για συστηματική γενετική παρακολούθηση των ιχθυοαποθεμάτων, ωστόσο επιβεβαιώνει την ομοιογένεια του πληθυσμού με αυτόν εκτός του Παγασητικού.

β) Να εκτιμηθούν οι γενετικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους εντός και εκτός Παγασητικού πληθυσμούς του είδους, όπως:

- i. βαθμός της γονιδιακής ροής ανάμεσα στους πληθυσμούς,
- ii. συμβολή της γονιδιακής ροής στη δημιουργία γενετικής ομοιογένειας.

Όλα τα δεδομένα της έρευνας συγκλίνουν στο ότι υπάρχουν σημαντικές

γενετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πληθυσμών εντός και εκτός Κόλπου. Αυτό προκύπτει από τα ικανοποιητικά επίπεδα του βαθμού των ανταλλαγών μεταξύ των πληθυσμών, παράμετρος που προσδιορίζει και το βαθμό της γονιδιακής ροής. Η πρακτική, από γενετικής άποψης, αξία της διαπίστωσης αυτής είναι ότι απότομες περιβαλλοντικές μεταβολές που θα προκαλέσουν αλλοίωση της γενετικής δομής του πληθυσμού του Παγασητικού, μπορούν γρήγορα να αποκατασταθούν με εισαγωγή άλλων και βασικά όμοιων φυσικών γενετικών αποθεμάτων από τον πληθυσμό εκτός του Κόλπου.

γ) Η αξιολόγηση των επιπέδων μεταλλαξιγένεσης του πληθυσμού του Παγασητικού σε σύγκριση με τον πληθυσμό εκτός Κόλπου και η διερεύνηση των αιτιών που τις προκαλούν.

Για κανένα πληθυσμό και για καμία τεχνική δε διαπιστώθηκαν γενετικές μεταβολές που θα υπονοούσαν την ύπαρξη φαινομένων μεταλλαξιγένεσης. Οι γενετικές διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν σε κάθε περίπτωση μέσα στα φυσιολογικά πλαίσια της πληθυσμιακής γενετικής για τους δύο πληθυσμούς.

Ακόμα και ο απευθείας έλεγχος του πυρηνικού DNA με τη μέθοδο RAPD και του μιτοχονδριακού DNA, που είναι ευαίσθητα στη δράση μεταλλαξιγόνων, δεν έδωσαν μοριακούς δείκτες διαφορετικούς από αυτούς του πληθυσμού εκτός Παγασητικού.

δ) Να εκτιμηθούν οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη γενετική σύσταση των ιχθυοπληθυσμών και στους περιβαλλοντικούς παράγοντες του Παγασητικού.

Γα κανένα δείγμα από τον πληθυσμό του Παγασητικού δε βρέθηκαν γενετικές διαφορές που θα μπορούσαν να οφείλονται σε επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων. Αντίθετα, τουλάχιστον για τα δείγματα του Παγασητικού, υπήρξε μεγάλη ομοιογένεια.

ε) Να προταθεί ένα μοντέλο συνεχούς παρακολούθησης (monitoring) των ιχθυοαποθεμάτων του Παγασητικού που θα βασίζεται σε ειδικούς μοριακούς δείκτες (ισοένζυμα ή τμήματα DNA).

Από την παρούσα ανάλυση δεν προέκυψαν κάποιοι δείκτες που θα μπορούσαν να προταθούν για ένα μοντέλο συνεχούς παρακολούθησης. Η απουσία διαγνωστικών δεικτών οφείλεται στα υψηλά επίπεδα γενετικής ροής από τον πληθυσμό του Πλατανιά που αποτρέπουν την πλήρη διαφοροποίηση οποιουδήποτε μοριακού δείκτη.

Τέλος, τα γενετικά δεδομένα θα πρέπει να συγκριθούν με τις υπόλοιπες

βιολογικές και πληθυσμιακές παραμέτρους του είδους (κύκλος ζωής, ρυθμός ανάπτυξης και θνησιμότητας, τρόποι και περιοχές αναπαραγωγής, κατά μήκος και κατά ηλικία σύνθεση των πληθυσμών), προκειμένου να υπάρξει μια πληρέστερη εικόνα των ιχθυοαποθεμάτων του Παγασητικού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abatzopoulos, T.J., Triantaphyllidis, C.D. and Kastritsis, C.D. (1993).** Genetic polymorphism in two parthenogenetic *Artemia* populations from Northern Greece. *Hydrobiologia*. 250: 73-80.
- Allegrucci, G., Caccone, A., Cataudella, S. and Powell, J.R. (1995).** Acclimation of the European sea bass to freshwaters: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Marine Biology*. 121: 591-599.
- Allendorf, F.W., Mitchell, N., Ryman, N. and Stahl, G. (1977).** Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data. *Hereditas*. 86: 179 -190.
- Altukhov, Y. (1981).** The stock concept from the Viewpoint of Population. *Genetic Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1523-1538.
- Awise, J.C. (1994).** Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.
- Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. and Saunders, N.C. (1987).** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Ayala, F.J., Tracey, M.L., Hedgecock, D. and Richmond, R.C. (1974).** Genetic differentiation during the speciation process in *Drosophila*. *Evol.* 28: 576-592.
- Baldwin, J. and Lake, P.S. (1987).** Lactate dehydrogenase homopolymer of hagfish heart and the single lactate dehydrogenase of lampreys display greater immunochemical similarity to LDHC₄ than to LDHB₄ of teleost fish. *J. exp. Zool.* 242: 99-102.

- Baldwin, J., Lake, P.S, and Moon, T.W. (1987).** Immunochemical evidence that the single lactate dehydrogenase of lampreys is more similar to LDHB₄ than to LDHA₄ of Hagfish. *The Journal of Experimental Zoology.* 241: 1 -8.
- Bardacki, F. and Skibinski, D.O.F. (1994).** The application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity.* 73: 117-123.
- Basaglia, F. (1989).** Some aspects of isozymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucose - phosphate isomerase in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 213-226.
- Bembo, D.G., Carvalho, G.R., Cingolani, N. and Pitcher, T.J. (1996).** Electrophoretic analysis of stock structure in Northern Mediterranean anchovies, *Engraulis encrasicolus*. *ICES J. Mar. Sci.* 53: 115-128.
- Bernatchez, L., Glemet, H., Wilson, C.C. and Danzmann, R.G. (1995).** Introgression and fixation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 179-185.
- Bernatchez, L., Savard, L., Dobson, J. and Pallota, D. (1988).** Mitochondrial DNA sequence heterogeneity among James-Hudson Bay anadromous coregoninines. *Finnish Fisheries Research.* 9: 17-26.
- Birky, C.W.J., Maruyama, T., and Fuerst, P. (1983).** An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics.* 103: 513 - 527.
- Black, W.C., Du Teau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R. and 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.

- Booth, J.D., Street, R.J. and Smith, P.J. (1990).** Systematic status of the rock lobsters *Jasus edwardsii* from New Zealand and *J. novaehollandiae* from Australia. N.Z.J. mar. Freshwat. Res. 24: 239-249
- Brown, G.G. and Simpson, M.V. (1982).** Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 3246-3250.
- Brown, W.M. (1985).** The mitochondrial genome of animals. In. Molecular Evolutionary Genetics, R. J. Macintyre (eds.), Plenum Press, New York, 95 - 130.
- Carvalho, G.R. and Hauser, L. (1994).** Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 4: 326-350.
- Cenis, J.L., Perez, P. and Fereres, A. (1993).** Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. Ann. Entomol. Soc. Am. 86: 545 - 550.
- Creech, S. (1991).** An electrophoretic investigation of populations of *Atherina boyeri* Risso, 1810 and *A. presbyter* Cuvier, 1829 (Teleostei: Atherinidae): genetic evidence in support of the two species. Journal of fish biology. 39:807-816.
- Cronin, M.A., Spearman, W.J., Wilmot, R.L., Patton, J.C. and Bickham, J.W. (1993).** Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 50: 708-715.
- Davidson, R.G., Cortner, G.A., Ratazzi, M.C., Ruddle, R.H. and Lups, H.A. (1970).** Genetic polymorphisms of human mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase. Science. 169: 391.
- 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: 1606-1612.

Dewayne, Shoemaker, D., Ross, K.G. and 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.

Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5c. Department of Genetics, SK-50, University of Washington, Seattle, WA.

Gray, M.W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. Annual Reviews in Ecology and Systematics. 5: 25-50.

Goldberg, E. (1990). Developmental expression of Lactate dehydrogenase isozymes during spermatogenesis. In: Isozymes: Structure, function and use in Biology and Medicine (Rattazzi G.C., Scandalios J.G. and Whitt G.S., eds.), 49-52. Alan R. Liss, New York.

Guyomard, R. and Krieg, F. (1983). Electrophoretic variation in six populations of brown trout (*Salmo trutta*, L.). Can. J. Genet. Cytol. 25: 403 - 413.

Gyllensten, U. (1985). The genetic structure of fish: Differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous and freshwater species. J. Fish. Biol. 26: 691-699.

Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Molecular Ecology. 1: 55-64.

Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. (1989). Allozyme diversity in plant species. In: Plant population genetics, breeding and genetic resources (eds Brown, Clegg, Kahler, Weir), 43-63. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Harris, H. (1966). Enzyme polymorphisms in man. Proc. R. Soc. 164 B: 298 - 310.

Harris, H. and Hopkinson, D. (1976). Handbook of enzyme electrophoresis in Human Genetics. North Holland publishing company, Amsterdam.

- Hindar, K., Ryman, N. and Utter, F. (1991).** Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 945-957.
- Ihssen, P., Booke, H., Casselman, J., McGlade, J., Payne, N. and Utter, F. (1981).** Stock identification: Materials and Methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1838-1855.
- Johansen, S., Guddal, P.H. and Johansen, T. (1990).** Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Research.* 18: 411 - 419.
- 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, USA.* 86: 6196-6200.
- Lanfranco, L., Wyss, P., Marzachi, C. and 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.
- Lavery, S. and Shaklee, J.B. (1991).** Genetic evidence for separation of two sharks, *Carharinus limbatus* and *C. tilstoni*, from Northern Australia. *Mar. Biol.* 108: 1-4.
- Lee, W.J., Conroy, J., Howell, W.H. and Kocher, T.D. (1995).** Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.* 41: 54-66.
- Lewontin, R.C. and Hubby, J.L. (1966).** A molecular approach to the study of genetic variation in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics.* 54: 595 -609.

- Li, S.S.L., Fitch, W.M., Pan, Y.C.E. and Sharief, F.S. (1983).** Evolutionary relationships of vertebrate LDH isozymes A₄ (muscle), B₄ (heart) and C₄ (testis). *J. Biol. Chem.* 258: 7029-7032.
- Lighy, W.de (1969).** Serological and biochemical studies in fish population. *Oceanogr. mar. Biol. Ann. Rev.* 7: 411 -513.
- Lynch, M. and Milligan, B.G. (1994).** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology.* 3: 91-99.
- Mailer, R.J., Scarth, R. and 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. and Triantaphyllidis, C. (1998a).** Genetic protein variation in red mullet (*Mullus barbatus*) and striped red mullet (*M. surmuletus*) populations from the Mediterranean Sea. *Marine Biology.* 130: 353-360.
- Mamuris, Z., Apostolidis, A.P., Theodorou, A.J. and Triantaphyllidis, C. (1998b).** Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Biology.* 132: 171-178.
- Markert, C.L. and Whitt, G.S. (1968).** Molecular varieties of isozymes. *Experientia.* 24: 977-991.
- Markert, C.L., Shaklee, J.B. and Whitt, G.S. (1975).** Evolution of a gene. *Science.* 189: 102-114.
- Martin, A.P. and Palumbi, S.R. (1993).** Body size, metabolic rate, generation time and the molecular clock. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 4087-4091.
- Matson, R.H. (1989).** Distribution of the testis specific LDH-X among avian taxa with comments on the evolution of the LDH gene family. *Syst. Zool.* 38: 106-115.

- Meyer, A. (1993).** Evolution of mitochondrial DNA in fish. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fish, Vol. 2, Hochachka, P. W. & T. P. Mommsen (eds.) Elsevier Press, 1-38.
- Mitton, J.B. and Grant, M.C. (1984).** Associations among protein heterozygosity, growth rate and developmental homeostasis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 479-499.
- Moritz, C., Dowling, T.E. and Brown, W.M. (1987).** Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 18: 269 - 292.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase – catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155:335-350.
- Naish, K.A., Warren, M., Bardacki, F., Skibinski, D.O.F., Carvalho, G.R. and Mair, G.C. (1995).** Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Molecular Ecology.* 4: 271-274.
- Normark, B.B., McCune, A.R. and Harrison, R.G. (1991).** Phylogenetic relationships of neopterygian fish, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution.* 8: 819-834.
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L. and Grabowski, G. (1991).** The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, 23 pp.
- Park, L. and Moran, P. (1994).** Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish. Biol. Fisheries.* 4: 272-299.
- Phillip, D.P. (1991).** Genetic implications of introducing Florida largemouth bass, *Micropterus Salmoides floridanus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 58-65.

- Rehse, P. and Davidson, W. (1986).** Evolutionary relationship of a fish C type lactate dehydrogenase to other vertebrate lactate dehydrogenase isozymes. *Canad. J. Fisheries Aquat. Sciences.* 43: 1045 -1051.
- Rossi, A.R., Capula, M., Crosetti, D., Sola, L. and Campton, D.E. (1998).** Allozyme variation in global populations of striped mullet, *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae). *Mar. Biol.* 131: 203-212.
- Russell, P.G. (1992).** Genetics, Third Edition. Harper Collins Publishers Inc., New York.
- Ryman, N., Lagercrantz, L., Anderson, R., Chkakraborty, R. and Rosenberg, R. (1984).** Lack of correspondence between genetic and morphological variability patterns in Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Heredity.* 53: 687-704.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H, Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erich, H.A. (1988).** Primer detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487 - 491.
- Schwantes, M.L.B. and Schwantes, A.R. (1982).** Adaptive features of ectothermic enzymes - I. Temperature effects on the malate dehydrogenase from a temperature fish *Leiostomus xanthurus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B: 49-58
- Shaklee, J.B., Allendorf, F.W., Morizot, D.C. and Whitt, G.S. (1990).** Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 2-15.
- Shaklee, J.B., Kepes, K.L. and Whitt, G.S. (1973).** Specialized Lactate Dehydrogenase Isozymes: The molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDHs of teleost fishes. *J. Exp. Zool.* 185: 217-240.
- Skorkowski, E.F. (1988).** Mitochondrial malic enzyme from crustacean and fish muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 19-24.

- Sick, K. (1961).** Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature*, London. 192: 894 -896.
- 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, 177-199.
- 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.
- Smith, P.J. and Robertson, D.A. (1981).** Genetic evidence for two species of sprat (*Sprattus*) in New Zealand waters. *Mar. Biol.* 62: 227-233.
- Smith, P.J., Wood, B.A. and Benson, P.G. (1979).** Electrophoretic and meristic separation of blue maomao and sweep. *N.Z.J. mar. Freshwat. Res.* 13: 549-551.
- Swofford, D.L. and Selander, R.B. (1989).** BIOSYS-I. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Taggart, J., Ferguson, A. and Mason, F. (1981).** Genetic variation in Irish populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) Electrophoretic analysis of allozymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 393-412.
- 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, 29-64.
- Waples, R. (1987).** A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution.* 41(2): 385-400.
- Ward, R.D. and Grewe, P.M. (1994).** Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 4: 300-325.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research.* 18: 7213-7218.

- Welsh, J., Peterson, C. and Mc Clelland, M. (1991).** Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.* 19: 303-306.
- Whitt, G.S. (1970).** Genetic variation of supernatant and mitochondrial malate dehydrogenase isozymes in the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Experientia.* 26/27: 734-736.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 18: 6531-6535.
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., (1985).** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26: 375-400.
- Wilson, A.C., Kaplan, N.O., Levine, L., Pesce, A., Peichlin, M. and Allison, W.S. (1964).** Evolution of lactic dehydrogenases. *Fed. Proc.* 23: 1258-1266.
- Wolstenholme, D.R. (1992).** Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology.* 141: 173 - 216.

