

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σχέση Ετεροζυγωτίας και Παρασιτικού Φορτίου Εντατικά
Εκτρεφόμενων Ψαριών**

Παγάνας Γεώργιος

Βόλος 2016

«Σχέση ετεροζυγωτίας και παρασιτικού φορτίου εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1. Ελένη Γκολομάζου**, Λέκτορας - Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα.
- 2. Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια - Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
- 3. Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής- Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, 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 Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κ. Γκολομάζου Έλενα καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Παναγιώτα Παναγιωτάκη και Αθανάσιος Εξαδάκτυλος ,όπως και τον Γεώργιο Γκάφα, Δανάη, Ελίνα και Κωνσταντίνα 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

Στόχος της ακόλουθης διπλωματικής εργασίας και έρευνας είναι η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας στο ψάρι *Diplodus puntazzo*(χιόνα) με στοιχεία αρμοστικότητας, όπως για παράδειγμα η παρασιτολογική ασθένεια εντερομύξωση. Η έγκαιρη διάγνωση του παθογόνου παράγοντα *Enteromyxum leei* συμβάλλει καθοριστικά στη συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την παρασίτωση, με τη χρήση ευαίσθητων διαγνωστικών μεθόδων, όπως οι μοριακές τεχνικές και δυνητικά αποτελεί χρήσιμη παράμετρο στην επιλογή γεννητόρων στις μονάδες εντατικής εκτροφής. Ο υπολογισμός των μικροδορυφορικών δεικτών *het_Obs*, *IR*, *st. het_Exp*, *st. het_Obs*, *st. d-sqd* χρησιμοποιήθηκε για τη συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα (HFC), με στόχο την εύρεση του συντελεστή της ομομιξίας, ενώ η ένταση παρασίτωσης χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης αρμοστικότητας. Η απομόνωση του ολικού DNA πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφορμίου, ενώ για την μέθοδο της PCR χρησιμοποιήθηκε MultiplexPCRKit 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*, υποδηλώνοντας την αντοχή της χιόνας στην παρασίτωση.

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

Εισαγωγή

Ο όρος «υδατοκαλλιέργεια» αντιπροσωπεύει την εντατική εκτροφή ιχθύων, δίθυρων και μαλακίων, υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Λόγω της αυξανόμενης ζήτησης ιχθύων αποτελεί τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο τομέα διατροφικής παραγωγής. Στην Ελλάδα ξεκίνησε η ανάπτυξη των πρώτων υδατοκαλλιεργειών το 1951, όταν αποπειράθηκε ο εμπλουτισμός των ορεινών ρέοντων υδάτων με την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*). Η χώρα πλέον έχει καταταχθεί εντός των πιο δυναμικών στην μεσόγειο, με την εντατική εκτροφή τσιπούρας και λαβρακιού (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος 2010). Στις αρχές του εικοστού αιώνα παρατηρήθηκε, σε παγκόσμιο επίπεδο, ραγδαία ανάπτυξη της εντατικής εκτροφής υδρόβιων οργανισμών.

Σχετικά με την Ελλάδα, ο τομέας παρουσίασε άνθηση όχι μόνο χάρη στις ευνοϊκές κλιματολογικές συνθήκες αλλά και εξαιτίας της αυξανόμενης αλιευτικής πίεσης που ασκούταν στα ιχθυοαποθέματα (Φώτης & Αγγελίδης, 2003). Η τσιπούρα και το λαβράκι αποτελούν τα κύρια είδη εκτροφής στην Ελλάδα, 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) αποτελεί ένα από τα σχετικά νέα εκτρεφόμενα είδη της οικογένειας Sparidae. Οι συνθήκες εκτροφής της είναι παρόμοιες με αυτές της τσιπούρας (Καρακατσούλη *etal.*, 2011). Η συνεκτροφή του είδους της χιόνας με τη τσιπούρα έχει αποδειχθεί αναγκαία (Παπαφωτίου *etal.*, 2008) κατά κύριο λόγο στα πρώτα στάδια εκτροφής της χιόνας, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε βελτιωμένος ρυθμός ανάπτυξης, όταν η αναλογία τσιπούρας- χιόνας ήταν 60- 40 αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι το ποσοστό θνησιμότητας της χιόνας στις τριάντα πρώτες ημέρες του πειράματος ήταν περίπου 6%, ποσοστό το οποίο

μειώθηκε αισθητά και τελικά σταθεροποιήθηκε κατά το πέρας του πειράματος ($P > 0,05$).

Διάφορα νοσήματα έχουν δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα στις μονάδες εντατικής εκτροφής, εξαιτίας της γρήγορης και μεγάλης ανάπτυξης των υδατοκαλλιιεργειών. Ποικίλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, ιοί, βακτήρια, παράσιτα, μύκητες και κάποια διατροφικά σφάλματα και νεοπλάσματα αποτελούν την αιτία των διάφορων αυτών νοσημάτων. Η επίλυση των προαναφερθέντων προβλημάτων κρίνεται απαραίτητη, καθώς αυτά δημιουργούν μεγάλες ζημιές στις υδατοκαλλιέργειες. (Coscellietal. 2014). Αν και ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί σχετικά με την ανίχνευση, την αντιμετώπιση και την πρόληψη των εν λόγω νοσημάτων, ο κλάδος της ιχθυοπαθολογίας ακόμη παραμένει σε εξελικτικό στάδιο. Η συνεχής μελέτη λοιπόν και η έρευνα των νοσημάτων είναι, κατά επέκταση, απαραίτητη, με τελικό στόχο την επίλυση των προβλημάτων, όπως για παράδειγμα της μεταφοράς των παθογόνων οργανισμών από τα ψάρια εντατικής εκτροφής προς το περιβάλλον, καθώς και τις οικονομικές ζημιές της ιχθυομονάδας, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα μολυσμένα ψάρια τις περισσότερες φορές είναι αντιαισθητικά και απρόσιτα για τους καταναλωτές (Zhang *et al.* 2014). Η ανάγκη για πρόληψη και αντιμετώπιση των ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια αυξάνεται ακόμη περισσότερο, δεδομένης της μεγάλης ανάπτυξης της υδατοκαλλιέργειας. Κρίνεται, συνεπώς, απαραίτητη η γνώση της ιχθυοπαθολογίας τόσο για την αντιμετώπιση των ασθενειών, όσο και για την προστασία της δημόσιας υγείας από τα νοσήματα των ψαριών, τα οποία μεταδίδονται στον άνθρωπο (Φώτης & Αγγελίδης, 2003).

Η κοινή και παρόμοια συμπτωματολογία των ασθενειών των ιχθύων καθιστά ακόμη πιο δύσκολη τη διάγνωσή τους. (Antuofermo *et al.* 2014). Σε πολλές περιπτώσεις,

λοιπόν, όταν η ασθένεια εκδηλωθεί, είναι αργά για οποιαδήποτε ενέργεια. Πρόβλημα ακόμη αποτελεί το γεγονός ότι η πλειοψηφία των βακτηρίων και μυκήτων που προκαλούν ασθένειες, υπάρχουν ούτως ή άλλως στο περιβάλλον, ως μέρος της φυσικής χλωρίδας και πανίδας του. Εξαιτίας της μικρής ιχθυοπυκνότητας συχνά δεν προκαλούν σημαντικές επιπτώσεις στους οργανισμούς (Angelidis *et al.*, 2008). Τα ψάρια αποκτούν ευπάθεια στους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς με την καταπόνηση που προκύπτει όταν πραγματοποιηθούν αλλαγές στις συνθήκες του νερού (όπως αλλαγές θερμοκρασίας, pH, κ.λπ.). Η έγκαιρη διάγνωση των ασθενειών είναι κρίσιμη, δεδομένης της μεγάλης θνησιμότητας που συνεπάγονται πολλές από αυτές, πράγμα το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε εκτεταμένη οικονομική ζημιά στις μονάδες εκτροφής (Zhang *et al.* 2014). Το βασικό δηλαδή συμπέρασμα είναι πως το καλύτερο μέτρο πρόληψης και αντιμετώπισης των ασθενειών σε οποιοδήποτε στάδιο της εκτροφής δεν είναι παρά η έγκαιρη διάγνωση του παθογόνου παράγοντα με τη χρήση γρήγορων, αξιόπιστων και ευαίσθητων διαγνωστικών μεθόδων (Jimenez *et al.*, 1988). Σε σύγκριση με τη βιολογική και παθολογική έρευνα άλλων παραγωγικών ζώων, η εφαρμοσμένη έρευνα στη βιολογία, στη διατροφή και στην ιχθυοπαθολογία των εκτρεφόμενων ειδών είναι σε πρωτογενές ακόμη στάδιο. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητη η περαιτέρω έρευνα νέων τεχνικών με ικανοποιητικούς ρυθμούς, προκειμένου να υποστηριχθεί επαρκώς η αλματώδης ανάπτυξη του κλάδου σε παραγωγικό επίπεδο (Πράπας *et al.*, 2000)

Οι μοριακές τεχνικές αποσκοπούν στην άμεση και γρήγορη ταυτοποίηση των ασθενειών, εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητάς τους. Κύρια μοριακή τεχνική είναι η PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερασης- Polymerase Chain Reaction). Αρχικά η PCR τεχνολογία συνδύασε τον κύκλο του DNA για τον

πολλαπλασιασμό του, με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (Tarasevich *etal.*, 2003). Αυτή εφαρμόζεται στην ιολογία με 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. Μοριακές τεχνικές έχουν επίσης εφαρμοστεί και στην παρασιτολογία και μυκητολογία για την ταχεία διάγνωση λοιμώξεων (Peruski *etal.*, 2003).

Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του οργανισμού αποτελούσαν το μέσο ταυτοποίησης και ανίχνευσης παθογόνων, μέχρι και τον προηγούμενο αιώνα. (Norqvist *etal.*, 1990 & Vendrell *etal.*, 2006). Με την τεχνολογία ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων έχουν ανοιχτεί νέοι ορίζοντες στη διάγνωση και ταυτοποίηση και είναι πλέον αδιαμφισβήτητο ότι οι μοριακές μέθοδοι έχουν υπερβεί τις παραδοσιακές μεθόδους διάγνωσης για την πλειονότητα των παθογόνων (Persing, 1991). Η εκτεταμένη 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 *etal.*, 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. Το τελευταίο στάδιο αποτελεί 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 διπλασιάζεται, σύμφωνα με τη θεωρία. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 30 κύκλους κατά προσέγγιση, 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 marneffeii* και το παράσιτο *Leishmania donovani*

(Gouzelouetal., 2012). Σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής MLMT είναι ότι, σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, επιτρέπει την περαιτέρω διαφοροποίηση στελεχών στα ευκαρυωτικά παθογόνα (Schonianetal., 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 μπορούν επαναληφθούν πολλές φορές, παραμένοντας ίδια. 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 αλληλουχείται, για μεγαλύτερη ακρίβεια, είτε ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα υψηλής διακριτικής ισχύος (Fisheretal., 2004).

Με τη διαστάρωση διαφορετικών πληθυσμών ενός καλλιεργούμενου φυτού ή ζώου, σε πολλές περιπτώσεις προκύπτει 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 (inbreedingdepression) (Vogel&Motulsky, 1997). Από την εποχή του Δαρβίνου η ετέρωση και η ομομικτική κατάπτωση είναι γνωστά φαινόμενα, ο οποίος πραγματοποίησε μια σειρά πειραμάτων επί της ομομικτικής κατάπτωσης. Ο συντελεστής ομομιξίας (inbreedingcoefficient, F) ενός ατόμου σχετίζεται με την επιβίωσή του μέχρι την ενηλικίωση (Falconer&Mackay, 1995). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί (Lynchetal., 1999) ότι στον πληθυσμό των σπουργιτιών του Μαντάρτ υπάρχει ετέρωση. Υψηλότερη αρμοστικότητα παρατηρήθηκε στους απογόνους

εποίκων από την ηπειρωτική χώρα που ζευγαρώνουν με ιθαγενή σπουργίτια. 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 φυτά όσο και σε ζώα σε αρκετές περιπτώσεις (David P., 1998).

Συσχετίσεις μεταξύ της ετεροζυγωτίας και των συνιστωσών της αρμοστικότητας μπορούν να παρατηρηθούν εύκολα με τη χρήση των μικροδορυφόρων (Forstmeier *etal.*, 2012 & Charman *etal.*, 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 *etal.*, 1999) ότι η επιβίωση των μικρών όσο και των μεγάλων προβάτων αυξάνεται σημαντικά με την ετεροζυγωτία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ομομικτικά πρόβατα είναι πιο ευάλωτα σε νηματώδεις σκώληκες οι οποίοι παρασιτούν στο πεπτικό τους σύστημα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ομομικτική κατάπτωση εκδηλώνεται κυρίως μέσω της διακύμανσης στην ανθεκτικότητα των ατόμων στα παράσιτα. Έχει ακόμη ερευνηθεί (Taylor *etal.*, 2010) η σχέση της πιθανότητας ζευγαρώματος του σπουργιτιού (*Melospiza melodia*) ως δείκτης αρμοστικότητας με την ετεροζυγωτία.

Ένας κομβικός στόχος της εξελικτικής βιολογίας είναι η κατανόηση της δράσης της φυσικής επιλογής στους πληθυσμούς. Η μελέτη φαινοτύπων σε πολλές περιπτώσεις έχει καλύψει το αντικείμενο αυτό χρησιμοποιώντας ποσοτική γενετική ανάλυση, ενώ μέσω μοριακών τεχνικών μελετάται το γονιδιακό επίπεδο

(Schonianetal., 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 (Szulkinetal., 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 & Lynchetal., 1999).

Δεδομένου ότι υπάρχει μια πληθώρα μελετών που προσπαθούν να βρουν τη συσχέτιση της αρμοστικότητας με την ετεροζυγωτία και εξαιτίας των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων αυτών, η έρευνα και οι τρόποι προσδιορισμού του HFC παραμένουν αμφιλεγόμενοι. Σε προγενέστερες περιόδους, οι μοριακές μετρήσεις γενετικής παραλλακτικότητας είχαν ως επί το πλείστον βασιστεί σε αλλοενζυμικούς δείκτες, οι οποίοι όμως έχουν αρκετούς περιορισμούς, εξαιτίας της ευαισθησίας τους (Gouzelouetal., 2012). Τον τελευταίο καιρό, ωστόσο, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο οι μικροδορυφόροι για συσχετίσεις μεταξύ ετεροζυγωτίας και αρμοστικότητας. Οι Roweetal το 1999 μελέτησαν, χρησιμοποιώντας 38 μικροδορυφορικούς τόπους, τη συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με χαρακτηριστικά της αρμοστικότητας στο είδος βατράχου *Bufo calamita*, και τα αποτελέσματά τους έδειξαν τη θετική συσχέτιση αυτών. Οι Borrelletal. , από την άλλη, το 2004 μελέτησαν τη σχέση της ετεροζυγωτίας με μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι το μήκος και το βάρος του είδους *Salmo salar*. Πιο συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές

διαφορές στη σχέση ετεροζυγωτίας με το βάρος και το μήκος εκτρεφόμενων σολομών υπολογίζοντας το d^2 με τη χρήση οκτώ μικροδορυφορικών τόπων. Αντιθέτως, σε παρόμοια μελέτη για το συσχετισμό μεταξύ ετεροζυγωτίας και βάρους νεογνών του είδους *Phoca vitulina*, παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικές διαφορές με τη χρήση του παράγοντα d^2 (Coltman et al., 1998). Επιπλέον, με τη χρήση εννέα μικροδορυφόρων παρατηρήθηκε η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με το μήκος των δοντιών της φώκιας *Arctocephalus gazella*, (Hoffman et al., 2010).

Το γεγονός ότι η μέθοδος των μικροδορυφόρων έχει εφαρμοστεί και για την συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα, χρησιμοποιώντας ως δείκτη αρμοστικότητας την ύπαρξη ή απουσία παρασίτων στο εκάστοτε είδος που μελετάται, είναι κάτι ακόμη που αξίζει να αναφερθεί. Για την ακρίβεια έχει διερευνηθεί (Voegeli et al., 2012) η επίδραση της πειραματικής παρασίτωσης του είδους πτηνού *Parus major* στο HFC. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από παρασιτωμένα πουλιά και με τη χρήση σαράντα πέντε μικροδορυφόρων εντοπίστηκε μία σημαντική συσχέτιση της παρασίτωσης με την ετεροζυγωτία. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο βαθμός παρασίτωσης δεν επηρεάζεται από το HFC.

Σκοπός παρούσας μελέτης

Κύριος στόχος της ακόλουθης μελέτης είναι η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας στο ψάρι *Diplodus puntazzo* με στοιχεία αρμοστικότητας, όπως είναι η παρουσία ή απουσία παρασίτων *Enteromyxum leei*.

Το επιλεγθέν παράσιτο έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί σημαντικές απώλειες στις Μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες, καθώς επίσης έχει αποδειχθεί ότι όσον αφορά στην τσιπούρα και στη χιόνα έχει άμεσο βιολογικό κύκλο και μεταδίδεται κατά πάσα πιθανότητα μέσω νερού (Diamant 1997, Diamant&Wajsbrodt 1997, Golomazou *et al.* 2006). Σε θερμοκρασίες άνω των 22° C τα ποσοστά θνησιμότητας αυξάνονται, ενώ μειώνονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C. Η συμπτωματολογία των μολυσμένων ψαριών περιλαμβάνει απίσχναση με διογκωμένες χοληδόχους κύστες και διογκωμένο κοιλιακό τοίχωμα. Σε κάποιες περιπτώσεις έχει επίσης παρατηρηθεί αποχρωματισμένο και πρασινωπό ήπαρ με εμφανή σημάδια λιπώδους εκφύλισης. Στα σπλάχνα των μολυσμένων ψαριών παρατηρείται σημαντική ποσότητα λίπους. (Rigos *et al.*, 1999).

Υλικά και Μέθοδοι

Επιλογή δειγμάτων

Δείγματα χιόνος από προηγούμενη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας μελέτης, κατά την οποία έγιναν 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 συγκεκριμένο είδος ψαριού επιλέχθηκε ως το πιο ευπαθές στην παρασίτωση από το συγκεκριμένο μυξοσπορίδιο, καθώς έχουν παρατηρηθεί μεγάλες θνησιμότητες εξαιτίας της ασθένειας. Ιχθυοπαθολογική εξέταση πριν την είσοδό τους στην πάχυνση στις 26 Μαρτίου του 2010, πραγματοποιήθηκε στα δείγματα με στόχο τη διαπίστωση ότι τα ψάρια είναι απαλλαγμένα από παθογόνους οργανισμούς, σύμφωνα με την ορθή πρακτική που εφαρμόζεται. Με σύμπηκτα κατάλληλα για χιόνες γινόταν καθημερινά η διατροφή των δειγμάτων. Η εισαγωγή των ψαριών στην πάχυνση πραγματοποιήθηκε όταν είχαν βάρος 2g λίγο πριν την έναρξη των δειγματοληψιών. Σταδιακή αύξηση του βάρους από $2,4 \pm 0,21$ g τον Απρίλιο, σε $26,8 \pm 2,11$ g τον Αύγουστο παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος. Πραγματοποιούνταν, επίσης, 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. Παρατηρώντας το θερμοκρασιακό 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 η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιούνταν την τελευταία μέρα κάθε μήνα, έτσι ώστε να υπάρχει πρόβλεψη για τον επόμενο μήνα. Κάθε μήνα γινόταν η συλλογή είκοσι τυχαίων ψαριών από τον ίδιο κλωβό και καταψύχονταν άμεσα στους -20°C με σκοπό να εξεταστούν νεκροσκοπικά και παρασιτολογικά για την παρουσία ή την απουσία του παρασίτου *E. leei*, ενώ υπήρχε συνεχής καταγραφή της θνησιμότητας.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τα οποία 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. Επιπλέον, έγινε άμεση ταυτοποίηση των παρασίτων μετά την ανεύρεσή τους με βάση τις κλειδες, υπολογίστηκε το ποσοστό προσβολής καθώς και η ένταση της παρασίτωσης. Τέλος, ανιχνεύθηκε το παράσιτο *E. leei* με τη τεχνική της qPCR.

Απομόνωση ολικού DNA και PCR

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού DNA από τον μυϊκό ιστό ψαριών πάνω από την κοιλιακή χώρα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο φαινόλης- γλωροφορμίου (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°C , τοποθετήθηκαν σε κυβέττες και προστέθηκαν 500 μl TNE, 100 μl SDS, 100 μl Tris-HCl και 10 μl ProteinaseK σε κάθε δείγμα, και έπειτα από δίωρη επώαση σε υδατόλουτρο (εικόνα 1), προστέθηκαν 300 μl φαινόλης και 300 μl γλωροφόρμιο-ισοαμυλική (24/1). Στη συνέχεια στα μίγματα

πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση (εικόνα 2) στις 12000 στροφές για δέκα λεπτά στους 4 °C και χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο. Σε αυτό, προστέθηκαν 600 μl χλωροφόρμιο-ισοαμυλική και φυγοκεντρίθηκαν για 10 λεπτά στις 12000 στροφές στους 4°C. Έπειτα, προστέθηκε 1 ml καθαρής αλκοόλης, καθώς και 10 μl sodium acetate και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20 °C για τριάντα λεπτά. Εν συνεχεία, 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 °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.

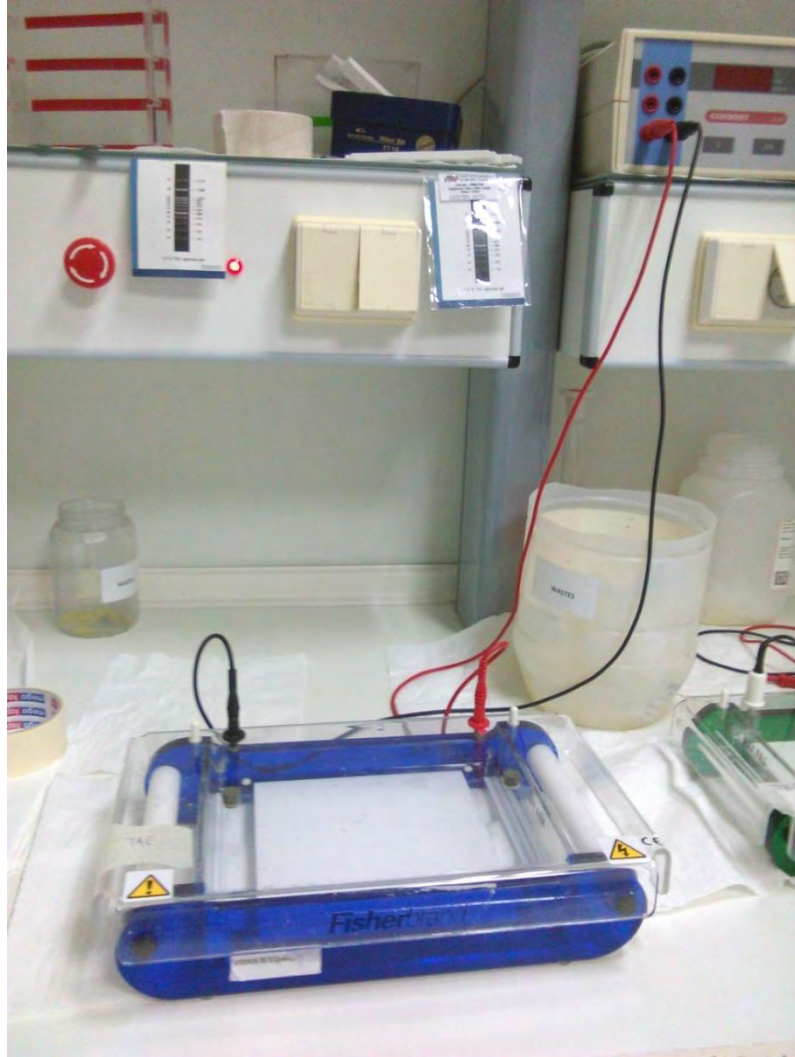
Για την μέθοδο της PCR (εικόνα 4) χρησιμοποιήθηκε multiplexPCRKit (Qiagen), ενώ οι συνθήκες της μεθόδου ρυθμίστηκαν στους 95°C για δεκαπέντε λεπτά και πραγματοποίησε τριάντα κύκλους. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα παρέμειναν στους 95°C για ένα λεπτό, έπειτα στους 72°C για μισό λεπτό και τέλος στους 75°C 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.



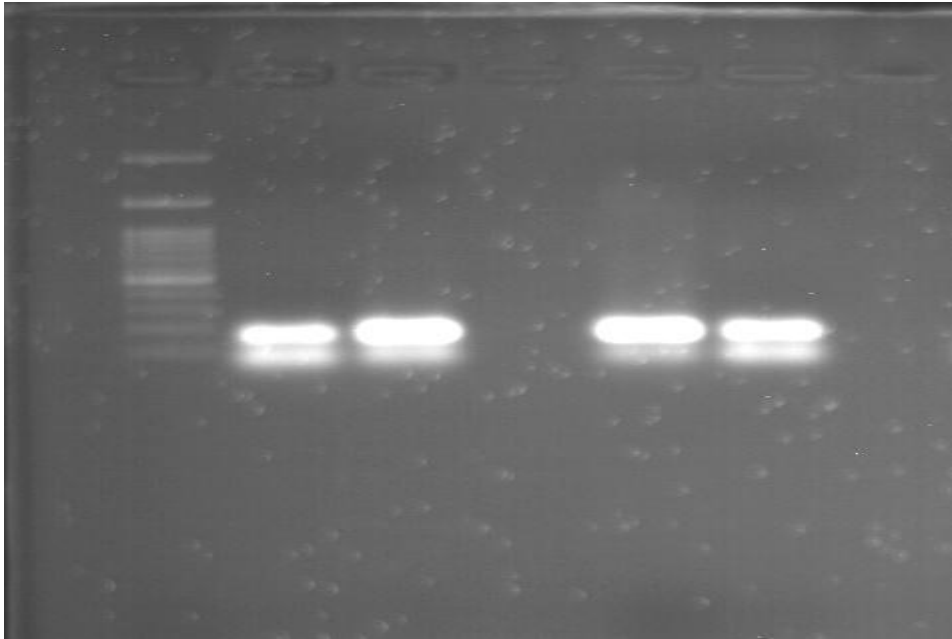
Εικόνα 4: PCR που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία του πειράματος

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα SPSS καθώς και το excel για τον υπολογισμό των συσχετίσεων των μικροδορυφορικών δεικτών με το παρασιτικό φορτίο.

Αποτελέσματα

Έπειτα από την πραγματοποίηση της διαδικασίας της απομόνωσης του ολικού DNA, έγινε οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για την απεικόνιση της ποιότητας και ποσότητας του γενετικού υλικού όπως απεικονίζεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: απεικόνιση του DNA με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης

Διασπορά αριθμού παρασίτων με μικροδορυφορικούς δείκτες:

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.

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των μέσων τιμών από κάθε μικροδορυφορικό τόπο, μεταξύ ατόμων που έχουν παράσιτα και ατόμων που δεν έχουν σε επίπεδο σημαντικότητας 95%, φαίνονται από τον πίνακα 1.

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

Pvalue

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

Όπως φαίνεται από τους πίνακες 1, μετά την πραγματοποίηση t-test μέσω των όρων βρέθηκε ότι για την πρώτη παράμετρο het_Obs το $p=0.89$. Δεν θεωρείται, συνεπώς, στατιστικά σημαντική διαφορά. Στατιστικά σημαντική διαφορά, αντίθετα, βρέθηκε να υπάρχει για την δεύτερη παράμετρο IR, όπου $p=0$. 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, μόνο στον δεύτερο δείκτη IR παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Συζήτηση

Σχετικά με το HFC έχουν υπάρξει διάφορες μελέτες οι οποίες κάνουν λόγο για μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ετών και των πληθυσμών που μελετούνται. Σαν εξήγηση για την εν λόγω αντίθεση έχουν προταθεί οι ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Coltman & Slate, 2003 & Balloux *et al.*, 2004). Οι αβιοτικοί παράγοντες έχουν επίσης παρατηρηθεί ότι επιδρούν στην συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αρμοστικότητα (Lesbarreres *et al.*, 2005 & Halverson *et al.*, 2006 & Marr *et al.*, 2006). Η περίπτωση, ωστόσο των παρασίτων ως δείκτης αρμοστικότητας δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και εντοπίζεται σε περιορισμένο αριθμό μελετών (Coltman *et al.*, 1999 & Voegeli *et al.*, 2012). Η σχέση της ετεροζυγωτίας με την ύπαρξη ή την απουσία γαστρεντερικού παρασίτου παρατηρήθηκε ότι μπορούσε να προβλέψει την επιβίωση ενός είδους προβάτου κατά τη χειμερινή περίοδο. Στα άτομα, ωστόσο, τα οποία είχαν υποβληθεί θεραπεία κατά του συγκεκριμένου παρασίτου δεν βρέθηκε συσχέτιση της επιβίωσης με την ετεροζυγωτία. (Coltman *et al.*, 1999). Σε μια διαφορετική έρευνα (Voegeli *et al.*, 2012) παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της ύπαρξης παρασίτου σε είδος πουλιών με την ετεροζυγωτία.

Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε ότι με τον προσδιορισμό του μικροδορυφορικού δείκτη IR φαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση του μικροδορυφορικού τύπου με την παρουσία ή την απουσία του παρασίτου *E. leei*. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται 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, οι προαναφερθέντες παρατήρησαν ότι ο βαθμός παρασίτωσης δεν επηρεάζεται από το HFC.

Έχει υπονοηθεί ότι σε σύγκριση με άλλους παράγοντες της αρμοστικότητας η σχέση της ετεροζυγωτίας με την παρασίτωση είναι λιγότερο ευαίσθητη. (Coltman *et al.*, 1999 & Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2005 & Hawley *et al.*, 2005). Τα αποτελέσματα ερευνών με δείκτη αρμοστικότητας την παρασίτωση αποδεικνύουν, κατά συνέπεια, ότι τα άτομα με ετεροζυγωτία επωφελούνται είτε από την αυξημένη αντίσταση των παρασίτων, είτε από την ανοχή τους στα παράσιτα, χάρη στην υψηλότερη γενετική ποικιλομορφία τους. Είναι, λοιπόν, σε θέση να επενδύσουν περισσότερο στην ανάπτυξη και την αύξηση, παρά στο παρασιτικό τους φορτίο. Τα ετερόζυγα άτομα θα μπορούσαν, λοιπόν, να αντιμετωπίσουν ευκολότερα τις αρνητικές επιπτώσεις της παρασίτωσης δεδομένου ότι θα μπορούσαν να έχουν υψηλότερο σθένος και μεγαλύτερη ανοχή γενικά. Και στις δύο περιπτώσεις θα μπορούσε να οδηγήσει στην παρατήρηση του HFC. Η συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την αντίσταση της παρασίτωσης ή ακόμη και την ανοχή σε αυτή, μπορεί να οδηγήσει σε παρατήρηση του HFC και μέσω άλλων παραγόντων και κατά συνέπεια να εξηγηθεί εκτενέστερα το HFC, εφόσον η αφθονία των παρασίτων είναι ποικίλα μεταξύ της εποχής και των πληθυσμών. (Krasnov&Lareschi, 2010 &Gomez-Flores*etal.*, 2011 &Jachowski*etal.*, 2011).

Σχέση με την ένταση της παρασίτωσης δεν εντοπίστηκε, έχει ωστόσο παρατηρηθεί (Voegeli*etal.*, 2012) ότι υπάρχει συσχέτιση στο HFC με την επικράτηση των παρασίτων. Οι διεργασίες των παρασίτων παρασίτων που επηρεάζονται από την πυκνότητά τους όπως για παράδειγμα ο ρυθμός αναπαραγωγής, ο οποίος αλλάζει όταν η πυκνότητα του πληθυσμού είναι υψηλή, μπορούν να εξηγήσουν την έλλειψη αποτελεσμάτων σχετικά με την ένταση (Tripet & Richner, 1999).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν, επίσης, οι συσχετίσεις των μικροδορυφορικών δεικτών με αρκετές μορφολογικές παραμέτρους. Μελετήθηκαν, για την ακρίβεια, 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 *Borrellet al.*, το 2004, οι οποίοι δεν παρατήρησαν στατιστικές σημαντικές διαφορές με τη χρήση οκτώ μικροδορυφορικών τόπων στη σχέση ετεροζυγωτίας με το βάρος και το μήκος εκτρεφόμενων σολομών *Salmosalar* υπολογίζοντας το d^2 , στη παρούσα εργασία εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις στην απόσταση μέχρι την κόγχη του οφθαλμού με τους δείκτες IR, st. hetExp, st. hetObs, στην απόσταση οφθαλμού-ρύγχους με τους δείκτες het_Obs και HL, στη διάμετρο του οφθαλμού με τους δείκτες IR, st. hetExp καθώς και st. hetObs, 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 αντίστοιχη 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 . Εντοπίστηκε, επίσης, θετική συσχέτιση της ετεροζυγωτίας με την επιβίωση προνυμφών είδος βατράχου *Bufo calamita* καθώς και με το ρυθμό ανάπτυξης αυτών, με τη χρήση 28 μικροδορυφορικών τόπων (Rowe *et al.* το 1999). Οι Borrel *et al.* το 2011 παρατήρησαν, αντιθέτως, αρνητική συσχέτιση με τη χρήση του δείκτη MLH, με δείκτες αρμοστικότητας όπως το μεσουραίο μήκος, το ολικό βάρος και το δείκτη ευρωστίας του είδους *Sparus aurata*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ετεροζυγώτες είχαν χαμηλότερη αρμοστικότητα σε αντίθεση με τους ομοζυγώτες, ενώ ομομικτική κατάπτωση δεν εντοπίστηκε. Στο είδος του λυθρινιού *Pagellus erythrinus* έχει ερευνηθεί η σχέση της ετεροζυγωτίας με την ηλικία, όπως και με παράγοντες ανάπτυξης. Μετρήθηκαν, για την ακρίβεια μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως το σταθερό μήκος, το ολικό σωματικό βάρος, το μήκος και βάρος των οτολίθων των ατόμων ως δείκτες αρμοστικότητας, όπως επίσης υπολογίστηκε και ο δείκτης ευρωστίας (Condition factor, CF) και ο σχετικός δείκτης ευρωστίας (relative condition factor, RCF) του κάθε ατόμου, ενώ αλλοενζυμική ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ετεροζυγωτίας. Η προαναφερθείσα μελέτη κατέληξε ότι μόνο οι οτόλιθοι είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ετεροζυγωτία ως δείκτες αρμοστικότητας (Fassatou *et al.*, 2012).

1. 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. Tsitroni, 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 microsatellite 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., Faílde 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* (Sparidae) 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. Hoglund 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., Christophiligiannis 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., Ziebuhr 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^{ου} 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. Κοΐνης Α., Καψάλη 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^{ου} 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.