

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μοριακοί δείκτες και παρασιτικό φορτίο σε ψάρια εμπορικής αξίας**

**Αραμπατζή – Ζιάμου Δανάη**

Βόλος 2016

**«Μοριακοί δείκτες και παρασιτικό φορτίο σε ψάρια εμπορικής αξίας»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

- 1. Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Μόνιμος Αναπληρωτής Καθηγητής- Γενετική υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
- 2. Ελένη Γκολομάζου**, Λέκτορας - Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
- 3. Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια - Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

### Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέπων της εργασίας αυτής, κ. Εξαδάκτυλο Αθανάσιο καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τις Γκολομάζου Έλενα και Παναγιωτάκη Παναγιώτα για την πολύτιμη βοήθειά τους, τη διαρκή υποστήριξή τους και για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας,. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας στο ψάρι *Diplodus puntazzo* με στοιχεία αρμοστικότητας, όπως είναι η παρασιτολογική ασθένεια εντερομύξωση, καθώς και δεκαπέντε ακόμα μορφολογικές παράμετροι. Η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την παρασίτωση, βασίζεται στην έγκαιρη διάγνωση του παθογόνου παράγοντα *Enteromyxum leei*, χρησιμοποιώντας ευαίσθητες διαγνωστικές μεθόδους, όπως οι μοριακές τεχνικές και θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμη παράμετρο στην επιλογή γεννητόρων στις μονάδες εντατικής εκτροφής. Για τη συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα (HFC) υπολογίστηκαν οι μικροδορυφορικοί δείκτες *het\_Obs*, *IR*, *st. het\_Exp*, *st. het\_Obs*, *st. d-sqd* και *HL*, για την εύρεση του συντελεστή της ομομιξίας, ενώ ως δείκτης αρμοστικότητας χρησιμοποιήθηκε η ένταση παρασίτωσης και μορφολογικές παράμετροι. Πιο συγκεκριμένα, μετρήθηκαν στοιχεία αρμοστικότητας όπως, το ολικό σωματικό βάρος, η απόσταση μετά την κόγχη, η απόσταση μεταξύ του οφθαλμού και του ρύγχους, η διάμετρος του οφθαλμού, η απόσταση μετά την κόγχη, το μήκος του κεφαλιού, το μήκος των θωρακικών πτερυγίων, η απόσταση μέχρι το ραχιαίο πτερύγιο, το ύψος των ραχιαίων πτερυγίων, το μήκος της βάσης των ραχιαίων πτερυγίων, το μέγιστο ύψος των δειγμάτων, το μήκος βάσης των εδρικών πτερυγίων, το ύψος των εδρικών πτερυγίων, το ελάχιστο ύψος των ατόμων, το μήκος του ουραίου μίσχου, καθώς και το σταθερό μήκος δειγμάτων *D. puntazzo* με παρουσία και απουσία παρασίτων *E. leei*. Η απομόνωση του ολικού DNA πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφορμίου, ενώ για την μέθοδο της PCR χρησιμοποιήθηκε Multiplex PCR Kit και οι συνθήκες της μεθόδου ρυθμίστηκαν στους 95° C για 15 λεπτά και πραγματοποίησε 30 κύκλους. Στην ένταση της παρασίτωσης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική

συσχέτιση με την ετεροζυγωτία υπολογίζοντας τον μικροδορυφορικό δείκτη IR, ενώ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με 11 από τις μορφολογικές παραμέτρους, υποδηλώνοντας την αντοχή της χλόνας στην παρασίτωση.

**Λέξεις κλειδιά:** HFC, *E. leei*, μορφολογικά χαρακτηριστικά, μικροδορυφόροι

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Η σημασία της συσχέτισης ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα για τις Υδατοκαλλιέργειες.....	1
1.2. Σχέση γονιδίων με μορφολογικά χαρακτηριστικά- αρμοστικότητα.....	6
1.3. Συσχέτιση ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα (Heterozygosity- fitness correlation, HFC) .....	7
1.4. Θεωρίες και υποθέσεις για το HFC.....	9
1.5. HFC και μοριακοί δείκτες.....	10
1.6. Αρμοστικότητα (Fitness).....	13
1.7. Εφαρμογές μικροδορυφόρων.....	14
1.8. Εφαρμογές μικροδορυφόρων στην οικογένεια Sparidea.....	16
1.9. Σκοπός παρούσας μελέτης.....	17
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	18
2.1. Επιλογή δειγμάτων.....	18
2.2. Απομόνωση ολικού DNA και PCR.....	20
2.3. Στατιστική ανάλυση.....	21
3. Αποτελέσματα.....	22
3.1. Διασπορά αριθμού παρασίτων με μικροδορυφορικούς δείκτες.....	22
3.2. Στατιστική ανάλυση.....	24
4. Συζήτηση.....	28
5. Βιβλιογραφία.....	32

## Εισαγωγή

### 1.1. Η σημασία της συσχέτισης ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα για τις Υδατοκαλλιέργειες

Οι υδατοκαλλιέργειες περιλαμβάνουν την εντατική εκτροφή ιχθύων, δίθυρων και μαλακίων, υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Αποτελούν τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο τομέα παραγωγής τροφίμων, εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης των ιχθύων. Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα ξεκίνησαν από το 1951, στην προσπάθεια εμπλουτισμού των ορεινών ρέοντων υδάτων με την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), ενώ τώρα είναι από τις πιο δυναμικές χώρες στην μεσόγειο για την εντατική εκτροφή τσιπούρας και λαβρακιού (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος 2010). Η εντατική εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών είχε ραγδαία ανάπτυξη κατά την αρχή του εικοστού αιώνα παγκοσμίως. Πιο συγκεκριμένα, στην Ελλάδα αναπτύχθηκε ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας εξαιτίας των ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών που επικρατούν και της αυξημένης αλιευτικής πίεσης που δέχονταν τα ιχθυαποθέματα (Φώτης & Αγγελίδης, 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύρια είδη εκτροφής στην Ελλάδα είναι η τσιπούρα και το λαβράκι με συνολική παραγωγή περίπου 120.000 τόνους το 2004. Το ποσό αυτό αντιπροσωπεύει το 49% της συνολικής παραγωγής των Μεσογειακών χωρών (Παπουτσόγλου 2008).

Η χιόνα ή μυτάκι (*Diplodus puntazzo*, Walbaum, 1792) είναι ένα από τα νέα σχετικά εκτροφόμενα είδη της οικογένειας Sparidae και οι συνθήκες εκτροφής της είναι παρόμοιες με αυτές της τσιπούρας (Καρακατσούλη *et al.*, 2011). Έχει αποδειχθεί (Παπαφωτίου *et al.*, 2008) ότι η συνεκτροφή του είδους της χιόνας με τη τσιπούρα είναι αναγκαία, κυρίως για τα πρώτα στάδια εκτροφής της χιόνας, εφόσον παρατηρήθηκε



καλύτερος ρυθμός ανάπτυξης, όταν η αναλογία τσιπούρας- χιώνας ήταν 60- 40 αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε στις τριάντα πρώτες ημέρες του πειράματος ποσοστό θνησιμότητας περίπου 6% για το μυτάκι, ενώ μέχρι το πέρας του πειράματος το ποσοστό αυτό μειώθηκε αισθητά και σταθεροποιήθηκε ( $P > 0,05$ ).

Εξαιτίας της μεγάλης και ταχείας ανάπτυξης των υδατοκαλλιιεργειών, έχουν δημιουργηθεί αρκετά προβλήματα στις μονάδες εντατικής εκτροφής από νοσήματα. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν νοσήματα που οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, σε ιούς, βακτήρια, παράσιτα, μύκητες, αλλά και σε διατροφικά σφάλματα και νεοπλάσματα. Για αυτό το λόγο κρίνεται αναγκαία η επίλυση αυτών των προβλημάτων, που προκαλούν μεγάλες ζημιές στις υδατοκαλλιέργειες (Coscelli *et al.* 2014). Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που αφορούν την ανίχνευση, αντιμετώπιση και πρόληψη των ασθενειών, αλλά ο κλάδος της ιχθυοπαθολογίας είναι ακόμα στο στάδιο της εξέλιξης. Συνεπώς, απαιτείται η συνεχής μελέτη και έρευνα των νοσημάτων, με σκοπό την επίλυση των προβλημάτων, όπως είναι η μεταφορά των παθογόνων οργανισμών από τα ψάρια εντατικής εκτροφής προς το περιβάλλον, καθώς και οι οικονομικές ζημιές της ιχθυομονάδας, εξαιτίας του γεγονός ότι τα μολυσμένα ψάρια τις περισσότερες φορές είναι αντιαισθητικά και απρόσιτα για τους καταναλωτές (Zhanga *et al.* 2014). Εξαιτίας της μεγάλης ανάπτυξης της υδατοκαλλιέργειας, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την πρόληψη και την καταπολέμηση των ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια. Η γνώση της ιχθυοπαθολογίας είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση των ασθενειών, αλλά και για την προστασία της δημόσιας υγείας από τα νοσήματα των ψαριών, τα οποία μεταδίδονται στον άνθρωπο (Φώτης & Αγγελίδης, 2003).

Η διάγνωση από τα εξωτερικά εμφανή συμπτώματα είναι δύσκολη εξαιτίας των παρόμοιων συμπτωμάτων που παρουσιάζουν οι περισσότερες από τις ασθένειες των ψαριών (Antuofermo *et al.* 2014). Συνεπώς, πολλές φορές, όταν πλέον εκδηλωθεί η ασθένεια, είναι αργά για οποιαδήποτε ενέργεια. Ακόμη, τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες που προκαλούν τέτοια προβλήματα, υπάρχουν ούτως ή άλλως στο περιβάλλον, ως μέρος της φυσικής χλωρίδας και πανίδας του, χωρίς να προκαλούν σημαντικές επιπτώσεις στους οργανισμούς, εξαιτίας της μικρής ιχθυοπυκνότητας (Angelidis *et al.*, 2008). Παρ' όλα αυτά, όταν πραγματοποιηθούν αλλαγές στις συνθήκες του νερού (όπως αλλαγές θερμοκρασίας, pH, κ.λπ.), δημιουργείται καταπόνηση στα ψάρια με αποτέλεσμα να γίνονται ευάλωτα σε τέτοιες παθήσεις. Εφόσον αρκετές ασθένειες έχουν σαν συνέπεια την μεγάλη θνησιμότητα, η έγκαιρη διάγνωση αυτών είναι αρκετά σημαντική, εξαιτίας της οικονομικής ζημίας των μονάδων εκτροφής (Zhang *et al.* 2014). Με άλλα λόγια, η έγκαιρη διάγνωση του παθογόνου παράγοντα με τη χρήση γρήγορων, αξιόπιστων και ευαίσθητων διαγνωστικών μεθόδων φαίνεται να αποτελεί το καλύτερο μέτρο πρόληψης και αντιμετώπισης των ασθενειών σε οποιοδήποτε στάδιο της εκτροφής (Jimenez *et al.*, 1988). Η εφαρμοσμένη έρευνα στη βιολογία, στη διατροφή και στην ιχθυοπαθολογία των εκτρεφόμενων ειδών είναι σε πρωτογενές επίπεδο σε σχέση με την έρευνα στη βιολογία και στην παθολογία άλλων παραγωγικών ζώων. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω έρευνα νέων τεχνικών με ικανοποιητικούς ρυθμούς, έτσι ώστε να μπορεί να υποστηρίξει την αλματώδη ανάπτυξη του κλάδου σε παραγωγικό επίπεδο (Πράπας *et al.*, 2000)

Οι μοριακές τεχνικές στοχεύουν στην ταχεία ταυτοποίηση των ασθενειών, εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητάς τους. Η PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερασης- Polymerase Chain Reaction) είναι η βασικότερη μοριακή τεχνική.

Αρχικά η PCR τεχνολογία συνδύασε τον κύκλο του DNA για τον πολλαπλασιασμό του, με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (Tarasevich *et al.*, 2003). Η εφαρμογή της στην ιολογία περιλαμβάνει τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιικά φάρμακα, τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου μαζί με την ανίχνευση του ιού. Στην βακτηριολογία οι μοριακές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για τη μελέτη της αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά, την ανίχνευση απαιτητικών ή βραδέως αναπτυσσομένων βακτηρίων και στην ταχεία ανίχνευση των σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων, ακόμα και μετά από χορήγηση αντιβιοτικών. Τέλος, στην παρασιτολογία και μυκητολογία έχουν επίσης εφαρμοστεί οι μοριακές τεχνικές για την ταχεία διάγνωση λοιμώξης (Peruski *et al.*, 2003).

Πιο συγκεκριμένα, μέχρι και τον προηγούμενο αιώνα, οι παραδοσιακές μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση παθογόνων στηρίζονταν αποκλειστικά στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του οργανισμού. (Norqvist *et al.*, 1990 & Vendrell *et al.*, 2006). Η τεχνολογία ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων έχει δημιουργήσει νέες προοπτικές στη διάγνωση και ταυτοποίηση και παρατηρείται ότι οι μοριακές μέθοδοι έχουν πλέον υπερβεί τις παραδοσιακές μεθόδους διάγνωσης για την πλειονότητα των παθογόνων (Persing, 1991). Η ευρεία χρήση της PCR οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς εναλλακτικών τεχνικών που επιτρέπουν επίσης την ειδική ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων, όπως η LMA (ligation-mediated amplification) και η TBA (transcription-based amplification) (Wu & Wallace, 1989). Με τη σειρά τους, αυτές οι τεχνικές τελειοποιήθηκαν, με αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων όπως η TMA (transcription-mediated amplification), η NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), η LCR (ligase chain reaction), η SDA (strand displacement amplification), η LLA (linear linked amplification) και η LAMP (loop mediated isothermal amplification)

(Arampatzi- Ziamou *et al.*, 2014), που αποτελούν διαφορετικές προσεγγίσεις βελτιστοποίησης της ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων (Kwoh *et al.*, 1989). Η βασική τεχνική της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων. Απαιτείται η παρουσία ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων που προσδένονται στους δύο κλώνους της αλληλουχίας- στόχου (Eisenstein, 1990). Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια: το πρώτο στάδιο είναι η αποδιάταξη του DNA, κατά την οποία η διπλή έλικα του DNA-στόχου αποδιατάσσεται. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την υβριδοποίηση των εκκινήτων, που πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, στην οποία οι εκκινήτες υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο τους. Τέλος, είναι η επιμήκυνση της αντίδρασης, στην οποία η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινήτων με κατεύθυνση 5'-3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινήτες. Στο τέλος του κάθε κύκλου, η ποσότητα των προϊόντων της PCR θεωρητικά διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 30 περίπου κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου (White *et al.*, 1992). Στο σύστημα PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, R-T PCR) χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο καθώς και μια κάμερα CCD για την παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων ενίσχυσης μέσα σε κλειστό σωλήνα αντίδρασης (Higuchi *et al.*, 1992). Τέλος, η MLMT (multilocus microsatellite typing) (Πολυεστιακή τυποποίηση με μικροδορυφορικές αλληλουχίες) είναι μια μοριακή τεχνική μεγάλης διακριτικής ικανότητας που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή πληθυσμιακών και γενετικών μελετών, όπως για παράδειγμα

επιδημιολογικές μελέτες για τον παθογόνο μύκητα *Penicillium marneffei* και το παράσιτο *Leishmania donovani* (Gouzelou *et al.*, 2012). Σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής MLMT είναι ότι, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, επιτρέπει την περαιτέρω διαφοροποίηση στελεχών στα ευκαρυωτικά παθογόνα (Schonian *et al.*, 2011). Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες είναι περιοχές επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών μοτίβων 1–6 ζευγών βάσεων, οι οποίες μεταλλάσσονται με ταχύτερους ρυθμούς από το υπόλοιπο γονιδίωμα, μεταβάλλοντας κυρίως τον αριθμό των επαναλήψεών τους. Η φυσική επιλογή δεν επηρεάζει την εξέλιξη των μικροδορυφορικών αλληλουχιών και τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι επαναλήψιμα. Ο πολυμορφισμός αυτός εξετάζεται στα υπό μελέτη δείγματα με PCR με τη χρήση εκκινητών που υβριδοποιούνται πριν και μετά από τις αλληλουχίες των εν λόγω περιοχών. Το προϊόν είτε αλληλουχεύεται, για μεγαλύτερη ακρίβεια, είτε ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα υψηλής διακριτικής ισχύος (Fisher *et al.*, 2004).

### 1.2. Σχέση γονιδίων με μορφολογικά χαρακτηριστικά- αρμοστικότητα

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες που σχετίζουν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εκτρεφόμενων οργανισμών με την έκφραση συγκεκριμένων αλληλουχιών στο DNA. Πιο συγκεκριμένα, έχει γίνει αναφορά στην επίδραση της ηλικίας και του διατροφικού προφίλ στην έκφραση γονιδίων του λευκού μυός της τσιπούρας (Γεωργίου *et al.*, 2012). Επιπλέον, έχει μελετηθεί η σχέση του ρυθμού αύξησης ψαριών Zebrafish με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της σωματικής αύξησης και του μεταβολισμού. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες ατόμων zebrafish τα οποία προέρχονταν από τους ίδιους γεννήτορες, ίδιας ηλικιακής κλάσης αλλά με διαφορετικό ολικό μήκος, και έπειτα από την απομόνωση του ολικού RNA μελετήθηκε η ποσοτική

έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση της σωματικής αύξησης και του μεταβολισμού με τη μέθοδο της Real time PCR (Κοΐνης Α. *et al.*, 2012). Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη που συσχετίζει τη θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιείται η ανάπτυξη των νεαρών ατόμων με το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης του zebrafish (Συμεωνίδη Δ., 2011). Κατά τη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού RNA από άτομα zebrafish και ακολούθησε υβριδοποίηση σε ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες Affymetrix με περίπου δεκαπέντε χιλιάδες αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες γονιδίων. Συμπερασματικά, αποδεικνύεται η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων. Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί κάποια από τα διαθέσιμα μοριακά και γονιδιωματικά «εργαλεία» που υπάρχουν στην τσιπούρα, όπως δύο γενετικοί χάρτες σύνδεσης αποτελούμενους από 204 μικροδορυφορικούς δείκτες και 324 μοριακοί δείκτες (Franch *et al.*, 2006), έτσι ώστε να διεξαχθεί μελέτη ανίχνευσης των γονιδιακών τόπων (QTL) που επηρεάζουν το σωματικό βάρος, το φύλο καθώς και 18 ακόμη μορφομετρικούς χαρακτήρες. Τέλος, με βάση την QTL ανάλυση αποδεικνύεται η ύπαρξη γονιδιακών τόπων που επηρεάζουν την ανάπτυξη της τσιπούρας, συνεπώς, καταδεικνύεται η δυναμική της συγκριτικής γονιδιωματικής στη στοχευμένη μελέτη εντοπισμού QTL σε περιοχές του γονιδιώματος (Loukonitis, 2013).

### 1.3. Συσχέτιση ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα (Heterozygosity- fitness correlation, HFC)

Όταν διασταυρώνονται διαφορετικοί πληθυσμοί ενός καλλιεργούμενου φυτού ή ζώου, συχνά παρατηρείται αύξηση της παραγωγής. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως ετέρωση (heterosis). Το αντίστροφο ισχύει για τους απογόνους από διασταυρώσεις μεταξύ συγγενών μέσα σε έναν πληθυσμό, οι οποίοι συχνά έχουν μειωμένο σφρίγος,

φαινόμενο γνωστό ως ομομικτική κατάπτωση (inbreeding depression) (Vogel & Motulsky, 1997). Τόσο η ετέρωση όσο και η ομομικτική κατάπτωση είναι γνωστά φαινόμενα από τον Δαρβίνο, ο οποίος πραγματοποίησε αρκετά πειράματα επί της ομομικτικής κατάπτωσης. Ο συντελεστής ομομιξίας (inbreeding coefficient,  $F$ ) ενός ατόμου σχετίζεται με την επιβίωσή του μέχρι την ενηλικίωση (Falconer & Mackay, 1995). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί (Lynch *et al.*, 1999) ότι στον πληθυσμό των σπουργιτιών του Μαντάρτ υπάρχει ετέρωση. Οι απόγονοι εποίκων από την ηπειρωτική χώρα που ζευγαρώνουν με ιθαγενή σπουργίτια είχαν υψηλότερη αρμοστικότητα. Τα θηλυκά της πρώτης γενιάς απέθεσαν τα αυγά τους νωρίτερα από τα ιθαγενή και τα αρσενικά είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να ζευγαρώσουν. Παρόμοιες αυξήσεις της αρμοστικότητας έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις τόσο σε φυτά όσο και σε ζώα (David P., 1998).

Συσχετίσεις μεταξύ της ετεροζυγωτίας και των συνιστωσών της αρμοστικότητας μπορούν να παρατηρηθούν εύκολα με τη χρήση των μικροδορυφόρων (Forstmeier *et al.*, 2012 & Chapman *et al.*, 2009). Συνεπώς, η ετεροζυγωτία είναι πιθανό να υποδηλώνει το συνολικό επίπεδο ομομιξίας ενός ατόμου, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι συσχετίσεις της με συνιστώσες της αρμοστικότητας μπορούν να αποτελούν έναν έμμεσο τρόπο μέτρησης της ομομικτικής κατάπτωσης (Vogel & Motulsky, 1997). Για παράδειγμα, η επιβίωση των προβάτων που ζουν απομονωμένα στη Σκωτία επηρεάζεται από την ετεροζυγωτία. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί (Lynch *et al.*, 1999) ότι η επιβίωση των μικρών όσο και των μεγάλων προβάτων αυξάνεται σημαντικά με την ετεροζυγωτία, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα ομομικτικά πρόβατα είναι πιο ευάλωτα σε νηματώδεις σκώληκες που παρασιτούν στο πεπτικό τους σύστημα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ομομικτική κατάπτωση εκδηλώνεται κυρίως μέσω της

διακύμανσης στην ανθεκτικότητα των ατόμων στα παράσιτα. Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί (Taylor et al., 2010) η σχέση της ετεροζυγωτίας με την πιθανότητα ζευγαρώματος του σπουργιτιού (*Melospiza melodia*) ως δείκτης αρμοστικότητας.

Η κατανόηση της δράσης της φυσικής επιλογής στους πληθυσμούς είναι ένας σημαντικός στόχος για την εξελικτική βιολογία. Αρκετές φορές το αντικείμενο αυτό καλύπτεται από τη μελέτη φαινοτύπων χρησιμοποιώντας ποσοτική γενετική ανάλυση, ενώ το γονιδιακό επίπεδο μελετάται κυρίως μέσω μοριακών τεχνικών (Schonian et al., 2011). Μία ακόμα λιγότερο απαιτητική μέθοδος είναι η μελέτη της συσχέτισης των μοριακών γονότυπων με των χαρακτηριστικών επιλογής σε πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί συσχέτιση μεταξύ πολλών θέσεων ετεροζυγωτίας και διαφόρων χαρακτηριστικών αρμοστικότητας χρησιμοποιώντας αλλοένζυμα ή μικροδορυφορικούς τόπους (Szulkin et al., 2010). Έχουν αναγνωριστεί αρκετές στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ ετεροζυγωτίας και διαφόρων χαρακτηριστικών των φυτών, των σπονδύλων και των θαλάσσιων μαλακίων (David P., 1998). Αρκετές μελέτες, τόσο σε φυτά όσο και σε ζώα, υποδεικνύουν μια θετική σχέση μεταξύ της ετεροζυγωτίας και των διάφορων χαρακτηριστικών της αρμοστικότητας (fitness) (David P., 1998 & Lynch et al., 1999).

#### 1.4. Θεωρίες και υποθέσεις για το HFC

Υπάρχουν δύο πιθανά αίτια της ομομικτικής κατάπτωσης. Η υπερεπικράτηση θα μπορούσε να διατηρεί τους πολυμορφισμούς σε πολλούς γενετικούς τόπους, οπότε τα ομομικτικά άτομα θα εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοζυγωτία σε αυτούς τους τόπους και έτσι θα έχουν μειωμένη αρμοστικότητα. Εναλλακτικά, εάν υπάρχουν στον πληθυσμό επιβλαβή υπολειπόμενα αλληλόμορφα, οι διασταυρώσεις μεταξύ συγγενών θα τείνουν να τα φέρουν σε ομόζυγη κατάσταση, μειώνοντας και πάλι την αρμοστικότητα



(Falconer & Mackay, 1995). Οι ίδιες ερμηνείες ισχύουν και για την ετέρωση. Από τη μία πλευρά, εάν δύο πληθυσμοί έχουν καθηλώσει διαφορετικά αλληλόμορφα σε υπερεπικρατείς τόπους, τα μεταξύ τους υβρίδια της πρώτης γενιάς θα έχουν μεγαλύτερη αρμοστικότητα. Από την άλλη, εάν τα επιβλαβή υπολειπόμενα βρίσκονται σε διαφορετικές συχνότητες μέσα στο πληθυσμό, είναι λιγότερο πιθανό να γίνουν ομόζυγα στα υβρίδια (Barton et al., 2007).

Με σκοπό να ερμηνευτούν οι δράσεις της συσχέτισης της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα έχουν προταθεί τρεις υποθέσεις. Κατά την πρώτη, *effect hypothesis*, παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα, εξαιτίας της ομομιξίας και της ομομικτικής κατάπτωσης. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για αυτήν την υπόθεση δεν είναι ειδικοί για την περιοχή που προκαλεί την ομομικτική κατάπτωση, αλλά είναι ουδέτεροι για την περιοχή της ετεροζυγωτίας (Hansson & Westerberg, 2002). Κατά την δεύτερη υπόθεση, *local-effect hypothesis*, υποστηρίζεται ότι η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα συμβαίνει εξαιτίας της αρνητικής επίδρασης της ομομιξίας (Chistiakow *et al.*, 2006). Τέλος, η τρίτη υπόθεση *direct-effect hypothesis* υποστηρίζει την συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα με άμεση επίδραση σε συγκεκριμένες περιοχές (Hoglund, 2009).

### 1.5. HFC και μοριακοί δείκτες

Αν και η χρήση των μοριακών δεικτών είναι ο βασικός τρόπος μελέτης μεταξύ των εξελικτικών βιολόγων και οι μέθοδοι ανάλυσης γενετικών δεδομένων βρίσκεται σε ταχεία ανάπτυξη, υπάρχει έλλειψη ενός οργανωμένου πλαισίου για τους επιστήμονες (Chenuil, 2006). Οι μοριακοί δείκτες καθορίζονται από δύο συνιστώσες. Η πρώτη είναι

η περιοχή του DNA που πρόκειται να καλύψουν, και η δεύτερη είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται για την εύρεση της διαφοροποίησης (Goldstein *et al.*, 1995). Τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου μοριακού δείκτη είναι το επίπεδο της διαφοροποίησης, τη φύση της πληροφορίας, η οποία πρέπει να προσδιορίζεται ανάλογα με το επιστημονικό ερώτημα, και τέλος πρακτικά κριτήρια, τα οποία έχουν να κάνουν με τον εξοπλισμό που διαθέτει το κάθε εργαστήριο καθώς και με την εμπειρία του κάθε ερευνητή (Παπαϊωάννου, 2010). Παλιά, οι συχνότεροι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνταν ευρέως ήταν ο πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικού θραύσματος (RFLP), ο τυχαίος πολλαπλασιασμός πολυμορφικού DNA (RAPD), καθώς και η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. Η μέθοδος RFLP βασίζεται στην παραγωγή διαφορετικού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων έπειτα από την πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα (Botstein *et al.*, 1980). Η μέθοδος RAPD βασίζεται στο διαφορετικό πολλαπλασιασμό, με τη βοήθεια της PCR, τυχαίων αλληλουχιών ενός δείγματος DNA με εκκινητές που αποτελούνται από μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, συνήθως των 8 με 10 βάσεων (Williams *et al.*, 1990). Τέλος, η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών είναι ένα σύστημα μοριακών δεικτών βασισμένο στην υπάρχουσα ποικιλότητα των πρωτεϊνών που επιτελούν ταυτόσημη λειτουργία αλλά διαφέρουν ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Παρ' όλα αυτά, κατά τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται αρκετά οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες. Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο DNA ενός μέχρι πέντε νουκλεοτιδίων, τα οποία εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών. Εμφανίζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού, εξαιτίας του μεγάλου ρυθμού μεταλλάξεων (Buburuzan *et al.*, 2007). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η μέση ετεροζυγωτία

σε σπονδυλωτά είναι μια τάξη μεγέθους υψηλότερη σε μικροδορυφορικούς τόπους σε σχέση με αλλοενζυμικούς τόπους (DeWoody & Avise, 2000).

Προκειμένου να μετρηθεί η ομομικτική κατάπτωση (inbreeding depression) σε άγριους πληθυσμούς έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί τρόποι υπολογισμού του συντελεστή της ομομιξίας. Είναι γνωστό ότι η ομομιξία μπορεί να προκαλέσει συσχέτιση μεταξύ των τόπων σε όλο το γονιδίωμα, φαινόμενο που ονομάζεται ανισορροπία ταυτότητας (Weir & Cockerham, 1973). Συνεπώς, οι δείκτες ετεροζυγωτίας μπορούν να παρέχουν μια εκτίμηση του γονιδιώματος στο επίπεδο ετεροζυγωτίας και αρμοστικότητας. Με την εύρεση αρκετών μοριακών δεικτών έχουν προταθεί εναλλακτικοί τρόποι μέτρησης για την ανίχνευση της ομομιξίας. Η μέση τιμή του  $d^2$  είναι ένα τέτοιο μέτρο βασισμένο στους μικροδορυφόρους, κατά το οποίο υποστηρίζει ότι το τετράγωνο της διαφοράς σε επαναλαμβανόμενες μονάδες μεταξύ οποιωνδήποτε δύο αλληλομόρφων σε έναν τόπο είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου από την συνένωση των δύο αλληλομόρφων (Goldstein *et al.*, 1995). Ένας ακόμη τρόπος μέτρησης είναι ο Multi-locus heterozygosity (MLH), κατά τον οποίο ο αριθμός των περιοχών της ετεροζυγωτίας διαιρείται με τον αριθμό των τόπων του γονότυπου (Coltman *et al.*, 1999). Ένας ακόμα τρόπος υπολογισμού είναι ο IR (Internal relatedness), κατά τον οποίο υπολογίζεται η ετεροζυγωτία με βάση τη σπανιότητα των αλληλομόρφων (Amos *et al.*, 2001). Τέλος, ο HL (Homozygosity by locus) είναι το άθροισμα της πιθανότητας ετεροζυγωτίας σε ομόζυγους τόπους, με βάση τις συχνότητες εμφάνισης αλληλομόρφου στον πληθυσμό, με τη πιθανότητα ετεροζυγωτίας σε όλα τα αλληλόμορφα για έναν συγκεκριμένο γονότυπο (Aparicio *et al.*, 2006).

### 1.6. Αρμοστικότητα (Fitness)

Πολλές φορές, με σκοπό να μετρηθεί η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα, χρησιμοποιούνται αρκετά μορφολογικά χαρακτηριστικά ως δείκτες αρμοστικότητας. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί επίδραση της ηλικίας και του διατροφικού προφίλ στην έκφραση γονιδίων του λευκού μυός της τσιπούρας (Γεωργίου *et al.*, 2012). Επίσης, ως δείκτης αρμοστικότητας έχει χρησιμοποιηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης (Κοΐνης Α. *et al.*, 2012), καθώς και η θερμοκρασία ανάπτυξης νεαρών ατόμων του ψαριών zebrafish (Συμεωνίδη Δ., 2011), το σωματικό βάρος και φύλο της τσιπούρας (Loukonitis, 2013), η πιθανότητα ζευγαρώματος εξαιτίας του τραγουδιού του σπουργιτιού (Taylor *et al.*, 2010), επιβίωση των προνυμφών του *Bufo calamita* και τον ρυθμό ανάπτυξης (Rowe *et al.* το 1999), το μήκος και βάρος του είδους *Salmo salar* (Borrell *et al.*, 2004), το βάρος των νεογνών του είδους *Phoca vitulina* (Coltman *et al.*, 1998), αλλά και της πειραματικής παρασίτωσης του *Parus major* (Voegeli *et al.*, 2012).

Η αρμοστικότητα προσδιορίζει τον ρυθμό με τον οποίο ο γενότυπος αυξάνει την παρουσία του στον πληθυσμό σε σχέση με τον ρυθμό ενός άλλου γενότυπου (Ott, 2009). Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία διαφορών μεταξύ δύο γενοτύπων που μπορεί να επηρεάσει την αρμοστικότητά τους, όπως είναι η επιβίωση των ατόμων μέχρι το στάδιο της αναπαραγωγής, με όποιον πιθανό φαινότυπο επιτευχθεί, η γονιμότητα των θηλυκών ατόμων με την εναπόθεση ωαρίων ή αυγών, η γονιμότητα των αρσενικών ατόμων με τον αριθμό απογόνων, η επιτυχία του αρσενικού ή του θηλυκού για σύζευξη, καθώς και κατά πόσο το αρσενικό μπορεί να επιλέξει θηλυκά με υψηλή γονιμότητα (Reed & Frankham, 2001). Η σχετική αρμοστικότητα (relative fitness) ( $w$ ) αντικαθιστά συνήθως τις απόλυτες τιμές της αρμοστικότητας, ενώ δίνεται αυθαίρετα η τιμή 1 στον γενότυπο με την υψηλότερη αρμοστικότητα, διαιρώντας όλες τις τιμές με τη μεγαλύτερη. Επίσης,

ο συντελεστής επιλογής (selection coefficient) ( $s$ ) δίνεται από τη σχέση  $s = 1 - w$  (Charlesworth & Hughes, 2000). Ενώ η αρμοστικότητα των γενοτύπων είναι σταθερή, η αρμοστικότητα του πληθυσμού είναι εξ ορισμού συνάρτηση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων και μπορεί να μεταβάλλεται από γενιά σε γενιά. Παρ' όλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις η αρμοστικότητα καθορίζεται από το περιβάλλον. Παραδείγματος χάριν στο είδος *Drosophila pseudoobscura* το δεύτερο χρωμόσωμα παρουσιάζει διάφορες αναστροφές ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, με συνέπεια οι συχνότητες των αναστροφών να ποικίλουν από τόπο σε τόπο και από εποχή σε άλλη (Lopez-Fanjul, & Villaverde, 1989).

### 1.7. Εφαρμογές μικροδορυφόρων

Εξαιτίας των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων από πολλές μελέτες που προσπαθούν να βρουν τη συσχέτιση της αρμοστικότητας με την ετεροζυγωτία, η έρευνα και οι τρόποι προσδιορισμού του HFC παραμένουν αμφιλεγόμενη. Παλιότερα, οι μοριακές μετρήσεις γενετικής παραλλακτικότητας έχουν ως επί το πλείστον βασιστεί σε αλληλοζυμικούς δείκτες, οι οποίοι όμως έχουν αρκετούς περιορισμούς, εξαιτίας της ευαισθησίας τους (Gouzelou *et al.*, 2012). Παρ' όλα αυτά, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο οι μικροδορυφόροι για συσχετίσεις μεταξύ ετεροζυγωτίας και αρμοστικότητας. Πιο συγκεκριμένα, οι Rowe *et al* το 1999 μελέτησαν στο είδος βατράχου *Bufo calamita*, χρησιμοποιώντας 38 μικροδορυφορικούς τόπους, τη συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με χαρακτηριστικά της αρμοστικότητας, όπως την επιβίωση των προνυμφών και το ρυθμό ανάπτυξης, ενώ τα αποτελέσματα έδειξαν τη θετική συσχέτιση αυτών. Αντιθέτως, οι Borrell *et al.*, το 2004 μελέτησαν τη σχέση της ετεροζυγωτίας με μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι το μήκος και το βάρος του είδους *Salmo salar*. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση οκτώ μικροδορυφορικών τόπων δεν

παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σχέση ετεροζυγωτίας με το βάρος και το μήκος εκτρεφόμενων σολομών υπολογίζοντας το  $d^2$ . Απεναντίας, σε παρόμοια μελέτη για το συσχετισμό μεταξύ ετεροζυγωτίας και βάρους νεογνών του είδους *Phoca vitulina*, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τη χρήση του παράγοντα  $d^2$  (Coltman *et al.*, 1998). Επιπλέον, έχει πραγματοποιηθεί έρευνα (Curik *et al.*, 2003) για την συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με είκοσι επτά μορφολογικά χαρακτηριστικά αλόγου με τη χρήση του μικροδορυφορικού δείκτη  $d^2$ . Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με το μήκος των δοντιών της φώκιας *Arctocephalus gazella*, χρησιμοποιώντας εννέα μικροδορυφόρους (Hoffman *et al.*, 2010). Ακόμα, σε μια έρευνα (Lieutenant- Gosselin & Bernatchez, 2006) μελετήθηκε η σχέση της ετεροζυγωτίας με τη χρήση 30 μικροδορυφόρων με πέντε δείκτες της αρμοστικότητας, όπως είναι η επιβίωση, η επιτυχία του ζευγαρώματος, το μήκος και η κατάσταση του σώματος του είδους *Gasterosteus aculeatus*.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος των μικροδορυφόρων έχει εφαρμοστεί και για την συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα, όταν ως δείκτης αρμοστικότητας προσδιορίζεται η ύπαρξη ή η απουσία παρασίτων στο είδος που μελετάται. Πιο συγκεκριμένα έχει διερευνηθεί (Voegeli *et al.*, 2012) η επίδραση της πειραματικής παρασίτωσης του είδους πτηνού *Parus major* στο HFC. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποίησαν δείγματα αίματος από παρασιτωμένα πουλιά και με σαράντα πέντε μικροδορυφόρους βρήκαν μία σημαντική συσχέτιση της παρασίτωσης με την ετεροζυγωτία. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι ο βαθμός παρασίτωσης δεν επηρεάζεται από το HFC.

### 1.8. Εφαρμογές μικροδορυφόρων στην οικογένεια Sparidae

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες για τη συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα σε ψάρια της οικογένειας Sparidae. Πιο συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί (Fassatoui *et al.*, 2012) η σχέση της ετεροζυγωτίας με την ηλικία, καθώς και με παράγοντες ανάπτυξης στο είδος του λυθρινιού *Pagellus erythrinus*. Αναλυτικότερα, μετρήθηκαν μορφολογικά χαρακτηριστικά των ατόμων ως δείκτες αρμοστικότητας, όπως το σταθερό μήκος, το ολικό σωματικό βάρος, το μήκος και βάρος των οσολίθων, καθώς και υπολογίστηκε ο δείκτης ευρωστίας (Condition factor, CF) και ο σχετικός δείκτης ευρωστίας (relative condition factor, RCF) του κάθε ατόμου, ενώ για τον υπολογισμό της ετεροζυγωτίας πραγματοποιήθηκε αλλοενζυμική ηλεκτροφόρηση. Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας φάνηκε ότι μόνο οι οσολίθοι ως δείκτες αρμοστικότητας είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ετεροζυγωτία. Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί (Borrell *et al.*, 2011) η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας χρησιμοποιώντας τον δείκτη MLH με δείκτες αρμοστικότητας όπως το μεσουραίο μήκος, το ολικό βάρος και ο δείκτης ευρωστίας. Παρατηρήθηκε ότι όλες οι σημαντικές συσχετίσεις ήταν αρνητικές, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ετεροζυγώτες είχαν χαμηλότερη αρμοστικότητα σε αντίθεση με τους ομοζυγώτες, ενώ δεν παρατηρήθηκε ομομικτική κατάπτωση. Επιπλέον, έχει ερευνηθεί (Lenfant, 2002) η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών MLS και Fis με διάφορα χαρακτηριστικά της αρμοστικότητας όπως η ηλικία ατόμων σαργού (*Diplodus sargus*) ανάλογα με το φύλο, καθώς και η διαδικασία αναστροφής του φύλου.

### 1.9. Σκοπός παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας στο ψάρι *Diplodus puntazzo* με στοιχεία αρμοστικότητας, όπως είναι η παρουσία ή η απουσία παρασίτων *Enteromyxum leei*, καθώς και δεκαπέντε ακόμα μορφολογικές παράμετροι.

Το παράσιτο που επιλέχθηκε προκαλεί σημαντικές απώλειες στις Μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες, ενώ στη τσιπούρα και στη χιόνα έχει αποδειχθεί ότι έχει άμεσο βιολογικό κύκλο και μεταδίδεται μάλλον μέσω του νερού (Diamant 1997, Diamant & Wajsbrodt 1997, Golomazou *et al.* 2006). Τα ποσοστά θνησιμότητας αυξάνονται συνήθως σε θερμοκρασίες άνω των 22° C και μειώνονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15° C. Τα μολυσμένα ψάρια εμφανίζουν απίσχναση με διογκωμένες χοληδόχους κύστες και διογκωμένο κοιλιακό τοίχωμα. Μερικές φορές έχει παρατηρηθεί αποχρωματισμένο και πρασινωπό ήπαρ με εμφανή σημάδια λιπώδους εκφύλισης. Κατά κύριο λόγο, στα σπλάχνα των περισσότερων μολυσμένων από το παράσιτο ψάρια παρατηρούνται σημαντικές ποσότητες λίπους (Rigos *et al.*, 1999).



## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Επιλογή δειγμάτων

Για την πειραματική διαδικασία της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα χιόνιας από προηγούμενη μελέτη, κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε ψάρια του είδους *D. puntazzo*, τα οποία προήλθαν από μονάδα εκτροφής στη βόρεια ακτή του Κορινθιακού κόλπου, με ιστορικό στην παρασίτωση από το παράσιτο *E. leei*. (Καρατζίνος Θ., 2012). Το είδος του ψαριού επιλέχθηκε ως το πιο ευπαθές στην παρασίτωση από το συγκεκριμένο μυξοσπορίδιο, εφόσον έχουν αναφερθεί μεγάλες θνησιμότητες εξαιτίας της ασθένειας. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε ιχθυοπαθολογική εξέταση πριν την είσοδό τους στην πάχυνση στις 26 Μαρτίου του 2010, με σκοπό τη διαπίστωση ότι τα ψάρια είναι απαλλαγμένα από παθογόνους οργανισμούς, σύμφωνα με την εφαρμοζόμενη ορθή πρακτική. Η διατροφή των δειγμάτων πραγματοποιούνταν καθημερινά με σύμπηκτα κατάλληλα για χιόνες. Τα ψάρια εισήχθησαν στην πάχυνση με βάρος 2g λίγο πριν την έναρξη των δειγματοληψιών. Κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του βάρους από  $2,4 \pm 0,21$  g τον Απρίλιο, σε  $26,8 \pm 2,11$  g τον Αύγουστο. Κατά τη διάρκεια του πειράματος υπήρχε καθημερινή καταγραφή της θερμοκρασίας, ενώ η μικρότερη τιμή της παρατηρήθηκε κατά τον μήνα Απρίλιο με μέση τιμή  $14,8 \pm 0,15$  °C και η μεγαλύτερη κατά τον μήνα Αύγουστο με μέση τιμή  $25,5 \pm 0,16$  °C. από την παρατήρηση του θερμοκρασιακού προφίλ φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας ήταν ανάλογη της εποχής στην οποία πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, ενώ δεν παρατηρήθηκαν μη αναμενόμενες αυξομειώσεις.

Οι μηνιαίες δειγματοληψίες ξεκίνησαν τον Απρίλιο του 2010 και ολοκληρώθηκαν τον Σεπτέμβριο του ίδιου έτους, και τα δείγματα λαμβάνονταν την τελευταία μέρα κάθε μήνα, έτσι ώστε να υπάρχει πρόβλεψη για τον επόμενο μήνα που ακολουθεί. Κάθε μήνα συλλέγονταν είκοσι τυχαία ψάρια από τον ίδιο κλωβό και καταψύχονταν άμεσα στους  $-20^{\circ}$  C με σκοπό να εξεταστούν νεκροσκοπικά και παρασιτολογικά για την παρουσία ή την απουσία του παρασίτου *E. leei*, ενώ υπήρχε συνεχής καταγραφή της θνησιμότητας.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν παρατηρηθεί μακροσκοπικά για την εκτίμηση της εξωτερικής εικόνας τους καθώς και παρασιτολογικά με εξέταση νωπών παρασκευασμάτων από τα βράγχια, το δέρμα, τον εντερικό σπλήνα, της χοληδόχου κύστης και το νεφρό. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε άμεση ταυτοποίηση των παρασίτων μετά την ανεύρεσή τους με βάση τις κλείδες, υπολογίστηκε το ποσοστό προσβολής καθώς και η ένταση της παρασίτωσης. Τέλος, ανιχνεύθηκε το παράσιτο *E. leei* με τη τεχνική της qPCR.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν αρκετά μορφολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, όπως το ολικό σωματικό βάρος, η απόσταση μέχρι τη κόγχη, η απόσταση μεταξύ του οφθαλμού και του ρύγχους, η διάμετρος του οφθαλμού, η απόσταση μετά τη κόγχη, το μήκος του κεφαλιού, το μήκος των θωρακικών πτερυγίων, η απόσταση μέχρι το ραχιαίο πτερύγιο, το ύψος των ραχιαίων πτερυγίων, το μήκος της βάσης των ραχιαίων πτερυγίων, το μέγιστο ύψος των δειγμάτων, το μήκος βάσης των εδρικών πτερυγίων, το ύψος των εδρικών πτερυγίων, το ελάχιστο ύψος των ατόμων, το μήκος του ουραίου μίσχου, καθώς και το σταθερό μήκος των δειγμάτων.

## 2.2. Απομόνωση ολικού DNA και PCR

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού DNA από τον μυικό ιστό ψαριών πάνω από την κοιλιακή χώρα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφορμίου (Sambrook *et al.* 1989) για την καλύτερη απεικόνιση του DNA. Πιο συγκεκριμένα, ισοβαρή τμήματα του ιστού των ψαριών, τα οποία ήταν αποθηκευμένα στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , τοποθετήθηκαν σε κυβέττες και προστέθηκαν 500  $\mu\text{l}$  TNE, 100  $\mu\text{l}$  SDS, 100  $\mu\text{l}$  Tris-HCl και 10  $\mu\text{l}$  Proteinase k σε κάθε δείγμα, και έπειτα από δώροη επώαση σε υδατόλουτρο (εικόνα 1), προστέθηκαν 300  $\mu\text{l}$  φαινόλης και 300  $\mu\text{l}$  χλωροφόρμιο-ισοαμυλική (24/1). Στη συνέχεια τα μίγματα φυγοκεντρίθηκαν (εικόνα 2) στις 12000 στροφές για δέκα λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  και χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο. Σε αυτό, προστέθηκαν 600  $\mu\text{l}$  χλωροφόρμιο-ισοαμυλική και φυγοκεντρίθηκαν για 10 λεπτά στις 12000 στροφές στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Κατόπιν, προστέθηκε 1 ml καθαρής αλκοόλης, καθώς και 10  $\mu\text{l}$  sodium acetate και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για τριάντα λεπτά. Έπειτα, οι κυβέττες φυγοκεντρίθηκαν, έτσι ώστε να κατακρατηθεί η πελλέτα, η οποία ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη. Τέλος, το DNA διαλύθηκε σε διάλυμα TE και φυλάχτηκε στην κατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , έως ότου χρησιμοποιηθεί. Από την απομόνωση του ολικού DNA των δειγμάτων, τα διαλύματα μετρήθηκαν σε nanodrop καθώς και σε οριζόντια ηλεκτροφόρηση (εικόνα 3) σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%, με σκοπό την καλύτερη εικόνα της ποσότητας και της ποιότητας του DNA.

Για την μέθοδο της PCR (εικόνα 4) χρησιμοποιήθηκε multiplex PCR Kit (Qiagen), ενώ οι συνθήκες της μεθόδου ρυθμίστηκαν στους  $95^{\circ}\text{C}$  για δεκαπέντε λεπτά και πραγματοποίησε τριάντα κύκλους. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα παρέμειναν στους  $95^{\circ}\text{C}$  για ένα λεπτό, έπειτα στους  $72^{\circ}\text{C}$  για μισό λεπτό και τέλος στους  $75^{\circ}\text{C}$  για

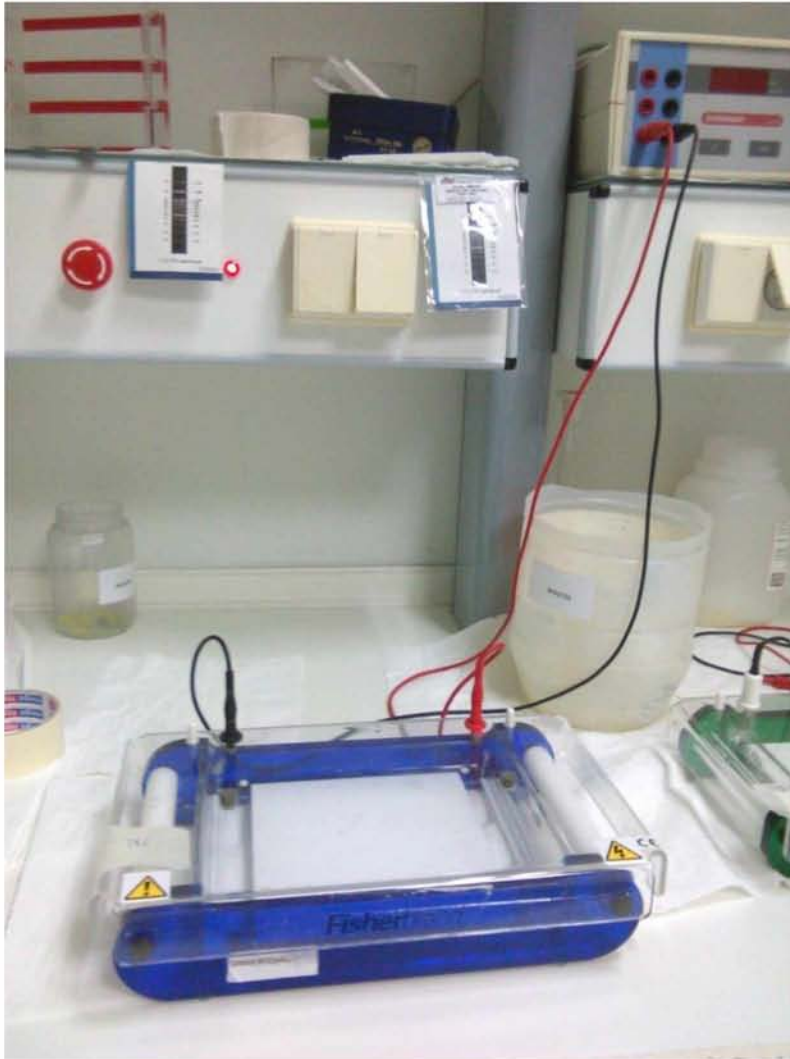
τριάντα δευτερόλεπτα. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA, τέλος γονοτυπήθηκαν σε αυτόματο αλληλουχική τύπου ABI 3730 και το σκοράρισμα- έλεγχος των αλληλομόρφων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα STRand. Για τον υπολογισμό των δεικτών IR και HL χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IRmacroN v. 4.0, μία μακροεντολή του προγράμματος Excel (Amos *et al.*, 2001).



**Εικόνα 1:** Υδατόλουτρο που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία του πειράματος



Εικόνα 2: Φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία του πειράματος



**Εικόνα 3:** Οριζόντια ηλεκτροφόρηση που χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την καλύτερη εικόνα της ποσότητας και της ποιότητας του DNA.





Εικόνα 4: PCR που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία του πειράματος

### 2.3. Στατιστική ανάλυση

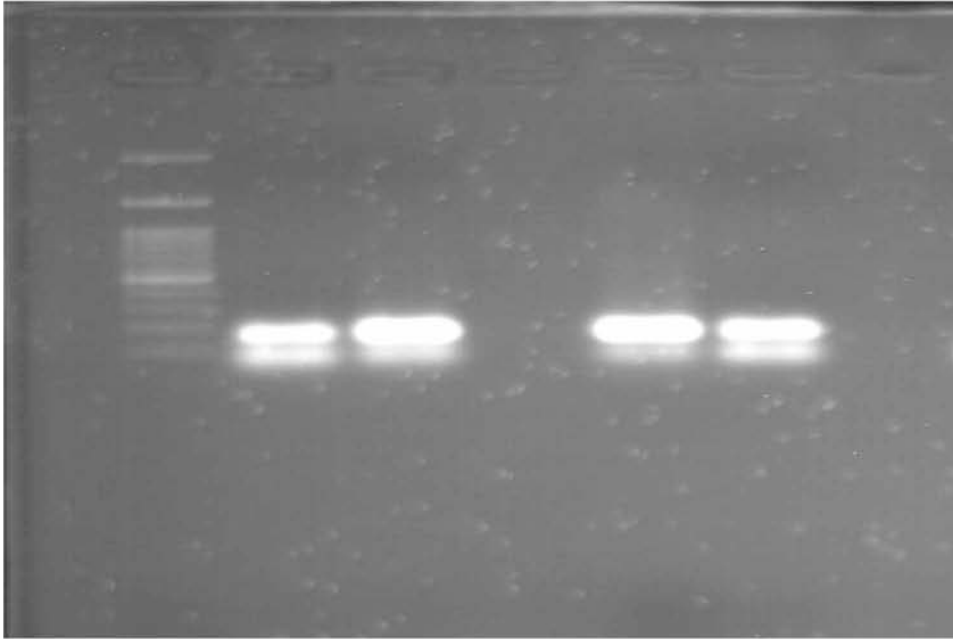
Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Minitab, SPSS καθώς και το excel για τον υπολογισμό των συσχετίσεων των μικροδορυφορικών δεικτών με τις μορφολογικές παραμέτρους καθώς και με το παρασιτικό φορτίο. Πιο συγκεκριμένα, με το πρόγραμμα Minitab προσδιορίστηκαν οι τιμές P value του κάθε

μικροδορυφορικού δείκτη με τις μορφολογικές παραμέτρους και με το παρασιτικό φορτίο.



### 3. Αποτελέσματα

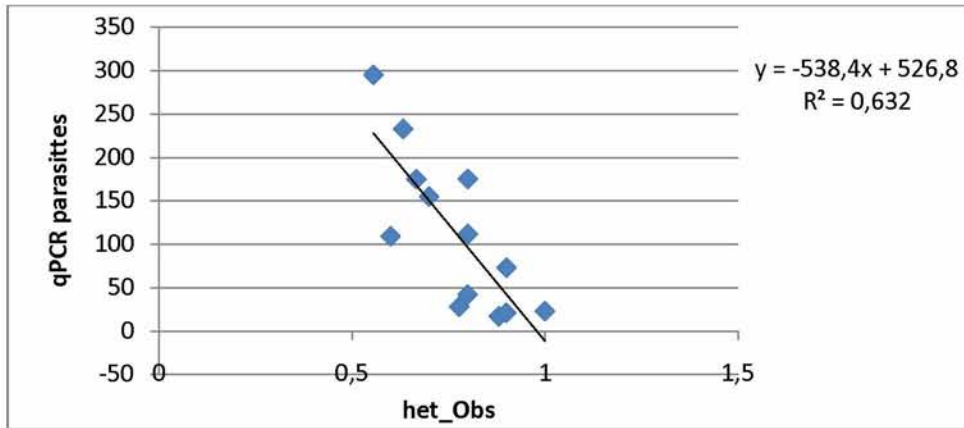
Μετά την διαδικασία της απομόνωσης του ολικού DNA, πραγματοποιήθηκε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για την απεικόνιση της ποιότητας και ποσότητας του γενετικού υλικού όπως φαίνεται στην εικόνα 5.



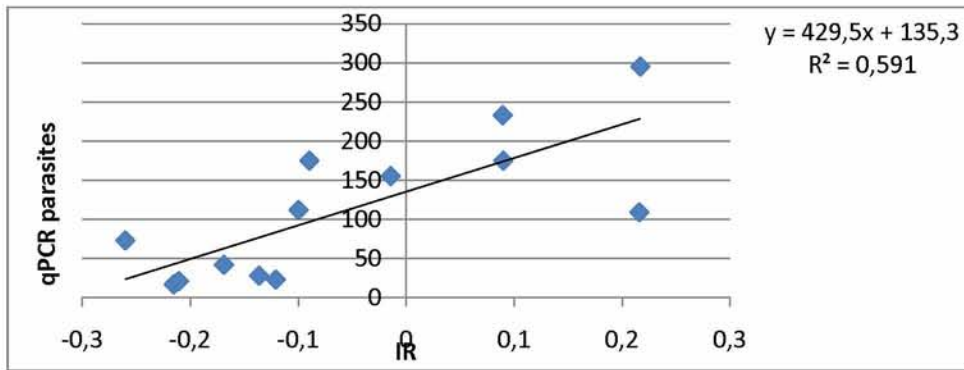
**Εικόνα 5:** απεικόνιση του DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης

#### 3.1. Διασπορά αριθμού παρασίτων με μικροδορυφορικούς δείκτες:

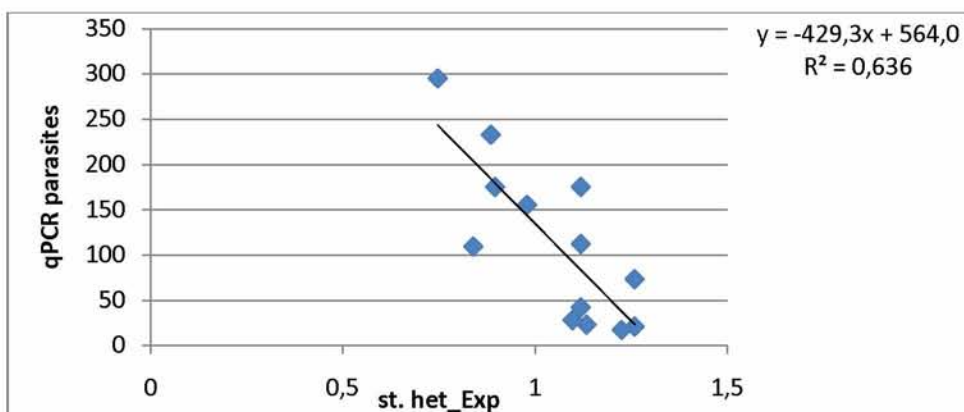
Στις εικόνες 6, 7, 8, 9 10 και 11 φαίνεται η γραμμική σχέση του αριθμού παρασίτων που υπολογίστηκαν με τη χρήση της qPCR με τις τιμές των μικροδορυφορικών δεικτών het\_Obs, IR, st. het\_Exp, st.het\_Obs, st.d-sqd καθώς και HL αντίστοιχα.



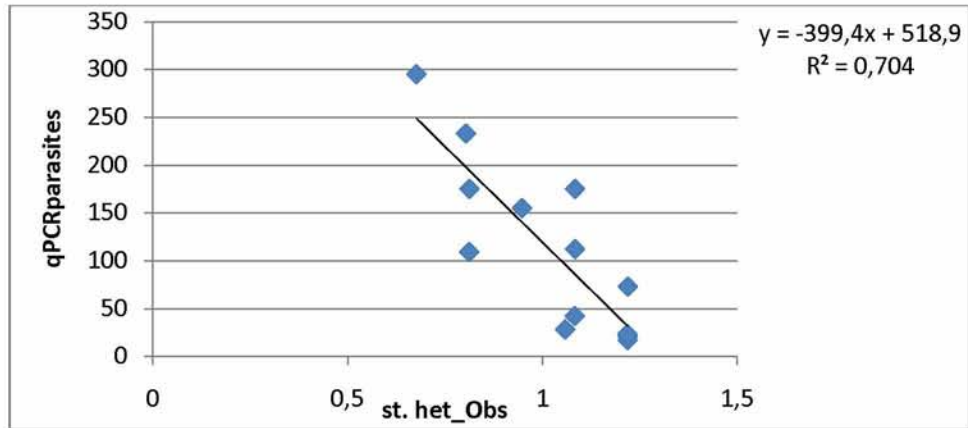
**Εικόνα 6:** Διασπορά αριθμού παρασίτων που βρέθηκαν με χρήση qPCR με την παράμετρο  $het\_obs$  με  $P\ value = 0,499$



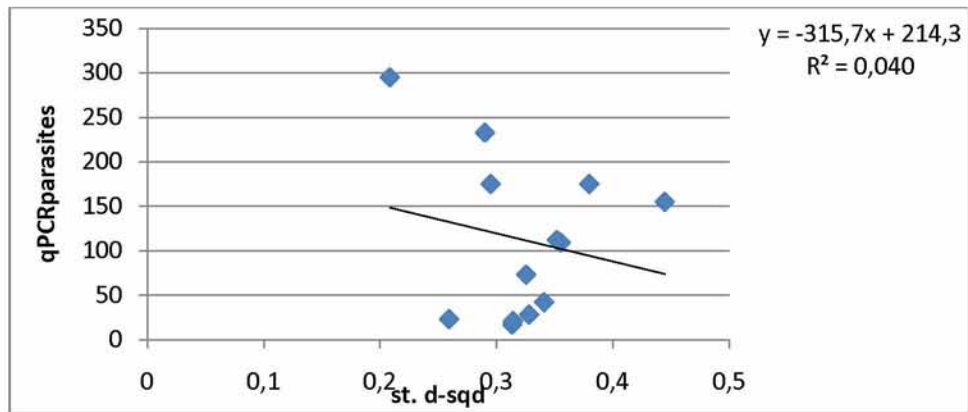
**Εικόνα 7:** Διασπορά αριθμού παρασίτων που βρέθηκαν με χρήση της qPCR με την παράμετρο  $IR$  με  $P\ value = 0,547$



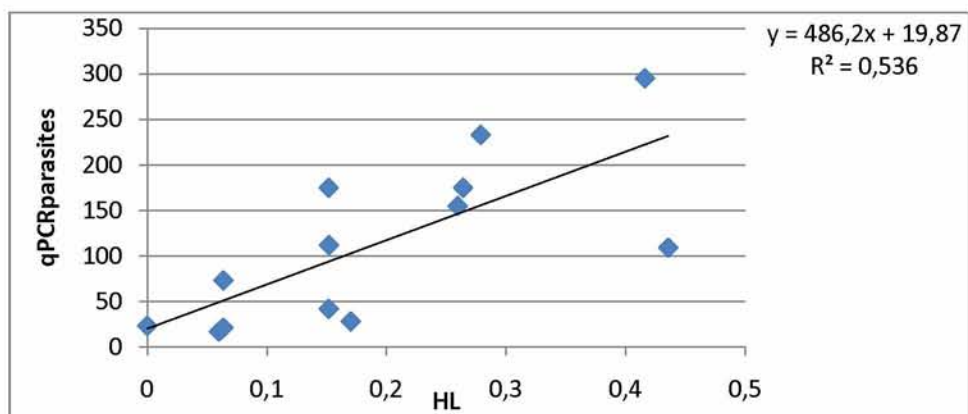
**Εικόνα 8:** Διασπορά αριθμού παρασίτων που βρέθηκαν με χρήση της qPCR με την παράμετρο  $st.\ het\_Exp$  με  $P\ value = 0,632$



**Εικόνα 9:** Διασπορά αριθμού παρασίτων που βρέθηκαν με χρήση της qPCR με την παράμετρο st.het\_Obs με P value= 0,669



**Εικόνα 10:** Διασπορά αριθμού παρασίτων που βρέθηκαν με χρήση της qPCR με την παράμετρο st.d-sqd με P value= 0,683



**Εικόνα 11:** Διασπορά αριθμού παρασίτων που βρέθηκαν με χρήση της qPCR με την παράμετρο HL με P value= 0,420

### 3.2. Στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων τιμών από κάθε μικροδορυφορικό τόπο μεταξύ ατόμων που έχουν παράσιτα και ατόμων που δεν έχουν σε επίπεδο σημαντικότητας 95%, όπως φαίνεται από τον πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ατόμων με και χωρίς παράσιτα και οι τιμές P

value

	<b>M.O. ± Τυπική απόκλιση</b>		<b>P value</b>
	<b>Θετικά</b>	<b>Αρνητικά</b>	
<b>het Obs</b>	0,77±0,13	0,72±0,16	0,89
<b>IR</b>	-0,05±0,16	0,0002±0,204	0
<b>st. het_Exp</b>	1,05±0,17	1,008±0,211	0,8
<b>st. het_Obs</b>	1,02±0,19	0,99±0,19	0,8
<b>st. d-sqd</b>	0,32±0,06	0,276±0,099	0,99
<b>HL</b>	0,19±0,14	0,24±0,15	0,06

Πραγματοποιώντας t-test μέσων όρων όπως φαίνεται από τους πίνακες 1 και 2, βρέθηκε ότι για την πρώτη παράμετρο het\_Obs το  $p = 0.89$ . συνεπώς, δεν θεωρείτε στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντίθετα, για την δεύτερη παράμετρο IR βρέθηκε ότι  $p = 0$  με αποτέλεσμα να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Για την τρίτη παράμετρο st. het\_exp βρέθηκε  $p = 0.8$ . Επίσης, για την τέταρτη παράμετρο st.het\_Obs υπολογίστηκε  $p = 0.8$  με αποτέλεσμα να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Για την πέμπτη παράμετρο st. d-sqd βρέθηκε ότι  $p = 0.99$ , δηλαδή δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος, για την έκτη παράμετρο HL υπολογίστηκε  $p = 0.06$ . Συμπερασματικά, στατιστικά σημαντική διαφορά φάνηκε μόνο στον δεύτερο δείκτη IR.

Επιπλέον, έγινε σύγκριση των μέσων τιμών από κάθε μορφολογική παράμετρο μεταξύ ατόμων που έχουν παράσιτα και ατόμων που δεν έχουν σε επίπεδο σημαντικότητας

95%. Πιο συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μορφομετρικών μετρήσεων, όπως φαίνεται από τον πίνακα 2 και υπολογίστηκαν οι τιμές του P value.

**Πίνακας 2:** Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ατόμων με (θετικά) και χωρίς (αρνητικά) παράσιτα και οι τιμές P value

	<b>M.O ± Τυπική απόκλιση</b>		<b>P value</b>
	<b>Θετικά</b>	<b>Αρνητικά</b>	
<b>Ολικό σωματικό βάρος</b>	10,08±7,9	15,97±15,98	0,104
<b>Απόσταση μέχρι τη κόγχη</b>	7,65±1,96	9,03±2,28	0,051
<b>Απόσταση οφθαλμού- ρύγχους</b>	13,51±2,83	15,62±4,42	0,055
<b>Διάμετρος οφθαλμού</b>	5,76±0,92	6,74±1,74	0,033
<b>Απόσταση μετά τη κόγχη</b>	8,45±1,62	9,60±2,85	0,086
<b>Μήκος κεφαλιού</b>	21,03±4,08	23,87±6,65	0,075
<b>Μήκος θωρακικών πτερυγίων</b>	19,64±4,38	23,29±7,58	0,054
<b>Απόσταση μέχρι ραχιαίο πτερύγιο</b>	28,10±5,69	32,32±10,07	0,078
<b>Ύψος ραχιαίου πτερυγίου</b>	11,54±1,87	12,85±3,50	0,101
<b>Μήκος βάσης ραχιαίου πτερυγίου</b>	33,42±6,84	38,78±12,26	0,07
<b>Μέγιστο ύψος σώματος</b>	27,17±5,57	31,74±10,50	0,071
<b>Μήκος βάσης εδρικού πτερυγίου</b>	14,64±2,81	17,08±5,24	0,06
<b>Ύψος εδρικού πτερυγίου</b>	6,83±1,34	7,66±2,09	0,089
<b>Ελάχιστο ύψος σώματος</b>	7,48±1,21	8,28±2,32	0,119
<b>Μήκος ουραίου μίσχου</b>	7,40±1,68	7,84±2,38	0,259
<b>Σταθερό μήκος</b>	73,28±15,97	85,24±26,01	0,062

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές των μορφομετρικών παραμέτρων ανάμεσα στα άτομα που ανιχνεύθηκαν με παρασιτικό φορτίο με τη χρήση της qPCR και στα άτομα τα οποία δεν ανιχνεύθηκαν παράσιτα, εκτός από τη διάμετρο του οφθαλμού, στο οποίο υπολογίστηκε ότι P value=0.033.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τιμές του P value σε επίπεδο σημαντικότητας 95% του κάθε μικροδορυφορικού δείκτη με το παρασιτικό φορτίο καθώς και με τις μορφολογικές παραμέτρους.

**Πίνακας 3:** Οι τιμές του P value των μικροδορυφορικών δεικτών

	Τιμές P value					
	het_Obs	IR	st. het_Exp	st. het_Obs	st. d-sqd	HL
<b>Ολικό σωματικό βάρος</b>	0,995	0,982	0,976	0,98	0,898	0,979
<b>Απόσταση μέχρι τη κόγχη</b>	0,302	0,021	0,047	0,017	0,535	0,227
<b>Απόσταση οφθαλμού- ρύγχους</b>	0,031	0,186	0,3	0,35	0,476	0,049
<b>Διάμετρος οφθαλμού</b>	0,015	0,002	0,004	0,005	0,191	0,013
<b>Απόσταση μετά τη κόγχη</b>	0,591	0,243	0,115	0,209	0,651	0,67
<b>Μήκος κεφαλιού</b>	0,439	0,153	0,21	0,137	0,849	0,365
<b>Μήκος θωρακικών πτερυγίων</b>	0,001	0,008	0	0	0,041	0,032
<b>Απόσταση μέχρι ραχιαίο πτερύγιο</b>	0,196	0,302	0,267	0,379	0,706	0,224
<b>Ύψος ραχιαίου πτερυγίου</b>	0,925	0,757	0,692	0,71	0,895	0,79
<b>Μήκος βάσης ραχιαίου πτερυγίου</b>	0,005	0,033	0,018	0,043	0,288	0,004
<b>Μέγιστο ύψος σώματος</b>	0,534	0,556	0,511	0,51	0,026	0,799
<b>Μήκος βάσης εδρικού πτερυγίου</b>	0,038	0,019	0,091	0,255	0,166	0,012
<b>Ύψος εδρικού πτερυγίου</b>	0,003	0,011	0,013	0,014	0,308	0,002
<b>Ελάχιστο ύψος σώματος</b>	0,075	0,054	0,041	0,009	0,65	0,011
<b>Μήκος ουραίου μίσχου</b>	0,045	0,02	0,03	0,008	0,176	0,014
<b>Σταθερό μήκος</b>	0,038	0,055	0,053	0,115	0,034	0,107

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 3, στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται καθόλου στις μετρήσεις του βάρους, στην απόσταση μετά την κόγχη, στο μήκος του κεφαλιού, στην απόσταση μέχρι το ραχιαίο πτερύγιο καθώς και στο ύψος του ραχιαίου πτερυγίου. Επιπλέον, παρατηρείται ότι στη διάμετρο του οφθαλμού με τους δείκτες IR, st. het\_Exp καθώς και st. het\_Obs, στο μήκος των θωρακικών πτερυγίων με τους δείκτες het\_Obs, st. het\_Exp και st. het\_Obs, στο μήκος βάσης ραχιαίου πτερυγίου και στο ύψος εδρικού πτερυγίου με τους δείκτες het\_Obs και HL οι τιμές του P value είναι

αρκετά χαμηλές. Τέλος, φαίνεται ότι στο μήκος των θωρακικών πτερυγίων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και από τους 6 μικροδορυφορικούς δείκτες.

#### 4. Συζήτηση

Υπάρχουν αρκετές μελέτες για το HFC στις οποίες αναφέρονται μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ετών και των πληθυσμών που μελετούνται. Συνεπώς, έχει προταθεί ότι αυτή η αντίθεση που παρατηρείτε προκύπτει εξαιτίας των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών (Coltman & Slate, 2003 & Balloux *et al.*, 2004). Επιπλέον, παρατηρείτε ότι οι αβιοτικοί παράγοντες ασκούν επίδραση στην συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα (Lesbarreres *et al.*, 2005 & Halverson *et al.*, 2006 & Marr *et al.*, 2006). Παρ' όλα αυτά όμως, η μελέτη των παρασίτων ως δείκτης αρμοστικότητας δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και παρατηρείτε σε λίγες μελέτες (Coltman *et al.*, 1999 & Voegeli *et al.*, 2012). Σε ένα είδος προβάτου βρέθηκε ότι η σχέση της ετεροζυγωτίας με την ύπαρξη ή την απουσία γαστρεντερικού παρασίτου προέβλεπε την επιβίωση των ατόμων κατά τη χειμερινή περίοδο. Αντίθετα, στα άτομα που είχαν υποστεί θεραπεία κατά του συγκεκριμένου παρασίτου δεν βρέθηκε συσχέτιση της επιβίωσης με την ετεροζυγωτία. (Coltman *et al.*, 1999). Επιπλέον, σε ακόμα μία μελέτη (Voegeli *et al.*, 2012) παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της ύπαρξης παρασίτου σε είδος πουλιών με την ετεροζυγωτία.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι με τον προσδιορισμό του μικροδορυφορικού δείκτη IR φαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση του μικροδορυφορικού τόπου με την παρουσία ή την απουσία του παρασίτου *E. leei*. Παρόμοια αποτελέσματα φαίνονται και από τους Voegeli *et al.* το 2012 στη μελέτη για την επίδραση της πειραματικής παρασίτωσης του είδους πτηνού (*Parus major*) στο HFC, καθώς παρατηρήθηκε μία σημαντική συσχέτιση της παρασίτωσης με την ετεροζυγωτία. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι ο βαθμός παρασίτωσης δεν επηρεάζεται από το HFC.



Γενικά, υπάρχει η υπόνοια ότι η σχέση της ετεροζυγωτίας με την παρασίτωση είναι λιγότερο ευαίσθητη σε σχέση με άλλους παράγοντες της αρμοστικότητας. (Coltman *et al.*, 1999 & Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2005 & Hawley *et al.*, 2005). Συνεπώς, τα αποτελέσματα ερευνών με δείκτη αρμοστικότητας την παρασίτωση δείχνουν ότι τα άτομα με ετεροζυγωτία επωφελούνται είτε από την αυξημένη αντίσταση των παρασίτων, είτε και από την ανοχή τους στα παράσιτα, εξαιτίας της υψηλότερης γενετικής ποικιλομορφίας τους. Συνεπώς, είναι σε θέση να επενδύσουν περισσότερο στην ανάπτυξη και την αύξηση, παρά το παρασιτικό τους φορτίο. Εναλλακτικά, τα ετερόζυγα άτομα θα μπορούσαν να έχουν υψηλότερο σθένος και μεγαλύτερη αντοχή γενικά και συνεπώς θα μπορούσαν να αντιμετωπίσουν ευκολότερα τις αρνητικές επιπτώσεις της παρασίτωσης. Και στις δύο περιπτώσεις θα μπορούσε να οδηγήσει στην παρατήρηση του HFC. Η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αντίσταση της παρασίτωσης ή και την ανοχή αυτής, μπορεί να οδηγήσει σε παρατήρηση του HFC και μέσω άλλων παραγόντων και συνεπώς να εξηγηθεί εκτενέστερα το HFC, εφόσον η αφθονία των παρασίτων ποικίλλει μεταξύ των πληθυσμών και της εποχής. (Krasnov & Lareschi, 2010 & Gomez-Flores *et al.*, 2011 & Jachowski *et al.*, 2011).

Έχει παρατηρηθεί επιπλέον (Voegeli *et al.*, 2012) ότι υπάρχει συσχέτιση στο HFC με την επικράτηση των παρασίτων, αλλά δεν βρέθηκε σχέση με την ένταση της παρασίτωσης. Η έλλειψη των αποτελεσμάτων της έντασης μπορεί να εξηγηθεί από τις διεργασίες των παρασίτων που επηρεάζονται από την πυκνότητά τους, όπως είναι ο ρυθμός αναπαραγωγής, ο οποίος αλλάζει όταν η πυκνότητα του πληθυσμού είναι υψηλή. (Tripet & Richner, 1999).

Επιπρόσθετα, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι συσχετίσεις των μικροδορυφορικών δεικτών με αρκετές μορφολογικές παραμέτρους. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν το ολικό σωματικό βάρος, η απόσταση μέχρι την κόγχη, η απόσταση μεταξύ του οφθαλμού και του ρύγχους, η διάμετρος του οφθαλμού, η απόσταση μετά την κόγχη, το μήκος του κεφαλιού, το μήκος των θωρακικών πτερυγίων, η απόσταση μέχρι το ραχιαίο πτερύγιο, το ύψος των ραχιαίων πτερυγίων, το μήκος της βάσης των ραχιαίων πτερυγίων, το μέγιστο ύψος των δειγμάτων, το μήκος βάσης των εδρικών πτερυγίων, το ύψος των εδρικών πτερυγίων, το ελάχιστο ύψος των ατόμων, το μήκος του ουραίου μίσχου, καθώς και το σταθερό μήκος των δειγμάτων. Σε αντίθεση με τους Borrell *et al.*, το 2004, όπου δεν παρατήρησαν στατιστικές σημαντικές διαφορές με τη χρήση οκτώ μικροδορυφορικών τόπων στη σχέση ετεροζυγωτίας με το βάρος και το μήκος εκτρεφόμενων σολομών *Salmo salar* υπολογίζοντας το  $d^2$ , στη παρούσα μελέτη βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις στην απόσταση μέχρι την κόγχη του οφθαλμού με τους δείκτες IR, st. het Exp, st. het Obs, στην απόσταση οφθαλμού-ρύγχους με τους δείκτες het\_Obs και HL, στη διάμετρο του οφθαλμού με τους δείκτες IR, st. het Exp καθώς και st. het Obs, στο μήκος των θωρακικών πτερυγίων με τους δείκτες het\_Obs, st. het\_Exp και st. het\_Obs, στο μήκος της βάσης του ραχιαίου πτερυγίου καθώς και στο ύψος του εδρικού πτερυγίου με τους δείκτες het\_Obs και HL, στο μέγιστο ύψος σώματος με τον δείκτη st. d-sqd, στο μήκος βάσης εδρικού πτερυγίου με τους δείκτες het\_Obs, IR και HL, στο ελάχιστο ύψος σώματος με τους δείκτες het\_Obs και HL, στο μήκος του ουραίου μίσχου με τους δείκτες het\_Obs, IR και st. het\_Exp, και τέλος στο σταθερό μήκος με τους δείκτες het\_Obs και st. d-sqd. Σε παρόμοια μελέτη (Coltman *et al.*, 1998) για το συσχετισμό μεταξύ ετεροζυγωτίας και βάρος νεογνών του είδους *Phoca vitulina*, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές

διαφορές με τη χρήση του παράγοντα  $d^2$ . Επιπροσθέτως, βρέθηκε θετική συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την επιβίωση προνυμφών είδος βατράχου *Bufo calamita* καθώς και με το ρυθμό ανάπτυξης αυτών, χρησιμοποιώντας 28 μικροδορυφορικούς τόπους (Rowe *et al* το 1999). Αντίθετα, οι Borrell *et al.* το 2011 παρατήρησαν αρνητική συσχέτιση χρησιμοποιώντας τον δείκτη MLH με δείκτες αρμοστικότητας όπως το μεσουραίο μήκος, το ολικό βάρος και ο δείκτης ευρωστίας του είδους *Sparus aurata*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ετεροζυγώτες είχαν χαμηλότερη αρμοστικότητα σε αντίθεση με τους ομοζυγώτες, ενώ δεν παρατηρήθηκε ομομικτική κατάπτωση. Τέλος, έχει μελετηθεί η σχέση της ετεροζυγωτίας με την ηλικία, καθώς και με παράγοντες ανάπτυξης στο είδος του λυθρινιού *Pagellus erythrinus*. Αναλυτικότερα, μετρήθηκαν μορφολογικά χαρακτηριστικά των ατόμων ως δείκτες αρμοστικότητας, όπως το σταθερό μήκος, το ολικό σωματικό βάρος, το μήκος και βάρος των οσολίθων, καθώς και υπολογίστηκε ο δείκτης ευρωστίας (Condition factor, CF) και ο σχετικός δείκτης ευρωστίας (relative condition factor, RCF) του κάθε ατόμου, ενώ για τον υπολογισμό της ετεροζυγωτίας πραγματοποιήθηκε αλλοενζυμική ηλεκτροφόρηση. Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας φάνηκε ότι μόνο οι οσολίθοι ως δείκτες αρμοστικότητας είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ετεροζυγωτία (Fassatouí *et al.*, 2012).

## 5. Βιβλιογραφία

1. Acevedo-Whitehouse, K., Vicente, J., Gortazar, C., Hofle, U., Fernandez-De-Mera, I.G. & Amos, W. (2005) . Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol. Ecol.* 14: 3209–3217.
2. Amos W, Worthington Wilmer J, Fullard K et al. (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 268, 2021– 2027.
3. Angelidis P., Giagnissi M., Vatsos I., Bithava K., Telioisis K., Solomakos N., Athanassopoulou F. (2008) Aquaculture bacterial bank in Greece- methodology and first results. *Sc. Annals of DDI.* 14:5-8
4. Antuofermo E., Pais A., Nuvoli S., Hetzel U., Burrai J.P., Stefano Rocca, Caffara M., Giorgi I., Pedron C., Prearo M. (2014) *Mycobacterium chelonae* associated with tumor-like skin and oral masses in farmed Russian sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*). *BMC Veterinary Research* **10**: 18
5. Aparicio JM, Ortego J, Cordero PJ (2006) What should we weigh to estimate heterozygosity, alleles or loci? *Molecular Ecology*, 15, 4659–4665.
6. Arampatzi –Ziamou D., Golomazou E., Gkafas G., Malandrakis E.E., Panagiotaki P., Exadactylos A.(2014) Early molecular detection of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) in intensively reared gilthead seabream (*Sparus aurata*). Conference: 15th Hellenic Conference of Ichthyologists, pp 335-337
7. Balloux, F., Amos, W. & Coulson, T. (2004). Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? *Mol. Ecol.* 13: 3021–3031.

8. Barton N. H., Briggs D. E. G., Eisen J. A., Goldstein D. B., Patel N. H. (2007) Evolution. Cold spring Harbor, New York: 676-678
9. Bierne, N., A. Tsiirone, and P. David. (2000). An inbreeding model of associative overdominance during a population bottleneck. *Genetics* 155:1981–1990.
10. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
11. Borrell Y.J., Carleos C.E., Sanchez J.A., Vazquez E., Gallego V., Asuriano J.F., Blanco G. (2011) Heterozygosity- fitness correlation in the gilthead sea bream *Sparus aurata* using icrosatellite loci from unknown and gene- rich genomic locations. *Journal of fish biology.* 79 (5): 1111-1129
12. Borrell Y.J., Pineda H., McCarthy I., Vázquez E., Sánchez J.A. and Lizana G. B. (2004) Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Heredity* (2004) 92, 585–593
13. Buburuzan L., Gorgan L.D., Băra I.I. (2007). Types of DNA used in speciation and phylogeny studies. *Analele Științifice ale Universității, Alexandru Ioan Cuza, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, TOM VIII.*
14. Chakraborty R, (1981). The distribution of the number of heterozygous loci in an individual in natural populations. *Genetics* 98:461–466
15. Chapman J.R., Nakagawa S., Coltman W., Slate J., Sheldon B.C. (2009) A quantitative review of heterozygosity–fitness correlations in animal populations. *Molecular Ecology* 18 (13): 2746- 2765

16. Charlesworth, B., and Hughes K. A.. (2000) The maintenance of genetic variation in life-history traits. *Evolutionary genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
17. Chenuil A. (2006). Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127: 101-120.
18. Chistiakov, D.A., Hellemans B., and Volckaert F.A.M. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1-29
19. Coltman DW, Bowen WD, Wright JM (1998). Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. *Proc Roy Soc B* 265: 803–809
20. Coltman, D.W. & Slate, J. (2003). Microsatellite measures of inbreeding: a meta-analysis. *Evolution* 57: 971–983.
21. Coltman, D.W., Pilkington, J.G., Smith, J.A. & Pemberton, J.M. (1999) . Parasite-mediated selection against inbred soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* 53: 1259–1267.
22. Coscelli G.A., Bermúdez R., Losada A.P., Failde L.D., Santos Y., Quiroga M.I. (2014) Acute *Aeromonas salmonicida* infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Histopathological and immunohistochemical studies. *Aquaculture* 430: 79–85
23. Curik I., Zehner P., Solkner J., Achmann R., Bodo I., Dovc P., Kavar T., Marti E., Brem G. (2003) Inbreeding, Microsatellite Heterozygosity, and Morphological traits in lipizzan horses. *Journal of Heredity*. 94: 125-132

24. David P. (1998) Heterozygosity–fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity* : 80, 531–537
25. Diamant A., Wajsbrot N. (1997) Experimental transmission of *Myxidium leei* in gilt head seabream *Sparus aurata*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 17(3/4):99-103
26. Diamant A. (1997) Fish – to- fish transmission of a marine myxospore- 563 ean. *Dis. Aquat. Org.* 30: 99-105
27. DeWoody JA and Avise JC, (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater, and anadromous fishes compared with other animals. *J Fish Biol* 56:461–473.
28. DeWoody Y. D. & DeWoody J. A. (2005) On the Estimation of Genome-wide Heterozygosity Using Molecular Markers. *Journal of Heredity* :96(2):85–88
29. Eisenstein BI. (1990) The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med*, 322:178–183
30. Falconer D. S. & Mackay T. F. C. (1995) *Introduction to quantitative genetics.* Longman, London
31. Fassatoui C., Chenuil A., Romdhane M.S. (2012) Relationship between heterozygosity, growth parameters and age in the common pandora *Pagellus erythrinus* (Sparidea) in the Gabes Culf (Tunisia). *Marine ecology progress series.* 445: 251-261.
32. Forstmeier W., Schielzeth H., Mueller J.C., Ellegren H. and Kempenaers B. (2012) Heterozygosity–fitness correlations in zebra finches: microsatellite markers can be better than their reputation. *Molecular Ecology* 21 (13): 3237–3249

33. Fisher MC, DE Hoog S, Akom NV. (2004) A highly discriminatory multilocus microsatellite typing (MLMT) system for *Penicillium marneffei*. *Mol Ecol Notes*, 4:515–518
34. Franch R, Louro B, Tsalavouta M, Chatziplis D, Tsigenopoulos CS, et al. (2006) A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics* 174: 851–861.
35. Golomazou E., Athanassopoulou F., Karagouni E., Tsagozis P., Tsantilas H., Vagianou S. (2006) Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom and Dykova, 1994 in sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters. *Aquaculture*, 260(1-4): 44-53
36. Gomez-Flores, R., Rabago-Castro, J., Sanchez-Martinez, J.G., Loredó-Osti, J., Tamez-Guerra, P. & Ramirez-Pfeiffer, C. (2011) . Temporal and spatial variations of ectoparasites on cage-reared channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in Tamaulipas, Mexico. *J. World Aquac. Soc.*42: 406–411
37. Gouzelou E, Haralambous C, Amro A, Mentis A, Pratlong F, Dedet JP (2012) Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic *L. donovani* sensu lato group. *PLoS Negl Trop Dis*, 6:1507
38. Halverson, M.A., Skelly, D.K. & Caccone, A. (2006) . Inbreeding linked to amphibian survival in the wild but not in the laboratory. *J. Hered.*97: 499–507.
39. Hansson B., Westerberg L. (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in nature populations. *Molecular Ecology* 11 (12): 2467-2474



40. Hawley, D.M., Sydenstricker, K.V., Kollias, G.V. & Dhondt, A.A. (2005). Genetic diversity predicts pathogen resistance and cell-mediated immunocompetence in house finches. *Biol. Lett.* 1: 326–329.
41. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*, 10:413–417
42. Hoffman J., Hanson N., Forcada J., Trathan P.N., Amos W. (2010) Getting long in the tooth: A strong positive correlation between canine size and heterozygosity in Antarctic Fur seals *Arctocephalus gazelle*. *Journal of Heredity* 101: 527-538
43. Høglund J. (2009) Evolutionary conservation genetics. Oxford. University Press. pp 57
44. Jachowski, D.S., Hubbart, J.A. & Eads, D.A. (2011). Seasonal and among-site variation in the occurrence and abundance of fleas on California ground squirrels (*Otospermophilus beecheyi*). *J. Vector Ecol.* 36: 117–123.
45. Jacquard, A. (1975). Inbreeding—one word, several meanings. *Theor. Popul. Biol.* 7:338–363.
46. Jimenez de la Fuente J., Marcotegui M.A., Juan S., Basurco B. (1988) Diagnosis of viral disease in salmonid farms in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 8:1-2
47. Krasnov, B.R. & Lareschi, M. (2010). Determinants of ectoparasite assemblage structure on rodent hosts from South American marshlands: the effect of host species, locality and season. *Med. Vet. Entomol.* 24: 284–292.

48. Kwoh DY, Davis GR, Whitfield KM, Chappelle HL, Dimichele LJ, Gingeras TR. (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:1173–1177
49. Lieutenant- Gosselin M. & Bernatchez L. (2006) Local heterozygosity- fitness correlations with global positive effects on fitness in Threespine Stickleback. *Evolution* 60(8): 1658-1668
50. Lenfant P. (2002) Heterozygosity and fitness: the case of marine fish *Diplodus sargus* (Linne, 1758)
51. Lesbarreres, D., Primmer, S.R., Laurila, A. & Merila, J. (2005). Environmental and population dependency of genetic variability-fitness correlations in *Rana temporaria*. *Mol. Ecol.* 14: 311–323.
52. Lopez-Fanjul, C., and Villaverde A.. (1989) Inbreeding increases genetic variation for viability in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 43: 1800–1804.
53. Lopez-Pujol J., Zhang F.M., Ge S. (2008) No Correlation Between Heterozygosity and Vegetative Fitness in the Narrow Endemic and Critically Endangered *Clematis acerifolia* (Ranunculaceae) *Biochem Genet* 46:433–445
54. Loukovitis D. (2013) Selective breeding designs utilizing molecular and quantitative genetics for the improvement of aquacultured Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy. Aristotle University of Thessaloniki
55. Lynch M., Blanchard J., Houle D., Kibota T., Schultz S. (1999) Spontaneous deleterious mutation. *Evolution* 53: 645-663

56. Marr, A.B., Arcese, P., Hochachka, W.M., Reid, J.M. & Keller, L.F. (2006). Interactive effects of environmental stress and inbreeding on reproductive traits in a wild bird population. *J. Anim. Ecol.* 75: 1406–1415.
57. Mitton JB and Pierce BA, (1980). The distribution of individual heterozygosity in natural populations. *Genetics* 95:1043–1054.
58. Norqvist A., Norrman B. and Wolf-Watz H. (1990) Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* 58 (11): 3731-3736
59. Ohta, T., and C. C. Cockerham. (1974). Detrimental genes with partial selfing and effects on a neutral locus. *Genet. Res.* 23:191–200.
60. Orr H.A. (2009) Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet.* 10 (8): 531-539
61. Persing DH. (1991) Polymerase chain reaction: Trenches to benches. *J Clin Microbiol*, 29:1281–1285
62. Peruski LF, Peruski AH. Rapid diagnostic assays in the genomic biology era: detection and identification of infectious disease and biological weapon agents. *Biotechniques*, 35:840-6
63. Reed, D. H., and Frankham R.. (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55:1095–1103.
64. Rigos G., Christophologiannis P., Yiagnisi M., Andriopoulou A., Koutsodimou M., Nengas I., Alexis M. (1999) Myxosporean infection in Greek mariculture. *Aquaculture International*, 7(5): 361-364

65. Rousset, F. (2002). Inbreeding and relatedness coefficients: what do they measure? *Heredity* 88:371–380.
66. Rowe G., Beebee T. J. C., Burke T. (1999) Microsatellite heterozygosity, fitness and demography in natterjack toads *Bufo calamita*. *Animal Conservation* 2: 85-92
67. Szulkin M., Bierne N., David P. (2010) HETEROZYGOSITY-FITNESS CORRELATIONS: A TIME FOR REAPPRAISAL. *Evolution*, Volume 64, 5: 1202–1217
68. Tarasevich IV, Shaginyan IA, Mediannikov OY. (2003) Problems and perspectives of molecular epidemiology of infectious diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 990: 751-6.
69. Taylor S.S., Sardell R.J., Reid J.M., Bucher T., Taylor N.G., Arcese P., Keller L.F. (2010) Inbreeding coefficient and heterozygosity- fitness correlation in unhatched and hatched song sparrow nestmates. *Molecular Ecology* , 19: 4454-4461
70. Tripet, F. & Richner, H. (1997). The coevolutionary potential of a ‘generalist’ parasite, the hen flea *Ceratophyllus gallinae*. *Parasitology* 115: 419–427
71. Tsitrone, A., F. Rousset, and P. David. (2001). Heterosis, marker mutational processes and population inbreeding history. *Genetics* 159:1845–1859.
72. Vendrell D., Balcázar J.L., Ruiz-Zarzuela I., Blas I., Gironés O., Múzquiz J.L. (2006) *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 29 (4): 177–198

73. Voegeli B., Saladin V., Wegmann M., Richner H. (2012) Parasites as mediators of heterozygosity–fitness correlations in the Great Tit (*Parus major*). *Journal of Evolutionary Biology*, Volume 25, Issue 3, pages 584–590
74. Vogel F. & Motulsky A. G. (1997) *Human genetics: Problems and approaches*. Springer-Verlag, Berlin.
75. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
76. White TJ, Madej R, Persing DH. (1992) The polymerase chain reaction: Clinical applications. *Adv Clin Chem*, 29:161–196
77. Wu D., Wallace RB. (1989) The ligation amplification reaction (LAR) – amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics*, 4:560–569
78. Zhanga Q., Standish I., Wintersb A.D., Puzach C., Ulferts R., Ziebhre J., Faisal M. (2014) Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of the fathead minnow nidovirus. *Journal of Virological Methods* 202: 39–45

## Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Γεωργίου Σ., Ντεζέ Μ., Giuffrida S., Power D. M., Μαμούρης Ζ., Μούτου Κ.Α. (2012) Πως η ηλικία και το διατροφικό καθεστώς επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων του λευκού μυός στην τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) Πρακτικά 34ου Επιστημονικού Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών Τρίκαλα: 38
2. Καρακατσούλη Ν., Κασσιανός Ν., Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2011) Επίδραση της πυκνότητας εκτροφής και του χρώματος των δεξαμενών στην ανάπτυξη νεαρών ατόμων μυτακίου *Diplodus puntazzo*. Πρακτικά 4<sup>ου</sup> Διεθνές Συνεδρίου Υδροβιολογίας- Αλιείας, Βόλος 9-11 Ιουνίου
3. Καρατζίνος Θ. (2012) Διαχειριστικές πρακτικές στις ιχθυοκαλλιέργειες μέσω προληπτικής ανίχνευσης ασθενειών. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4. Κλαουδάτος Σ. και Κλαουδάτος Δ. (2010) Κατασκευές υδατοκαλλιεργητικών συστημάτων. Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα.
5. Κοϊνης Α., Καμάλη Α., Φλυτζάνης Κ. Ν., Χρήστου Μ. (2012) Μελέτη της σχέσης του ρυθμού αύξησης ψαριών zebrafish με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της σωματικής αύξησης και του μεταβολισμού. Πρακτικά 34ου Επιστημονικού Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών Τρίκαλα: 106
6. Παπαϊωάννου Χ. (2010) Γενετική δομή και φυλογενετικές σχέσεις ειδών της οικογένειας Sphaeromatidae. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών
7. Παπαφωτίου Π., Καρακατσούλης Ν., Παπουτσόγλου Σ. (2008) Επίδραση της συνεκτροφής στην ανάπτυξη νεαρών ιχθυδίων τσιπούρας (*T) Sparus aurata* και

μυτακίου (M) *Diplodus puntazzo*. Πρακτικά 3<sup>ου</sup> Διεθνές συνεδρίου Υδροβιολογίας- Αλιείας. Άρτα, σελ. 131

8. Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008) Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλης Α.Ε., Αθήνα.
9. Φώτης Γ.Δ., Αγγελίδης Π.Γ. (2003) Εκτροφή και παθολογία ιχθύων. Σύγχρονη παιδεία, τόμος Α: 241-259

## **Abstract**

The aim of the present study was to investigate the correlation of heterozygosity in fish *D. puntazzo* with fitness factors related to Enteromyxosis intensity and fifteen morphological parameters. Diagnosis of enteromyxosis is based on early detection of *Enteromyxum leei* using sensitive diagnostic methods like molecular techniques. However, as heterozygosity is related to resistance at diseases, it could be a useful parameter for the selection of farmed fish. Correlation between heterozygosity and fitness (HFC) was estimated with the molecular markers het\_Obs, IR, st. het\_Exp, st. het\_Obs, st. d-sqd and HL, proposing alternative measurements to detect inbreeding, while morphological characteristics were related to the expression of microsatellites. 15 morphological characteristics, the net weight, the preorbital distance, the nose- eye distance, the diameter of eye, the postordital distance, the head length, the pectoral fin length, the predorsal fin distance, the dorsal fin height, the dorsal fin base length, the maximum body depth, the anal base length, the anal fin height, the minimum body depth, the caudal peduncle length and the standard length of infected and uninfected with *E. leei* sharpnout seabream from a previous study, were measured and total DNA was isolated using the protocol of phenol- chloroform. Multiplex PCR kit was used and PCR process conditions were adjusted to 95 ° C for fifteen minutes and held thirty cycles. Enteromyxosis intensity was significantly correlated to heterozygosity, according to microsatellite marker IR while significant correlation was assessed between heterozygosity and 11 morphological characteristic indicating their correlation to fish resistance at enteromyxosis.

**Key words:** HFC, *E. leei*, morphological characteristic, microsatellites.