



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Μαρία

**Ταυτοποίηση ειδών ιχθύων με τη χρήση μοριακών
δεικτών και εφαρμογή στην ταυτοποίηση ζωοτροφών**



ΛΑΡΙΣΑ
2010

**Ταυτοποίηση ειδών ιχθύων με τη χρήση μοριακών δεικτών και εφαρμογή
στην ταυτοποίηση ζωοτροφών**

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ζήσης Μαμούρης (Επιβλέπων): Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αικατερίνη Μούτου: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Θεολογία Σαραφίδου: Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, οι ευχαριστίες μου πηγαίνουν σε όλους τους ανθρώπους που έδωσαν τον χρόνο τους για να συμμετέχουν στην έρευνα της διπλωματικής διατριβής, των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και πιο συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας.

Εκτιμώ το ενδιαφέρον τους γιατί χωρίς την βοήθειά τους και τη συνεργασία τους η έρευνα αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη όπως και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη για την συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του πειράματος. Την Επίκουρο κ Αικατερίνη Μούτου, την Λέκτορα κ. Θεολογία Σαραφίδου τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Θέμη Γιαννούλη, για την ουσιαστική τους βοήθεια και την καθοδήγηση τους στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ, τους γονείς μου για όσα μου έχουν προσφέρει ως τώρα και τον αδερφό μου Γιώργο Παπαδόπουλο για την βοήθειά του, την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την ενθάρρυνσή του πάνω στην συγγραφή της διπλωματικής μου. Επίσης όλους τους φίλους μου και ιδιαίτερα την καλή μου φίλη Σοφία Πρωτοπαπαδάκη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα εκείνα τα άλλα άτομα που δεν τα έχω αναφέρει και ο καθένας με τον δικό του τρόπο συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της έρευνας μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ψάρι αποτελεί τρόφιμο που κατέχει ιδιαίτερη θέση στις σύγχρονες διατροφικές συνήθειες. Η εμπορική αξία μάλιστα, ορισμένων προϊόντων είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Και γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη, η ανάπτυξη μίας αξιόπιστης μεθόδου εύρεσης της προέλευσης του ψαριού και των προϊόντων που προέρχονται από αυτά.

Η διαδικασία στηρίχτηκε στον μιτοχονδριακό γονιδίωμα και στον πολυμορφισμό που εμφανίζουν ορισμένοι γενετικοί τύποι.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μοριακή ταυτοποίηση 28 ειδών ιχθύων. Η ανάλυση έγινε με την τεχνική PCR-SSCP. Τα πιο σημαντικά αποτελέσματα, τα οποία προκύπτουν από την έρευνα, είναι ότι εντοπίστηκαν διαφορετικά πρότυπα ανάλογα με το υπό μελέτη είδος ψαριού, που επιτρέπει το μοριακό διαχωρισμό τους.

Στην παρούσα έρευνα δείξαμε ότι κατάλληλος μοριακός δείκτης για την ταυτοποίηση ειδών ψαριών (στα 28 είδη ψαριών που μελετήθηκαν) είναι το γονίδιο 16S rRNA.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν κοινοί εκκινητές για όλα τα είδη που απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της PCR.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι μελλοντικά αυτή η μέθοδος μπορούσε να ελεγχθεί μετά την επιβίωση της σε περισσότερα άτομα από κάθε είδος.

ABSTRACT

Fish is a food source with a special position in our dietary habits. The commercial value of some fish products is exceptionally high. This is why the development of a reliable method of finding the origin of fish and its by-products is crucial.

The procedure was based on the mitochondrial genome and the polymorphism that some genetic types demonstrated.

The aim of this research was the molecular identification of 28 fish species. The analysis took place using the PCR-SSCP. The most significant results that come out of this research are the variations of specific species, depending on their features.

In this study we proved that the most appropriate molecular indicator for the identification of fish species (in the 28 fish species we dealt with) is a part of genome 16S rRNA.

Then we have the use of universal primers and universal initiators which by far simplifies the application of PCR.

To conclude, we could say that in the future this method identification of some species could be checked after its survival on more simple of each species.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	8
1.1. Ιστορία ψαριών	8
1.2. Ψάρια του γλυκού και θαλασσινού νερού	10
1.3. Συστηματική κατάταξη των ιχθύων	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ	14
2.1. Χαρακτηριστικά 26 ψαριών	14
2.2. Βακαλάος (<i>Merluccius merluccius</i>)	14
2.3. Γαύρος (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	14
2.4. Γλαύκος (<i>Prionace glauca</i>)	14
2.5. Γκιζάνι (<i>Ladigesocypris ghigi</i>)	14
2.6. Γλώσσα (<i>Solea solea</i>)	15
2.7. Γόπα (<i>Boops boops</i>)	15
2.8. Κοκκινόψαρο (<i>Carassius auratus</i>)	15
2.9. Κολίος (<i>Scomber japonicus</i>)	15
2.10. Κούτσομουρα (<i>Mullus barbatus</i>)	16
2.11. Λαυράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	16
2.12. Μαρίδα (<i>Spicara smaris</i>)	16
2.13. Μελανούρι (<i>Oblada melanura</i>)	16
2.14. Μπακαλιάρος (<i>Merluccius merluccius</i>)	17
2.15. Μπαρμπούνι (<i>Mullus surmuletus</i>)	17
2.16. Πέρκα (<i>Perca fluviatilis</i>)	17
2.17. Πεσκανδρίτσα (<i>Lophius piscatorius</i>)	17
2.18. Πέστροφα (<i>Salmo trutta</i>)	18
2.19. Προσφυγάκι (<i>Micromesistius poutassou</i>)	18
2.20. Σαλάχι (<i>Raja radula</i>)	18
2.21. Σαρδέλλα (<i>Sardina pilchardus</i>)	18
2.22. Σαρδελομάννα (<i>Sardinella aurita</i>)	19
2.23. Σαυρίδι (<i>Trachurus trachurus</i>)	19
2.24. Σκουμπρί (<i>Scomber scomburus</i>)	19
2.25. Συκάκι (<i>Gadus minutus</i>)	19

2.26. Τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)	19
2.27. Τόνος (<i>Thunnus thynnus</i>)	20
2.28. Χριστόψαρο (<i>Zeus faber</i>)	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ	22
3.1. Μοριακοί δείκτες	22
3.2. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	23
3.3. Ανάλυση SSCP	25
3.4. Μοριακή ταυτοποίηση ειδών ιχθύων	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ	28
4.1. Δείγματα του πειράματος	28
4.2. Υλικά και μέθοδοι	29
4.2.1. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την απομόνωση DNA από ιστό ψαριού	33
4.2.2. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	34
4.2.3. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την PCR	34
4.2.4. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την ανάλυση SSCP	34
4.3. Απομόνωση DNA από ιστό ψαριών	35
4.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	36
4.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	37
4.6. Ανάλυση SSCP	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ	41
5.1. Αποτελέσματα	41
5.2. Συζήτηση	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΨΑΡΙΩΝ

Ο όρος ιχθύες ή ψάρια αναφέρεται σε:

1. Υδροβία σπονδυλωτά που αναπνέουν με βράγχια
2. Έχουν αμφίπλευρη συμμετρία
3. Το σώμα τους κατά κανόνα είναι σκεπασμένο με λέπια
4. Έχουν πτερύγια με τα οποία εξυπηρετείται η μετακίνηση και η ισορροπία τους μέσα στο νερό
5. Έχουν δίχωρη καρδιά στην οποία κυκλοφορεί μόνο φλεβικό αίμα
6. Έχουν ένα ειδικό αισθητήριο όργανο την πλευρική γραμμή (Αθ. Τζιόρτζιου, 2005).

Η ιστορία των ψαριών αρχίζει πολύ πριν ο άνθρωπος εμφανισθεί στη γη και προτού ακόμη εμφανισθούν τα ερπετά, τα αμφίβια, τα πτηνά και τα θηλαστικά. Πολλά χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής και κατασκευής του ανθρώπου προέρχονται ή υπάρχουν στους προγόνους των ψαριών. Οι πληροφορίες αυτές στηρίζονται τόσο σε βιολογικές όσο και σε παλαιοντολογικές έρευνες. Τα ψάρια (pisces) είναι η μόνη ομάδα σπονδυλωτών ατόμων του ζωικού Βασιλείου που προσαρμόσθηκε να ζει στο νερό (αλμυρό, γλυκό, υφάλμυρο). Η ομάδα αυτή ανήκει στη συνομοταξία των χορδωτών (Chordata). Σήμερα υπάρχουν περίπου 30.000 γνωστά είδη ψαριών. Ο πρώτος που ασχολήθηκε με την εξέταση και την καταγραφή των ψαριών ήταν ο φιλόσοφος Αριστοτέλης ο οποίος αναφέρει περίπου 118 είδη. Στο βιβλίο φυσική ιστορία του Αριστοτέλη, που έζησε τον 3^ο αιώνα π.χ., βρίσκεται η αρχή ενός καθαρά φιλοσοφικού ενδιαφέροντος για την Ιχθυολογία (Χ. Ν. Νεοφύτου, 1997). Γι' αυτό μπορεί να ειπωθεί ότι η ιστορία της Ιχθυολογίας αρχίζει την εποχή αυτή. Μετά πέρασαν δεκαέξι με δεκαεφτά αιώνες για να ασχοληθούν άλλοι ερευνητές με τα ψάρια, όπως οι Belon (1518-64), Ronde (1507-57), Salviani (1513-72), Ray & Willughby κλπ. Οι οποίοι έδωσαν κάποια ώθηση στην Ιχθυολογία. Έτσι φτάνουμε στο έτος 1758 όπου ο Linnaeus στο βιβλίο του <<Systema Naturae>> ασχολήθηκε συστηματικά με την αναγνώριση και ταξινόμηση των περισσότερων

ειδών ψαριών με αποτέλεσμα ν' αρχίσει ραγδαία η εξέλιξη της Ιχθυολογίας (Χ. Ν. Νεοφύτου, 1997).

Η Ιχθυολογία σχετίζεται με πάρα πολλούς κλάδους μεταξύ των οποίων είναι η Ανατομική, η Εμβρυολογία, η Συστηματική, η Φυσιολογία/ Μορφολογία και η Οικολογία. Η Ιχθυολογία, που είναι κλάδος της Ζωολογίας, διαιρείται στην Γενική και στην Ειδική Ιχθυολογία. Η Γενική Ιχθυολογία ασχολείται με την ανατομία, φυσιολογία, αναπαραγωγή και συστηματική ταξινόμηση των διαφόρων ειδών ψαριών, ενώ η Ειδική Ιχθυολογία ασχολείται με τις τεχνικές ορθολογικής εκμετάλλευσης του κάθε είδους (Χ. Ν. Νεοφύτου, 1997).

Η Ιχθυολογική Διαχείριση εξετάζει τις διάφορες τεχνικές προστασίας και διαμονής των ψαριών, με σκοπό τη συνεχή κάρπωσή τους χωρίς να μειώνεται κάποιο είδος (αειφορία).

Ο άνθρωπος σήμερα λόγω της εκρηκτικής αύξησης του πληθυσμού του, αντιμετωπίζει έντονα τα προβλήματα της εξεύρεσης νέων πηγών ζωικών πρωτεϊνών για τη διατροφή του. Ως αποτέλεσμα αυτών των ενεργειών του ανθρώπου, προέκυψε ένας νέος κλάδος της Ζωολογίας που ονομάζεται Υδατοκαλλιέργεια.

Το νερό, για τα ψάρια, αποτελεί το χώρο όπου ασκούν όλες τις δραστηριότητες για την επιβίωσή τους, με πιο απαραίτητα χαρακτηριστικά το διαλυμένο οξυγόνο, την ποσότητα του φωτός που εισέρχεται μέσα σ' αυτό, το είδος και την ποσότητα των διαλυμένων αλάτων, τη θερμοκρασία, τα διάφορα τοξικά υποκατάστατα και τη συγκέντρωση χλωρίου. Γενικά η γνώση των ποιοτικών (φυσικών και χημικών) χαρακτηριστικών του νερού αποτελεί τη βασική προϋπόθεση τόσο για τον έλεγχο της καταλληλότητάς του για εμπλουτισμό όσο και για τη βελτίωση των οικολογικών συνθηκών διαβίωσης των ψαριών που πρόκειται να εισαχθούν στο συγκεκριμένο βιότοπο (Χ. Ν. Νεοφύτου, 1997).

Τα είδη του ζωικού βασιλείου χαρακτηρίζονται από μια σχετικά μορφο-φυσιο-οικολογική σταθερότητα. Αυτό είναι αποτέλεσμα της προσαρμογής τους σε συνθήκες ενός συγκεκριμένου περιβάλλοντος κάτω από τις οποίες μορφοποιήθηκαν και με τις οποίες τα είδη αυτά αποτελούν μια μονάδα. Γι' αυτό τα χαρακτηριστικά του κάθε είδους φανερώνουν την προσαρμογή του στις

συγκεκριμένες συνθήκες που εκτίθεται και έτσι έχουν μια ορισμένη έκταση κατανομής, όπου μέσα στα όριά της οι συνθήκες αυτές ανταποκρίνονται στις μορφο-φυσιο-οικολογικές ιδιότητες του. Βάσει των συνθηκών αυτών τα ψάρια του γλυκού νερού διακρίνονται στα ρεόφιλα είδη που ζουν στα τρεχούμενα νερά και στα λιμνόφιλα είδη που ζουν στα στάσιμα νερά. Οι κατηγορίες αυτές των ψαριών διαιρούνται επίσης στα:

1. πελαγικά που ζουν μακριά από τις ακτές ή τις όχθες
2. ψάρια που ζουν μεταξύ βυθού και επιφάνειας
3. ψάρια του βυθού

Τα περισσότερα είδη των ψαριών ανήκουν στην ομοταξία των οστεϊχθύων (Osteichthyes). Η ομοταξία αυτή εξελίχθηκε πριν από 120-150 εκατομμύρια χρόνια. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ειδών της ομοταξίας αυτής είναι:

1. Το δέρμα τους φέρει πολυάριθμους βλεννογόνους αδένες και καλύπτεται στα περισσότερα είδη από λέπια
2. Ο σκελετός τους είναι οστέινος με πολλούς σπόνδylους
3. Το σώμα τους φέρει πτερύγια στηριζόμενα σε ακτίνες
4. Η αναπνοή τους, εκτός απ' ορισμένες εξαιρέσεις, είναι βραγχιακή
5. Φέρουν δέκα ζεύγη κρανιακών νεύρων ή εγκεφαλικών συζυγιών
6. Η καρδιά τους είναι δίχωρη (ένας κόλπος και μια κοιλία) με τέσσερα ζεύγη αορτικών τόξων και σφαιρικά εμπύρηντα ερυθρά αιμοσφαίρια
7. Είναι ποικιλόθερμα είδη (η θερμοκρασία του σώματός τους επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος μέσα στο οποίο ζουν διότι δεν φέρουν εσωτερικούς θερμορυθμιστικούς μηχανισμούς για ν' αντιμετωπίζουν τις εξωτερικές θερμοκρασιακές μεταβολές)
8. Τ' αναπαραγωγικά τους όργανα είναι κατά ζεύγη
9. Η γονιμοποίηση, εκτός ορισμένων εξαιρέσεων, είναι εξωτερική
10. Το σώμα τους είναι συμμετρικό (Χ. Ν. Νεοφύτου, 1997).

1.2. ΨΑΡΙΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ

Εκτιμάται ότι τα ψάρια περιλαμβάνουν 20.000 είδη, αν και υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι μπορεί να φθάσουν στα 40.000. Η μελέτη των

απολιθωμάτων των ψαριών φανέρωσε ότι η ομάδα αυτή των σπονδυλωτών ήταν η πρώτη που εμφανίσθηκε στη γη κατά την Ορδοβίκιο περίοδο (500-425 εκατομμύρια χρόνια). Υπάρχουν όμως και επιστήμονες που πιστεύουν ότι τα ψάρια εμφανίσθηκαν στη γη κατά την Κάμβιο περίοδο (600-500 εκατομμύρια χρόνια). Επίσης πιστεύεται ότι ο πρόγονος των σπονδυλωτών εμφανίσθηκε στη γη πριν από 700 εκατομμύρια χρόνια και κατά πάσα πιθανότητα προήλθε από τις προνυμφικές μορφές των εχινόδερμων. Τα πρώτα είδη των οστεϊχθύων εμφανίσθηκαν κατά τη Δεβόνιο περίοδο (300 εκατομμύρια χρόνια) με πρώτο τα ακτινοπτερύγια (Χ. Ν. Νεοφύτου, 1997).

Το 70% της επιφάνειας της γης καλύπτεται από νερό. Όταν τα ψάρια ήταν στην εξελικτική τους πορεία, υπήρχε ακόμη μεγαλύτερη επιφάνεια της γης που καλύπτονταν από αυτό. Τα ψάρια καταλαμβάνουν την υδάτινη επιφάνεια από την Ανταρκτική (κάτω από τους πάγους) μέχρι και τις περιοχές που η θερμοκρασία των νερών φθάνει στους 40°C. Απ' όλα τα είδη των ψαριών που είναι γνωστά σήμερα, το 58,2% ζουν στα θαλασσινά νερά και το 41,8% ζουν στα εσωτερικά νερά είτε για όλη τη διάρκεια της ζωής τους είτε ένα μέρος αυτής και είναι γνωστά ως ψάρια του γλυκού νερού. Τα ψάρια περιλαμβάνονται στις παρακάτω ομοταξίες :

1. Κυκλόστομοι που αντιπροσωπεύουν τα εξαλειφθέντα οστρακόδερμα και τα ζώντα κυκλόστομα (Petromizonidea, Myxinoidea).
2. Τ' αρχέγονα ψάρια της τάξης Arthrodira.
3. Χονδριχθείς, όπου περιλαμβάνονται από τα σαλάχια, τα σκυλόψαρα και τους καρχαρίες.
4. Οστεϊχθείς (Χ Ν Νεοφύτου, 1997).

Ο Cohen (1960) σε μια μελέτη του για την αφθονία των διαφόρων ειδών ψαριών κατέληξε στα εξής:

1. Κυκλόστομοι 50 είδη.
2. Χονδριχθείς 515-555 είδη.
3. Οστεϊχθείς 19.135-20.980 είδη.

Στη χώρα μας υπάρχουν 464 είδη τα οποία κατανέμονται στις παρακάτω ομοταξίες :

1. Κυκλόστομοι 2 είδη.
2. Χονδριχθείς 56 είδη.
3. Οστεϊχθείς 406 είδη, από τα οποία τα 327 είναι θαλασσινά και τα 79 του γλυκού νερού (Χ. Ν. Νεοφύτου, 1997).

1.3. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ

Η συστηματική ταξινόμηση των ιχθύων έχει ως εξής :

Υπόφυλο: Σπονδυλωτά (*Vertebrata*)

1. Υπέρκλαση: Άγναθα (*Agnatha*)

Σπονδυλωτά που δεν έχουν πραγματικές γνάθους και ζυγά εξαρτήματα. Στο σώμα τους διακρίνονται χόνδρινες ακτίνες και νωτοχορδή.

A) Κλάση: Μυξίνοι (*Myxini*)

Αποκλειστικά θαλάσσιοι οργανισμοί. Είναι ερμαφρόδιτοι και η ανάπτυξή τους άμεση. Έχουν στόμα με τέσσερα ζεύγη κεραιών–οσφρητικά βοθρία που επικοινωνούν με τη στοματική κοιλότητα με 5-15 βραγχιακές οπές.

B) Κλάση: Κεφαλασπιδόμορφοι (*Cephalaspidomorphi*)

Μυζητικό στόμα με οδοντίδια και τραχιά γλώσσα. Επτά ζεύγη βραγχιακών οπών. Τυφλά οσφρητικά βόθρια.

2. Υπέρκλαση: Γναθοστόματα (*Gnathostomata*)

Διακριτές γνάθοι. Ζυγά εξαρτήματα. Η νωτοχορδή μπορεί να αντικαθιστάται από σπονδυλική στήλη.

A) Κλάση: Χονδριχθείς (*Chondrichthyes*)

Ουραίο πτερύγιο με συνήθως μεγαλύτερο τον άνω λοβό. Χόνδρινος σκελετός. Δεν υπάρχουν βραγχιακά επικαλύμματα και νηκτική κύστη ή πνεύμονες.

A) Κλάση: Οστεϊχθείς (*Osteichthyes*)

Έχουν οστέινο σκελετό, τα βράγχια καλύπτονται από βραγχιακό επικάλυμμα και υπάρχει αεροφόρος σάκος ο οποίος λειτουργεί ως κύστη ή υποτυπώδης πνεύμονας.

Γενικά τα ψάρια ανάλογα με τη σύσταση του σκελετού τους διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες :

- α) σε χονδριχθείς και

β) σε οστεϊχθείς ή τελεόστεους.

Οι χονδριχθείς έχουν χόνδρινο σκελετό και περιλαμβάνουν τα πιο πρωτόγονα ψάρια. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι Σελάχιοι και οι Ολοκέφαλοι.

Οι οστεϊχθείς ή τελεόστεοι έχουν οστέινο σκελετό και περιλαμβάνουν τα περισσότερα και πιο εξελιγμένα ψάρια. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα ψάρια που παρουσιάζουν ενδιαφέρον από πλευράς Ιχθυοκαλλιέργειας, τόσο στα γλυκά όσο και στα αλμυρά ύδατα. Η κατανομή των ειδών αυτών ανά κατηγορία στον πλανήτη και στη χώρα μας έχει ως εξής:

Πίνακας 1: Κατανομή των ειδών στο πλανήτη και στην χώρα μας

Ομοταξία	Πλανήτης	Ελλάδα
Χονδριχθείς	515 - 555	56
Οστεϊχθείς	26870**	385*

* 351 Θαλασσινά είδη και 62 είδη του γλυκού νερού.

** Οι πληροφορίες αφορούν μέχρι τον Αύγουστο 2002 (Αθ. Τζιόρτζιου, 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Στη συνέχεια αναφέρονται τα βασικά χαρακτηριστικά των ειδών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία:

2.2. ΒΑΚΑΛΑΟΣ (*Merluccius merluccius*)

Ο βακαλάος ανήκει στην οικογένεια *Merlucciusae*. Το σώμα του βακαλάου είναι μακρύ και κυλινδρικό. Το πιο δυνατό σημείο του σώματος είναι πίσω από το κεφάλι. Το στόμα του είναι μεγάλο. Το ουραίο πτερύγιο είναι κομμένα σε μια ευθεία γραμμή. Κατοικούν στα βορειοανατολικά του Ατλαντικού και στην Μεσόγειο (Εικ.1) (Relini G, *et al*, 1999).

2.3. ΓΑΥΡΟΣ (*Engraulis encrasicolus*)

Ο γαύρος ανήκει στην οικογένεια *Engraulidae*. Το σώμα του είναι επίμηκες και το μήκος του φθάνει έως τα 20 εκατοστά. Το στόμα του είναι μεγάλο και η άνω σιαγόνα εξέχει από την κάτω όπως και τα μάτια του. Η ράχη του και τα πλευρά του είναι πρασινωπά και το ραχιαίο πτερύγιό του είναι κοντό. Ζει κατά κοπάδια με συχνές μετακινήσεις το χειμώνα κατεβαίνοντας μέχρι και σε βάθος 150 μέτρων ενώ την άνοιξη ανεβαίνει προς την επιφάνεια. Τρέφεται με πλαγκτόν και με γόνιο άλλων ειδών ψαριών (Εικ.1) (Froese, *et al*, 2005).

2.4. ΓΛΑΥΚΟΣ (*Prionace glauca*)

Ο γλαύκος ανήκει στην οικογένεια *Prionaceae*. Το μήκος του σώματος μπορεί να φτάσει μέχρι τα 4 μέτρα και το βάρος του 200 κιλά. Στις εύκρατες θάλασσες μπορεί να ανέβει στην ξηρά όπου παρατηρείται από δύτες ενώ στα τροπικά νερά κατοικεί σε μεγαλύτερα βάθη. Ο τρόπος αλίευσης είναι με παραγάδι και ο τόπος είναι ο κεντρικός Ειρηνικός (Εικ.1) (Scholz, *et al*, 1998).

2.5. ΓΚΙΖΑΝΙ (*Ladigesocypris ghigii*)

Το *Ladigesocypris ghigii* (Pisces, Cyprinidae), είναι ένα ψάρι μικρού μεγέθους που ζει αποκλειστικά στα γλυκά νερά της Ρόδου. Πήρε το κοινό, αλλά και το επιστημονικό όνομά του, από τον Ιταλό καθηγητή Alessandro Ghigi που

το πρωτοσυνέλλεξε στο νησί στις αρχές του 1900. Θεωρείται ένα από τα πιο απειλούμενα με εξαφάνιση είδη ψαριών των γλυκών νερών στην Ευρώπη. Το γκιζάνι προστατεύεται τόσο από την Ευρωπαϊκή, όσο και από την Ελληνική Νομοθεσία (Εικ.1) (Barbieri, R, *et al*, 2003).

2.6. ΓΛΩΣΣΑ (*Solea solea*)

Η γλώσσα ανήκει στην οικογένεια *Solea*. Είναι ένα επίπεδο ψάρι που απαντάται σε αμμώδη σημεία του βυθού και συνήθως κολυμπά πολύ κοντά στο βυθό. Διακρίνεται κατά διαστάσεις σε μεγάλη, και μικρή και κατά είδος σε γλώσσα κοινή (*solea vulgaris* ή *solea solea*) και γλώσσα κίτρινη (*solea lutea*) που αμφότερες ανήκουν στην οικογένεια "γλωσσίδες" (*soleidae*) (Εικ.1) (Picton, B.E, *et al*, 2007).

2.7. ΓΟΠΑ (*Boops boops*)

Η γόπα είναι μικρό ψάρι μήκους 20–35 εκατοστών και συγγενεύει με τη σάλπα, τον σπάρο και τον σαργό. Υπάγεται στα τελεόστεα ή υποβραχιόνια και έχει τα γενικά χαρακτηριστικά τους. Το επίσημο όνομά της είναι *Boops boops* και ανήκει στην οικογένεια των *Sparidae*. Οι γόπες ζουν κοπαδιαστά σε βραχώδεις ακτές, είναι δε άφθονες στις ελληνικές θάλασσες. Το κρέας τους είναι εύγευστο παρά την κάπως βαριά οσμή τους (Εικ.1) (Haweeti M, *et al*, 2005).

2.8. ΚΟΚΚΙΝΟΨΑΡΟ (*Carassius auratus*)

Το κοκκινόψαρο ανήκει στην οικογένεια *Carassiusae*. Τα χαρακτηριστικά του είναι ότι έχει έντονο κόκκινο χρώμα με μουστάκια μακριά και κόκκινα μάτια. Το ψάρεμά του γίνεται στον Ατλαντικό. Στην αγορά υπάρχει και καταψυγμένο (Εικ.1) (Froese, *et al*, 2005).

2.9. ΚΟΛΙΟΣ (*Scomber japonicus*)

Ο κολιός ανήκει στην οικογένεια *Scombridae*. Συγγενεύει με το σκουμπρί. Έχει μήκος 45-50 εκατοστά. Έχει χρώμα γαλαζοπράσινο στην ράχη του με πολύ γυαλιστερές σκόρπιες και λεπτές μισοκυκλικές γραμμές καθώς και μια πιτσιλωτή γραμμή σ' όλο του το μήκος. Τα μάτια του είναι γαλάζια πολύ σκούρα και η κοιλιά του ασπρουδερή. Είναι άφθονοι στην Ανατολική Μεσόγειο, τους ψαρεύουν τα γρι-γρι και οι ανεμότρατες (Εικ.1) (Crone P R, 2009).

2.10. ΚΟΥΤΣΟΜΟΥΡΑ (*Mullus barbatus*)

Η κουτσομούρα ανήκει στην οικογένεια *mullusae*. Το μέγεθός της συνήθως δεν ξεπερνά τα 25 εκατοστά, αυτό όμως δεν την εμποδίζει να πηγαίνει σε πολύ βαθιά νερά, ακόμη και σε 300 με 400 μέτρα κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας. Το χρώμα της είναι κοκκινωπό και τείνει προς το ροζ. Η αναπαραγωγική της περίοδος τόσο στην Ελλάδα όσο και στη λοιπή Μεσόγειο διαρκεί από τον Απρίλιο μέχρι τις αρχές του φθινοπώρου (Εικ.1) (Adria Med, 2000).

2.11. ΛΑΥΡΑΚΙ (*Dicentrarchus labrax*)

Το λαυράκι είναι οστεϊχθύς, της οικογένειας των *Serranidae*. Στο ίδιο γένος ανήκουν δυο είδη *Dicentrarchus labrax* (Linneus, 1758) και *Dicentrarchus punctatus* (Bloch, 1792). Η διαφορά τους είναι ότι τα δόντια της ινιακής περιοχής του ουρανίσκου εξαπλώνονται σε όλη την περιοχή σχηματίζοντας ένα είδους βέλους στο *D. Punctatus*, ενώ στο *D. Labrax* υπάρχουν μόνο στο πρόσθιο μέρος του ουρανίσκου και σχηματίζουν ένα ανοικτό U (Εικ.1) (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

2.12. ΜΑΡΙΔΑ (*Spicara smaris*)

Η μαρίδα ανήκει στην οικογένεια *Spicarae*. Έχει μήκος 12-15 εκατοστά. Το χρώμα της είναι σταχτί στα πλευρά με καστανή ράχη και πιο ανοιχτή κοιλιά. Την εποχή που ζευγαρώνουν η ράχη των αρσενικών γίνεται καστανοκίτρινη και στα πλευρά παρουσιάζονται 3-4 γαλάζιες ταινίες, εκ των οποίων η πάνω συνεχίζεται και στο μέτωπο και σχηματίζει ανάμεσα στα μάτια ένα γαλαζοπράσινο, αστραφτερό πέταλο, περίπου μισό εκατοστό πλάτος (Εικ.1) (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

2.13. ΜΕΛΑΝΟΥΡΙ (*Oblada melanura*)

Το μελανούρι ανήκει στην οικογένεια *Obladae*. Το μέγεθός τους δεν είναι μεγάλο και σπάνια ξεπερνούν σε μήκος τα 34cm. Το μελανούρι έχει ένα φύλο καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Υπάρχουν και λίγες περιπτώσεις όμως, όπου παρατηρήθηκε ότι μπορεί να κάνουν αλλαγή φύλου από θηλυκά σε αρσενικά (όχι όμως το αντίστροφο). Γεννούν μια φορά το χρόνο την περίοδο από Απρίλιο μέχρι Ιούνιο (Εικ.1) (S. Roques, *et al*, 2006).

2.14. ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ (*Merluccius merluccius*)

Το ψάρι γάδος, διαφορετικά ονίσκος, κοινώς μπακαλιάρος. Ανήκει στην οικογένεια των "γαδιδών" ή *Merlucciusae*. Ζει σε μεγάλο βάθος (100-500μ, κυρίως στα 250-300μ.) στις βόρειες θάλασσες (στα παράλια της Νορβηγίας, Ρωσίας, Δανίας, Αμερικής, Αγγλίας, κλπ.). Στην Ελλάδα εισάγεται παστός, καπνιστός, στεγνωμένος στον αέρα ή κατεψυγμένος κι έχει εξαιρετική κατανάλωση. Ο μπακαλιάρος ζυγίζει 15–25 κιλά και το μήκος του φθάνει από 0,80 έως 1μ. και μερικές φορές στα 1,5μ (Εικ.1) (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

2.15. ΜΠΑΡΜΠΟΥΝΙ (*Mullus surmuletus*)

Το μπαρμπούνι (τρίγλη η μυστακοφόρος, παλαιότερα *Trigla barbatus*), είναι είδος ακανθοπτέρυγου ψαριού του γένους Τρίγλη (*Trigla*) της οικογένειας των τριγλιδών (*Triglidae*). Το μήκος του μπαρμπουνιού φθάνει τα 35 εκατοστά. Έχει χρώμα ερυθρωπό, βαθύτερο στη ράχη και ασημέρυθρο στην κοιλιά, καλύπτεται δε από πολλά μικρά λείπια ωοειδούς σχήματος (Εικ.1) (Brahim Tazi, *et al*, 2009).

2.16. ΠΕΡΚΑ (*Perca fluviatilis*)

Η πέρκα ανήκει στην οικογένεια των *Percae*. Είναι κοινό άφθονο ψάρι, σε πολλές λίμνες της Ευρώπης όπως και σε μερικά ποτάμια και λίμνες. Φθάνει τα 40 εκατοστά σε μήκος και ξεπερνά τα 2 κιλά σε βάρος. Η ράχη της είναι γκρίζα-πρασινωπή, τα πλευρά γκρίζα ασημί που τείνουν στο πρασινωπό χρώμα. Ζει σε κοπάδια λίγο ή πολύ πολυάριθμα, ειδικά κατά το νεανικό στάδιο (Εικ.1) (Tsikliras, A. C, 2007).

2.17. ΠΕΣΚΑΝΔΡΙΤΣΑ (*Lophius piscatorius*)

Η πεσκανδρίτσα ανήκει στην οικογένεια *Lophiidae*. Έχει ένα πολύ μεγάλο κεφάλι που είναι ευρύ και επίπεδο ενώ το υπόλοιπο σώμα φαίνεται να είναι ένα απλό εξάρτημα. Το στόμα της εκτείνεται σε όλη τη διαδρομή γύρω από την πρόσθια περιφέρεια του κεφαλιού. Έχει μήκος 0,5 έως 1,5 εκατοστά και σχεδόν το μισό της μάκρος είναι το κεφάλι της. Η ράχη είναι καστανή και η κοιλιά σταχτιά. Κρύβεται μέσα στην άμμο ή στα φύκια. Στα ελληνικά νερά έχουμε αρκετές που αλιεύονται με ανεμότρατες (Εικ.1) (Richard L, *et al*, 2004)

2.18. ΠΕΣΤΡΟΦΑ (*Salmo trutta*)

Οι πέστροφες ανήκουν στην οικογένεια των Σολομονιδών (*Salmo trutta*), στην τάξη των Ισοσπονδύλων, την υποκλάση των Νεοπτερύγων και την κλάση των Οστεϊχθύνων. Τα είδη της οικογένειας ενδημούν σ' ολόκληρο το Β. Ημισφαίριο. Η αναπαραγωγή τους γίνεται κατά τη διάρκεια των ψυχρότερων μηνών του χρόνου. Κατά την περίοδο αυτή η εξωτερική εμφάνιση πολλών ειδών αλλάζει πάρα πολύ ως προς το χρωματισμό του σώματος και το σχήμα της κάτω σιαγόνας (Εικ.1) (Ν. Παπαγεωργίου, 1996).

2.19. ΠΡΟΣΦΥΓΑΚΙ (*Micromesistius poutassou*)

Το προσφυγάκι ανήκει στην οικογένεια *Micromesistiusae*. Έχει ασημί χρώμα. Το προσφυγάκι της Μεσογείου είναι ένα κοινό ψάρι νερών μέσου βάθους και ψαρεύεται με τράτες, ενώ σπάνια ψαρεύεται με πετονιά. Αυτό εξαρτάται, όχι από την δυσκολία να πιαστεί στο αγκίστρι αλλά από τα νερά τις θάλασσας. Κύρια περιοχή αναπαραγωγής είναι ανοικτά της δυτικής ακτής της Ιρλανδίας μεταξύ Μαρτίου και Απριλίου (Εικ.1) (Heino M, 2004).

2.20. ΣΑΛΑΧΙ (*Raja radula*)

Το σαλάχι ανήκει στην οικογένεια *Rajae*. Το μεσογειακό σαλάχι αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα είδη σαλαχιών στον κόσμο και γι' αυτό αποκαλείται και σαλάχι γίγας. Κινείται στην Μεσόγειο ενώ άλλα παρόμοια είδη κινούνται και στον Ατλαντικό Ωκεανό. Το στόμα του είναι μεγάλο με πολλά μικρά δόντια. Το σώμα του έχει κυρίως μαύρο σκούρο χρώμα ενώ το μήκος του είναι πολύ μικρότερο του πλάτους (Εικ.1) (Mohamed B, *et al*, 2008).

2.21. ΣΑΡΔΕΛΛΑ (*Sardina pilchardus*)

Η σαρδέλλα ανήκει στην οικογένεια *Clupeidae*. Είναι πελαγίσιο ψάρι και βρίσκεται σε αφθονία στη Μεσόγειο. Ψάρι μικρών διαστάσεων, λεπτό, μακρουλό, με τριγωνικό κεφάλι και λαμπερά λέπια, τα οποία βγαίνουν εύκολα. Η ελληνική σαρδέλλα που ψαρεύεται στις θάλασσές μας είναι ένα αφρόψαρο που ζει σε κοπάδια και κινείται σε μικρά βάθη. Τα αυγά της γεννιούνται το καλοκαίρι. Η αλιεία της απαγορεύεται από το Δεκέμβριο έως το Μάρτιο. Ψαρεύεται με πλατύ δίχτυ που τοποθετείται οριζόντια στο νερό ή με πυροφάνι τη νύχτα (Εικ.1) (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

2.22. ΣΑΡΔΕΛΟΜΑΝΑ (*Sardinella aurita*)

Η σαρδελομάνα ανήκει στην οικογένεια *Sardinellae*. Συγγενεύει με τη σαρδέλλα και συχνά πουλιέται καταχρηστικά για σαρδέλλα για οικονομικούς λόγους. Το μήκος φτάνει έως 60εκ. και το χρώμα του είναι λαδί ασημί και πιο ανοιχτό απ' τη σαρδέλλα με 5 έως 6 μαύρες βούλες στα πλευρά. Το σώμα της είναι 2 και 3 φορές πιο μεγάλο απ' της σαρδέλλας. Ψαρεύεται την άνοιξη όταν πλησιάζει τις ακτές (Εικ.1) (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

2.23. ΣΑΥΡΙΔΙ (*Trachurus trachurus*)

Το σαυρίδι ανήκει στη οικογένεια *Carangidae* και το επιστημονικό του όνομα είναι *Trachurus trachurus*. Το μήκος του φτάνει στα 40 εκατοστά και το χρώμα του είναι γκρίζο-λαδί στη ράχη του, κιτρινωπό στα πλευρά και η κοιλιά του ασημόλευκη. Το σώμα του είναι στενόμακρο με λείπια στρογγυλά, μικρά και λεία. Υπάρχουν άφθονα στα ελληνικά νερά, ψαρεύονται σε περάσματα από την άνοιξη ως τον Ιούλιο με γρι-γρι (Εικ.1) (Paulo, *et al*, 1995).

2.24. ΣΚΟΥΜΠΡΙ (*Scomber scomburs*)

Το σκουμπρί ανήκει στην οικογένεια *Scombridae*. Έχει μήκος έως 50 εκατοστά, χρώμα πρασινωπό με γαλαζοπράσινη πλάτη με σκούρες γαλαζόμαυρες οριζόντιες ταινίες που κατεβαίνουν κυματιστά ως τα πλεύρα ενώ η κοιλιά του είναι ασημόλευκη. Γεννούν την περίοδο Μάιο με Ιούλιο (23 Εικ.1) (Status of Fishery Resources, *et al*, 1999).

2.25. ΣΥΚΑΚΙ (*Gadus minutus*)

Το συκάκι ανήκει στην οικογένεια *Gadusae* και το επιστημονικό του όνομα είναι *Gadus minutus*. Έχει χρώμα ασημί με κιτρινοκόκκινο στην ράχη του. Έχει μήκος από 30 έως 40 εκατοστά. Ψαρεύεται οργανωμένα και με γρι-γρι (Εικ.1) (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

2.26. ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*Sparus aurata*)

Οι τσιπούρες ανήκουν στην κλάση των οστεϊχθύων στην υπέρταξη των τελεόστεων στην τάξη *Perciformes* και μαζί με τα συγγενή είδη απαρτίζουν την οικογένεια των *Sparidae*. Οι τσιπούρες διαθέτουν πολυάριθμα μυτερά δόντια και στις δυο γνάθους και πολυάριθμες σειρές χονδρών τραπεζιτών, κάτι που διευκολύνει τη σύνθλιψη των οστράκων. Πρόκειται για ζώα ευρύθερμα και

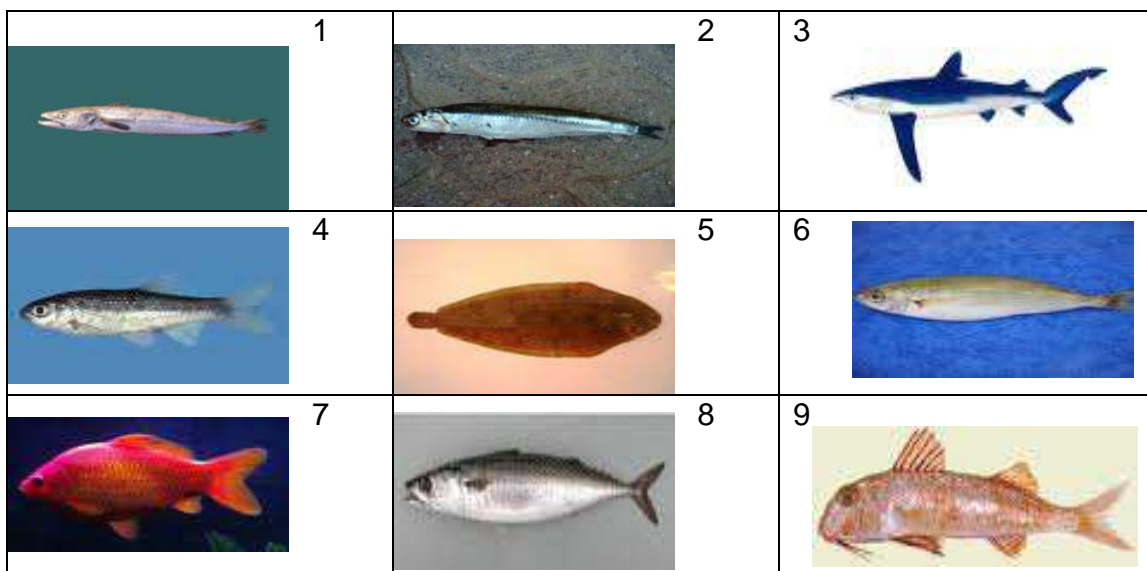
ευρύαλα που ζουν συχνότερα κοντά στις ακτές, μερικά δε είδη της οικογένειας αυτής διαβιούν μέσα στις λιμνοθάλασσες για μία περίοδο της ζωής τους (Εικ.1) (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).



















2.27. ΤΟΝΟΣ (*Thunnus thynnus*)

Ο τόνος ανήκει στην οικογένεια *Thunnidae*. Έχει χρώμα σκούρο γαλάζιο στην ράχη του και πιο ανοιχτόχρωμο στα πλευρά του ενώ η κοιλιά του είναι λευκή προς το ασημί. Έχει περίπου 458cm μέγεθος και βάρος 684kg και μπορεί να φτάσει σε ευρὸς βάθους από 0 έως 850 m (26 Εικ.1) (Froese, *et al*, 2005).

2.28. ΧΡΙΣΤΟΨΑΡΟ (*Zeus faber*)

Το χριστόψαρο ανήκει στην οικογένεια *Zeidae*. Φτάνει τα 60 εκατοστά. Έχει χρώμα γκριζοπράσινο με μια μεγάλη βούλα μαύρη στο κέντρο και στα δυο πλευρά του. Το σώμα του είναι κοντόφαρδο συμπιεσμένο, με μικρά, τραχιά λέπια. Το κεφάλι του είναι μεγάλο και έχει μεγάλα, σχεδόν στην κορυφή, μάτια. Το στόμα κλειστό φαίνεται κανονικό, γυριστό προς τα κάτω, αλλά γίνεται πελώριο και προεκβάλλει πολύ προς τα εμπρός όταν το ανοίγει. Τα χριστόψαρα γεννούν το καλοκαίρι και τ' αυγά τους είναι πλακοτά. Υπάρχουν αρκετά και στο Αιγαίο, όπου ψαρεύονται με ανεμότρατες (27 Εικ.1) (Michio Y, *et al*, 2002).



10 	11 	12 
13 	14 	15 
16 	17 	18 
19 	20 	21 
22 	23 	24 
25 	26 	27 

Εικ.1. Τα είδη των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία: 1) Βακαλάος, 2) Γαύρος, 3) Γλαύκος, 4) Γκιζάνι, 5) Γλώσσα, 6) Γόπα, 7) Κοκκινόψαρο, 8) Κολιός, 9) Κουτσομούρα, 10) Λαυράκι, 11) Μαρίδα, 12) Μελανούρι, 13) Μπακαλιάρος, 14) Μπαρμπούνι, 15) Πέρκα, 16) Πεσκανδρίτσα, 17) Πέστροφα, 18) Προσφυγάκι, 19) Σαλάχι, 20) Σαρδέλλα, 21) Σαρδελομάννα, 22) Σαυρίδι, 23) Σκουμπρί, 24) Συκάκι, 25) Τσιπούρα, 26) Τόνος, 27) Χριστόψαρο






ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3.1. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι μοριακοί δείκτες σε πολλές μελέτες για πληθυσμιακές αναλύσεις ψαριών.

Οι μοριακοί δείκτες που είναι γενετικά χαρτογραφημένοι είναι χρήσιμοι για την μελέτη της κληρονομικότητας των γενετικών χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων (Χατζόπουλος Π, 2001).

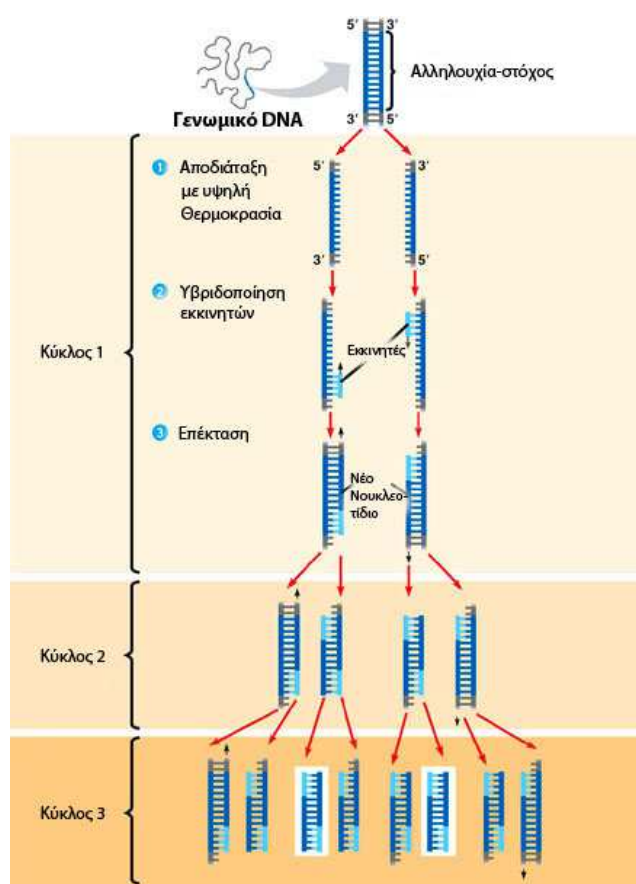
Ακόμη, οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν την μέγιστη χρησιμότητα:

-  Παρουσία πολυμορφισμού
-  Απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συνεπικρατή αλληλόμορφα.
-  Υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.
-  Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
-  Η μεθοδολογία ταυτοποίησης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια της ανάπτυξης των οργανισμών και συγκεκριμένα όταν ο οργανισμός αναπτυχθεί τόσο, ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα του DNA (Χατζόπουλος Π, 2001).

Τα κύρια είδη των μοριακών δεικτών είναι: α) Τα RLFP όπου παρατηρείται πολυμορφισμός στο πρότυπο των περιοριστικών τμημάτων του DNA όταν συμβεί κάποια μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού (Χατζόπουλος Π, 2001), β) Τα RAPDs ενισχύουν τμήματα DNA κάνοντας χρήση εκκινητών με τυχαία ακολουθία νουκλεοτιδίων και το κάθε προϊόν ενίσχυσης προκύπτει από τον υβριδισμό των τυχαίων αυτών εκκινητών με τις συμπληρωματικές περιοχές του υπό εξέταση

DNA (Χατζόπουλος Π, 2001), γ) Τα SSR που παράγονται μετά από απομόνωση και αναπαραγωγή τμημάτων DNA με PCR. Ο διαχωρισμός ζωνών γίνεται με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης ή αγαρόζης και η ανίχνευση του πολυμορφισμού με χρώση με άργυρο ή βρωμιούχο αιθίδιο και χρήση υπεριώδους ακτινοβολία (Spooner, *et al*, 2005), δ) Τα AFLPs βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υπομονάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά την πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού από ένα πολυσύνθετο σύνολο τμημάτων DNA του γονιδιώματος (Spooner, *et al*, 2005).

3.2. Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)



Εικ.2. PCR (από <http://www.ja.wikipedia.org>.)

Είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται στην βιοχημεία και μοριακή βιολογία για τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA. Η PCR είναι μία *in vitro* μέθοδος και μπορεί να ενισχύσει συγκεκριμένα τμήματα DNA που μπορούν αν

είναι επιθυμητό να κλωνοποιηθούν *in vitro*. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων οι οποίες διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο (Mullis K B *et al*, 1994).

- A) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- B) υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο
- Γ) σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης.

Στο πρώτο βήμα του κύκλου γίνεται αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί από το δείγμα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης συνήθως μεταξύ 92⁰C και 96⁰C. Με αυτό τον τρόπο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών κλώνων του DNA (Mullis K B *et al*, 1994, Rolfs A *et al*, 1992).

Στο δεύτερο βήμα του κύκλου με τη μείωση της θερμοκρασίας της αντίδρασης επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών με την συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA (Mullis K B *et al*, 1994, Rolfs A *et al*, 1992).

Στο τρίτο και τελευταίο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA σε θερμοκρασία 72⁰C. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση που συνθέτει το DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Μεγάλη ώθηση στην τεχνική PCR έδωσε η ανακάλυψη του θερμοστατικού ενζύμου Taq πολυμεράσης. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την ηλεκτροφόρηση παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Το μήκος του προϊόντος συγκρίνεται με το μήκος γνωστού μάρτυρα το οποίο ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα. Η τεχνική PCR μπορεί να εφαρμοσθεί σε διαφορετικά δείγματα (Dieffenbach C W *et al*, 1995).

Τα απαραίτητα συστατικά μιας αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

1. στόχος DNA (template DNA)
2. εκκινητές (primers)

3. τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)
4. DNA πολυμεράση (DNA polymerase)
5. ιόντα μαγνησίου (Mg^{++})
6. ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (buffer)

3.3. ΑΝΑΛΥΣΗ SSCP

Η SSCP (ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας Single Stranded Conformation Polymorphism) χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1989 και αποτελεί μια οικονομική, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλομορφίας. Στηρίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει μικρών διαφορών στην αλληλουχία τους, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας διαφορετικής δευτεροταγούς δομής, η οποία προκαλεί διαφορά στη κινητικότητα των μορίων αυτών μέσα σε πήκτωμα. Η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA μέσα σε ένα ηλεκτροφορητικό πήκτωμα εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου και είναι σχετικά ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Εν τούτοις, στα μονόκλωνα μόρια DNA η κινητικότητα επηρεάζεται αισθητά όταν συμβαίνουν μικρές αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Αυτό συμβαίνει λόγω της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA απουσία συμπληρωματικού κλώνου, καθώς το μονόκλωνο μόριο δύναται να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλειών, προσδίδοντάς του μία χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή. Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται ακριβώς αυτή την ιδιότητα του μονόκλωνου DNA (Orita *et al*, 1989).

Η ανάλυση SSCP, επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανίχνευση διάφορων νουκλεοτιδικών παραλλαγών, με ποσοστό ανίχνευσης που πλησιάζει το 100% (Γ. Π. Πατρινός, 2008).

3.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΙΔΩΝ ΙΧΘΥΩΝ

Το σύστημα barcode αξιοποιεί την πολυμορφία του DNA σ' ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή τμήμα DNA ώστε να διακριθούν μοριακά μεταξύ τους τα

διαφορετικά είδη. Ωστόσο, για να είναι πετυχημένη η διάκριση θα πρέπει το τμήμα από να μην παρουσιάζει πολυμορφισμό μέσα στο ίδιο είδος. Συνήθως ως barcode χρησιμοποιείται ένα τμήμα του μιτοχονδριακού DNA, η υπομονάδα I κυτοχρωμικής οξειδάσης c, COI) (Smith P J, *et al*, 2007).

Υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν το μοριακό διαχωρισμό ειδών ψαριού. Οι Georgina *et al* το 2001 χρησιμοποίησαν την PCR-RFLP για το διαχωρισμό 36 ειδών ψαριών (από διαφορετικές ευρωπαϊκές χώρες) χρησιμοποιώντας τμήμα 464bp του μιτοχονδριακού γονιδίου του κυτοχρώματος b και ακολούθησε πέψη με τα ένζυμα *Acil*, *Ddel*, *HaeIII*, *HincII*, *HinfI*, *MspI*, and *NlaIII* (New England Biolabs; Boehringer). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 120 δείγματα με ποσοστό αξιοπιστίας 96%. Σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της εργασίας είναι ότι τα είδη που περιέχονται σε μίγματα προσδιορίστηκαν γιατί υποδεικνύεται ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί στην ανίχνευση απάτης υποκατάστατων ειδών σε προϊόντα διατροφής (Georgina L *et al*, 2001).

Ακόμη, οι Fausto *et al* το 2003 επιχείρησαν να ανάπτυξουν δείκτες για την αναγνώριση ειδών μέσω της παράλληλης ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA και κάποιων μορφολογικών χαρακτηριστικών. Προσδιορίστηκαν είδη ειδικοί απλότυποι για τα *Raja miraletus*, *Raja montagui*, *Dipturus oxyrinchus*, καθώς παρατηρήθηκε μια συμφωνία μεταξύ των ορίων των ειδών και καλά διαφοροποιημένων απλότυπων. Η συγκριτική ανάλυση αλληλουχιών 16S rDNA επέτρεψε την αναγνώριση των 3 δειγμάτων του *Leucoraja circularis* που είναι ένα είδος που σπάνια συναντάς στην Αδριατική Θάλασσα. Αντιθέτως τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και η διασπορά του απλότυπου σε μεγάλο βαθμό εμφανίζουν συμφωνία μεταξύ των *R. asterias* και *R. clavata*. Ενώ όλα τα άτομα *R. clavata* εμφάνισαν ένα μοναδικό απλότυπο (H-CLA). Μόνο 8 από 30 πιθανά δείγματα *R. asterias* που διέθεταν ένα δεύτερο ελαφρός διαφοροποιημένο απλότυπο (H-AST). Τα υπόλοιπα 22 *R. asterias* είχαν τον απλότυπο *clavata* (H-CLA).

Ωστόσο οι περαιτέρω αναλύσεις σε μεγαλύτερα δείγματα με τη χρήση πυρηνικών μοριακών δεικτών είναι αναγκαία για την αποσαφήνιση των σχέσεων μεταξύ των taxa (*Fausto et al* 2003).

Επίσης οι *Bahy et al* το 2005 χρησιμοποίησαν κατά την διάρκεια των τελευταίων 15 ετών μοριακούς δείκτες που είχαν εισέλθει στο σκηνικό της γενετικής βελτίωσης σε διάφορους τομείς της γεωργικής έρευνας. Την ευκολία και την απλότητα της RAPD (που ενισχύεται τυχαία με πολυμορφικό DNA). Οι τεχνικές αυτές καθιστούν ιδανική την γενετική χαρτογράφηση και την εγκατάσταση των προγραμμάτων αναπαραγωγής ζώων και το αποτύπωμα του DNA έχει ιδιαίτερη χρησιμότητα στον τομέα της γενετικής πληθυσμού. Η επανεξέταση αυτή συνοψίζει τη χρήση των RAPD δεικτών στον τομέα της έρευνας των ψαριών (*Bahy A et al*, 2005).

Τέλος οι *Robert D.Ward et al* το 2005 ανέλυσαν 207 είδη ψαριών τα οποία κυρίως προέρχονται από την Αυστραλία. Αλληλουχήθηκε ένα τμήμα 655 ζευγών βάσεων του μιτοχondριακού γονιδίου τις υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Τα περισσότερα είδη αντιπροσωπεύονταν από πολλά δείγματα και προέκυψαν 754 αλληλουχίες. Το περιεχόμενο σε GC ήταν υψηλότερο στους τελεόστιους ιχθείς απ' ότι στα είδη των καρχαριών και των σαλαχιών κυρίως λόγω τις ύπαρξης υψηλότερου ποσοστού GC στην 3 θέση του κωδικόνιου στους τελεοστέους. Η γενετικές αποστάσεις ενδοειδικά και ανάμεσα σε γένη, οικογένειες, τάξεις και κλάσεις υπολογίστηκαν σε 0,39%, 9,93%, 15,46%, 22,18%, και 23,27% αντίστοιχα. Όλα τα είδη μπορούσαν να διαφοροποιηθούν από την αλληλουχία του COI παρότι κάποια δείγματα από κάποια είδη είχαν απλότυπους χαρακτηριστικούς από κάποιο άλλο συγγενικό είδος. Συμπερασματικά η αλληλούχιση του COI ή parcoding μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των ειδών (*Robert D.Ward et al*, 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, τα οποία προέρχονται από τοπικά καταστήματα (ιχθυοπωλεία) της Λάρισας και του Βόλου.

Πίνακας 2: 27 δείγματα ψαριού του πειράματος

α/α	Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία
1	Βακαλάος (καταψυγμένος και φρέσκος)	<i>Gedus morhua</i>
2	Γαύρος	<i>Engraulis encrasicolus</i>
3	Γλαύκος	<i>Prionace glauca</i>
4	Γκιζάνι	<i>Ladigesocypris ghigii</i>
5	Γλώσσα	<i>Solea solea</i>
6	Γόπα	<i>Boops boops</i>
7	Κοκκινόψαρο	<i>Carassius auratus</i>
8	Κολιός	<i>Scomber japonicus</i>
9	Κουτσομούρα	<i>Mullus barbatus</i>
10	Λαυράκι	<i>Dicentrarchus labrax</i>
11	Μαρίδα	<i>Spicara smaris</i>
12	Μελανούρι	<i>Oblada melanura</i>
13	Μπακαλιάρος	<i>Merluccius merluccius</i>
14	Μπαρμπούνι	<i>Mullus surmuletus</i>
15	Πέρκα (2 άτομα)	<i>Perca fluviatilis</i>

		<i>Serranus scriba</i>
16	Πεσκανδρίτσα	<i>Lophius piscatorius</i>
17	Πέστροφα	<i>Salmo trutta</i>
18	Προσφυγάκι	<i>Micromesistius poutassou</i>
19	Σαλάχι	<i>Raja radula</i>
20	Σαρδέλλα	<i>Sardina pilchardus</i>
21	Σαρδελομάνα	<i>Sardinella aurita</i>
22	Σαυρίδι (3 άτομα)	<i>Trachurus trachurus</i> <i>Trachurus mediterraneus sampanios</i>
23	Σκουμπρί	<i>Scomber scomburs</i>
24	Συκάκι	<i>Gadus minutus</i>
25	Τσιπούρα	<i>Sparus aurata</i>
26	Τόνος	<i>Thunnus thynnus</i>
27	Χριστόψαρο	<i>Zeus faber</i>

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα απαραίτητα συστατικά είναι:

1. Στόχος DNA

Τα πιο σημαντικά συστατικά της PCR που καθορίζουν τα προϊόντα είναι οι εκκινήτες και το DNA. Το DNA δεν πρέπει να είναι αποικοδομημένο, τουλάχιστον στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και να είναι υψηλής καθαρότητας χωρίς φαινόλες, πολυσακχαρίτες, απορρυπαντικά, EDTA ή άλλα χημικά που μπορούν να έχουν ανασταλτική δράση.

Η ποσότητα DNA που απαιτείται για μια αντίδραση κυμαίνεται μεταξύ 10 και 500 ng. Όταν ο στόχος DNA βρίσκεται σε πολλά αντίγραφα μέσα στο γονιδίωμα, η ποσότητα του DNA που χρειάζεται για την αντίδραση κυμαίνεται από 10 έως 100 ng. Ενώ όταν ο στόχος DNA είναι μοναδιαίος ή σε λίγα αντίγραφα τότε η ποσότητα κυμαίνεται από 100 έως 500 ng. Όταν η ποσότητα του DNA είναι μεγάλη (>1000ng), υπάρχει πιθανότητα να δημιουργηθούν παραπροϊόντα που δεν αντιστοιχούν στον επιθυμητό στόχο DNA (Γ Χώτος και Ι Ρογδάκης, 2000).

2. Εκκινητές

Οι εκκινητές αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της αντίδρασης, γιατί αντιπροσωπεύουν τα νουκλεοτιδικά άκρα του DNA στόχου και είναι απαραίτητοι προκειμένου να προστεθούν τα υπόλοιπα νουκλεοτίδια της αλληλουχίας. Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια, το μήκος των οποίων κυμαίνεται ανάλογα με την χρήση τους (για να απομονώσουμε και να πολλαπλασιάσουμε μια μοναδική αλληλουχία στόχο DNA, οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν μέγεθος από 18 έως 30 βάσεις). Η συγκέντρωση των εκκινητών στην αντίδραση πρέπει να είναι 0,01–0,05μM. Όταν η συγκέντρωση είναι πολύ υψηλή αυξάνεται η πιθανότητα να δημιουργηθούν τυχαίοι υβριδισμοί μεταξύ εκκινητή και DNA, με αποτέλεσμα την δημιουργία DNA τμημάτων που δεν αντιστοιχούν στα αναμενόμενα προϊόντα.

Για την κατασκευή των δυο εκκινητών μιας αντίδρασης πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη τα παρακάτω:

- A) οι αλληλουχίες τους δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ειδικά στο 3' άκρο
- B) οι αλληλουχίες τους πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε νουκλεοτίδια G και C, ώστε οι θερμοκρασίες υβριδοποίησής να μην διαφέρουν σημαντικά
- Γ) η αλληλουχία του κάθε εκκινητή δεν πρέπει να περιλαμβάνει περιοχές συμπληρωματικές, γιατί κατά την διάρκεια της αναδιάταξης δημιουργούνται φουρκέτες

Δ) κατά τον σχεδιασμό τους θα πρέπει η κατανομή των νουκλεοτιδίων να είναι τυχαία και να αποφεύγονται περιοχές με πολυπυρίνες ή πολυπυριμιδίνες. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγονται επαναλήψεις νουκλεοτιδίων.

Ε) προκειμένου να πολλαπλασιαστεί επιλεκτικά μόνο ο επιθυμητός στόχος DNA, οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα, συνεπώς ο επιτυχής σχεδιασμός τους είναι πολύ σημαντικός. Για την κατασκευή και καλύτερη επιλογή εκκινητών υπάρχουν ειδικά υπολογιστικά προγράμματα (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000)

3. Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια

Τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, dATP, dTTP, dCTP και dGTP, είναι απαραίτητα για την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την διάρκεια του πολυμερισμού. Είναι σημαντικό τα δεοξυνουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους για να μην γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η συγκέντρωση των δεοξυνουκλεοτιδίων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 200μM (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

4. DNA πολυμεράση

Η πολυμεράση είναι το ένζυμο με το οποίο επιτυγχάνεται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου DNA μετά από κάθε αποδιάταξη και υβριδισμό των εκκινητών. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Klenow. Η Klenow είναι πολυμεράση DNA τύπου I, που της έχει αφαιρεθεί η 5'→ 3' εξωνουκλεϊκή δράση ενώ παραμένει η 3'→ 5' εξωνουκλεϊκή δράση. Τα μειονεκτήματα της Klenow είναι ότι:

A) Καταστρέφεται στις υψηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης (90°C–95°C), συνεπώς είναι αναγκαία η προσθήκη ενζύμου μετά από κάθε κύκλο, με αποτέλεσμα να επιβαρύνεται ο χρόνος (προσθήκη ενζύμου μετά από κάθε κύκλο) και το κόστος (οι πολυμεράσες είναι ακριβά ένζυμα) της διαδικασίας και

B) Η θερμοκρασία στην οποία πολυμερίζει είναι 37°C, θερμοκρασία η οποία ενδέχεται να είναι μικρότερη της T_m των εκκινητών, με αποτέλεσμα να μην

υπάρχει απόλυτη νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ των εκκινητών και του στόχου DNA.

Τα παραπάνω προβλήματα λύθηκαν με την χρησιμοποίηση της πολυμεράσης Taq. Η πολυμεράση Taq έχει απομονωθεί από βακτήρια (*Thermus aquaticus*) που ζουν σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία (θερμοπίδακες) και είναι πολυμεράση τύπου I με 5' → 3' εξωνουκλεϊκή δράση. Η ιδανική θερμοκρασία για την δράση της είναι 55°C–75°C (pH 8,2-9,0) και ο χρόνος ημιζωής της είναι 50 κύκλοι στους 95°C. Η πολυμεράση Taq είναι διαθέσιμη από πολλές εταιρίες βιολογικών προϊόντων. Εκτός της πολυμεράσης Taq, έχουν απομονωθεί πολυμεράσες και από άλλα θερμοφύλλα βακτήρια, όπως τα *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritime*, και το *Bacillus stearothermophilus*. Οι πολυμεράσες έχουν πιθανότητα λάθους κατά την αντιγραφή στόχου DNA. Η ακριβής αντιγραφής εξαρτάται από την πολυμεράση αλλά και από τις συνθήκες αντίδρασης (συγκέντρωση dNTPs και ιόντων μαγνησίου, pH, θερμοκρασία) (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

5. Ιόντα μαγνησίου

Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, που συνήθως προέρχονται από την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου, επηρεάζει τον υβριδισμό του εκκινητή, τη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA, τη δημιουργία διμερών από τους εκκινητές, την εξειδίκευση των προϊόντων και τη δραστικότητα και πιστότητα της πολυμεράσης. Προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία του στόχου DNA μπορούν να παραχθούν όταν η συγκέντρωση Mg⁺⁺ είναι υψηλή, με αποτέλεσμα να έχουμε τυχαίες προσκολλήσεις εκκινητών σε μη ομόλογα τμήματα του DNA. Αντίθετα, η χαμηλή συγκέντρωση μειώνει την απόδοση της PCR, γιατί το Mg⁺⁺, ως συνένζυμο της πολυμεράσης είναι απαραίτητο για την λειτουργία της. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου πρέπει να είναι 0,5–2,5mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χημικών παραγόντων που δεσμεύουν Mg⁺⁺ στο διάλυμα των εκκινητών ή στο DNA μπορεί να διαταράξει την συγκέντρωση του μαγνησίου (Γ. Χώτος και Ι. Ρογδάκης, 2000).

6. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης.

Το διάλυμα θα πρέπει να δημιουργεί ένα ιοντικό περιβάλλον για να διευκολύνεται η υβριδοποίηση του εκκινητή με το στόχο DNA, το οποίο παρέχεται από την παρουσία NaCl ή KCl. Εάν η συγκέντρωση των δύο αλάτων υπερβαίνει τα 50mM, αναστέλλεται η δράση Taq πολυμεράσης. Στο διάλυμα επίσης υπάρχει Tris-HCl σε συγκέντρωση 10–50mM με pH 8,3. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης, οι θερμοκρασίες φθάνουν έως τους 94°C, και το pH κυμαίνεται μεταξύ 6,8 και 7,8. Επίσης στο διάλυμα υπάρχουν και σταθεροποιητές ενζύμου όπως αλβουμίνη (bovine serum albumin-BSA) και μη ιοντικά απορρυπαντικά (Tween 20 και Triton X-100).

Στις παραγράφους που ακολουθούν αναφέρεται αναλυτικά ο εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον, αναφέρεται η πειραματική πορεία της κάθε μεθόδου που εφαρμόστηκε.


4.2.1. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την απομόνωση DNA από ιστό ψαριού


Από τον εξοπλισμό του εργαστηρίου χρησιμοποιήθηκαν: αυτόματες πιπέττες ακριβείας (Gilson) των 20μl και 1000μl με τα αντίστοιχα ακρορύγχια (tips), φιαλίδια erpendorf των 1,5 ml και 2 ml, κυκλικός αναδευτήρα (Bio RS-24), κλίβανος (ProBlot Hybridization Oven), ψυχομένη φυγόκεντρος (Eppendorf-5810R), καταψύκτης, απαγωγός και ανακινητής (Vortex).

Τα αντιδραστήρια και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: TNES-Urea: (0.01M Tris -HCl, 0,125M NaCl, 0,005M EDTA pH 7.5, 0,5% SDS, 4M Urea), πρωτεϊνάση K (Proteinase K) (10μg/μl) [HT], φαινόλη (Phenol) 90% [Applichem], χλωροφόρμιο (Chloroform) [Merck], ισοαμυλική αλκοόλη (isoamyl alcohol) [Merck], διάλυμα 3M οξικού νατρίου (Sigma), απόλυτη αιθανόλη (EtOH) 100%, αιθανόλη συγκέντρωσης 70% και διπλά αποσταγμένο νερό (ddH₂O).

4.2.2. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να εφαρμόσουμε την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιούμε τα ακόλουθα: Εξοπλισμό: κωνική φιάλη των 100 ml, ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml, πιπέττα ακριβείας των 10 μl, συσκευή παρασκευής του πηκτώματος, φούρνος μικροκυμάτων, συσκευή παροχής υπεριώδους (U.V.) ακτινοβολίας [Ultra Lum], συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό μηχανήμα / [Bio-Rad (Scienc plus)]. Αντιδραστήρια και διαλύματα: αγαρόζη [HT], TAE 1X, βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/ml (EtBr) και το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer).

 TAE 50X: 1,98M Tris Base, 0,95M Οξικό Οξύ, 0,05M EDTA. Το TAE 1X παρασκευάζεται με αρραίωση διαλύματος πυκνού TAE 50X

 Loading buffer 6X (5ml): 1ml Βρωμοφαινόλη μπλέ 0,2%w/v + 0.5ml TBE 20X + 5ml Γλυκερίνη+ ddH₂O έως τελικό όγκο 10ml.

4.2.3. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την PCR

Ο εξοπλισμός για την PCR είναι ο εξής: πιπέττες ακριβείας των 2μl, 10μl, 20μl και 100μl, φιαλίδια (Eppendorf) των 200μl, φυγόκεντρος και θερμικός κυκλοποιητής [Eppendorf – Mastercycler epgradient S]

Τα αντιδραστήρια είναι τα εξής: αποστειρωμένο ddH₂O, ρυθμιστικό διάλυμα (10X) [Bioline], χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂) 50mM [Bioline], τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), εκκινητές και Taq DNA πολυμεράση 5U/μl [Bioline].

4.2.4. Εξοπλισμός και αντιδραστήρια για την ανάλυση SSCP

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιούμε για την ανάλυση SSCP είναι: ποτήρι ζέσεως των 200ml και των 500ml, μαγνήτης ανάδευσης, ογκομετρικός κύλινδρος των 15ml των 100ml και των 1000ml, χωνί μετάγγισης με χαρτί διήθησης, συσκευή παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμίδης, οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας (Yellow line), συσκευή κάθετου ηλεκτροφόρησης, τροφοδοτικό

[Scie Plus U2-DC (Hoefer)], μεταλλικό δοχείο χρώσης, συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης και συσκευή εκπομπής ορατού φωτός.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση SSCP είναι: ddH₂O, ακρυλαμίδα 99% [SIGMA], δις-ακρυλαμίδα [SIGMA], TBE 10X, TEMED (Tetramethylethylenediamine) 99% [SIGMA], APS 20% w/v, Loading buffer (6x), αιθανόλη 100 %, οξικό οξύ 99% [Riedel-de Haen], νιτρικός άργυρος (AgNO₃), υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) [Riedel-de Haen], βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄) φορμαλδεΰδη 37% [SIGMA].

4.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΨΑΡΙΩΝ

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκαν 50mg-100mg του συγκεκριμένου ιστού και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Τεμαχίζουμε και τοποθετούμε τον ιστό σε φιαλίδια erpendorf των 2ml.
2. Προσθέτουμε 700μl ρυθμιστικού διαλύματος TNES-Urea και 10μl proteinase K (10mg/ml) και αναδεύουμε έντονα στο vortex.
3. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55⁰C για 1h υπό ανάδευση σε κυκλικό αναδευτήρα.
4. Προσθέτουμε 350μl φαινόλη και 350μl χλωροφόρμιο: ισοαμλική αλκοόλη και αναδεύουμε τα δείγματα στον κυκλικό αναδευτήρα για 10min σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
5. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4⁰C.
6. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο erpendorf των 2ml.
7. Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία που αναφέρεται στα βήματα 4-6.
8. Προσθέτουμε 700μl χλωροφόρμιο: ισοαμλική αλκοόλη, αναδεύουμε στον κυκλικό αναδευτήρα για 10min σε RT και στην συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 10min στους 4⁰C.
9. Μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση σε erpendorf του 1,5ml.
10. Προσθέτουμε 50μl διαλύματος οξικού νατρίου 3M και 1ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης, ανακινούμε ελαφρά και επωάζουμε τα δείγματα στους -20⁰C για 20min.

11. Στην περίπτωση που κατά την κατακρήμιση εμφανίζονται ινίδια DNA, αυτά συλλέγονται και τοποθετούνται σε νέο φιαλίδιο. Εναλλακτικά φυγοκεντρούμε (13000rpm για 10min στους 4°C), απομακρύνουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 1ml παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες.

12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και το στεγνώνουμε στους 37°C.

13. Επαναδιαλύουμε το ίζημα του DNA σε 100μl αποστειρωμένου ddH₂O.

14. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

Το NaCl (που περιέχεται στο ρυθμιστικό διάλυμα) ρυθμίζει την οσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και ομογενοποίηση του ιστού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε pH 7.5 το οποίο ρυθμίζεται από το Tris-HCl. Ο ρόλος του χημικού παράγοντα EDTA είναι η δέσμευση των ιόντων Ca⁺⁺ και Mg⁺⁺. Το SDS, το οποίο είναι ένα ιοντικό απορρυπαντικό, συμβάλει στην διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο σε pH>7 ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας και συμβάλει στην μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμιση του DNA στην αιθανόλη οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στον συγκεκριμένο οργανικό διαλύτη.

4.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Πρόκειται για μια μέθοδο διαχωρισμού τμημάτων του DNA βάσει μεγέθους που μας δίνει την δυνατότητα να αποκτήσουμε τις πληροφορίες για την ποιότητα και την ποσότητα του DNA.

Στην συγκεκριμένη εργασία η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της απομόνωσης DNA και των προϊόντων της PCR. Συγκεκριμένα ελέγχθηκε η ακεραιότητα και η ποιότητα του απομονωμένου DNA η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται. Όσον αφορά το προϊόν PCR, ελέγχουμε την ποσότητα και το μέγεθός του.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Σε κωνική φιάλη 100ml ζυγίζουμε 0,6g ή 0.3gr αγαρόζης (2% ή 1% αντίστοιχα) και προσθέτουμε 40ml διαλύματος TAE 1X
2. Βράζουμε στο φούρνο μικροκυμάτων και ανακινούμε ανά διαστήματα, ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη
3. Αφήνουμε το περιεχόμενο του διαλύματος να κρυώσει μέχρι την θερμοκρασία περίπου των 50°C
4. Προετοιμάζουμε το εκμαγείο στο οποίο θα σχηματιστεί το πήκτωμα και τοποθετούμε τα χτενάκια που θα σχηματίσουν τις θέσεις στις οποίες θα εισαχθεί το δείγμα (πηγάδια)
5. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης στο εκμαγείο, όπου και πηζει η αγαρόζη σε θερμοκρασία δωματίου
6. Αφαιρούμε τη χτένα και τοποθετούμε το πήκτωμα στην συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης
7. Γεμίζουμε την συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X ώστε να καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα
8. Προετοιμάζουμε τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση: αναμιγνύονται 3μl loading buffer με 3μl DNA (10% της συνολικής ποσότητας) ή 5μl προϊόντος PCR (10% της συνολικής ποσότητας)
10. Τοποθετούμε τα δείγματα σε κάθε ένα από τα πηγάδια και εφαρμόζουμε σταθερή τάση περίπου 100Volts
11. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης τοποθετούμε και παρατηρούμε το πήκτωμα πάνω από τη συσκευή υπεριώδους φωτός και την φωτογραφίζουμε.

4.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για την εφαρμογή της PCR ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

1. Τοποθετούμε, σε φιαλίδια erpendorf των 200μl, 1μl εκμαγείου DNA (προϊόν της απομόνωσης). Αυτό αντιστοιχεί σε ποσότητα DNA 200–700ng
2. Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων παρασκευάζουμε ένα κοινό διάλυμα (master mix) η σύσταση του οποίου περιέχει τις ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα:

Πίνακας 3: Ποσότητες των αντιδραστηρίων ανά δείγμα για την παρασκευή ενός κοινού διαλύματος

		Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
DNA	1μl	~200ng/μl	
Εκκινητής 16sRNA FW	1μl	50pmoles	1 pmoles
Εκκινητής 16Srna RW	1μl	50pmoles	1 pmoles
Buffer	5μl	10x	1x
MgCl ₂	2μl	50mM	2mM
dNTP _s	1μl	10Mm το καθένα	0,2Mm το καθένα
Taq πολυμεράση	1μl	5U/μl	1U
ddH ₂ O	40μl		
Συνολικός ογκος	50μl		

3. Μοιράζουμε, σε κάθε erpendorf που περιέχει δείγμα, από 49μl του master mix. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl. Στο ένα erpendorf δεν περιέχεται DNA (είναι ο αρνητικός μάρτυρας που το χρησιμοποιούμε για να δούμε αν υπάρχει μόλυνση)
4. Τοποθετούμε τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή ο οποίος προγραμματίζεται να εκτελέσει το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου της PCR:

Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 4 min

Αποδιάταξη: 95 °C για 40 sec

Υβριδοποίηση εκκινητών: 52 °C για 50 sec

Επιμήκυνση: 72 °C για 50 sec

Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min

} 35 κύκλοι

5. Κάνουμε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για να ελέγξουμε την επιτυχία της διαδικασίας

6. Παρατηρούμε το πήκτωμα σε υπεριώδες φως και το φωτογραφίζουμε.

4.6. ΑΝΑΛΥΣΗ SSCP

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους στο πήκτωμα η οποία μπορεί να προκαλείται από μια αλλαγή ενός και μόνο νουκλεοτιδίου. Στηρίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει μικρών διαφορών στην αλληλουχία τους, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας διαφορετικής δευτεροταγούς δομής, η οποία προκαλεί διαφορά στη κινητικότητα των μορίων αυτών μέσα σε πήκτωμα. Σε ένα απλό πήκτωμα ακρυλαμίδη η κινητικότητα των δίκλωνων μορίων DNA εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος του μορίου και είναι σχετικά ανεξάρτητη από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Εν τούτοις, στην SSCP η κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων DNA επηρεάζεται αισθητά όταν υπάρχουν μικρές αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία, όπως είναι οι πολυμορφισμοί μονονουκλεοτιδίου (SNP). Αυτό συμβαίνει λόγω της ασταθούς φύσης του μονόκλωνου DNA: απουσία συμπληρωματικού κλώνου, το μονόκλωνο μόριο δύναται να σχηματίσει ενδομοριακούς δεσμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναδιπλώσεων και θηλειών, προσδίδοντάς του μία χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή. Η μέθοδος SSCP εκμεταλλεύεται ακριβώς αυτή την ιδιότητα του μονόκλωνου DNA (Orita M *et al*, 1989).

Περιλαμβάνει 3 στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10%.

Τα συστατικά και οι ποσότητες αναγράφονται στον πίνακα 4:

Πίνακας 4: Συστατικά και ποσότητες παρασκευής 2 πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης σε συγκέντρωση 10%

Ακρυλαμίδη	12gr
Δις-ακρυλαμίδη	0,333gr
Γλυκερόλη 50%	12,5ml
*TBE 10X	7,5ml

ddH ₂ O	60ml
TEMED	125μl
APS 20%	750μl

*TBE 10X (2lt): Tris Base 121gr, Boric acid 61,7gr, EDTA (0,5M) 80ml, ddH₂O έως το 2lt

Τα βήματα που ακολουθούμε είναι:

- Προετοιμάζουμε την συσκευή για παρασκευή πηκτώματος
- Σε ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα συστατικά ακριλαμίδη, δις-ακριλαμίδη, γλυκερόλη 50%, TBE 10X με ddH₂O (Πίνακας 4). Κάνουμε διήθηση και μετά συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι τα 125ml
- Προσθέτουμε TEMED (125 μl) και APS 20% (750 μl), γρήγορα για να μην πολυμεριστεί η ακρυλαμίδη.

2. Αποδιάταξη προϊόντων PCR: με τη χρήση denaturation buffer (95% formamide, 0,05% μπλέ τις βρωμοφαινόλης, 0,05% xylene cyanol, 10 mM NaOH) και υψηλή θερμοκρασία.

3. Ηλεκτροφόρηση: πραγματοποιείται για 18 ώρες στα 220 Volt.

4. Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο:

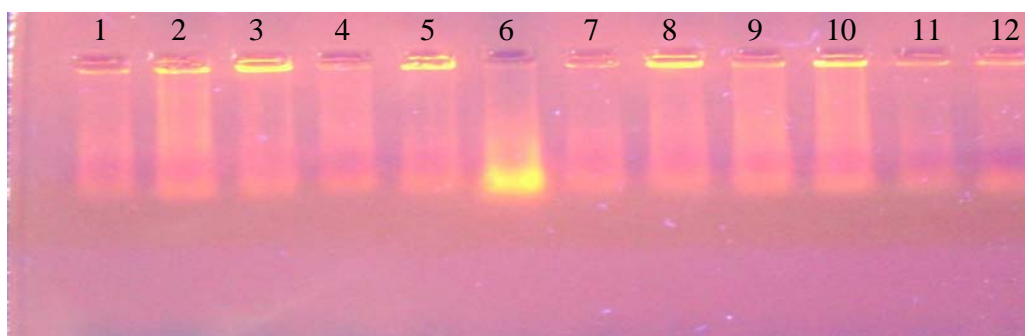
Η τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται με το DNA και αντιδρά με την φορμαλδεΰδη. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζουν ένα κίτρινο ή καφετί χρώμα. Για το σκοπό αυτό:

1. Εμβαπτίζουμε το πηκτωμα σε 200ml διαλύματος (20ml EtOH, 1ml οξικό οξύ και 780ml ddH₂O) για 3min
2. Απομακρύνουμε το διάλυμα
3. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 1 & 2
4. Ξεπλένουμε μία φορά με ddH₂O για 1min—απομακρύνουμε το νερό
5. Προσθέτουμε 1gr/lt AgNO₃ για 10-15min
6. Απομακρύνουμε το διάλυμα και ξεπλένουμε δυο φορές με ddH₂O για 1min
7. Απομακρύνουμε το ddH₂O και προσθέτουμε 400ml διαλύματος (μέχρι τα 400ml ddH₂O, 6gr NaOH, 0,025gr NaBH₄, 2ml φορμαλδεΰδη), μέχρι να εμφανιστούν ευκρινώς οι ζωνώσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

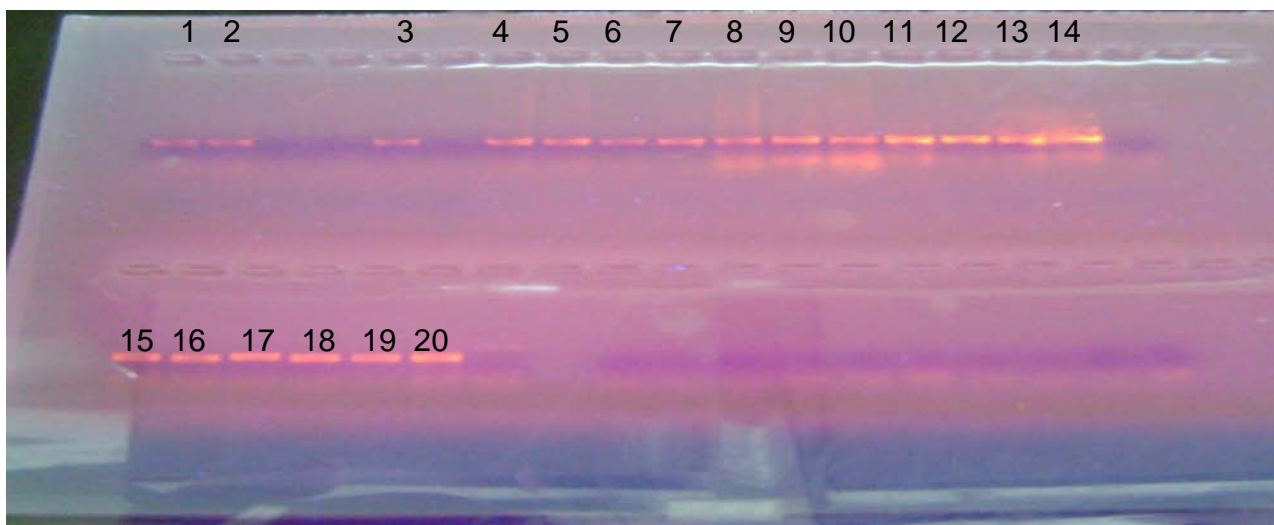
5.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά συλλέχθηκαν τα δείγματα ειδών ψαριών και από ένα μικρό τεμάχιο ιστού από το καθένα απομονώθηκε DNA. Ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%). Η εικόνα 28 δείχνει ενδεικτικά το DNA που απομονώθηκε από διάφορα είδη ψαριών. Η φωτεινότητα και το πάχος της κάθε ζώνης αντιστοιχεί στην ποσότητα DNA που απομονώθηκε. Επίσης, η ένταση των ζωνών αποδεικνύεται αρκετά καλή για τα 12 δείγματα και πιο καλή στα δείγματα 2,3,5,8,10 στα οποία έχει πιο έντονες ζώνες.



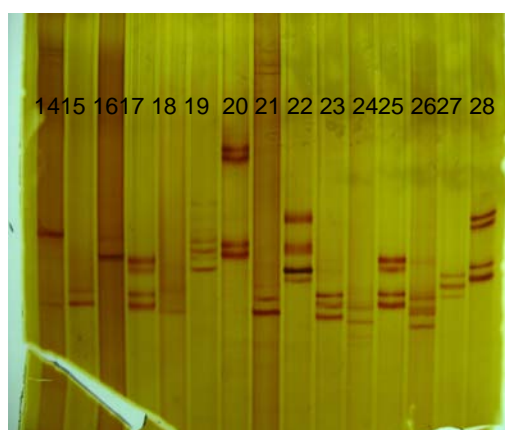
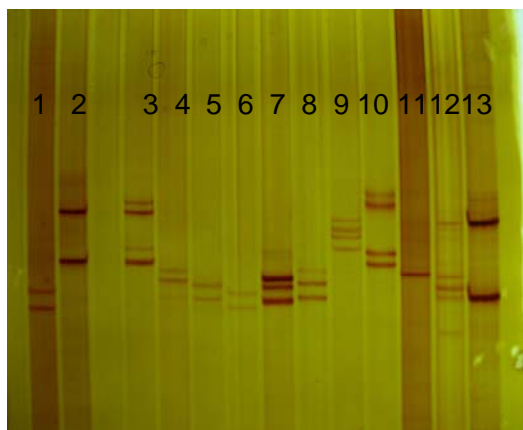
Εικ.28: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του DNA που απομονώθηκαν από 12 δείγματα ψαριού: 1) Βακαλάος, 2) Γαύρος, 3) Γλαύκος, 4) Γλώσσα, 5) Γόππα, 6) Κοκκινόψαρο, 7) Κολιός, 8) Κουτσομούρα, 9) Λαυράκι, 10) Μαρίδα, 11) Μελανούρι, 12) Μπακαλιάρος

Στην συνέχεια εφαρμόστηκε η PCR με την οποία πολλαπλασιάσαμε τμήμα του γονιδίου 16S rRNA σε 20 δείγματα (από τα 28 που είχαμε συνολικά). Το προϊόν έχει μέγεθος περίπου 230 bp. Χρησιμοποιήσαμε το ίδιο ζεύγος εκκινητών για όλα τα είδη που μελετήσαμε και είχαμε θετικό αποτέλεσμα στην αντίδραση PCR για όλα τα είδη. Παρακάτω έχουμε την εικόνα 29 που έγινε ηλεκτροφόρησης PCR σε πήκτωμα 2%.



Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% προϊόντων PCR: 1) Βακαλάος, 2) Γαυρός, 3) Γλαύκος, 4) Γλώσσα, 5) Γόπα, 6) Κοκκινόψαρο, 7) Κολιός, 8) Κουτσομούρα, 9) Λαυράκι, 10) Μαρίδα, 11) Μελανούρι, 12) Μπακαλιάρος, 13) Μπαρμπούνι, 14) Πέρκα 1, 15) Πεσκανδρίτσα, 16) Πέρκα 2, 17) Πέστροφα, 18) Προσφυγάκι, 19) Σαλάχι, 20) Σαρδελομάνα.

Μετά ακολουθεί η μέθοδος SSCP σε 28 δείγματα ψαριών.



Εικ.30 και 31: Ανάλυση SSCP στα 28 δείγματα: 1) Βακαλάος, 2) Γαύρος, 3) Γλαύκος, 4) Γλώσσα, 5) Γόπα, 6) Κοκκινόψαρο, 7) Κολιός, 8) Κουτσομούρα, 9) Λαυράκι, 10) Μαρίδα, 11) Μελανούρι, 12) Μπακαλιάρος, 13) Μπαρμπούνι, 14) Πέρκα 1, 15) Πεσκανδρίτσα, 16) Πέρκα 2, 17) Πέστροφα, 18) Προσφυγάκι, 19) Σαλάχι, 20) Σαρδελομάνα, 21) Σαυρίδι, 22) Τσιπούρα, 23) Τόνος, 24) Σαμπανιός, 25) Χριστόψαρο, 26) Σαρδέλλα, 27) Σκουμπρί, 28) Συκάκι

Στις εικόνες 30 και 31 παρατηρούμε ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων από τα ψάρια βακαλάο, προσφυγάκι και συκάκι που ανήκουν στην ίδια οικογένεια *Gadidae*. Επίσης στα δείγματα από την γόπα, το μελανούρι και την τσιπούρα που ανήκουν στην οικογένεια *Saridae*. Ενώ η κουτσομούρα και το μπαρμπούνι τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Mullidae* έχουν και αυτά διαφορές. Το ίδιο και η σαρδέλλα με την σαρδελομάνα όπου ανήκουν στην οικογένεια *Clupeidae*. Ακόμη ο κολιός, ο τόνος και το σκουμπρί που ανήκουν στην ίδια οικογένεια *Scombridae* παρουσιάζουν διαφορές. Επιπλέον το σαυρίδι και το ψάρι σαμπανίος που ανήκουν στην οικογένεια *Carangidae* παρουσιάζουν διαφορές. Από την άλλη πλευρά όμως ο γαύρος, ο γλαύκος, η γλώσσα, το κοκκινόψαρο, το λαυράκι, η μαρίδα, ο μπακαλιάρος, η πέρκα, η πεσκανδρίτσα, η πέστροφα, το σαλάχι και το χριστόψαρο που αντιστοιχούν στις ακόλουθες διαφορετικές οικογένειες *Engraulidae*, *Carcharhinidae*, *Soleidae*, *Cyprinidae*, *Moronidae*, *Centracanthidae*, *Merlucciidae*, *Percidae*, *Laphiidae*, *Salmonidae*, *Rajidae*, *Zeidae* έχουν και αυτά τις διαφορές τους.

5.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην συγκεκριμένη εργασία καταφέραμε να πετύχουμε τον μοριακό διαχωρισμό 28 από τα 30 είδη ψαριών. Στην μελέτη αυτή έγινε προσπάθεια για την μοριακή ταυτοποίηση 28 διαφορετικών ειδών ψαριών.

Στην παρούσα όμως ανάλυση αποδείξαμε ότι καταλληλότερος μοριακός δείκτης για την ταυτοποίηση ειδών ψαριών είναι τμήμα του γονιδίου 16S rRNA με τους ίδιους εκκινητές.

Έτσι η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PCR-SSCP. Αυτή λοιπόν η τεχνική είναι καλή διότι η διαδικασία της στηρίχτηκε στον μιτοχονδριακό γονιδίωμα και στον πολυμορφισμό μονόκλωνης διαμόρφωσης. Η μέθοδος αυτή έχει τουλάχιστον δυο επίπεδα, πρώτων θα απομονώσουμε το mtDNA από ιστό ψαριού, δεύτερων θα καταφέρουμε να πραγματοποιήσουμε το επιθυμητό γονιδιακό σημείο. Το επόμενο βήμα είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που πρόκειται για την μέθοδο διαχωρισμού και ελέγχου του DNA, η οποία στηρίζεται στον καταμερισμό των νουκλεϊνικών οξέων, ανάλογα του μεγέθους τους, καθώς αυτά είναι αρνητικά φορτισμένα, κινούνται διαμέσου των πόρων του πηκτώματος υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Βέβαια οι Rafael *et al* το 2007, παρουσίασαν μια έκθεση με ένα σύνολο 21εκκινητών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που ενισχύει τις προϋποθέσεις για να αναπτυχθούν barcode σχεδόν κάθε τελεοστέου είδος ψαριού, σύμφωνα με το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα b και της πυρηνικές γονιδιακές ακολουθίες. Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε με επιτυχία σε περισσότερα από 200 θαλάσσια είδη ψαριών που αποτελούν τα ακτινοπτέρυγα είδη. Όταν όμως χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές αναλύσεις, ο συνδυασμός της έρευνας με τα δυο γονίδια διαφορετικών εξελικτικών συντελεστών εξυπηρετεί τον προσδιορισμό των ψαριών στο είδος. Διαθέτει έτσι μια ροή που δείχνει τις επικυρωμένες πολυμεράσης αλυσίδας μας με όρους ενίσχυσης αντίδρασης για barcoding, στα είδη εφαρμογών αναγνώρισης καθώς και στη δομή του πληθυσμού ή haplotyping αναλύσεις που προσαρμόζονται στο υψηλότερο της απόδοσης τους (Rafael G Sevilla *et al*, 2007).

Τα 28 δείγματα έδωσαν διαφορετικό πρότυπο. Δηλαδή ο γαύρος διαφέρει αρκετά από την γλώσσα, επίσης διαφορετικά πρότυπα παρουσιάζουν και είδη του ίδιου γένους π.χ. οι δύο π.

Τα συγκεκριμένα είδη ψαριών έχουν άμεση σχέση με την ανθρώπινη διατροφή. Η γνησιότητα τους είναι ένα θέμα που προσελκύει το ενδιαφέρον του κοινωνικού συνόλου διότι, όταν υπάρχει η εσφαλμένη επισήμανση στις ετικέτες των τροφών αμέσως έχουμε άσχημες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι μελλοντικά αυτή η ταυτοποίηση του DNA ψαριών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρατηρήσουμε το είδος ψαριού που υπάρχει σε κονσέρβες, κατεψυγμένα είδη και σε διάφορα είδη τροφών για ζώα. Αυτό βέβαια θα είναι ένα άλλο θέμα για μελλοντική ανάλυση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:2766-2770
2. **Robert D** Ward¹, Tyler S Zemlak², Bronwyn H Innes ¹, Peter R Last ¹ and Paul D. N. Hebert ². DNA barcoding Australia's fish species 2005
3. A EL-Haweeti, M Hegazy ², H Abuhatab ³ and E Sabry. Validation of length frequency analysis for *boops boops* (bogue) growth estimation 2005
4. AdriaMed. Priority topics related to shared demersal fishery resources of the Adriatic Sea. Report of the first meeting of the AdriaMed Working Group on shared demersal resources. FAO-MiPAF Scientific Cooperation to Support Responsible Fisheries in the Adriatic Sea. GCP/RER/010/ITA/TD-02: 21 pp 2000
5. Bahy A Ali, Tian-Hua Huang, Da-Nian Qin ² & Xiao-Mei Wang A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish researchCV , 2005
6. Barbieri, R, Stoumboudi, M.Th, Kalogianni E & Corsini-Foka M. Abundance evaluation of fish populations - The case of gizani (*Ladigesocypris ghigii*). Proc., 7th Hellenic Symposium on Oceanography & Fisheries, Crete (in Greek, English abstract) 2003
7. Brahim Tazi Nawel Amel Investigation Sur Les Parasites Digena de *Mullus Surmuletus* Linné, 1758 Dans LE Littoral Algérien, 2009.
8. Crone, P. R, K. T. Hill, J. D. McDaniel, and N. C. H. Lo. Pacific mackerel (*Scomber japonicus*) stock assessment for USA management in the 2009-10 fishing year. Pacific Fishery Management Council, Pacific Fishery Management Council, 7700 NE Ambassador Place, Suite 101, Portland, Oregon 97220, USA. 197 p, 2009
9. Dieffenbach CW, Dversler GS, PCR Primer A. Laboratory Press, 1995.

10. Fausto Tintia,b, Nicola Ungaroc, Paola Pasolinia, Massimiliano De Panfilisa, Flavio Garoiaa, Ilaria Guarnieroa, Bruno Sabellia, Giovanni Maranoc, Corrado Piccinetti, Development of molecular and morphological markers to improve species-specific monitoring and systematics of Northeast Atlantic and Mediterranean skates (Rajiformes) (200
11. Froese, Rainer, and Daniel Pauly, eds. "*Engraulis encrasicolus*" in *FishBase*. 10 2005 version, (2005).
12. Georgina L. Hold, Valerie J. Russell, Susan E. Pryde, Hartmut Rehbein, Javier Quinteiro, Rodrigo Vidal, Manuel Rey-Mendez, Carmen G. Sotelo, Ricardo I. Pérez-Martin, Ana T. Santos, and Carla Rosa, Development of a DNA-Based Method Aimed at Identifying the Fish Species Present in Food Products, 2001.
13. Heino M 2004 Blue whiting: playing a big game with small fish. ICES CIEM Newsletter; Issue Number 41, September. 2004
14. Michio Yoneda, Shunji Yamasaki, Keisuke Yamamoto, Hiroshi Horikawa, and Michiya Matsuyama. Age and growth of John Dory, *Zeus faber* (Linnaeus, 1758), in the East China Sea, 2002
15. Mohamed Ben Mansoura, Manel Dhahria, Laurence Vénisseb, Martine Jandrot-Perrusb, Frédéric Chaubetb, Raoui M. Maaroufi Mechanism of thrombin inhibition by heparin cofactor II and antithrombin in the presence of the ray (*Raja radula*) skin dermatan sulphate, 2008.
16. Mullis K.B., Ferce F, Gibbs R.A., The polymerase chain reaction. Birchauser, 1994
17. Tsikliras, A.C., Antonopoulou, E. and Stergiou, K.I. (2007). A phenotypic trade-off between previous growth and present fecundity in round sardinella *Sardinella aurita*. *Population Ecology* 49, 221-227.
18. Paulo Vaz-Pires", Isabel Araujo & Roy M. Kirby. Physical measurement of the quality of fresh scad (*Trachurus trachurus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during ice storage using the RT Freshmeter, 2000

19. Picton, B.E. & Morrow, C.C, Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland, 2007
20. Rafael G. Sevilla, Amalia Diez, Michael. Noren, Olivierl Mouchel, Marc Jerome, Veronique Verrez-Bagnis, Hilde Van Pelt, Laurence Favre-Krey, Grigorios Krey, The Fishtrace consortium and Jose M. Bautista, Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial Cytochrome *b* and nuclear rhodopsin genes, 2007
21. Relini, G, Bertrand, J, Zamboni, A (eds) Synthesis of the knowledge on bottom fishery resources in Central Mediterranean (Italy and Corsica). Biol. Mar. Medit, 6 (suppl 1), 1999
22. Richard L. Malvin 2 And Irving B. Fritz Renal Transport of Urea and Some Carbohydrates in *Lophius piscatorius*, 2004
23. S. Roques Z J. A. Galarza Z E. Macpherson Z G. F. Turner Z J. Carreras-Carbonell Z C. Rico Isolation of eight microsatellites loci from the saddled bream, *Oblada melanura* and cross-species amplification in two sea bream species of the genus *Diplodus*, 2006
24. Scholz, Tomáš, Euzet, Louis; Moravec, František. "Taxonomic status of *Pelichnibothrium speciosum* Monticelli, 1889 (Cestoda: Tetraphyllidea), a mysterious parasite of *Alepisaurus ferox* Lowe (Teleostei Alepisauridae) and *Prionace glauca* (L) (Euselachii: Carcharinidae)". *Systematic Parasitology* 41 (1): 1–8, 1998
25. Smith P. J, S. M. Mcveagh And D. Steinke DNA barcoding for the identification of smoked fish products, 2007
26. Spooner D, Van Treuen R, Devincente M. Molecular Market for Genebank Management. RGRI technical bulletin No 10, 2005
27. Status of Fishery Resources off the Northeastern United States for. By Stephen H. Clark, ed. September 1999 Atlantic Mackerel, *Scomber scombrus*, Life History and Habitat Characteristics, 1999
28. Sudbery P, Human Molecular Genetics Long – man, 1998

29. Αθ. Τζιόρτζιου, ζωοτεχνολόγος Ms, Ιχθυοτροφία Τ.Ε.Ι. Λαρίσα, σελ.4-6. 2005
30. Γ. Π. Πατρινός, Μοριακή Διαγνωστική, σελ.4, 2008
31. Γ. Χώτος & Ι. Ρογδάκης, Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών Λαβράκι και τσιπούρα τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης, σελ. 25, 39-40
32. Ν. Κοπράνος. In situ. Αλλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράση Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής Τόμος 11, Παράρτημα 1. Μοριακή Παθολογική ανατομική, σελ. 25-34, 1997
33. Ν. Παπαγεωργίου Καθη. Πανεπιστημίου, « Η πέστροφα και η εκτροφή της» σελ.3,1996
34. Χατζόπουλος, Π. Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Εμβρύου, Αθήνα. Σελ.20,30-35.,2001
35. Χρη. Ν. Νεοφύτου, Ιχθυολογία, Α.Π.Θ. Σελ. 19-23, 41-42. 1997
36. . <http://www.ja.wikipedia.org>