

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ - ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πληθυσμιακή δομή του εδώδιμου ασκιδίου *Microcosmus sabatieri* με
χρήση RAPD ως μοριακού δείκτη



ΝΕΣΤΟΡΑΣ Γ. ΚΑΠΕΤΑΝΙΟΣ

ΒΟΛΟΣ 2006

Πληθυσμιακή δομή του εδώδιμου ασκιδίου *Microcosmus sabatieri* με χρήση RAPD ως μοριακού δείκτη

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

1. Εξαδάκτυλος Αθανάσιος. Λέκτορας.

Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
(Επιβλέπων).

2. Βαφείδης Δημήτριος. Επίκουρος Καθηγητής.

Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπόνδυλων και άμεση – έμμεση
χρησιμότητα τους. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (Μέλος).

3. Κορμάς Κωνσταντίνος. Επίκουρος Καθηγητής.

Οικολογία Υδάτινης Στήλης με έμφαση στα Μικροβιακά και Τροφικά Είδη.
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (Μέλος).

Στους γονείς μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η εργαστηριακή μελέτη έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του Τμήματος σε έναν άρτια εξοπλισμένο εργαστηριακό χώρο που μου παρείχε πολλές και σημαντικές εμπειρίες στο δύσκολο αλλά παράλληλα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο της Γενετικής και της Μοριακής Βιολογίας και με δίδαξε πολλά τόσο επιστημονικά όσο και απλά καθημερινά πράγματα που θα μείνουν για πάντα χαραγμένα στη μνήμη μου.

Η έμφαση και η εμπειριστατωμένη ανάλυση που δόθηκε στις παραδόσεις του μαθήματος «Γενετική Διατήρησης Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών» από την πλευρά του διδάσκοντος κ. Αθανάσιου Εξαδάκτυλου έστρεψε το ενδιαφέρον μου μέσα από τα κατάλληλα ερεθίσματα που μου δόθηκαν στον τομέα αυτό. Με βάση τα επιστημονικά δεδομένα και τις βιβλιογραφικές αναφορές, καθώς και το πρόσφορο έδαφος, για περαιτέρω μελέτη, μου προτάθηκε από τον κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο η μελέτη του συγκεκριμένου θέματος.

Θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η γενετική δομή και η καταγραφή των αποθεμάτων του ασκιδίου *Microcosmus sabatieri* ενός εδώδιμου θαλάσσιου οργανισμού σε αρκετά υψηλή θέση στην τροφική αλυσίδα και εξέλιξη των ειδών. Οι προβληματισμοί μας ήταν ποικίλοι και κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας γεννήθηκαν πολλά ερωτήματα τα οποία πρέπει να απαντηθούν, όπως για παράδειγμα εάν το είδος αυτό σχηματίζει γενετικά απομακρυσμένους μεταξύ τους πληθυσμούς.

Μέσα όμως από την καταγραφή, την ταξινόμηση, την ανάλυση αλλά και την ερμηνεία των αριθμητικών δεδομένων, ευελπιστούμε ότι συνεισφέραμε στο ελάχιστο στην μελέτη και περαιτέρω ανάλυση του δύσκολου αυτού οργανισμού και της Πληθυσμιακής Γενετικής γενικότερα.

Είναι αυτονόητο ότι η διεξαγωγή της παρούσας εργασίας θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί χωρίς την ουσιαστική συμβολή και την πολύτιμη βοήθεια πολλών ανθρώπων. Θεωρώ υποχρέωση μου να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου σε όλους όσους με βοήθησαν ποικιλοτρόπως και με υποστήριξαν στην προσπάθεια αυτή προσπαθώντας να μην παραλείψω και να μην αδικήσω κανέναν.

Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, Λέκτορα του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος αρχικά για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτό το αντικείμενο και να φοράω την αγαπημένη και πολυπόθητη λευκή ποδιά όλη την ημέρα.... και ένα μεγάλο ευχαριστώ για τα πράγματα που μου δίδαξε, τα ιδανικά και τις αξίες που μου μετέφερε για την μετέπειτα επιστημονική, ερευνητική πορεία μου αλλά και για την απλή καθημερινή ζωή.

Θερμά ευχαριστώ επίσης στον κ. Δημήτρη Βαφείδη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος για τις τόσο σημαντικές πληροφορίες και γνώσεις που μου έδωσε αλλά και για την συλλογή των δειγμάτων τα οποία χωρίς τη δική του συνεισφορά θα ήταν πολύ δύσκολο να βρεθούν και να μελετηθούν. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Κωνσταντίνο Κορμά, Επίκουρο Καθηγητή για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθεια του κατά τη διεξαγωγή του πειράματος στο εργαστήριο και τις πολύτιμες και χρήσιμες γνώσεις που μου μετέφερε.

Τον Πρόεδρο του Τμήματος Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Γεωργουλάκη για τις παραινέσεις και τις νουθεσίες του τα δύο αυτά χρόνια στο Βόλο αλλά και τον Καθηγητή κ. Χρήστο Νεοφύτου Διευθυντή - Συντονιστή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του Τμήματος για την ευκαιρία που μου έδωσαν να κάνω πραγματικότητα αυτό το πολύτιμο για μένα βήμα στην επαγγελματική μου σταδιοδρομία.

Πολύτιμες και άξιες λόγου θεωρώ τις συμβουλές και την καθοδήγηση του κ. Μάριου Σαπουντζή, της κ. Παναγιώτας Παναγιωτάκη και της κ. Έλενας Μεντέ κατά τη διάρκεια των σπουδών αυτών και τους ευχαριστώ. Ευχαριστώ επίσης την φίλη μου Ιωάννα Ιορδανίδου για την συμπαράσταση και την ηθική κυρίως υποστήριξη κατά τη διάρκεια αυτού του δύσκολου κομματιού του μεταπτυχιακού προγράμματος και τον Νικόλαο Βλάχο γιατί με πίστεψε και με βοήθησε σε δύσκολες στιγμές της φοιτητικής αλλά και προσωπικής μου ζωής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον πρωτεργάτη του εργαστηρίου που με φιλοξένησε, πολύτιμο «δάσκαλο» αλλά και φίλο Γιώργο Γκάφα και στη φίλη και συνοδοιπόρο στο εργαστήριο και στο Μεταπτυχιακό Βασιλική Κοντογιάννη (Βάσω, για όσους δεν την γνωρίζετε!!) που με υπέμειναν και με βοήθησαν υλικά και ψυχολογικά τις ατελείωτες ώρες που περάσαμε μαζί στο χώρο του εργαστηρίου και στους αγαπημένους μου φίλους Κατερίνα Γεωργάκη και Βαλάντη Αλεβίζο για την ηθική τους κυρίως συμπαράσταση τα χρόνια αυτά...του «Βόλου».

Τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου Γιώργο και Σοφία και στις αδερφές μου Δήμητρα και Χρυσούλα για την αμέριστη ηθική και υλική ανιδιοτελή συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια και το γεγονός ότι στέκονται αρωγοί σε κάθε μου προσπάθεια, όποια και αν είναι αυτή....

και στα αγαπημένα μου ανίμια Θοδωρή, Αντζελα, Βασιλική και Παναγιώτη για τις στιγμές ηρεμίας και ξεγνοιασιάς που μου προσέφεραν σε δύσκολες στιγμές.

Τέλος ευχαριστώ όσους ασχολήθηκαν με αυτόν τον κλάδο και μεταλαμπάδευσαν τις γνώσεις τους σε εμάς τους νεότερους και σε όλους αυτούς που συνέβαλλαν άμεσα ή έμμεσα στην πραγματοποίηση αυτής της Μεταπτυχιακής Διατριβής αλλά και αυτού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος γενικότερα.

Αυτά τα δύο χρόνια θα μου μείνουν πραγματικά αξέχαστα....

Σας ευχαριστώ όλους!!

Νέστορας_

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Ασκίδια αποτελούν μια σημαντική κλάση βενθικών οργανισμών και ανήκουν στο υπόφυλο Ουροχορδωτά του φύλου των Χορδωτών (Chordata). Είναι γενικά οργανισμοί που έχουν μελετηθεί κυρίως για την βιολογία τους, αλλά το κομμάτι της γενετικής και ειδικότερα της πληθυσμιακής γενετικής είναι ακόμη πολύ δύσκολο λόγω της δυσκολίας εύρεσης δειγμάτων, αλλά κυρίως λόγω της δυσκολίας να αναπτυχθούν και να διατηρηθούν σε εργαστηριακό χώρο. Στην παρούσα εργασία μελετάται ο γενετικός πολυμορφισμός του ασκιδίου *Microcosmus sabatieri* Roule, 1885 από έξι πληθυσμούς στον Ελλαδικό χώρο.

Συνολικά 198 δειγμάτα συλλέχθηκαν από τη Νήσο Αστυπάλαια, την περιοχή Τρίκερι, τον Πλατανιά Μαγνησίας, τον Μαλιακό κόλπο και από την περιοχή Αγ. Νικολάου στο Νομό Αττικής. Η συλλογή των δειγμάτων ξεκίνησε τον Ιούνιο του 2005 και ολοκληρώθηκε τον Αύγουστο του 2006. Αρχικά τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, όπου μετρήθηκε το μήκος χιτώνα, το πλάτος χιτώνα και το υγρό βάρος γονάδας. Για τη μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού μεταξύ των ειδών επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (RAPD) ως μοριακός δείκτης. Η αρχική μελέτη στον εργαστηριακό χώρο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, όπου έλαβε χώρα η πειραματική διαδικασία, ήταν να γίνει η εξαγωγή γενομικού DNA και να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Η RAPD δοκιμάστηκε με τη χρήση Taq πολυμεράσης σε 31 γενετικούς δείκτες (primers), ώστε να δώσουν καλύτερα προϊόντα, από τους οποίους επιλέχθηκαν οι 8 και έδωσαν τα κατάλληλα αποτελέσματα στην PCR.

Στο σύνολο των ατόμων που συλλέχθηκαν, μελετήθηκαν και αναλύθηκαν 22 γενετικοί τόποι μεταξύ των 6 πληθυσμών. Από την επεξεργασία των μορφομετρικών χαρακτηριστικών παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Η συνολική ετεροζυγωτία ήταν υψηλή ($Total H_e = 0.499$), αλλά όχι στατιστικά σημαντική ($H_o = 0.311$), γεγονός που συνεπάγεται ότι παρατηρείται έλλειμμα ετεροζυγωτίας μεταξύ των ατόμων των πληθυσμών που συλλέχθηκαν. Οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν δεν ακολουθούν το Νόμο Hardy-Weinberg, ή δεν βρίσκονται ακόμη σε γενετική ισορροπία και αποδεικνύεται ότι δεν υπάρχει τυχαία διασταύρωση μεταξύ των ατόμων. Ο συντελεστής παραλλακτικότητας ($Total F_{ST} = 0.286$) βρέθηκε αρκετά υψηλός και ο συνδυασμός του δείκτη αυτού σε σύγκριση πληθυσμών ανά ζεύγη είναι στατιστικά σημαντικός στο (P_{99} criterion) για όλους τους πληθυσμούς και για όλους τους γενετικούς τόπους που βρέθηκαν και αναλύθηκαν.

Τα δεδομένα που αναλύθηκαν δείχνουν χαμηλή γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών, αφού η τιμή του δείκτη γονιδιακής ροής βρέθηκε ότι ισούται ($N_m = 0.046$). Από την ανάλυση των δεδομένων και με τη βοήθεια στατιστικών και γενετικών προγραμμάτων αποτυπώθηκαν τα Δενδρογράμματα των γεωγραφικών αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών στα οποία μπορεί κανείς να διακρίνει έναν όχι στατιστικά σημαντικά διαχωρισμό των ατόμων, μεταξύ Νοτιοανατολικών και Βορειοανατολικών πληθυσμών του Αιγαίου Πελάγους.

Λέξεις κλειδιά: Ασκίδια, Τυχαία Ενίσχυση Πολυμορφικού DNA, εκκινητές.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ΤΑ ΑΣΚΙΔΙΑ.....	10
1.2 ΤΟ ΕΙΔΟΣ	16
1.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	19
1.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	20
1.5 ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ, ΑΛΛΟΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	24
1.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΗΛΙΔΩΝ – ΣΗΜΑΔΙΩΝ DNA (Southern Blot)	26
1.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA (RFLPs).....	28
1.8 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ (SSCP).....	29
1.9 ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΟΙ (Microsatellites)	30
1.10 ΤΥΧΑΙΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΟΥ DNA (RAPD).....	32
1.11 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ .	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
2.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ PCR.....	50
2.2 ΣΤΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	51
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
3.1 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	52
3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	62
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75
6 ABSTRACT.....	85
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	88

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τις βασικότερες παραμέτρους για τη σωστή διαχείριση των αλιευτικών πόρων είναι ο προσδιορισμός των διαφορετικών αποθεμάτων των εμπορικά σημαντικών ειδών και η γνώση της γενετικής τους δομής. Αν και τα είδη μπορεί να έχουν εκτεταμένη γεωγραφική εξάπλωση, πιθανόν να αποτελούνται από διαφορετικούς πληθυσμούς με διαφορετικά πεδία αναπαραγωγής. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει στη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών, δηλαδή στην ύπαρξη γενετικά διακριτών αποθεμάτων.

Για τον προσδιορισμό διαφορετικών αποθεμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν διάφοροι παράμετροι όπως μελέτη οικολογικών, φυσιολογικών ή μορφολογικών χαρακτηριστικών, καθώς επίσης και διάφοροι τύποι μαρκαρίσματος κ.α. Η αλματώδης όμως άνοδος της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής άνοιξε νέους δρόμους στην καταγραφή και μελέτη των ειδών. Τα τελευταία χρόνια έχει δημοσιευθεί πλήθος εργασιών που αφορούν τη μελέτη της γενετικής δομής διάφορων εμπορικά σημαντικών ειδών.

Για παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί ότι έχει μελετηθεί η ρέγγα (*Clupea harengus*), ο μπακαλιάρος (*Gadus morhua*) (King, 1983; Ryman et al., 1984; Mork et al., 1985), το λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*) κ.α. Τα σολομοειδή (Salmonidae) έχουν μελετηθεί σε σημαντικό βαθμό καθώς επίσης και μεγάλος αριθμός τροπικών και διακοσμητικών ψαριών. Οι εκτεταμένες αυτές μελέτες αποδείχθηκαν πολύτιμες για τον καθορισμό διαφορετικών αποθεμάτων.

Η ανάπτυξη ωστόσο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) συνέβαλλε σημαντικά στην καλύτερη ανάλυση της διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών. Στην Ελλάδα παρόμοιες μελέτες έχουν γίνει για τη σαρδέλα (*Sardina pilchardus*), το γαύρο (*Engraulis encrasicolus*), την τσιπούρα (*Sparus auratus*), την κουτσομούρα (*Mullus barbatus*), το μελανούρι (*Oblanda melanura*), το σαργό (*Diplodus sargus*) (Spanakis et al., 1989: Μαγουλάς 1990: Σοφρωνίδης 1993: Mamuris et al., 1998: Παπατριανταφύλλου κ.α, 1996).

Η διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας αποτελεί μια ουσιαστική παράμετρο στα διαχειριστικά προγράμματα πολλών ειδών. Η γενετική ποικιλότητα είναι ο παράγοντας που επιτρέπει στα είδη να προσαρμόζονται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και να ανταποκρίνονται σε προγράμματα επιλογής ή εκτροφής.

Η εκτίμηση της χρήσης των γενετικών-μοριακών δεικτών οφείλεται κατά κύριο λόγο στις παρατηρούμενες συμπεριφορές και μεταναστεύσεις (γονιδιακή ροή) στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η δυνατότητα εφαρμογής των μοριακών δεικτών στη διαχείριση ιχθυοπληθυσμών έχει αναγνωρισθεί από καιρό (Utter, 1991). Η χρήση τους δεν έχει αποδειχθεί μόνο πολύτιμη για τον διαχωρισμό των ιχθυοπληθυσμών αλλά και για τη σημασία τους και σπουδαιότητα των εξελικτικών δυνάμεων που δρουν σε αυτούς και τους διαφοροποιούν.

Η μελέτη των γενετικών δεικτών ασκεί σημαντικές επιδράσεις σε τρεις τομείς της ιχθυολογίας:

- α) **στον προσδιορισμό και την ανάλυση της δομής των ιχθυοαποθεμάτων:** εξασφάλιση διατήρησης των πόρων με παράλληλη μεγιστοποίηση των οικονομικών κερδών, διαρκής εκμετάλλευση των αλιευτικών πηγών (αειφορία).
- β) **στις υδατοκαλλιέργειες:** έλεγχος των επιπέδων γενετικής ποικιλότητας, έλεγχος των εισαγόμενων ή μεταφερόμενων πληθυσμών για γεννήτορες.
- γ) **στην αναγνώριση και διάκριση των ειδών:** διαλεύκανση ταξινομικών προβλημάτων, αναπαραγωγική και γεωγραφική απομόνωση, αναγνώριση ειδών σε νεαρά στάδια, αναγνώριση ειδών από απολιθώματα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εξέταση του γενετικού πολυμορφισμού σε άτομα του εδάδιμου ασκιδίου *Microcosmus sabatieri*, Roule, 1885 από έξι διαφορετικές περιοχές του Ελλαδικού χώρου και η εκτίμηση του βαθμού διαφοροποίησης της γενετικής απόστασης του είδους μεταξύ αυτών των έξι περιοχών, όπου θα συμβάλει στη διαχείριση και κατανόηση της βιολογίας του είδους.

1.1 ΤΑ ΑΣΚΙΔΙΑ

Τα πλέον οικεία για τους περισσότερους ανθρώπους ζώα ανήκουν στα Χορδωτά. Σ' αυτά ανήκουν και οι άνθρωποι, οι οποίοι μοιράζονται με αυτά, το χαρακτηριστικό από το οποίο πήρε το όνομα του το φύλο, τη νωτιαία χορδή (ελλην. νώτον ράχη, ελλην. χορδή). Όλα τα μέλη του φύλου διαθέτουν αυτή την κατασκευή είτε κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης τους είτε καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους.

Υπόφυλο Ουροχορδωτά (Χιτινόζωα) (Εικόνα 1). Τα Ουροχορδωτά, περιλαμβάνουν περίπου 3000 είδη. Απαντώνται σε όλες τις θάλασσες, από τις παράκτιες αβαθείς περιοχές, μέχρι τα μεγάλα βάθη. Τα περισσότερα ως ενήλικα άτομα είναι εδραίοι, αν και μερικά είναι πελαγικοί οργανισμοί. Το όνομα Χιτινόζωα προέρχεται από τον συνήθως ανθεκτικό ή σκληρό χιτώνα που περιβάλλει το ζώο και περιέχει κυτταρίνη (Λαζαρίδου, 1992).

Στο στάδιο του ενήλικου ατόμου τα Χιτινόζωα είναι πολύ εξειδικευμένα Χορδωτά και στα περισσότερα είδη μόνο η προνυμφική μορφή, η οποία μοιάζει με γυρίνο, διαθέτει τα διαγνωστικά χαρακτηριστικά των Χορδωτών. Κατά τη μεταμόρφωση σε ώριμα άτομα, η νωτιαία χορδή, η οποία στην προνύμφη περιορίζεται στην ουρά (Ουροχορδωτά) και η ουρά εξαφανίζονται, ενώ το ραχιαίο νευρικό σχοινίο, υποπλάσσεται και περιορίζεται σε ένα μόνο γάγγλιο.

Τα Ουροχορδωτά διαιρούνται σε τρεις κλάσεις: τα Ασκίδια, τους Κωπηλάτες και τα Θαλειοειδή. Τα Ασκίδια περιλαμβάνουν τις πλέον κοινές και γνωστές μορφές και τον μεγαλύτερο αριθμό ειδών. Μερικά είδη εκτοξεύουν με δύναμη νερό από το σίφωνα εξόδου, όταν ερεθιστούν. Σχεδόν όλα τα είδη Ασκιδίων είναι εδραίοι οργανισμοί.

Προσκολλώνται σε βράχους ή σε άλλες σκληρές επιφάνειες, όπως τα ύφαλα των πλοίων ή προβλήτες. Σε πολλές περιοχές συγκαταλέγονται μεταξύ των αφθονότερων ζώων της διαπαλίρροιακής ζώνης. Τα Ασκίδια μπορεί να είναι μονήρη, αποικιακά ή σύνθετα. Κάθε άτομο στις μονήρεις ή αποικιακές μορφές διαθέτει τον δικό του χιτώνα, αλλά στις σύνθετες πολλά άτομα μοιράζονται τον ίδιο χιτώνα.

Τα μονήρη ασκίδια είναι συνήθως σφαιρικές ή κυλινδρικές μορφές. Ο χιτώνας επενδύεται από μια εσωτερική μεμβράνη, τον μανδύα. Στην εξωτερική επιφάνεια υπάρχουν δύο προεκβολές, ο σίφωνα εισόδου ή στοματικός σίφωνα, που αντιστοιχεί στο πρόσθιο άκρο του σώματος και ο σίφωνα εξόδου ή εδρικός σίφωνα που καθορίζει τη ραχιαία πλευρά. Όταν το ασκίδιο εκτείνει το σώμα του, το νερό περνά από τον σίφωνα εισόδου στον ευρύχωρο βλεφαριδοφόρο φάρυγγα ο οποίος υποδιαιρείται σε μικρότατα τμήματα, από τις βραγχιακές σχισμές, σχηματίζοντας μια περίπλοκη κατασκευή σαν καλάθι του μπάσκετ. Το νερό περνά μέσα από τις βραγχιακές σχισμές σε μια περιβραγχιακή κοιλότητα και στη συνέχεια στο εξωτερικό περιβάλλον από τον σίφωνα εξόδου (Λαζαρίδου, 1992).

Το κυκλοφορικό σύστημα περιλαμβάνει μια κοιλιακή καρδιά και δύο μεγάλα αγγεία, ένα σε κάθε πλευρά της καρδιάς. Αυτά τα αγγεία διαιρούνται σε ένα διάχυτο σύστημα μικρότερων αγγείων και χώρων που εξυπηρετούν τον φάρυγγα, όπου συντελείται η ανταλλαγή των αερίων, τα πεπτικά όργανα, τις γονάδες και τις άλλες δομές. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του κυκλοφορικού συστήματος, που δεν απαντάται σε άλλα Χορδωτά είναι ότι η καρδιά ωθεί το αίμα αρχικά προς μια κατεύθυνση, για λίγους παλμούς, σταματά και αντιστρέφει τη ροή κατεύθυνσης του αίματος προς την αντίθετη κατεύθυνση για λίγους παλμούς.

Ένα άλλο επίσης εντυπωσιακό χαρακτηριστικό είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις σπάνιων στοιχείων στο αίμα, όπως για παράδειγμα το βανάδιο και το νιόβιο. Η συγκέντρωση του βαναδίου στο γένος *Ciona* sp. μπορεί να είναι δύο εκατομμύρια φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση του βαναδίου στο νερό. Ο ρόλος αυτών των δύο σπάνιων μετάλλων στο αίμα των Ασκιδίων παραμένει ανεξιχνίαστος. Το νευρικό σύστημα περιορίζεται σε ένα νευρικό γάγγλιο και ένα πλέγμα νεύρων στη ραχιαία πλευρά του φάρυγγα. Κάτω από το νευρικό γάγγλιο βρίσκεται ένας υπονευρικός αδένας που συνδέεται με έναν αγωγό με τον φάρυγγα.

Ο αδένας αυτός ελέγχει το νερό που εισέρχεται στο φάρυγγα και μπορεί δε συμπληρωματικά να εκτελέσει ενδοκρινική λειτουργία που έχει σχέση με την αναπαραγωγή. Στα ώριμα άτομα δεν υπάρχει η νωτιαία χορδή. Τα Ασκίδια είναι ερμαφρόδιτα και συνήθως στο ίδιο άτομο υπάρχει μια ωοθήκη και ένας όρχις. Τα γεννητικά κύτταρα μεταφέρονται με αγωγούς στην περιβραγχιακή κοιλότητα και στη συνέχεια στο περιβάλλον νερό όπου συντελείται η γονιμοποίηση.

Από τα τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά των Χορδωτών, τα ενήλικα Χιτινόζωα διαθέτουν μόνο τις φαρυγγικές σχισμές. Όμως τα προνυμφικά τους στάδια αποκαλύπτουν το μυστικό της πραγματικής τους σχέσης. Η προνύμφη που μοιάζει με γυρίνο είναι μια επιμήκης, διαφανή μορφή, που έχει και τα τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά: νωτιαία χορδή, κοίλο ραχιαίο νευρικό σχοινίο, προωθητική μεταεδρική ουρά και έναν ευρύ φάρυγγα με ενδόστυλο και φαρυγγικές σχισμές.

Η προνύμφη δεν τρέφεται, αλλά κολυμπά μερικές ώρες προτού προσκολληθεί με τις προκολλητικές της θηλές κάθετα σε ένα στερεό αντικείμενο. Στη συνέχεια υπόκειται σε δραματική μεταμόρφωση και μετατρέπεται σε ένα εδραίο ενήλικο άτομο, τόσο τροποποιημένο, ώστε είναι αδύνατη η τοποθέτηση του στα Χορδωτά.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός Ασκιδίου.

Μέχρι τα μέσα του 19^{ου} αιώνα οι επιστήμονες αλλά και όλοι όσοι ασχολούνταν με τη θάλασσα, πίστευαν, ότι δεν υφίσταται ζωή κάτω από τα 550 m βάθος. Πολλές διαδοχικές αποστολές είχαν φέρει στην επιφάνεια άγνωστα είδη, όπως τα Χιτινόζωα και έτσι μεγάλωσε το μέχρι τότε βάθος που πίστευαν ότι υπήρχε και μπορούσε να αναπτυχθεί ζωή. Σταθμός θεωρείται μια αποστολή του H. M. S Challenger το 1872 – 1876, όπου ήρθαν στην επιφάνεια ασκίδια τα οποία συλλέχθηκαν σε βάθος 5350 m (Herdman, 1882).

Μέχρι τον 20^ο αιώνα δεν υπήρχαν πολλές μελέτες και δημοσιευμένες εργασίες που να αφορούν την οικολογία και την συμπεριφορά των ασκιδίων και των Χιτινόζωων γενικότερα. Ο Abbott (1957) και ο Berner (1957), αναφέρουν τα πρώτα βιβλιογραφικά στοιχεία που αφορούν την οικολογία των πελαγικών Ασκιδίων.

Η αναφορά αυτή περιείχε συγκεντρωτικά στοιχεία των μελετών του Thompson (1930, 1931, 1932, 1934), του Berrill (1950) αλλά και του Dybern (1969) και άλλων επιστημόνων, δίνοντας έτσι μια συνοπτική άποψη για τα Ασκίδια την οποία ο Millar (1971) παρουσίασε πιο εμπειριστατωμένα και έτσι μια νέα εποχή για την μελέτη αυτών των οργανισμών ξεκίνησε.

Οι περιβαλλοντικές μεταβλητές, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της κατανομής των ασκιδίων είναι η θερμοκρασία (Brunetti et al., 1985; Marin et al., 1987; Nomaguchi et al., 1997), η αλατότητα (Sims, 1984; Toop and Wheatly, 1993; Vasquez and Young, 2000), το φως (Lambert and Brandt, 1967; Olson, 1983; Young and Chia, 1984; Durante, 1991) καθώς και η υδροδυναμική του νερού (Young and Braithwaite, 1980; Havenhand and Svane, 1991).

Γενικά υπάρχει μια ανθεκτικότητα σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών παρά στην αλατότητα, με μερικά είδη να επιζούν μόνο σε αλατότητα χαμηλότερη του 25 ‰. Η θέρμανση των ωκεανών λόγω του φαινομένου El Nino και η γενικότερη αύξηση της μέσης θερμοκρασίας προκαλεί αλλαγή στον μεταβολισμό πολλών ειδών ασκιδίων.

Η αλλαγή αυτή γίνεται έτσι ώστε να μπορέσει ο οργανισμός να αντεπεξέλθει στις «νέες» περιβαλλοντικές συνθήκες. Είναι γενικά οργανισμοί που εγκλιματίζονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Σχετικά λίγα είδη Ασκιδίων διαβιούν σε περιοχές με έντονη δράση κυμάτων, με τα περισσότερα είδη να απαντώνται σε σχετικά ήρεμα νερά αλλά με καλή κίνηση και ανακύκλωση του νερού (Abbott and Newberry, 1980; Carballo, 2000; Goodbody, 2000). Τα επιπλέοντα αυγά και έμβρυα σε μερικά είδη έχουν αναπτύξει ειδικούς μηχανισμούς ενάντια στην UV ακτινοβολία (Epel et al., 1999), όπως άλλωστε παρατηρείται και το έντονο χρώμα στον μανδύα του είδους *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (Hirose, 1999).

Υπάρχουν πολλές μελέτες και βιβλιογραφικές αναφορές σε σχέση με την επίδραση της ακτινοβολίας αλλά και τους μηχανισμούς που αναπτύσσουν κυρίως τα έμβρυα των Ασκιδίων για να προστατευτούν. Πολλά είδη, κυρίως αυτά που διαβιούν σε ρυπασμένα περιβάλλοντα, όπως λιμάνια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς και λειτουργούν ως συσσωρευτές βαρέων μετάλλων και τοξικών στοιχείων, όπως αρσενικό, κάδμιο, χρώμιο, κοβάλτιο, χαλκό, ψευδάργυρο κ.α (Papadopoulou and Kanias, 1977; Philp et al., 2003).

Τα περισσότερα από αυτά τα στοιχεία είναι πολύ τοξικά κυρίως για τα αυγά και τα έμβρυα των Ασκιδίων. Λόγω αυτής της αποικοδόμησης των βαρέων μετάλλων μερικά είδη Ασκιδίων δρουν ως δείκτες μόλυνσης των υδάτων (Monniott et al., 1986). Πολλά είδη είναι ευαίσθητα στη ρύπανση και στον ευτροφισμό των υδάτων από ανθρωπογενείς δραστηριότητες και συνήθως μειώνεται η ποικιλία και η ποσότητα των ατόμων (Naranjo et al., 1996; Goodbody, 1993). Όμως πολλά είδη όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες το επιτρέψουν μπορούν να ανακτηθούν και να πολλαπλασιαστούν γρήγορα (Rees et al., 2001).

Τα ασκίδια, τέλος, αποτελούν ανθρώπινη τροφή σε πολλά μέρη του κόσμου. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα είδη *Halocynthia roretzi* και *H. aurantium* εκτρέφονται στη Ιαπωνία και το είδος *S. clava* εκτρέφεται στην Κορέα ενώ το είδος *P. chilensis* αποτελεί σημαντικό τρόφιμο στη Χιλή (Davis 1995).

1.2 ΤΟ ΕΙΔΟΣ

Microcosmus sabatieri Roule, 1885



Εικόνα 2. το είδος *Microcosmus sabatieri* (www.google.gr)

Η συστηματική κατάταξη του είδους είναι η εξής:

- Φύλο: Chordata
- Υπόφυλο: Urochordata
- Κλάση: Ascidiacea
- Τάξη: Stolidobranchia
- Οικογένεια: Pyuridae
- Γένος: *Microcosmus*
- Είδος: *sabatieri*

Το γένος *Microcosmus* περιλαμβάνει έξι είδη που εξαπλώνονται στην Ανατολική Μεσόγειο και απαντώνται στις Ελληνικές ακτές. Από τα είδη αυτά τρία είναι εμπορεύσιμα και εδώδιμα:

M. sabatieri (κοινή ονομασία φούσκα)

M. vulgaris (κοινή ονομασία αμμόφουσκα)

M. polymorphus (κοινή ονομασία βραχύφουσκα)

Το είδος *M. sabatieri* μορφολογικά διακρίνεται από τον παχύ του χιτώνα ο οποίος φέρει πολυάριθμες αναδιπλώσεις πάνω στον οποίο βρίσκουν κατάλληλο υπόστρωμα εγκατάστασης επιβιοτικοί οργανισμοί. Ο εξωτερικός χρωματισμός του χιτώνα είναι καφέ ροζ σκούρο κοκκινωπό στη βάση προσκόλλησης και προς το κίτρινο στην περιοχή των σιφώνων. Σταθερό διαγνωστικό χαρακτήρα του είδους αποτελούν οι οκτώ βιολετί ταινίες που διατρέχουν τους σίφωνες. Ο μανδύας είναι κίτρινος, ροζ προς τους σίφωνες ενώ οι μύες κίτρινοι – πορτοκαλί. Τα βράγχια φέρουν επτά εσωτερικές μεσημβρινές πτυχές σε κάθε πλευρά, ενώ οι γονάδες είναι ογκώδεις καλύπτοντας ολόκληρο τον πεπτικό σωλήνα.

Το σωματικό μέγεθος του *M. sabatieri* είναι συνήθως από 10 – 15 cm ενώ ως μέγιστο έχει αναφερθεί 20 cm. Το είδος εξαπλώνεται σε όλη την έκταση της υποπαραλιακής και περιπαραλιακής ζώνης, προσκολλημένο σε βραχώδη υποστρώματα ή και πάνω σε συσσωματώματα βιογενών θρυμμάτων όπως για παράδειγμα νεκρά όστρακα από 1 – 200 m βάθος. Αναπαράγεται εγγενώς, με ενδιάμεσο πλαγκτικό προνυμφικό στάδιο, από το φθινόπωρο μέχρι την άνοιξη. Η αλιεία του είδους γίνεται με κατάδυση, ενώ συλλέγεται τυχαία με διάφορα αλιευτικά εργαλεία όπως τράτες, δίχτυα βυθού κ.α. Εμπορεύεται ζωντανό και καταναλώνεται ωμό ή μεταποιημένο (σπινιάλο)(Monniott et al., 1986).

Η διατροφή του είδους καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το βλεννώδες πλέγμα που εκκρίνεται από το ενδόστυλο. Η βλέννα ωθείται από τις βλεφαρίδες του φάρυγγα σε ένα έλασμα που υπάρχει στο εσωτερικό του φάρυγγα. Τα τροφικά σωματίδια που εισήλθαν με το ρεύμα του νερού συλλαμβάνονται από το βλεννώδες πλέγμα. Εκεί σχηματίζουν μαζί με τη βλέννα ένα ραβδί που με την κίνηση των βλεφαρίδων μεταφέρεται στον οισοφάγο και στο στομάχι. Τα θρεπτικά υλικά απορροφώνται στο μέσο έντερο, ενώ τα άπεπτα άχρηστα υλικά αποβάλλονται από την έδρα που βρίσκεται κοντά στο σίφωνα εξόδου (Hickman et al., 2001).

1.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Με την πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας των τελευταίων ετών και κυρίως έπειτα από τη μελέτη και τις περιγραφές των Watson και Crick (1953) για την διπλή ελικοειδή μορφή του μορίου του DNA, η οποία οριοθέτησε μια νέα εποχή στην κατανόηση και μελέτη των βιολογικών επιστημών και καθόρισε μια νέα οδό ανάπτυξης και εφαρμογής βιολογικών και μοριακών ανακαλύψεων και επιτευγμάτων. Οι επιστήμονες γνωρίζοντας την μοριακή δομή του κληρονομικού μορίου μπορούν πλέον να διαχειριστούν και να αποσαφηνίσουν τις λειτουργίες και τις διεργασίες του DNA.

Οι νέες αυτές μελέτες εξαρτήθηκαν επίσης από την ανακάλυψη και χρήση πολλών ενζύμων που είναι σε θέση να τροποποιήσουν ή ακόμα και να ενώσουν τα ήδη υπάρχοντα μόρια DNA αλλά και να συντελέσουν στη σύνθεση νέων μορίων. Οι πρώτες μοριακές γενετικές τεχνικές λαμβάνουν χώρα στον τομέα της ιχθυολογίας το 1950. Μελετήθηκαν παραλλαγές των ομάδων αίματος και παρατηρήθηκε γενετικά ελεγχόμενος πολυμορφισμός. Οι μέχρι τώρα γενετικές μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται και είναι γνωστές, είναι οι εξής:

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- Ισοένζυμα, αλλοένζυμα και πρωτεΐνες
- Τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (RAPD)
- Ανάλυση μιτοχονδριακού DNA (RFLPs)
- Συγκριτική ανάλυση ακολουθίας (SSCP)
- Μέθοδος κηλίδων – σημαδιών DNA (Southern Blot)
- Μικροδορυφόροι (Microsatellites)

1.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί και να προσδιοριστεί η σημασία και η επίδραση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Εικόνα 3) στα σημαντικά επιστημονικά επιτεύγματα των τελευταίων ετών. Η PCR είναι η γρήγορη και εύκολη μέθοδος δημιουργίας απεριόριστων αντιγράφων οποιουδήποτε τεμαχίου του κυτταρικού μορίου DNA. Είναι μια από εκείνες τις επιστημονικές εξελίξεις που αξίζει πραγματικά να χαρακτηριστεί "επαναστατική" και "σημαντική ανακάλυψη".

Η μελέτη και η περιγραφή της PCR περιγράφηκε και μελετήθηκε τα τελευταία δέκα χρόνια αλλά παρ' όλα αυτά στο σύντομο αυτό χρονικό διάστημα της ζωής της, η μέθοδος έχει μετασχηματίσει πλήρως τις βιολογικές επιστήμες. Από τις πρακτικές της ιατρικής διάγνωσης, στο θεωρητικό πλαίσιο της συστηματικής, από τα δικαστήρια των κρατών μέχρι την μελέτη της συμπεριφοράς διαφόρων ζώων η εφαρμογή της μεθόδου PCR αναλύει μικροσκοπικά ποσά γενετικού υλικού ακόμα και κατεστραμμένου γενετικού υλικού (DNA) σε υψηλά επίπεδα ακριβείας και αξιοπιστίας.

Η μέθοδος PCR είναι η σημαντικότερη νέα επιστημονική τεχνολογία των τελευταίων εκατό χρόνων, όπως αναφέρει ο Mark R. Hughes (αναπληρωτής διευθυντής του Εθνικού κέντρου έρευνας ανθρώπινου γονιδιώματος, του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Η.Π.Α). Από επιστημονικής πλευράς έχει τονισθεί ότι επειδή η μέθοδος PCR είναι πολύ πιο απλουστευμένη και φθηνότερη από τεχνικές που χρησιμοποιούνταν παλιότερα, στη χρήση για γενετικές έρευνες από όλους τους βιολόγους και τους ειδικούς ακόμα και χωρίς σχετικές γνώσεις μοριακής βιολογίας.

Η ανάπτυξη της τεχνικής αυτής οδήγησε σε μια έκρηξη νέων τεχνικών στη μοριακή βιολογία καθώς ολοένα και περισσότερες εφαρμογές της μεθόδου δημοσιεύθηκαν και χάρισε στον άνθρωπο που την ανακάλυψε (Kary Mullis) ένα βραβείο Νόμπελ (1993).

Η τεχνική αναπτύχθηκε κυρίως μετά την ανακάλυψη της Taq πολυμεράσης, μιας πολυμεράσης του γενετικού υλικού, η οποία χρησιμοποιείται από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus* το οποίο ανακαλύφθηκε σε θερμοπηγές. Η πολυμεράση αυτή είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες, έτσι ώστε να ενισχύεται, εκεί όπου άλλες πολυμεράσες του γενετικού υλικού (DNA) μετουσιώνονται - καταστρέφονται.

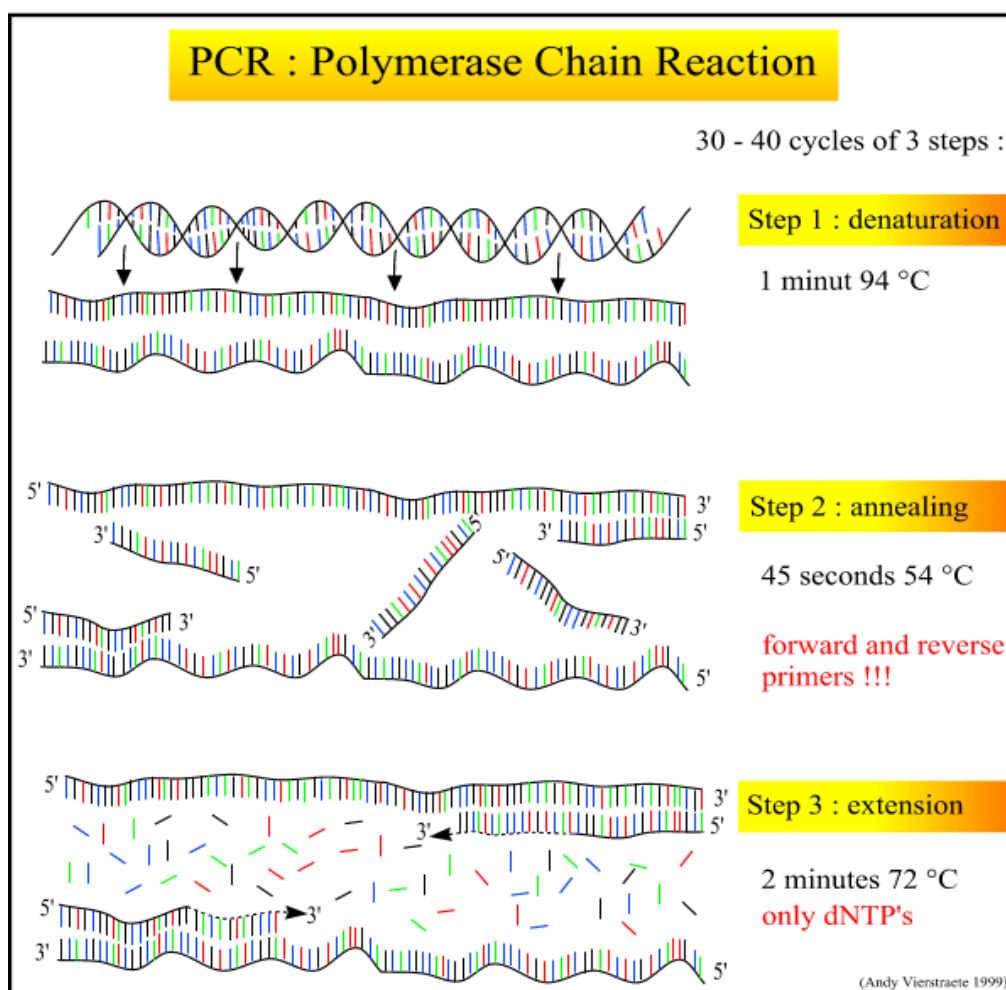
Υπάρχουν τρία βασικά βήματα εφαρμογής της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR, τα οποία επαναλαμβάνονται για συνήθως, 30 – 40 κύκλους. Η διαδικασία αυτή γίνεται αυτοματοποιημένα κατά την οποία παρατηρούνται θερμάνσεις και ψύξεις του μίγματος της αντίδρασης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

Τα βήματα αυτά αφορούν την εξής διαδικασία:

1. Μετουσίωση (**Denaturation**) σε θερμοκρασία 94 ° C.
2. Ενδυνάμωση (**Annealing**) σε θερμοκρασία 54 ° C (ανάλογα με τους εκκινητές).
3. Επέκταση (**Extension**) σε θερμοκρασία 72 ° C.

Κατά τη διάρκεια των παραπάνω βημάτων παρατηρούνται, κατά τη μετουσίωση, σπάσιμο – λιώσιμο της διπλής έλικας του DNA και «άνοιγμα» σε μονόκλωνο μόριο γενετικού υλικού και διακόπτονται όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις. Στο στάδιο της ενδυνάμωσης που πραγματοποιείται στους 54 ° C οι εκκινητές αναπηδούν εξαιτίας της κίνησης Brown.

Οι ιοντικοί δεσμοί διαμορφώνονται συνεχώς και με την ένωση των βάσεων, μετατρέπονται σε πολύ ισχυρούς δεσμούς μεταξύ του γενετικού μορίου και των εκκινητών, οι οποίοι δεν διασπώνται πια. Τέλος στο τρίτο στάδιο της επέκτασης δρα με κατάλληλη θερμοκρασία η πολυμεράση και οι εκκινητές ενώνονται με κάποιες βάσεις και δημιουργούν πολύ ισχυρούς ιοντικούς δεσμούς.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των τριών σταδίων της μεθόδου PCR.

Βασικό σημείο της μεθόδου είναι οι εκκινητές (primers). Η ποσότητα των εκκινητών πρέπει να είναι σε περίσσεια γιατί χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Μέρος της ακολουθίας του *αρχικού μορίου* DNA πρέπει να είναι γνωστό, έτσι ώστε να γίνει επιλογή του κατάλληλου εκκινητή. Υπάρχουν αριστεροί και δεξιοί εκκινητές, έτσι ώστε να μπορούν να ενισχυθούν και οι δύο κλώνοι του γενετικού μορίου DNA, το οποίο διασπάται από δίκλωνη αλυσίδα και ανοίγει κατά την διεξαγωγή της διαδικασίας.

Η πολυμεράση Taq χρησιμοποιείται γιατί ρυθμίζει την μετουσίωση (Denaturation) της διπλής έλικας DNA χωρίς να χρειάζεται περαιτέρω προσθήκη πολυμεράσης κατά τη διάρκεια. Επίσης επιτρέπει το στάδιο της ενδυνάμωσης (Annealing) να διεξαχθεί σε υψηλότερη θερμοκρασία και έτσι επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου.

Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση

Ειδικής (Taq) πολυμεράσης. Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που ονομάζονται εκκινητικά μόρια (primers). Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs). Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂. Ειδικού διαλύματος για την Taq πολυμεράση. Μικρή ποσότητα DNA που παίζει το ρόλο μορίου μήτρας.

Η μέθοδος κατέχει την πρώτη θέση κυρίως για τους εξής λόγους:

- Είναι γρήγορη μέθοδος και δεν απαιτεί μεγάλη προετοιμασία.
- Είναι απλή στη λειτουργία και διεξαγωγή της διαδικασίας.
- Απαιτεί μικρές ποσότητες ιστού των δειγμάτων
- Δεν απαιτείται θάνατος του οργανισμού.
- Μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγμα DNA ακόμα και παρελθόντων ετών.
- Η χρήση της καλύπτει μεγάλο φάσμα επιστημών.

1.5 ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ, ΑΛΛΟΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Οι δεκαετίες του 1950 και του 1960 θεωρούνται σταθμοί στις σημαντικές ανακαλύψεις στην ενζυμολογία του DNA. Τα ένζυμα που απομονώθηκαν είναι σε θέση να τροποποιήσουν και να ενώσουν μόρια γενετικού υλικού, ή να συμμετάσχουν στη σύνθεση νέων μορίων DNA (Εικόνα 4). Για παράδειγμα μπορούν να αναφερθούν η απομόνωση της DNA πολυμεράσης, η απομόνωση του ενζύμου λιγάση (ligase) καθώς επίσης η απομόνωση νουκλεοτιδίου περιορισμού.

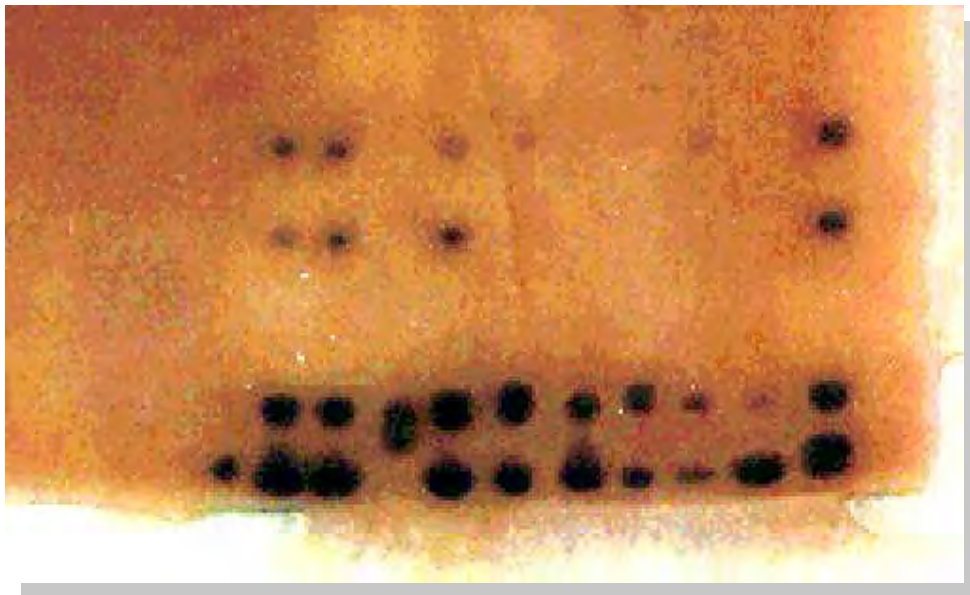
Η απομόνωση αυτών των ενζύμων και άλλων είναι δυνατό να δημιουργήσουν και νέα είδη μορίων DNA αλλά και να χειριστούν τη λειτουργία γονιδίων που βρίσκονται στα μόρια αυτά. Η μελέτη των λειτουργιών των ενζύμων και η χρησιμότητα τους άνοιξαν νέους δρόμους στη Μοριακή Βιολογία.

Η χρήση των ενζύμων και των πρωτεϊνών παραμένει ο κυρίαρχος τρόπος μελέτης γενετικής ποικιλομορφίας και γενετικής δόμησης πληθυσμών. Συνιστά επίσης παραμέτρους όπως ο βαθμός ετεροζυγωτίας, ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών θάκων και μέσο αριθμό αλληλομόρφων ανά γονιδιακό θάκο. Τα βασικά χαρακτηριστικά της μεθοδολογίας με τη χρήση ενζύμων και πρωτεϊνών είναι:

- Γρήγορη ανάλυση δειγμάτων και χαμηλό κόστος των χημικών ουσιών που απαιτούνται.
- Δεδομένα εκατοντάδων ατόμων αναλύονται σε μικρό χρονικό διάστημα.
- Ο απαιτούμενος εξοπλισμός είναι απλός και η μεθοδολογία απλή και εύκολη στη χρήση.

Υπάρχουν όμως και κάποια μειονεκτήματα της μεθόδου των πρωτεϊνών και των ενζύμων τα οποία έγκειται στα εξής:

- Απαιτούνται συγκεκριμένοι ιστοί ζώων που οδηγούν συνήθως στη θανάτωση των οργανισμών.
- Απαιτείται μεγάλη επαναληψιμότητα των παρατηρήσεων, άρα μεγάλος αριθμός δειγμάτων.
- Μικρός αριθμός αλληλομόρφων για κάθε γονιδιακό θώκο.
- Δυσχέρεια ανάλυσης προτύπων σε περιπτώσεις πολυπλοειδίας.
- Αποκαλύπτει μόνο το 1/3 των μεταλλάξεων.



Εικόνα 4. Παράδειγμα εικόνας μετά την ηλεκτροφόρηση με τη χρήση ενζύμων και πρωτεϊνών. (Exadactylos, 1997).

1.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΗΛΙΔΩΝ – ΣΗΜΑΔΙΩΝ DNA (Southern Blot)

Πολλά γονίδια ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελούν μέρη μιας ευρύτερης οικογένειας παρόμοιων γονιδίων. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατή η εύρεση του αριθμού των παρόμοιων γονιδίων αν υπάρχει στη διάθεσή μας, ένα μόνο γονίδιο (ακόμη και στη μορφή c DNA) που έχει κλωνοποιηθεί. Κατ' αρχάς χρησιμοποιούνται περιοριστικές ενδονουκλεάσες με σκοπό την κατάτμηση του γονιδιωματικού DNA στο οποίο θέλουμε να εντοπίσουμε τον αριθμό των παρόμοιων γονιδίων που περιέχει.

Στη συνέχεια τα θραύσματα που έχουν προκύψει υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση με αποτέλεσμα να παίρνουμε πολυάριθμες ζώνες (αφού γίνουν ορατές με χρώση) που αντιστοιχούν στα θραύσματα του DNA, οι οποίες φυσικά δεν μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Για να διακριθούν αρχικά αποδιατάσσονται ώστε να καταστούν μονόκλινα και στη συνέχεια μεταφέρονται σε ένα φίλτρο από νιτροκυτταρίνη ή νάιλον. Αυτό μπορεί να γίνει είτε με τη χρησιμοποίηση ενός ρυθμιστικού διαλύματος είτε με ηλεκτροφόρηση.

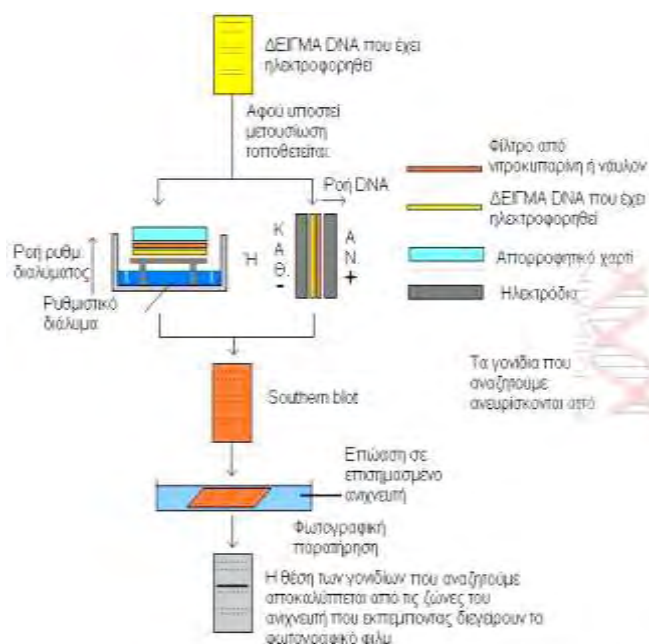
Στην 1^η περίπτωση το ρυθμιστικό διάλυμα περνώντας με διάχυση μέσω της πλάκας από το πήκτωμα που έχει το DNA, το μεταφέρει στο φίλτρο. Στην 2^η περίπτωση την δουλειά αυτή την κάνει η τάση που εφαρμόζεται δεξιά και αριστερά του πηκτώματος.

- Έτσι λαμβάνεται το φίλτρο (Southern blot) που περιέχει μη ορατές ζώνες DNA.
- Το φίλτρο στη συνέχεια υφίσταται επεξεργασία με επισημασμένους ανιχνευτές που φέρουν αλληλουχίες του γονιδίου που αναζητούμε.
- Με τον τρόπο αυτό σε όποια ζώνη (θραύσμα) τα μόρια ανιχνευτές βρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες, συνδέονται μαζί τους, δηλαδή τις υβριδοποιούν.

- Τελικώς η φωτογράφιση με φιλμ ακτινών X αποκαλύπτει τα θραύσματα που εκπέμπουν και έτσι φανερώνονται τα γονίδια που είναι παρόμοια με το αρχικό.

Η τεχνική βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην εγκληματολογία και όπου γενικώς χρειάζεται να αποκαλυφθεί η ταυτότητα ενός ατόμου από ένα ίχνος βιολογικού υλικού όπως αίμα ή οποιοσδήποτε ιστός που περιέχει DNA. Η απαρχή της εφαρμογής αυτής βρίσκεται στα 1985 οπότε ο Alec Jeffreys ανακάλυψε ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περιοχές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων (μικροδορυφόροι).

Επειδή το πρότυπο με το οποίο επαναλαμβάνονται οι βάσεις αυτές είναι χαρακτηριστικό για κάθε άτομο, μπορεί να χρησιμοποιείται όπως ένα δακτυλικό αποτύπωμα (**αποτύπωμα DNA**). Από τη σύγκριση του DNA που έχει ανεβρεθεί στον τόπο ενός εγκλήματος και του DNA ενός υπόπτου, ως προς τις αλληλουχίες αυτές, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ενοχή του ή όχι.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση μεθόδου Southern Blot.

1.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA Mitochondrial DNA

Restriction Analysis (RFLP).

- Το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται και μεταβιβάζεται σχεδόν αποκλειστικά μητρικά.
- Παρουσιάζει ταχύτερο ρυθμό αλλαγών σε σχέση με το πυρηνικό DNA στην αλληλουχία των βάσεων του.
- Το ζωικό mtDNA παρουσιάζει μια σαφή συντηρητικότητα ως προς τα γονίδια που περιέχει.
- Η διάταξη των γονιδίων στο ζωικό mtDNA, τουλάχιστον μέσα σε μια τάξη ή φύλο, είναι εξαιρετικά σταθερή.
- Το mtDNA εξελίσσεται 5-10 φορές ταχύτερα από το nDNA στα θηλαστικά.

Τα βασικά σημεία της μεθόδου είναι ότι ένας ιστός του οργανισμού μελέτης και σε σχετικά μικρή ποσότητα είναι αρκετός, που σημαίνει ότι το υλικό που χρησιμοποιείται μπορεί να διατηρηθεί και να αποθηκευθεί ευκολότερα.

Αρκετοί γονιδιακοί θάκοι έχουν περισσότερα αλληλόμορφα γονίδια από αυτά που αποκαλύπτονται από την ενζυμική ανάλυση. Μεταλλάξεις που δεν έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι ανιχνεύσιμες από τη μέθοδο αυτή ανάλυσης του μιτοχονδριακού mtDNA. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι πληθώρα γενετικών δεικτών μπορεί να μελετηθεί με τη μέθοδο αυτή και ότι δεν απαιτείται πάντα θάνατος των προς μελέτη οργανισμών.

1.8 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ Single-Stranded

Conformational Polymorphism (SSCP).

Η μέθοδος αυτή (SSCP) είναι η απλούστερη χρησιμοποιημένη μέθοδος ανίχνευσης μεταλλαγής. Χρησιμοποιείται για να ενισχύσει την περιοχή ενδιαφέροντος και το επακόλουθο DNA χωρίζεται ως μονόκλινα (single-stranded) μόρια από την ηλεκτροφόρηση σε ένα πήκτωμα (polyacrylamide). Ένα σκέλος του μονόκλινου DNA διπλώνει διαφορετικά από άλλο εάν διαφέρει από μια ενιαία βάση, και θεωρείται ότι η μεταλλαγή - αλλαγή της τριτογενούς δομής του DNA οδηγούν στις διαφορετικές κινητικότητες για τα δύο σκέλη.

Αυτές οι μεταλλαγές ανιχνεύονται ως εμφάνιση των νέων ζωνών στα αυτοραδιογράμματα (ραδιενεργός ανίχνευση), από την ασημένια σκίαση των ζωνών ή τη χρήση των φθορισμού εγχυτήρων που ανιχνεύονται στη συνέχεια από αυτοματοποιημένο αλληλουχική DNA (μη-ραδιενεργός ανίχνευση). Η τριτογενής δομή του ενιαίου προσαραγμένου DNA αλλάζει στο πλαίσιο της διαφορετικής θερμοκρασίας φυσικών καταστάσεων και του ιοντικού περιβάλλοντος. Ως εκ τούτου η ευαισθησία SSCP εξαρτάται από αυτό.

Ενώ μερικοί εμπειρικοί κανόνες έχουν προκύψει για την επιλογή των όρων χωρισμού για τις παραλλαγές ακολουθίας στα ιδιαίτερα πλαίσια ακολουθίας, δεν είναι δυνατό να προβλεφθεί εάν μια ορισμένη μεταλλαγή μπορεί να ανιχνευθεί υπό τους δεδομένους όρους, ειδικά όταν είναι η μεταλλαγή σε ένα νέο πλαίσιο ακολουθίας. Η ανίχνευση μεταλλαγής για το SSCP είναι γενικά υψηλή, > 80% σε ένα ενιαίο τρέξιμο για τα τεμάχια κοντύτερα από 300bp. Δεδομένου ότι η ευαισθησία δεν είναι 100%, η απουσία μιας νέας ζώνης δεν αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει καμία μεταλλαγή στο μόριο που αναλύεται.

Προσφέρουν ουσιαστική ποικιλότητα αλληλομόρφων σε ένα μεγάλο αριθμό γενετικών τόπων, κατανέμονται σε όλο το γονιδίωμα και κληρονομούνται με το Μεντελικό τρόπο (Barker, 2002). Οι μικροδορυφόροι είναι σε θέση να παρουσιάσουν πολυμορφισμό εξαιτίας της ποικιλίας στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Αυτή ακριβώς η υψηλή ποικιλότητα τους καθιέρωσε από τους πιο χρήσιμους μοριακούς δείκτες στη μελέτη της γενετικής των πληθυσμών (Wright & Bentzen, 1994).

Το μήκος του κάθε αλληλομόρφου καθορίζεται με τη χρησιμοποίηση της μεθόδου της PCR χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους εκκινητές ολιγονουκλετιδίων (primers). Η τεχνική αυτή διευκολύνει την κατασκευή των γενετικών χαρτών στα περισσότερα είδη εξαιτίας της χρήσης συγκεκριμένων εκκινητών και του υψηλού βαθμού πολυμορφισμού (Montaldo & Meza-Herrera, 1998).

Οι μικροδορυφόροι έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε ένα μεγάλο αριθμό ψαριών ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως η Εξελικτική Βιολογία, η Γενετική Πληθυσμών και η Οικολογία (Barroso et al., 2005). Ένα από τα πρώτα είδη στα οποία μελετήθηκε η γενετική ποικιλότητα μεταξύ των πληθυσμών με τη χρήση μικροδορυφορικού DNA ήταν η πέστροφα (Nielsen et al., 1994). Η έρευνα απεκάλυψε παρόμοια αποτελέσματα γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ μιτοχονδριακού και του μικροδορυφορικού DNA.

1.10 ΤΥΧΑΙΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΟΥ DNA Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

Οι τελευταίες πρόοδοι στον τομέα των μοριακών γενετικών δεικτών καθώς και η ανάπτυξη των αντίστοιχων μεθόδων στατιστικής ανάλυσης, έχουν προσφέρει νέες προοπτικές στη μελέτη της γενετικής δομής. Οι νεότερες μοριακές τεχνικές του DNA επιτρέπουν την ανίχνευση πολυμορφισμών μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού για συγκεκριμένες περιοχές του DNA.

Αυτοί οι πολυμορφισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κατασκευή γενετικών χαρτών και στην εκτίμηση διαφορών ανάμεσα σε δείκτες όσον αφορά την έκφραση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών σε μια οικογένεια τα οποία πιθανόν να αποτελούν μια ένδειξη για την εκδήλωση αυτών των χαρακτηριστικών σε επίπεδο γενετικής ανάλυσης (Montaldo & Meza-Herrera, 1998).

Τέτοιου είδους τεχνικές όπως οι μικροδορυφόροι και μια καινούρια σχετικά μέθοδος, η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (RAPD) έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν ασφαλείς πληροφορίες σε γενετικές και εξελικτικές μελέτες των πληθυσμών (Huang et al., 2000: Hoarau et al., 2004). Η γενετική δομή των πληθυσμών (Hansen et al., 1997: Olsen et al., 1998: Bouza et al., 1999), το πραγματικό μέγεθος του πληθυσμού και οι περιοδικές αλλαγές στη συχνότητα των αλληλομόρφων (Jorde and Ryman, 1996) καθώς και οι μακροχρόνιες αλλαγές στους πληθυσμούς με την old scale ανάλυση (Nielsen et al., 1997, 1999) έχουν μελετηθεί με την εφαρμογή αυτών των μεθόδων (Was, 2002).

Είναι μοριακοί δείκτες που μπορούν ουσιαστικά να μειώσουν το χρόνο, την εργασία και το κόστος που απαιτείται για τη μοριακή χαρτογράφηση. Τα βασικά σημεία της μεθόδου RAPD είναι: Καθορίζει ταξινομική ταυτότητα ειδών, προσδιορίζει φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα σε είδη, διαχωρίζει δείγματα διαφορετικού γονιδιώματος και επιτρέπει την εξέταση της γονιδιακής ποικιλότητας.

Η RAPD τεχνική προκύπτει με την εφαρμογή της PCR σε δείγματα γονιδιοματικού DNA, χρησιμοποιώντας τυχαία κατασκευασμένα ολιγονουκλεοτίδια, τους εκκινητές (primers). Η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα είδη φυτών και ζώων (Πίνακας 1) και ο αριθμός των τόπων που μπορούν να εξεταστούν είναι άπειροι. Έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους, την RFLP και τη DNA-fingerprints. Όταν οι εκκινητές είναι ενός μεσαίου μεγέθους (σε μια σειρά από 10 ζευγάρια βάσης), πολλαπλά ενισχυμένα τεμάχια (από διαφορετικούς τόπους) είναι συνήθως παρόντα για κάθε ομάδα εκκινητών για κάθε σειτ χρωμοσωμάτων. Τα δείγματα μπορούν να τρέξουν σε gel αγαρόζης και χρωματίζονται με τη χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide) και έτσι δεν πρέπει να προσδιοριστούν ιστοπικά (Lynch & Milligan, 1994).

Η PCR που βασίζεται στην RAPD τεχνική είναι ένα ελκυστικό συμπλήρωμα στη συνηθισμένη μοριακή αποτύπωση στην οικολογία. Είναι απλή όσον αφορά τις θεμελιώδεις αρχές της. Πολύ μικρή ποσότητα του ολικού γονιδιοματικού DNA χρειάζεται για την PCR χρησιμοποιώντας σύντομα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια με τυχαία αλληλουχία. Το πρωτόκολλο της ενίσχυσης διαφέρει από τις τυπικές συνθήκες της PCR, στην οποία μόνο ένας τυχαίος primer παίρνει μέρος και όχι προηγούμενη γνώση του γονιδιώματος απαιτείται για την ανάλυση. Όταν ο εκκινητής (primer) είναι μικρού μεγέθους υπάρχει υψηλή πιθανότητα ότι το γονιδίωμα περιέχει πολλά κάποιους τόπους κοντά τον έναν με τον άλλον σε ανακατεμένη σειρά.

Πιο αναλυτικά για τη μέθοδο αυτή παρατίθενται τα πλεονεκτήματα, οι εφαρμογές αλλά και τα μειονεκτήματα της μεθόδου τα οποία είναι τα εξής:

Πλεονεκτήματα:

- Δυνατότητα μελέτης αγνώστων γονιδιωμάτων.
- Μελέτη του DNA παρ' όλο που περιορισμένη ποσότητα δείγματος είναι διαθέσιμη.
- Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου και το μικρό κόστος της.

Δυσκολίες και περιορισμοί της μεθόδου:

- Το μέγεθος του εκκινητικού μορίου.
- Η ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης.
- Η πιθανότητα της ταυτόχρονης μετατόπισης ορισμένων ζωνών DNA.
- Μη αναπαραγόμενα προϊόντα ενίσχυσης.

Εφαρμογές της μεθόδου:

A) Προσδιορισμός ταξινομικών ταυτοτήτων.

Από την εφαρμογή διαφορετικών εκκινητικών μορίων, μπορούν να παραχθούν διάφοροι μοριακοί δείκτες οι οποίοι είναι διαγνωστικοί για διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα. Για κάθε εκκινητικό μόριο, τα προϊόντα ενίσχυσης (τμήματα DNA) της μεθόδου RAPD μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, στα μεταβλητά (πολυμορφικά) και στα σταθερά (μονομορφικά). Για παράδειγμα αν θεωρήσουμε μια ανάλυση RAPD με αρκετά άτομα μέσα σε ένα είδος και αρκετά είδη μέσα σε ένα δεδομένο γένος, μπορεί να αναγνωριστούν κάποια σταθερά τμήματα, διαγνωστικά για ένα γένος, καθώς και τμήματα που είναι πολυμορφικά μεταξύ ειδών μέσα στο γένος. Οι δύο τύποι των προϊόντων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση των σχέσεων σε επίπεδο ταξινομικής.

B) Ανάλυση της ενδοειδικής ροής γονιδίων και του υβριδισμού.

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

Γ) Προσδιορισμός της πατρότητας και των σχέσεων συγγένειας.

Ένα συχνό πρόβλημα στην οικολογία συμπεριφοράς είναι ο προσδιορισμός του πραγματικού "πατέρα" από έναν αριθμό πιθανών "πατέρων". Αναλύοντας τμήματα τα οποία είναι πολυμορφικά μέσα σε άτομα, η ανάλυση RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της πατρότητας και των σχέσεων συγγένειας μέσα σε μεγάλα δείγματα απογόνων. Επίσης μπορούν να παραχθούν συνθετικοί απόγονοι αναμιγνύοντας ίσες ποσότητες DNA από την μητέρα και τον πιθανό πατέρα. Τα προϊόντα ενίσχυσης από τους συνθετικούς απογόνους θα περιέχουν ολόκληρο τον αριθμό των ζωνών, οι οποίες θα εμφανίζονται σε κάθε απόγονο από αυτούς τους γονείς.

Δ) Ανάλυση δειγμάτων μικτού γονιδιώματος.

Η τεχνική RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ποσοτικών εκτιμήσεων των σχετικών αναλογιών των διαφορετικών γονιδιωμάτων σε δείγματα μικτού DNA. Δείγματα μικτού DNA υπάρχουν σε πολυγαμικά συστήματα σύζευξης, όπως έντομα ή ψάρια, όπου λαμβάνει χώρα ανταγωνισμός σπέρματος και μικτή πατρότητα.

Ε) Παραγωγή νέων ειδικών ανιχνευτών.

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

Πίνακας 1. Ενδεικτικός πίνακας με είδη στα οποία έχει εφαρμοστεί η μέθοδος τυχαίας ενίσχυσης πολυμορφικού DNA (RAPD).

ΕΙΔΟΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<i>Mullus barbatus</i>	Stamatis et al., 1998
<i>Ladigesocypris ghigii</i>	Mamuris et al., 2005
<i>Ciona intestinalis</i>	Shungo Kano et al., 2001
<i>Carrasius auratus</i>	Toth et al., 2005
<i>Hirundichthys affinis</i>	Gomes et al., 1998
<i>Hirundichthys affinis</i>	Gharmaine Gomes et al., 1998
<i>Cyprinus carpio</i>	Dong, 1998
<i>Nile tilapia</i>	Hesham Abdallah, 2004
<i>Atlantic salmon</i>	Mcgowan C. et al., 1998
<i>Pangio filinaris</i> και <i>Pangio piperata</i>	A. Ruzainah et al., 2003
<i>Amphiprion</i> sp.	Pallipuram Jayasankar, 2004
<i>Salvelinus namaycush</i>	Stott W. et al., 1997
<i>Hirundichthys affinis</i>	Gomes C. et al., 1998

1.11 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Η κυριότερη επιδίωξη αυτών που ασχολούνται με τη διαχείριση των ιχθυαποθεμάτων 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 and Hauser, 1994).

Η ιδέα της διαρκούς παραγωγής των αλιευτικών πηγών (αειφορία) κυριαρχεί στις επιστήμες της θάλασσας τα τελευταία πενήντα χρόνια. Η κεντρική ιδέα είναι ότι κάθε διαφορετικός πληθυσμός ενός είδους υδρόβιου οργανισμού έχει ένα πλεόνασμα και αν η αλίευση αυτού του πλεονάσματος δεν υπερβεί κάποιο όριο, τότε η επιπλέον παραγωγή μπορεί να διατηρηθεί επί άπειρον. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και η φέρουσα ικανότητα ενός πληθυσμού – οικοσυστήματος, δηλαδή τα επίπεδα στα οποία μπορούν να καλυφθούν όλα τα άτομα του πληθυσμού σε τροφή, συνθήκες διαβίωσης και άλλες ζωτικές λειτουργίες. Το κάθε είδος δεν αποτελείται από ένα πληθυσμό αλλά από διακριτούς πληθυσμούς, οι οποίοι πιθανόν να αντιδρούν διαφορετικά στην αλιευτική πίεση (Lannal et al., 1989).

Η αλιευτική τακτική που ακολουθείται όπως για παράδειγμα αλίευση μεγαλύτερων σε μέγεθος άρα και σε ηλικία ατόμων ή η υπεραλίευση 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 (Shaklee, 1990).

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 οδηγεί σε δραματική μείωση του βαθμού του γενετικού πολυμορφισμού ιδιαίτερα σε είδη που συγκροτούν μικρούς σε μέγεθος πληθυσμούς. Αυτές οι αλλαγές στη γενετική δομή των πληθυσμών μπορεί να οδηγήσουν σε μελλοντική μείωση της ικανότητας επιβίωσης των πληθυσμών ή ακόμα και στην εξαφάνισή τους (Ryman et al., 1994).

Ένα από τα σημαντικότερα ερωτήματα είναι με ποιο τρόπο θα καθορισθεί ένα ιχθυαπόθεμα. Για τον καθορισμό των ιχθυαποθεμάτων έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί διάφοροι παράμετροι όπως οικολογικά, φυσιολογικά, μορφολογικά χαρακτηριστικά ή μαρκαρίσματα ψαριών (Ihssen et al., 1981).

Η χρήση τεχνικών που ανιχνεύουν τον πολυμορφισμό πρωτεϊνών και ενζύμων και η ανάλυση του γενετικού υλικού είναι οι μέθοδοι που αποδείχθηκαν περισσότερο αποτελεσματικές (Park and Moran, 1994). Για το λόγο αυτό πληθώρα εργασιών έχει δημοσιευθεί τα τελευταία χρόνια που αφορούν τη μελέτη της γενετικής δομής και τον καθορισμό ιχθυαποθεμάτων διαφόρων εμπορικά σημαντικών ειδών ιχθύων και άλλων εδώδιμων κυρίως υδρόβιων οργανισμών.

Οι εφαρμογές των μοριακών τεχνικών στους υδρόβιους οργανισμούς και σε πληθυσμούς ιχθύων έχουν ως στόχο κυρίως τον έλεγχο και καταγραφή της γενετικής ποικιλομορφίας, την μελέτη των πληθυσμών και του βαθμού μετανάστευσης ή μεταφοράς πληθυσμών ιχθύων, την συστηματική κατάταξη ειδών και αναγνώριση τους, την αναπαραγωγική και γεωγραφική απομόνωση ειδών καθώς και ταυτοποίηση ειδών σε νεαρά στάδια ανάπτυξης (Thorpe, 1982).

Οι μοριακές τεχνικές εφαρμόζονται επίσης και στις υδατοκαλλιέργειες για τον έλεγχο της γενετικής ποικιλότητας ώστε τα προγράμματα αναπαραγωγής στα εκκολαπτήρια να μην οδηγούν σε μείωση της γενετικής μεταβλητότητας. Ελέγχονται επίσης οι εισαγόμενοι και οι πληθυσμοί που μεταφέρονται και μελετούνται οι υβριδισμοί μεταξύ των εισαγόμενων και των γηγενών πληθυσμών. Τέλος πολλές εφαρμογές των μοριακών τεχνικών είναι πολύ σημαντικές στις υδατοκαλλιέργειες και αφορούν τον χειρισμό του φύλου των ατόμων, γεγονός που είναι πολύ σημαντικό για πολλά εκτρεφόμενα είδη διότι η μοριακή βιολογία μπορεί να εξαλείψει πολλά προβλήματα στην αναπαραγωγή και εκτροφή των ειδών αυτών (Delvin et al., 1991).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δείγματα του είδους *Microcosmus sabatieri* συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές στον Ελλαδικό χώρο. Η συλλογή τους είναι μια αρκετά δύσκολη εργασία και απαιτεί μεγάλη προσπάθεια και επιμονή. Τα δείγματα που αναλύθηκαν στο εργαστήριο προέρχονται από έξι διαφορετικές περιοχές και η συλλογή τους καθώς και η επεξεργασία των δειγμάτων στο εργαστήριο ξεκίνησε τον Ιούλιο του 2005 και ολοκληρώθηκε τον Αύγουστο του 2006. Να τονιστεί επίσης ότι οι δειγματοληψίες στη Νήσο Αστυπάλαια ήταν δύο δηλαδή στην περίπτωση αυτή έγιναν δύο εποχικές δειγματοληψίες (Φθινόπωρο – Άνοιξη). Οι περιοχές δειγματοληψίας καθώς και ο αριθμός των δειγμάτων είναι (Πίνακας 2):

1. Νήσος Αστυπάλαια (Β. Αιγαίο Πέλαγος).
2. Πλατανιάς (Παγασητικός Κόλπος).
3. Τρίκερι (Παγασητικός Κόλπος).
4. Α. Νικόλαος Αττικής.
5. Μαλιακός Κόλπος.

Πίνακας 2. Οι περιοχές δειγματοληψίας.

Περιοχές δειγματοληψίας	Αριθμός ατόμων
Αστυπάλαια 1	32
Πλατανιάς	61
Τρίκερι	28
Α. Νικόλαος	20
Αστυπάλαια 2	28
Μαλιακός	29
Σύνολο δειγμάτων:	198

Τα 198 δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε πάγο όπου μετρήθηκαν μήκος, πλάτος χιτώνα και υγρό βάρος γονάδας και αφού αφαιρέθηκε ο χιτώνας, τοποθετήθηκαν σε αριθμημένα μπουκαλάκια σε καταψύκτη στους -24°C μέχρι να αναλυθούν στο εργαστήριο. Η αριθμηση και ο διαχωρισμός έγιναν ανά πληθυσμούς και ανά άτομο για την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των ατόμων του *Microcosmus sabatieri* πριν την ανάλυση τους στο εργαστήριο και την μέτρηση μήκους, πλάτους και βάρους είναι :

1. Ψαλίδι, Νυστέρι, Λαβίδα, Τσιμπίδα (Εικόνα 6).
2. Όργανο μέτρησης (παχύμετρο) (Εικόνα 7).
3. Ζυγός ακριβείας (Εικόνα 8).



Εικόνα 6. Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν: ψαλίδι νυστέρι, λαβίδα.



Εικόνα 7. Όργανο μέτρησης μήκους – παχύμετρο.



Εικόνα 8. Ζυγός ακριβείας που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση βάρους.

Για την εξαγωγή του γονιδιοματικού DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης (Exadactylos, 1997), το οποίο στηρίζεται στην τεχνική φαινόλης/χλωροφορμίου. Για την απομόνωση του DNA αφαιρείται κομμάτι γονάδας του οργανισμού (~0,01 g) με αποστειρωμένο νυστέρι και ο ιστός τοποθετείται σε αποστειρωμένο μπουκαλάκι τύπου Eppendorf (Biologix, BMT-15N) και αναγράφεται ο κωδικός του δείγματος στο καπάκι.

Το πρωτόκολλο απομόνωσης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Δείγμα ιστού τοποθετείται σε αποστειρωμένο Eppendorf tube.
2. Στο Eppendorf προστίθεται:
 - 500μl διαλύματος TNE (10 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8)
 - 50 μl Tris-HCl, pH 8
 - 25 μl διαλύματος SDS 25%
 - 20 μl Πρωτεϊνάση K 10 mg/l. και ανακινούνται ελαφρώς.
3. Επώαση των ιστών σε υδατόλουτρο (Mettmert) στους 55° C για 1 ώρα (εμπειρικά μέχρι να διαλυθεί ο ιστός).
4. Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και έπειτα γίνεται ομογενοποίηση του ιστού με τη βοήθεια κατάλληλου εμβόλου.

5. Επώαση των ιστών σε κλίβανο (WTB binder) σε θερμοκρασία 55° C για 1 ώρα.
6. Ύστερα από την επώαση και αφού παραμείνουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται 450μl φαινόλη και 450μl χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1
7. Ανακινούνται ελαφρώς και ύστερα φυγοκεντρώνται (Eppendorf Centrifuge 5804 R) για 10 λεπτά σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C για να διαχωριστούν οι 2 φάσεις.
8. Με το τέλος της φυγοκέντρισης αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο (υδατική φάση) με πιπέτα και τοποθετείται σε δεύτερο Eppendorf.
9. Στο νέο Eppendorf tube προστίθεται 900μl Χλωροφόρμιο-Ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1 και ακολουθεί ανάδευση (για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης).
10. Φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές.
11. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρισης αφαιρείται ξανά το υπερκείμενο και τοποθετείται σε τρίτο Eppendorff tube στο οποίο προστίθεται 1 ml καθαρής αιθανόλης (100%).
12. Προστίθενται 6 μl οξικού νατρίου 3M και το Eppendorf τοποθετείται σε καταψύκτη στους - 20° C για 30 λεπτά (για την δέσμευση του DNA σε στερεά μορφή).
13. Φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 13000 στροφές.
14. Στο κάτω μέρος του Eppendorf παρατηρείται ένα λευκού χρώματος ίζημα (pellet).

15. Μετά την προσεκτική αφαίρεση της αλκοόλης (προσέχοντας να μην πέσει το pellet) προστίθεται 200 µl κρύας αιθανόλης (4 ° C) περιεκτικότητας 70 % και φυγοκεντρείται ξανά για 5 λεπτά στις 13000 στροφές.

16. Η αιθανόλη αφαιρείται τελείως και το Eppendorf tube τοποθετείται με ανοικτό το πώμα στον κλίβανο επώασης για περίπου 20 λεπτά στους 40° C για να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.

17. Προσθήκη 50 µl υπερστεριωμένο νερό (Gibco ultra-sterilized water) και τοποθετούνται στον καταψύκτη στους -20° C, έως ότου αναλυθούν.

(Όλα τα παραπάνω χημικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρείας Scharlau).

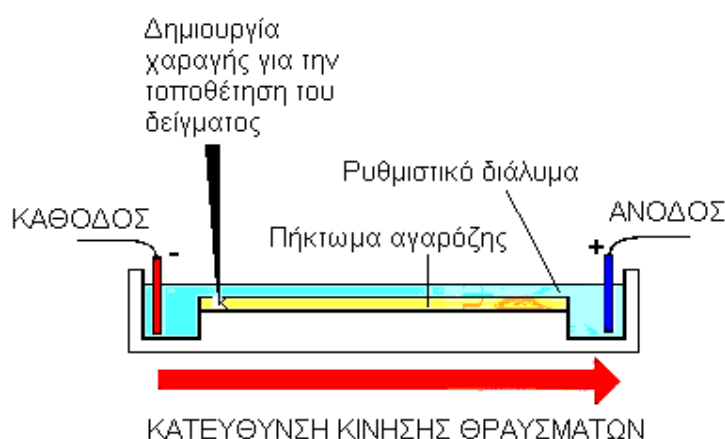
Η ανίχνευση της ποιότητας του απομονωμένου DNA γίνεται ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1%. Το διάλυμα TAE 1% αραιώνεται από ένα stock buffer TAE 50% (242 g Tris-HCl, 57 ml οξικό οξύ, 0,05 M EDTA pH 8).

Για την Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης χρησιμοποιούνται τα εξής. Αρχικά μετρούνται σε ζυγό ακριβείας 1.4 g στερεής αγαρόζης και προστίθενται σε 70 ml διαλύματος TAE 1% και η διάλυση γίνεται με θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων (KENWOOD microwave) για 2 λεπτά (εμπειρικά μέχρι να γίνει άχρωμο το διάλυμα, στους 90° C). Αμέσως μετά προστίθενται 3 µl Βρωμιούχου Αιθιδίου (EtBr) 1% (Scharlau) και μετά από σύντομη ανακίνηση το διάλυμα τοποθετείται σε τετράγωνο Plexiglas, μήκους 10 cm.

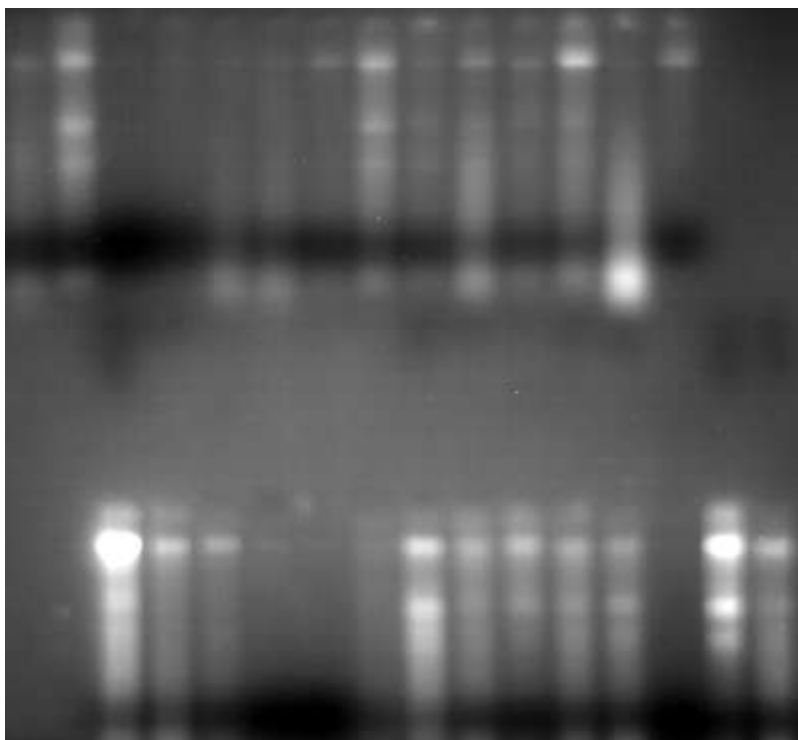
Το Plexiglas έχει δύο εσοχές (1 cm) εκατέρωθεν του πάνω μέρους των δύο πλευρικών τοιχωμάτων του όπου εφάρμοζαν δύο «χτενάκια» για τη δημιουργία των υποδοχών (πηγάδια). Με το κάθε χτενάκι ήταν δυνατή η δημιουργία 14 θέσεων όγκου 14 µl.

Μετά από περίπου 20 λεπτά το πήκτωμα αγαρόζης είναι στερεοποιημένη και έχει τις μορφοποιημένες υποδοχές (πηγάδια) όπου μπορεί να γίνει το «τρέξιμο» των δειγμάτων (Εικόνα 9). Ο συνολικός όγκος που τοποθετείται στην υποδοχή – πηγάδι στην πηκτική αγαρόζη, με την “by pipetting” τεχνική είναι 11 μl: 2 μl DNA, 1 μl χρωστικής (Blue-bromophenol, Invitrogen) και 8 μl υπερστειωμένου νερού. Η χρωστική είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό των προϊόντων.

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι TAE 1%. Η φόρτωση των δειγμάτων γίνεται αφού η πηκτική έχει βυθιστεί μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα (Εικόνα 9). Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται σε παροχή τάσης (60 volt) από το τροφοδοτικό (CONSORT E143) στη συσκευή (SCIE - PLAS) για περίπου 45 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε φωτογραφική μηχανή (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems) υπό υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και προκύπτει η εικόνα του πηκτώματος όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 10).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση συσκευής ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 10. Φωτογραφική απεικόνιση ποιότητας και ποσότητας DNA υπό υπεριώδη ακτινοβολία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Τμήματος. (Ίδια πηγή).

Η επιλογή των RAPD δεικτών έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία για τα ασκίδια γενικότερα αλλά και για το γένος *Microcosmus*. Συνολικά δοκιμάστηκαν στην τεχνική PCR 31 εκκινητές (Πίνακας 3) (Sommerfeldt, 2003).

Πίνακας 3. Οι γενετικοί δείκτες (primers) που εξετάστηκαν.

Κωδικός <i>Primer</i>	Αλληλουχία	Εταιρεία
F10	5'-GGAAGCTTGG-3'	Invitrogen
Pr14	5'-GGTGACGCAG-3'	Invitrogen
R02	5'-CACAGCTGCC-3'	Invitrogen
R13	5'-GGACGACAAG-3'	Invitrogen
Y01	5'-GTGGCATCTC-3'	Invitrogen

Y02	5'-CATCGCCGCA-3'	Invitrogen
Y05	5'-GGCTGCGACA-3'	Invitrogen
Y08	5'-AGGCAGAGCA-3'	Invitrogen
Y15	5'-AGTCGCCCTT-3'	Invitrogen
Y18	5'-GTGGAGTCAG-3'	Invitrogen
UBC-521	5'-CCGCCCCACT-3'	Invitrogen
UBC-526	5'-AACGGGCACC-3'	Invitrogen
UBC-542	5'-CCCATGGCCC-3'	Invitrogen
UBC-717	5'-CCCACACCCA-3'	Invitrogen
UBC-725	5'-GGGTGGGTG-3'	Invitrogen
UBC-726	5'-GGTGTGGGTG-3'	Invitrogen
UBC-728	5'-GTGGGTGGTG-3'	Invitrogen
UBC-730	5'-CCACACCCAC-3'	Invitrogen
UBC-735	5'-GGGAGAGGAG-3'	Invitrogen
UBC-750	5'-GGGTGGTGTG-3'	Invitrogen
1	5'-ACCCGGAAAC-3'	Biolegio
2	5'-TCGCAGCGAG-3'	Biolegio
3	5'-TGATGGCGTC-3'	Biolegio
A02	5'-CAGGCCCTTC-3'	Invitrogen
A03	5'-AGTCAGCCAC-3'	Invitrogen
A04	5'-AATCGGGCTG-3'	Invitrogen
A09	5'-GGGTAACGCC-3'	Invitrogen
A10	5'-GTGATCGCAG-3'	Invitrogen
F03	5'-CCTGATCACC-3'	Invitrogen
F04	5'-GGTGATCAGG-3'	Invitrogen
F12	5'-ACGGTACCAG-3'	Invitrogen

Από αυτούς τελικά επιλέχθηκαν οι παρακάτω 8 γενετικοί δείκτες (primers) και έδωσαν τα κατάλληλα αποτελέσματα προς μελέτη στην τεχνική PCR (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Οι γενετικοί δείκτες (primers) που επιλέχθηκαν.

Κωδικός Primer	Αλληλουχία	Εταιρεία
Y15	5'-AGTCGCCCTT-3'	Invitrogen
Pr14	5'-GGTGACGCAG-3'	Invitrogen
Y02	5'-CATCGCCGCA-3'	Invitrogen
UBC735	5'-GGGAGAGGAG-3'	Invitrogen
UBC-521	5'-CCGCCCACT-3'	Invitrogen
1	5'-ACCCGGAAAC-3'	Biolegio
Y01	5'-GTGGCATCTC-3'	Invitrogen
R13	5'-GGACGACAAG-3'	Invitrogen

Πρωτόκολλο PCR

Το πρωτόκολλο της PCR που χρησιμοποιήθηκε αναπτύχθηκε στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος και αποτελεί ένα συνοθύλευμα πρωτοκόλλων σχετικών PCR. Συνολικά το πρωτόκολλο της PCR (Πίνακας 5) που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από 35 κύκλους.

- Αρχική Αποδιάταξη: Θερμοκρασία 94 °C για 16 λεπτά.
- Θερμοκρασία 94 °C για 40 δευτερόλεπτα.
- Θερμοκρασία 38 °C για 1 λεπτό.
- Θερμοκρασία 72 °C για 1 λεπτό.
- Επανάληψη των τριών τελευταίων βημάτων άλλες 34 φορές.
- Θερμοκρασία 72 °C για 7 λεπτά
- Μετά στους 10 °C μέχρι να βγουν από τον κυκλοποιητή και να αποθηκευθούν στην κατάψυξη για περαιτέρω ανάλυση.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της PCR παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα και αφορούν τα αντιδραστήρια που αναλογούν σε ένα δείγμα για κάθε erppendorf tube ή πλακέτα DNA που χρησιμοποιείται στον θερμοκυκλοποιητή.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
DNA	1 μl
Buffer	3 μl (10X)
MgCl ₂	2,5 μl (25 mM)
DNTP's	2,5 μl (10mM)
Primer	3 μl (10μM)
Taq-polymerase	0,2 μl (5U/ μl)
H ₂ O	17,8 μl
Συνολικός όγκος	30 μl

Οι συνθήκες των θερμοκρασιακών κύκλων (Πίνακας 6) της αρχικής αποδιάταξης (first denaturation), των τριών σταδίων αποδιάταξη (denaturation)–επαναδιάταξης (annealing) – επιμήκυνσης (extention) και της τελικής επιμήκυνσης (final extention) φαίνονται επίσης πιο αναλυτικά και στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6. Συνθήκες θερμοκρασιακών κύκλων της PCR

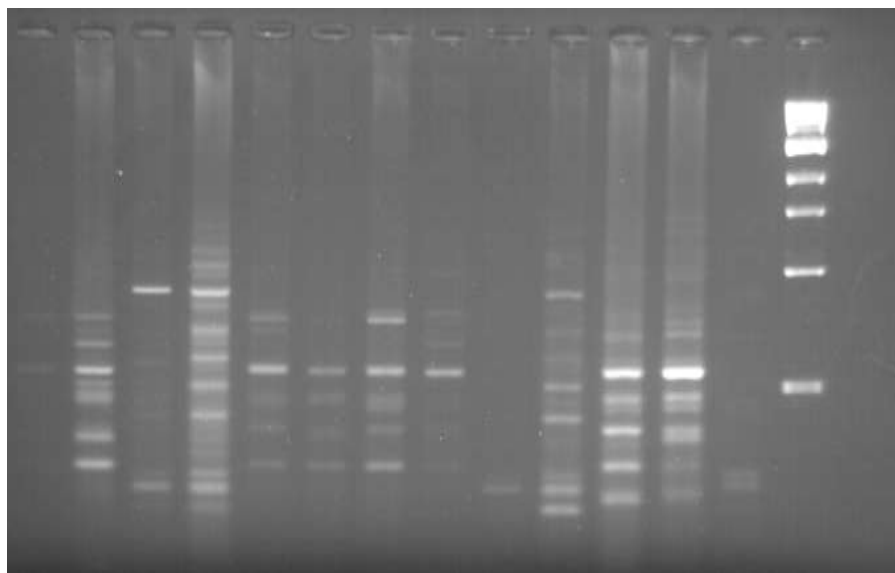
Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94	16 min	1
Αποδιάταξη	94	40 sec	34
Επαναδιάταξη	38	1 min	
Επιμήκυνση	72	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72	7 min	1

2.1 Ηλεκτροφόρηση PCR

Μετά το τέλος της PCR τα προϊόντα «φορτώνονται» σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Το πήκτωμα κατασκευάζεται μετά από θέρμανση διαλύματος TAE 1% και 1,4 gr στερεής αγαρόζης κατά τον ίδιο τρόπο όπως παρασκευάζεται η πηκτή ηλεκτροφόρησης γονιδιοματικού DNA και προστίθεται επίσης 2,5 μl Βρωμιούχου Αιθιδίου συγκέντρωσης 1%.

Στη συνέχεια τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και φορτώνονται τα προϊόντα της PCR μαζί με χρωστική ουσία. Ο ακριβής όγκος είναι 1 μl χρωστικής και 10 μl προϊόν της PCR. Επίσης σε ένα από τα πηγάδια σε κάθε σειρά τοποθετείται μοριακός δείκτης (Ladder) ανά 100 bp 0,5 μl μαζί με χρωστική 1 μl. Η παροχή της τάσης ορίζεται στα 60 V και μετά από μια ώρα κατά τον ίδιο τρόπο με το πήκτωμα DNA, τοποθετείται το πήκτωμα αγαρόζης στην ψηφιακή φωτογραφική μηχανή όπου προκύπτουν φωτογραφίες όπως φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 11).

Π1 Π2 Π3 Π4 Π5 Π6 Π7 Π8 Π9 Π10 Π11 Π12



Εικόνα 11. Φωτογραφία μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Τμήματος. (Ίδια πηγή).

2.2 Στατιστική ανάλυση

Από τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του είδους προέκυψαν στοιχεία όσο αφορά την σχέση μήκους βάρους $W = aL^b$. Για την ανάλυση των παραπάνω στοιχείων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 13.0, Statistica 6.0, JMP 5.0 και Minitab.

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων, ο δείκτης γονιδιακής ροής N_m , το test χ^2 και το test της πιθανότητας P υπολογίστηκαν με το λογισμικό πακέτο GenePop 3.4 (Reymond and Rousset, 1995).

Ο δείκτης N_m υπολογίστηκε σύμφωνα με τον Slatkin (1985). Τέλος, για την εκτίμηση της πιθανότητας P χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Markov ενώ για το test χ^2 σύμφωνα με τη μέθοδο του Fichier.

Ο δείκτης παραλλακτικότητας F_{ST} , με το λογισμικό πακέτο Arlequin επίσης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα TFGPA version 1.3 (2000) το οποίο αποτελεί σημαντικό εργαλείο για πληθυσμιακές αναλύσεις.

Οι γενετικές αποστάσεις D , οι 2x2 πίνακες γενετικής απόστασης (matrix distance) υπολογίστηκαν σύμφωνα με τους:

- ✓ Nei's minimum genetic distance, D_m (1972).
- ✓ Nei's standard genetic distance, D_s (1972).

Με το λογισμικό πακέτο POPULATION 1.2.28 (Langella, 1999).

Για την απεικόνιση των δενδρογραμμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, η Neighbor-Joining και η UPGMA με τα λογισμικά πακέτα Phylip 3.62 και TreeView 1.6.6.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

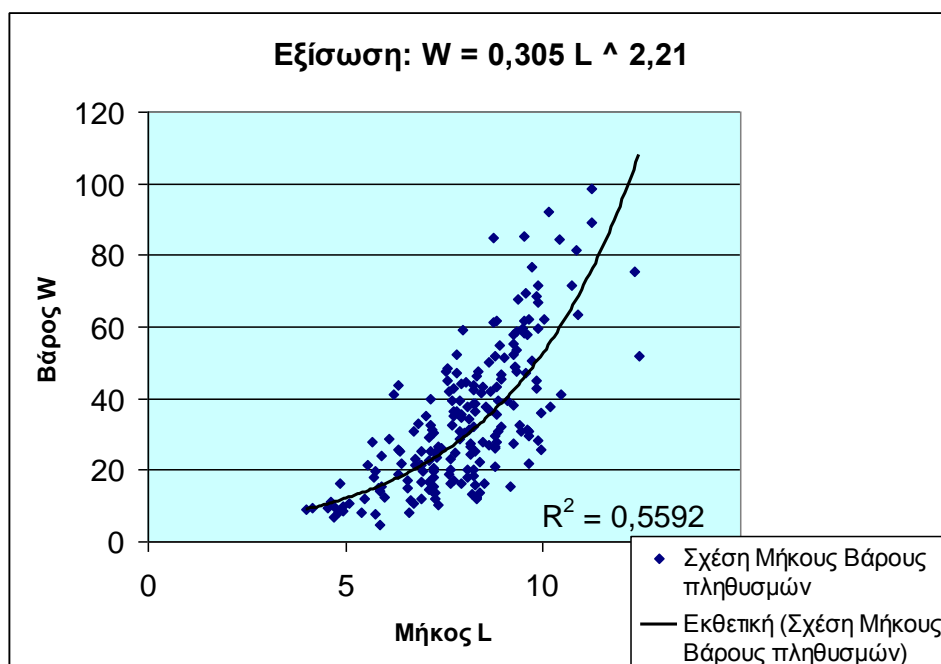
Για το σύνολο των 198 ατόμων του είδους *Microcosmus sabatieri* ύστερα από την συλλογή και μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο, έγιναν οι παρακάτω μετρήσεις

- μήκος σε mm,
- πλάτος σε mm και
- βάρος σε gr

Κατόπιν ακολούθησε στατιστική ανάλυση με στατιστικά προγράμματα, των μορφομετρικών χαρακτηριστικών. Εφαρμόστηκε το εκθετικό μοντέλο $W=a \cdot L^b$ και η εξίσωση λογαριθμήθηκε για να μειωθούν τα σφάλματα και να δώσουν καλύτερη συσχέτιση των αποτελεσμάτων.

Χρησιμοποιήθηκε η Ανάλυση της απλής παλινδρόμησης (Simple Regression) για τις δυο παραμέτρους Μήκος – Βάρος και παρατίθενται οι εικόνες που παρουσιάζουν τις διαγραμματικές απεικονίσεις των παραμέτρων μήκος – βάρος καθώς επίσης και οι στατιστικές σχέσεις που συνδέουν τις δύο αυτές παραμέτρους.

Από την στατιστική ανάλυση προκύπτει υψηλή συσχέτιση μεταξύ των παλινδρομήσεων και οι τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης κρίνονται ικανοποιητικές (Πίνακας 14) και συμπεραίνεται ότι οι πληθυσμοί διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους στο διάστημα εμπιστοσύνης 95 % σύμφωνα με τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά (μήκος, πλάτος, βάρος) που μετρήθηκαν στο σύνολο των ατόμων.

ΣΥΝΟΛΟ ΑΤΟΜΩΝ

Εικόνα 12. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης μήκους - βάρους μεταξύ των πληθυσμών (συνολικό διάγραμμα και των έξι πληθυσμών).

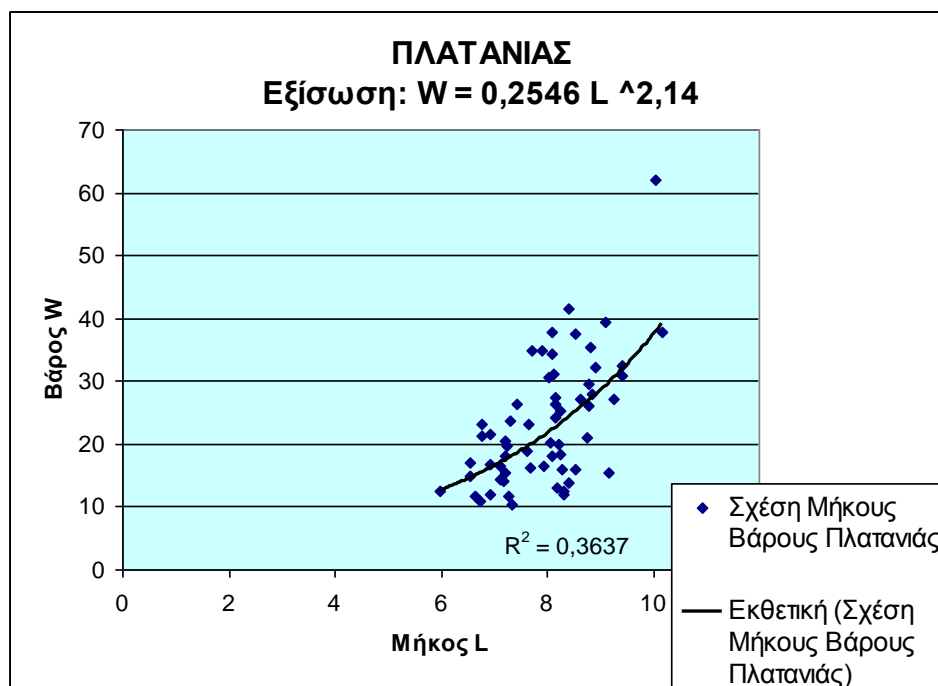
Πίνακας 7. Τα στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης παλινδρόμησης μεταξύ μήκους – βάρους για όλα τα άτομα όλων των πληθυσμών.

	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	B	Std. Error	Sig.
(Constant)	-,515	,126		-4,098	,000
Μήκος όλα τα άτομα	2,211	,140	,748	15,809	,000

Dependent Variable: Βάρος όλα τα άτομα

ΠΛΑΤΑΝΙΑΣ

Από την περιοχή Πλατανιάς του Νομού Μαγνησίας συλλέχθηκαν 61 άτομα και η απλή παλινδρόμηση μεταξύ του μήκους – βάρους έδειξε τα παρακάτω (Σχήμα 2) (Πίνακας 8):



Εικόνα 13. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης Μήκους Βάρους μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού ‘Πλατανιάς’.

Πίνακας 8. Τα στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης παλινδρόμησης μεταξύ μήκους – βάρους για τα άτομα του πληθυσμού ‘Πλατανιάς’.

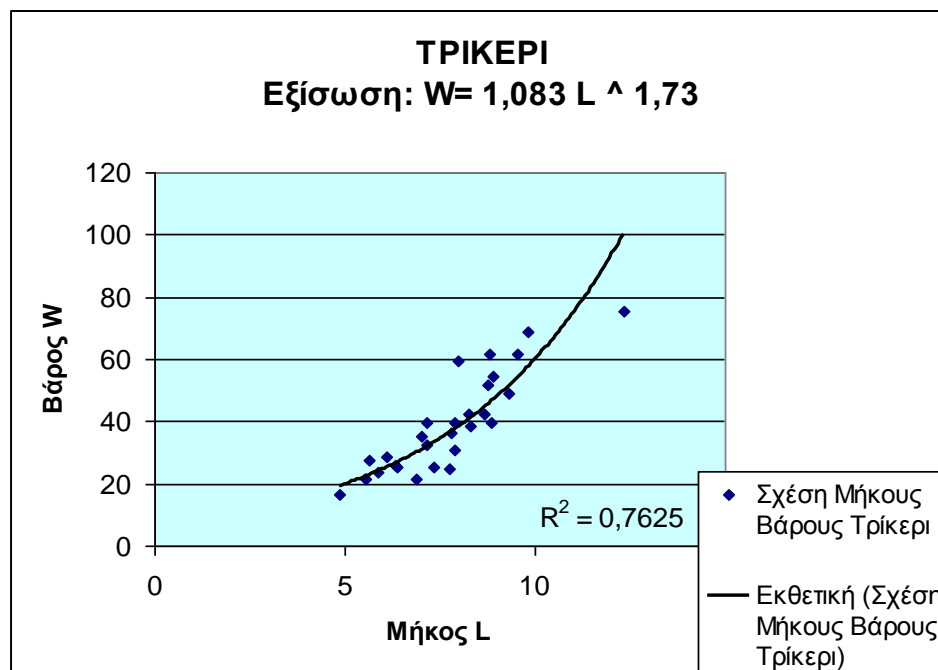
	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	B	Std. Error	Sig.
(Constant)	-,594	,336		-1,768	,082
Μήκος ατόμων Πλατανιάς	2,143	,374	,598	5,736	,000

Dependent Variable: Βάρος ατόμων Πλατανιάς

ΤΡΙΚΕΡΙ

Από την περιοχή Τρίκερι του Νομού Μαγνησίας συλλέχθηκαν 28 άτομα και η απλή παλινδρόμηση μεταξύ του μήκους – βάρους έδειξε τα παρακάτω (Σχήμα 3)

(Πίνακας 9):



Εικόνα 14. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης Μήκους Βάρους μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού ‘Τρίκερι’.

Πίνακας 9. Τα στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης παλινδρόμησης μεταξύ μήκους – βάρους για τα άτομα του πληθυσμού ‘Τρίκερι’.

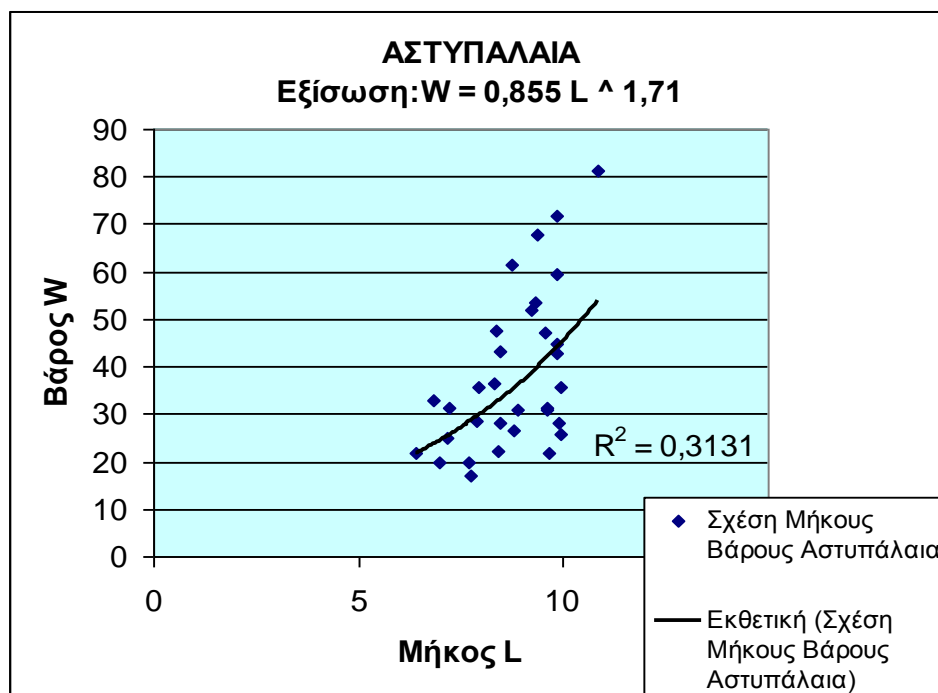
	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	B	Std. Error	Sig.
(Constant)	,035	,163		,214	,833
Μήκος ατόμων Τρίκερι	1,732	,184	,879	9,419	,000

Dependent Variable: Βάρος ατόμων Τρίκερι

ΑΣΤΥΠΑΛΛΙΑ 1

Από την Νήσο Αστυπάλεια στην πρώτη δειγματοληψία (Ιούνιος 2005)

συλλέχθηκαν 32 άτομα και η απλή παλινδρόμηση μεταξύ του μήκους – βάρους έδειξε τα παρακάτω (Σχήμα 4) (Πίνακας 10):



Εικόνα 15. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης Μήκους Βάρους μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού ‘Αστυπάλεια 1’.

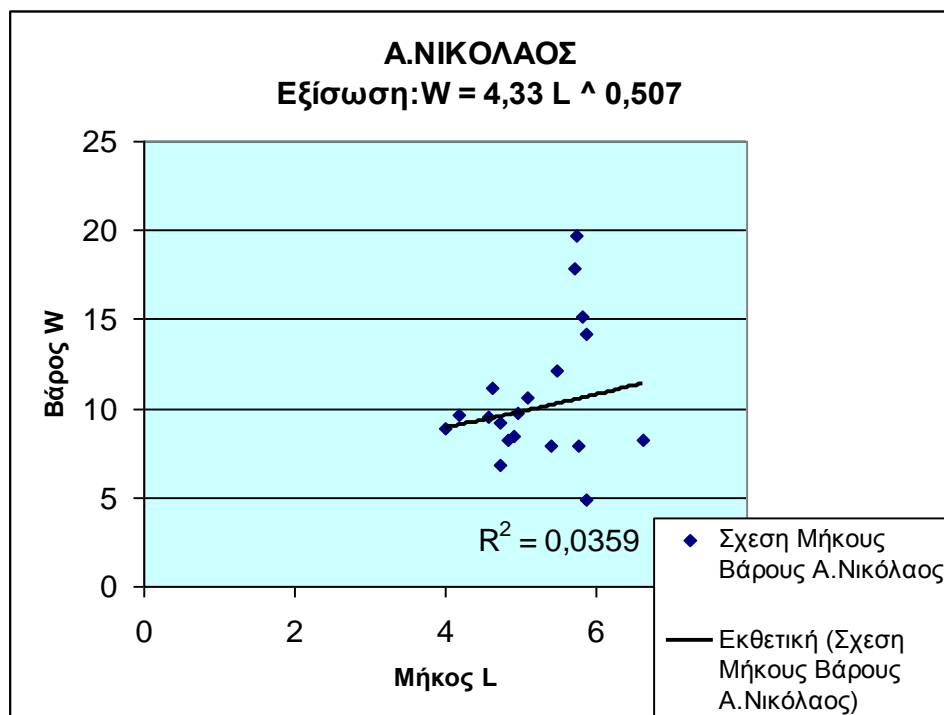
Πίνακας 10. Τα στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης παλινδρόμησης μεταξύ μήκους – βάρους για τα άτομα του πληθυσμού ‘Αστυπάλεια 1’.

	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	B	Std. Error	Sig.
(Constant)	-,068	,442		-,154	,879
Μήκος ατόμων Αστυπάλεια1	1,719	,470	,555	3,656	,001

Dependent Variable: Βάρος ατόμων Αστυπάλεια 1

A. ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Από την περιοχή Α. Νικόλαος του Νομού Αττικής συλλέχθηκαν 20 άτομα και η απλή παλινδρόμηση μεταξύ του μήκους – βάρους έδειξε τα παρακάτω (Σχήμα 5) (Πίνακας 11):



Εικόνα 16. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης Μήκους Βάρους μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού ‘Α. Νικόλαος’.

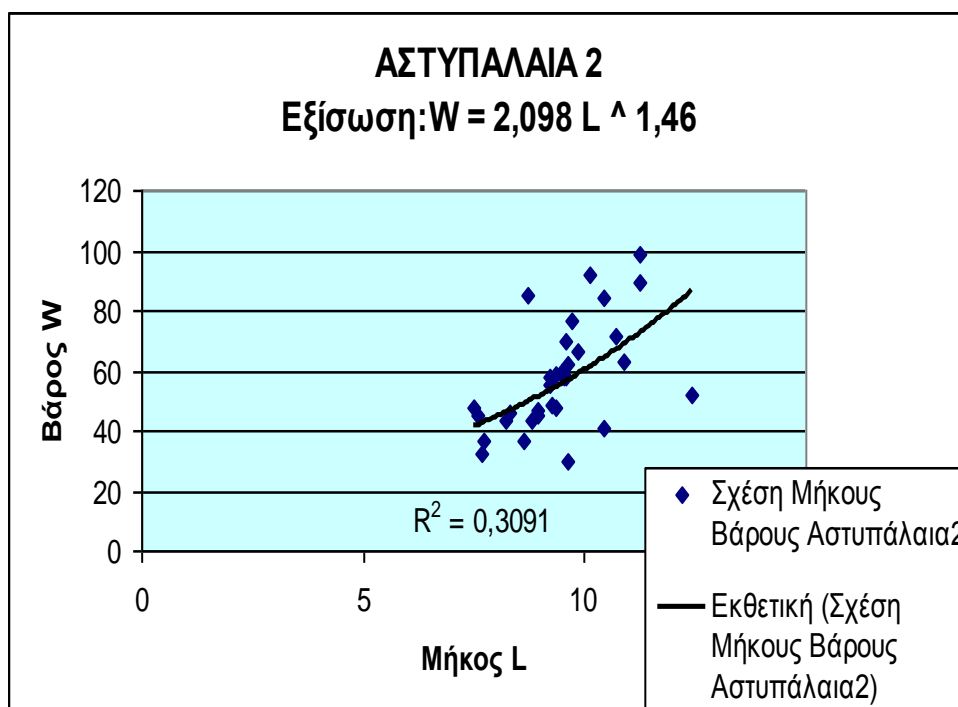
Πίνακας 11. Τα στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης παλινδρόμησης μεταξύ μήκους – βάρους για τα άτομα του πληθυσμού ‘Α. Νικόλαος’.

	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	B	Std. Error	Sig.
(Constant)	,637	,436		1,461	,162
Μήκος ατόμων Αγ.Νικόλαος	,507	,610	,198	,832	,417

Dependent Variable: Βάρος ατόμων Αγ.Νικόλαος

ΑΣΤΥΠΑΛΛΙΑ 2

Από την Νήσο Αστυπάλεια στην πρώτη δειγματοληψία (Αύγουστος 2006) συλλέχθηκαν 28 άτομα και η απλή παλινδρόμηση μεταξύ του μήκους – βάρους έδειξε τα παρακάτω (Σχήμα 6) (Πίνακας 12):



Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης Μήκους Βάρους μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού ‘Αστυπάλεια 2’.

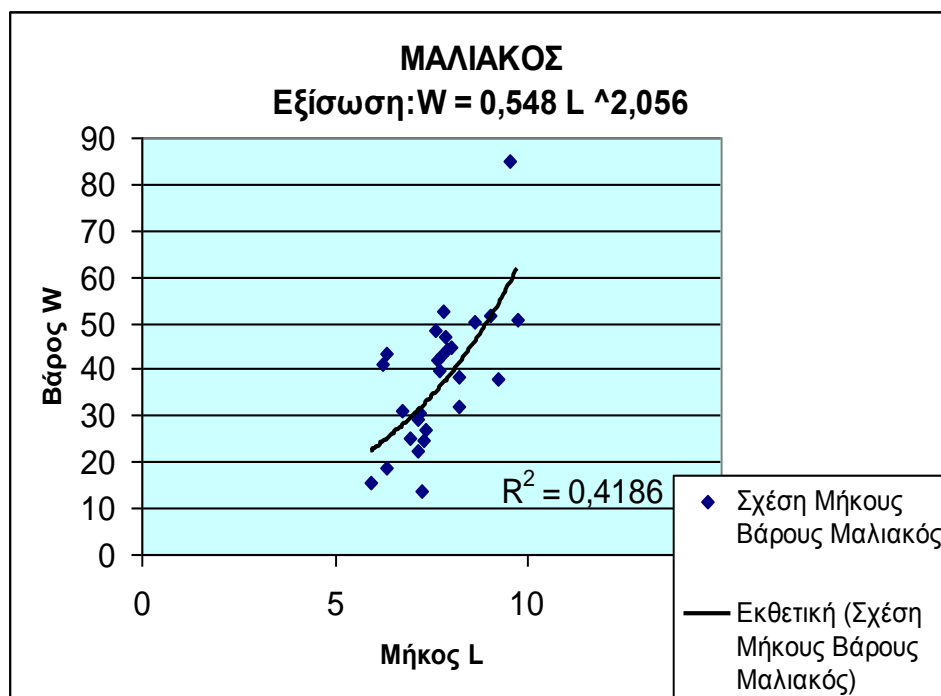
Πίνακας 12. Τα στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης παλινδρόμησης μεταξύ μήκους – βάρους για τα άτομα του πληθυσμού ‘Αστυπάλεια 2’.

	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	B	Std. Error	Sig.
(Constant)	,322	,375		,857	,398
Μήκος ατόμων Αστυπαλαι2	1,461	,386	,569	3,789	,001

Dependent Variable: Βάρος ατόμων Αστυπάλεια 2

ΜΑΛΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ

Από την περιοχή του Μαλιακού Κόλπου συλλέχθηκαν 29 άτομα και η απλή παλινδρόμηση μεταξύ του μήκους – βάρους έδειξε τα παρακάτω (Σχήμα 7) (Πίνακας 13):



Εικόνα 18. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης Μήκους Βάρους μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού ‘Μαλιακός’.

Πίνακας 13. Τα στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης παλινδρόμησης μεταξύ μήκους – βάρους για τα άτομα του πληθυσμού ‘Μαλιακός’.

	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	B	Std. Error	Sig.
(Constant)	-,261	,429		-,608	,548
Μήκος ατόμων Μαλιακός	2,056	,487	,645	4,224	,000

Dependent Variable: Βάρος ατόμων Μαλιακός

Πίνακας 14. Τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης b

ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΤΙΜΗ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ b
ΠΛΑΤΑΝΙΑΣ	2,14
ΤΡΙΚΕΡΙ	1,73
ΑΣΤΥΠΑΛΛΑΙΑ 1	1,71
Α. ΝΙΚΟΛΑΟΣ	0,50
ΑΣΤΥΠΑΛΛΑΙΑ 2	1,46
ΜΑΛΙΑΚΟΣ	2,05
ΣΥΝΟΛΟ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	2,21

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Με τη χρήση το στατιστικού πακέτου SPSS 13.0 έγινε σύγκριση των 6 πληθυσμών του *Microcosmus sabatieri* για κάθε ένα από τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά: Μήκος (Πίνακας 15), Βάρος (Πίνακας 16) και Πλάτος (Πίνακας 17).

Πίνακας 15. Αποτελέσματα της Ανάλυσης Διασποράς κατά ένα παράγοντα (Oneway ANOVA) για το μήκος (Μήκος – Πληθυσμοί).

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	238,601	5	47,720	40,577	,000
Within Groups	226,976	193	1,176		
Total	465,577	198			

Πίνακας 16. Αποτελέσματα της Ανάλυσης Διασποράς κατά ένα παράγοντα (Oneway ANOVA) για το βάρος (Βάρος – Πληθυσμοί)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37456,708	5	7491,342	39,154	,000
Within Groups	36926,473	193	191,329		
Total	74383,181	198			

Πίνακας 17. Αποτελέσματα της Ανάλυσης Διασποράς κατά ένα παράγοντα (Oneway ANOVA) για το Πλάτος (Πλάτος – Πληθυσμοί).

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	93,037	5	18,607	22,502	,000
Within Groups	159,598	193	,827		
Total	252,635	198			

3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Ύστερα από την απεικόνιση των δεδομένων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης PCR και την περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία τους και το “σκοράρισμα” των αλληλομόρφων που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Τμήματος υπό υπεριώδη ακτινοβολία προέκυψαν 22 γενετικοί τόποι από την ανάλυση των 8 εκκινητών στο σύνολο των 198 ατόμων. Το “σκοράρισμα” των πηκτωμάτων αγαρόζης που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για κάθε πληθυσμό παρατίθεται στο Παράρτημα.

Συντελεστής παραλλακτικότητας F_{ST}

Ο συντελεστής παραλλακτικότητας F_{ST} . (Total $F_{ST}=0.286$) (Πίνακας 18) και οι τιμές της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας H_{exp} ($H_e=0.499$) (Πίνακας 19), οι οποίες βρέθηκαν αρκετά χαμηλές με μικρότερη τιμή 0.0625 και μεγαλύτερη τιμή 0.387816 υπολογίστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα POPULATION 1.2.28 (Langella, 1999) και για τους 22 γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν.

Πίνακας 18. Τιμές συντελεστή Παραλλακτικότητας F_{ST}

	Αστυπάλαια1	Α.Νικόλαος	Πλατανιάς	Τρίκερι	Αστυπάλαια2	Μαλιακός
Αστυπάλαια1	0.00000					
Α.Νικόλαος	0.32790	0.00000				
Πλατανιάς	0.09194	0.21822	0.00000			
Τρίκερι	0.43474	0.50975	0.38793	0.00000		
Αστυπάλαια2	-0.03464	0.32427	0.08898	0.43434	0.00000	
Μαλιακός	0.54771	0.65046	0.47797	0.10970	0.55160	0.00000

Πίνακας 19. Τιμές αναμενόμενης ετεροζυγωτίας H_{exp} για τους 22 γενετικούς τόπους που μελέτήθηκαν.

0.0625	0.136007	0.177674	0.115174	0.260908	0.0795485
0.387816	0.366983	0.30979	0.261007	0.270811	0.136007
0.115174	0.0625	0.136007	0.0795485	0.261007	0.260908
0.387816	0.366983	0.177674	0.270811		

Από την επεξεργασία των δεδομένων με το στατιστικό πρόγραμμα Arlequin και τις τιμές αναμενόμενης ετεροζυγωτίας καθώς και τις τιμές του συντελεστή παραλλακτικότητας F_{ST} και σύγκριση αυτών με το exact test P value του Markov (Πίνακας 20) συμπεραίνουμε ότι δεν ακολουθούν το Νόμο Hardy-Weinberg law, ή δεν βρίσκονται ακόμη σε γενετική ισορροπία.

Πίνακας 20. Τιμές συντελεστή Παραλλακτικότητας F_{ST} με exact test P value

Number of permutations: 110.

	Αστυπάλαια1	Α.Νικόλαος	Πλατανιάς	Τρίκερι	Αστυπάλαια2	Μαλιακός
Αστυπάλαια1	*					
Α.Νικόλαος	0.0000+- 0.0000	*				
Πλατανιάς	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	*			
Τρίκερι	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	*		
Αστυπάλαια2	0.9909+- 0.0030	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	*	
Μαλιακός	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	*

Global test of differentiation among sample:

Non-differentiation: Exact P value = 0.00000 +- 0.00000 (6000 Markov steps done)

Γονιδιακή ροή

Με το όρο γονιδιακή ροή (gene flow) εννοούμε τη μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ των πληθυσμών. Η μεταφορά μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την προσθήκη ή την αφαίρεση νέου γενετικού υλικού στο ήδη υπάρχον (gene pool) ενός είδους.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν κυρίως την γονιδιακή ροή είναι τα περιβάλλοντα που διαβιεί το είδος, εάν ζει προσκολλημένο, εάν ζει σε απομακρυσμένες περιοχές με φυσικά όρια ή όχι, εάν είναι είδος που μετακινείται, κολυμπά μεγάλες αποστάσεις, ο τρόπος αναπαραγωγής κ.α. Ο δείκτης N_m ($N_m=0.046$) υπολογίστηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Genepop (Version 3.4) (Slatkin & Barton, 1989) και έγινε σύγκριση ανά ζεύγη (pairwise) με το στατιστικό πρόγραμμα Arlequin (Πίνακας 21).

- Mean sample size: 16.5
- Mean frequency of private alleles $p(1)= .3217213$
- Number of migrants for mean $N=10$: .1154552
- Number of migrants for mean $N=25$: 8.472007E-2
- Number of migrants for mean $N=50$: 6.724302E-2
- Number of migrants after correction for size= 6.997284E-2

Πίνακας 21. Matrix test του συντελεστή γονιδιακής ροής N_m

	Αστυπάλαια1	Α.Νικόλαος	Πλατανιάς	Τρίκερι	Αστυπάλαια2	Μαλιακός
Αστυπάλαια1	0.00000					
Α.Νικόλαος	0.48787	0.00000				
Πλατανιάς	0.10125	0.27913	0.00000			
Τρίκερι	0.76910	1.03978	0.63379	0.00000		
Αστυπάλαια2	0	0.47987	0.09767	0.76786	0.00000	
Μαλιακός	1.21095	1.86087	0.91559	0.12321	1.23015	0.00000

Γενετική απόσταση

Γενετική απόσταση καλείται το μέγεθος της διαφοράς – ανομοιομορφίας του γενετικού υλικού μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών του ίδιου είδους ή και μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν (Πίνακας 22) (Πίνακας 23) σύμφωνα με

- Nei's minimum, Dm (1972).
- Nei's standard genetic distance, Ds (1972).
- Slatkin genetic distance (1985)

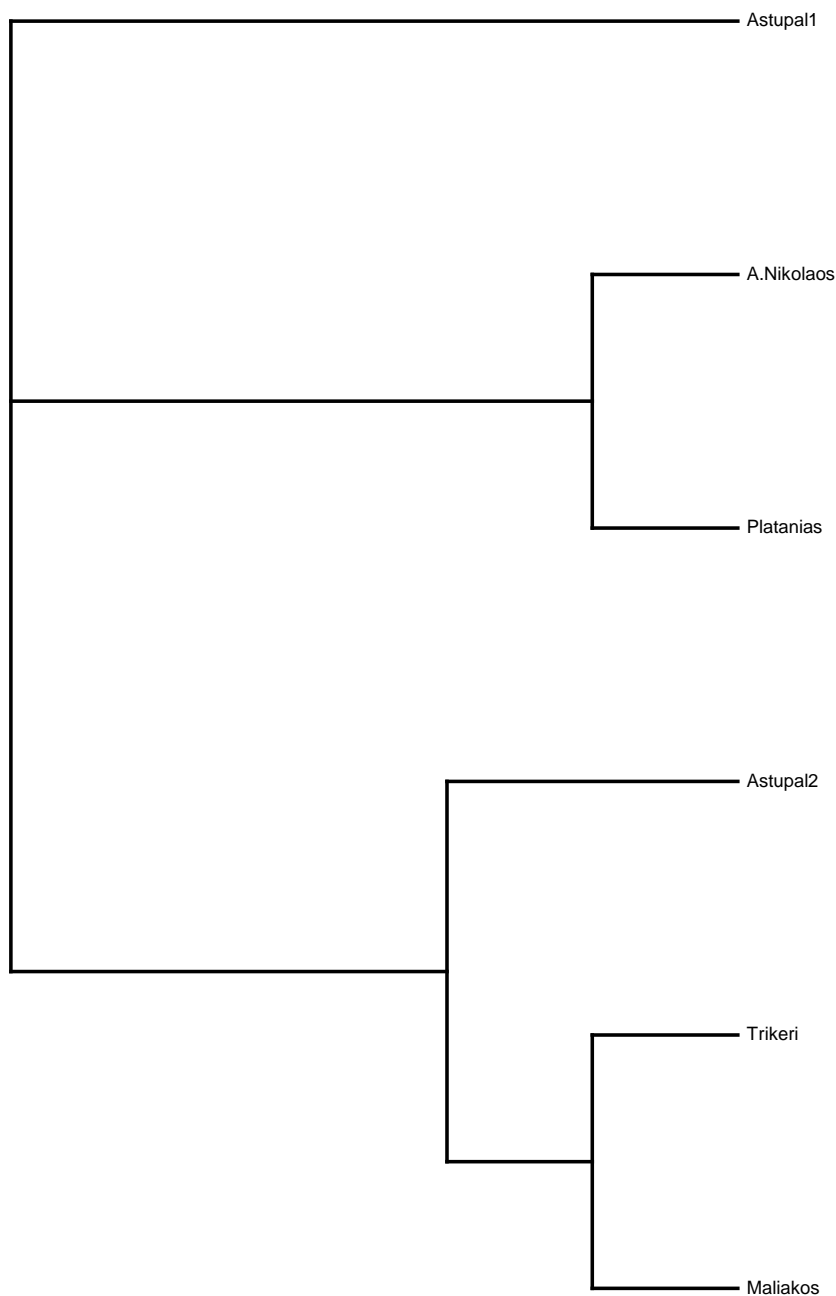
Οι υπολογισμοί των γενετικών αποστάσεων έγιναν με το λογισμικό πακέτο POPULATION 1.2.28 (Langella, 1999) και για την απεικόνιση των δενδρογραμμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, η Neighbor-Joining (Σχήμα 8) (Σχήμα 10) και η UPGMA (Σχήμα 9) (Σχήμα 11) με τα λογισμικά πακέτα Phylip 3.62 και TreeView 1.6.6.

Πίνακας 22. Γενετική Απόσταση κατά Nei μεταξύ των πληθυσμών.

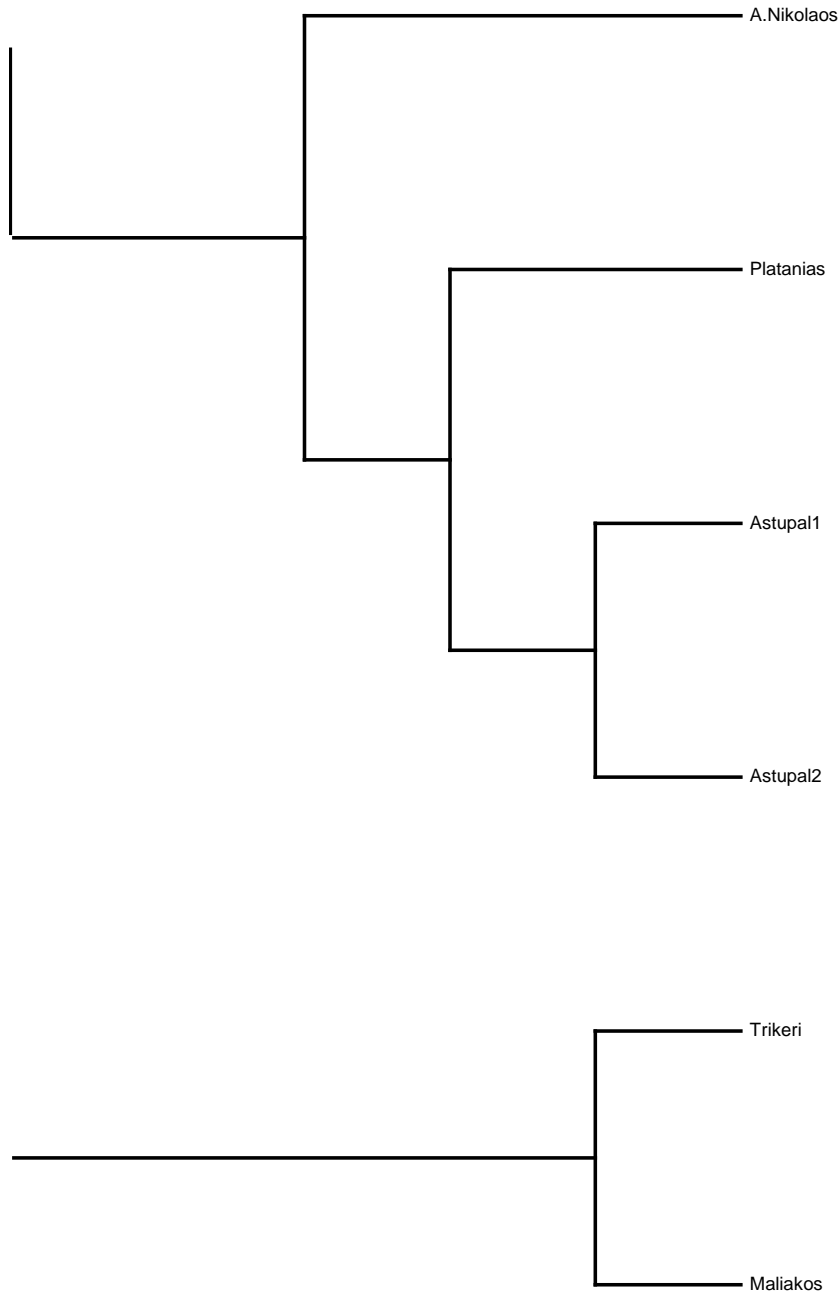
	Αστυπάλαια1	Α.Νικόλαος	Πλατανιάς	Τρίκερι	Αστυπάλαια2	Μαλιακός
Αστυπάλαια1	0					
Α. Νικόλαος	0.18916	0				
Πλατανιάς	0.04716	0.14513	0			
Τρίκερι	0.24106	0.40411	0.27864	0		
Αστυπάλαια2	0	0.18916	0.04716	0.24106	0	
Μαλιακός	0.30138	0.58733	0.35290	0.02957	0.30138	0

Πίνακας 23. Γενετική Απόσταση κατά Slatkin μεταξύ των πληθυσμών.

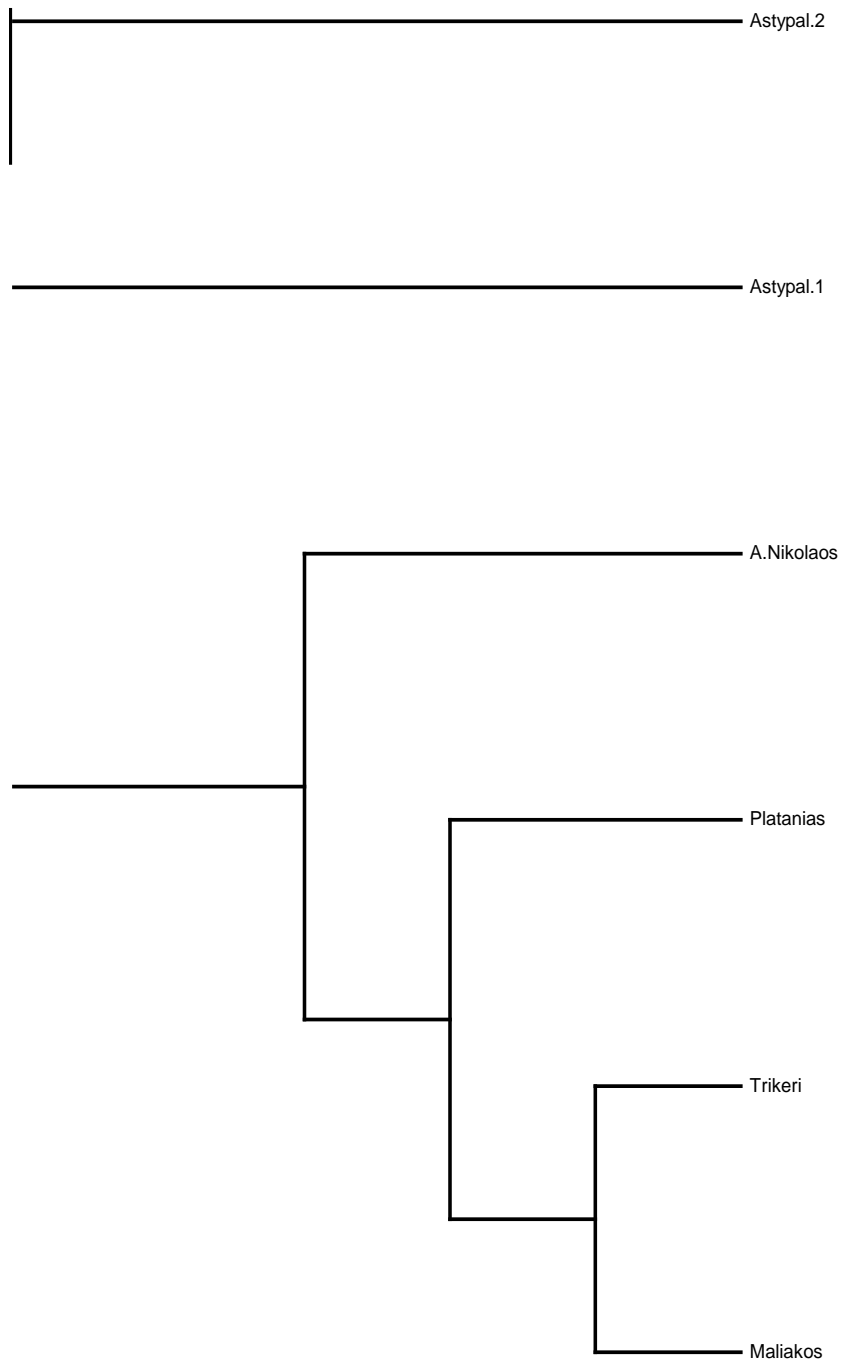
	Αστυπάλαια1	Α.Νικόλαο	Πλατανιάς	Τρίκερι	Αστυπάλαια2	Μαλιακός
Αστυπάλαια1	0					
Α. Νικόλαος	0.48787	0				
Πλατανιάς	0.10125	0.27913	0			
Τρίκερι	0.76910	1.03978	0.63379	0		
Αστυπάλαια2	0	0.47987	0.09767	0.76786	0	
Μαλιακός	1.21095	1.86087	0.91559	0.12321	1.23015	0



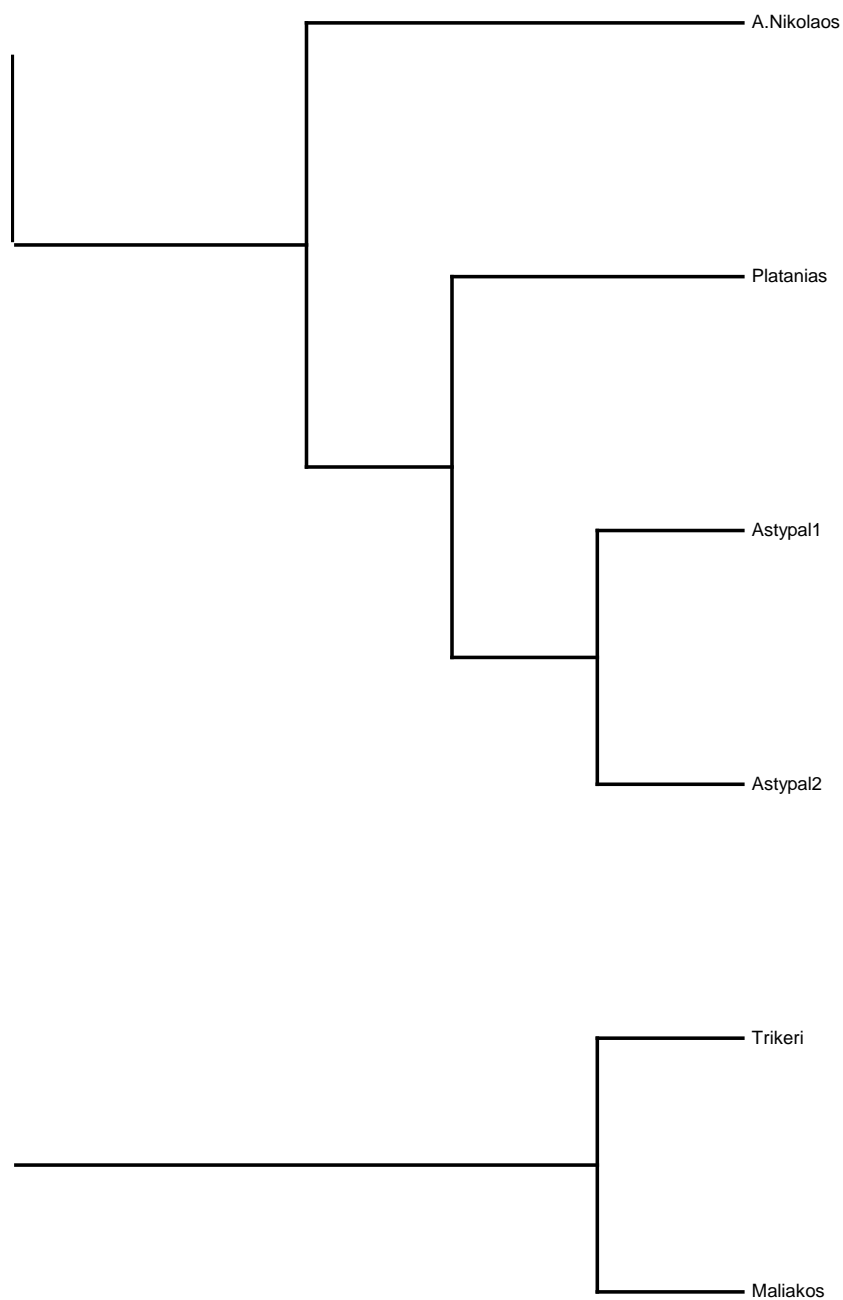
Εικόνα 19. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης κατά Nei (1972) με τη Neighbour-Joining μέθοδο.



Εικόνα 20. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης κατά Nei (1972) με τη UPGMA μέθοδο.



Εικόνα 21. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης κατά Slatkin (1985) με τη Neighbour-Joining μέθοδο.



Εικόνα 22. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης κατά Slatkin (1985) με τη UPGMA μέθοδο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν να αναλυθούν κάποια μορφολογικά δεδομένα και να μελετηθεί η γενετική δομή των ατόμων έξι συνολικά πληθυσμών του είδους *Microcosmus sabatieri* με τη μελέτη και επεξεργασία γενετικών δεδομένων που αφορούν το συγκεκριμένο είδος και τα οποία προέκυψαν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της τεχνικής της τυχαίας ενίσχυσης πολυμορφικού DNA (RAPD).

Δεδομένου ότι η τεχνική RAPD είναι λιγότερο επίπονη σε σύγκριση με άλλες μοριακές τεχνικές, παράγει αποτελέσματα με μικρότερο στατιστικό σφάλμα και δεν απαιτεί προηγούμενη γνώση των αλληλουχιών του γενετικού υλικού του οργανισμού που μελετάται. Μπορεί να αποδειχθεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος εκτίμησης των γενετικών συγγενειών σε μοριακό επίπεδο μεταξύ πληθυσμών υδρόβιων οργανισμών και ιχθύων.

Παρόλα αυτά εξαιτίας του γεγονότος ότι οι ενισχύσεις της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης PCR πραγματοποιούνται σε μη αυστηρές συνθήκες, αλλά τυχαία, η επαναληψιμότητα των παρατηρήσεων απαιτεί προσεκτικό έλεγχο των πειραματικών συνθηκών. Έχουν αναφερθεί πολλά τεχνικά προβλήματα από την εφαρμογή της μεθόδου RAPD από πολλούς συγγραφείς στον τομέα της γενετικής των πληθυσμών (Hadrys et al., 1992 : Lynch & Milligan, 1994 : Naish et al., 1995).

Η τεχνική RAPD από την φύση της, εκτός από μοναδικές περιοχές DNA, ενισχύει γενετικό υλικό από περιοχές με υψηλή επαναληψιμότητα (Williams et al., 1993). Είναι επομένως πιθανό πολλοί από τους δείκτες RAPD να είναι προϊόντα ενίσχυσης λιγότερο λειτουργικών περιοχών του γονιδιώματος οι οποίες δεν ανταποκρίνονται στην επιλογή σε φαινοτυπικό επίπεδο.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους προκύπτουν νέοι δείκτες RAPD δεν είναι γνωστοί, αλλά πιθανόν να προκύπτουν από αλλαγές νουκλεοτιδίων στις θέσεις ενάρξεως (Naish et al., 1995). Το σωματικό μέγεθος του *M. sabatieri* είναι συνήθως από 10 – 15 cm ενώ ως μέγιστο έχει αναφερθεί 20 cm. Το είδος εξαπλώνεται σε όλη την έκταση της υποπαραλιακής και περιπαραλιακής ζώνης και ζει προσκολλημένο σε βραχώδη υποστρώματα ή και πάνω σε συσσωματώματα βιογενών θρυμμάτων όπως για παράδειγμα νεκρά όστρακα από 1 – 200 m βάθος. Αναπαράγεται εγγενώς, με ενδιάμεσο πλαγκτονικό προνυμφικό στάδιο, από το φθινόπωρο μέχρι την άνοιξη.

Η διατροφή του είδους καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το βλεννώδες πλέγμα που εκκρίνεται από το ενδόστυλο. Η βλέννα ωθείται από τις βλεφαρίδες του φάρυγγα σε ένα έλασμα που υπάρχει στο εσωτερικό του φάρυγγα. Τα τροφικά σωματίδια που εισήλθαν με το ρεύμα του νερού συλλαμβάνονται από το βλεννώδες πλέγμα. Από τη βιολογία του είδους διαπιστώνουμε ότι είναι ένας εδραίος οργανισμός χωρίς πολλές μετακινήσεις αλλά υπάρχει μεγάλη πελαγική ζωή στο προνυμφικό στάδιο, γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να επηρεάζεται η μεταφορά των ατόμων από θαλάσσια ρεύματα, ανέμους και άλλα καιρικά φαινόμενα.

Το αρχικό ζήτημα που τέθηκε ήταν η εξαγωγή DNA από τον οργανισμό και ποιο πρωτόκολλο θα ακολουθηθεί. Η διαδικασία ήταν ιδιαίτερα δύσκολη μέχρι να δημιουργηθεί το κατάλληλο πρωτόκολλο και να βρεθούν οι συνθήκες ώστε να απομονωθεί το γενετικό υλικό όσο περισσότερων ατόμων κατέστη δυνατό. Αυτό που πρέπει να τονισθεί είναι ότι από ένα σύνολο έξι πληθυσμών του είδους που μελετήθηκαν, καθένας από αυτούς αποτελούνταν από διαφορετικό αριθμό ατόμων και πιο συγκεκριμένα το δείγμα ήταν ανομοιογενές λόγω της σχετικής δυσκολίας εύρεσης των ατόμων του είδους αυτού, γεγονός το οποίο ίσως να επηρέασε τα συμπεράσματα που παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία.

Με βάση την επεξεργασία των μορφομετρικών χαρακτηριστικών διαπιστώνεται ότι οι πληθυσμοί διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά γεγονός που συμφωνεί και με την μελέτη των Antoniadou et al., 2005 και όπως αναφέρουν σχετίζεται με τη φυσιογνωμία του ενδαιτήματος, καθώς το είδος ζει προσκολλημένο σε κεκλιμένα βράχια και αυτό που πρέπει να κάνουν τα άτομα είναι να εκτείνουν την αξονική τους αύξηση έτσι ώστε να επιτύχουν την άνοδο στην υδάτινη στήλη εξασφαλίζοντας την τροφοληψία τους. Η συνολική ετεροζυγωτία που βρέθηκε είναι υψηλή $H_e=0.499$ αλλά όχι στατιστικά σημαντική σε σχέση με την μηδενική υπόθεση $H_0=0.311$, γεγονός που συνεπάγεται ότι παρατηρείται έλλειμμα ετεροζυγωτίας μεταξύ των ατόμων των πληθυσμών που συλλέχθηκαν. Ο συνολικός δείκτης $Total F_{IS}=0.492$ είναι αρκετά υψηλός και στατιστικά σημαντικός στο **P₉₉ criterion**, γεγονός που υποδηλώνει έναν πιθανό διαχωρισμό τοπικών υποπληθυσμών του είδους.

Οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν δεν ακολουθούν το Νόμο Hardy-Weinberg ή δεν βρίσκονται ακόμη σε γενετική ισορροπία και αποδεικνύεται ότι δεν υπάρχει η τυχαία διασταύρωση μεταξύ των ατόμων. Ο συντελεστής παραλλακτικότητας $Total F_{ST}=0.286$ βρέθηκε αρκετά υψηλός και ο συνδυασμός του δείκτη συγκρίνοντας τους πληθυσμούς κατά ζεύγη είναι στατιστικά σημαντικός στο **P₉₉ criterion** για όλους τους πληθυσμούς και για όλους τους γενετικούς τόπους που βρέθηκαν και αναλύθηκαν.

Τα δεδομένα μας υποδηλώνουν χαμηλή γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών αφού η τιμή του δείκτη $N_m=0.046$ βρέθηκε αρκετά χαμηλή. Τα παραπάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το είδος ίσως να έχει σχηματίσει τοπικούς απομονωμένους αναπαραγωγικά και γεωγραφικά πληθυσμούς και χαρακτηρίζεται από χαμηλό ποσοστό γονιδιακής ροής.

Ωστόσο όμως, άλλοι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα, οι άνεμοι, τα ρεύματα και ωκεανογραφικά μέτωπα ενδεχόμενα να περιορίζουν την εξάπλωση των λαρβών κάποιου θαλάσσιου οργανισμού (Exadactylos, 1997) και σημαντικό είναι επίσης ότι το είδος *M. sabatieri* είναι ένας εδραίος οργανισμός που ζει προσκολλημένος.

Η χαμηλή γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών στηρίζεται σε πολλές άλλες παραδοχές, όπως τυχαία διασταύρωση, ουδέτερα αλληλόμορφα (neutral alleles) και πληθυσμούς σε γενετική ισορροπία (Slatkin, 1985, Slatkin & Barton, 1989, Cockerham & Weir, 1993).

Εάν οι πληθυσμοί δεν έχουν φτάσει σε γενετική ισορροπία τα F-statistics θα υπερκτιμήσουν το βαθμό παρατηρούμενης διαφοροποίησης και ο δείκτης γονιδιακής ροής θα υπερκτιμήσει τις πραγματικές τιμές (Slatkin, 1985).

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η μελέτη και η γενικότερη προσέγγιση του είδους αυτού στο εργαστήριο ήταν μια επίπονη και πολύωρη διαδικασία αφού για το είδος *Microcosmus sabatieri* αλλά και για το γένος *Microcosmus* γενικότερα υπάρχουν σχετικά ελάχιστες εάν όχι μηδενικές εργασίες που να αφορούν την γενετική τους δομή και την πληθυσμιακή γενετική ειδικότερα αλλά και την βιολογία τους. Ένα είδος το οποίο έχει μελετηθεί και ανήκει στα Ουροχορδωτά είναι το είδος *Ciona intestinalis*.

Η περιγραφή του γενετικού πολυμορφισμού, που εντάσσεται σε μία γενικότερη προσπάθεια μελέτης της βιοποικιλότητας οικοσυστημάτων, ενδιαιτημάτων, ειδών, πληθυσμών, θεωρείται το πλέον απαραίτητο βήμα τόσο για επιστημονικούς σκοπούς (κατανόηση μηχανισμών επιλογής, προσαρμογής και εξέλιξης των ειδών) όσο και για εφαρμοσμένους (διαχείριση, προστασία, διάσωση αποθεμάτων).

Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι απαιτείται περισσότερη έρευνα για το είδος *Microcosmus sabatieri* και κρίνεται απαραίτητη για να δοθεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της γενετικής δομής του είδους τόσο σε επίπεδο πληθυσμού όσο και σε άτομο. _

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Αντωνιάδου, Χ., Βαφείδης Δ., Χιντήρογλου Χ., (2005).** Βιομετρικές – Αλλομετρικές σχέσεις του εδώδιμου ασκιδίου *Microcosmus sabatieri*, Roule 1885 σε πληθυσμούς του Ν. Αιγαίου. Πρακτικά 12^ο Πανελληνίου Συνεδρίου Ιχθυολόγων. Δράμα Οκτώβριος 2005.
2. **Abbott, D.P. (1957).** Ascidiens. In Treatise on marine ecology and paleoecology. Vol I. Ecology. Edited by J.W Hedgpeth. Geological Society American Members 67:1197-1199.
3. **Abbott, D.P. and Newberry A.T., (1980).** Urochordata: the tunicates. In intertribal invertebrates of California. Edited by R.H Morris, D.P Abbott and E.C Haderlie. Stanford University Press, Stanford California. Pp 177-226.
4. **Barker, G.C. (2002).** Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. Transactions of the Royal society of tropical medicine and hygiene 96, Supplement 1 S1/21-S1/24.
5. **Barroso, R.M., Hilsdorf, A. W.S., Moreira, H. L.M., Cabello, P.H., Traub-Cseko, Y. M. (2005).** Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. Aquaculture 247 (1-4): 51-65.
6. **Berner, L.D. (1957).** Pelagic tunicates. In Treatise on marine ecology and paleoecology. Vol I. Ecology. Edited by J.W Hedgpeth. Geological Society Am. Mem 67:1201.
7. **Berril, N.J., (1950).** The Tunicata with an account of the British species. The Ray Society. London.
8. **Bouza, C., Arias, J., Castro, J., Sanchez, L., Martinez, P., (1999).** Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta* L., at the southern limit of the distribution range of the anadromous form. Molecular Ecology. 8: 1991-2001.
9. **Brunetti, R., Beghi, L., Marin, M.G. and Bressan, M., (1985).** Survival and growth of *Molgula socialis* Alder, 1863 at different temperature-salinity combinations. Vie Milieu 35:43-47.
10. **Carballo, J.L., (2000).** Larval ecology of an ascidian tropical population in a Mediterranean enclosed ecosystem. Marine Ecology. Progress. Series 195:159-167.

11. **Carvalho, G. and Hauser L. (1994).** Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Review Biological Fisheries*. 4:326-350.
12. **Cockerham, C.C., Weir, B.S. (1993).** Estimation of gene flow from F-statistics. *Evolution* 47:855-863.
13. **Davis, A. R. (1995).** Over – exploitation of *Pyura chilensis* (Ascidiacea) in Southern Chile: the urgent need to establish marine reserves. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 68:107-116.
14. **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*). *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Science*. 48:1606-1612.
15. **Dong Z. and Zhou E. (1998).** Application of the Random Amplified Polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*. 29:595-600.
16. **Durante, K.M., (1991).** Larval behaviour, settlement preference and induction of metamorphosis in the temperate solitary ascidian *Molgula citrina* Alder & Hancock. *J. Exp. Marine Biology Ecology*. 145:175-187.
17. **Dybern, B.I., (1969).** Distribution and ecology of ascidians in Kviturdivikpollen and Vagsbopollen on the West coast of Norway. *Sarsia*, 37:21-40.
18. **Epel, D., Hemela, K., Shick, M. and Patton, C., (1999).** Development in the floating world: defenses of eggs and larvae against damage from UV radiation. *American Zoology* 39:271-278.
19. **Exadactylos A. (1997).** Population Genetics of the Dover sole, *Solea solea* L. Linnaeus, 1758. Teleostei: Soleidae. Ph.D. Thesis. University of Liverpool, School of Biological Sciences, Port Erin Marine Lab., UK.
20. **Exadactylos, A., Geffen, A.J., Panagiotaki, P., Thorpe, J.P. (2003).** Population structure of Dover sole *Solea solea*: RAPD and allozyme data indicate divergence in European stocks. *Marine Ecology Progress. Series*, Vol.246:253-264.

21. **Gomes C., Dales R. B. G., Hazel A. and Oxenford A. (1998).** The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Molecular Ecology*. 7:1029-1039.
22. **Goodbody, I., (1993).** The ascidian fauna of a Jamaican lagoon – 30 years of change. *Review Biological Trop*. 41:35-38.
23. **Goodbody, I., (2000).** Diversity and distribution of ascidians (Tunicata). In the Pelican Cays Belize Atoll Res Bull 480:302-326.
24. **Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992).** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1:55-64.
25. **Hansen, M.M., Nieleesen, E.E., Mensberg, K.LD. (1997).** The problem of sampling families rather than populations: relatedness among individuals in samples of juvenile brown trout (*Salmo trutta*, L.). *Molecular Ecology*. 6: 469-474.
26. **Havenhand, J.N. and Svane, I., (1991).** Roles of hydrodynamics and larval behavior in determining spatial aggregation in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Marine Ecology Progress. Series* 68:271-276.
27. **Herdman, W.A. (1882).** Report of the Tunicata collected during the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873 – 1876. I. Ascidiæ simplices. *Zoological Challenger Expedition*. 6:1-296.
28. **Hesham Abdallah Hassanien¹, Mohumad Elnady¹, AliObeida¹ & Hania Itriby². (2004).** Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquaculture Research*. 35:587-593.
29. **Hickman, C., Roberts, L. and Larson A. (2001).** Integrated principles of Zoology 11th edition, Mcgraw – Hill Higher education.
30. **Hirose, E., (1999).** Pigmentation and acid storage in the tunic: protective functions of the tunic cells in the tropical ascidian *Phallusia nigra*. *Invertebrate Biology*. 118:414-422.

31. **Hoarau, G., Piquet, A.M.-T., van der Veer, H.W., Rijnsdorp, A.D., Stam, W.T. and Olsen, J.L. (2004).** Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: a comparison of resolving power between microsatellites and mitochondrial DNA data. *Journal of Sea Research* 51:183-190.
32. **Huang, B.X., Peakall, R. and Hanna, P.J. (2000).** Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Marine Biology* 136:207-216.
33. **Ihssen, P., Booke, H., Casseiman, J., McGlade, J., Payne, N. and Utter F. (1981).** Stock identification: Materials and Methodes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 38:1838-1855.
34. **Jarne, P., Lagoda, P.J.L., (1996).** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecology. Evol.* 11: 424-429.
35. **Jorde, P.E., Ryman, N., (1996).** Demographic genetics of brown trout (*Salmo trutta*) and estimation effective population size from temporal changes of allele frequencies. *Genetics* 143: 1369-1381.
36. **King, D., (1983).** Genetic analysis of enzyme polymorphisms in herring (*Clupea harengus* L.) *Heredity* 52: 121-131.
37. **Koukouras, A., Voultsiadou-Koukoura, E., Kevrekidis, T., Vafidis, D. (1995).** Ascidian fauna of the Aegean Sea with a check list of the eastern Mediterranean and Black Sea species. *Annales de l'Institute Oceanographique* 71: Issue 1 19-34.
38. **Λαζαρίδου-Δημητριάδου Μ., (1992).** Γενική Ζωολογία, Εκδόσεις ΓΙΑΧΟΥΔΗ.
39. **Lambert, C.C. and Brandt, C.L., (1967).** The effect of light on the spawning of *Ciona intestinalis*. *Biological Bulletin (Woods Hole)*, 132:222-228.
40. **Lannal, J., Gall, G., Thorpe, J., Nash, C. and Ballachey B. (1989).** Genetic resource management of fish. *Genome*. 31:798-804.
41. **Langella O. (1999).** Population genetic software (version 1.2.28). Available from:<http://www.cnrsgif.fr/pge/bioinfo/populations/index.php?lang=en>.
42. **Lynch, M., Milligan, B.G. (1994).** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. 3:91-99.

43. **Μαγουλάς, Α., (1990).** Ποικιλότητα του μιτοχονδριακού DNA στους πληθυσμούς σαρδέλας και γούρου των Ελληνικών Θαλασσών και φυλογενετικά συμπεράσματα. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης Ηράκλειο, Κρήτη.
44. **Mamuris, Z., Apostolidis, AP, Triantaphyllidis, C. (1998).** Genetic protein in red mullet (*Mullus barbatus*) and striped red mullet (*M. surmuletus*) populations from the Mediterranean Sea. *Marine Biology* 130: 353-360.
45. **Mamuris Z., Stoumboudi M. Th., Stamatis K., Barbieri R. and Moutou K. A. (2005).** Genetic variation in populations of the endangered fish *Ladigesocypris ghigii* and its implications for conservation. *Freshwater Biology*. 50:1441–1453.
46. **Marin, M.G., Bressan, M., Beghi, L. and Brunetti, R., (1987).** Thermo-haline tolerance of *Ciona intestinalis* (L., 1767) at different developmental stages. *Cahiers de Biologie Marine*. 28:47-57.
47. **Millar, R.H., (1971).** The biology of Ascidians. *Adv. Marine. Biology* 9:1-100.
48. **Mcgowan C. and Davidson W. S. (1998).** The RAPD technique fails to detect a male-specific genetic marker in Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*. 53:1134–1136.
49. **Monniott, F., Giannesini, P.J., oudot, J. and Richard, M.J., (1986).** Ascidiées salissures marines et indicateurs biologiques (metaux, hydrocarbures) *Bull. Mus. Natl. Hist. Natl* 8:215-245.
50. **Montaldo, H. H. and Meza-Herrera, C. A. (1998).** Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Review Article, *Animal Biotechnology* 1:256-262.
51. **Mork, J., Ryman, N., Stahl, G., Utter, F., Sudnes, G., (1985).** Genetic variation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout its range. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 42: 1580-1587.
52. **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.
53. **Mullis, K.B. (1990).** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56-65.

54. **Naranjo, S.A., Carballo, J.L. and Garcia – Gomez, J.C., (1996).** Effects of environmental stress in ascidian populations in Algeciras Bay (Southern Spain). Possible marine bioindicators? *Marine Ecology Progress. Series* 144:119-131.
55. **Naish, K.A., Warren, M., Bardakci, F., Skibinski, D.O.F., Carvalho, G.R., Mair, G.C. (1995).** Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) *Molecular Ecology*. 4:271-274.
56. **Nei, M. (1972).** Genetic distance between populations. *American Nature*. 106: 283-292.
57. **Nei, M. (1978).** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
58. **Nielsen, J.L., Gan, C.A., Wright, J.M., Morris, D.B. and Thomas, W.K. (1994).** Biogeographic distributions of mitochondrial and nuclear markers for southern steelhead. *Molecular Marine Biological Biotechnology*. 3: 281-293.
59. **Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Loechcke, V., (1997).** Analysis of microsatellite DANN from old scale samples of Atlantic salmon: a comparison of genetic composition over sixty years. *Molecular Ecology*. 6: 487-492.
60. **Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Loechcke, V., (1999).** Analysis of DANN from old scale samples: technical aspects, applications and perspectives for conservation. *Heredity* 130: 265-276.
61. **Nomaguchi, T.A., Nishijima, C., Minowa, S., Hasimoto. M., Haraguchi, C., Amemiya, S. and Fujisawa, H., (1997).** Embryonic thermosensitivity of the Ascidian *Ciona savignyi*. *Zoological Science*.14:511-516.
62. **Olsen, J.B., Seeb, L.W., Bentzen, P., Seeb, J.E. (1998).** Genetic interpretation of broad-scale microsatellite polymorphism in odd-year pink salmon. *Transaction of the American Fisheries Society*. 127: 535-550.
63. **Olson, R.R., (1983).** Ascidian – Prochloron symbiosis : the role of larval photoadaptations in midday larval release and settlement. *Biological Bulletin* 165:221-240.
64. **Παπαντριανταφύλλου, Σ., Μαμούρης, Ζ., Καρακούσης, Ι., Αποστολίδης, Α., Τριανταφυλλίδης, Κ., (1996).** Προκαταρκτική μελέτη του πολυμορφισμού του mtDNA Ελληνικών πληθυσμών κουτσομούρας (*Mullus barbatus*) 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΕ 17-19 Απριλίου 1996, Καλαμάτα.

65. **Pallipuram Jayasankar. (2004).** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) Fingerprinting resolves species ambiguity of domesticated clown fish (genus: Amphiprion, family: Pomacentridae) from India. *Aquaculture Research*. 35:1006-1009.
66. **Papadopoulou, C. and Kaniyas, G.D., (1977).** Tunicate species as marine pollution indicators. *Marine Pollution Bulletin*. 8:229-231.
67. **Park, L., Moran, P., (1994).** Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Review Fish Biological Fisheries* 4: 272-299.
68. **Philp, R.B, Leung, F.Y. and Bradley, C., (2003).** A comparison of the metal content of some benthic species from coastal waters of the Florida panhandle using high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis. *Archieve Environmental Contamination Toxicology*. 44:218-223.
69. **Rees, H.L., Waldock, R., Mathiessen, P. and Pendle, M.A., (2001).** Improvements in the epifauna of the Crouch Estuary (United Kingdom) following a decline in TBT concentrations. *Marine Pollution Bulletin*. 42:137-144.
70. **Reymond M, Rousset F. (1995).** GENEPOP (version 1.2) Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248-249.
71. **Ruzainah A., M. N., Siti Azizah, I Patimah and A. Amirrudin. (2003).** RAPD fingerprinting of the eel-loaches *Pangio filinaria* and *Pangio piperata*: preliminary evaluation. *Aquaculture Research*. 34:959-965.
72. **Ryman, N., Lagercrantz, L., Anderson, R., Chakraborty R., Rosenberg R., (1994).** Lack of correspondence between genetic and morphological variability patterns in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.) *Heredity* 53: 687-704.
73. **Σωφρονίδης, Κ., (1993).** Πολυμορφισμός mtDNA τσιπούρας (*Sparus aurata*) και οι φυλογενετικές σχέσεις της με άλλα είδη της οικογένειας *Sparidae*. Μεταπτυχιακή διατριβή, Ηράκλειο.

74. **Shaklee, J.B., Phelps, S.R. and Salini, J. (1990).** Analysis of fish stock structure and mixed-stock fisheries by electrophoretic characterization of allelic isozymes. In Whitmore, D.H., ed. *Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 173-196.
75. **Shaw, P.W., Pierce, G.J., Boyle, P.R., (1999).** Subtle population structuring within a highly variable marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*. 8: 407-417.
76. **Sims, L.L., (1984).** Osmoregulatory capabilities of three macrosympatric stolidobranch ascidians, *Styela clava* Herdman, *S. plicata* (Lesuer) and *S. montereyensis* (Dall). *Journal of Experimental Marine Biological Ecology* 82:117-129.
77. **Slatkin, M. (1985).** Gene flow in natural populations. *A. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393-430.
78. **Slatkin, M., Barton, N.H. (1989).** A comparison of three distinct indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349-1368.
79. **Spanakis, E., Tsimenides, N., Zouros, E., (1989).** Genetic differences between populations of sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Aegean and Ionian Seas. *Journal of Fish Biology*. 35: 417-437.
80. **Sommerfeldt, A.D., Bishop, J.D., Wood, C.A., (2003).** Chimerism following fusion in a clonal ascidian (Urochordata). *Biological Journal of the Linnean Society* 79:183-192.
81. **Stott W., Ihssen P. E. and White B.N. (1997).** Inheritance of RAPD molecular markers in lake trout *Salvelinus namaycush*. *Molecular Ecology*. 6:609-613.
82. **Thompson, H., (1930).** The Tunicata of the Scottish area: their classification, distribution and ecology. Part I. Sedentary Tunicata, order Ptychobranchia (part) (families Molgulidae and Pyuridae). Fishery Board for Scotland Scientific Investigations No. 3 pp 1-45.

83. **Thompson, H., (1931).** The Tunicata of the Scottish area: their classification, distribution and ecology. Part II. Sedentary Tunicata, order Ptychobranchia (part) (families Molgulidae and Pyuridae). Fishery Board for Scotland Scientific Investigations No. 1 pp 1-46.
84. **Thompson, H., (1932).** The Tunicata of the Scottish area: their classification, distribution and ecology. Part III. Sedentary Tunicata, order Dictyobranchia (part) (families Molgulidae and Pyuridae). Fishery Board for Scotland Scientific Investigations No. 2 pp 1-42.
85. **Thompson, H., (1934).** The Tunicata of the Scottish area: their classification, distribution and ecology. Part IV. Sedentary Tunicata, order Krikobranchia (part) (families Molgulidae and Pyuridae). Fishery Board for Scotland Scientific Investigations No. 1 pp 1-38.
86. **Thorpe, J.P., (1982).** The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. Annual Review Ecological Systematics. 13:139-168.
87. **Toop, T. and Wheatly, M.G., (1993).** Some behavioural and physiological responses of the ascidian *Styela plicata* (Lesuer) during acclimation to low salinity. Marine Behaviour Physiology 24:33-34.
88. **Toth, B., Varkonyie E., Hidas A., Edvinemeleg E. and Varadi L. (2005).** Genetic analysis of offspring from intra- and interspecific crosses of *Carassius auratus* gibelio by chromosome and RAPD analysis. Journal of Fish Biology. 66:784–797.
89. **Utter, F.M. (1991).** Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. Journal of Fish Biology. 39 (Suppl. A) : 1-20.
90. **Vasquez, E. and Young, C.M., (2000).** Effects of low salinity on metamorphosis in estuarine colonial ascidians. Invertebrate. Biology. 119:433-444.
91. **Was, A. and Wenne, R. (2002).** Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. Aquaculture 204: 493-506.
92. **Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1993).** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods of Enzymology. 218:704–740.

93. **Wright, J.M., Bentzen, P. (1994).** Microsatellites: genetic markers for the future. *Review of Fish Biology*. 4: 384-388.
94. **Young, C.M. and Braithwaite, L.F., (1980).** Orientation and current-induced flow in the stalked ascidian *Styela montereyensis*. *Biological Bulletin*. 159:428-440.
95. **Young, C.M. and Chia, F.S., (1984).** Microhabitat – associated variability in survival and growth of subtidal solitary ascidians during the first 21 days after settlement. *Marine Biology*. (Berl). 81:61-68.

6. ABSTRACT

Ascidians constitute a major class of benthic marine organisms within the subphylum Urochordata of the phylum Chordata, and they are important experimental animals for studying the genetic circuitry responsible for the specification of embryonic cells and for understanding basic chordate morphogenesis. Many studies indicate that the ascidia larva has the prototypical body plan basic to all chordates.

The genetics of ascidians is still poorly understood, however, because of difficulties in breeding them in the laboratory and because of their relatively long generation time. These technical limitations have often prevented progress in the study of ascidia biology, especially their developmental genetics.

In the present study, we examined genetic polymorphisms of the ascidian *Microcosmus sabatieri* (Roule, 1885) from 6 local populations in Greece. The number of 198 samples was collected from the sea regions of Astupalia Island, Trikeri, Platanias, Maliakos gulf and S. Nikolaos and the collection started in June 2005 to July 2006. To study genomic polymorphisms within a species, Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers have been useful to survey differences within the entire genome of an organism.

RAPD polymerase chain reaction was accomplished with Taq polymerase and 10 nucleotide long random primers in a 30 ml reaction mixture on a PCR thermocycler (PTC-200, MJ Research). Conditions were optimized in the laboratory of Dept. Agriculture Ichthyology and Aquatic Environment, Univ. of Thessaly.

The amplified DNA fragments were resolved by electrophoresis in 2% agarose (Invitrogen) gels stained with ethidium bromide (Scaurlau) and photographed under UV light. Eight primers were found to produce well-amplified and reproducible electrophoretic bands of the applied 31 primers. In total 22 loci were observed.

H_{exp} was higher than the observed which means a heterozygote deficit was observed. That's meaning the sampled populations do not follow Hardy-Weinberg law or are not yet in equilibrium. Total F_{ST} value was low enough and pairwised F_{ST} values were statistically significant for all populations and all loci. Total F_{IS} value was high enough and statistically significant on the P_{99} criterion.

Nevertheless by considering the F_{IS} values along with the low observed gene flow values (0.046) among populations a probable indication of possible local populations was observed, but on the other hand according to Slatkin when populations do not follow Hardy-Weinberg equilibrium the F – statistics might be overestimated.

Furthermore, one could observe a rather complex, but not statistically significant, clustering pattern of southeastern to northwestern populations in the Aegean Sea, by using the stepwise method A Neighbour – Joining tree of Nei's genetic distance has been produced. This kind of analysis showed a better fit between geographical and genetic distance. One could be easily observed the clustering between Eastern and Western Aegean Seas.

Keywords: Ascidiens, *Microcosmus*, RAPD primers, PCR,

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΑΠΛΟΤΥΠΟΙ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΤΩΝ ΕΞΙ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

ΑΣΤΥΠΑΛΛΙΑ 1

1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010
1111111110101111111010

A. ΝΙΚΟΛΑΟΣ

0011111111100111111111
 0011111111100111111111
 0011111111100111111111
 0011111111100111111111
 0011111111100111111111
 1010010010110100100101
 1010010010110100100101
 1010010010110100100101
 1010010010110100100101
 1010010010110100100101
 1111111110111111111101
 1111111110111111111101
 1111111110111111111101
 1111111110111111111101
 1111111110111111111101
 1111111110111111111101
 1111110111111111101111
 1111110111111111101111
 1111110111111111101111
 1111110111111111101111
 1111110111111111101111

ΠΑΤΑΝΙΑΣ

1001111101010011111010
 1001111101010011111010
 1001111101010011111010
 1001111101010011111010
 1001111101010011111010
 1001111101010011111010
 1001001001010010010010
 1001001001010010010010
 1001001001010010010010
 1001001001010010010010
 1001001001010010010010
 1001001001010010010010
 1001001001010010010010
 1111110101011111101010
 1111110101011111101010
 1111110101011111101010
 1111110101011111101010
 1111110101011111101010
 1111110101011111101010
 1111111111111111111111
 1111111111111111111111
 1111111111111111111111

TPIKEPI

1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001011001010010110010
1001011001010010110010
1001011001010010110010
1001011001010010110010
1001011001010010110010
1001011001010010110010
1001011001010010110010
1001110111110011101111
1001110111110011101111
1001110111110011101111
1001110111110011101111
1001110111110011101111
1001110111110011101111
1001110111110011101111

ΑΣΤΥΠΛΑΛΙΑ 2

1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1101110011111011100111
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111110011111111100
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010
1111111101011111111010

ΜΑΛΙΑΚΟΣ

0011111111100111111111
0011111111100111111111
0011111111100111111111
0011111111100111111111
0011111111100111111111
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001110101010011101010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1001111001010011110010
1010010010110100100101
1010010010110100100101
1010010010110100100101
1010010010110100100101
1111110111111111101111
1111110111111111101111
1111110111111111101111
1111110111111111101111
1111110111111111101111

Αποδοχή ανακοίνωσης εργασίας στο διεθνές συνέδριο CIESM.

38th Congress

Istanbul, Turkey, 9-13 April 2007

Stock assessment and genetic diversity of the edible ascidian
Microcosmus sabatieri Roule, 1885 in the south Aegean Sea.

¹Vafidis D., ²Antoniadou C., ¹Kapetanios N., ¹Gkafas G., ¹Exadactylos, A.

¹ Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Nea Ionia, Magnesia's, Hellas. e-mail: dvafidis@apae.uth.gr

² Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University, Thessaloniki, Hellas. e-mail: chintigl@bio.auth.gr

ABSTRACT

The spatial variation in population density of the edible ascidian *Microcosmus sabatieri* Roule, 1885 was studied in the Dodecanese complex (south Aegean). Sampling included the random collection of specimens during a 50 min dive with SCUBA apparatus. Mean population density was 156 ± 53 individuals/20-min. Additionally we examined its genetic polymorphism by using RAPD markers. Data imply high genetic diversity between populations with a rather complex clustering of a southeastern to northwestern pattern in the Aegean Sea. Thus, its fishery should be treated as a complicated stock locally, with different and distinct populations contributing to its value, which respond independently to exploitation.

Keywords: Population density, Stock assessment, Genetic diversity, Ascidia, Aegean Sea.

INTRODUCTION

Ascidians are among the most important members of the benthic assemblages in the Mediterranean Sea. *Microcosmus sabatieri* Roule, 1885 is an endemic species known from Adriatic and Western Mediterranean basin. It is an edible and of commercial interest species in many Mediterranean areas. However, few data exist on its population structure and even fewer in the South Aegean [1]. This study present preliminary data on spatial variation in population density in South Aegean, where it has been traditionally harvested. We also determined its genetic structure by using RAPD fingerprinting [2]. The results were used to investigate the differentiation between six Aegean populations and provide information to assist management and conservation on this ecologically important marine species. No studies on genetic structure of the species in question are available in the bibliography.

MATERIALS AND METHODS

In the south Aegean, overall sampling of 1,513 specimens was carried out with SCUBA diving at nine coastal stations (Figure 1), at depths between 20 and 60 m in September 2005. Specimens of *M. sabatieri* were randomly collected during a 50 min dive and counted in the field with a tapeline to the nearest mm (total length of the tunic and maximum diameter of the tunic). Population density was estimated as the number of individuals collected per 20 min dive (N/20-min). The null hypothesis of no significant differences in the mean length (or diameter) of *M. sabatieri* specimens among stations was tested with one-way ANOVA, after an initial logarithmic transformation of the data to meet the assumption of the analysis [3].

Seventy eight (78) samples from Astypalea Island along with 28 from Trikeri (Central Aegean), 61 from Platania (Central Aegean), 20 from A. Nikolaos (Central Aegean) and 27 from Maliakos Gulf (Central Aegean) were used for the genetic screening. Eight RAPD primer markers were found to produce well-amplified and reproducible electrophoretic bands. In total 22 loci were observed and scored. The mean observed heterozygosity H_o and mean expected heterozygosity H_e under random mating per locus and per group were calculated to assess intra-population variation. Departures of genotype frequencies from Hardy-Weinberg expectations were tested using exact tests [4]. Heterozygote deficiencies per locus in each group were estimated for all polymorphic loci using the inbreeding index F_{IS} . For each locus, the statistical significance of inter-population variation in allele frequencies was calculated by contingency χ^2 analysis. Genetic differentiation between populations was assessed using unbiased F_{ST} values. Gene flow (N_m) between population pairs was calculated using [5] formula. A Neighbour - Joining tree of [6] estimated genetic distances was produced.

RESULTS AND DISCUSSION

Mean population density, over all sites, was 156 ± 53 individuals/20-min. Increased stocks were found at three stations (St1, St3, St8), while at St4 and St7 few specimens were caught (Figure 1). One-way ANOVA showed significant spatial differences on mean tunic length ($F=9.82$ $p<0.05$) and diameter ($F=10.99$ $p<0.05$) of *M. sabatieri*. Both biometric characters varied in a similar way, showing maximum values at St4 and St6 and minimum at St2. Large sized specimens were also caught from St1, St3 and St5, while the specimens from St7, St8 and St9 were smaller, in both dimensions. Total $H_e=0.499$ was higher, but not statistically significant, than $H_o=0.311$, implying a heterozygote deficit on the sampled populations. Total $F_{IS}=0.492$ was high enough and statistically significant on the P_{99} criterion, indicating a possible presence of local sub-populations. Studied populations either do not follow Hardy-Weinberg law, or are not yet in genetic equilibrium, so there is evidence to reject random mating within them. Total $F_{ST}=0.286$ was high enough and pairwise F_{ST} values were statistically significant for all populations at all loci on the P_{99} criterion. Data imply high genetic diversity among populations, since a quite low $N_m=0.046$ migrants per generation, was observed. Furthermore, one could observe a rather complex, but not statistically significant, clustering pattern of southeastern to northwestern populations in the Aegean Sea, by using the stepwise method (Figure 2).

REFERENCES.

1. Antoniadou C., Chintiroglou C.C., Voultsiadou E., and Vafidis D. (2004). First assessment of the natural stock of *Microcosmus sabatieri* in the south Aegean Sea (Greece). Rapp. Comm. Int. Mer Medit., 37, 477.
2. Exadactylos A., Geffen A. J., Panagiotaki P., and Thorpe J. P. (2003). Population structure of Dover sole, *Solea solea* (L.), in the northeast Atlantic; comparisons of RAPD and allozyme data indicate divergence of British and continental European stocks. Marine Ecology-Progress Series 246, 253-264.
3. Zar J.H.,(1984). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
4. Lessios H. A., (1992). Testing electrophoretic data for agreement with Hardy-Weinberg expectations. Mar. Biol. 112: 517-523.
5. Slatkin M., (1985). Gene flow in natural populations. A. Rev. Ecol. Syst. 16: 393-430.
6. Nei M., (1972). Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292.

CAPTIONS

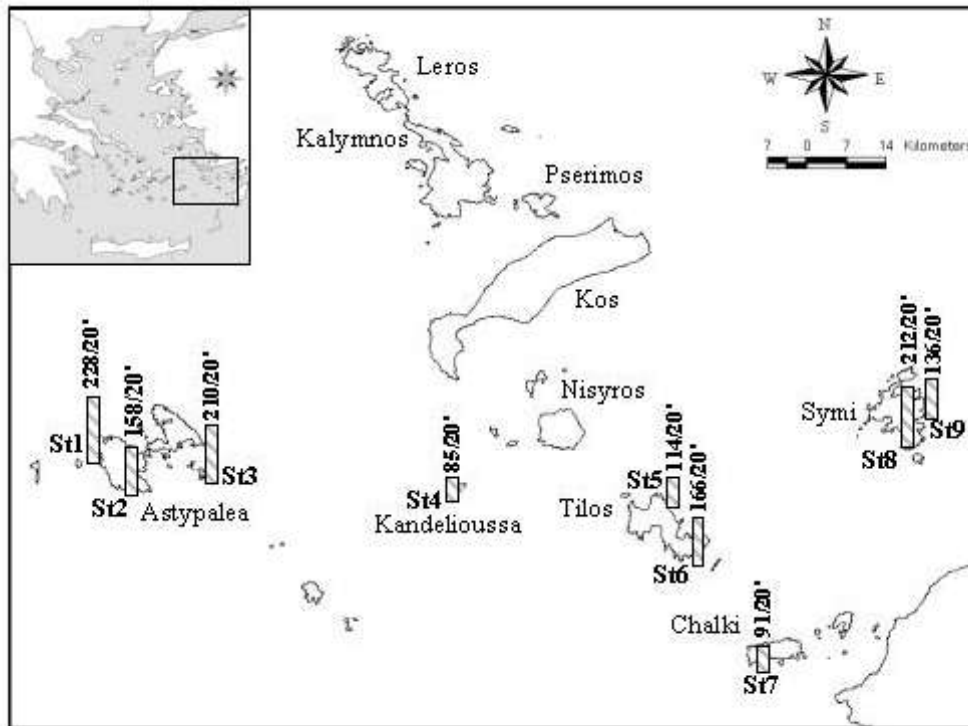


Figure 1. Spatial oscillations of *M. sabatieri* population density at the nine sampling sites dispersed at the Dodecanese complex.

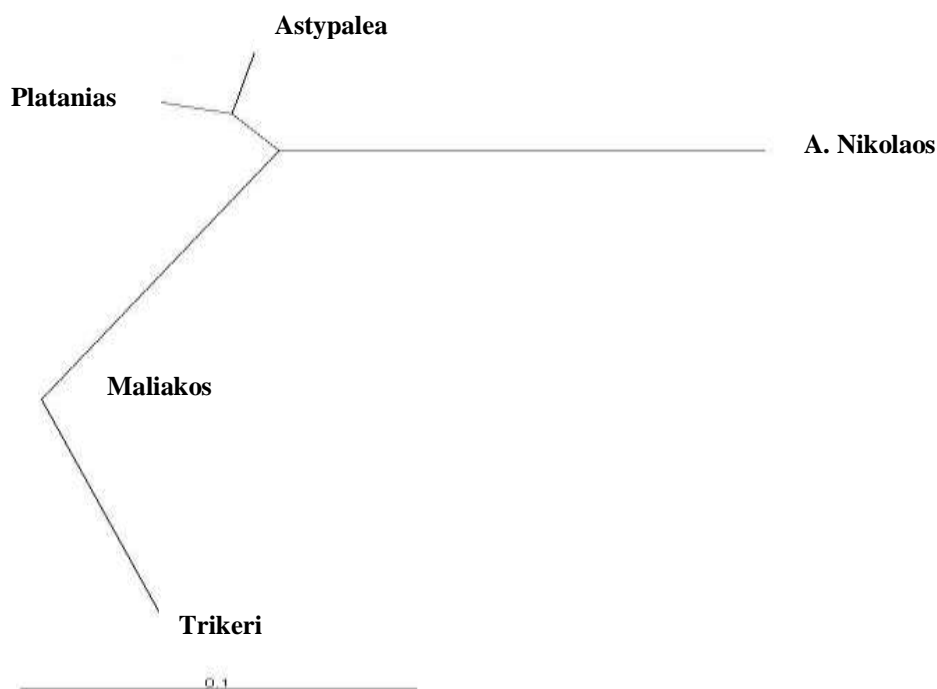


Figure 2. Neighbour Joining cluster analysis using Nei's (1972) genetic distance between the studied populations of *M. sabatieri*.