

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕ ΘΕΜΑ

**‘Γενετική μελέτη ιχθυαποθεμάτων του μπαρμπουνιού με τη μέθοδο RAPD
(Random Amplified Polymorphic DNA)’**

ΝΙΚΗΤΑΣ Δ. ΚΡΙΚΑΣ

Επιβλέπων Καθηγητής

Α. Ι. ΘΕΟΔΩΡΟΥ Καθηγητής

Μέλη Επιτροπής:

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ Επ. Καθηγητής

Π. ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗ Λέκτορας

ΒΟΛΟΣ

1999



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

Αριθ. Εισ.: 37/1

Ημερ. Εισ.: 07-08-2003

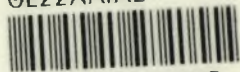
Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ – ΓΦΖΠ

1999

ΚΡΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070095

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία, κατέχει την θέση της διπλωματικής διατριβής μου. Πραγματοποιήθηκε κατά τα ακαδημαϊκά έτη 1996-1999. Το πειραματικό μέρος, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Γενικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Προλογίζοντας την εργασία αυτή, θεωρώ απαραίτητο να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους:

Καθηγητή κ. Α. Θεοδώρου, ο οποίος συμμετείχε στην ανάθεση του θέματος και υποστήριξε όλα τα στάδια της παρούσας διατριβής.

Επίκουρο Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη, ο οποίος συνέβαλλε τα μέγιστα, τόσο στην ανάθεση της εργασίας αυτής, όσο και στην δημιουργία του πειραματικού σχεδίου, την εκτέλεση του πειράματος και την ανάλυση και παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Λέκτορα κ. Π. Παναγιωτάκη, η οποία συμπαραστάθηκε περιβάλλοντας με ενδιαφέρον την όλη προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΕΣ
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ιχθυοαπόθεμα	1
1.2 Ιχθυοκαλλιέργεια και γενετική μόλυνση	2
1.3 Εκτιμήσεις των μοριακών γενετικών τεχνικών στα ψάρια	4
1.3.1 Εισαγωγή και ιστορική αναδρομή	4
1.3.2 Προσδιορισμός των ιχθυοαποθεμάτων με μοριακές τεχνικές	5
1.4 Εφαρμογές των μοριακών τεχνικών στις υδατοκαλλιέργειες	8
1.4.1 Έλεγχος των επιπέδων της γενετικής ποικιλότητας	8
1.4.2 Έλεγχος των εισαγόμενων ή μεταφερόμενων πληθυσμών	9
1.4.3 Άλλες εφαρμογές στις υδατοκαλλιέργειες	9
1.4.4 Εφαρμογές στην αναγνώριση και διάκριση των ειδών	10
1.5 Ανάλυση και χρησιμότητα της τεχνικής PCR	11
1.5.1 Εισαγωγικά	11
1.5.2 Αρχή της μεθόδου	11
1.5.3 Χαρακτηριστικά της μεθόδου	16
1.5.4 Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR	18
1.6 Ανάλυση και χρησιμότητα της τεχνικής RAPD	19
1.6.1 Εισαγωγικά	19
1.6.2 Αρχές της μεθόδου RAPD	20
1.7 Εφαρμογές της μεθόδου RAPD	21
1.7.1 Προσδιορισμός των ταξινομικών ταυτοτήτων	21
1.7.2 Ανάλυση της ενδοειδικής ροής γονιδίων και του υβριδισμού	22
1.7.3 Ανίχνευση της πατρότητας και των σχέσεων συγγένειας	22
1.7.4 Ανάλυση δειγμάτων μικρού γονιδιώματος	23
1.7.5 Παραγωγή νέων ειδικών ανιχνευτών	23
1.7.6 Δυσκολίες και περιορισμοί στην τεχνική RAPD	23
1.7.7 Δυνατές μελλοντικές εφαρμογές	25
1.8 Μπαρμπούνι (<i>Mullus surmuletus</i> L. 1758)	26
1.9 Σκοπός της εργασίας	27
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1 Δείγματα	28
2.2 Απομόνωση DNA	28
2.3 Εκκινητικά μόρια	30
2.4 Συνθήκες ενίσχυσης των δεικτών RAPD	31
2.5 Παρασκευές πηκτών αгарόζης και πολυακρυλαμίδης	31
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΧΘΥΟΑΠΟΘΕΜΑ

Ο καθορισμός της έννοιας του ιχθυοαποθέματος, αποτελεί ένα σημείο προστριβής μεταξύ διαφόρων ερευνητών. Παρουσιάζονται διάφοροι ορισμοί αναλόγως της σκοπιάς καθορισμού του ιχθυοαποθέματος.

Ως βιολογική παράμετρος, το ιχθυοαπόθεμα καθορίζεται σαν η φυσικά αναπαραγόμενη ομάδα ιχθύων ενός είδους που είναι αναπαραγωγικά απομονωμένη, σε κάποιο βαθμό, από άλλες ομάδες του ίδιου είδους.

Το ιχθυοαπόθεμα ως αλιευτική παράμετρος ορίζεται σαν η ομάδα ιχθύων που αποτελείται από έναν ή περισσότερους πληθυσμούς καθορισμένης σύνθεσης, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται και αυξάνονται κάθε χρόνο κατά ένα ορισμένο ποσοστό. Η ένταση της αλιευτικής εκμετάλλευσης πρέπει να διατηρείται σε ορισμένο επίπεδο. Για να αποφευχθεί το φαινόμενο της «υπερεντατικής» ή «καταχρηστικής αλιείας», απαιτείται η σύλληψη αλιευμάτων να αποτελεί μέρος της ετήσιας αύξησης του πληθυσμού, χωρίς να θίγει το «μητρικό» ιχθυοπληθυσμό που παίρνει μέρος στην αναπαραγωγή και συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό του.

Το σχέδιο μιας υποστηρικτικής παραγωγής (Gylland, 1983, Lannan *et.al*,1989), έχει επικρατήσει στην διαχείριση αλιείας, για περίοδο 50 περίπου ετών. Η κεντρική ιδέα είναι ότι κάθε απόθεμα έχει ένα συγκομιστικό πλεόνασμα και η αλίευση η οποία δεν υπερβαίνει αυτό το πλεόνασμα συμβιβάζεται με την φυσική διαιώνιση του αποθέματος.

Παλαιότερα επικρατούσε η άποψη ότι ο θαλάσσιος χώρος είναι μια ανεξάντλητη πηγή αλιευμάτων. Από τα τέλη όμως του προηγούμενου αιώνα, η αύξηση της αλιευτικής δραστηριότητας προκάλεσε μια καταφανή εξάντληση των ιχθυοαποθεμάτων. Τα συμπτώματα αυτής της εξάντλησης άρχισαν να γίνονται ορατά και στα σπουδαιότερα αλιευτικά πεδία του κόσμου, όπως αυτό της Βόρειας θάλασσας και του Ειρηνικού ωκεανού.

Έχει γίνει πλέον επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας ενός πλαισίου ορθολογιστικής διαχείρισης του αλιευτικού πλούτου.

Η αντιμετώπιση της δυσμενούς κατάστασης των αλιευτικών πηγών, απαιτεί την λήψη μέτρων «αποσυμφόρησης των αλιευτικών πεδίων», καθώς και την καθιέρωση ενός ανώτερου ορίου εξαλίευσης ψαριών ανά σκάφος και είδος αλιεύματος.

Το σύστημα αυτό εφαρμόζεται ήδη από όλες σχεδόν τις χώρες που ψάρευαν σε θάλασσες του Βορρά και είναι γνωστό με τα ακόλουθα συντομογραφικά στοιχεία: «Ολικό Επιτρεπόμενο Αλίευμα». (“Total Allowable Catch”), για κάθε σκάφος και είδος αλιεύμενου ψαριού. (Ανανιάδης, 1995).

Από την διαχειριστική σκοπιά το ιχθυοαπόθεμα ορίζεται ως η ομάδα ψαριών, η οποία αλιεύεται σε ένα συγκεκριμένο γεωγραφικό χώρο, (αλιευτικό πεδίο), ή με μια συγκεκριμένη αλιευτική μέθοδο.

Για την σωστότερη διαχείριση και προστασία των αλιευτικών πηγών, απαιτείται ο προσδιορισμός των διαφορετικών ιχθυοαποθεμάτων, κυρίως στα μεγάλης εμπορικής σημασίας είδη ιχθύων, καθώς και η γνώση της γενετικής δομής τους.

Στην περίπτωση που τα είδη αυτά έχουν εκτεταμένη γεωγραφική εξάπλωση, είναι πιθανόν τα ιχθυοαποθέματα να αποτελούνται από διαφορετικούς πληθυσμούς με διαφορετικά πεδία αναπαραγωγής. Το γεγονός αυτό, μπορεί να οδηγήσει στην γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών, με αποτέλεσμα την δημιουργία γενετικά διακριτών ιχθυοαποθεμάτων. Για την σωστή διαχείριση των ιχθυοπληθυσμών, απαιτείται η διερεύνηση τέτοιων διαφοροποιημένων ιχθυοαποθεμάτων, κυρίως όμως η μελέτη της χρονικής διάρκειας αυτής της διαφοροποίησης, η οποία όταν είναι εκτεταμένη, ωθεί στην συσσώρευση γενετικών αλλαγών μεταξύ των πληθυσμών.

(Altukhov 1981, Smith et. al., 1989, Carvalho & Hauser, 1994).

1.2 ΙΧΘΥΟΚΑΜΜΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ

Η γοητεία που ασκεί η εκτροφή ιχθύων στον άνθρωπο, δεν είναι σύγχρονο φαινόμενο. Οι Ρωμαίοι ασχολήθηκαν με την εκτροφή Κυπρίνου (*Cyprinus caprio*, Cyprinidae), ο οποίος συλλέγετο από τον ποταμό Δούναβη και παράδοση συνεχίστηκε σε μοναστήρια κατά την διάρκεια του Μεσαίωνα. (Balon, 1974.). Η πρώτη εντατική εκτροφή έγινε το 2000 π.Χ. στην Κίνα. Σε

μνημεία της αρχαίας Αιγύπτου απεικονίζονται πρόδρομοι τύπου δεξαμενές εκτροφής ιχθύων, ενώ σχετικές αναφορές υπάρχουν και στην Βίβλο.

Στις περισσότερες χώρες σήμερα, η εκτροφή ιχθύων με την μορφή εμπορικής δραστηριότητας, είναι ένα μέσο για την αύξηση πολύτιμων πηγών πρωτεΐνης για ανθρώπινη κατανάλωση. Η κλίμακα παραγωγής σκιαγραφείται από την ένταση παραγωγής εκτρεφόμενου σολομού (*Salmo salar*, Salmonidae) στην Νορβηγία. Το έτος 1988 η παραγωγή σολομού σε πλωτούς θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς ήταν ίση με 100 φορές την εσοδεία της παράκτιας και ποτάμιας αλιείας . (Gausen & Moen, 1991.).

Η ταχεία εξάπλωση της εμπορικής ιχθυοκαλλιέργειας έχει δημιουργήσει πολλές υποθέσεις όπως διάφορα προβλήματα ασθενειών, «γενετική μόλυνση» μέσω της απελευθέρωσης ή της διαφυγής εξωτικών και εισαγόμενων ειδών ιχθύων. (Hindar et al., 1991, Mork, 1991, Robinette et al., 1991, Saunders, 1991, Taylor, 1991.).

Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι σολομοί, οι οποίοι εκτρέφονταν και έχουν διαφύγει, αποτελούν μια ουσιώδη αναλογία των ενήλικων ώριμων αναπαραγωγικά ιχθύων που βρίσκονται στα πεδία ωτοκίας καθώς και των εμπορικών αλιευμάτων στην Ευρώπη. (Gaysen & Moen, 1991, Gudjonsson, 1991, Lund et al., 1991, Luna & Saegrov, 1991, Webb & Youngson, 1992, Webb et al., 1993 a,b.).

Για να αποφευχθεί η πιθανότητα γενετικής μόλυνσης απαιτείται η διασφάλιση της μη διαφυγής στο περιβάλλον εξωτικών γενοτύπων, η οποία είναι πιθανόν να επιφέρει στους γηγενείς πληθυσμούς αποτελέσματα αρνητικά και μη αντιστρεπτά.

Η εισαγωγή πληθυσμών που πιθανώς φέρουν «εξωτικούς» γενότυπους, πρέπει να είναι σύμφωνη με την υπαρκτή ισχύουσα νομοθεσία η οποία καθορίζει και την τύχη αυτών των πληθυσμών στο νέο ελεγχόμενο περιβάλλον εκτροφής και απαγορεύει την διασπορά τέτοιων πληθυσμών εκτός των ορίων της εκτροφής.

1.3. ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ

1.3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Οι πρώτες μοριακές γενετικές προσεγγίσεις άρχιζαν να εφαρμόζονται στα ψάρια το 1950. Οι αρχικές μελέτες, που αφορούσαν σε διάφορες παραλλαγές των ομάδων αίματος και εφαρμόστηκαν, κυρίως, σε τόνους, σε σαλμονίδες και σε μουρούνες (αναφορά από De Ligny, 1969), απέδειξαν επιτυχώς, την ύπαρξη γενετικά ελεγχόμενου πολυμορφισμού, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις δομής των πληθυσμών.

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

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

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αποδείχθηκε γρήγορη, σχετικά φθηνή και σταθερά αναπαραγόμενη. Πολλά είδη φυτών και ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών και των οστρακοειδών με εμπορική αξία, έδειξαν αρκετή μεταβλητότητα, έτσι ώστε, η δομή των πληθυσμών τους να μπορεί να εξεταστεί γρήγορα. Ωστόσο, οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών και ισοενζύμων παρέχουν μια έμμεση εκτίμηση της μεταβλητικότητας του πυρηνικού DNA. Άμεσες εκτιμήσεις της μεταβλητικότητας του DNA επιτεύχθηκαν με την απομόνωση των ενδονουκλεάσεων περιορισμού.

Οι ενδονουκλεάσεις περιορισμού είναι ένζυμα που "κόβουν" το DNA σε ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, παράγοντας τμήματα DNA μεταβλητού μεγέθους, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν πάνω σε πηκτές

ηλεκτροφόρησης, επιτρέποντας έτσι την άμεση μελέτη της μεταβλητότητας των αλληλουχιών DNA.

Οι περισσότερες από τις αρχικές εφαρμογές της τεχνολογίας αυτής, εξέταζαν μιτοχονδριακό DNA (mt DNA) (π.χ. Lansman *et al.*, 1981 Avise, 1987). Η ανάπτυξη της ανάλυσης του mt DNA οφείλεται κατά πολύ στο μικρό μέγεθος και την ευκολία εξαγωγής αυτού του μορίου, αλλά η ανάλυση μέσω των ενζύμων περιορισμού εφαρμόζεται με συνεχώς αυξανόμενους ρυθμούς και στο πυρηνικό DNA (n DNA). Πιο πρόσφατα, η ανάπτυξη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έχει αυξήσει σημαντικά τον αριθμό των διαθέσιμων εργαλείων για τους μοριακούς γενετιστές, επιτρέποντας απειροελάχιστες ποσότητες DNA να ενισχυθούν και να αναλυθούν.

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

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

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

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

1.3.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΟΑΠΟΘΕΜΑΤΩΝ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

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

Η ιδέα της διαρκούς παραγωγής των αλιευτικών πηγών (αειφορία) κυριαρχεί στις θαλάσσιες επιστήμες τα τελευταία 50 χρόνια. Η κεντρική ιδέα είναι ότι, κάθε διαφορετικός πληθυσμός ενός είδους ψαριού έχει ένα πλεόνασμα και εάν η αλίευση αυτού του πλεονάσματος δεν υπερβεί κάποιο όριο, η επιπλέον παραγωγή μπορεί να διατηρηθεί επ' άπειρον. Το κάθε είδος δεν αποτελείται από έναν ομοιογενή πληθυσμό, αλλά από διακριτούς πληθυσμούς (ιχθυαποθέματα), οι οποίοι, πιθανόν, αντιδρούν διαφορετικά στην αλιευτική πίεση (Lannan *et al.* 1989).

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

Η αλιευτική τακτική που ακολουθείται π.χ. αλίευση μεγαλύτερων σε μέγεθος άρα και σε ηλικία ατόμων ή η υπεραλίευση των πληθυσμών μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στη γενετική δομή των πληθυσμών. Γενικά θεωρείται ότι τα μεγαλύτερα σε ηλικία ψάρια έχουν μεγαλύτερο μέσο αριθμό αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο. Η απομάκρυνση αυτών των ατόμων από τους φυσικούς πληθυσμούς οδηγεί στη μείωση του βαθμού του γενετικού πολυμορφισμού τους. Η υπεραλίευση των φυσικών πληθυσμών των ψαριών μπορεί να προκαλέσει μείωση του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού.

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

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

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

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

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

Το μιτοχονδριακό DNA είναι ένα σχετικά μικρό σε μέγεθος μόριο, το οποίο μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Παρουσιάζει ταχύτερο ρυθμό αλλαγών, σε σχέση με το πυρηνικό DNA, στην αλληλουχία των βάσεων του. Έτσι, μπορούν να εντοπισθούν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ακόμη και σε περιπτώσεις όπου οι πληθυσμοί είναι ίδιοι στο επίπεδο του πυρηνικού DNA.

Αυτό δίνει τη δυνατότητα να βρεθούν ειδικοί δείκτες οι οποίοι και θα ταυτοποιούν τα διαφορετικά ιχθυαποθέματα (Gyllensten & Wilson 1987, Park & Moran ,1994).

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

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

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

1.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

1.4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

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

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

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

1.4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΩΝ Η ΜΕΤΑΦΕΡΟΜΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

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

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

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

1.4.3. ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Από τη στιγμή που οι υδατοκαλλιέργειες έγιναν μια πολύ σημαντική πηγή ζωικής πρωτεΐνης, έχουν αυξηθεί και οι προσπάθειες για την ανάπτυξη βελτιωμένων στελεχών. Οι δείκτες πυρηνικού DNA, που παράγονται από τα ισοένζυμα ή από τις τεχνικές ανάλυσης του mtDNA, του μικροδορυφορικού DNA και των δεικτών RAPD, έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμοι στη χαρτογράφηση και τις αναλύσεις σύνδεσης, στις διακρίσεις μεταξύ στελεχών

και στον προσδιορισμό σχέσεων μεταξύ γενετικής μεταβλητότητας και προσαρμοστικότητας. (Mitton και Grant, 1984, Bardakci & Skibinski, 1994).

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

1.4.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ

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

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

Πολλές φορές είναι δύσκολο να καταψυχθούν και να διατηρηθούν κατεψυγμένα δείγματα, προκειμένου αυτά να αναλυθούν και να μελετηθούν περαιτέρω.

Εντούτοις, η μέθοδος PCR επιτρέπει την ενίσχυση και την ανάλυση DNA, το οποίο προέρχεται από ιστούς διατηρημένους σε αλκοόλη. Επίσης μπορεί να γίνει σαφής αναγνώριση αυγών και ιχθυδίων, που είναι συντηρημένα σε αλκοόλη, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει πολύ τις μελλοντικές έρευνες για την ταξινόμηση αυγών και ιχθυδίων.

1.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR

1.5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

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

1.5.2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

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

προσδεδεμένων οδηγών (extension), αποτελεί ένα κύκλο της αντίδρασης PCR.

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

Ο πρώτος κύκλος της PCR αποδίδει 4 κλώνους DNA στόχου (δύο του αρχικού υποστρώματος και δύο αντίγραφα), που αποτελούν πρότυπα καλούπια για την σύνθεση νέων κλώνων DNA στόχου στο 2ο κύκλο. Συνεπώς, στο τέλος του 2ου κύκλου οι κλώνοι του DNA στόχου θα είναι 8 και σε κάθε νέο κύκλο θα αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2^n , όπου n, ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης (Σχήμα 1).

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

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

Αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA στόχου για επανιδιάταξη των οδύτων

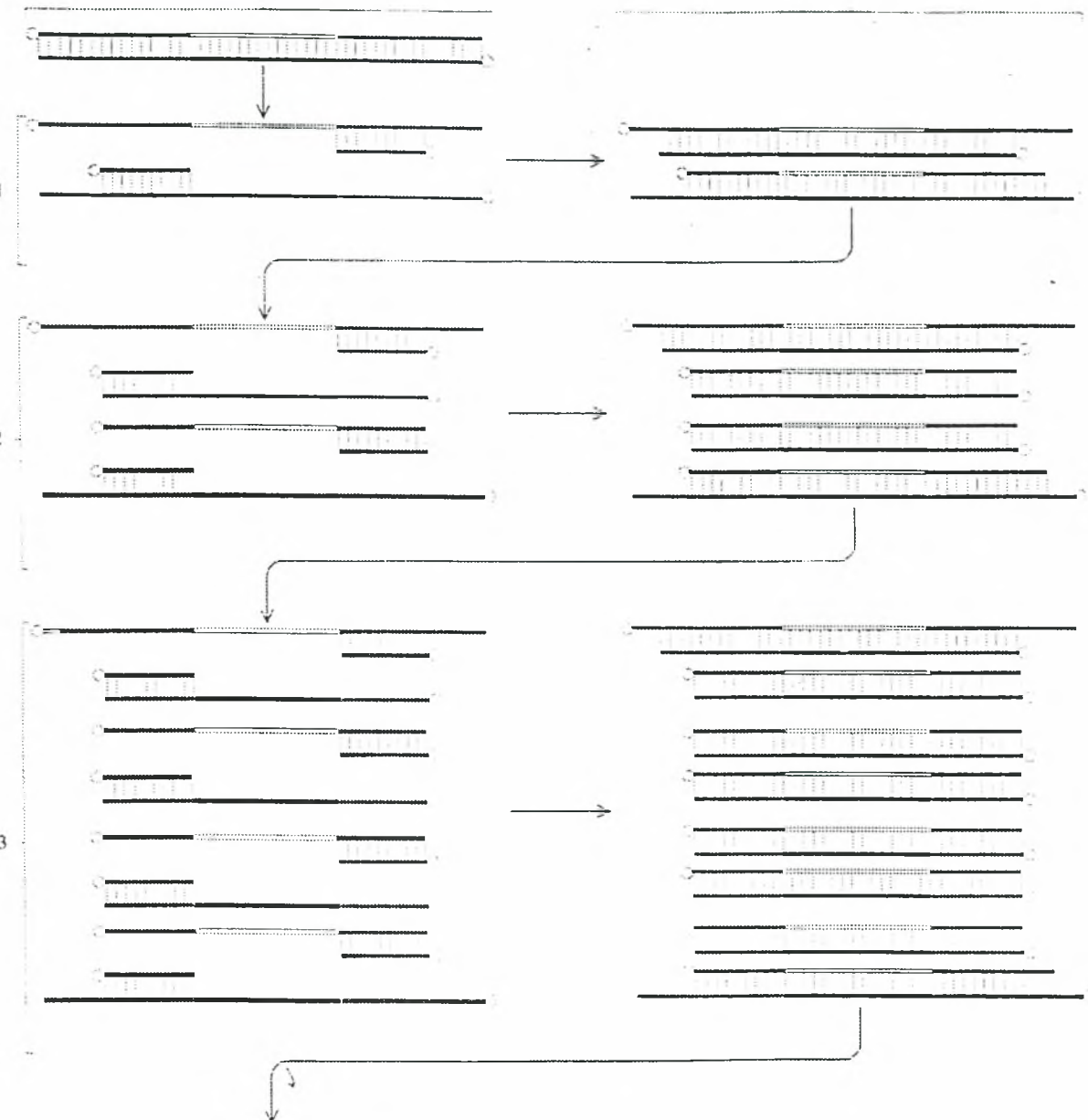
Επιμετρηση των οδύτων και δημιουργία αντιγράφων DNA στόχου

Κύκλος 1

Κύκλος 2

Κύκλος 3

Διαρκής επανακύκλωση επιτρέπει εκθετική συσσώρευση του προϊόντος της ΑΑΠ (DNA στόχου)



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

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

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

Η PCR ολοκληρώνεται συνήθως σε 25-40 κύκλους οπότε το τμήμα του DNA στόχου επεκτείνεται κατά 2^n (όπου n ο αριθμός των κύκλων). Αν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{25} (33.554.432) αντιγράφων, ενώ μετά από 40 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{40} (1.099.511.627.716) μονόκλωνων συμπληρωματικών αντιγράφων DNA στόχου (Πίνακας 1).

Ο άριστος αριθμός κύκλων, εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον άριστο, οδηγεί συνήθως στην αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη ανίχνευση του DNA στόχου. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι όταν ο αριθμός των μορίων του στόχου σε ένα βιολογικό υλικό είναι 10^5 απαιτούνται 30 κύκλοι, όταν είναι 10^4

Πίνακας 1. Επέκταση DNA στόχου με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

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

απαιτούνται 35 κύκλοι ενώ όταν είναι 10^3 ή μικρότερος απαιτούνται 40-45 κύκλοι. Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους οδηγούς. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR, σε ζεύγη βάσεων, ισούται με το άθροισμα των βάσεων του ζεύγους των εκκινητικών μορίων και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου που επεκτείνεται. Είναι δυνατόν, κατά τους πρώτους κύκλους της PCR να σχηματισθούν αλυσίδες DNA μακρύτερες από το τελικό μήκος του DNA στόχου, οι οποίες όμως αποτελούν ελάχιστο ποσοστό του προϊόντος της PCR και συνεπώς δεν είναι ανιχνεύσιμες.

1.5.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

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

Το κύριο χαρακτηριστικά της PCR είναι η τεράστια ευαισθησία της μεθόδου. Χρησιμοποιώντας ραδιενεργό σήμανση του μορίου ανιχνευτή (probe), είναι δυνατή η ανίχνευση έως 1 pg DNA. Η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί στο 1 fg με την τεχνική της επανεντοπισμένης PCR (nested PCR).

Στην τεχνική αυτή 1-2 μl του προϊόντος της PCR, υποβάλλοντας σε δεύτερη PCR με νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων, εσωτερικό (inner primers) των αρχικών (outer primers), με αποτέλεσμα όταν η πρώτη PCR γίνει για 25 κύκλους και το προϊόν της υποβληθεί σε επανεντοπισμένη PCR για 25 ακόμα κύκλους, να παράγονται 1.1×10^{15} αντίγραφα DNA στόχου. Θεωρητικά η επανεντοπισμένη PCR, έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει 1 αντίγραφο προϊόν HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) σε 1×10^6 κύτταρα.

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

Η επιλογή του προς επέκταση στόχου, καθώς και ο σχεδιασμός των κατάλληλων οδηγών και ανιχνευτών έχει μεγάλη σημασία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ανίχνευσης ποικιλιών ιών όπως ο HIV, και γονιδιακών περιοχών έντονων ανακατανομών και μεταλλαξιμότητας, όπως διαφόρων εύθραυστων αυτοσωματικών περιοχών, των ψευδοαυτοσωματικών περιοχών του Υ χρωμοσώματος κλπ. Επί θετικών δειγμάτων, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα από 4 διαφορετικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, όπως συνηθίζεται

για την επέκταση διαφορετικών γονιδιακών περιοχών, τότε η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι δυνατόν να υπερβεί το 97%.

1.5.4. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR

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

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

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

Η PCR εντάσσεται μαζί με την τεχνολογία του ανασυνδυσασμένου DNA και τη διαγονιδιακή τεχνολογία, στις βιοτεχνολογικές μεθόδους συνθετικής προσέγγισης του φαινομένου της ζωής. Η σύγχρονη συνθετική μεθοδολογία στηρίζεται στην κατανόηση και αξιοποίηση των γνώσεων της αναλυτικής μεθοδολογίας, από την οποία προέρχεται και της οποίας αποτελεί λογική συνέχεια και ολοκλήρωση. Την τεράστια σημασία της PCR υποδηλώνουν το ευρύ φάσμα εφαρμογών (Βιοτεχνολογία, Βιοϊατρική, βιολογικός έλεγχος περιβάλλοντος, κλπ) και οι απεριόριστες δυνατότητες εξελικτικών προσαρμογών της μεθόδου. Η ταχύτατη διεθνοποίηση του όρου PCR σε σχεδόν ισότιμο των όρων DNA και RNA, είναι επίσης ενδεικτική της σημασίας της μεθόδου.

1.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ RAPD

1.6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

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

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

Μια τεχνική, που χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια για τις ανάγκες της πληθυσμιακής γενετικής, βασίζεται στη χρήση των δεικτών RAPD, που παράγονται με τη μέθοδο PCR (Williams *et al.*, 1990, Welsh & McClelland, 1990).

Αυτή η μέθοδος που επιτρέπει την εξέταση της γενωμικής ποικιλότητας έχει εφαρμοσθεί, επιτυχώς, για την ανίχνευση ποικιλότητας σε διάφορους οργανισμούς, όπως βακτήρια, μύκητες, φυτά, αφίδες και μυρμήγκια. Στα ψάρια, η μέθοδος RAPD έχει οδηγήσει στην αναγνώριση ειδών και υποειδών στη τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) (Bardakci & Skibinski, 1994, Sultmann *et al.*, 1995), καθώς και στον έλεγχο του γενετικού πολυμορφισμού στο λαβράκι κατά τον εγκλιματισμό του σε γλυκό νερό (Allegrucci *et al.*, 1995).

Επιπλέον, μια συγκριτική μελέτη των δεικτών RAPD και των πολυγονιδιακών αποτυπωμάτων του DNA σε στελέχη της τιλάπιας, αποκάλυψαν όμοιες γενετικές σχέσεις, αποδεικνύοντας ότι η μέθοδος RAPD,

παρόλες τις τεχνικές δυσκολίες, μπορεί να είναι αρκετά αποτελεσματική και αξιόπιστη (Naish *et al.*, 1995).

1.6.2. ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ RAPD

Η μέθοδος RAPD (τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA), βασιζόμενη στην τεχνική του PCR, αποτελεί ένα ενδιαφέρον συμπλήρωμα στις ήδη υπάρχουσες τεχνικές ανάλυσης του DNA. Η μέθοδος βασίζεται στα εξής:

Ποσότητες γενωμικού DNA, της τάξεως των νανογραμμαρίων, υποβάλλονται στην τεχνική PCR, χρησιμοποιώντας ως εκκινητικά μόρια, μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, τυχαίων αλληλουχιών. Το πρωτόκολλο της ενίσχυσης διαφέρει από τις τυπικές συνθήκες PCR πρώτον, στο ότι χρησιμοποιείται ένα απλό, αυθαίρετο νουκλεοτίδιο ως εκκινητικό μόριο, δεύτερον, στο ότι δεν χρειάζεται καμία προγενέστερη γνώση του γενώματος, που υπόκειται στην ανάλυση και τρίτον, στο ότι οι συνθήκες υβριδισμού (annealing) του DNA στόχου και των εκκινητών είναι πολύ χαμηλότερες από τις κλασσικές (36-38°C).

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

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

Τα προϊόντα ενίσχυσης αναλύονται σε πηκτές αγαρόζης και οι πολυμορφισμοί προσφέρονται σαν κυρίαρχοι γενετικοί δείκτες, οι οποίοι κληρονομούνται βάσει των νόμων του Μέντελ.

1.7 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ RAPD

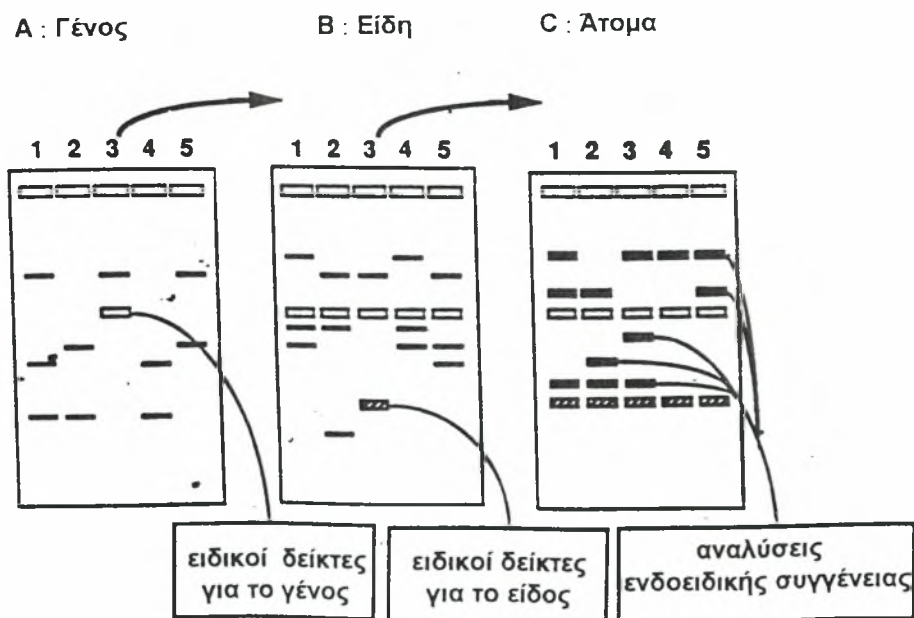
1.7.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΩΝ ΤΑΥΤΟΤΗΤΩΝ

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) RAPD μπορούν βασικά, να χωριστούν σε δυο ομάδες:

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

Για παράδειγμα, ας θεωρήσουμε μια ανάλυση RAPD με αρκετά άτομα μέσα σε ένα είδος και αρκετά είδη μέσα σε ένα δεδομένο γένος. Μπορεί να αναγνωριστούν κάποια σταθερά τμήματα, διαγνωστικά για ένα γένος, καθώς και τμήματα που είναι πολυμορφικά μεταξύ ειδών μέσα στο γένος. Και οι δυο τύποι των προϊόντων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση των σχέσεων σε επίπεδο ταξινόμιας (Σχήμα 2).

Ομοίως, τα πολυμορφικά τμήματα στο επίπεδο του είδους, θα αναγνωρίσουν τα άτομα ενός δεδομένου είδους, εάν το τμήμα είναι σταθερό για όλα τα άτομα αυτού του είδους (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Χρήση των πολυμορφικών και μη-πολυμορφικών τμημάτων RAPD για την ανάλυση του γονιδιώματος

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

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

1.7.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΕΙΔΙΚΗΣ ΡΟΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ

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

1.7.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΤΡΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

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

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

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

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

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

1.7.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΙΚΡΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Η τεχνική RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ποσοτικών εκτιμήσεων των σχετικών αναλογιών των διαφορετικών γονιδιωμάτων σε δείγματα μικτού DNA.

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

1.7.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΝΕΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ

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



1.7.6. ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ RAPD

α) Το μέγεθος του εκκινητικού μορίου

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

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

Όλες οι έρευνες, που χρησιμοποίησαν τις τυπικές συνθήκες RAPD με διαχωρισμό των τμημάτων DNA σε πηκτή αгарόζης, έχουν αποδείξει ότι τα εκκινητικά μόρια, μεγέθους 10 bp είναι τα πιο αποτελεσματικά.

β) Η ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης

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

Η τεχνική είναι ευαίσθητη:

α) στον τύπο του «προφίλ» της θερμοκρασίας

β) στον τύπο της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται και

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

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

γ) Η πιθανότητα της ταυτόχρονης μετατόπισης κάποιων ζωνών DNA

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

δ) Μη αναπαραγώμενα προϊόντα ενίσχυσης

Όπως συμβαίνει και σε άλλους γενετικούς δείκτες, έτσι και στην τεχνική RAPD, μερικά τμήματα είναι ασαφή και δυσδιάκριτα. Αυτά τα μη

αναπαραγώμενα προϊόντα ενίσχυσης δεν χρησιμοποιούνται ως γενετικοί δείκτες. Παρόλα αυτά, όλες οι εργασίες που έχουν χρησιμοποιήσει την τεχνική RAPD έχουν δείξει ότι, όταν η ενίσχυση RAPD εφαρμοστεί για δυο ή περισσότερες φορές, η πλειονότητα των δεικτών αναπαράγονται σωστά και εντοπίζονται πολύ εύκολα.

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

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

1.7.7. ΔΥΝΑΤΕΣ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

α) Προσδιορισμός φύλου.

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

β) Παραγωγή ειδικών εκκινητικών μορίων PCR για ανώνυμα γονιδιώματα.

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

γ) Ποσοτικές αναλύσεις μικτών βιολογικών δειγμάτων.

Σε αναλογία με τις αναλύσεις δειγμάτων μικτής πατρότητας, μπορεί να γίνουν αναλύσεις δειγμάτων πεδίου σε διαφορετικά είδη (π.χ. δείγματα πλαγκτού).

δ) Φυλογένεση.

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

1.8 ΜΠΑΡΜΠΟΥΝΙ (*Mullus surmuletus*. L. 1758).

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ.

Το είδος *Mullus surmuletus*, είναι γνωστό στην Ελλάδα με το εμπειρικό όνομα πετρομπάρμπουνο. Ανήκει στην οικογένεια Mullidae.

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν όλα τα μπαρμπούνια και οι κουτσομούρες (Mulletts, Goatfishes). Η οικογένεια περιλαμβάνει 15 γένη. Εξ' αυτών μόνο δύο απαντούν στην Μεσόγειο και πιο συγκεκριμένα τα *Mullus* και *Upeneus*.

Η εμπορική αξία των ειδών της οικογένειας είναι πολύ σημαντική και αποτελούν αλιευτικούς στόχους. Συγκεκριμένα για το είδος *Mullus surmuletus*, η αξία έγκειται στο γεγονός ότι αποτελεί τροφή εξαιρετικής γευστικότητας με λευκή και συνεκτική σάρκα. Η απόδοση σε βρώσιμο τμήμα, ανέρχεται στο ποσοστό 62,1%.

Το μπαρμπούνι αποτελεί σύνηθες αλίευμα των Ελληνικών θαλασσών. Η περιοχή εξάπλωσης του είδους είναι ευρεία. Συναντάται στον Ατλαντικό Ωκεανό, από τα Κανάρια Νησιά μέχρι και την Νορβηγία. Επίσης εμφανίζεται στην Μεσόγειο, στην Βαλτική και στις ακτές της Β.Δ. Αφρικής.

Το σώμα του μπαρμπουνιού είναι μετρίως συμπιεσμένο. Το μπροστινό τμήμα της κεφαλής εμφανίζεται ελαφρώς οξυμένο. Το πίσω μέρος του άνω χείλους εκτείνεται έως την περιοχή κάτω από τον οφθαλμό.

Το μήκος της κεφαλής, ισούται με το 25% του συνολικού μήκους του σώματος του ψαριού. Στο κάτω μέρος της κεφαλής και πιο συγκεκριμένα πίσω απ'την κάτω γνάθο, εμφανίζονται δύο σαρκώδεις προεξοχές, οι οποίες λόγω μορφής καθιερώθηκε να ονομάζονται «μουστάκια».

Το χρώμα του σώματος είναι κόκκινο-ερυθρωπό. Εμφανίζεται μια επιμήκης καφέ-κόκκινη ταινία κατά μήκος του σώματος στα πλευρά, η οποία εκτείνεται πίσω απ'τον οφθαλμό, έως την ουρά και πλαισιώνεται από τρεις κιτρινόχρωμες γραμμές. Το μήκος του σώματος φτάνει έως και 40 cm.

Τα μπαρμπούνια συγκροτούν κοπάδια μικρού ή μεγάλου μεγέθους, κυρίως κατά την περίοδο αναπαραγωγής.

Είναι ψάρι βενθικό, στα ενήλικα στάδια και οι κυριότεροι βιότοποι είναι πετρώδεις, βραχώδεις ή και αμμώδεις πυθμένες. Εντοπίζεται σε βάθη έως

100 μέτρα. Άτομα μεγάλης ηλικίας ζουν σε βαθύτερα στρώματα και συγκεκριμένα σε βάθη 200 ή και 300 μέτρων.

Τα μπαρμπούνια τρέφονται με βενθικούς οργανισμούς, όπως μαλακόστρακα, αμφίποδα, πολύχαιτους, μαλάκια και μικρά σε μέγεθος ψάρια.

Για τον εντοπισμό της τροφής του χρησιμοποιεί τα «μουστάκια» του, τα οποία αποτελούν αισθητήρια όργανα αφής και γεύσης, με τη βοήθεια των οποίων ψηλαφεί ή και αναμοχλεύει τα υλικά του πυθμένα. Τα μπαρμπούνια ασχολούνται με την αναζήτηση της τροφής για χρονικά διαστήματα πολλών ωρών και διακόπτουν την δραστηριότητα αυτή μόνο σε περίπτωση που αισθανθούν κίνδυνο.

Η περίοδος αναπαραγωγής τους καλύπτει τους μήνες Μάη, Ιούνη και Ιούλιο. Τα αυγά και τα νεαρά ιχθύδια είναι πελαγικά. Στις πρώτες μέρες της ζωής τους τα νεαρά ιχθύδια αποτελούν μέρος του πλαγκτού. Όταν το μέγεθος του σώματός τους ανέλθει στα 5 cm, πραγματοποιείται καθοδική κίνηση προς τον πυθμένα στον οποίο διαβιεί ως ενήλικο.

Η αλίευση του είδους πραγματοποιείται κυρίως με μανομένα δίχτυα καθώς και μηχανότρατες.

1.9. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η εκτίμηση της ενδοειδικής γενετικής ποικιλότητας σε μοριακό επίπεδο, πληθυσμών του μπαρμπουνιού της Μεσογείου θάλασσας. Η προσπάθεια εκτίμησης της ποικιλότητας, έγινε με την χρήση μοριακών γενετικών τεχνικών και πιο συγκεκριμένα με την μέθοδο RAPD.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση, περιείχαν μόνο ενήλικα άτομα μπαρμπουνιού.

Το σύνολο των δειγμάτων (342 άτομα *Mullus surmuletus*), συλλέχθηκαν με κοινές μεθόδους αλιείας (εμπορικές τράτες). Τα δείγματα προέρχονται από 5 διαφορετικές περιοχές των Ελληνικών υδάτων, (εκ των οποίων οι 3 ανήκουν στο Αιγαίο πέλαγος και οι 2 στο Ιόνιο), καθώς και μια από την Γαλλία. (Σχήμα 3)

Τα Ελληνικά δείγματα του Αιγαίου αντιπροσωπεύουν τις περιοχές Τρίκερι, Καβάλα, Ρόδο και του Ιονίου τις περιοχές Πρέβεζα και Κέρκυρα.

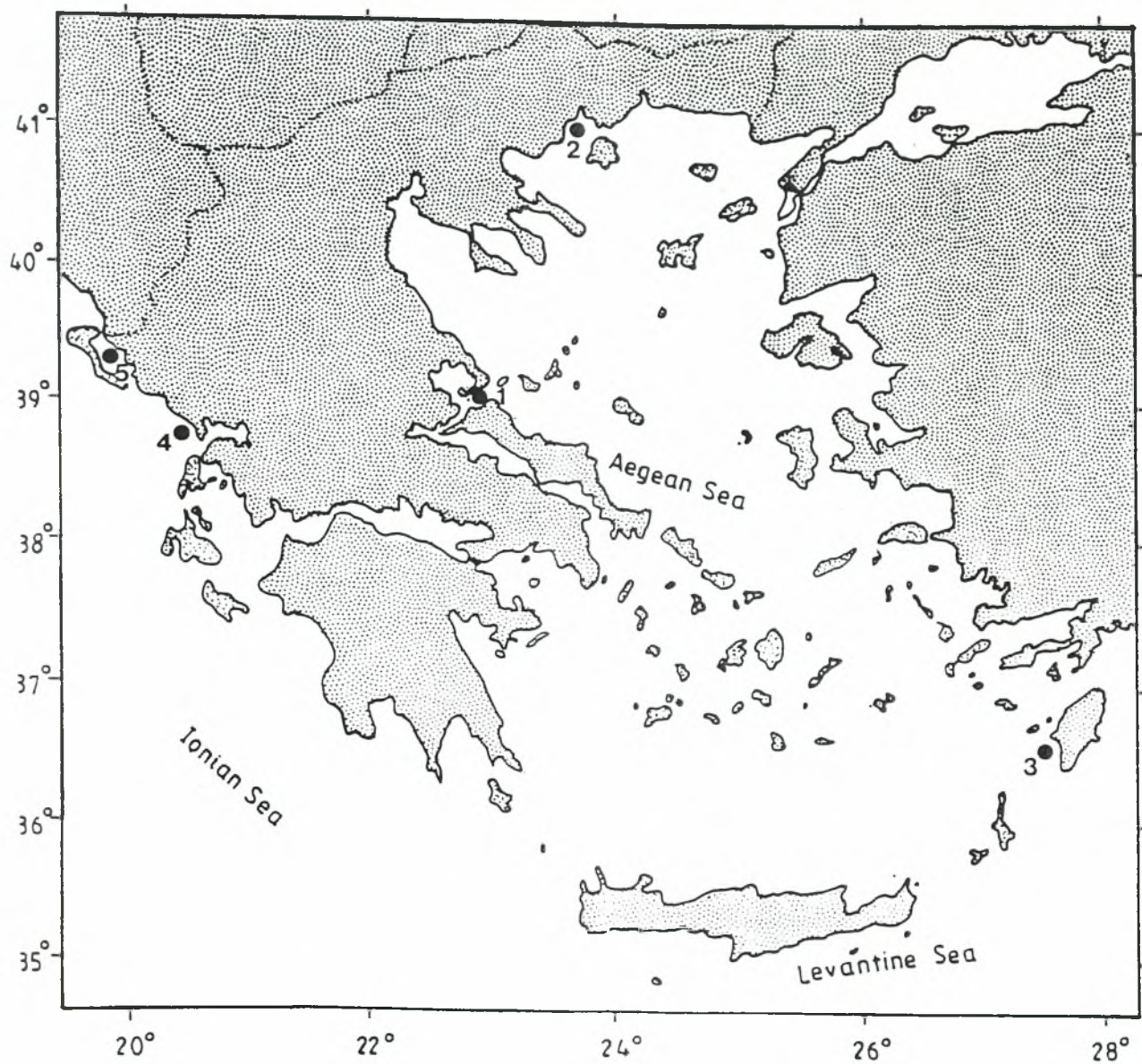
Δείγματα από το Τρίκερι και την Πρέβεζα συλλέχθηκαν σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές του ίδιου έτους και συνεπώς στοιχειοθετούν διακριτούς πληθυσμούς. (Τρίκερι 1, Τρίκερι 2, Πρέβεζα 1, Πρέβεζα 2).

2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η εξαγωγή και απομόνωση του ολικού DNA, πραγματοποιήθηκε με διαδικασίες σύμφωνες με το πρωτόκολλο των Cenis et al., 1993, μετά από μερική διαφοροποίησή του.

Τα άτομα απ' τα οποία εξήχθη το DNA διατηρούνται σε βαθιά κατάψυξη (θερμοκρασία ίση με -40°C). Από κάθε άτομο, απομακρύνεται μετά από μερική απολέπιση μικροποσότητα λευκού μυϊκού ιστού περίπου ίση με 50 mg.

Στην συνέχεια σε μικροσωλήνα Eppendorf, τοποθετείται η ποσότητα του ιστού καθώς και 200 μl διαλύματος απομόνωσης (200 mM Tris-HCl pH=8.5, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS).



Σχήμα 3. Θέσεις δειγματοληψίας των πληθυσμών του μπαρμπουνιού. (Το δείγμα από τη Γαλλία δεν συμπεριλαμβάνεται) 1=Τρίκερι, 2=Καβάλα, 3=Ρόδος, 4=Πρέβεζα, 5=Κέρκυρα.

Το δείγμα του ιστού συνθλίβεται μηχανικά και το μίγμα ομογενοποιείται. Στο μικροσωλήνα, προστίθενται 200 μl διαλύματος οξικού νατρίου 3M, με pH=5.2 και ακολουθεί ψύξη στους -20°C για χρονικό διάστημα ίσο με 10 λεπτά. Μετά την ψύξη, το μίγμα υποβάλλεται σε φυγοκέντριση (13000 rpm, για 15 λεπτά). Στο σωλήνα Eppendorf είναι διακριτές τώρα δύο φάσεις, εκ των οποίων η υπερκείμενη στην οποία βρίσκεται το DNA, απομακρύνεται και μεταφέρεται σε νέο μικροσωλήνα.

Με σκοπό τον πληρέστερο καθαρισμό του DNA, ακολουθεί σειρά εκχυλίσεων με φαινόλη (φαινόλη- χλωροφόρμιο- ισοαμυλική αλκοόλη, με αναλογία όγκων 25V: 24V: 1V) και χλωροφόρμιο (χλωροφόρμιο- ισοαμυλική αλκοόλη, με αναλογία όγκων 24V: 1V). Προκαλείται καθίζηση στο διάλυμα με την προσθήκη αιθανόλης 100% η οποία προηγουμένως έχει ψυχθεί για χρονικό διάστημα 2h σε θερμοκρασία -20°C . Αποτέλεσμα της καθίζησης, είναι η εμφάνιση ιζήματος. Το ίζημα καταβυθίζεται με φυγοκέντριση χρονικής διάρκειας 20 λεπτών στις 13000 rpm.

Στο σωλήνα Eppendorf είναι διακριτές δύο φάσεις, εκ των οποίων η ανώτερη απομακρύνεται και παραμένει το ίζημα. Ακολουθεί πλύση με αιθανόλη 70% και λυοφιλοποίηση. Το DNA επαναιωρείται σε διάλυμα T.E., V=100μl (Buffer T.E.: 100mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8.0).

Το δείγμα του απομονωμένου και καθαρισμένου πια DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα, ή να ψυχθεί ώστε να χρησιμοποιηθεί μεταγενέστερα.

2.3. ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Κατά την διάρκεια της παρούσης εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά σαράντα εκκινητικά μόρια. Η προμήθειά τους, έγινε από την Operon Technologies, Alameda, CA, USA. Οι εκκινητές ομαδοποιούνται σε δύο ομάδες, (A kit, F kit), οι οποίες περιλαμβάνουν 20 τυχαίους εκκινητές έκαστη.

Για να προσδιοριστούν γενετικοί δείκτες με την ικανότητα πλήρους ταυτοποίησης των πληθυσμών, ελέγχθηκαν έξι άτομα από κάθε πληθυσμό με όλα τα εκκινητικά μόρια και τα προϊόντα ενίσχυσης διαχωρίστηκαν σε πηκτές αγαρόζης.

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι γενετικές ομοιότητες ανάμεσα στους πληθυσμούς, εικοσιπέντε άτομα από κάθε δείγμα ελέγχθηκαν με οκτώ εκκινητικά μόρια, (ORA 02, ORA 05, ORA 11, ORA 16, OPF 05, OPF 06, OPF 12, OPF 17), τα οποία επιλέχθηκαν τυχαία και τα προϊόντα ενίσχυσης διαχωρίστηκαν σε πηκτές πολυακρυλαμίδης.

2.4. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ RAPD

Οι συνθήκες ενίσχυσης καθορίστηκαν μετά από δοκιμαστικά πειράματα ως εξής: οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε μίγμα αντίδρασης, όγκου 25μl. Στο μίγμα αυτό, περιέχεται ποσότητα 30ng καθαρού DNA (DNA στόχος), 1 μονάδα Taq πολυμεράσης Minotech, 0.25 mM διαλύματος dNTPs, 20 ng από κάθε εκκινητικό μόριο, 2.5Mm MgCl₂ και 1 X διάλυμα αντίδρασης (500Mm KCl, 100mM Tris, pH=9.0). Για τον έλεγχο της επιμόλυνσης των αντιδράσεων με ξένο DNA, πραγματοποιήθηκαν αρνητικοί έλεγχοι, παραλείποντας το DNA στόχο από το μίγμα αντίδρασης.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν ένα σύνολο 35 κύκλων χρονικής διάρκειας 40 sec έκαστος στους 94⁰C, 1min στους 38⁰C 1 min στους 72⁰C. Η εναλλαγή μεταξύ των διαφορετικών τιμών θερμοκρασίας, πραγματοποιήθηκε με τους γρηγορότερους δυνατούς θερμοκρασιακούς κύκλους.

2.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΠΗΚΤΩΝ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.

ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ. (2% κ.ο.)

Η παρασκευή της πηκτής αγαροζης, πραγματοποιείται με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Αρχικά λαμβάνονται 30 ml διαλύματος T.A.E. 1X και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη. (1lt διαλύματος T.A.E. 50X: 242 gr Tris - 57 ml Acetic acid - 0,05 M EDTA.).

2. Ζυγίζονται 0,6 gr αγαρόζης και τοποθετούνται στο διάλυμα. Στην συνέχεια ακολουθεί θέρμανση του μίγματος, με συνεχή ανακίνησή του.

3. Μετά τον βρασμό, εντός της κωνικής φιάλης, τοποθετούνται 2,5 ml βρωμιούχου αιθιδίου.

4. Ακολουθεί η τοποθέτηση του διαλύματος στην συσκευή μορφοποίησης της πηκτής.

ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ. (6% κ.ο.)

Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκε μητρικό διάλυμα πολυακρυλαμίδης. Η παρασκευή του μητρικού διαλύματος (30% κ.ο.) έγινε ως εξής: 29gr ακρυλαμίδης και 1gr Bis ακρυλαμίδης διαλύονται σε 60 ml dH₂O. Ακολουθεί διήθηση και το διάλυμα συμπληρώνεται έως τελικού όγκου 100 ml. Το μητρικό διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί σε ψύξη σε θερμοκρασία 4°C.

Λαμβάνεται ποσότητα ίση με 10ml μητρικού διαλύματος πολυακρυλαμίδης 30% κ.ο. Ζυγίζονται 4,8 gr ουρίας και τοποθετούνται στο διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθενται 2,5 ml διαλύματος TBE 20X (ή 10ml TBE 5X). Το διάλυμα διηθείται και κατόπιν συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως τελικού όγκου 50 ml.

Για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης προστίθεται 50 ml διαλύματος TEMED και 300 ml διαλύματος APS (Ammonium persulfate) 20%.

Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στην ειδική συσκευή μορφοποίησης της πηκτής και στην άνω θέση εισάγεται η «χτένα» δημιουργίας υποδοχών ενισχυμένου DNA (πηγαδιών).

Το διάλυμα παραμένει στην συσκευή για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 2 h. Κατόπιν αφαιρείται προσεκτικά η «χτένα» και η πηκτική είναι έτοιμη προς χρήση.

Η επιλογή πηκτικής αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψιν, ότι η πηκτική αγαρόζης, είναι περισσότερο εύχρηστη, κυρίως λόγω του μικρότερου χρόνου παρασκευής της, χωρίς όμως να παρέχει την δυνατότητα λεπτομερούς ανάλυσης, σε σχέση με την πηκτική πολυακρυλαμίδης. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της πηκτικής πολυακρυλαμίδης, είναι η δυνατότητα μονιμοποίησης της, που συνεπάγεται και την διατήρησή της για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΝΑΛΥΣΗ RAPD

Όλα τα χρησιμοποιηθέντα εκκινητικά μόρια εκτός τριών, (OPA 09, OPF 03, OPF 19), παρέχουν ικανοποιητικά προϊόντα ενίσχυσης σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν. Κάθε εκκινητικό μόριο παράγει ένα ξεχωριστό πρότυπο ζωνών ενισχυμένο DNA. Παρόλα αυτά, όλοι οι εκκινητές απέτυχαν στο να παρέχουν κάποια διαγνωστική ζώνη, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναγνώριση διαφορετικών γεωγραφικών πληθυσμών του είδους.

Ο αριθμός των ατόμων που αναλύθηκαν ανά πληθυσμό και ανά εκκινητικό μόριο, σε πηκτές πολυακρυλαμίδης κυμάνθηκε μεταξύ 20 (Τρίκερι 2) και 24 (Τρίκερι 1), εξαιτίας του γεγονότος, ότι κάθε ακατάλληλο παραγόμενο πρότυπο DNA, οφειλόμενο στην ανεπιτυχή ενίσχυση, έχει αποκλειστεί από την ανάλυση (Πίνακας 2). Ο αριθμός των αναπαραγομένων και καλώς διακριτών ζωνών που αναλύθηκε για κάθε εκκινητικό μόριο σε όλους τους πληθυσμούς, κυμάνθηκε μεταξύ 14 και 22 (Πίνακας 2). Από τις 154 ζώνες οι οποίες αναλύθηκαν και για τους οκτώ τυχαίους εκκινητές, 73 εξ' αυτών (ποσοστό 47,4%), εμφανίζουν πολυμορφισμό και οι υπόλοιπες ήταν μονομορφικές, διαρκώς εμφανιζόμενες σε όλα τα άτομα (Πίνακας 3).

Πίνακας 2. Αριθμός των ατόμων (N) και των ζωνών RAPD (n) που αναλύθηκαν ανά πληθυσμό και ανά εκκινητή και ο αριθμός των πολυμορφικών ζωνών (P) που βρέθηκαν ανά εκκινητή σε κάθε πληθυσμό *Mullus surmuletus*.

Πληθυσμός	OPA 02			OPA 05			OPA 11			OPA 16			OPF 05			OPF 06			OPF 12			OPF 17		
	N	n	P	N	n	P	N	n	P	N	n	P	N	n	P	N	n	P	N	n	P	N	n	P
Τρίκερι1	24	20	8	24	20	10	24	14	5	24	22	11	24	21	11	24	19	8	24	16	6	24	22	10
Τρίκερι2	20	20	8	20	20	10	20	14	5	20	22	11	20	21	11	20	19	8	20	16	6	20	22	10
Καβάλα	21	20	8	21	20	10	21	14	5	21	22	11	21	21	11	21	19	8	21	16	6	21	22	10
Ρόδος	23	20	8	23	20	10	23	14	5	23	22	11	23	21	11	23	19	8	23	16	6	23	22	10
Πρέβεζα1	22	20	8	22	20	10	22	14	4	22	22	11	22	21	10	22	19	8	22	16	7	22	22	11
Πρέβεζα2	21	20	8	21	20	10	21	14	4	21	22	11	21	21	10	21	19	8	21	16	7	21	22	11
Κέρκυρα	22	20	8	22	20	10	22	14	4	22	22	11	22	21	10	22	19	8	22	16	7	22	22	11
Γαλλία	23	20	8	23	20	10	23	14	6	23	22	11	23	21	11	23	19	8	23	16	6	23	22	11

Το χ^2 κριτήριο στην εκτίμηση της συχνότητας εμφάνισης των ζωνών μεταξύ των πληθυσμών δείχνει σημαντική ετερογένεια ($P < 0,05$), για 39 από τις 73 ζώνες (ποσοστό 53,4 %). Παρόλα αυτά, μετά την διόρθωση Bonferroni, μόνο 18 ζώνες, (ποσοστό 24,6%), εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια ($P < 0,05$), (Πίνακας 3). Αυτή η αναλογία, ελαττώθηκε στο 14,1%, (10/71), μετά τον αποκλεισμό του Γαλλικού δείγματος, στο ποσοστό 5,7%, (4/70) ανάμεσα στα δείγματα που προέρχονται από το Αιγαίο Πέλαγος και σε ποσοστό 4,8% (3/70), ανάμεσα στα δείγματα που αντιπροσωπεύουν το Ιόνιο Πέλαγος. Καμία σημαντική διαφορά δεν εμφανίστηκε ανάμεσα στους πληθυσμούς Τρίκερι 1 και Τρίκερι 2 καθώς και στους Πρέβεζα 1 και Πρέβεζα 2. Οι συχνότητες από 10 ζώνες, βρέθηκαν να ακολουθούν μια γεωγραφική τάση σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Πίνακας 3).

Η συνολική ανάλυση της συχνότητας των ζωνών, χρησιμοποιώντας το χ^2 κριτήριο με εξομοίωση Monte-Carlo, δείχνει σημαντική γεωγραφική ετερογένεια ανάμεσα στα οκτώ δείγματα ($P < 0,01$), όπως επίσης και ανάμεσα στις λεκάνες Ιόνιο-Αιγαίο ($P < 0,01$), Ιόνιο- κόλπος Lion ($P < 0,001$) και Αιγαίο-κόλπος Lion ($P < 0,001$).

Οι υπολογισθείσες εκτιμήσεις της ετεροζυγωτίας μέσα στους πληθυσμούς (Μέσος $H_{ij} = 0,259$), ήταν ελαφρώς υψηλότερες, συγκρινόμενες με αυτές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα δείγματα (Μέσος $H_i = 0,245$) (Πίνακας 3). Υπολογισμοί του F_{st} για τις εκτιμήσεις της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας και για τους οκτώ πληθυσμούς, δείχνουν την παρουσία υποδιαίρεσεων μεταξύ των πληθυσμών ($F_{st} = 0,053$). Αυτή η υποδιαίρεση ήταν σαφέστερη στο Αιγαίο ($F_{st} = 0,033$) από ότι στο Ιόνιο Πέλαγος.

Το αποτέλεσμα από τις συγκρίσεις κατά ζεύγη ανάμεσα στους πληθυσμούς, για την γενετική απόσταση (D) του Nei (1972), υπολογίστηκε από συνδυασμένα δεδομένα και των οκτώ εκκινήτων και κυμάνθηκε από $D=0,007$ έως $D=0,037$ (Πίνακας 4). Το Γαλλικό δείγμα ήταν αυτό που παρουσίασε τη μεγαλύτερη γενετική ετερογένεια, ($D=0,034$) από όλα τα υπόλοιπα και τα δείγματα του Αιγαίου Πελάγους δείχνουν να αποκλίνουν γενετικά από τα δείγματα του Ιονίου Πελάγους (Μέσος $D= 0,016$ για όλες τις συγκρίσεις κατά ζεύγη ανάμεσα στις δύο ομάδες των πληθυσμών).

Πίνακας 3. Συχνότητες του μηδενικού αλληλόμορφου των πολυμορφικών δεικτών RAPD στο μαρμπούνι μεταξύ των οκτώ πληθυσμών (TP1=Τρίκερι1, ΚΑΒ=Καβάλα, TP2=Τρίκερι2, ΡΟΔ=Ρόδος, ΠΡ1=Πρέβεζα1, ΚΕΡ=Κέρκυρα, ΠΡ2=Πρέβεζα2, ΓΑΛ=Γαλλία), τα αποτελέσματα της ανάλυσης χ^2 για την ετερογένεια των δεικτών μεταξύ των οκτώ δειγμάτων με 7 βαθμούς ελευθερίας και την εκτιμηθείσα ετεροζυγωτία (Hi) μέσα σε κάθε πληθυσμό.

RAPD Δείκτης;	TP1 n=24	ΚΑΒ n=21	TP2 n=20	ΡΟΔ n=23	ΠΡ1 n=22	ΚΕΡ n=22	ΠΡ2 n=21	ΓΑΛ n=23	Τιμή χ^2
ΟΡΑ02 ₁₁₂₀	0.125	0.381	0.350	0.217	0.227	0.318	0.238	0.217	11.507
ΟΡΑ02 ₉₅₀	0.583	0.476	0.450	0.522	0.545	0.409	0.333	0.174	22.822 ⁺
ΟΡΑ02 ₇₄₀	0.292	0.286	0.350	0.174	0.545	0.364	0.571	0.304	24.302 ^{**}
ΟΡΑ02 ₇₀₀	0.250	0.524	0.300	0.696	0.227	0.227	0.238	0.348	42.921 ^{**}
ΟΡΑ02 ₆₂₀	0.417	0.333	0.350	0.217	0.455	0.545	0.476	0.304	14.741 ⁺
ΟΡΑ02 ₆₀₀	0.167	0.238	0.200	0.300	0.182	0.273	0.190	0.348	7.408
ΟΡΑ02 ₅₄₀	0.250	0.238	0.250	0.348	0.455	0.591	0.476	0.174	28.842 ^{**}
ΟΡΑ02 ₄₁₀	0.375	0.333	0.450	0.478	0.409	0.409	0.429	0.435	22.728 ⁺
ΟΡΑ05 ₉₂₀	0.125	0.238	0.150	0.304	0.136	0.227	0.381	0.174	24.252 ^{**}
ΟΡΑ05 ₈₅₀	0.375	0.571	0.350	0.391	0.182	0.182	0.190	0.304	25.192 ^{**}
ΟΡΑ05 ₇₈₀	0.208	0.286	0.200	0.348	0.227	0.227	0.238	0.217	4.149
ΟΡΑ05 ₇₄₀	0.167	0.286	0.350	0.217	0.182	0.318	0.333	0.174	9.615
ΟΡΑ05 ₆₈₀	0.500	0.714	0.650	0.565	0.409	0.409	0.429	0.609	16.477 ⁺
ΟΡΑ05 ₆₁₀	0.375	0.238	0.450	0.348	0.409	0.545	0.429	1.000	67.272 ^{**a}
ΟΡΑ05 ₅₇₀	0.208	0.190	0.250	0.348	0.227	0.227	0.238	0.174	4.968
ΟΡΑ05 ₅₂₀	0.542	0.429	0.550	0.522	0.591	0.409	0.286	0.435	11.986
ΟΡΑ05 ₄₆₀	0.667	0.571	0.650	0.435	0.727	0.500	0.429	0.565	15.038 ⁺
ΟΡΑ05 ₃₂₀	0.167	0.190	0.300	0.261	0.182	0.182	0.190	0.348	7.994
ΟΡΑ11 ₁₀₅₀	0.458	0.619	0.500	0.391	0.364	0.364	0.381	0.174	21.028 ⁺
ΟΡΑ11 ₉₈₀	0.125	0.333	0.250	0.174	0.136	0.273	0.333	0.348	14.188 ⁺
ΟΡΑ11 ₈₃₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.304	96.988 ^{**a}
ΟΡΑ11 ₆₀₀	0.333	0.190	0.150	0.261	0.000	0.000	0.000	0.261	44.150 ^{**a}
ΟΡΑ11 ₅₈₀	0.375	0.429	0.550	0.522	0.682	0.591	0.429	0.391	14.604 ⁺
ΟΡΑ11 ₃₇₀	0.167	0.238	0.300	0.304	0.182	0.273	0.524	0.304	18.084 ⁺
ΟΡΑ16 ₁₂₅₀	0.250	0.190	0.300	0.217	0.318	0.318	0.333	0.261	4.145
ΟΡΑ16 ₁₁₂₀	0.542	0.476	0.450	0.609	0.000	0.500	0.381	0.000	47.123 ^{**a}
ΟΡΑ16 ₉₀₀	0.250	0.238	0.300	0.217	0.273	0.409	0.286	0.174	7.704
ΟΡΑ16 ₇₉₀	0.292	0.381	0.400	0.261	0.318	0.318	0.333	0.391	3.462
ΟΡΑ16 ₇₀₀	0.167	0.143	0.300	0.348	0.182	0.182	0.190	0.261	9.479
ΟΡΑ16 ₆₅₀	0.167	0.333	0.200	0.391	0.182	0.273	0.190	0.174	12.331
ΟΡΑ16 ₆₂₀	0.667	0.619	0.600	0.391	0.727	0.545	0.333	0.174	45.135 ^{**}
ΟΡΑ16 ₅₇₀	0.417	0.429	0.400	0.304	0.455	0.364	0.476	0.565	7.837
ΟΡΑ16 ₅₅₀	0.375	0.524	0.450	0.522	0.273	0.273	0.286	0.522	17.066 ⁺
ΟΡΑ16 ₄₃₀	0.541	0.714	0.450	0.435	0.500	0.500	0.524	0.522	8.703
ΟΡΑ16 ₃₅₀	0.167	0.333	0.250	0.304	0.182	0.318	0.381	0.304	8.671
ΟΡΦ05 ₁₃₂₀	0.333	0.238	0.350	0.174	0.182	0.227	0.333	0.000	24.016 ^{**a}
ΟΡΦ05 ₁₂₀₀	0.167	0.143	0.200	0.174	0.182	0.273	0.333	0.435	17.755 ⁺
ΟΡΦ05 ₈₅₀	0.250	0.238	0.300	0.217	0.273	0.273	0.286	0.174	2.774
ΟΡΦ05 ₈₁₀	0.167	0.286	0.300	0.391	0.182	0.227	0.333	0.348	10.356
ΟΡΦ05 ₇₆₀	0.458	0.333	0.550	0.261	0.500	0.409	0.524	0.435	11.931
ΟΡΦ05 ₆₉₀	0.417	0.476	0.600	0.348	0.455	0.500	0.286	0.217	19.057 ⁺
ΟΡΦ05 ₆₆₀	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.217	68.467 ^{**a}
ΟΡΦ05 ₆₀₀	0.125	0.238	0.150	0.217	0.182	0.227	0.381	0.217	10.586
ΟΡΦ05 ₅₅₀	0.208	0.190	0.150	0.304	0.000	0.000	0.000	0.304	42.469 ^{**a}
ΟΡΦ05 ₄₉₀	0.167	0.238	0.200	0.261	0.182	0.182	0.190	0.217	11.858

OPF05 ₃₈₀	0.208	0.238	0.350	0.174	0.227	0.182	0.238	0.261	16.727 ⁺
OPF05 ₂₈₀	0.417	0.429	0.400	0.478	0.455	0.409	0.476	0.261	6.267
OPF06 ₈₀₀	0.292	0.238	0.200	0.217	0.364	0.364	0.381	0.522	16.308 ⁺
OPF06 ₇₃₀	0.250	0.190	0.400	0.174	0.273	0.455	0.286	0.217	14.919 ⁺
OPF06 ₇₀₀	0.292	0.429	0.300	0.348	0.318	0.318	0.333	0.217	4.961
OPF06 ₅₈₀	0.125	0.190	0.300	0.174	0.409	0.409	0.429	0.391	22.949 ⁺
OPF06 ₅₅₀	0.125	0.238	0.150	0.348	0.136	0.364	0.286	0.565	35.205 ⁺ *
OPF06 ₅₀₀	0.417	0.381	0.650	0.261	0.455	0.545	0.476	0.435	15.926 ⁺
OPF06 ₃₆₀	0.292	0.429	0.250	0.261	0.182	0.182	0.190	0.304	10.755
OPF06 ₂₂₀	0.125	0.238	0.350	0.304	0.182	0.273	0.190	0.217	9.036
OPF12 ₉₇₀	0.292	0.429	0.300	0.565	0.318	0.318	0.333	0.435	12.223
OPF12 ₉₁₀	0.167	0.286	0.200	0.174	0.182	0.273	0.190	0.217	3.743
OPF12 ₈₅₀	0.292	0.381	0.250	0.174	0.318	0.318	0.333	0.522	14.828 ⁺
OPF12 ₇₈₀	0.167	0.286	0.350	0.391	0.182	0.182	0.190	1.000	109.748 ^{***}
OPF12 ₆₅₀	1.000	1.000	1.000	1.000	0.500	0.409	0.524	0.261	181.717 ^{***}
OPF12 ₅₂₀	0.542	0.429	0.450	0.304	0.591	0.636	0.619	0.391	17.873 ⁺
OPF12 ₄₇₀	0.125	0.190	0.350	0.261	0.136	0.182	0.286	0.261	10.736
OPF17 ₁₀₉₀	1.000	1.000	1.000	1.000	0.682	0.591	0.714	0.609	78.352 ^{***}
OPF17 ₁₀₀₀	0.458	0.667	0.600	0.391	0.364	0.364	0.381	0.174	29.093 ^{**}
OPF17 ₈₉₀	0.542	0.476	0.550	0.261	0.591	0.636	0.619	0.348	22.719 ⁺
OPF17 ₈₀₀	0.333	0.381	0.400	0.478	0.364	0.364	0.381	0.391	2.446
OPF17 ₇₈₀	0.292	0.381	0.300	0.217	0.136	0.227	0.143	0.261	10.939
OPF17 ₇₅₀	0.125	0.190	0.250	0.261	0.136	0.136	0.286	0.304	10.078
OPF17 ₆₉₀	0.292	0.238	0.400	0.391	0.318	0.318	0.333	0.261	4.506
OPF17 ₆₅₀	0.208	0.190	0.250	0.261	0.227	0.227	0.238	0.130	3.175
OPF17 ₅₀₀	0.125	0.238	0.400	0.348	0.136	0.273	0.238	0.130	18.179 ⁺
OPF17 ₄₈₀	0.250	0.190	0.450	0.304	0.273	0.273	0.286	0.217	8.704
OPF17 ₄₁₀	0.167	0.143	0.300	0.261	0.182	0.227	0.190	0.261	5.277

Hi (εκτιμηθείσα ετεροζυγωτία) 0.247 0.243 0.243 0.248 0.240 0.245 0.246 0.248

⁺υποδηλώνει σημαντικότητα για απλό έλεγχο

^{*}υποδηλώνει σημαντικότητα μετά από τη διόρθωση Bonferroni

^aυποδηλώνει δείκτη που ακολουθεί μια γεωγραφική κατανομή

Οι γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των πληθυσμών είναι σε αντιστοιχία με το γεωγραφικό πρότυπο, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και στο δένδρόγραμμα που παράγεται από την ανάλυση UPGMA των γενετικών αποστάσεων (Σχήμα 4).

Πίνακας 4. Γενετικές αποστάσεις (D) του Nei (1972) μεταξύ των οκτώ πληθυσμών του *Mullus surmuletus* βάσει της ανάλυσης RAPD

Όνομασία Πληθυσμού	1	2	3	4	5	6	7	8
1 Τρίκερι1	0,000							
2 Τρίκερι2	0,011	0,000						
3 Καβάλα	0,010	0,005	0,000					
4 Ρόδος	0,015	0,010	0,008	0,000				
5 Πρέβεζα1	0,014	0,012	0,016	0,020	0,000			
6 Πρέβεζα2	0,021	0,013	0,016	0,019	0,007	0,000		
7 Κέρκυρα	0,020	0,011	0,015	0,019	0,007	0,006	0,000	
8 Γαλλία	0,033	0,033	0,033	0,031	0,037	0,033	0,034	0,000

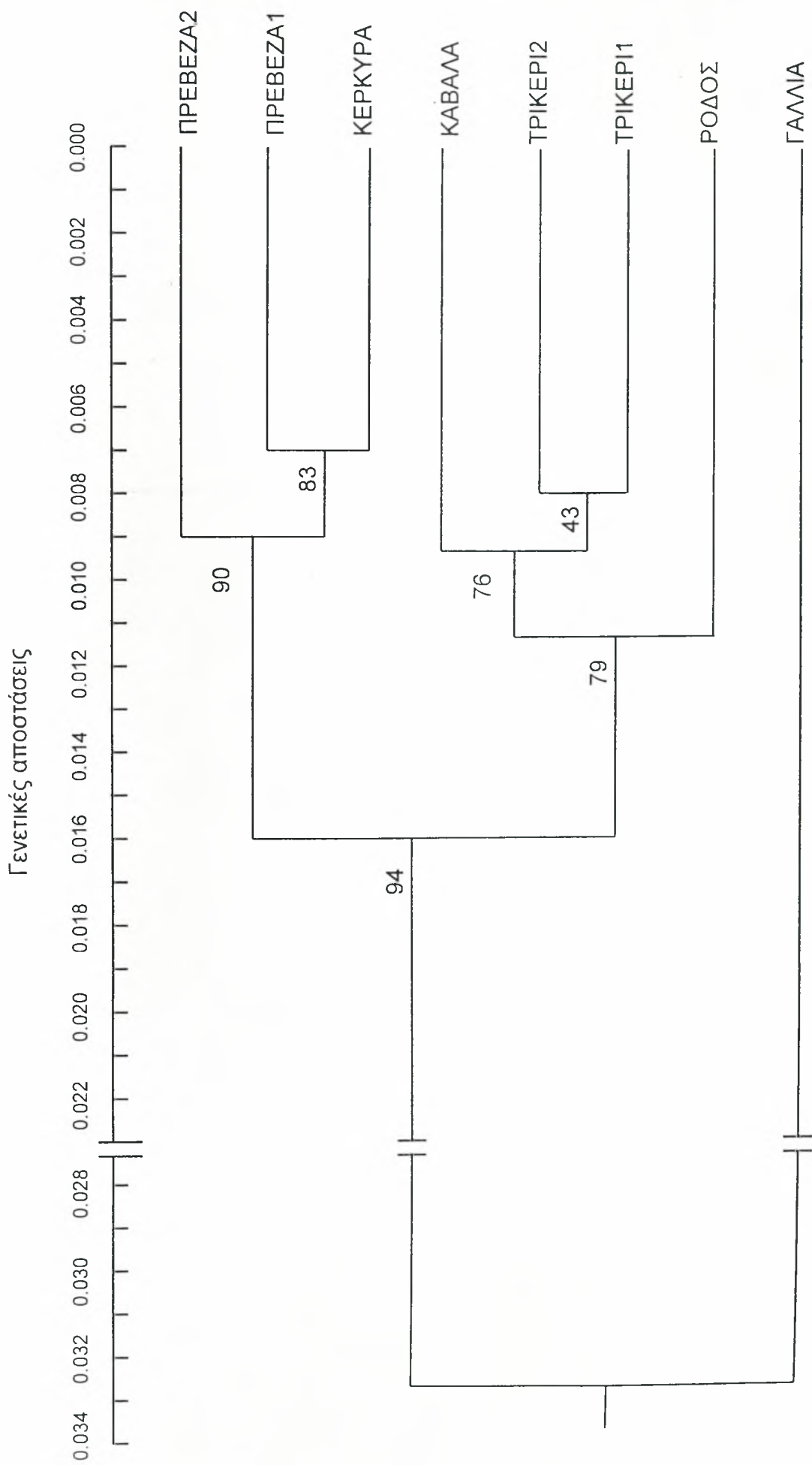
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα έρευνα η μέθοδος RAPD, χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί η γενετική παραλλακτικότητα σε πληθυσμούς μπαρμπουνιού. Η RAPD ανάλυση απεκάλυψε 73 αξιόπιστους πολυμορφισμούς (ποσοστό 47,4%) για τους οκτώ τυχαίους εκκινήτες που επιλέχθηκαν για την ανάλυση πληθυσμών.

Αν και η μέθοδος απέτυχε να ενισχύσει ειδικές ζώνες που θα μπορούσαν να διαχωρίσουν τους πληθυσμούς, πέτυχε στο να αποκαλύψει μια γενετική ετερογένεια ανάμεσα στα δείγματα. Παρότι μόνο 18 από τις 73 ζώνες εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Πίνακας 3), η συνολική ανάλυση της συχνότητας των ζωνών, η οποία βασίζεται στο χ^2 κριτήριο με εξομοίωση Monte-Carlo, δηλώνει ότι ενδεχομένως υπάρχουν γενετικώς διαφοροποιημένα δείγματα.

Στα δείγματα από την Ελλάδα, η μέθοδος δείχνει μεγαλύτερη γενετική ετερογένεια για τους πληθυσμούς του Αιγαίου Πελάγους, συγκρινόμενη με αυτούς που συλλέχθηκαν στο Ιόνιο Πέλαγος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι γεωγραφικές αποστάσεις ανάμεσα στα σημεία συλλογής των δειγμάτων ήταν σημαντικότερες στο Αιγαίο από ότι στο Ιόνιο Πέλαγος και αυτό συνεπάγεται ένα υψηλότερο επίπεδο γενετικής ροής ανάμεσα στους πληθυσμούς του Ιονίου Πελάγους. Αυτή η αξιοσημείωτη γενετική ετερογένεια ανάμεσα στους πληθυσμούς επιβεβαιώνεται από την F_{st} ανάλυση. Η ανάλυση αποδεικνύει ότι το Γαλλικό δείγμα, ήταν μακράν το περισσότερο γενετικώς ετερογενές.

Η γενετική ετερογένεια ανάμεσα στα δείγματα των Ελληνικών υδάτων, είναι σε συμφωνία με την γεωγραφική απόσταση ανάμεσα στις θέσεις συλλογής των δειγμάτων. Με την εφαρμογή της μεθόδου RAPD, εμφανίζεται μια στατιστικώς σημαντική συμφωνία ανάμεσα στις γενετικές και τις γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών (Mantel t-test, $r=0.72$, $P<0.01$).



Σχήμα 4. Δενδρόγραμμα UPGMA βασισμένο στις γενετικές αποστάσεις μετά την ανάλυση των δεικτών RAPD

Είναι πιθανό ότι οι περισσότερες ζώνες που παράγονται με τη μέθοδο των RAPD είναι τα ενισχυμένα πρότυπα του λιγότερο λειτουργικού τμήματος του γονιδιώματος, το οποίο δεν ανταποκρίνεται στην επιλογή και μπορεί να συσσωρεύσει πολλές μεταβολές νουκλεοτιδίων. Για το λόγο αυτό, η μέθοδος RAPD μπορεί να αποκαλύψει ευκολότερα τη γενετική ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών, αρκεί οι νέες ζώνες να προκύπτουν από τις μεταβολές νουκλεοτιδίων στα σημεία συγκόλισης των εκκινητών (Naish et al., 1995) και τα επίπεδα της γονιδιακής ροής να είναι ανάμεσα να καλύψουν τις συνέπειες των μεταλλάξεων.

Ο βιολογικός κύκλος του μπαρμπουνιού, περιλαμβάνει μια πελαγική φάση ιχθυδίου, η οποία ακολουθείται από μια βενθική φάση ενήλικου. (Stergiou et al., 1997). Η ανταλλαγή των ιχθυδίων είναι προφανώς ο κύριος μηχανισμός για την γενετική ομογενοποίηση των πληθυσμών. Οι εκτιμήσεις F_{st} , αν είναι σημαντικά διάφορες του μηδενός (Ferguson, 1994), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εκφράσουν τις μεταναστεύσεις ανά γενιά (N_eM) ανάμεσα στους πληθυσμούς. Η υπολογισθείσα N_eM , σύμφωνα με την μέθοδο RAPD, για τους συγκεκριμένους πληθυσμούς είναι $N_eM = 4.5$. Η εκτίμηση αυτή, είναι πολύ μικρότερη από την μέση εκτίμηση γονιδιακής ροής για τα θαλάσσια ψάρια ($N_eM = 22.76$, Ward et al., 1994) αλλά πλησιάζει αρκετά σε αυτές που υπολογίσθηκαν για κάποια θαλάσσια είδη στην Μεσόγειο θάλασσα, όπως για τα *Engraulis encrasicolus* ($N_eM = 8.6$, Bembo et al., 1996), *Mullus barbatus* ($N_eM = 5.6$, Mamuris et al., 1998a) και *Mugil cephalus* ($N_eM = 7.26$, Rossi et al, 1998).

Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι ωκεανογραφικές και βυθομετρικές συνθήκες που επικρατούν στο Αιγαίο και στο Ιόνιο Πέλαγος, ίσως να εμποδίζουν τις μεγάλης κλίμακας μεταναστεύσεις ενηλίκων και την μεταφορά των αυγών και ιχθυδίων, ελαττώνοντας τη γονιδιακή ροή ανάμεσα στις θέσεις συλλογής των δειγμάτων (Spanakis et al., 1998, Mamuris et al., 1998b).

Ένας μετανάστης ανά γενεά ανάμεσα στους πληθυσμούς, θα ήταν επαρκής για να προκαλέσει την καθήλωση και συντήρηση ενός αλληλομόρφου σε έναν πληθυσμό, και λιγότερο από δέκα μετανάστες ανά γενιά θα μπορούσαν να συντηρήσουν, με πιθανότητες 95%, μια σημαντική

διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς (Allendorf & Phelps, 1981). Προφανώς, τα επίπεδα της μετανάστευσης που υπολογίστηκαν ανάμεσα στους γεωγραφικούς πληθυσμούς, δεν ήταν ικανά να ομογενοποιήσουν τελείως τα δείγματα του μπαρμπουνιού και η μέθοδος RAPD μπόρεσε να αποκαλύψει αυτόν τον ενδοειδικό γενετικό πολυμορφισμό. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και άλλες μελέτες για διαφορετικά είδη, όπως για το λαβράκι (Bielawski & Pumo, 1997) και την κουτσομούρα (Mamuris et al., 1998b).

Εν κατακλείδι, η μέθοδος RAPD παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες για την πληθυσμιακή γενετική, οι οποίες μπορεί να είναι χρήσιμες για την ανάλυση της δομής των ιχθυαποθεμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allegrucci, G., Caccone, A., Cataudella, S., Powell, J.R.** (1995). Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Mar Biol* 121: 591-599.
- Allendorf, F.W. and Phelps, S.R.** (1981). Use of allelic frequencies to describe population structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38:1507-1514.
- Altukhov, Y.** (1981). The stock concept from the Viewpoint of Population. *Genetic Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38:1523-1538.
- Ανανιάδης Ι.Κ.** (1995). Εκμετάλευση των αλιευτικών βυθών και προστασία της Ελληνικής υδρόβιας πανίδας και χλωρίδας. Επιλεγμένα θέματα διαχείρισης περιβάλλοντος., 403-433.
- Awise, J. C.** (1987). Identification and interpretation of mitochondrial DNA stocks in marine species. In Kumpf H.E., Vaught R.N. and Grimes C. eds *Proc of the Stock Identification workshop*. pp 105-136.
- Awise, J.C.** (1989) Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43: 1192-1208.
- Bardakci, F., Skibinski, D.O.F.** (1994) The application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73: 117-123.
- Beacham, T., Gould, A. Withler R., Murray, C. and Barner L.** (1987). Biochemical genetic survey and stock identification of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in British Columbia. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 44: 1702-1713.
- Bembo, D.G., Carvalho, G.R., Cingolani, N. And Pitcher, T.J.** (1996). Electroforetic analysis of stock structure in Northern Mediterranean anchovies, *Engraulis encrasicolus*. *ICES J. Mar. Sci.*, 53:115-128.
- Bermingham, E., Forbes, S., Fiedland, K., and C. Pla** (1992). Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North America and European origin using restriction analysis of mitochondrial DNA. *Can. J. Aquat. Sci.* 48: 884-893.
- Bielawski, J. P., and Pumo, D. E.** (1997). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Heredity* , 78:32-40.
- Billington, N. and Hebert, P.D.N.** (1990). Technique for determining mitochondrial DNA markers in blood samples from walleyes. *Am. Fish. aquat. Sci.* 48, 884-93.
- Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A.J., Worff, R.** (eds) (1991b). DNA fingerprinting: Approaches and Applications. Birkhauser, Basel.
- Carmichael, G.J., Schmidt, M.E. and Morizot, D.C.** (1992). Electrophoretic identification of genetic markers in channel catfish blue catfish by use low-risk tissues. *Trans. Am. Fish. Soc.* 121, 26-35.

- Carr, S., and H. Marshall** (1991). A direct approach to the measurement of genetic variation in fish population: applications of the polymerase chain reaction to studies of Atlantic cod *Gadus morhua*. J. Fish Biol. 39: 101-107.
- Carvalho, G. and L. Hauser** (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. Rev. Fish. Biol. Fisheries 4: 326-350.
- Cenis, J.L., Perez, P., Fereres, A.** (1993) Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. Ann Entomol Soc Am 86: 545-550.
- Cenis, J.L., Perez, P., Fereres, A.** (1993) Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. Ann Entomol Soc Am 86: 545-550.
- Delvin, R.H., McNeil, B.K., Groves, T.D. and Donaldson, E.M.** (1991). Isolation of a Y- chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 1606-12.
- Ferguson A.** (1994).Molecular genetics in fisheries: current and future perspectives. Rev. Fish Biol. Fish., 4:379-383.
- Graves, J. E., Ferris, S. and A. Dizon** (1984). Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsawonus pelamis*) demonstrated with restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. Mar. Biol. 89: 315-319.
- Gausen, D. And Moen,**(1991) Large-scale escapes of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) into Norwegian rivers threaten natural populations. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 426-428.
- Gudjonsson, S.** (1991) Occurrence of reared salmon in natural salmon rivers in Iceland. Aquaculture 98: 133-142.
- Gulland, J. A.** (1983). Fish stock Assessment: A Manual of Basic Methods. Chichester: FAO / Wiley, 223 pp.
- Gyllenstein, U. and A. Wilson** (1987). Mitochondrial DNA of Salmonids : Inter- and intraspecific variability detected with restriction enzymes. In Ryman N, and F. Utter (eds). Population Genetics and Fishery Management pp 301-317. Seattle. University of Washington.
- Harris, H.** (1966). Enzyme polymorphisms in man. Proc. R. Soc. 164B, 298-310.
- Hindar, K., Ryman, N. and Utter, F.** (1991). Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 945-57.
- Ihssen, P., Booke, H., Casselman, J., McGlade, J., Payne, N., and F Utter.** (1981). Stock Identification: Materials and Methodes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 1838-1855.
- Jorstad, K., and G. Nævdal** (1989). Genetic variation and population structure of cod *Gadus morhua* L., in some Fjords in northern Norway. J. Fish Biol. 35 (Sup): 245-252.
- Karl, S., and J. Avise** (1993). PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single copy-nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. Mol. Biol. Evol. 10: 342-361.

- King, D.** (1983). Genetic analysis of enzyme polymorphisms in herring (*Clupea harengus* L.). *Heredity* 52: 121-131.
- Kirby, L.T.** (1990). DNA fingerprinting: An Introduction. Stockton Press, New York.
- Kocher, T., Thomas, W., Meyer, A., Edwards, S., Paabo, S., Villablanca, F., and Wilson A.** (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *PNAS* 86: 6196-6200.
- Lannan, J., Gall, G., Thorpe J., Nash C., and Ballachey B.** (1989). Genetic resource management of fish. *Genome* 31, 798-804.
- Lansman, R.A., Shade, R.O., Sharipa, J.F. and Avice, J.C.** (1981). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. *J. mol. Evol.* 17. 214-26.
- Lewin, R.** (1989). Limits to DNA fingerprinting. *Science*, 243, 1549-1551.
- Lewontin, R.C. and Hubby, J.L.** (1966). A molecular approach to the study of genic variation in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54, 595-609.
- Lund, R.A., Okland, F. And Hansen, L.P.** (1991) Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in fisheries and rivers in Norway. *Aquaculture* 98: 143-150.
- Lura, H. and Saegrov, H.** (1991) Documentation of successful spawning of escaped farmed female Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Norwegian rivers. *Aquaculture* 98: 151-159.
- Μαγουλάς, Α.** (1990). Ποικιλότητα του μιτοχονδριακού DNA στους πληθυσμούς σαρδέλας *Sardina pilchardus* και γαύρου *Engraulis encrasicolus* των ελληνικών θαλασσών και φυλογενετικά συμπεράσματα. Διδακτορική διατριβή, Ηράκλειο, Κρήτη.
- Mamuris, Z., Apostolidis, A.P., Triantaphyllidis, C.** (1997b) Genetic protein variation in red mullet (*Mullus barbatus* L.) and striped red mullet (*M. surmuletus*, L.) populations from the Mediterranean Sea. *Mar Biol.*
- Mitton, J.B., and Grant, M.C.** (1984). Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *A. Rev. Ecol. Syst.* 15, 479-99.
- Mork, J.** (1991) One-generation effects of farmed fish immigration on the genetic differentiation of wild Atlantic salmon in Norway. *Aquaculture* 98: 267-276.
- Mork, J., Ryman, N., Stahl, G., Utter, F., and G. Sundnes** (1985). Genetic variation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout its range. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1580-1587.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A.,** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155: 335-350.
- Naish, K.A., Warren, M., Bardakci, F., Skibinski, D.O.F., Carvalho, G.R., Mair, G.C.** (1995) Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar

genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Molec Ecol* 4: 271-274.

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

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

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

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

Phillip, D.P. (1991). Genetic implications of introducing Florida largemouth bass, *Micropterus salmoides floridanus*. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 48. (Supp. 1), 58-65.

Robinette, H.R., Hynes, J., Parker, N.C., Putz, R., Stevens, R.E. and Stickney, R.R. (1991) Commercial aquaculture. *Fisheries* 16: 18-23.

Rossi A. R., Capula, M., Crosetti, D., Sola, L., and Campton, D. E., (1998). Allozyme variation in global populations of striped mullet, *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae). *Mar. Biol.*, 131: 203-212.

Ryman, N., Lagercrantz, L., Anderson, R., Chakraborty R., and R. Rosenberg (1984). Lack of correspondence between genetic and morphological variability patterns in atlantic herring (*Clupea harengus*). *Heredity* 53: 687-704.

Saunders, R.L. (1991) Potential interaction between cultured and wild Atlantic salmon. *Aquaculture* 98: 51-60.

Sick, K., (1961). Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature, Lond.* 192, 894-6.

Skibinski, D.O.F. (1994). The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In Beaumont, A.R., ed. *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. London: Chapman and Hall ,pp. 177-99.

Smith, P. J., and Jamieson, A. (1986). Stock discreteness in herrings: a conceptual revolution. *Fish. Res.* 4: 223-234.

Smith, P., Jamieson, A., and Birley, A. (1990). Electrophoretic studies and the stock concept in marine teleosts. *J. Cons. int. Exp. Mer.* 47: 231-245.

Spanakis, E., Tsimenides, N., and Zouros, E. (1989). Genetic differences between populations of sardine (*Sardina pilchardus*) and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Aegean and Ionian Seas. *J. Fish Biol.* 35: 417-437.

Sultmann, H., Mayer, W.E., Figueroa, F., Tichy, H., Klein, J. (1995) Phylogenetic analysis of Cichlid fishes using nuclear DNA markers. *Mol Biol. Evol* 12: 1033-1047.

Taggart, J.B. and Ferguson , A. (1986). Electrophoretic evaluation of a supplemental stocking programme for brown trout, *Salmo trutta* L. *Aquacult. Fish. Manage.* 17, 155-62.

Taylor, E.B. (1991) A review of local adaptation in Salmonidae, with particular reference to Pacific and Atlantic salmon. *Aquaculture* 98: 185-207.

Waldman, J.R. and Wirgin, I. (1994). Use of DNA analyses in the management of natural fish populations. In Garte, S.J., ed. *Molecular Environmental Biology*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp.29-64.

Ward, R. D.,and Grewe, P. M. (1994). Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4: 300-325.

Ward, R. D., Woodwark, M., and Skibinski,D. O. F. (1994).A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J. Fish Biol.*, 44: 213-232.

Weatherhead, P.J., Montgomerie, R.D. (1991). Good news and bad news about DNA fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 6, 173-174.

Webb, J.H., and Youngson, A.F.(1992). Reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in the catches of a salmon fishery on the western coast of Scotland. *Aquacult. Fish. Manage.* 23: 393-397.

Webb, J.H., McLaren, I.S., Donaghy, M.J. and Youngson, A.F. (1993a) Spawning of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in the second year after their escape. *Aquacult. Fish. Manage.* 24: 557-561.

Webb, J.H., and Youngson, A.F., Thompson, C.E., Hay, D.W., Donaghy, M.J. and McLaren, I.S.(1993b) Spawning of escaped farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in western and northern Scottish rivers: egg deposition by females. *Aquacult. Fish. Manage.* 24: 663-670.

Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218.

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 218: 704-740.

