

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών των Τμημάτων Γεωπονίας
Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος και Γεωπονίας Φυτικής
Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Μαρία Ν. Νούσια

**Ρυθμός αύξησης και γενετικός πολυμορφισμός του σαργού, *Diplodus
sargus*, στο Αιγαίο και Ιόνιο πέλαγος**

2006

Ρυθμός αύξησης και γενετικός πολυμορφισμός του σαργού, *Diplodus sargus*, στο Αιγαίο και Ιόνιο πέλαγος

Τα μέλη της επιτροπής

Νεοφύτου Χρήστος
Ιχθυολογία-Υδροβιολογία
Καθηγητής Π.Θ.
Επιβλέπων

Κλαουδάτος Σπυρίδων
Υδατοκαλλιέργειες
Καθηγητής Π.Θ.
Μέλος

Εξαδάκτυλος Αθανάσιος
Γενετική
Λέκτορας Π.Θ.
Μέλος

*Αφιερώνεται στο σύζυγό μου Γιάννη, τον γιο μας Νικολάκη και σε όσους με βοήθησαν
να πραγματοποιήσω αυτό το μεταπτυχιακό*

Ευχαριστίες

Η πτυχιακή αυτή διατριβή πραγματοποιήθηκε κατά τα αρχικά στάδια στο Εργαστήριο Εντομολογίας, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος. Το ουσιαστικότερο και μεγαλύτερο μέρος της διατριβής ολοκληρώθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυολογίας-Υδροβιολογίας, του Τμήματος Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Ρυθμός αύξησης και γενετικός πολυμορφισμός του σαργού, *Diplodus sargus*, στο Αιγαίο και το Ιόνιο πέλαγος» με επιβλέποντα τον Καθηγητή κ. Χρήστο Ν. Νεοφύτου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Χρήστο Ν. Νεοφύτου για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την εξέλιξη της έρευνας καθώς και στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Λέκτορα κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για την αμέριστη βοήθειά του, την κατανόηση και συμπαράσταση που μου έδειξε κατά την πορεία της διατριβής από την αρχή έως το τέλος αυτής.

Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Ι. Τσιτσιπή για την παραχώρηση του Εργαστηρίου Εντομολογίας με σκοπό τη διεξαγωγή της παρούσας έρευνας στα αρχικά στάδια της.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον συμφοιτητή μου κ. Γεώργιο Γκάφα, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την πορεία της παρούσας διατριβής, στον κ. Δ. Βαφείδη για τη συλλογή δειγμάτων καθώς και σε όσους άλλους με βοήθησαν στη συλλογή των δειγμάτων μου και γενικά στην έρευνα που πραγματοποίησα.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους για τη βοήθεια και την συμπαράσταση που μου πρόσφεραν στα χρόνια αυτά. Χωρίς τη δική τους προσφορά και υπομονή, δε θα μπορούσα να πραγματοποιήσω αυτό το πολύτιμο για μένα μεταπτυχιακό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη του ρυθμού αύξησης και η εκτίμηση του γενετικού πολυμορφισμού μεταξύ των πληθυσμών του είδους *Diplodus sargus* στο Αιγαίο και Ιόνιο πέλαγος. Η προσπάθεια εκτίμησης της γενετικής ποικιλότητας επετεύχθη με τη χρήση του μικροδορυφορικού DNA ως μοριακού γενετικού δείκτη.

Για τη μελέτη του ρυθμού αύξησης λήφθηκαν ορισμένες μετρήσεις οι οποίες περιελάμβαναν το ολικό και το καθαρό βάρος, το μεσουραίο μήκος, το πλάτος κάθε ατόμου ενώ επιπλέον απομακρύνθηκαν οι γονάδες για την εκτίμηση του φύλου και οι ωτόλιθοι για τη μέτρηση της ηλικίας των ψαριών.

Σε σύνολο 80 ατόμων εντοπίστηκαν 52 αρσενικά και 28 θηλυκά άτομα ηλικίας 1+, 2+, 3+ και 4+. Οι σχέσεις μεσουραίου μήκους - ολικού βάρους που μελετήθηκαν για τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Όσον αφορά το εύρος πολυμορφισμού, δεκαπέντε ζεύγη εκκινητών (primers) (Pma1, Pma2, Pma3, Pma5, GA1A, GA1B, GA2A, GA2B, GT2, GT3, GT4, GT6, SaI10, SaI12, SaI19) μελετήθηκαν για τα 77 συνολικά άτομα του είδους. Από τους εκκινητές αυτούς, μόνο οι 4 (Pma1, Pma2, SaI10, SaI12) ανιχνεύθηκαν στους 11 πληθυσμούς του σαργού. Και οι τέσσερις αυτοί εκκινητές βρέθηκαν πολυμορφικοί.

Η τεχνική των μικροδορυφορικών δεικτών που εφαρμόστηκε περιελάμβανε την απομόνωση του DNA από όλα τα άτομα του είδους, τον πολλαπλασιασμό αυτού του DNA με PCR και τέλος την εύρεση των αλληλομόρφων του κάθε ατόμου με γονοτύπιση.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αφορούσαν ένα σύνολο 114 αλληλομόρφων με 23 μοναδικά αλληλόμορφα. Οι παρατηρούμενες τιμές ετεροζυγωτίας ήταν αρκετά υψηλές (0.6250 – 0.9065), αλλά μέσα στα όρια που έχουν παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία. Δεν παρατηρήθηκαν αποκλίσεις από το νόμο Hardy-Weinberg. Εξίσου σημαντικές εντοπίστηκαν και οι τιμές του συντελεστή παραλλακτικότητας (-0.1831 έως 0.5469) δείχνοντας την ύπαρξη γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών. Επίσης ανιχνεύθηκαν υψηλές τιμές γονιδιακής ροής που δείχνουν την ύπαρξη υποπληθυσμών. Το δένδρογραμμα των γενετικών αποστάσεων δεν επιβεβαιώνεται από τις γεωγραφικές αποστάσεις.

ABSTRACT

The aim of the present work is to study the growth rate and to evaluate the genetic polymorphism of various populations of white seabream, *Diplodus sargus* in the Aegean and Ionian Seas. The effort to estimate genetic diversity was achieved with the use of microsatellite DNA as a molecular genetic marker.

For the study of the growth rate, data were collected such as the total and standard weight, the fork length, the height of each individual. Furthermore, the gonads were destructed for sex evaluation as well as the otoliths for the estimation of fish age.

In a total of 80 individuals 52 were males and 28 females, aged 1+, 2+, 3+ and 4+. The relationships between fork length – total weight for males and females produced significant results.

Fifteen microsatellite primers (Pma1, Pma2, Pma3, Pma5, GA1A, GA1B, GA2A, GA2B, GT2, GT3, GT4, GT6, SaI10, SaI12, SaI19) were tested for the 77 samples. From those, only four (Pma1, Pma2, SaI10, SaI12) were detected highly polymorphic in the eleven populations of *Diplodus sargus*.

The observed results involved a total of 114 alleles, while 23 of them being unshared. The observed heterozygosity values were high enough (0.6250 - 0.9065), but within the range observed in the bibliography. No statistical departure from the Hardy-Weinberg law was detected. Statistically significant were the genetic heterogeneity coefficients values (-0.1831 - 0.5469) describing the existence of genetic differentiation among the populations. Nevertheless, quite extensive gene flow values were detected among populations, indicating the presence of sub-populations. Dendrogram using genetic distance values did not conform to geographical distances.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ρυθμός αύξησης.....	4
1.1.1 Εκτίμηση της ηλικίας των ψαριών από τους ωτολίθους.....	5
1.2 Γενετικός πολυμορφισμός.....	6
1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	15
1.3.1 Χαρακτηριστικά και σημασία της τεχνικής PCR.....	18
1.4 Ηλεκτροφόρηση.....	19
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Βιολογικό υλικό.....	22
2.2 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.....	23
2.3 Αφαίρεση και παρατήρηση ωτολίθων.....	25
2.4 Τεχνική μικροδορυφορικού DNA	
2.4.1 Εξαγωγή και απομόνωση του DNA.....	25
2.4.2 Τεχνική PCR με μη σημασμένους εκκινητές.....	27
2.4.3 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης.....	29
2.4.4 Τεχνική PCR με σημασμένους εκκινητές.....	32
2.4.5 Γονοτύπιση.....	33
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Αναλογία φύλων.....	35
3.2 Σχέση μήκους – βάρους.....	36
3.3 Γενετική ποικιλότητα μικροδορυφορικών δεικτών.....	38
3.4 Γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών.....	42
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	i

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πρόβλημα των θαλασσιών βιολογικών πόρων γίνεται όλο και περισσότερο σύνθετο και μόνο η συστηματική διερεύνησή του θα συμβάλει στην ορθή διαχείρισή τους. Με τον όρο θαλάσσιοι βιολογικοί πόροι εννοούμε, κυρίως, τον τομέα της αλιείας, ενώ πρόσφατα έχει περιληφθεί στην κατηγορία αυτή και ο τομέας των υδατοκαλλιεργειών.

Πολλά σημαντικά εμπορικά ιχθυοαποθέματα έχουν πληγεί ανεπανόρθωτα. Η αειφορική διαχείριση των ιχθυοαποθεμάτων έχει ως σκοπό την εξασφάλιση της διατήρησης των πόρων. Τα επιστημονικά δεδομένα που απαιτούνται για τη διαχείριση των ιχθυοπληθυσμών περιλαμβάνουν, κυρίως, την αφθονία των πληθυσμών καθώς και πληροφορίες για τη δυναμική τους, αλλά και τη γενετική δομή τους.

Το υλικό που μελετήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν πληθυσμοί του είδους, *Diplodus sargus* (Εικ. 1).

Ο σαργός, *Diplodus sargus*, ανήκει στην Οικογένεια Sparidae και ταξινομείται ως εξής (Linnaeus, 1758):

Ομοταξία: Osteichthyes

Υφομοταξία: Acanthopterygii

Υπέταξη: Teleostei

Τάξη: Perciformes

Υπόταξη: Percoides

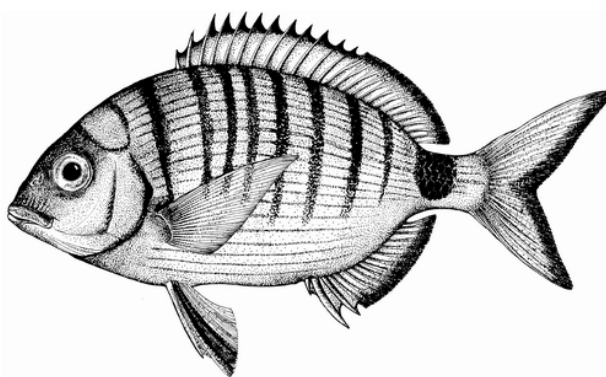
Οικογένεια: Sparidae

Η οικογένεια Sparidae περιλαμβάνει πολλά ψάρια των ελληνικών θαλασσών, με μεγάλο εμπορικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον (τσιπούρες, λιθρίνια, σπάροι, μουρμούρες, μελανούρια κ.λπ.).

Έχουν σώμα ωοειδές, πιεσμένο στα πλάγια και μεγάλα πτερύγια. Το πτερύγιο της ουράς είναι πάντοτε διχαλωτό και το ραχιαίο αποτελείται από δύο τμήματα, το μπροστινό με σκληρές ακτίνες και το πίσω με μαλακές. Είναι από τα λίγα ψάρια που

έχουν διαφοροποιημένα δόντια (κοπήρες, κυνόδοντες, τραπεζίτες) (Παπαναστασίου, 1976).

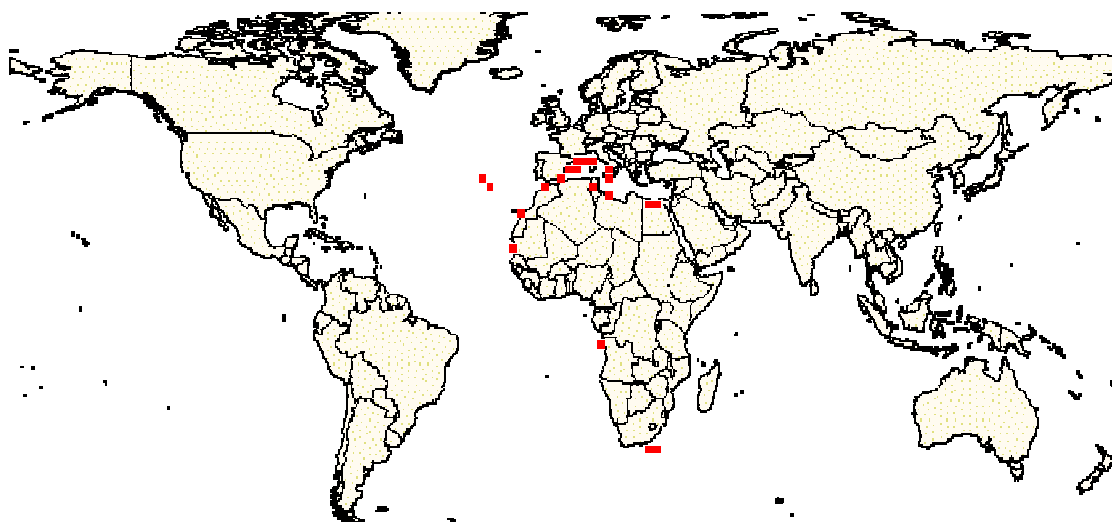
Στην πλειοψηφία τους είναι ερμαφρόδιτα ψάρια (πρωτανδρικά ή πρωτογύναια, ανάλογα με το είδος). Η οικογένεια Sparidae περιλαμβάνει 29 γένη με πληθώρα ειδών.



Εικόνα 1. Σαργός, *Diplodus sargus*

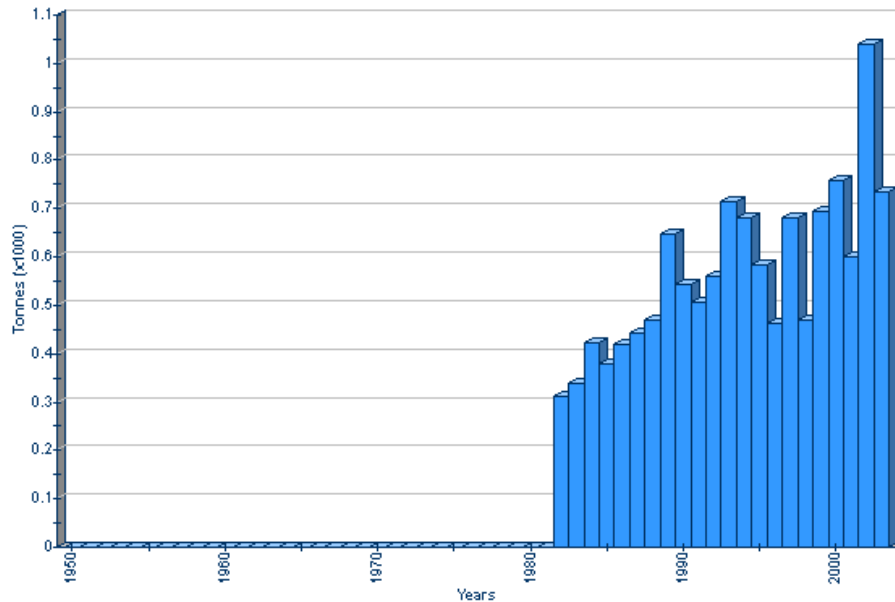
Ο σαργός συναντάται στις ακτές του Ατλαντικού, από το Βискаϊκό κόλπο μέχρι το Πράσινο ακρωτήριο και τα Κανάρια νησιά, καθώς επίσης και στη Μαδέρα. Στη Μεσόγειο είναι κοινό είδος αλλά σπάνια συναντάται στη Μαύρη θάλασσα (Παπαναστασίου, 1976).

Στον χάρτη που ακολουθεί διακρίνεται η εξάπλωση του σαργού παγκοσμίως (Εικ. 2).

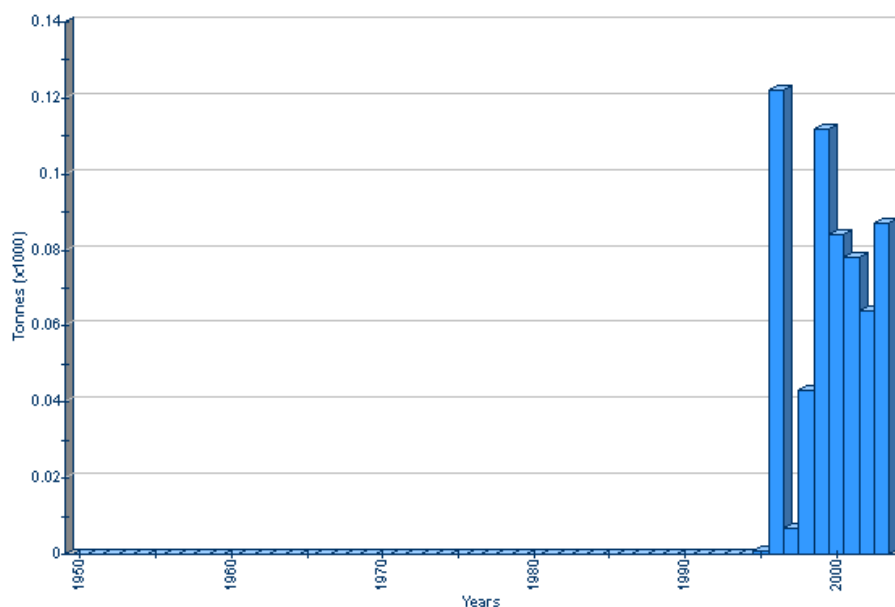


Εικόνα 2. Γεωγραφική εξάπλωση του σαργού σε παγκόσμια κλίμακα.

Σύμφωνα με στοιχεία του FAO (Food and Agriculture Organization) η παγκόσμια παραγωγή του σαργού τα τελευταία 50 χρόνια αποτυπώνεται στα παρακάτω διαγράμματα (Σχ. 1 και Σχ. 2 αντίστοιχα).



Σχήμα 1. Παγκόσμια παραγωγή του είδους *Diplodus sargus* (FAO Fishery Statistic, 2000-2005).



Σχήμα 2. Παγκόσμια παραγωγή σε υδατοκαλλιέργεια του είδους *Diplodus sargus* (FAO Fishery Statistic, 2000-2005).

Στο Σχήμα 1 παρατηρείται μία σημαντική αύξηση της παραγωγής από το 1980 μέχρι το 2003 πάνω από το 50% ενώ τα προηγούμενα χρόνια ήταν σε μηδενική βάση. Στο Σχήμα 2 διαφαίνεται μία τάση παραγωγής του σαργού σε υδατοκαλλιέργεια από το 1995 και μετά, όχι όμως τόσο σημαντική.

1.1 Ρυθμός αύξησης

Η μελέτη της αύξησης παρέχει βασικές παραμέτρους που είναι απαραίτητες στην εφαρμογή των αναλυτικών μοντέλων προκειμένου να εκτιμηθεί η κατάσταση του ιχθυαποθέματος. Τα συνήθη μοντέλα εκτίμησης της κατάστασης των ιχθυαποθεμάτων εφαρμόζονται με βάση ότι ισχύουν ορισμένες προϋποθέσεις. Μία από αυτές είναι η σταθερότητα του αριθμού των νεοεισερχόμενων ατόμων στην αλιευτική φάση.

Ο όρος ανάπτυξη (growth) στους ζωικούς οργανισμούς υποδηλώνει αλλαγές στο μέγεθός τους. Η μεταβολή αυτή αναφέρεται είτε στο μήκος του ζωικού οργανισμού είτε σε άλλες φυσικές διαστάσεις του, περιλαμβανομένου του όγκου, του βάρους, της μάζας, ή ακόμη και ολόκληρου του μεγέθους του σώματός του με όλες τις ιστολογικές και κυτταρολογικές αλλαγές (πρωτεΐνες, λίπη κ.λπ). Όλα τα επιμέρους χαρακτηριστικά της ανάπτυξης των ψαριών εμπλέκονται στη βιολογία τους και γενικότερα στην οικολογία και τη διαχείρισή τους. Από πολλούς ερευνητές η ταχύτητα αύξησης των ψαριών ονομάζεται και ρυθμός αύξησης (growth rate) (Νεοφύτου, 1997).

Η συνολική αύξηση των ψαριών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι:

- α) Η αφθονία και το μέγεθος της τροφής.
- β) Ο συνολικός αριθμός (πληθυσμός) των ψαριών που χρησιμοποιεί ένα συγκεκριμένο είδος τροφής.
- γ) Οι φυσικοί παράγοντες (θερμοκρασία, οξυγόνο κ.λπ).
- δ) Το μέγεθος και η ηλικία των ψαριών.
- ε) Η αναπαραγωγική ωρίμανση.

Εάν όλοι οι παραπάνω παράγοντες μπορούν να εκτιμηθούν με ακρίβεια, τότε είναι δυνατή η ακριβής περιγραφή της συνολικής αύξησης των ψαριών. Αυτό όμως πρακτικά είναι αδύνατο. Για αυτό γίνεται προσπάθεια στις διάφορες μελέτες να μετρηθούν όσο το δυνατό περισσότεροι παράγοντες, ώστε να υπάρξει η μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια (Νεοφύτου, 1997) .

1.1.1. Εκτίμηση της ηλικίας των ψαριών από τους ωτολίθους

Οι ωτόλιθοι είναι συστατικά του λαβυρίνθου και σχετίζονται μεταξύ των άλλων και με την ηλικία του ψαριού. Το μέγεθος των ωτολίθων ποικίλει από είδος σε είδος.

Υπάρχουν τρία ζεύγη ωτολίθων σε κάθε ψάρι. Για την εκτίμηση της ηλικίας χρησιμοποιείται το ζευγάρι με το μεγαλύτερο μέγεθος που ονομάζεται «τοξοειδής» (*sagittae*) (Νεοφύτου, 1997). Ο τοξοειδής ωτόλιθος φαίνεται με γυμνό μάτι, έχει άσπρο χρώμα και είναι κοίλος από τη μία πλευρά του και κυρτός από την άλλη.

Η χρησιμοποίηση των ωτολίθων για την εκτίμηση της ηλικίας των ψαριών παρουσιάζει ορισμένα βασικά πλεονεκτήματα, όπως:

- Σχηματίζονται κατά την περίοδο της εμβρυακής ανάπτυξης και επομένως περιλαμβάνεται όλη η ανάπτυξη του ψαριού.
- Σε πολλά είδη ψαριών οι ετήσιοι δακτύλιοι είναι περισσότερο εμφανείς σε σύγκριση με τα λέπια.

Το κυριότερο μειονέκτημα είναι ότι για να χρησιμοποιηθούν πρέπει να θανατωθεί το ψάρι. Το πρόβλημα αυτό είναι ακόμη μεγαλύτερο όταν πρόκειται να μελετηθούν σπάνια είδη ψαριών των οποίων ο πληθυσμός βρίσκεται σε κρίσιμο σημείο.

Όλα τα ψάρια του ίδιου είδους έχουν ωτόλιθους περίπου ομοιόμορφου σχήματος. Οι ωτόλιθοι αποτελούνται από ανόργανο υλικό, όπως κρύσταλλοι ανθρακικού ασβεστίου (αραγωνίτης) οι οποίοι βρίσκονται μέσα σε οργανικό υλικό πρωτεϊνικής σύστασης ινώδους μορφής, γνωστής ως ωτολίνη (otolin). Η εμφάνιση διαφανών και αδιαφανών δακτυλίων ή ζωνών οφείλεται στην εναλλακτική διαφοροποίηση της ποσοτικής αναλογίας αυτών των δύο στοιχείων (Morales-Nin, 1987). Οι αδιαφανείς περιοχές (με προσπίπτοντα φωτισμό στο οπτικό μικροσκόπιο) αντιστοιχούν σε περιόδους ταχείας ανάπτυξης του ψαριού, οπότε εναποτίθεται περισσότερος αραγωνίτης στην επιφάνεια του ωτόλιθου (ICSEAF, 1986). Αυτή η

περιοδικότητα είναι περισσότερο έντονη σε ψάρια που ζουν σε ψυχρές και εύκρατες περιοχές (Panella, 1974).

Οι ετήσιοι δακτύλιοι σχετίζονται με τις εναλλαγές στην αύξηση που επιταχύνεται ή επιβραδύνεται κατά την πορεία του βιολογικού κύκλου του ψαριού. Παρόλα αυτά δεν είναι γνωστή η αιτία σχηματισμού τους. Όμως φαίνεται ότι ο σχηματισμός των ετησίων δακτυλίων ελέγχεται γενετικά, εφόσον άτομα τα οποία διατηρήθηκαν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και αλατότητας, σχημάτισαν δακτυλίους. Παράγοντες, όπως απότομες αλλαγές της θερμοκρασίας, ασθένειες, έλλειψη τροφής ή μετακινήσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του δακτυλίου ή αποτελούν τις αιτίες σχηματισμού ψευδοδακτυλίων, οι οποίοι «διακόπτουν» τη συνοχή της αυξητικής ζώνης. Επίσης ο σχηματισμός ψευδοδακτυλίων αντικατοπτρίζει μικρής διάρκειας διαταραχές στη διατροφή.

1.2 Γενετικός πολυμορφισμός

Εκτός από το ρυθμό αύξησης, σημαντικό ρόλο στη διαχείριση και προστασία των αλιευτικών πηγών διαδραματίζει ο προσδιορισμός των διαφορετικών ιχθυοαποθεμάτων και η γνώση της γενετικής τους δομής. Τις περισσότερες φορές τα είδη αυτά παρουσιάζουν εκτεταμένη γεωγραφική εξάπλωση και ίσως να αποτελούνται από διαφορετικούς πληθυσμούς με διαφορετικά πεδία αναπαραγωγής. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει στη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών. Τα τελευταία χρόνια, η πληρέστερη κατανόηση της αξίας των γενετικών δεδομένων καθώς και η αύξηση των διαθέσιμων μοριακών τεχνικών οδήγησε στην περιγραφή της γενετικής ποικιλότητας των πληθυσμών.

Η εξέλιξη των ειδών βασίζεται στην ποικιλότητα των ζωντανών οργανισμών. Αυτή είναι η ουσία της εξελικτικής βιολογίας που τη διακρίνει από τις άλλες επιστήμες. Πολλοί χαρακτήρες εμφανίζουν ευδιάκριτους φαινοτύπους. Οι χαρακτήρες αυτοί ονομάζονται **ποιοτικοί** και ελέγχονται γενετικά από ένα γονίδιο ή από ένα μικρό αριθμό γονιδίων. Όμως οι περισσότεροι χαρακτήρες εμφανίζουν μία συνεχή ποικιλότητα και ονομάζονται **ποσοτικοί** ή **μετρικοί χαρακτήρες**. Οι χαρακτήρες αυτοί ελέγχονται συνήθως από ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων (Λουκάς, 2003).

Περιστασιακά εντοπίζονται πληθυσμοί με δύο ή περισσότερους διαφορετικούς, διακριτούς φαινοτύπους που είναι αρκετά κοινοί μεταξύ των ατόμων. Όταν υπάρχει ένας δεύτερος τουλάχιστον φαινότυπος με συχνότητα που υπερβαίνει κάποια αυθαίρετη τιμή, μιλάμε για κατάσταση **πολυμορφισμού** (polymorphism). Ο απλούστερος τύπος πολυμορφισμού που αφορά σε δύο ευδιάκριτες μορφές είναι ο διμορφισμός. Μερικοί πολυμορφισμοί είναι **εξισορροπημένοι** με την έννοια ότι οι αλληλόμορφοι των γόνων που τους ελέγχουν βρίσκονται σε μία σταθερή ή ενδιάμεση συχνότητα. Ένας σύνθετος εξισορροπημένος πολυμορφισμός έχει μελετηθεί στο χερσαίο σαλιγκάρι, *Cepaea nemoralis*, στο οποίο το χρώμα του κελύφους είναι καφέ ή ροζ ή κίτρινο και υπάρχουν από μηδέν έως πέντε ζώνες στο κέλυφος, ο αριθμός των οποίων ελέγχεται από αρκετούς γενετικούς τόπους. Σε ορισμένες περιπτώσεις η αντικατάσταση αλληλομόρφων γίνεται κατά την παρατήρηση του πληθυσμού. Οι πολυμορφισμοί αυτοί ονομάζονται **μεταβατικοί** (transitional). Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταβατικού πολυμορφισμού είναι η μελανιστική μορφή της νυχτοπεταλούδας, *Biston betularia*, η οποία μετά το 1895 έφτασε σε ορισμένους πληθυσμούς στην Αγγλία συχνότητα 98% (Kettlewell, 1973: Bishop and Cook, 1980).

Η ανίχνευση της γενετικής ποικιλομορφίας μπορεί να γίνει:

- α) Με την **ηλεκτροφορητική τεχνική**
- β) Με **υβριδοποίηση του DNA**
- γ) Με τη χρήση **ενζύμων περιορισμού** και άλλες μεθόδους.

Παρόλο που έχει γίνει σημαντική έρευνα στη μελέτη της βιολογίας, της ηθολογίας και της ανάπτυξης του *Diplopus sargus* στη Μεσόγειο (Wassef, 1985: AbouSeedo, Wright and Clayton, 1990: Micale and Perdichizzi, 1994: Macpherson et al., 1997), στον τομέα της γενετικής δομής η γνώση είναι ακόμη περιορισμένη.

Η διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας αποτελεί ένα ουσιώδες συστατικό στα διαχειριστικά προγράμματα πολλών ειδών. Η γενετική ποικιλότητα είναι εκείνος 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 το 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.

Στην παρούσα εργασία μελετάται ένα είδος γενετικού δείκτη που βρίσκει τεράστια εφαρμογή τα τελευταία χρόνια στον τομέα της γενετικής πληθυσμών και είναι οι μικροδορυφορικοί δείκτες.

Πρόκειται για μία σχετικά νέα τεχνική που χαρακτηρίζεται από υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού (Jarne and Lagoda, 1996) και την ικανότητα να ανιχνεύει γενετική διαφοροποίηση σε υποπληθυσμούς (Shaw et al., 1999; Hoarau et al., 2004). Επιπλέον, απαιτεί σχετικά λιγότερα δείγματα για ανάλυση από ότι η πρωτεϊνική, αλλοενζυμική ή ισοενζυμική ηλεκτροφόρηση.

Οι μικροδορυφόροι είναι σύντομες αλληλουχίες του DNA στις οποίες επαναλαμβάνεται ένα μοτίβο από 1 έως 6 bp, συχνά πάνω από 60 φορές (Εικ. 3). Διακρίνονται σε:

- **Mononucleotide SSR (A)11** AAAAAAAAAAAA
- **Dinucleotide SSR (GT)6** GTGTGTGTGTGT
- **Trinucleotide SSR (CTG)4** CTGCTGCTGCTG
- **Tetranucleotide SSR (ACTC)4** ACTCACTCACTCACTC

Επίσης διακρίνονται σε:

- **Ομοζύγωτοι** της μορφής:

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTG...

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTG...

5' συμπιεσμένη περιοχή **μικροδορυφόρος** 3' συμπιεσμένη περιοχή

- **Ετεροζύγωτοι** της μορφής:

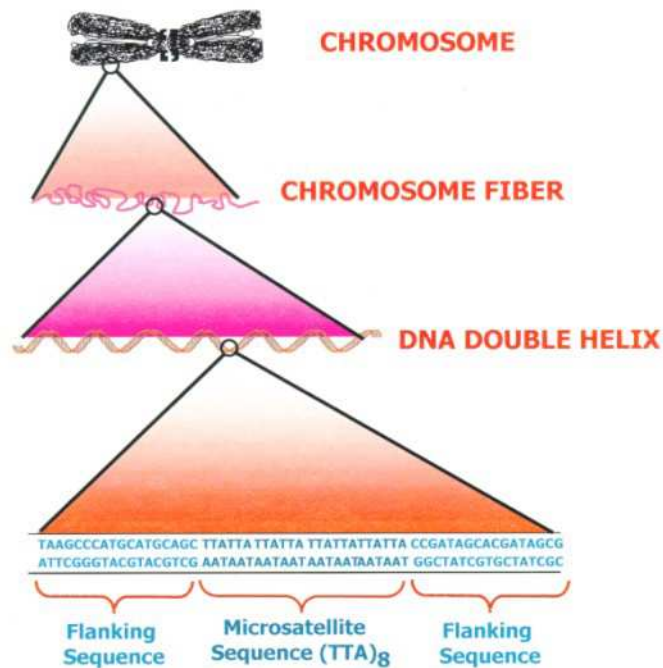
...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTACTACGTG...

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTACT...

5' συμπιεσμένη περιοχή **μικροδορυφόρος** 3' συμπιεσμένη περιοχή

Προσφέρουν ουσιαστική ποικιλότητα αλληλομόρφων σε ένα μεγάλο αριθμό γενετικών τόπων, κατανέμονται σε όλο το γένωμα και κληρονομούνται με το Μενδελικό 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 ως τους πιο χρήσιμους μοριακούς δείκτες στη μελέτη της γενετικής των πληθυσμών (Wright, 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 et al., 1998).



Εικόνα 3. Ανατομία ενός μικροδορυφόρου

Οι μικροδορυφόροι έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε ένα μεγάλο αριθμό παριών 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.

Οι πρώτες μοριακές τεχνικές για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και της δομής των θαλάσσιων ειδών άρχισαν να εφαρμόζονται στα ψάρια το 1950. Οι αρχικές μελέτες, οι οποίες εκπονήθηκαν σε τόνους, σαλμονοειδή και μουρούνες (De Ligny, 1969) αφορούσαν σε παραλλαγές των ομάδων αίματος και παρατηρήθηκε γενετικά ελεγχόμενος πολυμορφισμός, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις δομής των πληθυσμών.

Στη συνέχεια, οι επιστήμονες στράφηκαν προς τη χρήση των μεθόδων ηλεκτροφόρησης οι οποίες αποκάλυπταν γενετικά καθορισμένους πρωτεϊνικούς πολυμορφισμούς. Σε αυτές στηρίχθηκε ο Sick (1961) για να περιγράψει τις μεταβολές

της αιμοσφαιρίνης στο ταούκι (*Gadus morhua*). Ο Harris (1966) και οι Lewontin and Hubby (1966) απέδειξαν ότι ο άνθρωπος και η φρουτόμυγα (*Drosophila pseudoobscura*) αντίστοιχα ήταν πολυμορφικοί για διάφορα ισοένζυμα, τα οποία ανιχνεύονταν μετά από ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση ενζύμων παραμένει η πιο γρήγορη, απλή και χαμηλού κόστους τεχνική για μελέτες πληθυσμών, όπου εξετάζονται μεγάλοι αριθμοί δειγμάτων ψαριών. Παρόλα αυτά, οι τεχνικές αυτές παρέχουν υψηλή ανάλυση της γενετικής δομής μεταξύ των ειδών. Για την ανίχνευση πολυμορφισμών όπως για παράδειγμα η χαρτογράφηση γόνου ή αναγνώριση των ειδών, εφαρμόζεται η τεχνική PCR-RAPD (Exadactylos et al. 2003).

Μέχρι σήμερα στο είδος *Diplodus sargus* έχει εφαρμοστεί η πρωτεϊνική ηλεκτροφόρηση. Οι Lenfant and Planes (1996) εφάρμοσαν τη μέθοδο αυτή σε 190 άτομα του είδους *Diplodus sargus* με σκοπό να μελετήσουν τη γενετική δομή τους. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν σημαντικές γενετικές διαφορές ανάμεσα σε τρεις περιοχές δειγματοληψίας.

Οι ίδιοι ερευνητές (Planes and Lenfant, 2002) εφάρμοσαν την ίδια τεχνική και στη Μεσόγειο θάλασσα, έξι χρόνια αργότερα, επιδιώκοντας να μελετήσουν τη γενετική ποικιλότητα του είδους *Diplodus sargus* σε σχέση με τις κλάσεις ηλικίας. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν αποδόθηκαν σε πολύπλοκες διαδικασίες επιλογής ή στη γενετική απόσταση.

Παρόμοια μελέτη πραγματοποίησαν οι Planes and Lenfant (2002) η οποία συνδυάστηκε με την εκτίμηση της δημογραφικής δομής του ιχθυοπληθυσμού. Η πρωτεϊνική ηλεκτροφόρηση αποκάλυψε σημαντική γενετική διαφοροποίηση σε όλες τις κλάσεις ηλικίας ενώ εντοπίστηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας και της αφθονίας στις κλάσεις ηλικίας.

Ο Lenfant (2002) μελέτησε τις σχέσεις γενότυπου - φαινοτύπου σε ένα ιχθυοπληθυσμό του σαργού προερχόμενο από τη Μεσόγειο θάλασσα. Η μελέτη των 17 πολυμορφικών τόπων έδειξε σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της γενετικής δομής, της ηλικιακής κατανομής των θηλυκών ατόμων και των περιόδων ωοτοκίας.

Οι Gonzalez-Wanguemert et al (2004) με τη χρησιμοποίηση της ίδιας μεθόδου σε 1.249 άτομα του είδους *Diplodus sargus* εντόπισαν υψηλού βαθμού γενετικό

πολυμορφισμό ενώ ορισμένοι από τους πληθυσμούς χαρακτηρίζονταν από μοναδικά αλληλόμορφα.

Σε μία πιο πρόσφατη έρευνα, οι [Bargelloni et al. \(2005\)](#) εξέτασαν δείγματα πληθυσμών του είδους σε μια ευρεία γεωγραφική κλίμακα χρησιμοποιώντας mtDNA και αλλοένζυμα, όπου παρουσιάστηκαν διαφορές στη πληθυσμιακή δομή και ερμηνεύθηκαν ως συνέπεια διακυμάνσεων στο δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος και πληθυσμιακών αυξομειώσεων, που ενδεχομένως συνδυάστηκε με τις παρούσες διαφορές στα επίπεδα γονιδιακής ροής.

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 et al., 1998](#)). Τέτοιου είδους τεχνικές όπως οι RAPD και οι μικροδορυφόροι έχουν 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](#); [Estoup et al., 1998](#); [Olsen et al., 1998](#); [Wenbug et al., 1998](#); [Bouza et al., 1999](#)), το πραγματικό μέγεθος του πληθυσμού και οι περιοδικές αλλαγές στη συχνότητες των αλληλομόρφων ([Jorde and Ryman, 1996](#)) καθώς και οι μακροχρόνιες αλλαγές στους πληθυσμούς ([Nielsen et al., 1997, 1999](#)) έχουν μελετηθεί με την εφαρμογή των μικροδορυφόρων ([Was, 2002](#)).

Ο σολομός του Ατλαντικού έχει επίσης μελετηθεί με τη βοήθεια των μικροδορυφόρων. Οι [McConnell et al. \(1995a\)](#), σε μια προκαταρκτική μελέτη των πληθυσμών και στις δυο πλευρές του Ατλαντικού έδειξαν σημαντικές διαφορές στις αλληλομορφικές συχνότητες ανάμεσα στους πληθυσμούς της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής. Το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι και άλλες μοριακές τεχνικές όπως το μιτοχονδριακό DNA και οι μινιδορυφόροι είχαν δώσει παρόμοια αποτελέσματα ([Taggart et al., 1995b](#)). Ακόμη και πρόσφατα, οι

μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί εντατικά σε μελέτες σολομοειδών (O'Connell and Wright, 1997).

Ωστόσο, το πιο συχνά μελετούμενο είδος με τη βοήθεια των μικροδορυφόρων είναι ο βακαλάος του Ατλαντικού. Οι Brooker et al. (1994) πρώτοι περιέγραψαν τις γενετικές θέσεις για το συγκεκριμένο είδος αποκαλύπτοντας συγχρόνως υψηλά επίπεδα ποικιλότητας. Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα είδη στα οποία έχουν εφαρμοστεί οι μικροδορυφόροι.

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες έχουν εφαρμοστεί και σε είδη της οικογένειας Sparidae και ειδικότερα στο είδος *Sparus aurata*. Οι Alarcon et al (2004) μελέτησαν για το συγκεκριμένο είδος Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς φυσικών πληθυσμών και καλλιεργούμενων ατόμων με τη βοήθεια μικροδορυφορικού DNA, μιτοχondριακού DNA και ισοενζύμων. Τα αποτελέσματα σημαντικού γενετικού πολυμορφισμού ήταν περισσότερο εμφανή με τη χρήση των μικροδορυφόρων.

Το ίδιο είδος (*Sparus aurata*) μελετήθηκε και από τους Brown et al. (2005) χρησιμοποιώντας άλλους μικροδορυφορικούς δείκτες. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε υψηλό επίπεδο ετεροζυγωτίας επιβεβαιώνοντας αποτελέσματα προηγούμενων μελετών στο ίδιο είδος.

Πρόκειται για το αγαπημένο εργαλείο στη διαχείριση ιχθυοαποθεμάτων, στην ανάλυση πληθυσμών ιχθύων και στην διατήρηση της βιοποικιλότητας.

Πίνακας 1. Είδη στα οποία μελετήθηκε μικροδορυφορικό DNA.

Είδος	Πηγή
Atlantic cod, <i>Gadus morhua</i>	Brooker et al. (1994), Ruzzante et al. (1996)
Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i>	Slettan et al. (1993, 1995a,b), McConnell et al. (1995b), O'Reily et al. (1996), Langefors (2005), Artieri et al. (2006)
Bluegill sunfish, <i>Lepomis macrochirus</i>	Colbourne et al. (1996)
Brown trout, <i>Salmo trutta</i>	Estoup et al. (1993)
Brook charr, <i>Salvelinus fontinalis</i>	Angers et al. (1995)
Koi carp, <i>Cyprinus carpio</i>	Grobler et al. (2005)
Lobster, <i>Homarus americanus</i>	Crivello et al. (2005)
Pacific abalone (<i>Haliotis discus hannai</i>)	Li et al. (2005)
Pacific salmonids, <i>Oncorhynchus</i> spp.	O'Connell et al. (1996a), Scribner et al. (1996)
Pacific herring, <i>Clupea harengus pallasii</i>	O'Connell et al. (1996b), Jorgensen et al. (2005)
Sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i>	Garcia de Leon et al. (1995)
Silver barb, <i>Puntius gonionotus</i>	Kamonrat (1996)
Stickleback, <i>gasterosteus aculeatus</i>	Rico et al. (1993)
Tilapia, <i>Oreochromis</i> spp.	Ambali (1996), Lee and Kocher (1996)
Whiting, <i>merluccius merluccius</i>	Rico et al. (1996), Castillo et al. (2005)
Zebrafish, <i>Brachydanio rerio</i>	Goff et al. (1992)

1.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA - στόχου) από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος (Saiki et al., 1988). Στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένου, δίκλωνου DNA. Μάλιστα, στην αρχή ο χρόνος επανασύνδεσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμβαλλόμενων συμπληρωματικών αλυσίδων, που περιέγραψαν ερευνητές στα τέλη της δεκαετίας του '60.

Η PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985. Σήμερα αντιμετωπίζεται ως μία από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA. Το 1993, ο Dr K. Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για τη συμβολή του στην ανάπτυξη της PCR. Μέχρι το 1993, η PCR είχε χρησιμοποιηθεί σε περισσότερες από 7.000 επιστημονικές εργασίες.

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

1. ειδικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase) που απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο, *Thermus aquaticus*, και είναι θερμοσταθερή, διατηρώντας τη δραστηριότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95°C.
2. ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (15-30 βάσεων) που ονομάζονται εκκινητικά μόρια (primers).
3. κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5'τριφωσφορικών δεοξυριβοζο-νουκλεοτιδίων (dNTPs).
4. κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂.
5. ειδικού διαλύματος για την Taq πολυμεράση.
6. μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας.

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA-στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (Σχ. 3). Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο της θερμικής επαναδιάταξης του DNA κατά την οποία τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 15-30 βάσεων, συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου. Τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια ονομάζονται εκκινητικά μόρια ή οδηγοί ή «primers». Παρουσία θερμοσταθερής DNA

πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων, κατά το τρίτο στάδιο, λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA με το διπλασιασμό του DNA-στόχου. Τα τρία αυτά στάδια α) μετουσίωση-αποδιάταξη (denaturation), β) υβριδισμού-πρόσδεσης των εκκινητών επί των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου (annealing) και γ) επέκτασης-σύνθεσης των προσδεδωμένων εκκινητών αποτελούν έναν κύκλο της τεχνικής της PCR.

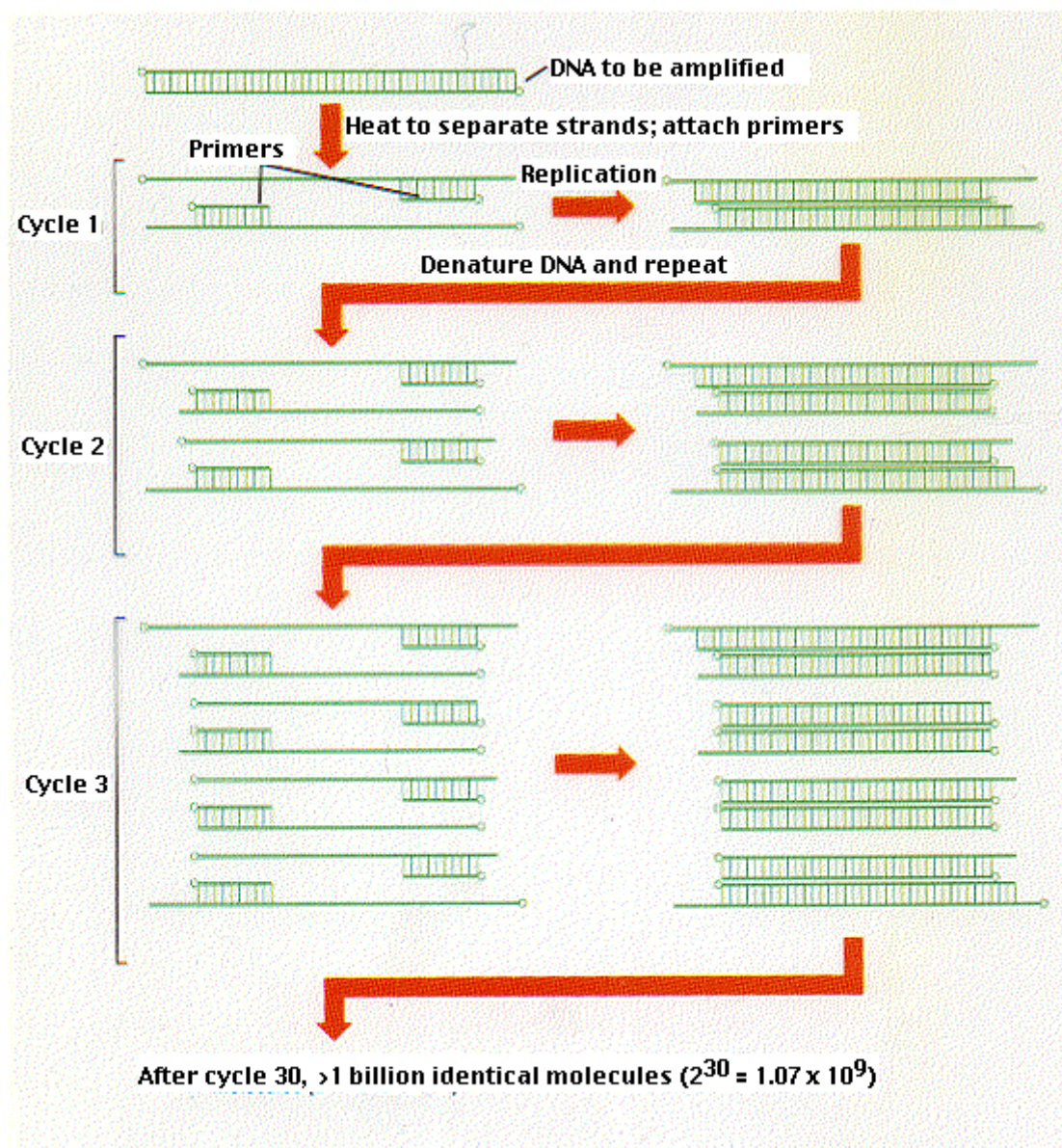
Ο πρώτος κύκλος της PCR αποδίδει 4 κλώνους DNA (δύο του αρχικού υποστρώματος και δύο αντίγραφα) που αποτελούν πρότυπα καλούπια για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA - στόχου στον 2^ο κύκλο. Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι θα αυξάνονται εκθετικά κατά 2ⁿ όπου n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία στάδια αποδιάταξης, υβριδισμού και πολυμερισμού. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 92-95°C για 30 περίπου δευτερόλεπτα, ο υβριδισμός σε θερμοκρασία 50-65°C για 1-2 λεπτά, ανάλογα με την περιεκτικότητα των οδηγών σε A/T, G/C και ο πολυμερισμός στους 70-78° C για 1-2 λεπτά. Οι εναλλαγές στη θερμοκρασία πραγματοποιούνται ταχύτατα με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών (PCR thermal cycler).

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

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

Επιθυμητές T_m κυμαίνονται μεταξύ 55-65°C. Όσον αφορά τη θερμοκρασία επαναδιάταξης (T_a), συνήθως, είναι μικρότερη της T_m .



Σχήμα 3. Τα τρία στάδια της τεχνικής PCR.

Η PCR ολοκληρώνεται 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 παράγονται 2^{25} αντίγραφα, ενώ μετά από 40 κύκλους παράγονται 2^{40} αντίγραφα DNA-στόχου.

1.3.1 Χαρακτηριστικά και σημασία της τεχνικής PCR

Το κύριο χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής είναι η τεράστια ευαισθησία της. Χρησιμοποιώντας ραδιενεργό σήμανση του μορίου ανιχνευτή (probe), είναι δυνατή η ανίχνευση έως 1 pg probe. Με την τεχνική της επαναεντοπισμένης PCR (nested PCR), η ευαισθησία αυξάνεται στο 1 fg. Στην τεχνική αυτή 1-2 μl του προϊόντος της PCR, υποβάλλονται σε 2^η PCR με νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων, εσωτερικό των αρχικών (inner primers) με αποτέλεσμα όταν η πρώτη PCR γίνει για 25 κύκλους και το προϊόν της υποβληθεί σε επαναεντοπισμένη PCR για ακόμα 25 κύκλους, να παράγονται 1.1×10^{15} αντίγραφα DNA-στόχου. Θεωρητικά, η επαναεντοπισμένη PCR έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει 1 αντίγραφο προϊόντος HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) σε 1×10^6 κύτταρα.

Πιθανή επιμόλυνση της PCR είναι εύκολο να οδηγήσει και σε ψευδή θετικά αποτελέσματα. Αυτό είναι αποτέλεσμα της μεγάλης ευαισθησίας της τεχνικής. Η επιμόλυνση είναι δυνατό να προκληθεί από αιωρούμενο DNA στο χώρο εργασίας. Η αποτελεσματική πρόληψη των επιμολύνσεων απαιτεί προσεκτική προετοιμασία των χώρων εκτέλεσης της τεχνικής. Για τη μείωση των επιμολύνσεων συνιστάται: α) χρήση διαφορετικών χώρων επεξεργασίας των δειγμάτων και διεξαγωγής των αντιδράσεων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις διαδοχικών PCR, β) χρησιμοποίηση διαφορετικών συσκευών καθέτου νηματικής ροής και γ) αποστείρωση αντιδραστηρίων και σωληναρίων, προσεκτικός καθαρισμός πιπετών με αιθανόλη και έκθεση του χώρου ή των χώρων εργασίας σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μετά το τέλος της εργασίας για τουλάχιστον 12 ώρες. Για να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, σε κάθε αντίδραση PCR, καλό είναι να υπάρχουν πολλοί μάρτυρες και να μην αξιολογείται ένα δείγμα ως θετικό αν δεν επαληθευθεί και επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα δύο τουλάχιστον φορές με 2 διαφορετικά ζεύγη οδηγών.

Η επιλογή του προς επέκταση στόχου καθώς και ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και ανιχνευτών έχει μεγάλη σημασία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ανίχνευσης ποικιλιών ιών όπως ο HIV ή γονιδιακών περιοχών έντονων ανακατανομών και μεταλλαξιμότητας, όπως διάφορων εύθραυστων αυτοσωματικών περιοχών, των ψευδοσωματικών περιοχών του Y χρωμοσώματος και άλλα. Στην περίπτωση θετικών δειγμάτων, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα από τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, η ευαισθησία και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου μπορεί να

υπερβεί και το 97 %. Αυτό συμβαίνει, για παράδειγμα, στην επέκταση διαφορετικών γονιδιακών περιοχών.

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι απλή, γρήγορη και μπορεί να πραγματοποιηθεί με ελάχιστες ποσότητες ιστού χωρίς να απαιτείται η θανάτωση του ζώου. Είναι δυνατό να εφαρμοστεί σε DNA το οποίο προέρχεται από στεγνό ιστό προσκολλημένο σε ιστορικές συλλογές ωτολίθων και να προσδιοριστούν γενετικές δομές παρελθοντικών πληθυσμών.

Από τη στιγμή που θα πολλαπλασιαστούν τα τμήματα του DNA, μπορούν να αναλυθούν με πολλές εργαστηριακές τεχνικές. Για παράδειγμα, οι περισσότερες τεχνικές της χαρτογράφησης του DNA που χρησιμοποιούνται στην αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) στηρίζονται πάνω στην τεχνική PCR. Επίσης, η PCR είναι πολύ χρήσιμη σε πολλές καινούριες μεθόδους, όπως το DNA FingerPrinting, η διάγνωση βακτηριδίων και ιών και η διάγνωση γενετικών ανωμαλιών. Η δύναμη της PCR είναι τέτοια που είναι δυνατόν να γίνει ανάλυση από το γενετικό υλικό ενός και μόνο κυττάρου.

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται στη Βιοϊατρική, τη Βιοτεχνολογία και το βιολογικό έλεγχο του περιβάλλοντος. Η ταχύτατη διεθνοποίηση του όρου PCR σε σχεδόν ισότιμο των όρων DNA και RNA επιβεβαιώνει την τεράστια σημασία αυτής της τεχνικής.

1.4 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι η περισσότερο διαδεδομένη τεχνική ανίχνευσης πολυμορφισμών. Πρόκειται για μία μέθοδο με την οποία διαχωρίζονται μακρομόρια (πρωτεΐνες ή κομμάτια νουκλεϊκών οξέων) με βάση διαφορές στην κινητικότητα που οφείλονται στο μέγεθός τους, τη στερεοδιάταξή τους και το ολικό φορτίο τους. Κυρίως χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό τμημάτων DNA που έχουν προκύψει μετά από επεξεργασία με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Τα δείγματα DNA τοποθετούνται σε μια χαραγή που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο μιας πλάκας από πήκτωμα αγαρόζης και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους (Σχ. 4). Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο, καθώς

αποτελούνται από νουκλεοτίδια που είναι αρνητικά φορτισμένα (η φωσφορική ομάδα λόγω απόδοσης πρωτονίων φέρει αρνητικό φορτίο). Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος εξαρτάται από το μέγεθος του (τα μεγάλα θραύσματα κινούνται αργότερα από τα μικρά) σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα θραύσματα κινούνται πιο γρήγορα έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνηση τους προς το θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους.

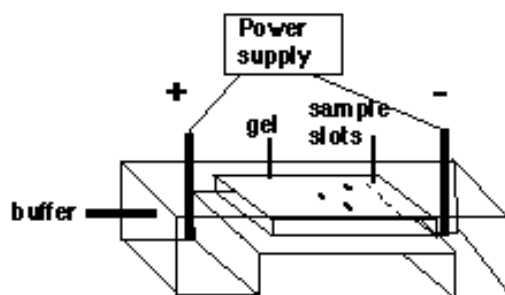
Με τη μέθοδο αυτή τα θραύσματα που έχουν προκύψει από την επεξεργασία ενός μορίου DNA με μια περιοριστική ενδονουκλεάση διαχωρίζονται με βάση την απόσταση που έχουν διανύσει από την άνοδο. Η σύγκριση της απόστασης που διένυσαν τα θραύσματα που έχουν προκύψει, με την απόσταση που διανύουν θραύσματα γνωστού μεγέθους, πληροφορεί για το μέγεθος των πρώτων.

Για την παρασκευή του πηκτώματος (gel) που διαχωρίζει τα μόρια DNA χρησιμοποιούνται δυο υλικά: η αγαρόζη και η πολυακρυλαμίδη. Για το μικροδορυφορικό DNA εξαιτίας του μικρού μεγέθους των θραυσμάτων χρησιμοποιείται η πολυακρυλαμίδη ενώ για τα RAPD εφαρμόζεται πήκτωμα αγαρόζης.

Ακολουθώντας την τεχνική της ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό μορίων με βάση το μέγεθός τους, ο πολυμορφισμός αποκαλύπτεται χρησιμοποιώντας έναν παράγοντα ανίχνευσης. Στην περίπτωση της αγαρόζης ο παράγοντας αυτός είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) ενώ για την πολυακρυλαμίδη χρησιμοποιείται ο νιτρικός άργυρος (silver nitrate).

Επίσης η τεχνολογία των laser εφαρμόζεται στην τεχνική του μικροδορυφορικού DNA. Στην περίπτωση αυτή ο εκκινητής (primer) χρωματίζεται με μια φωσφορίζων χρώση. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στο gel πολυακρυλαμίδης. Καθώς τα δείγματα κατευθύνονται στο κάτω μέρος του gel, τα θραύσματα ανιχνεύονται με ένα λέιζερ που εντοπίζει την παρουσία της χρώσης. Ένας υπολογιστής που είναι συνδεδεμένος με το σύστημα εξάγει τα αποτελέσματα σε τέτοια μορφή που να μπορούν να αναλυθούν.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ευρύτατα για το διαχωρισμό, απομόνωση και ανάλυση των πρωτεϊνικών μιγμάτων. Είναι μία κλασική εργαστηριακή μέθοδος ανάλυσης τόσο στη Βιοϊατρική έρευνα καθώς και στην καθημερινή κλινική πράξη.



Σχήμα 4. Σχηματική παράσταση της λειτουργίας της συσκευής ηλεκτροφόρησης: όταν το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται στο gel, λαμβάνει μέρος μοριακός διαχωρισμός. Οι πιο σύντομες αλυσίδες κινούνται πιο γρήγορα από ό,τι οι μεγαλύτερες. Επομένως, οι μπάντες απλώνονται στο gel σύμφωνα με το μέγεθός τους.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι να μελετηθούν:

- α) ο ρυθμός αύξησης και
- β) ο γενετικός πολυμορφισμός 11 πληθυσμών του σαργού, *Diplodus sargus*, στο Αιγαίο και στο Ιόνιο πέλαγος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό

Τα δείγματα του μελετηθέντος είδους συλλέχθηκαν από 11 διαφορετικές περιοχές στο Αιγαίο και το Ιόνιο πέλαγος: Παγασητικός κόλπος (Τρίκερι), Σποράδες, Σκιάθος (Μανδράκι), Χαλκιδική (Νέα Σκιάωνη, Ουρανούπολη), Θάσος, Καβάλα (2 πληθυσμοί), Σαμοθράκη, Ηγουμενίτσα και Πρέβεζα (Εικ. 4). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε το διάστημα από Αύγουστο έως Δεκέμβριο του 2004 (Πίν. 2). Τα δείγματα, ένα σύνολο 77 ατόμων, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο μέσα σε ψυγεία με πάγο (dry ice) και τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη (στους -20°C) μέσα σε νάιλον, αριθμημένες σακούλες μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Οι διεργασίες προετοιμασίας τους πραγματοποιήθηκαν σε πάγο(dry ice).



Εικόνα 4. Περιοχές δειγματοληψίας σαργού

Πίνακας 2. Αριθμός δειγμάτων / περιοχή

Περιοχή δειγματοληψίας	Αριθμός δειγμάτων	Διάστημα σύλληψης
Τρίκερι	6	Σεπτέμβριος 2004
Σκιάθος (Μανδράκι)	4	Αύγουστος 2004
Σποράδες	6	Αύγουστος 2004
Θάσος	12	Αύγουστος 2004
Καβάλα1	10	Νοέμβριος 2004
Καβάλα2	4	Νοέμβριος 2004
Χαλκιδική1 (Νέα Σκιώνη)	16	Αύγουστος 2004
Χαλκιδική2(Ουρανούπολη)	2	Οκτώβριος 2004
Σαμοθράκη	6	Νοέμβριος 2004
Πρέβεζα	5	Δεκέμβριος 2004
Ηγουμενίτσα	6	Νοέμβριος 2004
Σύνολο δειγμάτων	77	

2.2 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των ατόμων του σαργού είναι:

- Στερεοσκόπιο (Εικ. 5)
- Ζυγός ακριβείας (Εικ. 6)
- Όργανο μέτρησης του μήκους (Εικ. 7)
- Ψαλίδι, Νυστέρι, Λαβίδα, Τσιμπίδα (Εικ. 8)

Τα στοιχεία τα οποία ελήφθησαν από κάθε άτομο του δείγματος (νωπό δείγμα) ήταν το ολικό βάρος, το καθαρό βάρος, το μεσουραίο μήκος, το πλάτος του σώματος και το βάρος των γονάδων. Επίσης, μετρήθηκε η αναλογία φύλου με την παρατήρηση των γονάδων και έγινε η αφαίρεση των ωτολίθων για τον προσδιορισμό της ηλικίας.

Η παρατήρηση των γονάδων για την εύρεση του φύλου πραγματοποιήθηκε με μακροσκοπική παρατήρηση αυτών (άσπρο χρώμα γονάδων και κρεμώδους υφής για αρσενικό και κόκκινο χρώμα γονάδων και κοκκώδους υφής για θηλυκό).



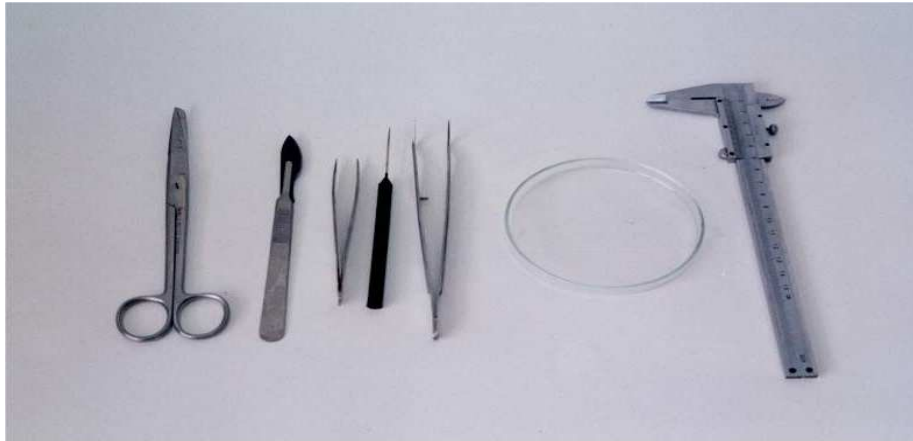
Εικόνα 5. Στερεοσκόπιο



Εικόνα 6. Ζυγός ακριβείας



Εικόνα 7. Χάρακας μέτρησης διαφόρων μηκών του δείγματος



Εικόνα 8. Όργανα (ψαλίδι, νυστέρι, λαβίδα, τσιμπίδα, τριβλίο petri, όργανο μέτρησης πλάτους)

2.3. Αφαίρεση και παρατήρηση ωτολίθων

Ένας τρόπος αφαίρεσης των ωτολίθων, ειδικά από τα μικρά ψάρια όπως ο σαργός, είναι η απομάκρυνση των βραγχίων από τη βραγχιακή κοιλότητα, με αποτέλεσμα να εμφανιστεί το κάτω μέρος του κρανίου, εκθέτοντας την ωτική κοιλότητα με τους ωτόλιθους. Μετά γίνεται μια χάραξη στο λεπτό οστού, που είναι πάνω από την κοιλότητα του αυτιού και οι ωτόλιθοι απομακρύνονται πολύ εύκολα με τη χρησιμοποίηση λαβίδας.

Οι ωτόλιθοι, αφού αφαιρέθηκαν όπως παραπάνω και καθαρίστηκαν προσεκτικά με αλκοόλη, τοποθετήθηκαν σε χάρτινους φακέλους και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν σε στερεοσκόπιο OLYMPUS (Εικ. 5). Η ηλικία υπολογίστηκε μεταφράζοντας τους δακτυλίους ανάπτυξης που υπάρχουν στους ωτόλιθους (Pajuelo and Lorenzo, 2002).

2.4 Τεχνική μικροδορυφορικού DNA

2.4.1 Εξαγωγή και απομόνωση του DNA

Για την εξαγωγή και απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστού τα οποία αφαιρέθηκαν προσεκτικά από κάθε ψάρι με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες κυβέττες Eppendorf.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε (Exadactylos, 1997) αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

1. Δείγματα ιστού τοποθετούνται σε αποστειρωμένες κυβέτες (Eppendorf tubes).
2. Στις κυβέτες αυτές προστίθενται:
 - 500μl διαλύματος TNE,
 - 50 μl Tris-HCl με pH 8,
 - 25 μl διαλύματος SDS περιεκτικότητας 25%
 - 20 μl Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) συγκέντρωσης 10 mg/l.όπου και ανακινούνται ελαφρώς.
3. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση των ιστών σε κλίβανο WTB binder σε θερμοκρασία 55° C για 2 ώρες (εμπειρικά μέχρι να διαλυθεί ο ιστός στο μίγμα).
4. Ύστερα από την επώαση και αφού παραμείνουν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται στις κυβέτες Eppendorff 600μl φαινόλο-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1.
5. Ανακινούνται σε μηχανή ανακίνησης (rotating mixing machine) και ύστερα φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C για να ξεχωρίσουν οι φάσεις (φυγόκεντρος MIKRO 12-24 UNIVERSAL της Hettich).
6. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης αφαιρείται προσεκτικά η υδατική φάση (πάνω στρώμα) με μια πιπέτα και τοποθετείται σε δεύτερη ομάδα κυβετών Eppendorf.
7. Στις νέες κυβέτες προστίθενται 600μl Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 29:1 και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση.
8. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές.
9. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης αφαιρείται ξανά το υπερκείμενο υγρό (υδατική φάση) και τοποθετείται σε τρίτη ομάδα κυβετών Eppendorff στις οποίες προστίθεται 1 ml καθαρής αιθανόλης (100%) και ανακινούμε ελαφρώς.
10. Προστίθενται 6 μl Sodium Acetate συγκέντρωσης 3M και οι κυβέτες τοποθετούνται στο ψυγείο στους - 20°C για 30 λεπτά.
11. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές.

12. Στο κάτω μέρος της κυβέττας παρατηρείται ένα λευκού χρώματος ίζημα (pellet).
13. Μετά την προσεκτική αφαίρεση της αλκοόλης (προσέχοντας να μην πέσει το λευκό pellet) προστίθενται 200 μl κρύας αιθανόλης περιεκτικότητας 70 % και φυγοκεντρώνται ξανά για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές.
14. Η αιθανόλη αφαιρείται τελείως από τα δείγματα και οι κυβέτες τοποθετούνται με ανοικτά πώματα στον κλίβανο επώασης για 20 λεπτά στους 40°C.
15. Μετά την επώαση προστίθενται 50 μl υπερστειωμένο νερό (συσκευασία των 5 ml) και τοποθετούνται στον καταψύκτη στους -20°C. Τα δείγματα είναι έτοιμα για ανάλυση.

2.4.2 Τεχνική PCR με μη-σημασμένους εκκινητές

Δεκαπέντε ζεύγη εκκινητών (primers) χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή και αναγνώριση των πολυμορφικών ατόμων στο σαργό, *Diplodus sargus*, των οποίων η προμήθεια έγινε από την Invitrogen (Πίν. 3). Από αυτούς, μόνο οι εκκινητές Pma1, Pma2, SaI10 και SaI12 εντοπίστηκαν πολυμορφικοί στα άτομα του σαργού. Ενώ οι εκκινητές Pma3 και SaI19 εντοπίστηκαν μονομορφικοί.

Οι τελικές συνθήκες ενίσχυσης βασίστηκαν σε πρωτόκολλο του είδους *Solea solea* L. (Exadactylos, 1997) και αποφασίστηκαν κατόπιν δοκιμαστικών πειραμάτων στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων DNA, dNTP's, MgCl₂, Taq πολυμεράσης, εκκινητών καθώς και τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας συγκόλλησης των εκκινητών. Το τελικό διάλυμα των αντιδράσεων της PCR (Εικ. 9) είχε όγκο 20 μl και περιείχε 2 μl DNA, 1.6 μl dNTP's (10mM), 2 μl 1X PCR buffer (200 mM Tris-HCl σε pH 8.4, 500 mM KCl), 1.5 μl MgCl₂ (25 mM), 0.25 μl Taq πολυμεράσης (5U/μl), 2 μl από κάθε ζεύγος εκκινητών (συγκέντρωσης 15 pmol/μl) και 9.65 μl υπερστειωμένο νερό. Για τον έλεγχο της επιμόλυνσης των αντιδράσεων με ξένο DNA πραγματοποιήθηκαν αρνητικοί έλεγχοι, παραλείποντας το DNA από το μίγμα αντίδρασης.

Κατόπιν πειραματικής επιβεβαίωσης οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν έναν κύκλο των 3 min στους 94°C, ένα σύνολο 33 κύκλων των 45 sec στους 94°C, 30 sec

στους 58°C, 1 min και 30 sec στους 72°C και τέλος έναν κύκλο των 10 min στους 72°C. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 4°C μέχρι την ηλεκτροφόρηση.

Πίνακας 3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Adcock et al. 2000).

Εκκινητές	Αλληλουχία (5' to 3')	Επανάληψη στον κλώνο	Ta-Ann (° C)
Pma1F _n	CATGCCAGTATTCCAATGTGC	(GT) ₂₁ *	56
Pma1R _n	AGGACAAATTCCCAAGGTCATCC		
Pma2F _n	TGCCAAGGAGAGGTTGAGGAG	(GT) ₂₄ *	57
Pma2R _n	TATTCTTGCAAGGGTCCAAACG		
Pma3F _n	CTAAACAAATAATTCTGGTTTAGC	(GT) ₂₀ *	54
Pma3R _n	CATGACAAACTGAGGTGAATGC		
Pma5F _n	CCAATCGGATTGAGTATCTGTGG	(GT) ₂₂ *	56
Pma5R _n	GAGAGGTTCTCCGTCCTGTCC		
GA1AF	TATTTCTCTTTGTCATCCTGC	(TC) ₁₁ (N) ₁₂ (TC) ₅	56
GA1AR	TTAAACATGCTGTCAAATGC		
GA1BF	ATGAGAGTGTGAACGTCCTG	(GAA) ₄ (GGA) ₄	56
GA1BR	GTATCATTGCCTGTGTACTCC		
GA2AF	ACGGACAGAGAGGGAGTGG	(AG) ₁₆	56
GA2AR	CATCATCATCAGTCAGAGCTG		
GA2BF	CAGATACAGGCAGAGGAGC	(AC) ₁₇	56
GA2BR	CAATTAGAGGAGGGAGAACG		
GT2F	TAGGGGTCTTGCTGCCTGCTC	(GT) ₁₆	56
GT2R	ACAGATACAGACTGACAGACG		
GT3F	ACTTCATCATTACCCAATTTC	(CA) ₁₀ N(CA) ₁₅	56
GT3R	AAGGTGAGGAGGAAAACCTGC		
GT4F	CTTTACACTGTTGAAGCTTTGG	(GT) ₁₆	56
GT4R	CGCACAGATAAAACAAATCAAT		
GT6F	GAACGGCTGAAATCAGATCTC	(TG) ₁₁ C(GT) ₅	54
GT6R	GCTCTGGCTCTGGATCTATG		
SaI10	TCACGGGGACCAAGACTG	(GT) ₃₇	60
	CTCACACTGCCTAATTAGCACAGA		
SaI12	ACGGTATGGAGTCAACTGC	(GT) ₃₀	60
	CCCCTTTTGGTACATCATAG		
SaI19	ATTCTTCACAGGCCCAACACAAA	(GT) ₃₅	60
	GAAAACACCGGCCAGTACGA		

* Οι επαναλήψεις αναφέρονται από τους Tagaki et al. 1997.

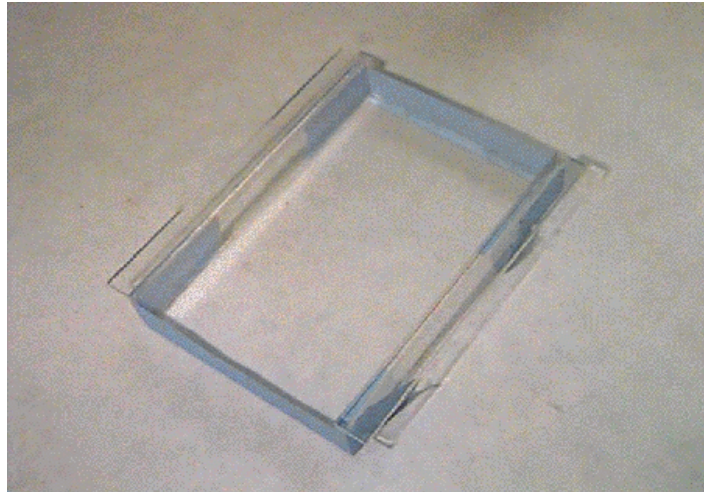


Εικόνα 9. Συσκευή PCR

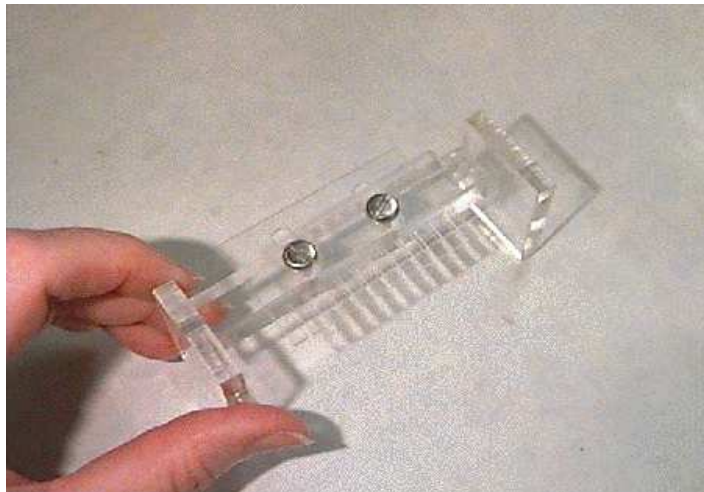
2.4.3 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA των δειγμάτων, σε μια μικρή ποσότητα κάθε δείγματος (2 μ l) εφαρμόζεται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η παρασκευή της πηκτής αγαρόζης πραγματοποιήθηκε, κατόπιν δοκιμών στο εργαστήριο, με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Αρχικά λαμβάνονται 60 ml διαλύματος T.A.E. 1X και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη (1 lt διαλύματος T.A.E. 50 X: 242 g Tris-HCl, 57 ml Acetic Acid, 0.05 M EDTA).
2. Ζυγίζονται 0.42 g αγαρόζης και τοποθετούνται στο διάλυμα.
3. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος με συνεχή ανακίνησή του.
4. Μετά το βρασμό, τοποθετούνται εντός της κωνικής φιάλης 3 μ l βρωμιούχου αιθιδίου.
5. Ακολουθεί η τοποθέτηση του διαλύματος στη συσκευή μορφοποίησης της πηκτής (Εικ. 10) στην οποία έχουν ήδη τοποθετηθεί τα χτένια δημιουργίας υποδοχών (Εικ. 11) ενισχυμένου DNA (πηγάδια) και παραμένει εκεί για τουλάχιστον 20 λεπτά.
6. Τα χτένια αφαιρούνται προσεκτικά και η πηκτή είναι έτοιμη για την προσθήκη του DNA στα «πηγάδια» (Εικ. 12) αφού πρώτα τοποθετηθεί στην ηλεκτροφόρηση (συσκευή SCIE-PLAS με τροφοδοτικό CONSORT E143).



Εικόνα 10. Συσκευή μορφοποίησης αгарόζης

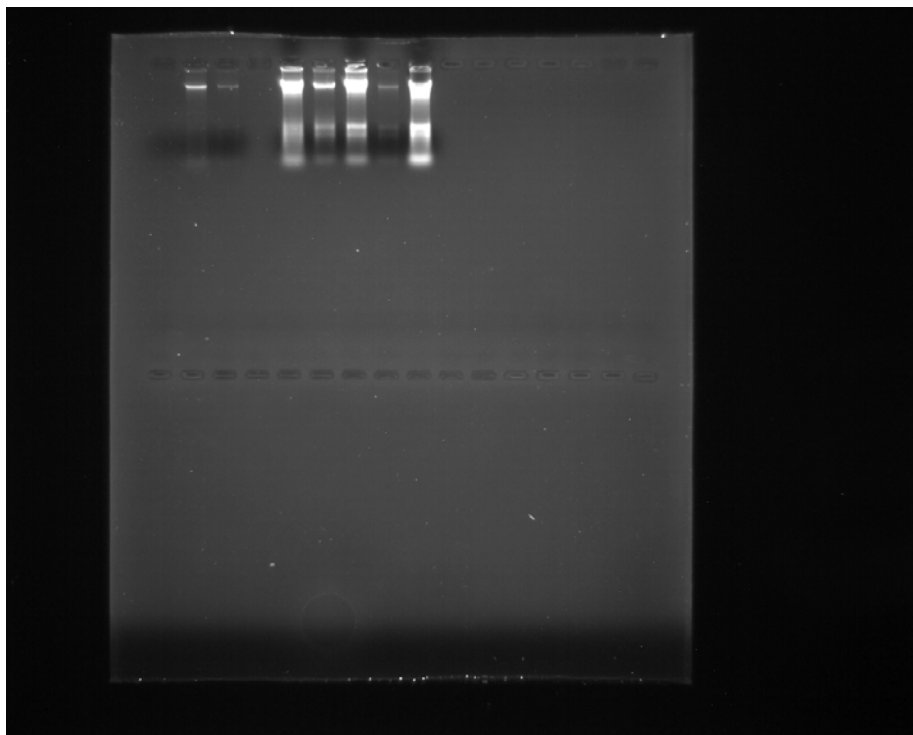


Εικόνα 11. Χτένια δημιουργίας υποδοχών



Εικόνα 12. «Φόρτωμα» του DNA στα πηγάδια

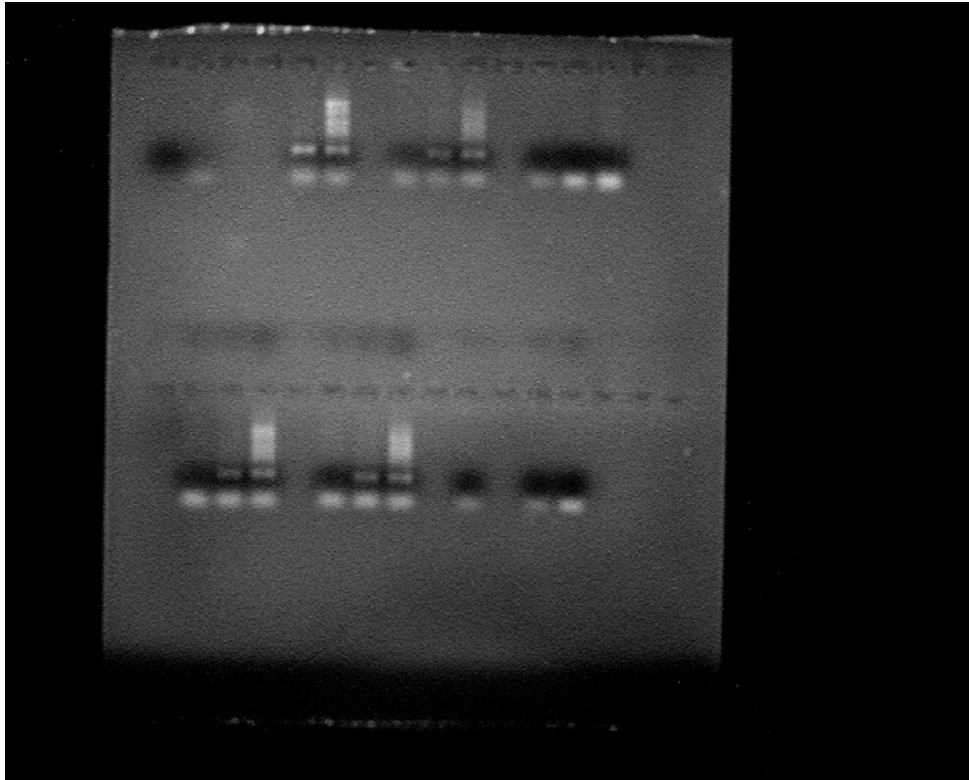
Μετά την προσθήκη του DNA στα πηγάδια, η πηκτή παραμένει εκεί για περίπου 30 λεπτά και στη συνέχεια, αφού αφαιρεθεί προσεκτικά από τη συσκευή, τοποθετείται σε υπεριώδεις ακτίνες (UV) για να διαπιστωθεί η ύπαρξη του DNA (Εικ. 13).



Εικόνα 13. Gel αγαρόζης όπου διαπιστώνεται η ύπαρξη του DNA (ιδία πηγή).

Για τον εντοπισμό συγκεκριμένων εκκινητών στα άτομα του πληθυσμού εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% που περιείχε 2.5 μl βρωμιούχο αιθίδιο σε διάλυμα TAE 1X (Tris-base, Acetic acid, 0.5M EDTA σε pH 8).

Οι ζώνες εμφανίστηκαν σε συσκευή UV και στη συνέχεια φωτογραφήθηκαν σε φωτογραφική μηχανή Mini Bis της Bio-Imaging Systems (Εικ. 14).



Εικόνα 14. Gel αγαρόζης για τον εντοπισμό εκκινητών (ιδία πηγή).

2.4.4 Τεχνική PCR με σημασμένους εκκινητές

Λέγοντας σημασμένους εκκινητές (primers) εννοούμε εκείνους οι οποίοι είναι χρωματισμένοι από την προμηθεύτρια εταιρία με κάποια συγκεκριμένα χρώματα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση οι εκκινητές είχαν τα ακόλουθα χρώματα:

- Pma1: FAM (μπλε)
- Pma2: HEX (κίτρινο)
- SaI10: FAM (μπλε)
- SaI12: TET (πράσινο)

Το τελικό διάλυμα των αντιδράσεων της PCR είχε όγκο 10 μ l και περιείχε 1/10 μ l DNA, 0.2 μ l dNTP's (10mM), 1 μ l 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl με pH 8.4, 500 mM KCl), 0.6 μ l MgCl₂ (25 mM), 0.15 μ l Taq πολυμεράσης (5U/ μ l), 0.6 μ l από κάθε ζεύγος εκκινητών (συγκέντρωσης 10 mM) και 5.85 μ l υπερστειρωμένο νερό.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν έναν κύκλο των 3 min στους 95°C, ένα σύνολο 30 κύκλων του 1 min στους 95°C, 50 sec στη T °C annealing και 50 sec στους 72°C και τέλος έναν κύκλο των 5 sec στους 72°C.

Για καθένα εκκινήτη η θερμοκρασία T °C annealing καθορίστηκε:

- Για τον Pma1: 56°C
- Για τον Pma2: 57°C
- Για τον SaI10: 60°C
- Για τον SaI12: 60°C

2.4.5 Γονοτύπιση

Για την εύρεση των αλληλομόρφων κάθε ατόμου τα προϊόντα της PCR τοποθετήθηκαν σε μία συσκευή που ονομάζεται Base Station (MJ Research)(Εικ. 15). Εντός της συσκευής αυτής, «τρέχει» ένα gel πολυακρυλαμίδης 6%.

Η συγκεκριμένη συσκευή περιέχει ένα λογισμικό που ονομάζεται Cartographer το οποίο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των αλληλομόρφων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ένα γράφημα όπου με τη βοήθεια αυτού πραγματοποιείται η μέτρηση.



Εικόνα 15. Base Station (MJ Research)

2.5 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του ρυθμού αύξησης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS ενώ για τα αντίστοιχα του γενετικού πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε το πακέτο GenePop (version 3.4) (Raymond and Rousset, 1995), Phylip 3.61 και Treeview.

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων, η αναμενόμενη και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία του κάθε δείγματος για όλους τους μικροδορυφορικούς δείκτες υπολογίστηκαν με το λογισμικό πακέτο GenePop. Επίσης μετρήθηκε ο αριθμός των μοναδικών αλληλομόρφων από τους πίνακες συχνοτήτων. Με το ίδιο πρόγραμμα υπολογίστηκαν οι πιθανότητες απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg σε κάθε μικροδορυφόρο με ένα τεστ που χρησιμοποιεί τη μέθοδο Markov chain. Ο δείκτης ενδογαμίας F_{IS} μετρήθηκε για κάθε πληθυσμό και όλους τους μικροδορυφόρους. Τέλος, υπολογίστηκε ο δείκτης παραλλακτικότητας F_{ST} μεταξύ των πληθυσμών. Οι γενετικές αποστάσεις κατά Nei και το δενδρόγραμμα υπολογίστηκαν με τα πακέτα Phylip 3.61 και Treeview software.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αναλογία φύλων

Η εξέταση της αναλογίας των δύο φύλων έγινε από ένα δείγμα 80 ατόμων (52 αρσενικά και 28 θηλυκά). Στον Πίνακα 4 φαίνεται η αναλογία των δύο φύλων κατά ηλικία.

Πίνακας 4. Αναλογία των 2 φύλων ανά ηλικία

ΗΛΙΚΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ		ΑΝΑΛΟΓΙΑ
	ΑΡΣΕΝΙΚΑ	ΘΗΛΥΚΑ	Α:Θ
1+	13	3	1:4,33
2+	20	16	1:1,25
3+	19	8	1:2,38
4+	0	1	0

Το μεσουραίο μήκος για τα αρσενικά κυμαίνεται από 9.1 έως 21.2 ενώ για τα θηλυκά από 9 έως 25.3. Αντίστοιχα, το ολικό βάρος παρουσιάζει ένα εύρος από 75.22 έως 380.98 g και από 75.12 έως 821.26 g. Ενώ το καθαρό βάρος για τα αρσενικά παρουσιάζει ένα εύρος από 70.24 έως 387.62 g και για τα θηλυκά από 70.33 έως 756.03 g. Το πλάτος κυμαίνεται από 4.6 έως 10 cm για τα αρσενικά και από 4.7 έως 12.6 cm για τα θηλυκά (Πίν. 5).

Πίνακας 5. Μετρήσεις των ατόμων του είδους *Diplodus sargus*

Άτομα	Μεσουραίο μήκος (cm)	Ολικό βάρος (g)	Καθαρό βάρος (g)	Πλάτος (cm)
Αρσενικά	9.1 - 21.2	75.22 - 380.98	70.24 - 387.62	4.6 - 10.0
Θηλυκά	9 - 25.3	75.12 - 821.26	70.33 - 756.03	4.7 - 12.6

Για τον υπολογισμό της ηλικίας χρησιμοποιήθηκαν, όπως προαναφέρθηκε, οι ωτόλιθοι. Εκείνο που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι από αυτούς, από ένα ποσοστό 6% χρησιμοποιήθηκε για ανάγνωση μόνο ο ένας ωτόλιθος, καθώς ο άλλος είτε έσπασε είτε χάθηκε κατά την εξαγωγή. Η ηλικία των ψαριών που μελετήθηκαν ήταν από 1+ έως 4+.

3.2 Σχέση Μήκους - Βάρους

Το μήκος του σώματος των περισσότερων ψαριών, κατά τη διάρκεια της ζωής τους, αυξάνεται σε σχέση με το βάρος τους. Στην περίπτωση αυτή η σχέση που συνδέει το μήκος με το βάρος του σώματος είναι εκθετική συνάρτηση της μορφής

$$W=aL^b$$

Όπου W= το βάρος (ολικό) του ψαριού σε g

L= το σταθερό μήκος σε cm

a και b= σταθερές

Το a είναι ένας συντελεστής που καθορίζεται από τη φυσική κατάσταση του ψαριού και το b ο συντελεστής παλινδρόμησης, που παίρνει τιμές μεταξύ του 2 και του 4 με ιδανική το 3 (Νεοφύτου, 1997).

Από τη εφαρμογή της παραπάνω σχέσης, στα δεδομένα ολικού βάρους και μεσουραίου μήκους σε σύνολο 80 ατόμων, υπολογίστηκαν οι σταθερές a και ο συντελεστής παλινδρόμησης b, ξεχωριστά για τα δύο φύλλα, και η παραπάνω σχέση παίρνει την εξής μορφή:

$$\text{Αρσενικά: } W=0.01281L^{2.89}, \quad n=52, \quad r^2=0.985$$

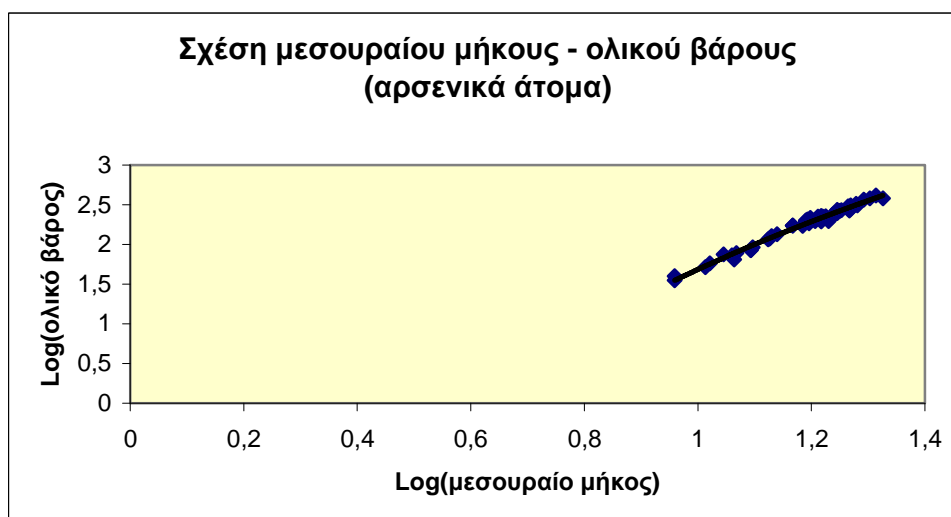
$$\text{Θηλυκά: } W=0.01325L^{3.03}, \quad n=28, \quad r^2=0.901$$

Από τις σχέσεις μήκους-βάρους για τα δύο φύλλα, στο σύνολο 80 ατόμων, οι συντελεστές συσχέτισης ($r^2=0.985$ για τα αρσενικά και $r^2=0.901$ για τα θηλυκά) εκφράζονται πολύ ικανοποιητικά με τις αντίστοιχες λογαριθμικές συναρτήσεις. Επίσης από τις παραπάνω σχέσεις φαίνεται ότι οι τιμές του συντελεστή

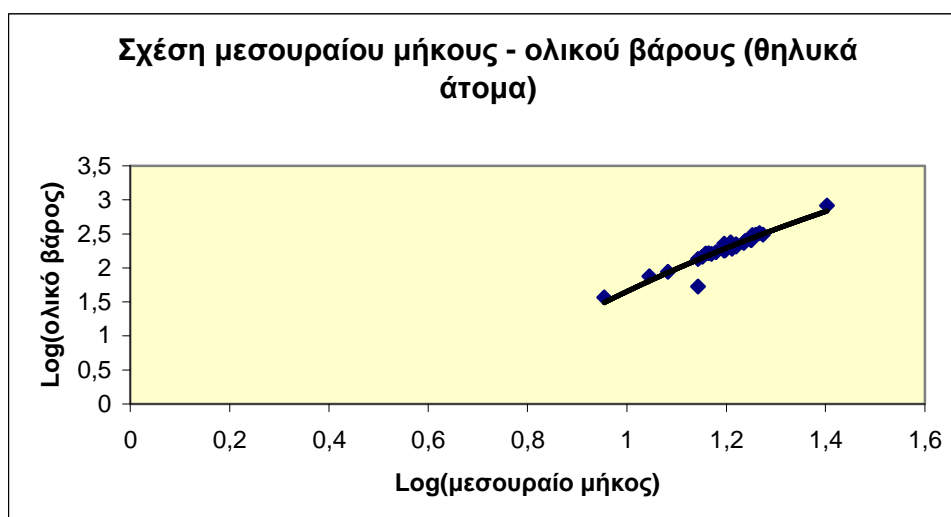
παλινδρόμησης b κυμαίνεται γύρω στο 3 ($b=2.89$ για τα αρσενικά και $b=3.03$ για τα θηλυκά) που είναι κοντά στις ιδανικές τιμές.

Στα διαγράμματα 5 και 6 απεικονίζονται οι σχέσεις μεσουραίου μήκους-ολικού βάρους για τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα.

Σχήμα 5. Διάγραμμα της σχέσης μήκους - βάρους στα αρσενικά άτομα.



Σχήμα 6. Διάγραμμα της σχέσης μήκους - βάρους στα θηλυκά άτομα.



3.3 Γενετική ποικιλότητα μικροδορυφορικών δεικτών

Από τα δεκαπέντε ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν τα τέσσερα αναγνωρίστηκαν ως πολυμορφικά: Pma1, Pma2, SaI10 και SaI12. Και οι τέσσερις εκκινήτες χαρακτηρίζονται από υψηλό αριθμό αλληλομόρφων (Πίν. 6) έχοντας 29, 31, 28 και 26 αλληλόμορφα αντίστοιχα με τον Pma20 να έχει τον υψηλότερο αριθμό αλληλομόρφων. Ενώ οι εκκινήτες Pma3 και SaI19 οι οποίοι δοκιμάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως μονομορφικοί.

Πίνακας 6. Οι τέσσερις μικροδορυφορικοί δείκτες στο είδος *Diplodus sargus*, το παραγόμενο εύρος μεγέθους, ο αριθμός των αλληλομόρφων και η θερμοκρασία (T°C annealing).

Locus name	Size range	N° of alleles	T°C annealing
SaI10	171-237	28	60
SaI12	115-181	26	60
Pma1	137-215	29	56
Pma2	131-209	31	57

Τα μεγέθη των αλληλομόρφων κυμαίνονται για τον SaI10 από 171 έως 237 bp, για τον SaI12 από 115 έως 181bp, για τον Pma1 από 137 έως 215 bp και για τον Pma2 από 131 έως 209 bp (Πίν. 6).

Οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy - Weinberg εξετάστηκαν για όλα τα ζεύγη των γενετικών τόπων και στους 11 πληθυσμούς. Οι τιμές που προέκυψαν δεν έδειξαν αποκλίσεις από την ισορροπία αυτή.

Από τη μελέτη του Πίνακα 7 προκύπτει ότι ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά τόπο κυμαίνεται από 8 έως 8.728. Η μέση τιμή της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας κυμαίνεται από 0.7824 έως 0.8505 ενώ για την παρατηρούμενη ετεροζυγωτία η χαμηλότερη τιμή παρατηρείται στο 0.6197 και η υψηλότερη στο 0.8652. Αυτό σημαίνει ότι και οι τέσσερις μικροδορυφορικοί δείκτες είναι υψηλά πολυμορφικοί.

Πίνακας 7. Μέση τιμή αλληλομόρφων (A), παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας (Ho) και αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (He) για όλους τους μικροδορυφορικούς δείκτες.

Μικροδορυφόρος	Μέση τιμή		
	A	Ho	He
SaI10	8.728	0.7999	0.8505
SaI12	8.545	0.8652	0.8032
Pma1	8.000	0.6602	0.7824
Pma2	8.545	0.6197	0.8417

Στους Πίνακες I, II, III και IV του Παραρτήματος δίνονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων όλων των πληθυσμών για κάθε μικροδορυφόρο ξεχωριστά. Ένα σύνολο 23 μοναδικών αλληλομόρφων βρέθηκε με συχνότητες που φτάνουν το 50%. Από αυτά, ένα ανήκει στο Τρίκερι, τέσσερα στην Καβάλα1, πέντε στον πληθυσμό της Χαλκιδικής1, τέσσερα στον πληθυσμό της Σαμοθράκης, ένα στην Πρέβεζα, τρία στις Σποράδες, τρία στη Χαλκιδική2, ένα στην Καβάλα2, ένα στη Σκιάθο και τρία στη Θάσο.

Μελετώντας τον αριθμό των αλληλομόρφων ανά τόπο από τον Πίνακα 8 διαπιστώνεται ότι αυτός κυμαίνεται από 3 έως 16.75. Η μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία (He) των 11 πληθυσμών στους τέσσερις γενετικούς τόπους ήταν υψηλότερη στον πληθυσμό της Χαλκιδικής1 με τιμή 0.9065, ακολουθούμενη από τη Θάσο με 0.8781, Τρίκερι με 0.8750, Σαμοθράκη με 0.8715, Σκιάθος με 0.8360, Σποράδες και Ηγουμενίτσα με 0.8299, Καβάλα1 με 0.8279, Πρέβεζα με 0.7920, Καβάλα2 με 0.7422 και τέλος Χαλκιδική2 με 0.6250. Ενώ για την παρατηρούμενη ετεροζυγωτία η υψηλότερη τιμή της παρατηρείται στον πληθυσμό της Σαμοθράκης με τιμή 0.9167 και ακολουθεί η Σκιάθος με τιμή 0.8125, η Πρέβεζα με 0.8000, το Τρίκερι με 0.7916, οι 2 πληθυσμοί της Χαλκιδικής με 0.7500, οι Σποράδες με 0.7083, η Θάσος με 0.6364 και τέλος οι πληθυσμοί της Καβάλας2 και Καβάλας1 με 0.6250 και 0.5583 αντίστοιχα.. Η μέση τιμή ετεροζυγωτίας βρέθηκε αρκετά υψηλή αλλά δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών ($P_{0.99}$).

Πίνακας 8. Γενετική ποικιλότητα που προέκυψε από την ανάλυση σε τέσσερις μικροδορυφορικούς δείκτες στους 11 πληθυσμούς όπου N: αριθμός δειγμάτων, A: αριθμός αλληλομόρφων, Ho: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, He: αναμενόμενη ετεροζυγωτία, P-val: πιθανότητα σημαντικής απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg

Locus	Πληθυσμοί										
	Τρίκερι	Σκιάθος	Σποράδες	Θάσος	Καβάλα1	Καβάλα2	Χαλκιδική1	Χαλκιδική2	Σαμοθράκη	Πρέβεζα	Ηγουμενίτσα
SaI10											
N	6	4	6	12	10	4	16	2	6	5	6
A	10	7	9	12	10	6	16	4	7	7	8
Ho	1.0000	0.7500	1.0000	0.6364	0.8000	0.5000	0.8125	1.0000	0.8333	0.8000	0.6667
He	0.8889	0.8438	0.8889	0.8967	0.8600	0.8125	0.9219	0.7500	0.8333	0.8400	0.8194
P_{0.99}	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
SaI12											
N	6	4	6	12	10	4	16	2	6	5	6
A	9	7	10	10	10	6	16	3	9	7	7
Ho	1.0000	1.0000	0.8333	0.9091	0.6000	1.0000	0.8750	0.5000	1.0000	0.8000	1.0000
He	0.8750	0.8438	0.7639	0.8388	0.7200	0.8125	0.8809	0.6250	0.8750	0.7800	0.8194
P_{0.99}	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Πίνακας 8. (συνέχεια)

Pma1	Τρίκερι	Σκιάθος	Σποράδες	Θάσος	Καβάλα1	Καβάλα2	Χαλκιδική1	Χαλκιδική2	Σαμοθράκη	Πρέβεζα	Ηγουμενίτσα
N	6	4	6	12	10	4	16	2	6	5	6
A	9	7	8	10	10	3	18	2	11	4	6
Ho	0.6667	1.0000	0.5000	0.4545	0.5000	0.2500	0.6250	1.0000	1.0000	0.6000	0.6667
He	0.8750	0.8438	0.8611	0.8719	0.8450	0.5313	0.9238	0.50000	0.9028	0.6600	0.7917
P_{0,99}	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Pma2	Τρίκερι	Σκιάθος	Σποράδες	Θάσος	Καβάλα1	Καβάλα2	Χαλκιδική1	Χαλκιδική2	Σαμοθράκη	Πρέβεζα	Ηγουμενίτσα
N	6	4	6	12	10	4	16	2	6	5	6
A	8	6	7	11	10	6	15	3	9	9	10
Ho	0.5000	0.5000	0.5000	0.5455	0.3333	0.7500	0.6875	0.5000	0.8333	1.0000	0.6667
He	0.8611	0.8125	0.8056	0.9050	0.8867	0.8125	0.8984	0.6250	0.8750	0.8888	0.8889
P_{0,99}	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Mean											
A	9	6.75	8.5	10.75	10	5.25	16.25	3	9	6.75	7.75
Ho	0.7917	0.8125	0.7083	0.6364	0.5583	0.6250	0.7500	0.7500	0.9167	0.8000	0.7500
He	0.8750	0.8360	0.8299	0.8781	0.8279	0.7422	0.9065	0.6250	0.8715	0.7920	0.8299

3.4 Γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών

Η γονιδιακή διαφοροποίηση μεταξύ των έντεκα πληθυσμών του σαργού ανιχνεύθηκε με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων (Πίν. 9).

Πίνακας 9. Γονιδιακή διαφοροποίηση στους 4 μικροδορυφορικούς δείκτες για κάθε ζεύγος πληθυσμού του είδους *Diplodus sargus* Όπου: * P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001, NS = μη σημαντικό

Ζεύγος πληθυσμών	Γονιδιακή Διαφοροποίηση
Χαλκιδική2 - Σποράδες	*
Χαλκιδική2 - Ηγουμενίτσα	NS
Χαλκιδική2 - Καβάλα2	NS
Χαλκιδική2 - Σκιάθος	NS
Χαλκιδική2 - Πρέβεζα	NS
Χαλκιδική2 - Σαμοθράκη	NS
Χαλκιδική2 - Τρίκερι	NS
Χαλκιδική2 - Θάσος	NS
Χαλκιδική2 - Καβάλα1	NS
Χαλκιδική2 - Χαλκιδική1	NS
Σποράδες - Ηγουμενίτσα	**
Σποράδες - Καβάλα2	*
Σποράδες - Σκιάθος	NS
Σποράδες - Πρέβεζα	*
Σποράδες - Σαμοθράκη	NS
Σποράδες - Τρίκερι	NS
Σποράδες - Θάσος	NS
Σποράδες - Καβάλα1	*
Σποράδες - Χαλκιδική1	**
Ηγουμενίτσα - Καβάλα2	NS
Ηγουμενίτσα - Σκιάθος	NS
Ηγουμενίτσα - Πρέβεζα	NS
Ηγουμενίτσα - Σαμοθράκη	*

Πίνακας 9 (συνέχεια)

Ηγουμενίτσα - Τρίκερι	NS
Ηγουμενίτσα - Θάσος	**
Ηγουμενίτσα - Καβάλα1	*
Ηγουμενίτσα - Χαλκιδική1	NS
Καβάλα2 - Σκιάθος	NS
Καβάλα2 - Πρέβεζα	NS
Καβάλα2 - Σαμοθράκη	NS
Καβάλα2 - Τρίκερι	NS
Καβάλα2 - Θάσος	*
Καβάλα2 - Καβάλα1	**
Καβάλα2 - Χαλκιδική1	*
Σκιάθος - Πρέβεζα	NS
Σκιάθος - Σαμοθράκη	NS
Σκιάθος - Τρίκερι	NS
Σκιάθος - Θάσος	NS
Σκιάθος - Καβάλα1	NS
Σκιάθος - Χαλκιδική1	NS
Πρέβεζα - Σαμοθράκη	NS
Πρέβεζα - Τρίκερι	NS
Πρέβεζα - Θάσος	NS
Πρέβεζα - Καβάλα1	*
Πρέβεζα - Χαλκιδική1	NS
Σαμοθράκη - Τρίκερι	NS
Σαμοθράκη - Θάσος	***
Σαμοθράκη - Καβάλα1	**
Σαμοθράκη - Χαλκιδική1	*
Τρίκερι - Θάσος	*
Τρίκερι - Καβάλα1	NS
Τρίκερι - Χαλκιδική1	*
Θάσος - Καβάλα1	***
Θάσος - Χαλκιδική1	*
Καβάλα1 - Χαλκιδική1	**

Σημαντική γονιδιακή διαφοροποίηση προέκυψε ανάμεσα στους πληθυσμούς Σαμοθράκης - Θάσου και Θάσου - Καβάλας οι οποίες εντοπίζονται σε κοντινές μεταξύ τους γεωγραφικές αποστάσεις. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και σε ζεύγη άλλων πληθυσμών με λιγότερο σημαντικές τιμές γονιδιακής διαφοροποίησης.

Ο συντελεστής ενδογαμίας F_{IS} (Weir and Cockerham, 1984) απεικονίζεται στον Πίνακα 10. Η ένταση της ενδογαμίας μέσα σε κάθε πληθυσμό ποικίλει από τον ένα μικροδορυφόρο στον άλλο. Αξίζει να επισημανθεί ότι στους πληθυσμούς της Χαλκιδικής2 και των Σποράδων έχει τιμή μηδέν για τον SaI10 και για τον SaI12 αντίστοιχα, ενώ για τον πληθυσμό της Χαλκιδικής2 η ανάλυση δεν έδωσε αποτέλεσμα για τον Pma1. Γενικά οι τιμές που παρατηρούνται είναι αρνητικές και θετικές.

Πίνακας 10. Συντελεστής ενδογαμίας F_{IS} για κάθε πληθυσμό και μικροδορυφόρο.

Πληθυσμός	Μικροδορυφορικός δείκτης			
	SaI10	SaI12	Pma1	Pma2
Τρίκερι	-0.034	-0.053	0.322	0.492
Καβάλα1	0.122	0.207	0.347	0.657
Χαλκιδική1	0.150	0.039	0.352	0.265
Ηγουμενίτσα	0.273	-0.132	0.245	0.333
Σαμοθράκη	0.091	-0.053	-0.017	-0.053
Πρέβεζα	0.158	0.086	-0.200	-0.026
Σποράδες	-0.034	0.000	0.492	0.455
Χαλκιδική2	0.000	0.500	-	0.500
Καβάλα2	0.500	-0.091	0.451	0.217
Σκιάθος	0.182	-0.043	-0.043	0.500
Θάσος	0.307	-0.066	0.466	0.394

Η μεγαλύτερη τιμή (0.657) εντοπίζεται στον πληθυσμό της Καβάλας¹ για το μικροδορυφόρο Pma2 με τη μεγαλύτερη έλλειψη ετεροζυγωτών. Ωστόσο, καταγράφονται και πληθυσμοί όπως εκείνος της Πρέβεζας (-0.200) για το μικροδορυφόρο Pma1 με το υψηλότερο πλεόνασμα ετεροζυγωτών. Στην πλειοψηφία τους όμως οι πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από έλλειψη ετεροζυγωτών.

Η γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς καταγράφεται με τον συντελεστή F_{ST} ο οποίος ονομάζεται συντελεστής παραλλακτικότητας (Πίν. 11). Οι τιμές του κυμαίνονται από -0.1831 έως 0.5469. Η υψηλότερη τιμή εντοπίστηκε ανάμεσα στους πληθυσμούς της Πρέβεζας και του Τρικεριού με τιμή 0.5469, ενώ η χαμηλότερη παρατηρήθηκε ανάμεσα στους πληθυσμούς των Σποράδων και της Χαλκιδικής² με τιμή -0.1831.

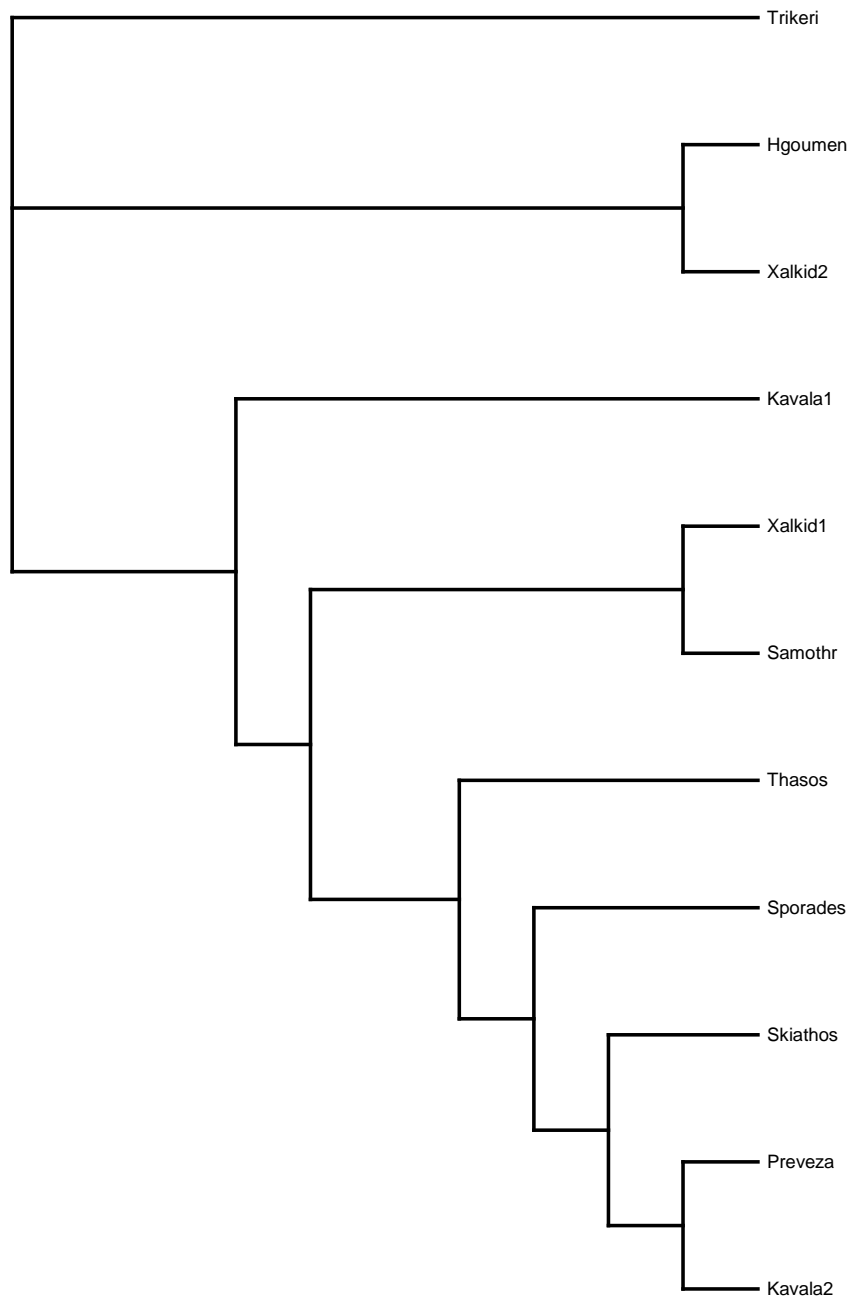
Το μέτρο διαφοροποίησης των πληθυσμών καθορίζεται από το βαθμό της γενετικής τους επικοινωνίας (Futuyma, 1995). Αυτό το μέτρο είναι η γονιδιακή ροή. Αξίζει να επισημανθεί ότι η γονιδιακή ροή υπολογίστηκε κατά Slatkin (1985) και μετρήθηκε με τιμή 1.73 η οποία θεωρείται αρκετά ικανοποιητική.

Στον Πίνακα 11 μαζί με τις τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας καταγράφονται και οι τιμές των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών κατά Nei (1972). Οι τιμές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τους τέσσερις γενετικούς τόπους και είχαν ένα εύρος από 0.439035 έως 3.457862. Η μεγαλύτερη τιμή (3.457862) εντοπίζεται μεταξύ των πληθυσμών της Σκιάθου και της Χαλκιδικής και η μικρότερη (0.439035) μεταξύ της Καβάλας και της Πρέβεζας.

Το δενδρόγραμμα (Σχ. 7) με τη μέθοδο Neighbor-Joining / UPGMA απέδωσε με μεγαλύτερη ακρίβεια τις γενετικές αποστάσεις (D) μεταξύ πληθυσμών. Εκείνο που παρατηρείται στο δενδρόγραμμα είναι ότι σχηματίζονται δύο διαφορετικές ομάδες με τον πληθυσμό του Τρικεριού να είναι απομονωμένος από τους υπόλοιπους. Η μία ομάδα περιλαμβάνει την Ηγουμενίτσα και τη Χαλκιδική¹ και η άλλη τους πληθυσμούς της Καβάλας¹, της Χαλκιδικής², της Σαμοθράκης, της Θάσου, των Σποράδων, της Σκιάθου, της Πρέβεζας και της Καβάλας². Ο πληθυσμός του Τρικεριού είναι αρκετά απομονωμένος από τους πληθυσμούς της Σκιάθου και των Σποράδων ενώ δεν ισχύει το ίδιο σε γεωγραφική απόσταση.

Πίνακας 11. Τιμές F_{ST} (κάτω από τη διαγώνιο) και τιμές γενετικών αποστάσεων (πάνω από τη διαγώνιο) μεταξύ των ζευγών των πληθυσμών του είδους *Diplodus sargus*.

Πληθυσμοί	Χαλκιδική2	Σποράδες	Ηγουμενίτσα	Καβάλα2	Σκιάθος	Πρέβεζα	Σαμοθράκη	Τρίκερι	Θάσος	Καβάλα1	Χαλκιδική1
Χαλκιδική2	****	1.0000	1.108953	1.285959	3.457862	2.418141	2.131995	1.329428	1.613113	1.275020	1.519555
Σποράδες	-0.1221	****	1.217654	1.209112	0.794006	0.870156	1.010444	0.819908	0.605366	0.592141	0.886119
Ηγουμενίτσα	-0.0303	-0.0206	****	0.921568	1.070334	0.924370	1.611230	0.767309	1.112136	0.785343	0.576189
Καβάλα2	0.2734	0.2859	0.1090	****	1.191073	0.439035	1.607918	1.399924	1.138084	1.231771	1.308724
Σκιάθος	0.0772	-0.0215	-0.0505	0.2331	****	0.993201	1.536034	1.174072	1.017110	1.131668	1.180417
Πρέβεζα	0.2484	0.2048	0.0419	0.1999	0.1125	****	1.109348	1.309162	0.820048	0.802877	0.900051
Σαμοθράκη	0.0898	0.0293	0.2319	0.5133	0.1457	0.4393	****	0.1346194	1.328634	1.116119	0.984702
Τρίκερι	0.1809	0.0912	0.2850	0.5462	0.2794	0.5469	0.0487	****	0.711441	0.590635	0.865115
Θάσος	-0.1831	-0.0690	0.0352	0.2535	0.0305	0.2082	-0.0095	0.0266	****	0.687283	0.727795
Καβάλα1	-0.0444	-0.0241	0.0213	0.3060	0.0266	0.3324	0.1652	0.1822	0.0141	****	0.785343
Χαλκιδική1	0.0073	-0.0553	0.0291	0.2784	0.0275	0.2044	0.0522	0.0661	-0.0166	0.0602	****



Σχήμα 7. Neighbor-Joining/UPGMA δένδρογραμμα γενετικής απόστασης κατά Nei (1972) μεταξύ των μελετούμενων πληθυσμών.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν οι ακόλουθοι:

- α) να μελετηθεί ο ρυθμός αύξησης 11 πληθυσμών του είδους *Diplodus sargus* και
- β) να αναλυθούν γενετικά δεδομένα που αφορούν το συγκεκριμένο είδος και τα οποία προέκυψαν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της τεχνικής του μικροδορυφορικού DNA.

Εκείνο που πρέπει να τονισθεί είναι ότι παρόλο τους 11 πληθυσμούς που μελετήθηκαν, ο καθένας από αυτούς αποτελούνταν από διαφορετικό αριθμό ατόμων και συγκεκριμένα από **αρκετά μικρό αριθμό ατόμων, γεγονός το οποίο ίσως να επηρέασε ως ένα βαθμό τα συμπεράσματα** που παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία. Περισσότερα δεδομένα απαιτούνται προκειμένου να προκύψουν ασφαλή και γενικευμένα συμπεράσματα.

Η μελέτη του ρυθμού αύξησης στα άτομα των 11 ιχθυοπληθυσμών φανέρωσε 52 αρσενικά άτομα και 28 θηλυκά άτομα, ηλικίας 1+, 2+, 3+ και 4+. Ο υπολογισμός της ηλικίας με τη χρησιμοποίηση των ωτολίθων ήταν ιδιαίτερα ακριβής και σχετικά εύκολος. Στα είδη της οικογένειας Sparidae ο υπολογισμός της ηλικίας ήταν σχετικά δύσκολος ως αποτέλεσμα του φαινομένου της συγκέντρωσης των ζωνών ανάπτυξης στην άκρη του ωτόλιθου, ειδικά στα γηραιότερα ψάρια (Pajuelo and Lorenzo, 2002). Στους ωτόλιθους του είδους *Diplodus sargus cadenati* αποτίθεται κάθε χρόνο ένας διαφανής και ένας αδιαφανής δακτύλιος. Η εποχιακή αυτή εναπόθεση έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη *Diplodus* από τον Vigliola (1997) στη Μεσόγειο, από τους Pajuelo and Lorenzo (2002) στα Κανάρια Νησιά. Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες σε άλλα είδη της οικογένειας Sparidae όπως τα *Pagellus erythrinus*, *Pagrus pagrus* και *Spondyliosoma cantharus* (Pajuelo and Lorenzo, 1996, 1998, 1999).

Η σχέση μεταξύ μεσουραίου μήκους και ολικού βάρους μελετήθηκε ξεχωριστά στα αρσενικά και θηλυκά άτομα ενώ στις σχέσεις που προέκυψαν οι συντελεστές συσχέτισης ($r^2=0.985$ για τα αρσενικά και $r^2=0.901$ για τα θηλυκά) εκφράζονται πολύ ικανοποιητικά σε σχέση με τις αντίστοιχες συναρτήσεις. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τους Morato et al. (2001) οι οποίοι εξέτασαν σε 21 είδη ψαριών στο βορειοανατολικό Ατλαντικό τις σχέσεις μήκους - βάρους. Μεταξύ αυτών των ειδών μελέτησαν και το είδος *Diplodus sargus* και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι συντελεστές συσχέτισης για τη σχέση μήκους - βάρους στα αρσενικά άτομα, στα θηλυκά και στο σύνολό τους είναι αρκετά υψηλοί (0.961, 0.970 και 0.997 αντίστοιχα) ενώ οι συντελεστές παλινδρόμησης b έχουν τιμές κοντά στο 3 η οποία θεωρείται η ιδανική (3.032, 3.054 και 3.181 αντίστοιχα).

Όσον αφορά την ανάλυση των γενετικών δεδομένων, όλοι οι μικροδορυφορικοί δείκτες παρουσίασαν υψηλή γενετική ποικιλότητα με ένα σύνολο 114 αλληλομόρφων. Επίσης, ένα σημαντικό πλεονέκτημα των μικροδορυφόρων είναι ότι επιτρέπουν την αναγνώριση μοναδικών αλληλομόρφων. Τα 23 μοναδικά αλληλόμορφα που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία **θεωρούνται αρκετά σημαντικός αριθμός που έχει καταγραφεί ποτέ στη μελέτη του είδους.**

Ωστόσο, ένα άκρως σημαντικό σημείο της όλης εργασίας είναι το γεγονός ότι όλοι οι πληθυσμοί δεν ξεφεύγουν του νόμου Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2$; $p + q = 1$) (Lynch and Milligan, 1994). Δηλαδή βρίσκονται σε γενετική ισορροπία. Δε συνέβη το ίδιο όμως και στη μελέτη των **Lenfant and Planes (1996)**, οι οποίοι έχουν ασχοληθεί συστηματικά με το είδος *Diplodus sargus*. Στη μελέτη αυτή κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πληθυσμοί, αποτελούμενοι από 190 άτομα, αποκλίνουν σημαντικά από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Ο υψηλός βαθμός ετεροζυγωτίας που παρατηρήθηκε σε κάθε μικροδορυφορικό δείκτη [μέση αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e) 0.819] ήταν παρόμοια με εκείνη που μελετήθηκε στην εργασία των **Brown et al. (2005)** όπου στο είδος *Sparus aurata* είχε τιμή 0.897.

Η ετεροζυγωτία είναι ένα σημαντικό μέτρο της διαφοροποίησης του πληθυσμού σε γενετικό επίπεδο και έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον τόσο των οικολόγων όσο και των ιχθυολόγων (**Xu, et al., 2001**). Οι μελετηθέντες πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλά επίπεδα ετεροζυγωτίας (0.5583 - 0.9065) με κύριο χαρακτηριστικό οι περισσότεροι πληθυσμοί να έχουν έλλειψη ετεροζυγωτών, πολύ πιο υψηλά από εκείνα που έχουν κατά καιρούς προκύψει από την πρωτεϊνική ηλεκτροφόρηση σε άτομα του είδους *Diplodus sargus*. Οι **Gonzalez-Wanguemert et al. (2004)**, μελετώντας το ίδιο είδος στη βορειοδυτική Μεσόγειο, εντόπισαν υψηλά επίπεδα ετεροζυγωτίας (0.3138 - 0.4182) με μικρή, όμως, διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς ($F_{ST} = 0.004 - 0.01$).

Οργανισμοί όπως τα θαλάσσια ψάρια, που χαρακτηρίζονται από μεγάλους σε μέγεθος πληθυσμούς, έχουν μεγαλύτερες τιμές ετεροζυγωτίας σε σύγκριση με μικρότερους σε μέγεθος πληθυσμούς (**Gyllesten, 1985**). Επομένως, η υψηλή τιμή ετεροζυγωτίας πιθανόν να σημαίνει ότι το είδος, *Diplodus sargus*, έχει μια μακριά, αδιάσπαστη ιστορία στη Μεσόγειο Θάλασσα, ίσως, χωρίς φαινόμενα πληθυσμιακών στενωπών (**Mamouris et al. 1998**).

Ακόμη χαμηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας παρατηρήθηκαν στη μελέτη των **Bargelloni et al. (2005)** στα είδη *Diplodus puntazzo* (Cetti) και *Diplodus sargus* (L.) οι οποίες κυμάνθηκαν από 0.078 έως 0.089. Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση

ανάμεσα στο μιτοχονδριακό DNA και την πρωτεϊνική ηλεκτροφόρηση όπου διαπιστώθηκαν μεγάλες διαφορές στην πληθυσμιακή τους δομή.

Οι τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας οι οποίες κυμαίνονται από -0.1831 έως 0.5469 δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις μέχρι τώρα μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και στις οποίες εμφανίζονται χαμηλές τιμές του δείκτη. Οι **Lenfant and Planes (2002)** μελετώντας 1.306 άτομα του είδους *Diplodus sargus* κατέληξαν σε χαμηλές τιμές γενετικής παραλλακτικότητας (0.0018) παρά τη σημαντική γενοτυπική διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε ανάμεσα στους πληθυσμούς ($P < 0.0001$).

Χαμηλές τιμές του δείκτη παραλλακτικότητας (0.007) παρουσιάζονται και στην μελέτη του **Lenfant (2003)** ο οποίος ασχολήθηκε με τις δημογραφική και γενετική δομή του *Diplodus sargus* σε δύο θαλάσσιες περιοχές της Μεσογείου θάλασσας. Η γενετική διαφοροποίηση ήταν ασθενής και εμφανής μόνο σε έναν γενετικό τόπο από τους 26 που μελετήθηκαν.

Ένα σημείο ιδιαίτερης αναφοράς αποτελεί το γεγονός ότι οι δύο υψηλότερες τιμές του δείκτη παραλλακτικότητας παρατηρούνται ανάμεσα σε περιοχές του Αιγαίου και του Ιονίου πελάγους. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η μεγαλύτερη τιμή του F_{ST} είναι μεταξύ Πρέβεζας και Τρικεριού (0.5469) και ακολουθεί η τιμή 0.4393 ανάμεσα στην Πρέβεζα και τη Σαμοθράκη.

Η σχετικά υψηλή τιμή της γονιδιακής ροής ($N_m = 1.73$) που παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς σημαίνει ότι αυτοί χαρακτηρίζονται από έντονη γενετική ομοιογένεια. Αυτός ο υπολογισμός βασίζεται σε υποθέσεις, όπως η ενδογαμία, η ύπαρξη γενετικής ισορροπίας των πληθυσμών και τα ουδέτερα αλληλόμορφα (**Slatkin, 1985a; Waples, 1987; Slatkin and Barton, 1989; Cockerham and Weir, 1993**). Από την άλλη, οι υψηλές τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας υποδεικνύουν το επίπεδο της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών. Αυτό σημαίνει ότι στους πληθυσμούς παρατηρείται ένα είδος γονιδιακής ροής που πιθανόν να οφείλεται στη μετανάστευση των ενηλίκων ατόμων και τη μεταφορά των αυγών και των λαρβών με τα υπάρχοντα ρεύματα στις υπό μελέτη περιοχές, ή στην ύπαρξη υποπληθυσμών (τοπικών πληθυσμών).

Οι γενετικές αποστάσεις των μελετηθέντων πληθυσμών με τη μέθοδο **Nei (1972)**, απεικονιζόμενες με το δένδρογραμμα Neighbor-Joining/UPGMA, φανερώνουν τις σχέσεις των πληθυσμών. Δεν προκύπτει όμως ένδειξη συσχέτισης των γενετικών αποστάσεων με τις αντίστοιχες γεωγραφικές.

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).

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Λουκάς, Μ. Γ. (2003). Γενετική των Πληθυσμών, Τόμος Α', Στατική και Δυναμική Μελέτη των Πληθυσμών.
- Ζούρος Λ. και συνεργάτες (1995). Εξελικτική Βιολογία (του Douglas J. Futuyma), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Νεοφύτου Χρ. (1997). Ιχθυολογία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Παπαναστασίου Δ. (1976). Αλιεύματα, Τόμος Α, Εκδόσεις Ίων.

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Abou-Seedo, F., Wright, JM, Clayton, SDA. (1990). Aspects of the biology of *Diplodus sargus kotschy* (Sparidae) from Kuwait bay. *Cybiurn* 14:217-223.
- Adcock, G.J., Bernal Ramirez, J.H., Hauser, L., Smith, P., Carvalho, G.R. (2000). Screening of DNA polymorphisms in samples of archived scales from New Zealand snapper. *Journal of Fish Biology*, 56:1283-1287.
- Alarcon, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., Alvarez, M.C.(2004). Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 230: 65-80.
- Ambali, A. (1996). The relationship between domestication and genetic diversity of *Oreochromis* species in Malawi: *Oreochromis shiranus shiranus* (BOULENGER) and *Oreochromis shiranuschilwae* (TREWAVAS). Ph.D. thesis, Dalhousie University, Halifax, NS.
- Angers, B. and bernatchez, L. (1995). Usefulness of heterologous microsatellites obtained from brook charr, *Salvelinus fontinalis* Mitchill, in other *Salvelinus* species. *Molecular Ecology* 5(2):317.
- Artieri, C.G., Mitchell, L.A., Ng SHS (2006). Identification of the sex-determining locus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) on chromosome z. *Cytogenet. Genome Res.* 112(1-2):152-159.
- Bargelloni, L., Alarcon, J.A., Alvarez, M.C., Penzo, E., Magoulas, A., Palma, J., Patarnello, T. (2005). The Atlantic – Mediterranean transition : Discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 523-535.

- 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.
- 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.
- Barton NH, Slatkin, M. (1986). A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. Heredity 56: 409-415.
- Bishop, J.A. and Cook, L.M. (1980). Industrial melanism and the urban environment. Adv. Ecol. Res. 11:373-404. [4]
- 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. Mol. Ecol. 8: 1991-2001.
- Brooker, A.L, Cook, D., Bentzen, P., Wright, J.M. and Doyle, R.W. (1994). Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51: 1959-1966.
- Brown, R.C., Tsalavouta, M., Terzoglou, V., Magoulas and McAndrew, B.J. (2005). Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. Molecular Ecology Notes, 5:605-607.
- Castillo, A.G.F., Alvarez, P., Garcia-Vasquez, E. (2005). Population structure of *Merluccius merluccius* along Peninsula coast. ICES J. Mar. Sci. 62(8): 1699-1704.
- Cockerham, C.C., Weir, B.S. (1993). Estimation of gene flow from F-statistics. Evolution 47:855-863.
- Colbourne, SK., Neff, BD, Wright, SM (1996). DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT) microsatellites and its potential for assessment of mating success. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53(2):342-349.
- Crivello, J.F., Landers, D.F., Keser, M. (2005). The genetic stock structure of the American lobster (*Homarus americanus*) in Long Island Sound and the Hudson canyon. J. Shellfish Res 24(3): 841-848.
- Estoup, A., Presa, D., Krieg, F. (1993). (CT)(N) and (GT)(n) microsatellites-a new class of genetic-marker for *Salmo trutta* L.(Brown trout). Heredity 71:488-496 (Part 5).

- Estoup, A. Angers, B. (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: Carvalho, G.R. (Ed), Advances in Molecular Ecology, Nato Sciences Series A: Life Sciences vol. 306.IOS, Press, pp.55-86.
- 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.
- 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. Mar. Ecol. Prog. Ser., Vol.246:253-264.
- **FAO Fishery Statistic, 2000-2005.**
- Garcia de Leon, F.J., Chilki, L., Bonhomme, F. (1997). Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Molecular Ecology 6 : 51-62.
- Goff, D.J., Galvin, K., Katz, H., Westerfield, m., Lander, E.S., Tabin, C.J. (1992). Identification of polymorphic samples sequence repeats in the genome of the zebrafish. Genomics 14(1):200-202.
- Gonzalez-Wanguemert, M., Perez-Ruzafa, A., Marcos, C. and Garcia-Charton, J.A. (2004). Genetic differentiation of *Diplodus sargus* (Pisces:Sparidae) populations in the south-west Mediterranean. Biological Journal of the Linnean Society 82:249-261.
- Grobler, J.R., Kotze, A., Swart, H. (2005). The application of microsatellite DNA markers for forensic analysis of koi carp (*Cyprinus carpio*).S.Afr. j. Sci. 101 (1-2):19-21.
- Gyllesten, U. (1985). The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous and freshwater species. Journal of Fisheries Biology 26: 691-699.
- 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.). Mol. Ecol. 6: 469-474.
- 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.

- 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.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L., (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11: 424-429.
- 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.
- Jorgensen, H.B.H., Hansen, M.M., Loeschke, V. (2005). Spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.) in the southwestern Baltic Sea:do they form genetically distinct spawning waves? *ICES J. Mar. Sci.* 62(6): 1065-1075.
- Kamonrat, W. (1996). Spatial genetic structure of Thai silver barb, *Puntius gonionotus* (Bleeker) populations in Thailand. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. 193 p., Ph.D. dissertation.
- Kettlewell, H.B.D. (1973). The evolution of melanism. Clarendon, Oxford.[4]
- Langefors, A.H. (2005). Adaptive and neutral genetic variation and colonization history of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Environ. Biol. Fish* 74 (3-4) : 297-308.
- Lee, W-J, and Kocher, T.D. (1996). Microsatellite DNA markers for genotyping mapping in the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Submitted.
- Lenfant, P. (2002). Hétérozygotie et valeur sélective: le cas du poisson marin, *Diplodus sargus* (Linné, 1758). *C.R.Biologies* 325 :239-252.
- Lenfant, P. and Planes, S. (1996). Genetic differentiation of white sea bream within the Lion's Gulf and the Ligurian Sea (Mediterranean Sea). *Journal of Fish Biology* 49:613-621.
- Lenfant, P. and Planes, S. (2002). Temporal genetic changes between cohorts in a natural population of a marine fish, *Diplodus sargus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 76:9-20.
- Lenfant, P. (2003). Demographic and genetic structures of white sea bream populations (*Diplodus sargus*, Linnaeus, 1758) inside and outside a Mediterranean marine reserve. *C.R. Biologies* 326: 751-760.
- Lewontin, R.C. and Hubby, J.L. (1966). A molecular approach to the study of genetic variation in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54:595-609.

- Li, Q., Kijima, A. (2005). Segregation of microsatellite alleles in gynogenetic diploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Mar. Biotechnol.* 7(6):669-676.
- Ligny, W. de (1969). Seriological and biochemical studies in fish population. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 7:411-513.
- Linnaeus (1758). *Systema Naturae*, 10th edition.
- Liu, Y., Chen, S., Li, B. (2005). Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. *Aquaculture*, 243:103-111.
- Macpherson, E., Biagi, F., Francour, P., Garcia-Rubies, A., Harmelin, J., Harmelin-Vivien, M., Jouvenel, J., Planes, S., Vigliola, L., Tunesi, L. (1997). Mortality of juvenile fishes of the genus *Diplodus* in protected and unprotected areas in the western Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 160:135-147.
- Mamouris, 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.
- McConnell, S. K., Hamilton, L., Morris, D., Cook, D., Paquet, D., Bentzen, P. and Wright, J.M. (1995a). Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquaculture* 137: 19-30.
- Micale, V., Perdichizzi, F. (1994). Further studies on the sexuality of the hermaphroditic teleost *Diplodus sargus*, with particular reference to protandrous sex inversion. *Journal of Fish Biology*, 45:661-670.
- 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:
- Morales-Nin, B. (1986). ICSEAF Otolith interpretation guide: n°2. Horse Mackerel. *ICSEAF Special Publication, Madrid* 1986: 24pp.
- Morales-Nin, B. (1987). Influence of environmental factors on microstructure of otoliths of three demersal fish species caught off Namibia. *The Benguela and Comparable Ecosystems*. A.I.L. Payne, J.A. Gulland and K.H. Brinkd eds. *South African Journal Marine Science* 5: 255-262.

- Morato, T., Afonso, P., Lourinho, P., Barreiros, J.P., Santis, R.S., Nash, R.D.M. (2001). Length-weight relationships for 21 coastal fish species of the Azores, north-eastern Atlantic. *Fisheries Research* 50:297-302.
- 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.
- Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56-65.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- 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. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 281-293.
- 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. *Mol. Ecol.* 6: 487-492.
- Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Loechcke, V., (1999). Analysis of DANN from old scale samples: technical aspects, applications and perspectives for conservation. *Hereditas* 130: 265-276.
- O'Connell, M., Diellon, M.C., Wright, J.M. (1996a). Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasi*). *Mol. Ecol.* 7(3): 358-360.
- O'Connell, M., Wright, J.M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7: 331-363.
- O'Reily, P.T., McConnell, S.K., Hamilton, L.C., Wright, J.M. (1996). Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53(10):2292-2298.
- Olsen, J.B., Seeb, L.W., Bentzen, P., Seeb, J.E. (1998). Genetic interpretation of broad-scale microsatellite polymorphism in odd-year pink salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127: 535-550.

- Pajuelo, J.G., Lorenzo, J.M. (1996). Life history of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae) off the Canary Islands, central-east Atlantic. *Fish. Res.* 28: 163-177.
- Pajuelo, J.G., Lorenzo, J.M. (1998). Life history of the common pandora *Pagellus erythrinus* (Teleostei: Sparidae) off the Canary Islands, *Fish. Res.* 30: 1-30.
- Pajuelo, J.G., Lorenzo, J.M. (1999). Life history of the black seabream *Spondyliosoma cantharus* (Teleostei: Sparidae) off the Canary Islands, central-east Atlantic. *Env. Biol. Fish.* 54: 325-336.
- Pajuelo, J.G., Lorenzo, J.M. (2002). Growth and age estimation of *Diplodus sargus cadenati* (Sparidae) off the Canary Islands. *Fisheries Research* 59: 93-100.
- Panella, G. (1974). Otolith growth patterns: an aid in age determination in temperate and tropical fishes. Pages 28-29 in T.B. Bagelal, editor. *Ageing of fish*. Gresham press, Old Woking, England.
- Planes, S. and Lenfant, P. (2002). Temporal change in the genetic structure between and within cohorts of a marine fish, *Diplodus sargus*, induced by a large variance in individual reproductive success. *Molecular Ecology* 11:1515-1524.
- Raymond M., Rousset F. (1995). GenePop (version 1.2). Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86:248-429.
- Rico, C., Zadworny, D., Kuhnlein, U., Fitzegerald, G.J. (1993). Characterization of hypervariable microsatellite loci in the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Mol. Ecol.* 2(4):271-272.
- Rico, C., Rico, I., Hewitt, G. (1996). 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. Roy. Soc. B.* 263:549-557.
- Ruzzante, DE, Taggart, CT, Cook, C (1996). Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua*) off Newfoundland: Microsatellite DNA variation and antifreeze level. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53 (3): 634-645.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Highuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B. and Erich, H.A. (1988). Primer detected enzymatic amplification of DANN with a thermostable DANN polymerase. *Science.* 239:487-491.
- Sambrook J., Russel, DW. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.

- 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. *Mol.Ecol.* 8: 407-417.
- Sick, K. (1961). Haemoglobin polymorphism in fishes. *Nature*, London. 192:894-896.
- Slatkin, M. (1985). Gene flow in natural populations. *A. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393-430.
- Slatkin, M. (1985a). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- Slatkin, M., Barton, N.H. (1989). A comparison of three distinct indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349-1368.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O. (1993). Isolation and characterization of variable (GT)_N repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genet.* 24(3): 195-197.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O. (1995a). Genome mapping of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 137(1-4): 100-101.
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, O. (1995b). A polymorphic dinucleotide repeat microsatellite in Atlantic salmon, *Salmo salar* (SS)SL436). *Anim. Genet.* 26(5):368-368.
- Taggart, J.B., Verspoor, E., Galvin, P., Moran, P. and Ferguson, A. (1995b). A minisatellite DNA marker for discriminating between European and North American Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 2305-2311.
- Utter, F.M. (1991). Biochemical genetics and fishery management:an historical perspective. *J. Fish Biol.* 39 (Suppl. A): 1-20.
- Vigliola, L. (1997). Validation of daily increment formation in otoliths for three *Diplodus* species in the Mediterranean Sea. *J. Fish. Biol.* 51: 349-360.
- 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.
- Wassef EA, (1985). Comparative biological studies of four *Diplodus* species (Pisces:Sparidae). *Cybium* 9:203-215.
- Weir, BS., Cockerham, CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution* 38 (6): 1358-1370.
- Wendurg, J.K., Bentzen, P., Foote, C.J., (1998). Microsatellite analysis of population genetic structure in an endangered salmonid: the coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*). *Mol. Ecol.* 7: 733-749.

- Wright, J.M., Bentzen, P. (1994). Microsatellites: genetic markers for the future. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4: 384-388.
- Xu, Zh., Primavera, J.H., De la Pena, L.D., Pettit, P., Belak, J., Alcivar-Warren, A. (2001). Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199: 13-40.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Ι .Συχνότητες αλληλομόρφων όλων των πληθυσμών για τον μικροδορυφόρο SAI 10 όπου * μοναδικά αλληλόμορφα.

LOCUS	POPULATION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SAI 10											
(N)	6	10	16	6	6	5	6	2	4	4	11
171	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0833	0.1000	0.0000	0.2500	0.1250	0.0000	0.0000
173	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
175	0.0000	0.0000	0.0938	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455
179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
181	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0000	0.0000
183	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455
185	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250*	0.0000
187	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455
189	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
191	0.0833*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
193	0.0000	0.0000	0.0625	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0455
195	0.0833	0.1500	0.0938	0.1667	0.1667	0.2000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
197	0.0833	0.1000	0.0938	0.0833	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.1364
199	0.0833	0.0000	0.0313	0.0833	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.1364
201	0.0000	0.0000	0.0938	0.0833	0.1667	0.2000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0455
203	0.1667	0.2500	0.0938	0.3333	0.0000	0.1000	0.0000	0.2500	0.1250	0.1250	0.0909
205	0.0833	0.0500	0.0625	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.1250	0.1364
207	0.0000	0.0000	0.0625	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000
208	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500*	0.0000
209	0.0000	0.0500	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0455
211	0.0000	0.0500	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000
213	0.0833	0.1500	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.1364
215	0.0833	0.1000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.2500	0.2500	0.0000	0.0909
219	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
221	0.0833	0.0000	0.0313	0.0000	0.2500	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
225	0.1667	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
227	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
237	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500*	0.0000	0.0000	0.0000

Πίνακας Π. Συχνότητες αλληλομόρφων όλων των πληθυσμών για τον μικροδορυφόρο SAI 12 όπου * μοναδικά αλληλόμορφα.

LOCUS	POPULATION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SAI 12											
(N)	6	10	16	6	6	5	6	2	4	4	11
115	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000*	0.0000	0.0000	0.0000
119	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000
121	0.0833	0.0500	0.2188	0.2500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
123	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.1250	0.0000
124	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455*
125	0.0000	0.0500	0.0313	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.2500	0.1250	0.0000	0.0455
127	0.1667	0.5000	0.1875	0.1667	0.1667	0.4000	0.4167	0.0000	0.2500	0.1250	0.3182
129	0.0000	0.0500	0.0938	0.0833	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0909
131	0.1667	0.0500	0.0313	0.2500	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.2500	0.0000	0.0455
133	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909
135	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.1000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909
137	0.0833	0.1000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000
139	0.1667	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0455
141	0.0000	0.0500	0.0313	0.0000	0.0833	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909
143	0.0833	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.1250	0.1364
145	0.0000	0.0500	0.0313	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
147	0.0833	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
149	0.0000	0.0500	0.1250	0.0000	0.0833	0.1000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
151	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000
153	0.0000	0.0500	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
155	0.0000	0.0000	0.0313	0.0833	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
161	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
165	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0000
171	0.0000	0.0000	0.0313*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
177	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
181	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Πίνακας III. Συχνότητες αλληλομόρφων όλων των πληθυσμών για τον μικροδορυφόρο Pma1 όπου * μοναδικά αλληλόμορφα.

LOCUS	POPULATION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Pma1											
(N)	6	10	16	6	6	5	6	2	4	4	11
137	0.0000	0.0000	0.0625	0.2500	0.0000	0.2000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000
139	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.2000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.1818
141	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.5000	0.1667	0.0000	0.6250	0.2500	0.0909
143	0.0000	0.1000	0.1563	0.2500	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455
145	0.0833	0.3000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000
151	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
153	0.0833	0.0500	0.0625	0.2500	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.2500	0.0000	0.0000
155	0.0000	0.0500	0.0313	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
157	0.0000	0.0500*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
159	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1667	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000
161	0.0000	0.1000	0.0625	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.0455
163	0.0833	0.0500	0.0625	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000
165	0.0000	0.1500*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
167	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0909
169	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455
171	0.0833	0.0000	0.1250	0.0000	0.0833	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000
173	0.0833	0.0000	0.0313	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
175	0.0000	0.0500	0.0313	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
177	0.1667	0.0000	0.0625	0.0000	0.0000	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455
179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.1364
181	0.0000	0.0000	0.0625	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1364
183	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
187	0.0000	0.0000	0.0313	0.0833	0.0833	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
189	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
191	0.0000	0.1000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
193	0.1667	0.0000	0.0625	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1818
195	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
199	0.0833	0.0000	0.0313	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
215	0.0000	0.0000	0.0313*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Πίνακας IV. Συχνότητες αλληλομόρφων όλων των πληθυσμών για τον μικροδορυφόρο Pma2 όπου * μοναδικά αλληλόμορφα.

LOCUS	POPULATION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Pma2											
(N)	6	10	16	6	6	5	6	2	4	4	11
131	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500*	0.0000	0.0000
137	0.0000	0.0556	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000
139	0.0000	0.0000	0.0625	0.0000	0.0000	0.2000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000
141	0.0000	0.0000	0.0625	0.1667	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.1250	0.1250	0.0000
143	0.0000	0.0000	0.1563	0.0000	0.0833	0.1000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0000	0.0909
145	0.0833	0.0000	0.0313	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909
147	0.1667	0.0556	0.0625	0.0833	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000	0.0000	0.2500	0.1364
149	0.0833	0.1111	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0455
151	0.1667	0.1111	0.0313	0.0833	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
153	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0833	0.1000	0.1667	0.0000	0.1250	0.1250	0.0000
155	0.1667	0.1667	0.0313	0.0833	0.0833	0.1000	0.0000	0.5000	0.0000	0.0000	0.0909
157	0.1667	0.1111	0.0000	0.0833	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
159	0.0000	0.0000	0.1250	0.0000	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1250	0.0455
161	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909
163	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455
165	0.0000	0.0556	0.1875	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0000	0.0000	0.1364
167	0.0000	0.0000	0.0625	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
169	0.0833	0.1111	0.0000	0.0000	0.0833	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
171	0.0000	0.0000	0.0000	0.1667	0.0833	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0000
175	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1667	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
177	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833	0.1667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
179	0.0000	0.0000	0.0625	0.0000	0.0833	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455
181	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0833*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
185	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909*
187	0.0000	0.0000	0.0313*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
189	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909*
193	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1667*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
195	0.0000	0.0556*	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
199	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500*	0.0000	0.0000	0.0000
207	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
209	0.0000	0.0000	0.0313	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

