

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΕΤΡΟΥ Β. ΜΑΡΤΣΙΚΑΛΗ

**Ιχνηλασιμότητα πληθυσμών Ιριδίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss*  
(Walbaum, 1792) στην Ελλάδα**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΟΛΟΣ 2018

## ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Α. ΕΞΑΔΑΚΤΥΛΟΣ<sup>1,2,3</sup> Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Α. Π. ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΗΣ<sup>2,3</sup> Καθηγητής Τομέα Ζωικής Παραγωγής, Τμήματος Γεωπονίας, Σχολής Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Ι. Σ. ΜΠΟΖΙΑΡΗΣ<sup>2,3</sup> Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Συντήρησης Ιχθυηρών, Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ι. ΛΕΟΝΑΡΔΟΣ<sup>3</sup> Καθηγητής Βιολογίας Ζώων με έμφαση στην Ιχθυολογία, Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δ. ΒΑΦΕΙΔΗΣ<sup>3</sup> Καθηγητής Βιοποικιλότητας Θαλάσσιων Βενθικών Ασπόνδυλων και άμεσης – έμμεσης χρηστικότητάς τους, Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Α. ΚΟΚΚΙΝΑΚΗΣ<sup>3</sup> Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας και Οικολογίας Ιχθύων Εσωτερικών Υδάτων, Τμήματος Γεωπονίας, Σχολής Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Δ. ΧΑΤΖΗΠΛΗΣ<sup>3</sup> Καθηγητής Γενετικής, Τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων, Κατεύθυνση Ζωικής Παραγωγής, Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης

<sup>1</sup> Επιβλέπων της Διδακτορικής Διατριβής

<sup>2</sup> Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής

<sup>3</sup> Μέλος της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

*Στη μνήμη του πατέρα μου*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Λίστα Δημοσιεύσεων

Λίστα Συντομεύσεων και Βιοχημικών όρων

Περίληψη

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά.....1

1.2 Ταξινόμηση και Κατανομή της Ιριδίζουσας Πέστροφας.....4

1.3 Αβιοτικοί Παράγοντες.....5

1.4 Τροφικό Πλέγμα.....6

1.5 Εκτροφή της Ιριδίζουσας Πέστροφας στην Ευρώπη.....7

1.6 Εισαγωγή της Ιριδίζουσας Πέστροφας στην Ελλάδα.....8

1.7 Εντατικές Εκτροφές Ιριδίζουσας Πέστροφας στην Ελλάδα.....10

### 2. ΜΥΪΚΟΣ ΙΣΤΟΣ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ.....11

2.1 Ποιότητα των φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας.....12

2.2 Ο ρόλος των ελεύθερων αμινοξέων στην ποιότητα των φιλέτων της ιριδίζουσας πέστροφας.....12

### 3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ *Oncorhynchus mykiss* ΣΕ ΕΝΤΑΤΙΚΕΣ ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

3.1 Εισαγωγή.....14

3.2 Υλικά και Μέθοδοι.....18

3.2.1 Εξαγωγή DNA.....21

3.2.2 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα των τμημάτων-στόχων του mtDNA που πολλαπλασιάστηκαν με την PCR.....25

3.2.3 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων.....26

3.3 Αποτελέσματα.....28

3.4 Συζήτηση.....38

3.5 Συμπέρασμα.....42

<b>4. ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΕΝΤΑΤΙΚΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΜΥΪΚΟ ΤΟΥΣ ΙΣΤΟ</b>	
4.1 Εισαγωγή.....	43
4.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	46
4.2.1 Συμμόρφωση με τον Κώδικα Ηθικής και Δεοντολογίας Ερευνών.....	46
4.2.2 Δειγματοληψία.....	47
4.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων.....	50
4.2.4 Αντιδραστήρια.....	51
4.2.5 Προετοιμασία κινητών φάσεων.....	51
4.2.6 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	52
4.2.7 Προετοιμασία ορθοφθαλδεΐδης.....	52
4.2.8 Πρότυπα διαλύματα αμινοξέων.....	53
4.2.9 Παραγοντοποίηση αμινοξέων.....	53
4.2.10 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων.....	53
4.3 Αποτελέσματα.....	54
4.4 Συζήτηση.....	58
4.5 Συμπέρασμα.....	60
<b>5. ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΕΝΤΑΤΙΚΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑΣ</b>	
5.1 Εισαγωγή.....	61
5.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	65
5.2.1 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων.....	67
5.3 Αποτελέσματα.....	68
5.4 Συζήτηση.....	70
5.5 Συμπέρασμα.....	74
<b>6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>75</b>

Δημοσίευση Ι

Δημοσίευση ΙΙ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Ιχθυολογίας-Υδροβιολογίας, του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ολοκλήρωσή της δεν θα μπορούσε να επιτευχθεί χωρίς τη διαρκή, ανεκτίμητη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε ο Επιβλέπων Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Εξαδάκτυλος Αθανάσιος. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ολόψυχα, διότι με περιέβαλε με εμπιστοσύνη, παρέχοντας χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις, δείχνοντας αδιάκοπο ενδιαφέρον για την επιτυχή υλοποίησή της.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Αποστολίδη Απόστολο για την αμέριστη βοήθεια του και τις εύστοχες συμβουλές και υποδείξεις του. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μποζιάρη Ιωάννη για τις πολύτιμες συμβουλές του και το αμείωτο ενδιαφέρον που επέδειξε καθ'όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την πολυσχιδή βοήθεια, τις χρήσιμες συμβουλές, την εποικοδομητική και ταυτόχρονα ενθαρρυντική κριτική που έλαβα από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Παναγιωτάκη Παναγιώτα, την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Γκολομάζου Ελένη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σκόρδα Κωνσταντίνο και τον Καθηγητή κ. Βαφειδή Δημήτριο. Εκφράζω τις ειλικρινέστερες και θερμότερες ευχαριστίες μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω για τις αένες και εποικοδομητικές συζητήσεις που είχαμε με όλη την ομάδα του εργαστηρίου, τον Δρ. Μαλανδράκη Εμμανουήλ, τον Υ.Δ. Κάβουρα Μενέλαο, τον Δρ. Παλαιοκώστα Χρήστο και τον Δρ. Γκάφα Γεώργιο.

Επίσης, οφείλω να εκφράσω τον σεβασμό και τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου, που μου έδωσαν την ευκαιρία, αλλά και τη δυνατότητα να αφοσιωθώ στην υλοποίηση της διατριβής μου παρέχοντας μου κάθε δυνατή υποστήριξη, καθώς και στις αδερφές μου Παναγιώτα και Αλεξάνδρα για τη διαρκή στήριξή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη σύζυγο μου Κάτια και τον γιο μου Φίλιππο για την αμέριστη και ολόψυχη συμπαράσταση, υποστήριξη, κατανόηση και υπομονή τους καθ'όλη τη διάρκεια της διατριβής. Τους ευχαριστώ θερμά όλους.

## Λίστα Δημοσιεύσεων

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ I: Martsikalis, P., Gkafas, G. A., Apostolidis, A. P. and Exadactylos A. (2014). Genetic Structure Profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farmed Strains in Greece. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **14**, 749-757. doi: 10.4194/1303-2712-v14\_3\_17

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ II: Martsikalis, P. V., Kavouras, M., Gkafas, G. A., Apostolidis, A. P., Boziaris, I. S. and Exadactylos A. (2018). Morphological and free amino acid profile variability, as a tool for stock identification among farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* of different origin. *Aquaculture Research* **49**(2), 621-630. doi: 10.1111/are.13491



## **Λίστα συντομεύσεων και βιοχημικών όρων**

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη

COIII: Κυτόχρωμα c οξειδάσης 3

DNA: Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

mtDNA: Μιτοχονδριακό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

dNTPs: Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια

EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

RFLPs: Πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού

RP-HPLC: Αντίστροφης Φάσης – Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία

tRNA: Μεταφορικό ριβονουκλεϊκό οξύ

ND-5: NADH αφυδρογονάση υπομονάδα 5

ND-6: NADH αφυδρογονάση υπομονάδα 6

TNE: Ρυθμιστικό διάλυμα Υδροξυμεθυλαμινομεθανίου-Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος – Χλωριούχου νατρίου

Tris: Υδροξυμεθυλαμινομεθάνιο

SDS: Δωδεκυλοθειϊκό νάτριο

TAE: Ρυθμιστικό διάλυμα βάσης Υδροξυμεθυλαμινομεθανίου – Οξικού οξέος – Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος

## Περίληψη

Για την επίτευξη της ιχθυλασιμότητας των πληθυσμών ιριδιζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) στην Ελλάδα υιοθετήθηκε μια διαθεματική προσέγγιση, η οποία ως αλληλένδετους πυλώνες της περιελάμβανε α) την πληθυσμιακή γενετική μελέτη στο μιτοχονδριακό DNA των ιχθύων, β) την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων και γ) τη γεωμετρική μορφομετρία του σώματος των ιχθύων, εκφράζοντας ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα των εντατικών εκτροφών της ελληνικής επικράτειας.

Η ιριδιζουσα πέστροφα αποτελεί μη γηγενές είδος των ευρωπαϊκών εσωτερικών υδάτων. Εξαιτίας όμως του γεγονότος ότι παρουσιάζει αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα, όπως είναι η ταχεία αύξηση και η προσαρμοστικότητα της σε ποικίλα ενδιαιτήματα υπό διαφορετικές συνθήκες, εξελίχθηκε σε κυρίαρχο εντατικά εκτρεφόμενο είδος στα εσωτερικά ύδατα της Ελλάδας. Παρά τη σημαντική οικονομική σημασία της, υφίσταται παντελής έλλειψη πληθυσμιακών γενετικών μελετών αναφορικά με την προέλευση των αθρόων εισαγωγών γόνου που έλαβαν χώρα τις προηγούμενες δεκαετίες στον κλάδο της ελληνικής πεστροφοκαλλιέργειας.

Για τη διενέργεια της πληθυσμιακής γενετικής μελέτης πραγματοποιήθηκε πέψη τμημάτων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) που ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP). Τα τμήματα-στόχοι του mtDNA που πολλαπλασιάστηκαν με την τεχνική της PCR ήταν ολόκληρη η περιοχή του βρόχου εκτόπισης, τα tRNA γονίδια της προλίνης και της θρεονίνης, το κυτόχρωμα β, τα γονίδια ND-5 και ND-6 και τμήμα των γονιδίων ATPάση VI και κυτόχρωμα c οξειδάσης 3 (COIII) περιλαμβάνοντας περισσότερα

από 5.500 ζεύγη βάσεων DNA από τα περίπου 16.600 ζεύγη βάσεων που απαρτίζουν το συνολικό mtDNA της ιριδίζουσας πέστροφας. Η ανάλυση της πληθυσμιακής δομής αποκάλυψε ότι οι απλότυποι διακρίνονται σε δύο κεντρικούς κλάδους. Η συνύπαρξη απλότυπων και από τους δύο κλάδους σε όλους τους πληθυσμούς ενδέχεται να υποδηλώνει την ύπαρξη κοινής γονιδιακής δεξαμενής. Επίσης, η συνολική γενετική ποικιλότητα οφειλόταν σε σημαντικό βαθμό στην ύπαρξη ποικιλότητας ενδοπληθυσμιακά παρά στην ύπαρξη ποικιλότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς. Το ποσοστό γενετικής ποικιλότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς σε σύγκριση με τη συνολική παρατηρούμενη ποικιλότητα αντανακλά την πανμιξία δύο αρχικών πληθυσμών (γενεών), υπογραμμίζοντας την ύπαρξη μια κοινής δεξαμενής γονιδίων σε όλες τις εντατικές εκτροφές ιριδίζουσας πέστροφας στην Ελλάδα. Αυτό το γεγονός ενισχύεται και από το δίκτυο απλότυπων που δημιουργήθηκε και αποκάλυψε την ύπαρξη δύο αρχικών κλάδων σε όλο το φάσμα των εντατικών εκτροφών.

Παράλληλα, η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων διενεργήθηκε με τη χρήση Αντίστροφης Φάσης - Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC). Τα εξεταζόμενα δείγματα παρουσίασαν διαφορετικά προφίλ ελεύθερων αμινοξέων ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση. Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis – PCA) αποκάλυψε τον σαφή διαχωρισμό των πληθυσμών μεταξύ ανατολικής και δυτικής Ελλάδας, ο οποίος ενδέχεται να οφείλεται στην ύπαρξη διακυμάνσεων στις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν και επηρεάζουν καταλυτικά τους αβιοτικούς παράγοντες κάθε εντατικής εκτροφής.

Η γεωμετρική μορφομετρία του σώματος των ιχθύων κατέδειξε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των πληθυσμών διαφορετικής προέλευσης. Η Ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (Canonical Variate Analysis – CVA) διέκρινε τους πληθυσμούς σε δύο ομάδες παρουσιάζοντας σε πολύ μεγάλο βαθμό ομοιότητες με τη διενεργηθείσα πληθυσμιακή γενετική μελέτη. Η διεξαγωγή των Γενικών Γραμμικών Μοντέλων (General Linear Models – GLM) δεν επέδειξε συσχέτιση των απλότυπων και της διατροφής με το σχήμα του σώματος των ιχθύων. Εντούτοις, το σχήμα του σώματος των ιχθύων παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με τη γεωγραφική προέλευση, τη θερμοκρασία νερού, τις γεωλογικο-χημικο-κλιματικές ζώνες, την ιστιδίνη και την αργινίνη. Επομένως, η παρατηρούμενη μορφολογική διαφοροποίηση δύναται να οφείλεται στις διαφορές των αβιοτικών παραγόντων που υφίστανται μεταξύ αυτών των ζωνών όντας το αποτέλεσμα του φαινομένου της φαινοτυπικής πλαστικότητας.

Συμπερασματικά, οι αβιοτικοί παράγοντες και οι συνθήκες εκτροφής διαδραματίζουν τον κυρίαρχο ρόλο σε σύγκριση με την προέλευση του γόνου. Η παρούσα διαθεματική προσέγγιση αποτελεί ένα πολύτιμο και χρήσιμο εργαλείο στην αποτελεσματική ιχθυλασιμότητα των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας, έχοντας καθοριστική συνεισφορά και προάγοντας την έρευνα σε τομείς, όπως η περιβαλλοντική ανάλυση κινδύνων για την αξιολόγηση ενδεχόμενων οικολογικών επιπτώσεων που στοχεύουν στην επίτευξη της αειφορικής διαχείρισης των ιχθυοκαλλιεργειών.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικά

Τα σύγχρονα γενετικά μοτίβα των υδρόβιων οργανισμών έχουν διαμορφωθεί έπειτα από την αλληλεπίδραση ιστορικών και σύγχρονων παραγόντων. Οι διάφορες ανθρωπογενείς παρεμβάσεις στο φυσικό περιβάλλον συνετέλεσαν αποφασιστικά στη μείωση της υφιστάμενης γενετικής ποικιλομορφίας των ιχθυοπληθυσμών. Σε διεθνές επίπεδο, αρχικά με τη Σύμβαση της Βέρνης (1979) και μετέπειτα με τη Σύμβαση για τη βιοποικιλότητα (1992), καθώς και με το Πρωτόκολλο της Ναγκόγια (2010) καθορίστηκε το απαραίτητο νομικό και θεσμικό πλαίσιο για την προστασία της βιοποικιλότητας. Η Ευρωπαϊκή Ένωση υιοθετώντας και κυρώνοντας τις παραπάνω Συμβάσεις δημιούργησε ένα ισχυρό νομοθετικό πλαίσιο το οποίο περιλαμβάνει την οδηγία 92/43/ΕΟΚ για την προστασία των οικοτόπων, την οδηγία πλαίσιο 2000/60/ΕΚ αναφορικά με την πολιτική προστασίας των υδάτων, την οδηγία 2006/44/ΕΚ για την ποιότητα των εσωτερικών υδάτων, καθώς και τον κανονισμό 304/2011/ΕΚ (τροποποίηση του κανονισμού 708/2007/ΕΚ) για τη χρήση στην υδατοκαλλιέργεια ξένων και απόντων σε τοπικό επίπεδο ειδών.

Παράλληλα, αξιολογείται η ικανότητα των ιχθύων να παρουσιάζουν το φαινόμενο της φαινοτυπικής πλαστικότητας, όπου ο ίδιος γενότυπος δύναται να απαντάται σε μια πλειάδα διαφορετικών φαινοτύπων ανάλογα με τις ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στις εκάστοτε εκτροφές (Scheiner, 1993). Το γεγονός ότι οι ιχθείς είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο να επηρεάζονται καταλυτικά από την ποιότητα του νερού στο οποίο διαβιούν και να εμφανίζουν διαφορές στον φαινότυπο όταν υφίστανται μεταβολές σε παραμέτρους όπως η θερμοκρασία του νερού, το pH, το επίπεδο οξυγόνου κ.α.

Εντούτοις, οι διαφορές ανάμεσα στους φαινότυπους μπορεί να οφείλονται πέρα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επικρατούν σε κάθε εκτροφή (Taylor, 1986, Fleming *et al.*, 1994, Hedenskog *et al.*, 1997, Hard *et al.*, 2000, Peres-Neto & Magnan, 2004, von Cramon-Taubadel *et al.*, 2005, Löhmus *et al.*, 2010, Pulcini *et al.*, 2013, Pulcini *et al.*, 2014) και στη διαφορετική προέλευση του γόνου των ιχθύων (Swain *et al.*, 1991, Hard *et al.*, 1999, Pakkasmaa & Piironen, 2001, Wessel *et al.*, 2006) ή ακόμη και στο συνδυασμό τους. Στην περίπτωση που συντελούν συνδυαστικά στο φαινότυπο και οι δύο παράγοντες, τότε λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της μερικής πλαστικότητας (Hollander & Butlin, 2010).

Από τη δεκαετία του 1940 πραγματοποιήθηκε αθρόα εισαγωγή αυγών (>3.000.000) ιριδιζουσας πέστροφας από την Αμερικανική Επιτροπή Ιχθύων σε εντατικές εκτροφές που βρίσκονταν εγκατεστημένες στα ρέοντα συστήματα 13 ευρωπαϊκών χωρών με σκοπό την αύξηση της παραγωγής και τη μεγέθυνση του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών (Stanković *et al.*, 2016). Η διατήρηση της ενδοειδικής και διαειδικής γενετικής ποικιλότητας αποτελεί προϋπόθεση για την αποφυγή του κινδύνου εξαφάνισης των ειδών που θα επέφερε ως συνέπεια τη διατάραξη της ισορροπίας ολόκληρου του οικοσυστήματος.

Παράλληλα, η συνεχής μείωση των διαθέσιμων ιχθυοαποθεμάτων σε παγκόσμιο επίπεδο ανέδειξε το ζήτημα της εναλλακτικής κάλυψης της αυξανόμενης ζήτησης ιχθύων από την αγορά με την αρωγή του ταχύτατα αναπτυσσόμενου κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι περίπου το 50% της υφιστάμενης ζήτησης από τον καταναλωτή καλύπτεται πλέον από ιχθείς προερχόμενους από εντατικές εκτροφές. Σύμφωνα με εκτιμήσεις το ποσοστό αυτό δύναται να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια με την αύξηση της παραγωγής που θα προέλθει από την υιοθέτηση, ανάπτυξη και εφαρμογή εκ μέρους των

ιχθυοκαλλιέργειών σύγχρονων προγραμμάτων επιλογής γεννητόρων τα οποία θα έχουν καταρτιστεί με τη βοήθεια μοριακών δεικτών (AQUABREEDING, 2008, Janssen *et al.*, 2015).

Ειδικότερα, οι εντατικά εκτρεφόμενοι ιχθείς των εσωτερικών υδάτων παρουσιάζουν έντονο οικονομικό ενδιαφέρον, καθώς κατά κύριο λόγο εκτρέφονται ευρέως καταλαμβάνοντας ένα σημαντικό μερίδιο της αγοράς ιχθύων. Επιπρόσθετα, η απαίτηση του καταναλωτικού κοινού για συνεχή βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων ιχθύων δημιούργησε νέες προκλήσεις για τον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας. Επιπλέον, όχι μόνο στην Ευρώπη, αλλά και σε ολόκληρη την υφήλιο αλιεύονται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια στα πλαίσια της αθλητικής δραστηριότητας ερασιτεχνικής αλιείας (Sport fishing) δίνοντας ώθηση στον τριτογενή τομέα και πιο συγκεκριμένα στον κλάδο του αγροτουρισμού.

Προπομπός και θεμέλιος λίθος για την επιτυχή εφαρμογή στρατηγικών διαχείρισης είναι η διεξαγωγή πληθυσμιακών γενετικών μελετών, οι οποίες θα δώσουν απαντήσεις ως προς την κατανομή και το βαθμό της γενετικής ποικιλότητας στους προς εξέταση ιχθυοπληθυσμούς, επιδεικνύοντας τις ενδεδειγμένες ενέργειες, αλλά και τα κατάλληλα μέτρα που απαιτούνται να ληφθούν.

Παράλληλα, η ανάλυση των ποιοτικών χαρακτηριστικών της σάρκας των εκτρεφόμενων ιχθύων με στόχο τη διαρκή προσπάθεια για συνεχή βελτίωση της ποιότητάς της θα προσδώσει προστιθέμενη αξία στο τελικό προϊόν συμβάλλοντας στην αύξηση των κερδών και την οικονομική ανάπτυξη του κλάδου.

Αντικείμενο της εργασίας αυτής αποτελεί η ιχνηλασιμότητα των πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) στην Ελλάδα ακολουθώντας μια διαθεματική προσέγγιση που ως αλληλένδετους πυλώνες της περιλαμβάνει την πληθυσμιακή γενετική μελέτη στο μιτοχονδριακό DNA των

ιχθύων, την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό τους ιστό και τη γεωμετρική μορφομετρία του σώματός τους, εκφράζοντας ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα των εντατικών εκτροφών της ελληνικής επικράτειας. Το έναυσμα για τη διεξαγωγή αυτής της μελέτης δόθηκε από το γεγονός ότι: α) υφίσταται παντελής έλλειψη επιστημονικών δεδομένων αναφορικά με την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας ενδοπληθυσμιακά και διαπληθυσμιακά των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδιζουσας πέστροφας στον ελλαδικό χώρο, με αποτέλεσμα η καταγραφή των υφιστάμενων απλότυπων σε κάθε εντατική εκτροφή στην Ελλάδα να αποτελεί σημαντική παρακαταθήκη με απώτερο στόχο την υιοθέτηση και εφαρμογή στρατηγικών διαχείρισης για τη διατήρηση και την επίτευξη της αειφορίας στα ρέοντα συστήματα και β) τόσο το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων, όσο και η γεωμετρική μορφομετρία του σώματός τους δύνανται να επηρεαστούν από τους αβιοτικούς παράγοντες που επικρατούν σε κάθε εντατική εκτροφή, καθώς επίσης και από την προέλευση του γόνου. Επομένως, η πληθυσμιακή γενετική μελέτη σε συνδυασμό με τις αναλύσεις του προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων και της γεωμετρικής τους μορφομετρίας θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην ανίχνευση διαφοροποιήσεων ανάμεσα στους ιχθυοπληθυσμούς διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο την ιχνηλασιμότητά τους.

## **1.2 Ταξινόμηση και Κατανομή της Ιριδιζουσας Πέστροφας**

Οι φυσικοί πληθυσμοί της ιριδιζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) εκτείνονται από την νοτιοδυτική Αλάσκα μέχρι την Sierra Madre Occidental στο Μεξικό περιλαμβάνοντας και περιοχές του Ειρηνικού ωκεανού στην Ασία (Behnke, 2002). Οι φυσικοί πληθυσμοί ιριδιζουσας πέστροφας διακρίνονται σε



δύο τύπους, με τον πρώτο να απαντάται ανατολικά της οροσειράς Κασκείντ (Cascade range) στις Η.Π.Α και στον Άνω ποταμό Φρέϊτζερ (Upper Fraser River) στη Βρετανική Κολούμπια, ο οποίος ονομάζεται «red band ή κόκκινη λωρίδα» και τον δεύτερο να απαντάται δυτικά της οροσειράς Κασκείντ και να ονομάζεται «steelhead», συγκαταλεγόμενος στα ανάδρομα είδη, καθώς μεταναστεύει στον Ειρηνικό ωκεανό, έως ότου επέλθει η αναπαραγωγική του ωρίμανση, οπότε και επιστρέφει εκ νέου στα ρέοντα συστήματα για την απόθεση των αυγών του (Behnke, 2002).

### 1.3 Αβιοτικοί Παράγοντες

Γενικά, στο φυσικό περιβάλλον η ιριδίζουσα πέστροφα απαντάται συνήθως σε υψηλό υψόμετρο, σε ορεινούς όγκους μέσα σε διάφορους τύπους ρέοντων συστημάτων, όπως είναι οι πηγές, οι μικρού και μεγάλου μεγέθους ποταμοί και οι εκβολές αυτών, καθώς και λίμνες, όπου τα επίπεδα οξυγόνου βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα και η θερμοκρασία του νερού κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Πρωτεύοντα ρόλο στην αύξηση και ωρίμανσή της διαδραματίζει η θερμοκρασία του νερού. Η βέλτιστη θερμοκρασία του νερού για την ωοτοκία και την αύξησή της είναι μεταξύ 9-14°C, επίπεδο θερμοκρασίας το οποίο απαντάται συνήθως στα ρέοντα συστήματα της ελληνικής επικράτειας, γεγονός που επιταχύνει την επίτευξη εμπορεύσιμου βάρους από τους ιχθύες σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Γενικότερα, σε κάθε περίπτωση η εκτροπή της ιριδίζουσας πέστροφας απαιτεί θερμοκρασία νερού μικρότερη των 21°C. Η ενδεικνυόμενη τιμή του pH στο νερό είναι ίση με 7 με ανεκτές μικρές αποκλίσεις, ενώ το διαλυμένο οξυγόνο πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 mg l<sup>-1</sup> και 9 mg l<sup>-1</sup> (FAO, 2012).

Το ιδανικό ενδιαίτημα για την ιριδίζουσα πέστροφα αποτελείται από μια αλληλουχία ρευμάτων νερού και ήρεμων λιμνών, όπου το νερό είναι καθαρό, διαυγές, πλούσιο σε οξυγόνο, σε χαμηλή θερμοκρασία, συνοδευόμενο από ημιβυθισμένους

κορμούς δέντρων, ογκόλιθους και υδρόβια βλάστηση (Hunter, 1991). Η ύπαρξη κατάλληλα διαμορφωμένης κοίτης με απότομες κλίσεις σε συνδυασμό με τους ογκόλιθους στο βυθό και τους κορμούς δέντρων στην επιφάνεια του νερού καθιστούν ένα εξαιρετικό καταφύγιο για την προστασία της ιριδίζουσας πέστροφας. Επίσης η ύπαρξη αμμοχαλικώδους υποστρώματος στο βυθό διευκολύνει την ασφαλή απόθεση των αυγών και τη γονιμοποίησή τους από τα αρσενικού γένους άτομα (Hilderbrand *et al.*, 1997).

Ειδικότερα, η βλάστηση κατά μήκος της όχθης, η οποία εισέρχεται ορισμένες φορές και μέσα στην κοίτη παρέχει πολλαπλά πλεονεκτήματα. Κατά κύριο λόγο δύναται να φιλοξενήσει έντομα τα οποία αποτελούν εν δυνάμει τροφή, παράλληλα παρέχει μέσω του φυλλώματος των δέντρων σκίαση διατηρώντας σε χαμηλά επίπεδα τη θερμοκρασία του νερού και επιπρόσθετα αποτελεί καταφύγιο για την προστασία της πέστροφας, όταν κλαδιά και κορμοί δέντρων βυθιστούν στην κοίτη του ρέοντος συστήματος. Επίσης, το ριζικό σύστημα της παρόχθιας βλάστησης συμβάλλει στη διατήρηση της ποιότητας του νερού, στη μη διάβρωση του εδάφους σταθεροποιώντας το εύρος της κοίτης και αποκλείοντας κάθε ενδεχόμενο απόφραξης της, λόγω κατακρήμνισης του εδάφους, στοιχείο σημαντικό για τη διασφάλιση της ανάγκης μετανάστευσης της ιριδίζουσας πέστροφας (Hilderbrand *et al.*, 1997).

#### **1.4 Τροφικό Πλέγμα**

Όσον αφορά το τροφικό πλέγμα της ιριδίζουσας πέστροφας, αυτή συγκαταλέγεται στα αρπακτικά, σαρκοφάγα είδη και η διατροφή της ποικίλλει από αεροπλαγκτόν, όπως είναι τα έντομα που απαντώνται πολλές φορές νεκρά στην επιφάνεια του νερού, μέχρι και μεγάλα ασπόνδυλα, όπως οι караβίδες. Τα σημεία του βυθού, όπου υπάρχουν ογκόλιθοι αποτελούν καταφύγιο για έντομα και οστρακόδερμα. Επιπρόσθετα, οι βδέλλες αποτελούν εν δυνάμει τροφή, όπως επίσης

τα αυγά ιχθύων και οι μικρού μεγέθους ιχθύες συνηθίζεται να περιλαμβάνονται ως μέρος της διατροφής της ιριδίζουσας πέστροφας. Για την αύξηση και ωρίμανσή της απαιτείται διατροφή πλούσια σε πρωτεΐνες. Λόγω της ιδιότητάς της να μεταναστεύει είναι δύσκολο να θέσουμε τα όρια του ενδιαιτηματός της. Η ιριδίζουσα πέστροφα, ως κορυφαίος θηρευτής αναζητεί τροφή σε μεγάλες αποστάσεις ειδικότερα σε περίπτωση έλλειψης τροφής. Η διασφάλιση και η συνεχής βελτίωση της ποιότητας του ενδιαιτηματος κρίνεται καθοριστική για τη διαβίωση και άλλων οργανισμών που αποτελούν εν δυνάμει τροφή για την ιριδίζουσα πέστροφα (Staley & Mueller, 2000).

### **1.5 Εκτροφή της Ιριδίζουσας Πέστροφας στην Ευρώπη**

Το είδος εισήχθη για πρώτη φορά στην ευρωπαϊκή ήπειρο από τη βορειοδυτική Αμερική στις αρχές του 19ου αιώνα και ειδικότερα θεωρείται ότι η πλειονότητα των εκτρεφόμενων ιχθύων ιριδίζουσας πέστροφας σε ολόκληρη την υφήλιο προέρχεται από ένα εκκολαπτήριο στον ποταμό Μακλάουντ της Καλιφόρνια των Η.Π.Α, το οποίο είχε ιδρυθεί ήδη από το 1879 (Gall & Crandell, 1992). Το κύριο πλεονέκτημα της, ήτοι η προσαρμοστικότητά της συνετέλεσε αποφασιστικά στην εξάπλωση της εκτροφής της σε ολόκληρη την Ευρώπη.

Σύμφωνα με δημοσιευμένα στοιχεία αποτελεί ένα από τα κυριότερα και ευρέως διαδεδομένα εκτρεφόμενα είδη σε εσωτερικά ύδατα στην Ευρώπη με παραγωγή που αγγίζει τους 386.859 τόνους ετησίως, καθιστώντας τη μεγαλύτερη παραγωγό ήπειρο παγκοσμίως. Ειδικότερα, στην Ευρώπη το μεγαλύτερο μερίδιο στην παραγωγή κατά το έτος 2015 κατείχαν η Τουρκία και η Νορβηγία με 107.000 και 80.000 τόνους, αντίστοιχα. Επίσης, σημαντική παραγωγή μεταξύ 30.000-40.000 τόνων ετησίως επιδεικνύουν η Δανία, η Ιταλία και η Γαλλία (FEAP, 2016). Όσον αφορά την Ελλάδα, η παραγόμενη ποσότητα προορίζεται κυρίως για την κάλυψη των αναγκών της εγχώριας αγοράς (Framian, 2009). Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ελληνικής

Στατιστικής Υπηρεσίας τα τελευταία χρόνια η παραγωγή ιριδιζουσας πέστροφας παρουσιάζει πτωτική τάση με αποκορύφωμα το έτος 2014 όπου υποχώρησε, αγγίζοντας συνολικά τους 1.611,4 τόνους, με αξία 5.030.400 Ευρώ (ΕΛΣΤΑΤ, 2014).

### **1.6 Εισαγωγή της Ιριδιζουσας Πέστροφας στην Ελλάδα**

Η ιριδιζουσα πέστροφα στην Ελλάδα χρησιμοποιήθηκε ως το κατεξοχήν είδος εκτροφής σε συστήματα συνεχούς ροής εκμεταλλεύοντας στο έπακρο την αρμοστικότητα του είδους στις αβιοτικές συνθήκες των ενδιαιτημάτων της χώρας. Η εισαγωγή της έλαβε χώρα κατά κύριο λόγο στοχεύοντας στην ανάπτυξη και την οικονομική μεγέθυνση τόσο του κλάδου των ιχθυοκαλλιεργειών, όσο και της αγοράς ιχθύων, η οποία μέχρι τότε περιελάμβανε αποκλειστικά άγριους πληθυσμούς πέστροφας (Economidis *et al.*, 2000). Παράλληλα, επιχειρήθηκε ο εμπλουτισμός λιμνών και ρέοντων συστημάτων από τα οποία είχαν εκλείψει οι ιχθείς, είτε λόγω της υπεραλίευσής τους, είτε λόγω της εν γένει υποβάθμισης του περιβάλλοντος. Γενικά, η εισαγωγή ξενικών ειδών και η μεταφορά άγριων πληθυσμών από ένα οικοσύστημα σε ένα άλλο μέσα στην ίδια χώρα αποτελούν ευρέως διαδεδομένες μεθόδους για την ενίσχυση των εγχώριων ενδιαιτημάτων (Copp *et al.*, 2005, Welcomme & Bartley, 1998).

Σε κάθε όμως περίπτωση πριν την πραγματοποίηση τέτοιων εγχειρημάτων θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι αυτή η ανεξέλεγκτη εισροή ξενικών ειδών δύναται να επιφυλάσσει σοβαρούς κινδύνους για την ισορροπία των κατά τόπους οικοσυστημάτων. Μεταξύ των κινδύνων που εγκυμονούν συγκαταλέγονται: i) οι μεταβολές του ενδιαιτήματος, στο οποίο διαφοροποιούνται οι φυσικοχημικές του ιδιότητες, ii) ο ανταγωνισμός με τους άγριους πληθυσμούς για την εύρεση τροφής και την εξασφάλιση ζωτικού χώρου για ανάπτυξη, iii) η κυριαρχία στο οικοσύστημα, όπου ο υπερπληθυσμός κάποιων ξενικών ειδών οδηγεί στην κυριαρχία τους έναντι

των άγριων πληθυσμών, iv) ο υβριδισμός, όπου διαταράσσει τη γενετική προσαρμογή των άγριων πληθυσμών και v) η μεταβολή του τροφικού πλέγματος, με την εξαφάνιση σημαντικών ειδών στην τροφική αλυσίδα του ενδιαιτήματος (Savini *et al.*, 2010).

Στην περίπτωση της ιριδίζουσας πέστροφας, αυτή τοποθετείται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας αποτελώντας κορυφαίο θηρευτή μέσα στο οικοσύστημα. Για το λόγο αυτό, κατά την εισβολή της ως ξενικό είδος στην Ευρώπη ενοχοποιείται ότι επέφερε σημαντικές μεταβολές στο τροφικό πλέγμα, όπως επίσης ότι υπήρξε θηρευτής των άγριων πληθυσμών (Oscoz *et al.*, 2005). Επιπλέον της θήρευσης των άγριων πληθυσμών, κατηγορείται ότι ευθύνεται και για την πρόκληση επιβλαβών συνεπειών μέσω του ανταγωνισμού για την εύρεση τροφής και ζωτικού χώρου για ανάπτυξη στο ενδιαίτημα, της διάδοσης ασθενειών (φορέας-ξενιστής) και της καταστροφής των σημείων απόθεσης των αυγών για γονιμοποίηση από γηγενή είδη πέστροφας (Landergren, 1999).

Η εισαγωγή της ιριδίζουσας πέστροφας στην Ελλάδα ακολούθησε τη γενικότερη τάση για αθρόα εισαγωγή ξενικών ειδών που επικρατούσε σε ολόκληρη την ευρωπαϊκή ήπειρο εκείνη την χρονική περίοδο (Copp *et al.*, 2005). Στις αρχές της δεκαετίας του 1950 και μη διενεργώντας περιβαλλοντικές μελέτες για την εκτίμηση των δυνητικών επιπτώσεων από μια τέτοια εισαγωγή στους γηγενείς φυσικούς πληθυσμούς, αυγά μεταφέρθηκαν από εκκολαπτήρια της Ελβετίας και με την αρωγή των κρατικών ιχθυογεννητικών σταθμών της Έδεσσας και του Λούρου, ιχθύδια προερχόμενα από εκείνα τα αυγά χρησιμοποιήθηκαν για τον εμπλουτισμό ολιγοτροφικών λιμνών και ρέοντων συστημάτων σε ολόκληρη την ελληνική επικράτεια. Παρά ταύτα, στις μέρες μας μόνο ένα μικρό μέρος από πληθυσμούς ιριδίζουσας πέστροφας υφίσταται σε λίμνες και ποταμούς προερχόμενη κυρίως από

διαφυγές παρακείμενων εντατικών εκτροφών, εξαιτίας του γεγονότος ότι η ιριδίζουσα πέστροφα αδυνατεί να αναπαραχθεί στο φυσικό ενδιαίτημα (Economidis *et al.*, 2000).

### **1.7 Εντατικές Εκτροφές Ιριδίζουσας Πέστροφας στην Ελλάδα**

Ταυτόχρονα, οι αρχικές προσπάθειες για τη δημιουργία και την ανάπτυξη εντατικών εκτροφών ιριδίζουσας πέστροφας στα εσωτερικά ύδατα ολόκληρης της ελληνικής επικράτειας ευοδώθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1960, αφού υποστηρίχθηκαν σε μέγιστο βαθμό από τους κατά τόπους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, οι οποίοι παρείχαν γόνο και τεχνογνωσία στις νεοσύστατες εκτροφές. Ωστόσο, έκτοτε δεν υφίσταται ουδεμία καταχωρημένη πληροφορία σχετικά με την εισαγωγή και την προέλευση γόνου στις εντατικές εκτροφές ιριδίζουσας πέστροφας ανά την Ελλάδα.

Εντούτοις, η δημιουργία και η ταχεία ανάπτυξη του κλάδου πέρα από τα αδιαμφισβήτητα σημαντικά οικονομικά οφέλη που απέφερε, πραγματοποιήθηκε άναρχα, δίχως κανένα χωροταξικό σχεδιασμό και απουσία περιβαλλοντικών μελετών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της ανισομέρειας, όσον αφορά στο χωροταξικό σχεδιασμό και την παντελή έλλειψη περιβαλλοντικών μελετών αποτελεί το γεγονός ότι οι μισές από τις εντατικές εκτροφές ιριδίζουσας πέστροφας που λειτουργούν στην Ελλάδα βρίσκονται εγκατεστημένες στην ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου, με τον ποταμό Λούρο να φιλοξενεί την πλειονότητα αυτών των μονάδων. Ο συνωστισμός μεγάλου αριθμού εντατικών εκτροφών στον ποταμό Λούρο έχει αρνητικές συνέπειες τόσο για την ποιότητα των υδάτων, όσο και για τον αυξανόμενο κίνδυνο μεταδόσεως ασθενειών, λόγω της εγγύτητας των εκτροφών μεταξύ τους. Παράλληλα, ένα μεγάλο μέρος, περίπου 25 μονάδες βρίσκεται εγκατεστημένο στη Μακεδονία, ενώ οι υπόλοιπες βρίσκονται κυρίως στη Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο.

## 2 ΜΥΪΚΟΣ ΙΣΤΟΣ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ

Αναμφίβολα, ο μυϊκός ιστός των ιχθύων αποτελεί ως τρόφιμο το προϊόν που προσελκύει και συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον του καταναλωτή. Γενικότερα, οι ιδιότητες του μυϊκού ιστού των ιχθύων και ειδικότερα της ιριδίζουσας πέστροφας ως ποικιλόθερμο είδος που διαβιεί σε κρύα νερά, διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τις ιδιότητες του μυϊκού ιστού των χερσαίων θερμόαιμων ειδών (Foegeding *et al.*, 1996). Κύριες διαφορές αποτελούν η μειωμένη ποσότητα συνδετικού ιστού στο μυϊκό ιστό των ιχθύων που περιέχει μόνο το 1/10 του κολλαγόνου του μυϊκού ιστού των θηλαστικών (Eskin, 1990), η μεταβολή των ιδιοτήτων του μυϊκού ιστού των ιχθύων σε σχέση με την ηλικία του ιχθύος (Archer *et al.*, 1998), καθώς και το γεγονός ότι ενώ στα χερσαία θερμόαιμα είδη η υφή του μυϊκού ιστού βελτιώνεται μετά τη θανάτωση, γενόμενη με το πέρασμα του χρόνου πιο χυμώδης, στους ιχθείς εξαρχής, η υφή του μυϊκού ιστού μετά τη θανάτωση τους είναι χυμώδης και σταδιακά υποβαθμίζεται μετατρέπόμενη σε μαλακή κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

Το σύνολο των βιοχημικών μεταβολών των πρωτεϊνών και των μη πρωτεϊνικών αζωτούχων ενώσεων που λαμβάνουν χώρα στο μυϊκό ιστό μετά τη θανάτωση του ιχθύος αποτελούν παράγοντες υποβάθμισης της ποιότητάς του (Venugopal *et al.*, 1996). Επιπρόσθετα, σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της ποιότητας του μυϊκού ιστού διαδραματίζουν η διατροφή του ιχθύος, ο τρόπος θανάτωσης σε συνάρτηση με το βαθμό καταπόνησής του, η θερμοκρασία και οι συνθήκες επεξεργασίας (Kristoffersen *et al.*, 2006, Kiessling *et al.*, 2004, Sigurgisladottir *et al.*, 2001, Sigholt *et al.*, 1997).

Όσον αφορά τη δυνατότητα του εκτροφέα να παρέμβει στην τελική διαμόρφωση της ποιότητας του μυϊκού ιστού, οι ιχθύες που προέρχονται από εντατικές εκτροφές πλεονεκτούν έναντι των ιχθύων που προέρχονται από την αλιεία,

καθώς είναι δυνατός σε μεγάλο βαθμό ο καθορισμός της ποιότητάς τους, μέσω του ελέγχου των συνθηκών εκτροφής (Haard, 1992).

## **2.1 Ποιότητα των φιλέτων ιριδίζουσας πέστροφας**

Τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη έχει καταγραφεί μια αύξηση της ζήτησης για μεγαλύτερου μεγέθους πέστροφες, οι οποίες ενδείκνυνται για την παραγωγή φιλέτων. Ειδικότερα, στην ευρωπαϊκή αγορά η τιμή λιανικής πώλησης του φιλέτου πέστροφας τον Απρίλιο του 2010 κυμαίνονταν στην τιμή των 6,50 Ευρώ (FAO, 2010). Επομένως, τα φιλέτα ιριδίζουσας πέστροφας παρουσιάζουν έντονο οικονομικό ενδιαφέρον, γεγονός το οποίο οι ελληνικές εκτροφές οφείλουν να εκμεταλλευτούν στοχεύοντας στην παραγωγή μεγάλου μεγέθους ιχθύων, κατάλληλων προς φιλετοποίηση.

## **2.2 Ο ρόλος των ελεύθερων αμινοξέων στην ποιότητα των φιλέτων της ιριδίζουσας πέστροφας**

Κύρια συνιστώσα της οσμής και της γεύσης τους αποτελούν τα ελεύθερα αμινοξέα καθορίζοντας σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα και την αποδοχή τους ως τελικού προϊόντος από τον καταναλωτή. Η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από φυσιολογικούς, περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες. Ειδικότερα στους φυσιολογικούς παράγοντες συγκαταλέγεται η ηλικία των ιχθύων (Haard, 1992), στους περιβαλλοντικούς η σκληρότητα του νερού (Buentello & Gatlin, 2002) και η ιχθυοπυκνότητα (Metusalach *et al.*, 2000), ενώ στους διατροφικούς η σύσταση της τροφής και ο κύκλος σίτισης των ιχθύων (Haard, 1992). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στο σχηματισμό των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων είναι κατά κύριο λόγο ο βαθμός απορρόφησης των αμινοξέων που παρέχονται μέσω



της διατροφής, η οξειδωση των αμινοξέων και η διάσπαση των πρωτεϊνών (Houlihan *et al.*, 1995).

Τα ελεύθερα αμινοξέα στο μυϊκό ιστό των ιχθύων προέρχονται από την απορρόφηση αμινοξέων μέσω της διατροφής και τον μεταβολισμό πρωτεϊνών και αμινοξέων στο μυϊκό ιστό του οργανισμού (Cowey & Walton, 1989). Τα ελεύθερα αμινοξέα, εκτός από τη διατροφή επηρεάζονται από τη γεωγραφική περιοχή και τους αβιοτικούς παράγοντες που επικρατούν στο περιβάλλον, την ηλικία και το μέγεθος των ιχθύων, τη γενετική ωριμότητα και την εποχή του έτους (Limin *et al.*, 2006). Όσο μεγαλύτερη είναι η ηλικία του ιχθύος, τόσο μεγαλύτερη είναι και η συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό του (Panigrahi *et al.*, 1979). Επομένως, καθοριστικό ρόλο στη συγκέντρωσή τους διαδραματίζουν οι ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν σε κάθε εκτροφή. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με αποτελέσματα μελετών, οι εντατικά εκτρεφόμενοι πληθυσμοί ιχθύων συνήθως περιέχουν μικρότερες ποσότητες ελεύθερων αμινοξέων συγκριτικά με τους γηγενείς πληθυσμούς.

Το σύνολο των ελεύθερων αμινοξέων που απαντώνται στο μυϊκό ιστό των ιχθύων είναι L-εναντιομερή. Η γεύση που προσδίδουν τα ελεύθερα αμινοξέα L-αλανίνη, L-γλυκίνη, L-θρεονίνη, L-βαλίνη, L-σερίνη, L-λυσίνη και η L-προλίνη είναι γλυκιά με εξαιρέσεις τις L-βαλίνη, L-λυσίνη και L-προλίνη που εμφανίζουν στο τέλος μια πικρή μετάγευση και την L-serine που εμφανίζει στο τέλος μια πικρόξινη μετάγευση (Haefeli & Glaser, 1990).

### 3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ *Oncorhynchus mykiss* ΣΕ ΕΝΤΑΤΙΚΕΣ ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

#### 3.1 Εισαγωγή

Παρά το γεγονός ότι η ιριδίζουσα πέστροφα αποτελεί το κυριότερο εκτρεφόμενο είδος στα εσωτερικά ύδατα της Ελλάδας, εντούτοις η πραγματοποίηση βιβλιογραφικής ανασκόπησης αποκάλυψε την καθολική έλλειψη πληθυσμιακών γενετικών μελετών. Ομοίως, σε ολόκληρη την Ευρώπη μόνο δύο μεγάλες πληθυσμιακές γενετικές μελέτες αναφορικά με το είδος έχουν λάβει χώρα, η μία μελετώντας τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς της βόρειας και ανατολικής Ευρώπης (Φινλανδία, Δανία, Σουηδία, Νορβηγία, Εσθονία, Πολωνία) (Gross *et al.*, 2007), ενώ η δεύτερη διεξήχθη σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς στη Νορβηγία (Glover, 2008).

Αναλυτικότερα, η δημοσίευση των Gross *et al.* (2007) εξέτασε τον πολυμορφισμό σε 10 απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Single Sequence Repeats – SSR) 12 εκτρεφόμενων γενεαλογικών σειρών ιριδίζουσας πέστροφας στη βόρεια και ανατολική Ευρώπη σε σύγκριση με δύο γηγενείς πληθυσμούς από τον Καναδά και της εκτρεφόμενης γενεαλογικής σειράς ιριδίζουσας πέστροφας «Shasta» στην Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, η πλειονότητα των ευρωπαϊκών πληθυσμών παρουσίασε όμοια επίπεδα πολυμορφισμού με τον εκτρεφόμενο πληθυσμό «Shasta» της Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Το γεγονός της ομοιότητας με τον εκτρεφόμενο πληθυσμό προερχόμενο από την Καλιφόρνια και όχι με τους άγριους πληθυσμούς του Καναδά ενισχύει την υπόθεση ότι η πλειονότητα των εκτρεφόμενων πληθυσμών ανά την υφήλιο προέρχεται από ένα εκκολαπτήριο στον ποταμό Μακλάουντ της Καλιφόρνια των ΗΠΑ, το οποίο είχε ιδρυθεί ήδη από το

1879 (Gall & Crandell, 1992). Αντίθετα, μόνο δύο πληθυσμοί που εκτρέφονται στην Πολωνία παρουσίασαν σημαντικά μικρότερο πολυμορφισμό και υψηλά επίπεδα ενδογαμίας. Παράλληλα, οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί της βόρειας Ευρώπης παρουσίασαν μέτρια διαφοροποίηση συγκριτικά με εκείνους της ανατολικής Ευρώπης.

Ο Glover (2008) εκτίμησε τη γενετική ποικιλότητα, με τη βοήθεια 12 απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, σε εννέα εντατικές εκτροφές ιριδιζουσας πέστροφας εγκατεστημένες στα νορβηγικά φιόρντ και σύγκρινε τα αποτελέσματα της ανάλυσης με δείγματα ιριδιζουσας πέστροφας, τα οποία είχαν διαφύγει από εντατικές εκτροφές στο φυσικό ενδιαίτημα, προσπαθώντας να ταυτοποιήσει την προέλευση των διαφυγόντων ιχθύων. Η διενέργεια της μελέτης αυτής, όχι μόνο αποκάλυψε σημαντική γενετική ποικιλότητα τόσο ενδοπληθυσμιακά, όσο και μεταξύ των εκτρεφόμενων πληθυσμών της Νορβηγίας, αλλά συνάμα κατάφερε να προσδιορίσει την προέλευση των διαφυγόντων ιχθύων.

Αντίθετα, οι περισσότερες πληθυσμιακές γενετικές μελέτες έχουν διεξαχθεί στις Η.Π.Α, τόσο σε άγριους (Nielsen & Fountain, 1999, McCusker *et al.*, 2000, Narum *et al.*, 2004, Aguilar & Garza, 2006, Deiner *et al.*, 2007, Williams *et al.*, 2007, Heath *et al.*, 2008), όσο και σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς ιριδιζουσας πέστροφας (Gregg *et al.*, 2001, Silverstein *et al.*, 2004, Hauser *et al.*, 2006, Johnson *et al.*, 2007, Camarena-Rosales *et al.*, 2008).

Αναφορικά με τις πληθυσμιακές γενετικές μελέτες σε άγριους πληθυσμούς, οι Nielsen & Fountain (1999) ανέφεραν την εύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορών στη συχνότητα των αλληλόμορφων μεταξύ δύο αναπαραγωγικών τύπων της ανάδρομης ιριδιζουσας πέστροφας στον ποταμό Middle Fork Eel της βόρειας Καλιφόρνια. Επιπλέον, οι McCusker *et al.* (2000) εκτίμησαν τη γενετική ποικιλότητα

στο μιτοχονδριακό DNA του είδους *O. mykiss* στη βόρεια Αμερική με τη χρήση της τεχνικής ανίχνευσης πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLPs) αποκαλύπτοντας την ύπαρξη δύο πλήρως διαχωρισμένων φυλογενετικά μιτοχονδριακών γενεών. Επιπρόσθετα, οι Nagum *et al.* (2004) ανίχνευσαν τη γενετική δομή του «ανάδρομου» και «χερσαίου» τύπου ιριδίζουσας πέστροφας μεταξύ δύο κύριων ρεόντων συστημάτων, του ποταμού Walla Walla και του ποταμού Touchet. Τέλος, οι Heath *et al.* (2008) εξέτασαν τη γενετική ποικιλότητα των δύο τύπων ιριδίζουσας πέστροφας που απαντώνται σε πέντε ρέοντα συστήματα της Βρετανικής Κολούμπια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας οι δύο τύποι ιριδίζουσας πέστροφας διαφοροποιήθηκαν σε γενετικό επίπεδο, βάσει των πολυμορφισμών που ανιχνεύτηκαν στη γοναδοτροπίνη και το εσώνιο p53.

Όσον αφορά τους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς στις ΗΠΑ, οι Silverstein *et al.* (2004) εξέτασαν τρεις γενεαλογικές σειρές εκτρεφόμενης ιριδίζουσας πέστροφας σε 10 απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, εκτιμώντας τη μεταξύ τους γενετική ποικιλότητα. Το σύνολο και των τριών γενεαλογικών σειρών διέφεραν μεταξύ τους, γεγονός που ερμηνεύεται, καθώς και οι τρεις πληθυσμοί είχαν διαφορετική προέλευση και χρησιμοποιούνταν στην ιχθυοκαλλιέργεια εδώ και δέκα γενεές. Επιπρόσθετα, οι Hauser *et al.* (2006) μελέτησαν με τη χρήση οκτώ απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, αφού πρωτύτερα είχε προηγηθεί εμπλουτισμός του παραπόταμου Forks Creek (Φορκς Κρικ) με ενήλικα άτομα του ανάδρομου είδους ιριδίζουσας πέστροφας από το τοπικό εκκολαπτήριο, τους απογόνους και προσδιόρισαν την προέλευσή τους κατατάσσοντάς τους, είτε στον εκτρεφόμενο, είτε στον άγριο πληθυσμό. Στη δυτική Βιρτζίνια, οι Johnson *et al.* (2007) χρησιμοποίησαν 12 απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες για την εκτίμηση της γενετικής

ποικιλότητας μεταξύ ετήσιων εκτρεφόμενων γενεαλογικών σειρών της ιριδίζουσας πέστροφας αποκαλύπτοντας την ύπαρξη γενετικής δομής για αρκετές γενεές.

Τέλος, οι Camarena Rosales *et al.* (2008) μελέτησαν με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων τον πολυμορφισμό και τη σύνθεση των απλότυπων του mtDNA αναφορικά με εκτρεφόμενους πληθυσμούς που προέρχονταν από τέσσερα εκκολαπτήρια εγκατεστημένα στο βορειοδυτικό Μεξικό. Η μελέτη περιελάμβανε την περιοχή του mtDNA μεταξύ του κυτοχρώματος β και του βρόχου εκτόπισης (περίπου 2.354 ζεύγη βάσεων). Συνολικά ανιχνεύθηκαν οκτώ απλότυποι υποδηλώνοντας τη γενετική ποικιλότητα των εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας, οι οποίοι πιθανόν να προέρχονται από περισσότερες από μία γενεαλογικές σειρές. Επιπλέον, οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί παρουσίασαν περισσότερους μοναδικούς απλότυπους συγκριτικά με τους γηγενείς πληθυσμούς.

Παρά το γεγονός ότι η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί τον τομέα ζωικής παραγωγής με την ταχύτερη και αλματώδη ανάπτυξη, οι χρησιμοποιούμενοι ιχθυοπληθυσμοί δεν έχουν μελετηθεί ακόμη επαρκώς σε γενετικό επίπεδο. Οι γενετικές πληθυσμιακές μελέτες χρησιμοποιώντας μοριακούς δείκτες στο μιτοχονδριακό DNA έχουν σημαντική συνεισφορά στην ορθή διαχείριση των εντατικών εκτροφών (Billington, 2003) και στην αποκάλυψη γενετικών συσχετίσεων μεταξύ των διάφορων εκτρεφόμενων γενεών. Η χρήση τους στην ιχθυοκαλλιέργεια έγινε ευρεία μεταξύ των γενετιστών, εξαιτίας του γεγονότος ότι κατάφεραν να επιτύχουν την ανίχνευση σημαντικών γενετικών διαφοροποιήσεων ανάμεσα σε εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς (Sajedi *et al.*, 2003, Camarena-Rosales *et al.*, 2008).

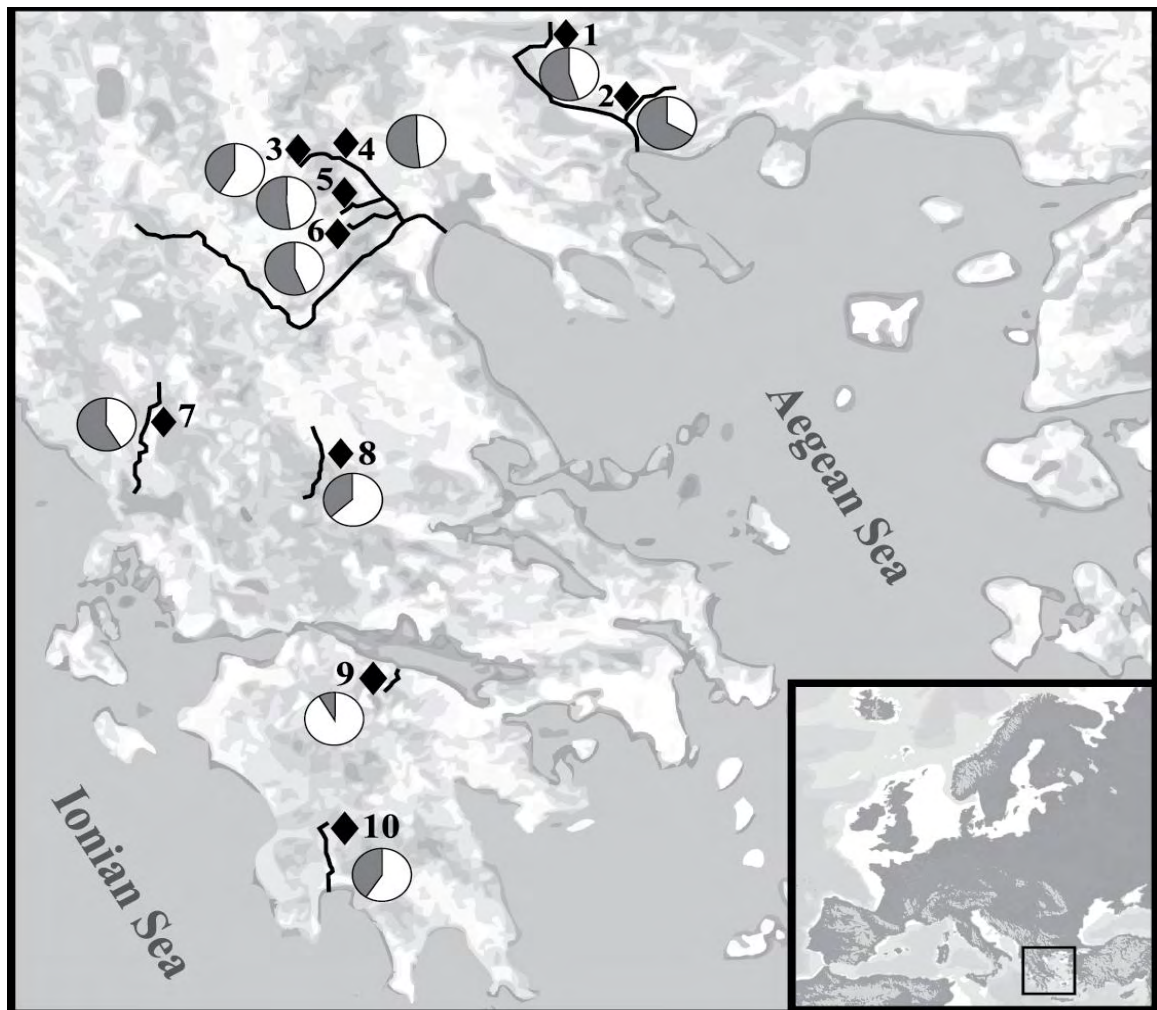
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι α) η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας στο μιτοχονδριακό DNA με τη χρήση της μοριακής τεχνικής PCR-RFLP, τόσο

ενδοπληθυσμιακά, όσο και μεταξύ των πληθυσμών της ιριδίζουσας πέστροφας *O. mykiss* που προέρχονται από διάφορες εντατικές εκτροφές που βρίσκονται εγκατεστημένες σε ολόκληρη την ελληνική επικράτεια και β) η καταγραφή των τρεχουσών σύνθετων απλότυπων βάσει της ανάλυσης του μιτοχονδριακού DNA σε κάθε εντατική εκτροφή. Με την επίτευξη του παραπάνω διττού στόχου θα διευκολυνθεί η εφαρμογή αιεφορικών σχεδίων διαχείρισης που θα προάγουν και θα προστατεύουν τη διατήρηση της βιοποικιλότητας, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εν γένει υποβάθμιση του οικοσυστήματος.

### 3.2 Υλικά και Μέθοδοι

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο δειγματοληψίας συνολικά 564 ενήλικα άτομα ιριδίζουσας πέστροφας, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), ηλικίας 20 μηνών, συλλέχθηκαν με τη χρήση απόχης από 10 ιχθυοκαλλιέργειες που βρίσκονται εγκατεστημένες σε εννέα διαφορετικά ρέοντα συστήματα αντιπροσωπευτικά της ελληνικής επικράτειας (Άγκιστρο  $n=59$ , Άγιος Ιωάννης  $n=57$ , Εδεσσαίος1  $n=59$ , Εδεσσαίος2  $n=57$ , Αράπιτσα  $n=55$ , Τριπόταμος  $n=55$ , Λούρος  $n=54$ , Μέγδοβας  $n=57$ , Κράθης  $n=54$ , Μπουρνιά  $n=57$ ) (Εικ. 1). Η διαδικασία προέβλεπε τη διεξαγωγή μίας, μοναδικής δειγματοληψίας σε κάθε εντατική εκτροφή, η οποία διενεργήθηκε στις 10π.μ. σε μη αναπαραγωγική περίοδο κατά τη διάρκεια του μήνα Μαΐου, το έτος 2013. Όσον αφορά την υφιστάμενη υποδομή των εντατικών εκτροφών αυτή αποτελείται από παράλληλες, ορθογώνιες δεξαμενές κατασκευασμένες από σκυρόδεμα, βάθους 1,0m. Ανάμεσα στα επιλεγθέντα ρέοντα συστήματα συγκαταλέγονται ο παραπόταμος του Στρυμόνα, Αγγίτης στο Άγκιστρο Σερρών και το ρέμα του Αγίου Ιωάννη Σερρών αντιπροσωπευτικά της ανατολικής βορείου Ελλάδας, ο ποταμός Εδεσσαίος στην Έδεσσα του νομού Πέλλας, ο ποταμός

Αράπιτσα στον Άγιο Νικόλαο Νάουσας του νομού Ημαθίας και ο ποταμός Τριπόταμος στους Γεωργιανούς Ημαθίας αντιπροσωπευτικοί της κεντρικής βορείου Ελλάδας, ο ποταμός Λούρος στο νομό Ιωαννίνων αντιπροσωπευτικός της δυτικής Ελλάδας, ο ποταμός Μέγδοβας στο νομό Καρδίτσας αντιπροσωπευτικός της κεντρικής Ελλάδας, όπως επίσης ο ποταμός Κράθης στον οικισμό Περιστέρας του νομού Αχαΐας και η πηγή Μπουρνιά στην Κάτω Μέλπεια του νομού Μεσσηνίας αντιπροσωπευτικοί της νότιας Ελλάδας. Οι ιχθείς έπειτα από την εξαλίευσή τους τοποθετήθηκαν άμεσα σε φορητό ψυγείο, έως ότου μεταφερθούν αυθημερόν στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βόλο, όπου και σε πρώτη φάση έλαβε χώρα η φωτογράφισή τους, η φιλετοποίησή τους και έπειτα η λήψη μικρής ποσότητας μυϊκού ιστού από το ίδιο σημείο του φιλέτου για κάθε δείγμα και η τοποθέτησή της σε πλαστικά φιαλίδια eppendorf 1,5ml με σκοπό την εξαγωγή DNA. Τα δείγματα μυϊκού ιστού παρέμειναν στους -80°C μέχρι τη στιγμή της εξαγωγής του DNA.



**Εικόνα 1.** Χάρτης της Ελλάδας με τα σημεία δειγματοληψίας των εντατικών εκτροφών ιριδιζουσας πέστροφας. Κάθε εντατική εκτροφή κωδικοποιείται με αριθμημένο ρόμβο [1. Άγκιστρο ( $n = 59$ ),  $41^{\circ}22'50.39''\text{N}$   $23^{\circ}26'18.15''\text{E}$  / 2. Άγιος Ιωάννης ( $n = 57$ ),  $41^{\circ}5'57.30''\text{N}$   $23^{\circ}35'15.15''\text{E}$  / 3. Εδεσσαίος1 ( $n = 59$ ),  $40^{\circ}48'30.94''\text{N}$   $22^{\circ}0'57.25''\text{E}$  / 4. Εδεσσαίος2 ( $n = 57$ ),  $40^{\circ}48'25.00''\text{N}$   $22^{\circ}1'19.12''\text{E}$  / 5. Αράπιτσα ( $n = 55$ ),  $40^{\circ}36'47.46''\text{N}$   $22^{\circ}2'49.15''\text{E}$  / 6. Τριπόταμος ( $n = 55$ )  $40^{\circ}28'26.68''\text{N}$   $22^{\circ}10'37.37''\text{E}$  / 7. Λούρος ( $n = 54$ ),  $39^{\circ}25'39.82''\text{N}$   $20^{\circ}50'43.41''\text{E}$  / 8. Μέγδοβας ( $n = 57$ ),  $39^{\circ}13'1.53''\text{N}$   $21^{\circ}44'43.74''\text{E}$  / 9. Κράθης ( $n = 54$ ),  $38^{\circ}1'4.07''\text{N}$   $22^{\circ}15'5.36''\text{E}$  / 10. Μπουρνιά ( $n = 57$ ),  $37^{\circ}19'54.77''\text{N}$   $21^{\circ}55'53.43''\text{E}$ . Οι κυκλικές πίτες υποδηλώνουν την ύπαρξη δύο θεωρούμενων ομάδων Κ (λευκό, γκρι χρώμα) σε κάθε ιχθυοπληθυσμό, όπως αποκαλύφθηκε από την ανάλυση STRUCTURE.



### 3.2.1 Εξαγωγή DNA

Η εξαγωγή του DNA περιελάμβανε τα εξής στάδια:

Η ληφθείσα ποσότητα μυϊκού ιστού τεμαχίστηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού σε μικρότερα κομμάτια και τοποθετήθηκε σε πλαστικό φιαλίδιο erpendorf 1,5 ml. Έπειτα προστέθηκαν σε αυτό 500  $\mu$ l TNE με ακόλουθη σύσταση (TNE = 0,1 M NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA), 100  $\mu$ l NaCl 1M, 100  $\mu$ l Tris 1 M, 50  $\mu$ l SDS 10 % και 10  $\mu$ l Πρωτεΐνάση K 20 mg ml<sup>-1</sup>. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55°C για χρονικό διάστημα τεσσάρων ωρών (4h). Σε αυτό το σημείο έλαβε χώρα εκχύλιση με πρόσθεση ίσου όγκου εξισορροπημένης φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25V:24V:1V και τοποθετήθηκαν για ανακίνηση σε ρότορα για 10min. Ακολούθησε φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 13.000 rpm, λήψη του υπερκείμενου και τοποθέτηση σε νέα πλαστικά φιαλίδια erpendorf 1,5 ml. Η διαδικασία της εκχύλισης επαναλήφθηκε και έπειτα από την ολοκλήρωση στα νέα πλαστικά φιαλίδια erpendorf 1,5 ml προστέθηκαν 1ml απόλυτης αιθανόλης (100%) και 15  $\mu$ l CH<sub>3</sub>COONa 3 M. Αμέσως μετά τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -4°C για 30 min και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 10 min. Ακολούθως η υπερκείμενη ποσότητα απορρίφθηκε και μόνο το ίζημα παρέμεινε στα πλαστικά φιαλίδια τύπου erpendorf. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ξήρανση των δειγμάτων σε κενό αέρος για 15-20 min με σκοπό την απομάκρυνση των εναπομειναντων ιχνών αιθανόλης, τα οποία δρουν ως αναστολείς της δράσης των ενζύμων. Τέλος, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 50  $\mu$ l TE (10 mM Tris – 1mM EDTA, pH = 8) ρυθμιστικού διαλύματος.

Η εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του γονιδιωματικού DNA ανά δείγμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου, αφού τοποθετήθηκε μία σταγόνα (1,5 μl) δείγματος για την ανάλυση (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Έπειτα από την ανάλυση και με τη διενέργεια κατάλληλων αραιώσεων, η συγκέντρωση γονιδιωματικού DNA στο σύνολο των δειγμάτων ρυθμίστηκε στα 100 ng μl<sup>-1</sup>.

Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό το σύνολο των δειγμάτων *O. mykiss* συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση που διενεργήθηκε με την πέψη τμημάτων του mtDNA που ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP). Τα τμήματα-στόχοι του mtDNA που πολλαπλασιάστηκαν με την τεχνική της PCR ήταν τρία DNA γονίδια και δύο tRNA γονίδια περιλαμβάνοντας στην ανάλυση περισσότερα από 5.500 ζεύγη βάσεων DNA από τα περίπου 16.600 ζεύγη βάσεων που απαρτίζουν το συνολικό mtDNA της ιριδίζουσας πέστροφας.

Ειδικότερα, για τον πολλαπλασιασμό ολόκληρης της περιοχής που περιελάμβανε το βρόχο εκτόπισης, τα γονίδια tRNA της προλίνης και της θρεονίνης, αντίστοιχα και το κυτόχρωμα b (2.096 ζεύγη βάσεων) χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ζεύγος εκκινήτων που σχεδιάστηκε λαμβάνοντας υπόψη τις κατατεθειμένες αλληλουχίες του είδους *O. mykiss* στη βάση γενετικών δεδομένων GenBank:

CR<sub>1</sub>: 5'-CAACTACAAGAACCTAAT-3' και

CR<sub>2</sub>: 5'-TAACAGGAACATAAGGAT-3',

Για την ενίσχυση ολόκληρων των γονιδίων ND-5 και ND-6 (2.500 ζεύγη βάσεων) χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών, όπως σχεδιάστηκε από τους Sajedi *et al.* (2003):

ND<sub>L</sub>: 5'-TCATCCATTGGTCTTAGGAACC-3' και

ND<sub>G</sub>: 5'-CAACGGTGGTTCTTCAAGTCA-3'

Τέλος, για τον πολλαπλασιασμό τμήματος 948 ζευγών βάσεων των γονιδίων ΑΤΡάση VI και κυτοχρώματος c οξειδάσης 3 (COIII) έγινε χρήση των παρακάτω εκκινητών που σχεδιάστηκαν λαμβάνοντας υπόψη τις κατατεθειμένες αλληλουχίες του είδους *O. mykiss* στη βάση γενετικών δεδομένων GenBank:

ΑΤ<sub>1</sub>: 5'-GCAGGYATTACTACTCTA-3' και

ΑΤ<sub>2</sub>: 5'-AGGTAAAGCTGAAGTGTA-3'.

Στο σύνολο των δειγμάτων, ο πολλαπλασιασμός των τμημάτων του mtDNA έλαβε χώρα σε τελικό όγκο αντιδράσεων 50 μl που περιείχε κάθε φορά:

- 100 ng μl<sup>-1</sup> DNA
- 10 μl 5xPCR ρυθμιστικό διάλυμα
- 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 200 μM από κάθε dNTP
- 30 pmol από κάθε εκκινητή και
- 2 μονάδες Taq DNA πολυμεράση (Kapa Biosystems, USA)

Στο τέλος προσθέτονταν ποσότητα αποστειρωμένου νερού μέχρι τον τελικό όγκο των 50  $\mu\text{l}$ .

Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων-στόχων του mtDNA πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή θερμοκυκλοποιητή MJ Research PTC-200 Gradient Thermal Cycler (BIORAD, USA). Ειδικότερα:

- Σε πρώτη φάση η θερμοκρασία ορίστηκε στους  $95^{\circ}\text{C}$  για χρονικό διάστημα 5 min συντελώντας στην αποδιάταξη των κλώνων του DNA
- Ακολούθως ορίστηκε επίσης στους  $95^{\circ}\text{C}$  για 1 min για την αποδιάταξη των κλώνων του DNA
- Έπειτα ορίστηκε τους  $56,2^{\circ}\text{C}$  όσον αφορά τους εκκινητές CR<sub>1</sub> και CR<sub>2</sub> ή στους  $60^{\circ}\text{C}$  όσον αφορά τους εκκινητές ND<sub>G</sub> και ND<sub>L</sub> ή στους  $62^{\circ}\text{C}$  όσον αφορά τους εκκινητές AT<sub>1</sub> και AT<sub>2</sub> για 1 min με σκοπό τη σύνδεση των εκκινητών στο DNA-στόχο,
- Επιπρόσθετα, ορίστηκε τους  $72^{\circ}\text{C}$  για 1.5 min, ώστε να επιμηκυνθούν οι νεοσύστατες αλυσίδες του DNA,
- Τα προαναφερόμενα στάδια-κύκλοι επαναλήφθηκαν διαδοχικά 34 φορές,
- Το τελικό στάδιο περιελάμβανε την τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους  $72^{\circ}\text{C}$  για 10 min.

Η επαλήθευση του επιτυχούς πολλαπλασιασμού του DNA-στόχου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2 % που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) σε 90 V εμβαπτισμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα 1 x TAE (Tris base-Acetic acid-EDTA). Τα διάφορα γενετικά πρότυπα που

προέκυπταν παρατηρούνταν και φωτογραφίζονταν υπό υπεριώδες φως με τη συσκευή φωτογράφισης MiniBIS Pro Gel (BioSystematica, United Kingdom).

### 3.2.2 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα των τμημάτων-στόχων του mtDNA που πολλαπλασιάστηκαν με την PCR

Αρχικά, ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα προϊόντων της PCR, αποτελούμενο από πέντε άτομα από κάθε πληθυσμό εξετάστηκε για την ύπαρξη πολυμορφισμών χρησιμοποιώντας τις παρακάτω 10 ενδονουκλεάσες περιορισμού: *AluI*, *AvaII*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *MspI*, *NciI*, *RsaI*, *TaqI*. Στόχος ήταν η ανίχνευση τουλάχιστον δύο γενετικών προτύπων για κάθε ένζυμο. Η πέψη των προϊόντων της PCR με τα παραπάνω περιοριστικά ένζυμα πραγματοποιήθηκε με επώαση σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της NEBiolabs (New England Biolabs Inc., USA) σε αντιδράσεις τελικού όγκου 10 μl που περιείχαν 5 μl PCR-προϊόν, 1 μl κατάλληλου 1x ρυθμιστικού διαλύματος και 0,2 μl του αντίστοιχου περιοριστικού ενζύμου. Έπειτα, ο διαχωρισμός των τμημάτων του mtDNA λόγω της πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα επετεύχθη με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2 % που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), εμβαπτισμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE (Tris base-Acetic acid-EDTA). Η παρατήρηση και η φωτογράφιση των διάφορων γενετικών προτύπων έλαβε χώρα υπό υπεριώδες φως. Η προκαταρκτική αυτή εξέταση των προϊόντων της πέψης των περιοριστικών ενζύμων αποκάλυψε ότι τρεις ενδονουκλεάσες περιορισμού εμφάνιζαν πολυμορφισμό στην περιοχή βρόχος εκτόπισης-tRNA-Pro-tRNA-Thr-κυτόχρωμα b, έξι ενδονουκλεάσες περιορισμού εμφάνιζαν πολυμορφισμό στην περιοχή ND5/6 και μία ενδονουκλεάση περιορισμού παρουσίαζε πολυμορφισμό στην περιοχή ATPase VI-COIII. Επομένως, συνολικά 10 περιοριστικά ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια των περαιτέρω αναλύσεων.

Στη συνέχεια το γενετικό πρότυπο κάθε ατόμου που προέκυψε από τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων μεταφράστηκε σε σύνθετους απλότυπους.

### 3.2.3 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων

Αρχικά για το συμβολισμό των διαφορετικών προτύπων που προέκυψαν από τη χρήση περιοριστικών ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν κεφαλαία γράμματα, με σκοπό το σχηματισμό σύνθετων απλότυπων. Επομένως, οι σύνθετοι απλότυποι αποτελούνταν από επτά κεφαλαία γράμματα, ένα για κάθε περιοριστικό ένζυμο. Προκαταρκτικά, όλοι οι γενετικοί τόποι ελέγχθηκαν για ενδεχόμενη ανισορροπία σύνδεσης σύμφωνα με τα τεστ ακριβείας του Fisher με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού προγράμματος ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Επιπλέον, η γενοτυπική αφθονία,  $R$  (λόγος  $G/N$ ) κάθε πληθυσμού εκτιμήθηκε, όπου το  $G$  συμβολίζει τον αριθμό των διαφορετικών σύνθετων απλότυπων και το  $N$  συμβολίζει τον αριθμό των εξεταζόμενων δειγμάτων. Στη συνέχεια, το λογισμικό πρόγραμμα ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των δεικτών σταθεροποίησης  $F_{ST}$  (Wright, 1951) που εκφράζει τη γενετική διαφοροποίηση, όπως επίσης για την εκτίμηση της απλοτυπικής διαφοροποίησης  $h$  (Nei, 1987), της νουκλεοτιδικής διαφοροποίησης  $\pi$  (Nei & Tajima, 1981) και του δείκτη  $D$  του Tajima (Tajima, 1989). Ο δείκτης  $D$  του Tajima εκτιμήθηκε με σκοπό να προσδιορίσει τις αποκλίσεις από την ουδέτερη θεωρία των εκτροπών μεταλλακτικής ισορροπίας. Όμοια, το λογισμικό πρόγραμμα ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των κατά ζεύγος διαφοροποιήσεων λαμβάνοντας υπόψη τις συχνότητες εμφάνισης των σύνθετων απλότυπων (Raymond & Rousset, 1995). Παράλληλα, έγινε χρήση της ιεραρχικής ανάλυσης μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) για τα σημεία κοπής με τη χρήση του στατιστικού

λογισμικού πακέτου ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Οι δείκτες σταθεροποίησης και οι συνιστώσες παραλλακτικότητας συνδυάστηκαν 10.000 φορές εφαρμόζοντας τη διόρθωση Bonferroni (Rice, 1989).

Επιπρόσθετα, υλοποιήθηκε η Μπαγεσιανή ανάλυση σε ομάδες (Bayesian cluster analysis) με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος STRUCTURE v. 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000) παρέχοντας τη δυνατότητα για την κατηγοριοποίηση των ατόμων κάθε πληθυσμού σε K ομάδες, σύμφωνα με τους συντελεστές συμμετοχής τους σε κάθε ομάδα. Οι παράμετροι «μήκος συνεχούς λειτουργίας» (burn-in length) και «μήκος προσομοίωσης» (simulation length) ορίστηκαν στις 500.000 και 1.000.000 επαναλήψεις, αντίστοιχα, μετά τη διεξαγωγή δοκιμών, όπου τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις έλαβαν χώρα για κάθε τιμή του K ( $1 \leq K \leq 17$ ). Η κατάλληλη τιμή για το K επιλέχθηκε βάσει του λογισμικού προγράμματος HARVESTER, το οποίο παρέχει την πιθανότητα για κάθε τιμή του K (Earl & Von Holdt, 2012).

Η απεικόνιση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας έλαβε χώρα με τη διεξαγωγή της Ανάλυσης Κύριων Συντεταγμένων (PCoA, Jombart *et al.*, 2009) χρησιμοποιώντας την εκτίμηση της τυπικής γενετικής απόστασης Nei ανά ζεύγος πληθυσμών με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού πακέτου GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Οι ανά ζεύγος γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας υπολογίστηκαν ως Ευκλείδειες χιλιομετρικές (Km) αποστάσεις. Παράλληλα, το Mantel test με 1000 συνδυασμούς (Mantel, 1967, Mantel & Valand, 1970) εφαρμόστηκε με σκοπό να εξετάσει τη σχέση μεταξύ των γεωγραφικών χιλιομετρικών αποστάσεων (Km) και των γενετικών αποστάσεων Nei

μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Οι φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στους σύνθετους απλότυπους που προέκυψαν εξετάστηκαν υπολογίζοντας ένα δίκτυο απλότυπων με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος NETWORK 4.6.1.2 (Fluxus Technology Ltd, www.fluxus-engineering.com). Οι Median Joining (MJ) και ο Maximum Parsimony (MP) αλγόριθμοι χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του κατάλληλου δικτύου απλότυπων (Bandelt *et al.*, 1999).

Τέλος, η κατανομή των εξεταζόμενων ατόμων ιριδίζουσας πέστροφας στις 10 εντατικές εκτροφές βάσει των σύνθετων απλότυπων τους έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004). Η Μπαγεσιανή μέθοδος (Ranalla & Mountain, 1997) εφαρμόστηκε και η τιμή του ορίου ορίστηκε ίση με 0,05.

### **3.3 Αποτελέσματα**

Σύμφωνα με την παρατήρηση των προτύπων που προέκυψαν από τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, έξι ένζυμα (*AluI*, *AvaII*, *HaeIII*, *HinfI*, *RsaI*, *Taq<sup>α</sup>I*) εμφάνισαν πολυμορφισμό στην περιοχή του μιτοχονδριακού DNA ND5/6, τρία ένζυμα (*AvaII*, *HinfI*, *TaqI*) στην περιοχή CR-tRNA-Pro-tRNA-Thr-Cytb και ένα ένζυμο (*HaeIII*) στην περιοχή ATPase-VI-COIII, αντίστοιχα. Τέσσερεις ενδονουκλεάσες περιορισμού (*AluI*, *HaeIII*, *RsaI*, *Taq<sup>α</sup>I*) αναγνωρίζουν τετρανουκλεοτιδικές αλληλουχίες και δύο ενδονουκλεάσες περιορισμού (*AvaII* and *HinfI*) αναγνωρίζουν πεντανουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Εξαιτίας του γεγονότος, ότι κατά την προκαταρκτική επεξεργασία των πολυμορφισμών που προέκυψαν από τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *AluI*, *AvaII* and *RsaI*, αναφορικά με την περιοχή του μιτοχονδριακού DNA ND5/6 διεγνώσθη ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των



εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών για τα συγκεκριμένα σημεία κοπής, αποφασίστηκε η εξαίρεσή τους από τους σύνθετους απλότυπους. Επομένως, οι σύνθετοι απλότυποι απαρτίζονταν από 10 ενδονουκλεάσες περιορισμού αντιπροσωπεύοντας 23 σημεία κοπής. Τα διαφορετικά πρότυπα που προέκυψαν από τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων είναι διαθέσιμα σε κάθε περίπτωση. Η ανάλυση των σημείων κοπής αποκάλυψε την παρουσία 24 διαφορετικών απλότυπων ανάμεσα στους εξεταζόμενους ιχθείς και οι σχετικές συχνότητες των απλότυπων στους 10 εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς ιριδίζουσας πέστροφας παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 1 οι τιμές των σχετικών συχνοτήτων των απλότυπων κυμαίνονταν από 0,03 έως 0,52 ανάμεσα στους διαφορετικούς εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη τις σχετικές συχνότητες των απλότυπων, διακρίνεται ότι ο αριθμός των διαφορετικών σύνθετων γενοτύπων σε κάθε πληθυσμό κυμαίνονταν από 4 έως 11. Επιπρόσθετα, αξιοσημείωτο είναι ότι μόνο ο σύνθετος γενότυπος 8 (4,17%) εμφανίζονταν σε όλους τους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Ειδικότερα, ανάμεσα στους 24 σύνθετους γενοτύπους, τρεις ανιχνεύθηκαν αποκλειστικά στους πληθυσμούς του Αγκίστρου και του Εδεσσαίου2, δύο στην Αράπιτσα και ένας στους πληθυσμούς του Εδεσσαίου1 και του Λούρου, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, τόσο η μέγιστη μέση απλοτυπική διαφοροποίηση  $h = 0,87 \pm 0,04$ , όσο και η μέγιστη νουκλεοτιδική διαφοροποίηση  $\pi = 0,36 \pm 0,19$  εμφανίστηκαν στον δεύτερο εκτρεφόμενο πληθυσμό του Εδεσσαίου ποταμού (Εδεσσαίος2).

**Πίνακας 1.** 24 σύνθετοι γενότυποι (απλότυποι) αποτελούμενοι από κεφαλαία γράμματα βάσει των RFLP πέψεων έξι περιοριστικών ενδονουκλεασών (*AluI*, *AvaII*, *HaeIII*, *HinfI*, *RsaI*, *Taq<sup>α</sup>I*) στα γονίδια ND5/6, ενός περιοριστικού ενζύμου (*HaeIII*) στην ΑΤΡάση VI-COIII και τρία περιοριστικά ένζυμα (*AvaII*, *HinfI*, *Taq<sup>α</sup>I*) στην περιοχή βρόχος εκτόπισης – Κυτόχρωμα β του mtDNA, σχετικές συχνότητες των απλότυπων ανά πληθυσμό, μέγεθος δείγματος (*N*), γενοτυπική αφθονία (*R*), απλοτυπική διαφοροποίηση (*h*) και νουκλεοτιδική διαφοροποίηση (*π*), περιλαμβάνοντας την τυπική απόκλιση (*SD*) και τον δείκτη Tajima's D (ns = μη στατιστικώς σημαντικός).

Απλότυπος	Σύνθετος γενότυπος	Άγκιστρο	Αγ.Ιωάννης	Εδεσσαίος 1	Εδεσσαίος 2	Αράπιτσα	Τριπόταμος	Λούρος	Μέγδοβας	Κράθης	Μπουρνιά
1	BBBBBAABBB				0,04	0,04					
2	BBBBABABAB					0,04			0,04		
3	BBBBAAACAB					0,04					
4	BBBBAAABAB							0,04			
5	BABBBAAABAB							0,04		0,12	
6	BABABABBBB			0,03							
7	BABABAABBB		0,07	0,45	0,26	0,32	0,04	0,09	0,07	0,17	0,15
8	BABABAABAB	0,45	0,22	0,15	0,07	0,08	0,40	0,25	0,44	0,46	0,19
9	BABABAABAA	0,03									
10	BABAABABAB				0,04						
11	BABAAAAABAB		0,04		0,04						
12	BABAAAAAAB					0,04		0,04	0,07	0,17	0,25
13	ABBBBAABBB				0,07						
14	ABBBABABAB	0,32	0,19	0,25	0,26	0,24	0,04	0,04	0,19		0,15
15	ABBBAAACAB		0,11	0,03		0,08					
16	ABBBAAACAA	0,03									
17	ABBBAAABAB	0,07	0,30	0,03	0,10	0,04	0,52	0,5	0,04		0,07
18	ABBAABABAB		0,07			0,04					
19	ABBAAAAABAB					0,04					
20	ABABAABBBAB	0,07									
21	ABABAABBAA	0,03		0,03	0,04				0,11	0,08	0,15

<b>22</b>	ABABAAABAA			0,03						0,04	
<b>23</b>	AABABAABAB				0,04			0,04			
<b>24</b>	AABAABABAB				0,04						
	<i>N</i>	59	57	59	57	55	55	54	57	54	57
	<i>R=G/N</i>	0,24	0,26	0,28	0,41	0,44	0,16	0,29	0,30	0,21	0,26
	<i>h</i>	0,71± 0,06	0,83± 0,04	0,74± 0,06	0,87± 0,04	0,85± 0,05	0,59± 0,06	0,7± 0,08	0,77± 0,07	0,74± 0,07	0,86± 0,03
	<i>π</i>	0,32± 0,17	0,26± 0,14	0,31± 0,17	0,31± 0,17	0,31± 0,17	0,21± 0,12	0,22± 0,12	0,32± 0,17	0,18± 0,10	0,36± 0,19
	<b>Tajima's D</b>	1,40 <sup>ns</sup>	1,76 <sup>ns</sup>	0,96 <sup>ns</sup>	1,27 <sup>ns</sup>	2,34 <sup>ns</sup>	1,49 <sup>ns</sup>	0,97 <sup>ns</sup>	1,04 <sup>ns</sup>	-0,73 <sup>ns</sup>	1,64 <sup>ns</sup>

Όσον αφορά τη γενεοτυπική αφθονία  $R$ , η μικρότερη τιμή  $R = 0,16$  ανιχνεύθηκε στον εκτρεφόμενο πληθυσμό του Τριπόταμου ποταμού, ενώ η υψηλότερη τιμή  $R = 0,44$  ανιχνεύθηκε στον εκτρεφόμενο πληθυσμό του ποταμού Αράπιτσα στον Άγιο Νικόλαο Ημαθίας. Ο δείκτης  $D$  Tajima ήταν μη στατιστικώς σημαντικός στο σύνολο των εξεταζόμενων πληθυσμών (Πίνακας 1). Επίσης, τα αποτελέσματα του Mantel test εμφάνισαν συντελεστή συσχέτισης  $R^2 = 0,2093$ . Αναφορικά με τις ανά ζεύγη  $F_{ST}$  τιμές, η μέγιστη τιμή 0,3496 ανευρέθηκε μεταξύ των πληθυσμών του Άγιου Ιωάννη και του Κράθι ( $P < 0,001$ , Πίνακας 2), με στατιστικώς σημαντική ( $P < 0,001$ ) μέση τιμή  $F_{ST}$  ίση με 0,056 (Πίνακας 3).

**Πίνακας 2.** Τα ακριβή τεστ διαφοροποίησης ανά ζεύγη των εντατικά εκτρεφόμενων ιριδίζουσων πεστρόφων παρουσιάζονται στην κάτω διαγώνιο και οι ανά ζεύγη τιμές ( $F_{ST}$ ) των ιχθυοπληθυσμών, μετά από την εφαρμογή της διόρθωσης Bonferroni παρουσιάζονται στην επάνω διαγώνιο (\*\* $P < 0,001$ , \* $P \leq 0,01$ , \*  $P < 0,05$ ).

	<b>AGS</b>	<b>AIO</b>	<b>1ED</b>	<b>2ED</b>	<b>ARA</b>	<b>TRI</b>	<b>LOU</b>	<b>MEG</b>	<b>KRA</b>	<b>BOU</b>
<b>AGS</b>	-	0,0102	0,0235	-0,0116	-0,0018	0,0125	0,0164	-0,0090	0,2026***	0,0125
<b>AIO</b>	0,0063**	-	0,1008*	0,0117	0,0139	0,0130	0,0045	0,0799	0,3496***	0,0688*
<b>1ED</b>	0,0001***	0,0019**	-	0,0006	0,0017	0,0643	0,0695	-0,0085	0,1076*	0,0285
<b>2ED</b>	0,0004***	0,0335*	0,4279	-	-0,0246	0,0251	0,0249	0,0150	0,2316***	0,0359
<b>ARA</b>	0,0003***	0,0341*	0,8031	0,6936	-	0,0306	0,0240	0,0141	0,2143***	0,0269
<b>TRI</b>	0,0001***	0,0674	0,0001***	0,0001***	0,0001***	-	-0,0381	0,0370	0,2641***	0,0445
<b>LOU</b>	0,0001***	0,1512	0,0001***	0,0010**	0,0001**	0,7687	-	0,0443	0,2742***	0,0375
<b>MEG</b>	0,2641	0,0077**	0,0029**	0,0124**	0,0077**	0,0004***	0,0006***	-	0,0860**	-0,0084
<b>KRA</b>	0,0001***	0,0001***	0,0001***	0,0001***	0,0003**	0,0001***	0,0005***	0,0935	-	0,1252*
<b>BOU</b>	0,0009***	0,002**	0,0083**	0,0211*	0,0257*	0,0001***	0,001**	0,2283	0,0475*	-

Επεξήγηση συντομεύσεων - AGS: Άγκιστρο, AIO: Αγ. Ιωάννης, 1ED: Εδεσσαίος1, 2ED: Εδεσσαίος2, ARA: Αράπιτσα, TRI: Τριπόταμος, LOU: Λούρος, MEG: Μέγδοβας, KRA: Κράθης, BOU: Μπουρνιά.

**Πίνακας 3.** Ιεραρχική ανάλυση μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA) διαπληθυσμιακά και ενδοπληθυσμιακά. Ο δείκτης  $F_{ST}$  αντιπροσωπεύει το άθροισμα της παραλλακτικότητας μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών και της παραλλακτικότητας ενδοπληθυσμιακά διαιρούμενο με τη συνολική παραλλακτικότητα (\*\* $P \leq 0,001$ ).

	<b>Βαθμοί ελευθερίας</b>	<b>Άθροισμα τετραγώνων</b>	<b>Συντελεστές παραλ/τητας</b>	<b>Ποσοστό παραλ/τητας</b>	<b>Δείκτης <math>F_{ST}</math></b>
<b>Διαπληθυσμιακά</b>	9	75,453	0,19456 Va	5,65	$F_{ST}=0,056^{***}$
<b>Ενδοπληθυσμιακά</b>	554	825,422	3,24969 Vb	94,35	
<b>Σύνολο</b>	563	900,875	3,44426		

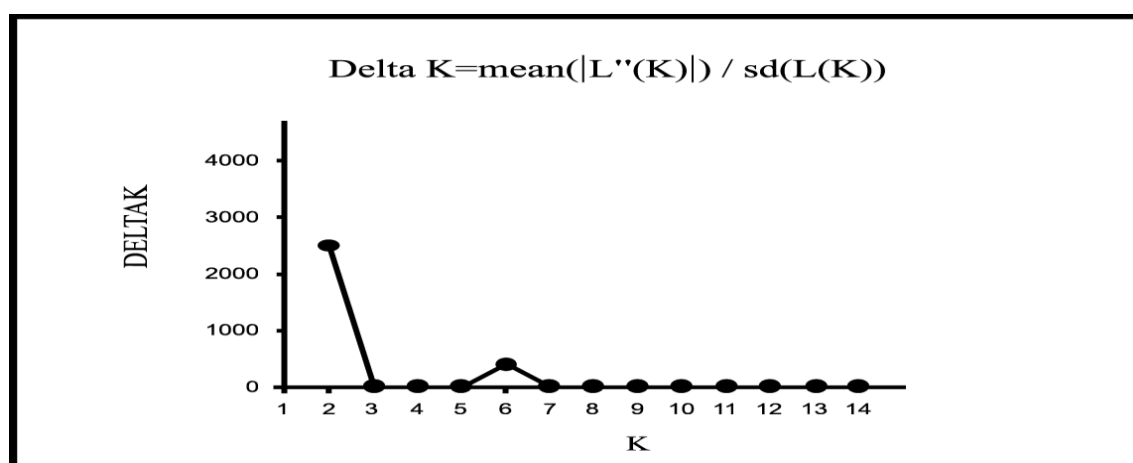
Ο παγκόσμιος ακριβής έλεγχος της διαφοροποίησης των δειγμάτων βάσει των συχνοτήτων των απλότυπων εμφανίστηκε στατιστικώς σημαντικός ( $P < 0,0001$ ). Λαμβάνοντας υπόψη τα τεστ διαφοροποίησης μεταξύ των δειγμάτων όλων των ζευγών διακρίνεται ότι η πλειονότητα των πληθυσμών ανά ζεύγη παρουσιάζουν κατανομή της συχνότητας των απλότυπων που διαφέρει στατιστικώς σημαντικά (Πίνακας 2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της AMOVA, παρατηρήθηκε ότι μόνο το 5,65% της συνολικής γενετικής ποικιλότητας οφείλονταν σε διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, ενώ το σημαντικότερο ποσοστό 94,35% οφείλονταν σε διαφορές ενδοπληθυσμιακά (Πίνακας 3).

Με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος STRUCTURE v. 2.3 αποκαλύφθηκε η ύπαρξη δύο πιθανών ομάδων ( $K = 2$ , Εικ. 2) μεταξύ των 10 εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών, με το άθροισμα των συντελεστών συμμετοχής κάθε ατόμου στις δύο ομάδες να είναι ίσο με 1. Το σύνολο των εντατικών εκτροφών

ιριδίζουσας πέστροφας που εξετάστηκαν απαρτίζονταν από άτομα που ανήκαν και στις δύο ομάδες. Εντούτοις, τα ποσοστά των δύο ομάδων στους εξεταζόμενους πληθυσμούς διέφεραν σημαντικά.

Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι μόνο στον εκτρεφόμενο πληθυσμό του ποταμού Κράθη στη νότια Ελλάδα το συντριπτικό ποσοστό (91,67%) των εξεταζόμενων ατόμων ανήκαν στην πρώτη ομάδα. Αντίστοιχα, ο εκτρεφόμενος πληθυσμός του Αγίου Ιωάννη Σερρών παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό ατόμων (66,67%) που ανήκαν στη δεύτερη ομάδα (Εικ. 1).

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διενέργεια του ελέγχου κατανομής, η ακρίβεια του ελέγχου κατανομής αποδείχτηκε εξαιρετικά υψηλή (92%) για τον εκτρεφόμενο πληθυσμό στον ποταμό Τριπόταμο στους Γεωργιανούς του Νομού Ημαθίας, μέτρια για τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς Εδεσσαίος<sup>1</sup> (44,83%) και μικρή για τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς του Αγίου Ιωάννη (25,93%) και της πηγής Μπουρνιά (18,52%) στην Πελοπόννησο.

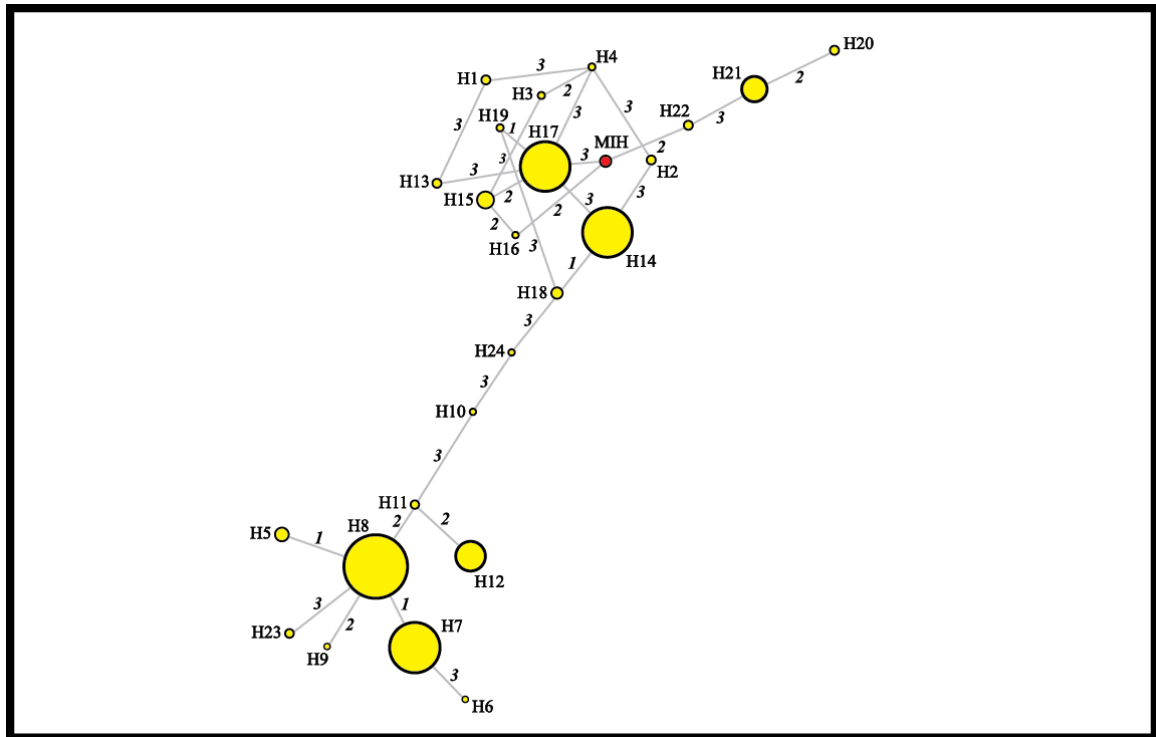


**Εικόνα 2.** Επιλογή του κατάλληλου αριθμού ομάδων (K) λαμβάνοντας υπόψη την υψηλότερη κορυφή, η οποία αντιπροσωπεύει τον πιο πιθανό αριθμό ομάδων (K=2) σύμφωνα με την Μπαγεσιανή θεωρία.

Όσον αφορά τα επιμέρους ποσοστά των δύο ομάδων που παρατηρήθηκαν στους εξεταζόμενους πληθυσμούς με υψηλότερο ποσοστό κατανομής στην πρώτη ομάδα, ο εκτρεφόμενος πληθυσμός του ποταμού Μέγδοβα αποτελούνταν από 62,96 % άτομα της πρώτης ομάδας και 37,04% της δεύτερης. Οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί Εδεσσαίος<sup>2</sup> στη βόρεια Ελλάδα και Μπουρνιά στη νότια Ελλάδα παρουσίασαν όμοια ποσοστά ατόμων που κατανεμήθηκαν στην πρώτη (59,26%) και στη δεύτερη ομάδα (40,74%), αντίστοιχα. Επίσης, ο εκτρεφόμενος πληθυσμός Εδεσσαίος<sup>1</sup> εμφάνισε ελαφρώς χαμηλότερο ποσοστό ατόμων στην πρώτη ομάδα (58,62%) συγκριτικά με τον πληθυσμό της γειτονικής εντατικής εκτροφής Εδεσσαίος<sup>2</sup>.

Αντίθετα, οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί που παρατηρήθηκαν να έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό από τα άτομά τους στην δεύτερη ομάδα ήταν εκτός από τον Άγιο Ιωάννη (66,67%), ο πληθυσμός στο Λούρο ποταμό (58,33%), ο πληθυσμός στον Τριπόταμο ποταμό (56%) και ο πληθυσμός στο Άγκιστρο Σερρών (55%). Όσον αφορά τον εκτρεφόμενο πληθυσμό στον ποταμό Αράπιτσα, αυτός αποτελείται από σχεδόν όμοια ποσοστά τόσο της δεύτερης (52%), όσο και της πρώτης ομάδας (48%). Το συνολικό ποσοστό των δύο ομάδων σε ολόκληρη την ελληνική επικράτεια ήταν 54,17% αναφορικά με τα εξεταζόμενα άτομα που ανήκαν στην πρώτη ομάδα, ενώ το 45,83% εκείνων που ανήκαν στη δεύτερη ομάδα.

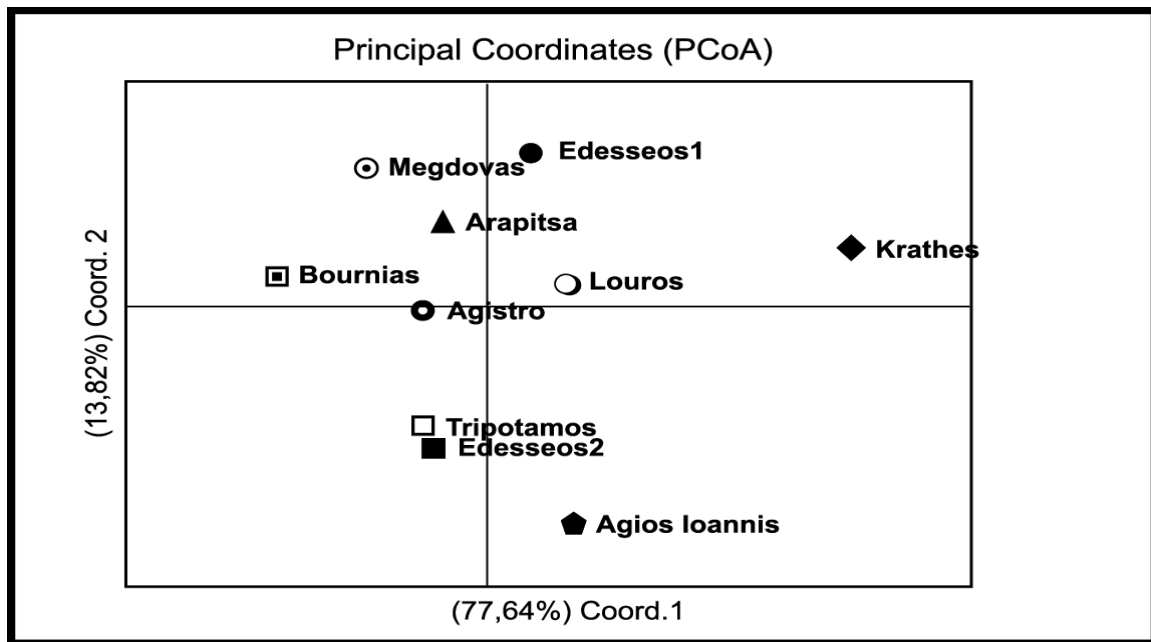
Όμοια με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το λογισμικό STRUCTURE 2.3, η χρήση του NETWORK 4.6.1.2 κατέδειξε ότι το σύνολο των εξεταζόμενων εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας προέρχονταν από δύο γενεές (Εικ. 3).



**Εικόνα 3.** Median – Joining δίκτυο που υποδεικνύει τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στους απλότυπους του mtDNA των 10 εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας. Κάθε απλότυπος (H1-H24) αντιπροσωπεύεται από ένα κίτρινο κύκλο, ενώ ο ενδιάμεσος απλότυπος (MIH) αντιπροσωπεύεται από ένα κόκκινο κύκλο. Το βήμα μετάλλαξης μεταξύ των απλότυπων χαρακτηρίζεται από αριθμούς σε *italics*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Ανάλυσης Κύριων Συντεταγμένων (PCoA), οι διαφορές σε γενετικό επίπεδο μεταξύ των 10 εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας απεικονίστηκαν στους άξονες (Εικ. 4).





**Εικόνα 4.** Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας. Η διαφοροποίηση ως προς τον άξονα της Συντεταγμένης 1 είναι ίση με 77,64%, ενώ 13,82% ως προς τον άξονα της Συντεταγμένης 2.

Ο πρώτος άξονας αποτύπωσε το μεγαλύτερο ποσοστό της παραλλακτικότητας 77,64%, σε σύγκριση με τον δεύτερο και τρίτο άξονα που παρουσίασαν χαμηλότερα ποσοστά 13,82% και 8,54%, αντίστοιχα. Οι ιδιοτιμές που προέκυψαν ήταν 0,608 για τον πρώτο άξονα, 0,108 για το δεύτερο άξονα και 0,067 για τον τρίτο άξονα εκφράζοντας το επίπεδο της παραλλακτικότητας σε κάθε άξονα.

Παρατηρώντας το δισδιάστατο διάγραμμα της Ανάλυσης Κυρίων Συντεταγμένων (Εικ. 4) διακρίνεται ότι οι εντατικά εκτρεφόμενοι πληθυσμοί ιριδίζουσας πέστροφας κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες ως προς τις συντεταγμένες 1 και 2. Οι τέσσερις ομάδες που προέκυψαν αποτελούνταν από τους πληθυσμούς Αράπιτσα – Μέγδοβας – Μπουρνιά / Εδεσσαίος 1 – Λούρος – Κράθης / Άγκιστρο – Τριπόταμος – Εδεσσαίος 2 / Άγιος Ιωάννης. Εντούτοις, η διενέργεια του

Mantel test δεν αποκάλυψε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των απλότυπων και των γεωγραφικών αποστάσεων ( $R^2 = 0,1891$ ,  $P > 0,05$ ).

Αναφορικά με τις κατά ζεύγη  $F_{ST}$  τιμές, η μέση τιμή τους ήταν ίση με 0,067. Τέλος, η μεγαλύτερη τιμή 0,205 παρατηρήθηκε μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών στο ρέμα του Άγιου Ιωάννη και στον ποταμό Κράθη ( $P < 0,001$ ), ενώ αντίστοιχα η χαμηλότερη τιμή 0,042 παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών Αγκίστρου και Εδεσσαίος2 ( $P < 0,05$ ).

### 3.4 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν περισσότερα από 5.500 ζεύγη βάσεων από τα συνολικά 16.600 ζεύγη βάσεων του μιτοχονδριακού DNA βάσει της μοριακής τεχνικής PCR-RFLP, έτσι ώστε να αξιολογηθεί ο βαθμός της γενετικής παραλλακτικότητας τόσο ενδοπληθυσμιακά, όσο και μεταξύ των διάφορων εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας που βρίσκονται εγκατεστημένες σε ολόκληρη την Ελληνική επικράτεια. Ειδικότερα, εκτός από τα σύμπλοκα ND5-6 και τις περιοχές Control region-Cytb στο σύνολό τους, το τμήμα 948 ζευγών βάσεων της ΑΤΡάσης VI-COIII περιοχών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της ιριδίζουσας πέστροφας δεν είχε ουδέποτε εξεταστεί πρωτύτερα με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών. Εντούτοις, η μελέτη των παραπάνω περιοχών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς (Katsares *et al.*, 2003), καθώς και σε συγγενικά είδη, όπως είναι η *S. trutta* (Giuffra *et al.*, 1994, Apostolidis *et al.*, 2008) επιβεβαίωσαν την ύπαρξη πολυμορφισμού.

Η διεξαγωγή της ανάλυσης της πληθυσμιακής δομής αναφορικά με τους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς σε ολόκληρη την Ελλάδα αποκάλυψε ότι οι

απλότυποι διακρίνονται σε δύο κεντρικούς κλάδους (Εικ. 1, Εικ. 3). Η συνύπαρξη απλότυπων και από τους δύο κλάδους σε όλους τους πληθυσμούς ενδέχεται να υποδηλώνει την ύπαρξη κοινής γονιδιακής δεξαμενής. Σύμφωνα με την ανάλυση της πληθυσμιακής δομής μόνο ο πληθυσμός του Κράθη ποταμού εμφανίστηκε να διαθέτει συντριπτικό ποσοστό ιχθύων που άνηκαν στον 1<sup>ο</sup> κλάδο, σε πλήρη αντίθεση με όλους τους υπόλοιπους πληθυσμούς που διέθεταν μια μίξη και των δύο κλάδων. Επιπρόσθετα, ο βαθμός του πολυμορφισμού ήταν μικρότερος, όπως ήταν αναμενόμενο, σε σύγκριση με την ποικιλομορφία που καταγράφεται στους φυσικούς πληθυσμούς. Τα χαμηλά επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας στους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς και το γεγονός ότι βρίσκονται σε αντιδιαστολή με ότι παρατηρείται στους φυσικούς πληθυσμούς είναι κοινό φαινόμενο αν λάβει κανείς υπόψη μια πλειάδα πληθυσμιακών γενετικών μελετών, οι οποίες έχουν διενεργηθεί τόσο σε εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς, όσο και σε φυσικούς πληθυσμούς άλλων ειδών, όπως είναι ο κοινός κυπρίνος (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) (Zhou *et al.*, 2004, Kohlmann *et al.*, 2005) και ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*, Linnaeus 1758) (Norris *et al.*, 1999).

Εκτός από τον πληθυσμό του Τριπόταμου, η μεγάλη πλειοψηφία των εξεταζόμενων εκτρεφόμενων πληθυσμών παρουσίασαν σημαντικά υψηλή απλοτυπική ποικιλότητα και σχετικά χαμηλή νουκλεοτιδική ποικιλότητα, υποδηλώνοντας ότι σχεδόν το σύνολο των απλότυπων σχετίζονταν μεταξύ τους. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται σε ποικιλότητα η οποία προήλθε από προγενέστερους πληθυσμούς, ενισχύοντας συγχρόνως το ενδεχόμενο ύπαρξης γόνου με κοινή γονιδιακή δεξαμενή. Ειδικότερα, στην περίπτωση του πληθυσμού του Τριπόταμου η απλοτυπική ποικιλότητα ήταν αρκετά χαμηλή σε σχέση με τη νουκλεοτιδική ποικιλότητα, εκφράζοντας την ύπαρξη λίγων απλότυπων που παρουσιάζουν υψηλή

παραλλακτικότητα μεταξύ τους. Αυτό το γεγονός μπορεί να είναι χαρακτηριστικό διάφορων απλότυπων προερχόμενων από πολλαπλές περιοχές. Στην παρούσα μελέτη, η πλειονότητα των τιμών Tajima's  $D$  (Tajima, 1989) ήταν στατιστικώς μη σημαντικά θετικές, υποδηλώνοντας ότι υφίσταται έλλειμμα σε χαμηλής συχνότητας μεταλλάξεις σε σύγκριση με τις προσδοκίες μας, σύμφωνα με τη θεωρία της ουδετερότητας. Αντίθετα, μόνο ο πληθυσμός του ποταμού Κράθη εμφάνισε στατιστικώς μη σημαντικές αρνητικές τιμές, εκφράζοντας την ύπαρξη αφθονίας σε χαμηλής συχνότητας μεταλλάξεις λαμβάνοντας υπόψη τη θεωρία της ουδετερότητας.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης AMOVA αποκάλυψαν ότι μόνο 5,65% της συνολικής γενετικής ποικιλότητας ερμηνεύεται από την παραλλακτικότητα που ανιχνεύθηκε ανάμεσα στους πληθυσμούς. Εντούτοις, σημαντική παραλλακτικότητα με ποσοστό 94,35% ανιχνεύθηκε ενδοπληθυσμιακά. Επιπλέον, το επίπεδο διαφοροποίησης μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας κυμαίνονταν από -0,0381 έως την αρκετά υψηλή τιμή 0,3496 με μέση τιμή  $F_{ST}$  ίση με 0,056. Σε άλλες ευρωπαϊκές μελέτες, όπως στη μελέτη που διενεργήθηκε ανάμεσα σε 12 ευρωπαϊκές εκτρεφόμενες γενιές ιριδίζουσας πέστροφας (Gross *et al.*, 2007) και στη μελέτη εννέα εντατικών εκτροφών ιριδίζουσας πέστροφας στη Νορβηγία (Glover, 2008), οι αναφερόμενες ανά ζεύγη  $F_{ST}$  τιμές κυμαίνονταν από 0,04 έως 0,36 με μέση τιμή  $F_{ST}$  ίση με 0,14 και από 0,001 έως 0,127 με μέση τιμή  $F_{ST}$  ίση με 0,053, αντίστοιχα. Από τις τιμές που ανευρέθηκαν στην παρούσα εργασία διαφαίνεται ότι βρίσκονται μεταξύ του εύρους τιμών που παρατηρήθηκαν σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Επιπρόσθετα, στη δυτική Αυστραλία οι εκτρεφόμενες ιριδίζουσες πέστροφες παρουσίασαν  $F_{ST}$  τιμές παρόμοιες με εκείνες των ευρωπαϊκών χωρών (Gross *et al.*, 2007), κυμαινόμενες από 0,016 έως 0,404 με μέση τιμή  $F_{ST}$  ίση με 0,19 (Ward *et al.*, 2003). Αντίθετα, σύμφωνα με διενεργούμενες

μελέτες τόσο στις Η.Π.Α, όσο και στο βόρειο Ιράν το εύρος των  $F_{ST}$  τιμών ήταν χαμηλό κυμαινόμενο από 0 έως 0,048 με μέση τιμή  $F_{ST}$  0,028 στις Η.Π.Α (Silverstein *et al.*, 2004, Johnson *et al.*, 2007) και από 0,062 έως 0,080 με μέση τιμή  $F_{ST}$  0,072 στο βόρειο Ιράν, αντίστοιχα (Yousefian *et al.*, 2012).

Παρ' όλα αυτά η γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς στις περισσότερες ανά ζεύγη συγκρίσεις ήταν στατιστικώς σημαντική μετά και την εφαρμογή της διόρθωσης Bonferroni, είτε για τις κατανομές των απλοτυπικών συχνοτήτων (ακριβή τεστ), είτε για τις ανά ζεύγη  $F_{ST}$  τιμές και η συνολική γενετική ποικιλότητα οφείλονταν σε σημαντικό βαθμό στην ύπαρξη ποικιλότητας ενδοπληθυσμιακά παρά στην ύπαρξη ποικιλότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τις αναφερόμενες μέσες  $F_{ST}$  τιμές σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς στη Νορβηγία και στο Ιράν, σε σύγκριση με τις μέσες  $F_{ST}$  τιμές των εκτρεφόμενων πληθυσμών στην Ελλάδα, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι στους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς ιριδιζουσας πέστροφας στην Ελλάδα υφίστανται παρόμοια επίπεδα πολυμορφισμού. Εντούτοις, διαφαίνεται ότι τόσο οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί της δυτικής Αυστραλίας, όσο και εκείνοι των βόρειων και ανατολικών χωρών παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη διαφοροποίηση σε σύγκριση με τους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς στην ελληνική επικράτεια.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCoA (Εικ. 4), οι πρώτες δύο συνιστώσες ερμήνευσαν το 81,2% της παραλλακτικότητας. Εντούτοις, το δισδιάστατο γράφημα δεν αποκάλυψε τη διάκριση των πληθυσμών σύμφωνα με τις γεωγραφικές τους αποστάσεις. Επιπλέον, τα αποτελέσματα του Mantel τεστ υποδήλωσαν τη μη στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των γεωγραφικών αποστάσεων και των γενετικών αποστάσεων κατά Nei.

### 3.5 Συμπέρασμα

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια εκτίμησης της γενετικής ποικιλότητας, τόσο διαπληθυσμιακά μεταξύ των διάφορων εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας σε ολόκληρη την Ελληνική επικράτεια, όσο και ενδοπληθυσμιακά σε κάθε εκτροφή. Το ποσοστό της συνολικής γενετικής ποικιλότητας που παρατηρήθηκε, εμφανίστηκε ενδοπληθυσμιακά παρά ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς. Το ποσοστό γενετικής ποικιλότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς σε σύγκριση με τη συνολική παρατηρούμενη ποικιλότητα αντανακλά την πανμιξία δύο αρχικών πληθυσμών (γενεών), υπογραμμίζοντας την ύπαρξη μιας κοινής δεξαμενής γονιδίων σε όλες τις εντατικές εκτροφές ιριδίζουσας πέστροφας στην Ελλάδα. Αυτό το γεγονός ενισχύεται και από το δίκτυο απλότυπων που δημιουργήθηκε και αποκάλυψε την ύπαρξη δύο αρχικών κλάδων σε όλο το φάσμα των εντατικών εκτροφών. Τέλος, αυτή η προσπάθεια θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για περαιτέρω εφαρμογή μοριακών δεικτών για το χαρακτηρισμό της ιριδίζουσας πέστροφας, όπως η συσχέτιση ετεροζυγωτικής φόρμας – HFC συμβάλλοντας στην υιοθέτηση καινοτόμων τεχνικών εντατικής εκτροφής από τις εταιρείες που δραστηριοποιούνται στον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας εσωτερικών υδάτων.

#### **4. ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΕΝΤΑΤΙΚΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟ ΜΥΪΚΟ ΤΟΥΣ ΙΣΤΟ**

##### **4.1 Εισαγωγή**

Ο τομέας της εκτροφής ιριδιζουσας πέστροφας στην Ελλάδα αριθμεί έξι μεγάλες εντατικές εκτροφές (>100 τόνων) και 110 μεσαίου και μικρότερου μεγέθους. Το 2014, η συνολική παραγωγή ανέρχονταν στους 1.611,4 τόνους ετησίως (ELSTAT, 2014). Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια στην Ευρώπη έχει καταγραφεί μια αύξηση της ζήτησης για μεγαλύτερου μεγέθους πέστροφες, οι οποίες ενδείκνυνται για την παραγωγή φιλέτων. Συνήθως, στην ευρωπαϊκή αγορά οι ιριδιζουσες πέστροφες πωλούνται είτε ολόκληρες, είτε ως φιλέτα ανάλογα με τις προτιμήσεις του καταναλωτικού κοινού. Παρ' όλα αυτά, πρόσφατα στη Γαλλία υπήρξε έντονη αυξητική τάση από 9% σε 65% για ιριδιζουσες πέστροφες με βάρος μεγαλύτερο των 300g, εξαιτίας του γεγονότος ότι σημειώθηκε αξιοσημείωτη στροφή στην προτίμηση των καταναλωτών με αύξηση της αγοράς των φιλέτων της (Agreste, 2009). Ένα ενδεικτικό εύρος τιμών αναφορικά με τα φιλέτα της ιριδιζουσας πέστροφας στην ευρωπαϊκή αγορά είναι περίπου 5,10 EUR/Kg για ιχθύες βάρους 200-300g και μεταξύ 15-17,8 EUR/Kg για ιχθύες βάρους 1Kg, αντίστοιχα (EUMOFA, 2013). Επομένως, τα φιλέτα ιριδιζουσας πέστροφας παρουσιάζουν έντονο οικονομικό ενδιαφέρον, γεγονός το οποίο οι ελληνικές εντατικές εκτροφές οφείλουν να εκμεταλλευτούν στοχεύοντας στην παραγωγή μεγάλου μεγέθους ιχθύων, κατάλληλων προς φιλετοποίηση, με έμφαση στη συνεχή βελτίωση της ποιότητας.

Η ποιότητά τους δύναται να επηρεαστεί, τόσο από τις ακολουθούμενες πρακτικές εκτροφής (Hwang *et al.*, 2000), όσο και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε εντατική εκτροφή (Pottinger, 2001). Γι' αυτό το λόγο οι διαφοροποιήσεις στη σύσταση των φιλέτων σε ελεύθερα αμινοξέα, έπειτα από την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους θα μπορούσε να συμβάλει στην ιχνηλασιμότητα των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας διαφορετικής προέλευσης. Αυτό ενισχύεται και από μια πρόσφατη μελέτη, η οποία επιβεβαίωσε σημαντικές διαφορές στο προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων σε εκτρεφόμενα μύδια ανάλογα με την γεωγραφική τους προέλευση (Fuentes *et al.*, 2009).

Ο ρόλος των ελεύθερων αμινοξέων είναι εξαιρετικά καθοριστικός σε αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως είναι η οσμωρύθμιση και η ρυθμιστική ικανότητα του μυϊκού ιστού των ιχθύων (Van Waarde, 1988). Ειδικότερα, επιτυγχάνουν τη ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης στους κυτταρικούς ιστούς και με την ύπαρξη παραγώγων της ιμιδαζόλης, όπως είναι η ιστιδίνη συμβάλουν στη ρυθμιστική ικανότητα του μυϊκού ιστού των ιχθύων (Suyama *et al.*, 1986). Επιπρόσθετα, ο ρόλος τους στην απρόσκοπτη λειτουργία του νευρικού συστήματος είναι εξαιρετικής σημασίας, καθώς δρουν ως υποστρώματα σε βασικές ενζυματικές αντιδράσεις και ρυθμίζουν τον όγκο των αζωτούχων ενώσεων (Anaya & D'Aniello, 2006). Επιπλέον, όχι μόνο αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας (Van Marrewijk & Ravestein, 1974), αλλά ευθύνονται επίσης και για τη χαρακτηριστική γεύση των θαλασσινών τροφών, γεγονός που τους προσδίδει το πλεονέκτημα της χρησιμοποίησής τους ως δείκτες για την αξιολόγηση της γεύσης των ιχθύων (Fuke, 1994).

Το είδος και η συγκέντρωση των αμινοξέων που βρίσκονται δεσμευμένα σε πρωτεΐνες του μυϊκού ιστού των ιχθύων δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές, καθώς



δεν επηρεάζονται από τη διατροφή τους. Αυτό συμβαίνει, διότι οι πρωτεΐνες του μυϊκού ιστού συντίθενται αποκλειστικά βάσει της γενετικής πληροφορίας του DNA και δεν επηρεάζονται από τα παρεχόμενα επίπεδα πρωτεΐνης στα σιτηρέσια των ιχθύων.

Αντίθετα, τα ελεύθερα αμινοξέα στο μυϊκό ιστό των ιχθύων προέρχονται από την απορρόφηση αμινοξέων μέσω της διατροφής και τον μεταβολισμό πρωτεϊνών και αμινοξέων στο μυϊκό ιστό του οργανισμού (Cowey & Walton, 1989). Τα ελεύθερα αμινοξέα, εκτός από τη διατροφή επηρεάζονται από τη γεωγραφική περιοχή και τους αβιοτικούς παράγοντες που επικρατούν στο περιβάλλον, την ηλικία και το μέγεθος των ιχθύων, τη γενετική ωριμότητα και την εποχή του έτους (Limin *et al.*, 2006). Όσο μεγαλύτερη είναι η ηλικία του ιχθύος, τόσο μεγαλύτερη είναι και η συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό του (Panigrahi *et al.*, 1979). Επομένως, καθοριστικό ρόλο στη συγκέντρωσή τους διαδραματίζουν οι ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν σε κάθε εκτροφή. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με αποτελέσματα μελετών, οι εντατικά εκτρεφόμενοι πληθυσμοί ιχθύων συνήθως περιέχουν μικρότερες ποσότητες ελεύθερων αμινοξέων συγκριτικά με τους γηγενείς πληθυσμούς.

Παρ' όλο που μια πλειάδα μελετών έχει επικεντρωθεί μέχρι στιγμής στην ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων στο πλάσμα της *O. mykiss* (Tantikitti & March, 1995, Schumacher *et al.*, 1997, Ok *et al.*, 2001, Karlsson *et al.*, 2006, Cleveland & Burr, 2011, Robinson *et al.*, 2011), λίγες πρότερες μελέτες διενεργήθηκαν στο λευκό μυϊκό ιστό της *O. mykiss* (Carter *et al.*, 1995, Yamamoto *et al.*, 2000), παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό αύξησης πρωτεΐνης (Carter & Houlihan, 2001). Ειδικότερα, ο Carter *et al.* (1995) χρησιμοποίησαν ένα μεμονωμένο σιτηρέσιο θέλοντας να εξετάσουν την επίδραση του σιτηρεσίου στη συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων στο λευκό μυϊκό ιστό σε

διάφορα χρονικά διαστήματα, αποκαλύπτοντας ότι μόνο οι συγκεντρώσεις των απαραίτητων ελεύθερων αμινοξέων βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης μειώθηκαν σε αντίθεση με τη συνολική συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων, η οποία παρουσίασε ελάχιστη μεταβολή.

Από την άλλη πλευρά, ο Yamamoto *et al.* (2000) στη μελέτη τους εξέτασαν την επίδραση έξι διαφορετικών πειραματικών σιτηρεσίων στη συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων στο λευκό μυϊκό ιστό συμπεραίνοντας ότι τα υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης στο σιτηρέσιο προκαλούν την ταυτόχρονη αύξηση των συνολικών απαραίτητων ελεύθερων αμινοξέων και μη απαραίτητων ελεύθερων αμινοξέων.

Η διενέργεια της παρούσας εργασίας είχε ως στόχο την ιχνηλασιμότητα των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδιζουσας πέστροφας διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, μέσω της διαφοροποίησης του προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό τους. Ο εντοπισμός διαφοροποιήσεων μεταξύ των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων ανάμεσα στους διαφορετικούς πληθυσμούς θα αποτελέσει ένα ακόμη χρήσιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση του καίριου ζητήματος της ιχνηλασιμότητας των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών.

## **4.2 Υλικά και Μέθοδοι**

### **4.2.1 Συμμόρφωση με τον Κώδικα Ηθικής και Δεοντολογίας Ερευνών**

Καθόλη τη διαδικασία της δειγματοληψίας, προτεραιότητα δόθηκε τόσο στην ευζωία των ιχθύων, όσο και στη διατήρηση της ποιότητας της σάρκας τους. Λαμβάνοντας υπόψη τη γνωμοδότηση της Επιτροπής για την υγεία των ζώων και την ευζωία τους (EFSA, 2009) η ημιαυτόματη μέθοδος ακαριαίας θανάτωσης με χτύπημα

στο κρανίο των ιχθύων προτιμήθηκε να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα δείγματα από εκπαιδευμένο προσωπικό σε κάθε εντατική εκτροφή. Το σύνολο των χειρισμών στα δείγματα ιριδίζουσας πέστροφας, καθώς και όλες οι σχετικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την Οδηγία 2010/63/ΕΕ της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η οποία θέτει το πλαίσιο της προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

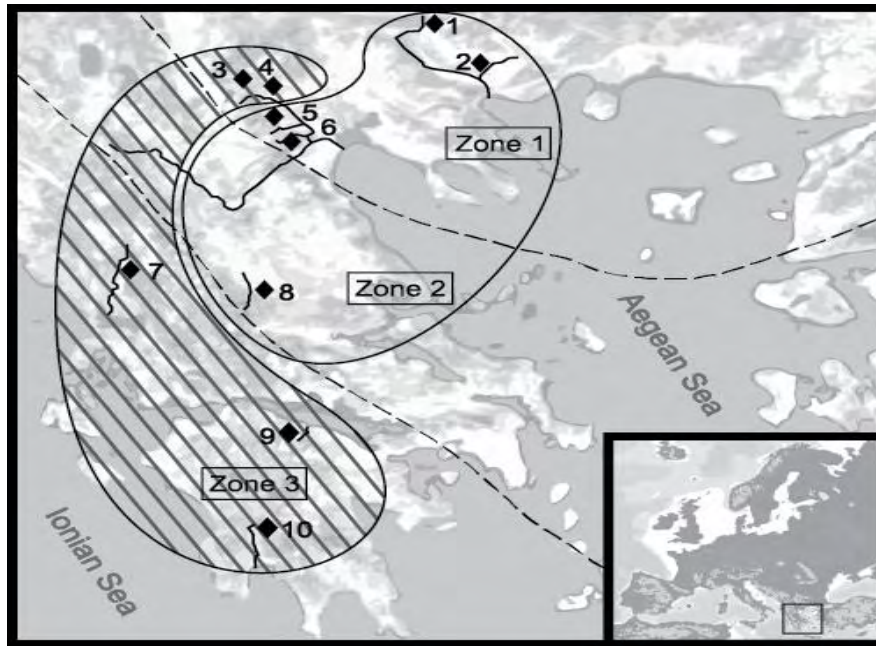
#### **4.2.2 Δειγματοληψία**

Το πλάνο δειγματοληψίας των υπό εξέταση εντατικά εκτρεφόμενων ιριδίζουσων πεστρόφων καταρτίστηκε βάσει γεωγραφικών κριτηρίων, όπου έγινε προσπάθεια να συμπεριληφθεί ένα ευρύ φάσμα ρέοντων συστημάτων. Έτσι, επιλέχθηκαν έξι ποταμοί, δύο ρέματα και μία πηγή που καλύπτουν ολόκληρη την ελληνική επικράτεια και είναι αντιπροσωπευτικοί του συνόλου των εντατικών εκτροφών στα εσωτερικά ύδατα. Οι επιλεγθείσες εντατικές εκτροφές μεταξύ τους ποικίλουν στα διάφορα χαρακτηριστικά τους, όπως είναι η τοποθεσία, η γεωλογικο-χημικο-κλιματική ζώνη, η θερμοκρασία νερού και η σύσταση του σιτηρεσίου που παρέχονταν στους ιχθύες (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4** Συνθήκες εκτροφής σε κάθε εντατική ιχθυοκαλλιέργεια.

Περιοχή	Ζώνη	Θερμοκρασία νερού (°C)	Διατροφή	Πρωτεΐνη (%)	Λίπαρα (%)
Άγκιστρο	1	12,5	Koppens NL	42	30
Αγ. Ιωάννης	1	16,0	Skretting NL	42-45	21-25
Εδεσσαίος1	1	12,0	Trouvit	47	9
Εδεσσαίος2	1	12,0	Biomar	42-45	25-28
Αράπιτσα	1	9,5	Skretting NL	42-45	21-25
Τριπόταμος	1	13,0	Biomar	42-45	25-28
Λούρος	3	14,0	Skretting NL	42-45	21-25
Μέγδοβας	2	9,0	Skretting NL	42-45	21-25
Κράθης	3	16,0	Skretting NL	42-45	21-25
Μπουρνιά	3	15,0	Skretting NL	42-45	21-25

Επομένως, σύμφωνα με το πλάνο δειγματοληψίας επιλέχθηκαν 10 εντατικές εκτροφές που βρίσκονται εγκατεστημένες σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και συνολικά εξαλειύτηκαν 564 ιριδίζουσες πέστροφες με τη χρήση απόχης, από τις οποίες επιλέχθηκαν 264 άτομα. Το σύνολο των επιλεγμένων ιχθύων ήταν ενήλικα άτομα ηλικίας 20 μηνών, με παρόμοιο εμπορεύσιμο μέγεθος και με περίπου ίσο βάρος  $250 \pm 20$ g (Άγκιστρο  $n = 29$ , Άγιος Ιωάννης  $n=27$ , Εδεσσαίος1  $n=29$ , Εδεσσαίος2  $n=27$ , Αράπιτσα  $n=25$ , Τριπόταμος  $n=25$ , Λούρος  $n=24$ , Μέγδοβας  $n=27$ , Κράθης  $n=24$ , Μπουρνιά  $n=27$ ) (Εικ. 5).



**Εικόνα 5.** Χάρτης της Ελλάδας με τα σημεία δειγματοληψίας των εντατικά εκτρεφόμενων ιριδιζουσων πεστρόφων, τις τρεις κύριες γεωλογικο-χημικο-κλιματικές ζώνες (Skoulikidis, 1993, Skoulikidis et al., 2004, Skoulikidis et al., 2006) και τις δύο ομάδες των ιχθυοπληθυσμών που προέκυψαν έπειτα από τις αναλύσεις της γεωμετρικής μορφομετρίας και του προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων. Το μη σκιασμένο τμήμα αντιστοιχεί στην πρώτη ομάδα, ενώ το σκιασμένο τμήμα στη δεύτερη ομάδα. Ο ιχθυοπληθυσμός κάθε εντατικής εκτροφής κωδικοποιήθηκε με αριθμημένους ρόμβους [1. Άγκιστρο ( $n = 29$ ),  $41^{\circ}22'50.39''\text{N}$   $23^{\circ}26'18.15''\text{E}$  / 2. Άγιος Ιωάννης ( $n = 27$ ),  $41^{\circ}5'57.30''\text{N}$   $23^{\circ}35'15.15''\text{E}$  / 3. Εδεσσαίος1 ( $n = 29$ ),  $40^{\circ}48'30.94''\text{N}$   $22^{\circ}0'57.25''\text{E}$  / 4. Εδεσσαίος2 ( $n = 27$ ),  $40^{\circ}48'25.00''\text{N}$   $22^{\circ}1'19.12''\text{E}$  / 5. Αράπιτσα ( $n = 25$ ),  $40^{\circ}36'47.46''\text{N}$   $22^{\circ}2'49.15''\text{E}$  / 6. Τριπόταμος ( $n = 25$ ),  $40^{\circ}28'26.68''\text{N}$   $22^{\circ}10'37.37''\text{E}$  / 7. Λούρος ( $n = 24$ ),  $39^{\circ}25'39.82''\text{N}$   $20^{\circ}50'43.41''\text{E}$  / 8. Μέγδοβας ( $n = 27$ ),  $39^{\circ}13'1.53''\text{N}$   $21^{\circ}44'43.74''\text{E}$  / 9. Κράθης ( $n = 24$ ),  $38^{\circ}1'4.07''\text{N}$   $22^{\circ}15'5.36''\text{E}$  / 10. Μπουρνιά ( $n = 27$ ),  $37^{\circ}19'54.77''\text{N}$   $21^{\circ}55'53.43''\text{E}$ ].

Όλες οι εντατικές εκτροφές διέθεταν σύστημα συνεχούς ροής που αποτελούνταν από ορθογώνιες δεξαμενές από σκυρόδεμα με βάθος 1,0m. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συλλογή των δειγμάτων, ήταν η πρότερη εφαρμογή αστίας διάρκειας μιας ημέρας στο σύνολο των ιχθύων. Η διαδικασία προέβλεπε τη διεξαγωγή μίας, μοναδικής δειγματοληψίας σε κάθε εντατική εκτροφή, η οποία διενεργήθηκε στις 10π.μ. σε μη αναπαραγωγική περίοδο κατά τη διάρκεια του μήνα Μαΐου, το έτος 2013. Το σύνολο των δειγμάτων θανατώθηκε ακαριαία με χτύπημα στο κρανίο των ιχθύων (ημιαυτόματη μέθοδος ακαριαίας θανάτωσης με χτύπημα στο κρανίο) και έπειτα ακολούθησε η μεταφορά τους αυθημερόν υπό ψύξη στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βόλο, όπου και πραγματοποιήθηκε η φωτογράφιση και η φιλετοποίηση τους. Για την εξαγωγή των ελεύθερων αμινοξέων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Antoine *et al.* (2001) με μικρές τροποποιήσεις. Η λήψη 10g μυϊκού ιστού πραγματοποιήθηκε από το φιλέτο που βρίσκεται στην αριστερή πλευρά κάθε ιχθύος, αφού πρωτύτερα απομακρύνθηκαν τα οστά. Η ποσότητα του μυϊκού ιστού τοποθετήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon, οι οποίοι παρέμειναν αποθηκευμένοι για μικρό χρονικό διάστημα στους -80 °C έως ότου αναλυθούν με την Αντίστροφης Φάσης - Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography - RP-HPLC).

#### 4.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Κατά την προετοιμασία κάθε δείγματος, 10g μυϊκού ιστού ομογενοποιήθηκαν, αφού πρώτα προστέθηκαν 40 ml διαλύματος 75% κ.ο. μεθανόλης (HPLC grade). Έπειτα ακολούθησε λειοτριβίση με τη συσκευή Ultra-Turrax T 25 model (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) μέχρι το σημείο πλήρους ομογενοποίησης του εκχυλίσματος. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά Milli-Q

υπερκάθαρο νερό (Fisher Scientific International Inc., New Hampshire, USA) για την προετοιμασία του συνόλου των διαλυμάτων, καθώς και των αραιώσεών τους. Στη συνέχεια έλαβε χώρα πλήρωση με διάλυμα μεθανόλης 75% κ.ο. μέχρι τον όγκο των 100 ml και τοποθέτηση του δείγματος στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύκτας. Την επόμενη μέρα, μέρος από το εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε πλαστικούς σωλήνες τύπου erpendorf 1,5 ml και φυγοκεντρίθηκε στις 14000 rpm για 40 min, σε θερμοκρασία 4°C, χρησιμοποιώντας την ψυχόμενη φυγόκεντρο 5810R (Eppendorf, Hamburg, Germany). Το λαμβανόμενο υπερκείμενο τμήμα φιλτραρίστηκε με τη χρήση φίλτρων Whatman Puradisc 0,2μm PTFE (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) και αραιώθηκε καταλλήλως με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (pH 5,5) και τοποθετήθηκε άμεσα στην κατάψυξη στους -20°C.

#### **4.2.4 Αντιδραστήρια**

Η μεθανόλη (HPLC grade), το οξικό νάτριο, η τετραϋδροφουράνη (HPLC grade), το άνυδρο τετραβορικό νάτριο, η 2-μερκαπτοαιθανόλη και η απόλυτη αιθανόλη προμηθεύθηκαν από την εταιρεία Applichem (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany). Η ορθοφθαλδεΰδη αγοράστηκε από την εταιρεία Fluka (Fluka, Buchs, Switzerland), ενώ το υπερκάθαρο νερό προήλθε από τη συσκευή Milli-Q (Fisher Scientific International Inc., New Hampshire, USA).

#### **4.2.5 Προετοιμασία κινητών φάσεων**

Για την έκλυση και το διαχωρισμό των ελεύθερων αμινοξέων χρησιμοποιήθηκαν δύο κινητές φάσεις. Η κινητή φάση A αποτελούνταν από μεθανόλη, ενώ η κινητή φάση B περιείχε 1,5 % τετραϋδροφουράνη σε 50 mM οξικό νάτριο (pH 5,9). Οι κινητές φάσεις πριν τη χρήση τους φιλτραρίστηκαν με φίλτρα 0,2 μm και απαερώθηκαν για χρονικό διάστημα 30 min.

#### **4.2.6 Εργαστηριακός εξοπλισμός**

Η διεξαγωγή των αναλύσεων πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, Perkin Elmer 200 Series (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την έκλουση των ελεύθερων αμινοξέων ήταν τύπου αντίστροφης φάσης – HPLC, Brownlee Pecosphere 3 $\mu$ m C18 84 x 4,6 mm (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Η αντλία της συσκευής ήταν η Perkin-Elmer Pump 200 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Για τον έλεγχο της βαθμιαίας μεταβολής της αναλογίας των κινητών φάσεων και τη ρύθμιση της ροής (1,5 ml/min) σταθερά στους 35 °C  $\pm$  1 °C έγινε χρήση του λογισμικού TotalChrom Navigator έκδοση 6.3, μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Ο ανιχνευτής φθορισμού Perkin-Elmer 200a (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) και τα μήκη διέγερσης και εκπομπής του μονοχρωμάτορα ρυθμίστηκαν στα 340 και 450 nm, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η συσκευή διαθέτει αυτόματο δειγματολήπτη, τον Perkin-Elmer Autosampler 200 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η έγχυση των δειγμάτων με βρόγχο σταθερού όγκου 20  $\mu$ l.

#### **4.2.7 Προετοιμασία ορθοφθαλδεΐδης**

Η παρασκευή της ορθοφθαλδεΐδης απαιτείται να γίνεται τουλάχιστον 24h πριν τη χρήση της και δύναται να χρησιμοποιηθεί δίνοντας επαναλήψιμα αποτελέσματα μέχρι την ένατη ημέρα. Ειδικότερα, 27 mg ορθοφθαλδεΐδης διαλύθηκαν σε 500  $\mu$ l απόλυτης αιθανόλης και τοποθετήθηκαν σε πλαστικό σωλήνα τύπου falcon 50 ml. Επιπλέον προστέθηκαν διαδοχικά 5 ml 0,1 M τετραβορικού νατρίου pH 9,5 και 50  $\mu$ l 2-μερκαπτοαιθανόλης.



#### **4.2.8 Πρότυπα διαλύματα αμινοξέων**

Η ταυτοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τους χρόνους έκλουσης μεταξύ των χρωματογραφημάτων που προέκυπταν από τα γνωστής συγκέντρωσης πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα. Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση των ελεύθερων αμινοξέων κατασκευάστηκε εξωτερική πρότυπη καμπύλη αναφοράς η οποία αποτελούνταν από πέντε σημεία κάθε φορά. Το σύνολο των πρότυπων διαλυμάτων αμινοξέων παρασκευάστηκε διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα κάθε αμινοξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,05 M (pH 5,5).

#### **4.2.9 Παραγοντοποίηση αμινοξέων**

Για την ανίχνευση των ελεύθερων αμινοξέων από τον ανιχνευτή φθορισμού απαιτείται η ιχνηθέτηση με φθορίζουσα ουσία (ορθοφθαλδεΐδη). Επομένως, πριν την έγχυση κάθε δείγματος και την έκλουσή του από τη στήλη πραγματοποιήθηκε μίξη και ελαφρά ανακίνηση 100 μl πρότυπου διαλύματος αμινοξέος ή εκχυλίσματος μυϊκού ιστού με 400 μl ορθοφθαλδεΐδης (OPA) για ακριβές χρονικό διάστημα 2 min. Αμέσως μετά ακολούθησε έγχυση του δείγματος με τη βοήθεια μικροσύριγγας ακριβείας του αυτόματου δειγματολήπτη.

#### **4.2.10 Στατιστική Επεξεργασία Δεδομένων**

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων διεξήχθη με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού Minitab 17 (Minitab 17 Statistical Software, 2010). Αρχικά, η ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα (one-way ANOVA) εφαρμόστηκε εκτιμώντας την πιθανή ύπαρξη στατιστικώς σημαντικών διαφορών ανάμεσα στους διαφορετικούς

εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς ιριδιζουσας πέστροφας. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA), ώστε να καταδείξει τις σχέσεις μεταξύ των εξεταζόμενων ιχθυοπληθυσμών σε ένα πολυδιάστατο χώρο.

**Συσχέτιση γενετικών δεδομένων με τη μορφομετρία, το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων, τη θερμοκρασία νερού, το σιτηρέσιο, τις γεωλογικο-χημικο-κλιματικές ζώνες, τις ομαδοποιήσεις ιχθύων και τη γεωγραφική προέλευση των εντατικών εκτροφών.**

Για την εκτίμηση ενδεχόμενης συσχέτισης, Γενικά Γραμμικά Μοντέλα (GLM) διεξήχθησαν μεταξύ της κυρίαρχης παραμέτρου των απλότυπων που προέκυψαν από τα γενετικά δεδομένα ως εξαρτημένη μεταβλητή και των μορφομετρικών δεδομένων, των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων, των θερμοκρασιών νερού, των σιτηρεσίων, των γεωλογικο-χημικο-κλιματικών ζωνών, των ομαδοποιήσεων και των γεωγραφικών προελεύσεων των ιχθυοπληθυσμών ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Η χρήση των GLM αποκάλυψε εάν οι απλότυποι, τα μορφομετρικά δεδομένα και το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων διέφεραν μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών καθώς επίσης και το βαθμό της συμβολής τους σε αυτή τη διαφοροποίηση. Επίσης, για τον έλεγχο σφάλματος εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni, λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Το σύνολο των GLM αναλύσεων διεξήχθη με τη βοήθεια της R έκδοσης 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

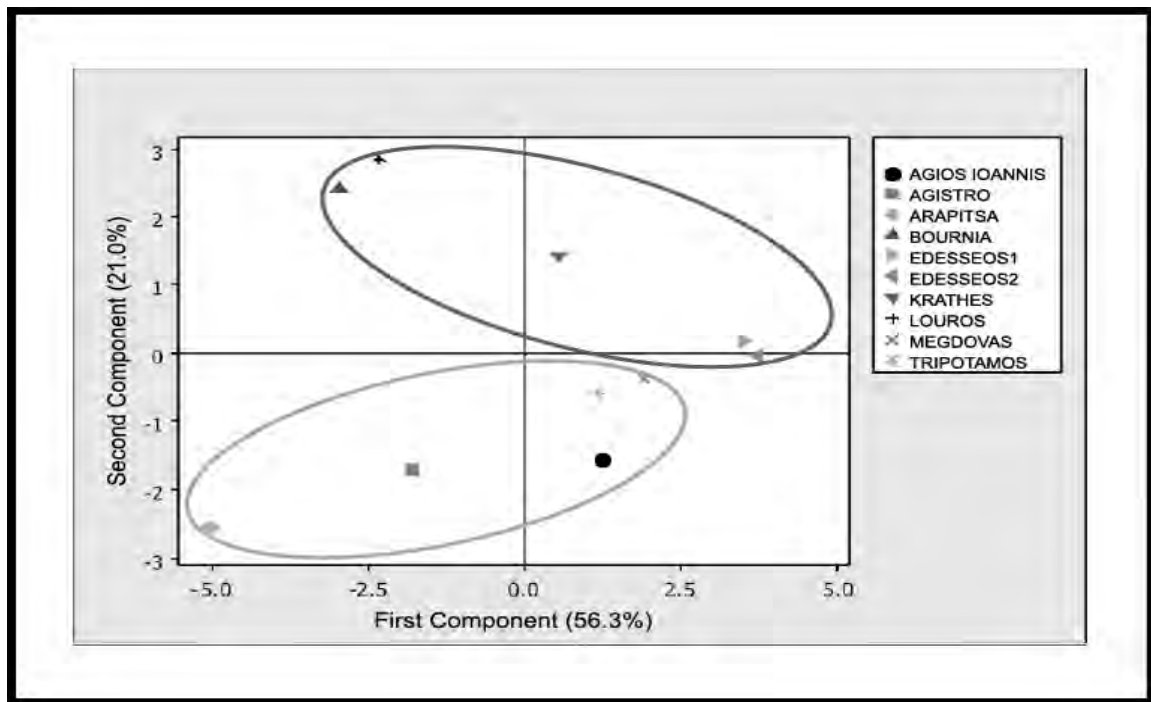
### **4.3 Αποτελέσματα**

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 15 ελεύθερων αμινοξέων (Asp: Ασπαραγινικό οξύ, Glu: Γλουταμινικό οξύ, Asn: Ασπαραγίνη, His: Ιστιδίνη, Gln: Γλουταμίνη, Gly: Γλυκίνη, Arg: Αργινίνη, Thr: Θρεονίνη, Ala: Αλανίνη, Tyr:

Τυροσίνη, Phe: Φαινυλαλανίνη, Ile: Ισολευκίνη, Leu: Λευκίνη, Orn: Ορνιθίνη & Lys: Λυσίνη) στο λευκό μυϊκό ιστό των ιριδιζουσων πεστρόφων επιτεύχθηκε κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των εξεταζόμενων δειγμάτων. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων ήταν αξιοσημείωτη.

Η συνολική συγκέντρωση ελεύθερων αμινοξέων στους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς κυμαίνονταν από 30,38 έως 59,54  $\mu\text{mol g}^{-1}$ . Ειδικότερα, η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή της συνολικής συγκέντρωσης ελεύθερων αμινοξέων εμφανίστηκαν στους πληθυσμούς Εδεσσαίος1 και Αράπιτσα, αντίστοιχα.

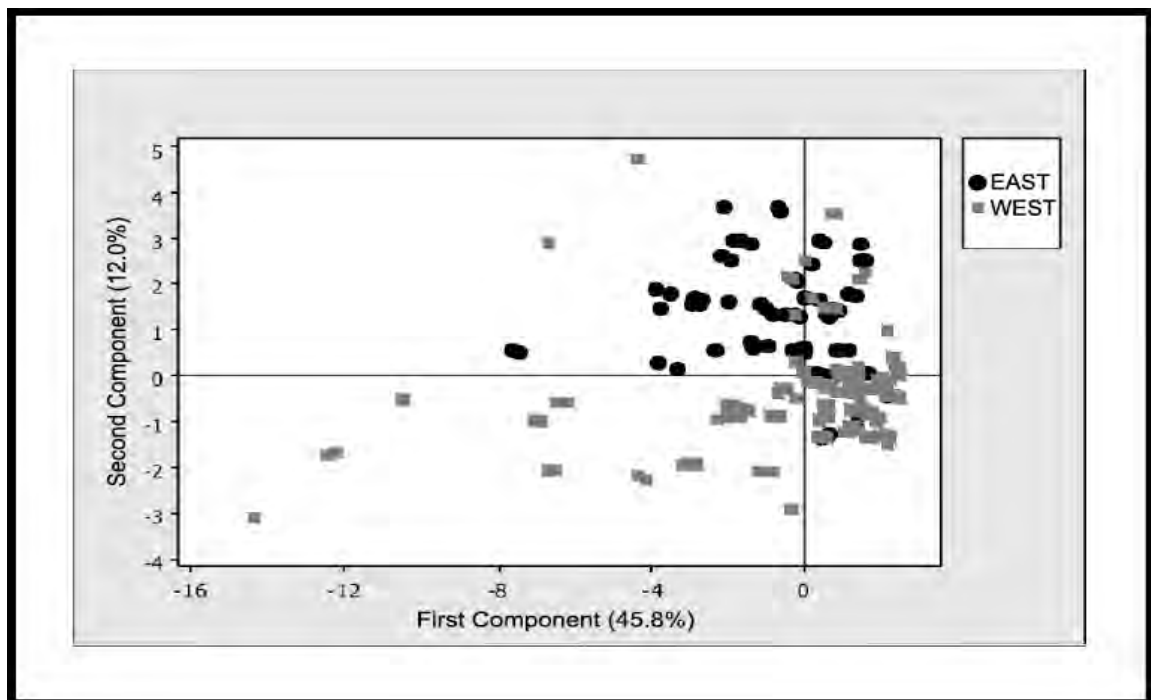
Επιπρόσθετα, η Gly παρουσίασε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε όλους τους ιχθυοπληθυσμούς. Ακολουθούσαν από την Ala, η οποία εμφάνισε τη δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση σε όλα τα εξεταζόμενα δείγματα. Επίσης, η ανάλυση διασποράς (ANOVA) αποκάλυψε ότι η πλειονότητα των συγκεντρώσεων των ελεύθερων αμινοξέων παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικά προφίλ ( $P < 0,05$ ) εξαρτώμενες από τη γεωγραφική προέλευση της εντατικής εκτροφής, με μοναδική εξαίρεση τη Gln.



**Εικόνα 6.** Διαφοροποίηση των μέσων τιμών των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδιζουσας πέστροφας διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης χρησιμοποιώντας το γράφημα της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA). Το ποσοστό της διαφοροποίησης ως προς τον κάθε άξονα είναι 56,3% για την πρώτη Συνιστώσα και 21,0% για τη δεύτερη Συνιστώσα.

Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA) αναφορικά με τις μέσες τιμές των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων ανά πληθυσμό (Εικ. 6), παρατηρήθηκε η ύπαρξη δύο διακριτών ομάδων ως προς τη συνιστώσα PC1. Η πρώτη ομάδα (Άγκιστρο-Άγιος Ιωάννης-Αράπιτσα-Τριπόταμος-Μέγδοβας) αποτελούνταν αποκλειστικά από ιχθυοπληθυσμούς που προέρχονταν από την ανατολική Ελλάδα (Ζώνες 1 & 2). Αντίθετα, η δεύτερη ομάδα (Λούρος-Κράθης-Μπουρνιά-Εδεσσαίος1-Εδεσσαίος2), αποτελούνταν κατά κύριο λόγο από ιχθυοπληθυσμούς που προέρχονταν από τη δυτική Ελλάδα (Ζώνη 3), εκτός από τους

Εδεσσαίος1 και Εδεσσαίος2 που προέρχονταν από τη Ζώνη 1 (Εικ. 5). Ειδικότερα, η συνιστώσα PC1 ερμήνευσε το 56,3% της συνολικής ποικιλότητας που ανιχνεύθηκε στους εξεταζόμενους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς ιριδίζουσας πέστροφας, ενώ η συνιστώσα PC2 το 21%, αντίστοιχα. Τέλος, το γράφημα της PCA κατέδειξε το διαχωρισμό των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων μεταξύ των δειγμάτων της ανατολικής και της δυτικής Ελλάδας (Εικ. 7).



**Εικόνα 7.** Γράφημα Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών, το οποίο καταδεικνύει τη διαφοροποίηση του προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων δειγμάτων ιριδίζουσας πέστροφας της ανατολικής και της δυτικής Ελλάδας.

**Συσχέτιση γενετικών δεδομένων με τη μορφομετρία, το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων, τη θερμοκρασία νερού, το σιτηρέσιο, τις γεωλογικο-χημικο-κλιματικές ζώνες, τις ομαδοποιήσεις ιχθύων και τη γεωγραφική προέλευση των εντατικών εκτροφών.**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της GLM, ανιχνεύθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των απλότυπων, των ομαδοποιήσεων που προέκυψαν από το STRUCTURE 2.3 ( $P < 0,0001$ ) και των δύο ελεύθερων αμινοξέων Asp ( $P < 0,05$ ), Arg ( $P < 0,01$ ). Ομοίως, ανιχνεύθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των απλότυπων και των διαφορετικών σιτηρεσίων ( $P < 0,05$ ). Εντούτοις, οι απλότυποι δεν συνέβαλαν στην μορφομετρική ποικιλότητα ( $P = 0,443$ ). Στον αντίποδα, η διεξαγωγή της GLM με τα μορφομετρικά ως κυρίαρχη παράμετρο (CV1) κατέδειξαν ότι αυτά επηρεάστηκαν από τη γεωγραφική προέλευση των εντατικών εκτροφών, τη θερμοκρασία νερού ( $P < 0,01$ ), τις γεωλογικο-χημικο-κλιματικές ζώνες ( $P < 0,0001$ ) και τα ελεύθερα αμινοξέα His ( $P < 0,001$ ) και Arg ( $P < 0,05$ ). Ειδικότερα, τα μορφομετρικά διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ιχθυοπληθυσμών του Αγκίστρου ( $P < 0,001$ ), του Εδεσσαίου2 ( $P < 0,01$ ), του Λούρου ( $P < 0,001$ ), του Μέγδοβα ( $P < 0,01$ ) και του Τριπόταμου ( $P < 0,001$ ). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, οι απλότυποι και τα διάφορα σιτηρέσια δεν είχαν καμία επίδραση στο σχήμα του σώματος των ιχθύων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας νερού και αρκετών ελεύθερων αμινοξέων, όπως είναι το Asp ( $P < 0,01$ ), η Asn ( $P < 0,01$ ), η Gln ( $P < 0,001$ ), η Phe ( $P < 0,01$ ) και η Leu ( $P < 0,05$ ).

#### **4.4 Συζήτηση**

Η παρούσα εργασία κατέδειξε ότι εντατικά εκτρεφόμενοι πληθυσμοί ιριδίζουσας πέστροφας, προερχόμενοι από διαφορετικές εντατικές εκτροφές που

βρίσκονται εγκατεστημένες σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές, με ποικίλες συνθήκες εκτροφής δύναται να ταυτοποιηθούν επιτυχώς με τη βοήθεια του προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο λευκό μυϊκό ιστό τους.

Η πραγματοποίηση της Ανάλυσης Διασποράς ANOVA αποκάλυψε ότι η πλειονότητα των εξεταζόμενων πληθυσμών εντατικά εκτρεφόμενης ιριδιζουσας πέστροφας παρουσίασαν διαφορετικά προφίλ ελεύθερων αμινοξέων ( $P < 0,05$ ), ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση. Σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, μια συναφή μελέτη σε εκτρεφόμενα μύδια που προέρχονταν από τρεις περιοχές της Ισπανίας εντόπισε με τη σειρά της διαφορετικά προφίλ ελεύθερων αμινοξέων, οι διαφορές των οποίων αποδόθηκαν στην ύπαρξη διαφορετικών περιβαλλοντικών και διατροφικών συνθηκών μεταξύ των τριών εντατικών εκτροφών που μελετήθηκαν (Fuentes *et al.*, 2009). Επομένως, η ανιχνευθήσα διαφοροποίηση στην παρούσα εργασία μπορεί να συνδέεται με τα ιδιαίτερα σε τοπική κλίμακα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος (Tzedakis *et al.*, 2002b, Medail & Diadema, 2009), όπως επίσης και με τις εφαρμοζόμενες συνθήκες εκτροφής (Hwang *et al.*, 2000, Fuentes *et al.*, 2009) που είχαν υιοθετηθεί από κάθε εκτροφέα. Αυτή η ερμηνεία ενισχύθηκε από τα αποτελέσματα της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA), τα οποία κατέδειξαν το σαφή διαχωρισμό των πληθυσμών, βάσει του προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων τους, μεταξύ ανατολικής και δυτικής Ελλάδας (Εικ. 7), φυσικά οριοθετημένες από την οροσειρά της Πίνδου. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ανατολικό τμήμα, ανατολικά της οροσειράς της Πίνδου, υπόκειται στην επίδραση του Σιβηρικού αντικυκλώνα με αποτέλεσμα να δέχεται χαμηλότερες ποσότητες (380-640mm) βροχοπτώσεων σε ετήσια βάση, σε σύγκριση με το δυτικό τμήμα, το οποίο σε πλήρη αντιδιαστολή εμφανίζει αυξημένες ετήσιες ποσότητες (780-1280mm) βροχοπτώσεων, λόγω του επηρεασμού του από τις χαμηλές πιέσεις

που επικρατούν στη δυτική λεκάνη της Μεσογείου (Kosmas *et al.*, 1998a), αποδεικνύεται ότι η ύπαρξη κλιματικών διακυμάνσεων μεταξύ ανατολικής και δυτικής Ελλάδας αντανακλάται με τη διαφοροποίηση των αβιοτικών παραγόντων σε τοπικό επίπεδο, σε κάθε εντατική εκτροπή διαδραματίζοντας κυρίαρχο ρόλο στην παρατηρούμενη διακύμανση του προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων.

#### **4.5 Συμπέρασμα**

Επομένως, το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό των εντατικά εκτρεφόμενων ιριδίζουσων πεστρόφων φαίνεται να απεικονίζει ένα διακριτό γεωγραφικό πρότυπο των εκτροφών της ανατολικής και δυτικής Ελλάδας, συμβάλλοντας αποτελεσματικά στην ιχνηλασιμότητα των εξεταζόμενων πληθυσμών, βοηθώντας τόσο στην εκτίμηση περιβαλλοντικών κινδύνων, όσο και ενδεχόμενων οικολογικών επιπτώσεων. Γι' αυτό το λόγο, η χρήση τους ως μέσο ιχνηλασιμότητας θα μπορούσε να συμβάλει στην αειφορική διαχείριση των ιχθυοκαλλιεργειών.



## 5. ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΕΝΤΑΤΙΚΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΓΕΩΜΕΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑΣ

### 5.1 Εισαγωγή

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) η παραγωγή εντατικά εκτρεφόμενων ιριδίζουσων πεστρόφων *O.mykiss* διακρίνεται σε μεγάλο μέγεθος (>1,2 Kg) και σε εμπορεύσιμου μεγέθους (<1,2 Kg) ιχθείς, με τους τελευταίους να αποτελούν τον κύριο όγκο παραγωγής μεταξύ των Κρατών-Μελών. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία από το Πλαίσιο Συλλογής Δεδομένων (Data Collection Framework - DCF) η συνολική παραγωγή στην ΕΕ κατά το έτος 2014 άγγιξε τους 168.100 τόνους σε βάρος και τα 543,6 εκατομμύρια Ευρώ σε αξία, αντιπροσωπεύοντας το 10,85% της συνολικής παραγωγής που λαμβάνει χώρα στην ΕΕ (STEFEC, 2014).

Τόσο η προέλευση του γόνου (Swain *et al.*, 1991, Hard *et al.*, 1999, Pakkasmaa & Piironen, 2001, Wessel *et al.*, 2006), όσο και οι συνθήκες εκτροφής (Taylor, 1986, Fleming *et al.*, 1994, Hedenskog *et al.*, 1997, Hard *et al.*, 2000, Peres-Neto & Magnan, 2004, von Cramon-Taubadel *et al.*, 2005, Løhmus *et al.*, 2010, Pulcini *et al.*, 2013, Pulcini *et al.*, 2014) φαίνεται να συμβάλουν καθοριστικά στην εμφάνιση μορφομετρικής διαφοροποίησης ανάμεσα στους ιχθυοπληθυσμούς.

Η ανάλυση του σχήματος των εντατικά εκτρεφόμενων ιχθύων παρέχει σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με το ρυθμό αύξησης και τη γενετική ωρίμανση των πληθυσμών. Κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση των εξωτερικών μορφολογικών χαρακτηριστικών των ιχθύων διαδραματίζουν οι ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν σε κάθε εντατική εκτροφή (Favaloro & Mazzola, 2003). Παράμετροι, όπως η

θερμοκρασία του νερού (Lõhmus *et al.*, 2010), η ιχθυοπυκνότητα, η ταχύτητα ροής του νερού σε συνάρτηση με την κολυμβητική ικανότητα των ιχθύων (Peres-Neto & Magnan, 2004), καθώς και η ποιότητα και ποσότητα της παρεχόμενης τροφής έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη μορφολογία τους (Favaloro & Mazzola, 2003). Σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σολομοειδών δύνανται να διαφοροποιηθούν από την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων σε διάστημα 6 έως 30 γενεών (Haugen & Vollestad, 2000, Hendry *et al.*, 2000, Quinn *et al.*, 2001, Unwin *et al.*, 2003, Kinnison *et al.*, 2008, Kavanagh *et al.*, 2010, Fraser *et al.*, 2011).

Η μορφομετρία αποτελεί βασικό συστατικό του φαινότυπου των ιχθύων και διακρίνεται είτε στην κλασική μορφομετρία, είτε στη γεωμετρική μορφομετρία. Η κύρια διαφορά μεταξύ της «κλασικής» και της «γεωμετρικής» μορφομετρίας έγκειται στο γεγονός ότι η τελευταία χρησιμοποιεί σημεία ως ορόσημα (landmarks), τα οποία μεταφράζονται και περιστρέφονται γύρω από μια κοινή θέση, εξαλείφοντας κάθε διαφορά μεγέθους μεταξύ τους, με αποτέλεσμα το σχήμα να διαχωρίζεται εντελώς από τον παράγοντα μέγεθος, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη διακριτή του ανάλυση (Kendall, 1986).

Η κλασική μορφομετρία ανήκει στις παραδοσιακές μεθόδους και στοχεύει σε μετρήσεις (μήκος, πλάτος, ύψος κ.α.) μορφομετρικών και μεριστικών χαρακτηριστικών των ιχθύων (Casselman *et al.*, 1981, Ihssen *et al.*, 1981, Cadrin, 2000, Adams *et al.*, 2004). Σαν μέθοδος παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα ως προς την αξιοπιστία της, καθώς οι μετρήσεις των μορφομετρικών και μεριστικών δεδομένων αποτυπώνουν εν μέρει μόνο την πραγματική δομή των ιχθύων (Jerry & Cairns, 1998, Swain & Foote, 1999, Murta, 2000, Zelditch *et al.*, 2004). Ειδικότερα, οι γραμμικές αποστάσεις μεταξύ σημείων στους ιχθείς εξαρτώνται συνήθως από το

μέγεθός τους, με αποτέλεσμα την ανάγκη για χρήση μεθόδων που θα εξαλείφουν την επίδραση του παράγοντα μεγέθους κατά τη σύγκριση τους. Επίσης, σημαντικές δυσκολίες εμφανίζονται στην εκτίμηση της ομολογίας των γραμμικών αποστάσεων μεταξύ σημείων, διότι σε πολλές περιπτώσεις τα σημεία αυτά δεν είναι ομόλογα. Παράλληλα, οι μετρήσεις των γραμμικών αποστάσεων δεν παρέχουν τη γεωμετρία του σχήματος, καθώς όμοιες γραμμικές αποστάσεις μπορούν να αντιπροσωπεύουν διαφορετικά γεωμετρικά σχήματα (Rohlf & Marcus, 1993).

Στον αντίποδα, η γεωμετρική μορφομετρία αποτελεί τη σύγχρονη και καινοτόμο μέθοδο ποσοτικοποίησης και ανάλυσης της μορφολογίας του σχήματος των ιχθύων (Bookstein, 1991). Για το λόγο αυτό, η ταυτοποίηση των ιχθύων με σκοπό τον προσδιορισμό της εντατικής εκτροφής από την οποία προέρχονται, εκτός από τη χρήση μοριακών δεικτών και το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο λευκό μυϊκό ιστό, μπορεί να επιτευχθεί και με τη μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας. Ειδικότερα, τα τελευταία χρόνια η μέθοδος της γεωμετρικής μορφομετρίας χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο από τον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας σε συνδυασμό με πληθυσμιακές γενετικές μελέτες εντατικά εκτρεφόμενων ιχθύων. Κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου που την κατέστησε χρήσιμο εργαλείο αποτελεί η ευρεία και πολύπλευρη χρηστικότητα της, καθώς πέρα από την επιτυχή διάκριση των πληθυσμών, συμβάλλει στην αξιολόγηση της υγείας των ιχθύων (Loy *et al.*, 2000), στην εκτίμηση της βιομάζας (Hockaday *et al.*, 2000), όπως επίσης και σε βιογεωγραφικές μελέτες διατήρησης πληθυσμών (Haas & McPhail, 2001).

Η γεωμετρική μορφομετρική μέθοδος υπερίσχυσε έναντι των παραδοσιακών-κλασικών μεθόδων που βασίζονταν αποκλειστικά σε μετρήσεις γραμμικών αποστάσεων μορφομετρικών και μεριστικών χαρακτηριστικών των ιχθύων, διότι εκτός από τα δεδομένα γραμμικών αποστάσεων στηριζόταν επιπρόσθετα και στον

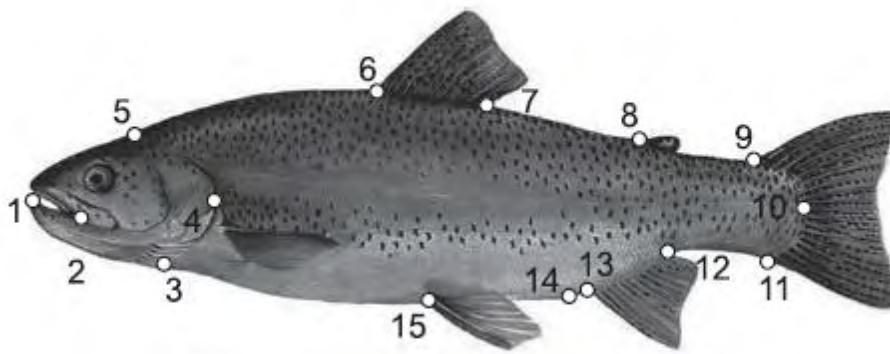
καθορισμό οροσήμων (landmarks) σε σημεία του ιχθύος που παρουσιάζουν βιολογική σημασία και αντικατοπτρίζουν τη γεωμετρική δομή του. Κύριο χαρακτηριστικό, αλλά και ειδοποιός διαφορά των μεθόδων που βασίζονται σε ορόσημα από τις λοιπές μεθόδους αποτελεί το γεγονός ότι λαμβάνονται δισδιάστατες ή τρισδιάστατες συντεταγμένες από ομόλογες δομές ή ομόλογα ορόσημα με αποτέλεσμα την ορθότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων βάσει της βιολογίας.

Προαπαιτούμενη ενέργεια για να χρησιμοποιηθούν οι ληφθείσες συντεταγμένες ως μεταβλητές στη στατιστική ανάλυση, είναι η εξάλειψη με τη χρήση κατάλληλης μαθηματικής συνάρτησης της επίδρασης παραγόντων, όπως η θέση, το μέγεθος και ο προσανατολισμός για το σύνολο των δειγμάτων. Επομένως, η εναπομένουσα παραλλακτικότητα αντιστοιχεί αποκλειστικά σε διαφοροποιήσεις στο σχήμα του σώματος των ιχθύων, έτσι όπως καθορίζεται από τα επιλεγμένα ορόσημα. Κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η Μέθοδος Απόστασης Προκρούστη (Generalized Procrustes Analysis, GPA) και η Μέθοδος Thin-Plate Spline (TPS) (Rohlf & Slice, 1990, Bookstein, 1991, Goodall, 1991, O'Higgins, 2000, Zelditch *et al.*, 2004). Τα αποτελέσματα αυτών των διαφοροποιήσεων αναλύονται με στατιστικές μεθόδους πολυμεταβλητών δεδομένων.

Τα διαφορετικά πρότυπα που προκύπτουν από τις μετρήσεις στο σχήμα του σώματος των ιχθύων υποδηλώνουν διαφορές στο ρυθμό αύξησης και το επίπεδο γενετικής ωρίμανσης των εξεταζόμενων ατόμων, καθώς το σχήμα του σώματος των ιχθύων είναι αποτέλεσμα της αύξησης του οργανισμού. Επομένως, καθίσταται εφικτή η διάκριση είτε διαφορετικών γενεαλογικών σειρών της ιριδίζουσας πέστροφας είτε ακόμη και η διάκριση των ατόμων που ανήκουν στην ίδια γενεαλογική σειρά, αλλά έχουν εκτραφεί υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Hard *et al.*, 2000).

## 5.2 Υλικά και Μέθοδοι

Το πλάνο δειγματοληψίας που ακολουθήθηκε αναφέρθηκε λεπτομερώς στην παράγραφο 4.2.2. Συνολικά επιλέχθηκαν 264 δείγματα ιριδίζουσας πέστροφας που προέρχονταν από 10 διαφορετικές εντατικές εκτροφές και εξετάστηκαν με τη μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας. Ειδικότερα, πριν τη φιλετοποίηση και την αποθήκευση των δειγμάτων στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , 264 ψηφιακές φωτογραφίες που απεικόνιζαν την αριστερή πλευρά των ιχθύων ελήφθησαν με τη χρήση της ψηφιακής κάμερας Nikon Coolpix 4100 4MP που βρίσκονταν στερεωμένη σε τρίποδα. Σε κάθε φωτογραφία το μέγεθος των ιχθύων διακρίνονταν από την ύπαρξη βαθμονομημένου χάρακα και πριν την φωτογράφιση προηγήθηκε απομάκρυνση της εναπομένουσας ποσότητας νερού που υπήρχε στο σώμα των ιχθύων, ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αντανakλάσεις. Έπειτα, σε αρχικό στάδιο έλαβε χώρα η προεπισκόπηση των φωτογραφιών για την επιλογή των πιθανών σημείων-οροσήμων. Τα σημεία-ορόσημα επιλέχθηκαν να βρίσκονται σε ευδιάκριτα, κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά των ιχθύων και ήταν όμοια για το σύνολο των εξεταζόμενων δειγμάτων. Αναλυτικότερα, 15 ομόλογα ορόσημα (Εικ. 8) επιλέχθηκαν σε κάθε ιχθύ με τη βοήθεια του λογισμικού *TPSdig2* (διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>) και με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν τα σχήματα των σωμάτων των ιχθύων (Rohlf, 2006).



**Εικόνα 8.** Επιλογή των ορόσημων (κύκλοι λευκού χρώματος) στο σώμα της ιριδιζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss*: 1. Πρόσθιο άκρο της γνάθου, 2. Οπίσθιο άκρο της γνάθου, 3. Εισαγωγή του καλύμματος των βραγχίων στο κάτω μέρος του προφίλ, 4. Οπίσθιο άκρο του καλύμματος των βραγχίων, 5. Προβολή του καλύμματος των βραγχίων στο ραχιαίο προφίλ, 6. Πρόσθια βάση του ραχιαίου πτερυγίου, 7. Οπίσθια βάση του ραχιαίου πτερυγίου, 8. Πρόσθια βάση του λιπόδους πτερυγίου, 9. Πρόσθια άκρη της ραχιαίας μεμβράνης του ουραίου πτερυγίου, 10. Βάση στο μέσον του ουραίου πτερυγίου, 11. Πρόσθια άκρη της κοιλιακής μεμβράνης του ουραίου πτερυγίου, 12. Πρόσθια βάση του εδρικού πτερυγίου, 13. Οπίσθια βάση του εδρικού πτερυγίου, 14. Έδρα, 15. Αρχή του αριστερού κοιλιακού πτερυγίου.

### 5.2.1 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων

Στη συνέχεια ελέγχθηκε το σύνολο των οροσήμων για ενδεχόμενη ύπαρξη ακραίων τιμών με τη λειτουργία “Find outliers” του λογισμικού MorphoJ (Klingenberg, 2011). Ακολούθως, το MorphoJ χρησιμοποιήθηκε για τη διενέργεια της Μεθόδου Απόστασης Προκρούστη (Generalized Procrustes Analysis – GPA) στα σχήματα των σωμάτων των ιχθύων, όπου εξαλείφθηκε η επίδραση της θέσης, του προσανατολισμού και της κλίμακας από το σύνολο των δειγμάτων (Rohlf & Slice 1990). Οι αποστάσεις προκρούστη που προέκυψαν από τη Μέθοδο Απόστασης Προκρούστη (Generalized Procrustes Analysis – GPA) επεξεργάστηκαν με τη Μέθοδο Thin Plate Spline (TPS) (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>) (Bookstein, 1991).

Παράλληλα, μέσω του λογισμικού MorphoJ (Klingenberg, 2011) πραγματοποιήθηκε η Ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (Canonical Variate Analysis – CVA), ώστε να επιτευχθεί η απεικόνιση του γραμμικού διαχωρισμού ανάμεσα στους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς ιριδίζουσας πέστροφας διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης και ο υπολογισμός των αποστάσεων προκρούστη μεταξύ του συνόλου των δειγμάτων. Επιπρόσθετα, τα μοτίβα των μεταβολών στο σχήμα των ιχθύων στον άξονα CV1 απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση περιγράμματος (wireframe graphs). Ομοίως, η Διαχωριστική Ανάλυση (Discriminant Function Analysis - DFA) διενεργήθηκε με τη χρήση του MorphoJ (Klingenberg, 2011), ώστε να εξετασθούν οι διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που προέρχονταν από διαφορετικές εντατικές εκτροφές εφαρμόζοντας συγκρίσεις ανά ζεύγη. Τέλος, για την επιβεβαίωση της επιτυχούς κατανομής των εξεταζόμενων δειγμάτων στις εντατικές εκτροφές τους χρησιμοποιήθηκε η διασταύρωση leave-one-out cross-validation (Weiss & Kulikowski, 1991).

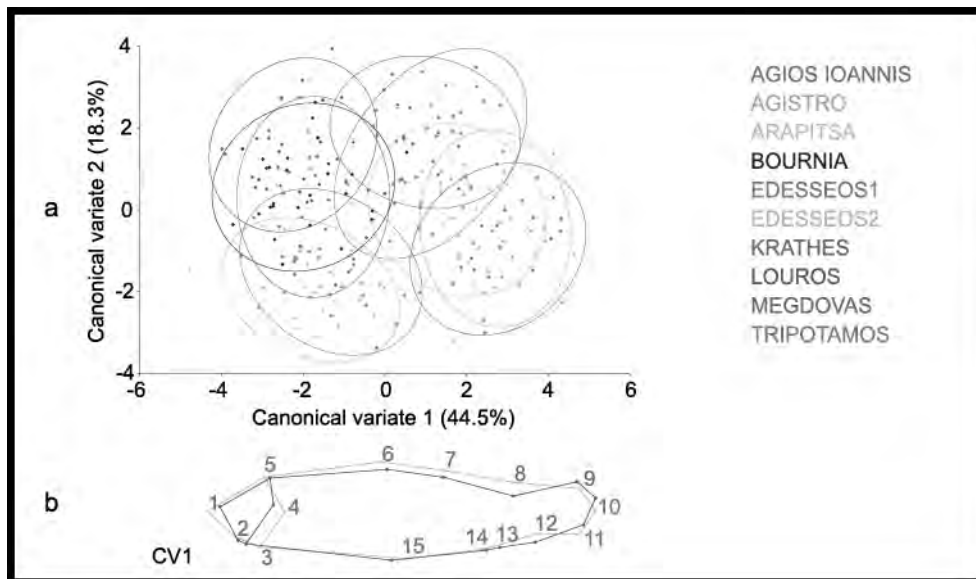
### 5.3 Αποτελέσματα

Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο μέσο σχήμα του σώματος των ιριδιζουσων πεστρόφων (Πίνακας 5). Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη το γράφημα της Ανάλυσης Κανονικών Μεταβλητών CVA (Εικ. 9α) ως προς τον άξονα CV1 (44,5%) επιτεύχθηκε ο σαφής διαχωρισμός των δειγμάτων ιριδιζουσας πέστροφας σε δύο ομάδες βάσει της γεωγραφικής τους προέλευσης. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από τους πληθυσμούς των εντατικών εκτροφών Άγκιστρο – Άγιος Ιωάννης – Αράπιτσα – Τριπόταμος – Μέγδοβας που βρίσκονταν στο θετικό τμήμα του CV1, ενώ η δεύτερη ομάδα βρίσκονταν στο αρνητικό τμήμα και αποτελούνταν με τη σειρά της από τους πληθυσμούς Λούρος – Κράθης – Μπουρνιά – Εδεσσαίος1– Εδεσσαίος2, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα μοτίβα των περιγραμμάτων (Εικ. 9β), οι εντατικά εκτρεφόμενες ιριδιζουσες πέστροφες παρουσίασαν σχετικά μικρότερο κρανίο και λεπτό σώμα ως προς τον άξονα CV1. Ομοίως, η συντριπτική πλειοψηφία των συγκρίσεων ανά ζεύγη που διενεργήθηκε με τη Διαχωριστική Ανάλυση εμφανίστηκαν στατιστικώς σημαντικές ( $P < 0,001$ ) εκτός από τα ζεύγη των πληθυσμών Μπουρνιά – Κράθης, Μπουρνιά – Λούρος και Κράθης – Λούρος. Όσον αφορά την αξιοπιστία της επιτυχούς κατανομής των δειγμάτων στις εντατικές εκτροφές τους, η διενέργεια διασταύρωσης αποκάλυψε ότι ήταν σημαντικώς υψηλή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το ποσοστό της διασταύρωσης για τον έλεγχο της επιτυχούς κατανομής των δειγμάτων στις εντατικές εκτροφές από τις οποίες προέρχονταν ήταν υψηλότερο από 90%. Εντούτοις, μόνο τα ζεύγη των πληθυσμών Μπουρνιά – Κράθης (58%), Κράθης – Λούρος (56,5%) και Μπουρνιά – Λούρος (54%) εμφάνισαν λανθασμένη κατανομή.



**Πίνακας 5.** Αποστάσεις προκρούστη μεταξύ των μέσων σχημάτων του σώματος των δέκα εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας που βρίσκονταν εγκατεστημένοι σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και οι αντίστοιχες τιμές *P* (έντονο μαύρο χρώμα) που προέκυψαν από δοκιμές μετάθεσης (10.000 κύκλοι δοκιμών μετάθεσης)

	AIO	AGS	ED1	ED2	ARA	TRI	LOU	MEG	KRA
AGS	0,026 <b>&lt;0,001</b>								
ED1	0,047 <b>&lt;0,001</b>	0,042 <b>&lt;0,001</b>							
ED2	0,046 <b>&lt;0,001</b>	0,040 <b>&lt;0,001</b>	0,030 <b>0,001</b>						
ARA	0,019 <b>0,015</b>	0,024 <b>0,002</b>	0,040 <b>&lt;0,001</b>	0,037 <b>&lt;0,001</b>					
TRI	0,031 <b>&lt;0,001</b>	0,033 <b>&lt;0,001</b>	0,038 <b>&lt;0,001</b>	0,034 <b>0,001</b>	0,024 <b>0,009</b>				
LOU	0,043 <b>&lt;0,001</b>	0,048 <b>&lt;0,001</b>	0,032 <b>&lt;0,001</b>	0,035 <b>&lt;0,001</b>	0,039 <b>&lt;0,001</b>	0,032 <b>0,001</b>			
MEG	0,038 <b>&lt;0,001</b>	0,025 <b>0,001</b>	0,036 <b>&lt;0,001</b>	0,038 <b>&lt;0,001</b>	0,028 <b>0,001</b>	0,031 <b>&lt;0,001</b>	0,039 <b>&lt;0,001</b>		
KRA	0,042 <b>&lt;0,001</b>	0,041 <b>&lt;0,001</b>	0,021 <b>0,054</b>	0,026 <b>0,034</b>	0,036 <b>0,001</b>	0,031 <b>0,010</b>	0,018 <b>0,212</b>	0,033 <b>0,002</b>	
BOU	0,038 <b>&lt;0,001</b>	0,042 <b>&lt;0,001</b>	0,020 <b>0,052</b>	0,028 <b>0,008</b>	0,033 <b>0,001</b>	0,030 <b>0,008</b>	0,018 <b>0,178</b>	0,036 <b>0,001</b>	0,011 <b>0,776</b>



**Εικόνα 9.** a: Γράφημα διασποράς της Ανάλυσης Κανονικών Μεταβλητών (CVA) που παρουσιάζει τη διαφοροποίηση του σχήματος του σώματος των ιχθύων μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδίζουσας πέστροφας διαφορετικής προέλευσης, b: Μεταβολές στο πλαίσιο των ορόσημων (σκούρο χρώμα) καταδεικνύοντας τη διαφοροποίηση του σχήματος του σώματος των ιχθύων ως προς τον άξονα της Κανονικής Μεταβλητής 1 (CV1) σε σχέση με το μέσο σχήμα (ανοικτό χρώμα).

## 5.4 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη κατέδειξε ότι οι εντατικά εκτρεφόμενοι πληθυσμοί ιριδίζουσας πέστροφας που προέρχονταν από εντατικές εκτροφές που βρίσκονταν εγκατεστημένες σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και εκτρέφονταν υπό ποικίλες συνθήκες είναι δυνατό να διακριθούν ως προς την προέλευσή τους, βάσει της γεωμετρικής τους μορφομετρίας και του προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων του μυϊκού τους ιστού.

Σημαντική διαφοροποίηση του σχήματος των ιχθύων ανιχνεύθηκε μεταξύ των εξεταζόμενων εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης. Ειδικότερα, το γράφημα της διενεργηθείσας Ανάλυσης Κανονικών Μεταβλητών (CVA) αποκάλυψε τον σαφή διαχωρισμό των εντατικών εκτροφών σε δύο ομάδες, (1<sup>η</sup> Ομάδα: Άγκιστρο – Άγιος Ιωάννης – Αράπιτσα – Τριπόταμος – Μέγδοβας) και (2<sup>η</sup> Ομάδα: Λούρος – Κράθης – Μπουρνιά – Εδεσσαίος1 – Εδεσσαίος2), αντίστοιχα (Εικ. 9α). Επιπλέον, οι μεταβολές στο σχήμα των ιχθύων κατά τον άξονα CV1 αποκάλυψαν την ύπαρξη μικρότερου κρανίου και λεπτότερου κορμού σώματος, χαρακτηριστικά που και τα δύο συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση της γρήγορης εκκίνησης των ιχθύων (Εικ. 9β). Οι συγκεκριμένες διαφοροποιήσεις στη μορφομετρία των ιχθύων μπορεί να σχετίζονται τόσο με τη γεωγραφική περιοχή εξαρτώμενες από τις ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν κατά τόπους, καθώς και από τις ποικίλες συνθήκες εκτροφής που εφαρμόζονται σε κάθε ιχθυοκαλλιέργεια (Taylor, 1986, Fleming *et al.*, 1994, Hedenskog *et al.*, 1997, Hard *et al.*, 2000, Peres-Neto & Magnan, 2004, von Cramon-Taubadel *et al.*, 2005, Pulcini *et al.*, 2013, Pulcini *et al.*, 2014), όσο και με γενετικούς παράγοντες εξαρτώμενες από την προέλευση του γόνου (Swain *et al.*, 1991, Hard *et al.*, 1999, Pakkasmaa & Piironen, 2001, Wessel *et al.*, 2006).

Εντούτοις, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι απλότυποι και το σχήμα του σώματος των ιχθύων δεν εμφάνισαν συσχέτιση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Γενικών Γραμμικών Μοντέλων, οι ανιχνευθείσες μορφολογικές διαφοροποιήσεις δύνανται να αντανακλούν την προσαρμογή των ιχθύων στις κατά τόπους περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως επίσης και στις ειδικές συνθήκες εκτροφής που επικρατούν σε κάθε εντατική εκτροφή. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι ο παρατεταμένος διαχωρισμός των νεαρών ιχθυδίων σε διαφορετικά ενδιαιτήματα, όπου επικρατούν

διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να οδηγήσει στη φαινοτυπική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών (Campana *et al.*, 1995). Ειδικότερα, οι αναλύσεις των Γενικών Γραμμικών Μοντέλων (GLM) αποκάλυψαν σημαντική συσχέτιση του σχήματος του σώματος των ιχθύων με την γεωγραφική τους προέλευση, τη θερμοκρασία νερού, τις ζώνες και τα ελεύθερα αμινοξέα His και Arg. Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση των ελληνικών ρέοντων συστημάτων σε τρεις ζώνες λαμβάνοντας υπόψη τα υδρολογικά, χημικά, γεωλογικά και κλιματικά τους χαρακτηριστικά (Skoulikidis, 1993, Skoulikidis *et al.*, 2004, Skoulikidis *et al.*, 2006) και με τον σαφή διαχωρισμό τους σε δύο ομάδες, όπως προέκυψε από την Ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (CVA), αποκαλύφθηκε ότι η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από πληθυσμούς που προέρχονταν από τις βορειο-ανατολικές και βορειο-κεντρικές περιοχές (Ζώνες 1 & 2), σε αντίθεση με τη δεύτερη ομάδα οι πληθυσμοί της οποίας προέρχονταν από τις βορειο-ανατολικές και δυτικές περιοχές (Ζώνες 1 & 3), αντίστοιχα. Επομένως, μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι η μορφολογική διαφοροποίηση οφείλονταν κυρίως σε διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες που απαντώνται μεταξύ των ενδιαιτημάτων των δύο ομάδων ιχθυοπληθυσμών, ενισχύοντας την πιθανότητα να είναι το αποτέλεσμα φαινοτυπικής πλαστικότητας (Swain & Foote, 1999).

Εντούτοις, τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να ερμηνευθούν με επιφύλαξη, καθώς παράγοντες όπως η ηλικία, είτε η ικανότητα της συλλογής αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από χαμηλής στάθμης ορθογώνιες δεξαμενές από σκυρόδεμα σε σύγκριση με τη χρήση απόχης ή ακόμη και εάν τα δείγματα ελήφθησαν πριν ή μετά την παροχή ιχθυοτροφής διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο και είναι εξαιρετικής σημασίας. Η μορφολογία του σώματος των ιχθύων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης δεν

επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τέτοιους παράγοντες, όπως ενδεχομένως επηρεάζεται το προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων.

Λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενες επιστημονικές μελέτες, κρίσιμος παράγοντας που δύναται να μεταβάλει το σχήμα του σώματος των ιχθύων ήταν η θερμοκρασία νερού αποτελώντας τον πρωταρχικό μηχανισμό επίδρασης (Beacham, 1990, Brannon *et al.*, 2004, Løhmus *et al.* 2010). Τα σολομοειδή βρέθηκε ότι είναι ευαίσθητα ακόμη και σε μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας νερού αναφορικά με την αύξηση και την υγεία τους (Brannon *et al.*, 2004). Ομοίως, η μελέτη των Løhmus *et al.* (2010) παρατήρησε ότι διαφορετικές θερμοκρασίες νερού κατά την εκτροφή τόσο φυσικών πληθυσμών, όσο και GH-enhanced coho σολομών είχαν σημαντική επίδραση στη μορφολογία του σώματος των ιχθυδίων, σημειώνοντας ότι υπήρχε τάση για στενότερου και μεγαλύτερου μήκους σώμα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Είναι γεγονός ότι η θερμοκρασία νερού παρουσιάζει σημαντική διακύμανση ακόμη και σε μικρές αποστάσεις, λόγω της κατά κόρου ύπαρξης μωσαϊκών περιβάλλοντων στον ελλαδικό χώρο (Tzedakis *et al.*, 2002b, Medail & Diadema, 2009) συμβάλλοντας στην ανιχνευθήσα διαφοροποίηση της μορφολογίας του σώματος των ιχθύων ανάμεσα στις διάφορες εντατικές εκτροφές στις οποίες πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Ειδικότερα, λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες εκτροφής σε κάθε ιχθυοκαλλιέργεια (Πίνακας 4) τα ρέοντα συστήματα της πρώτης ομάδας είχαν μικρότερη μέση θερμοκρασία νερού (12,0°C) σε σύγκριση με της δεύτερης ομάδας (13,8°C) αποτελώντας τη γενεσιουργό αιτία της εμφάνισης διαφορετικών φαινοτύπων.

Παρά το γεγονός ότι αρκετές μελέτες ανέφεραν μορφολογικές διαφοροποιήσεις που οφείλονταν σε διαφορές στη σύσταση της χορηγούμενης ιχθυοτροφής, καταδεικνύοντας ότι διαφορετικά σιτηρέσια μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές στη

μορφολογία των ιχθύων (Robinson & Wilson, 1995, Day & McPhail, 1996, Mittelbach *et al.*, 1999, Hegrenes, 2001, Andersson, 2003, Proulx & Magnan, 2004, Ollson & Eklön, 2005), οι αναλύσεις των Γενικών Γραμμικών Μοντέλων κατέδειξαν πως δεν υπήρχε συσχέτιση της μορφολογίας των εντατικά εκτρεφόμενων ιριδιζουσων πέστρφων με τη σύσταση της χορηγούμενης ιχθυοτροφής. Επομένως, το σχήμα του σώματος των ιχθύων επηρεάζονταν κυρίως από τη θερμοκρασία του νερού, καθώς και τις κλιματικές διακυμάνσεις ανάμεσα στα ελληνικά ρέοντα συστήματα, παρά από τις διαφορετικές ιχθυοτροφές που χορηγούνταν σε κάθε εντατική εκτροφή. Σε πλήρη συμφωνία με τη μελέτη μας και αναφορικά με άλλα είδη σολομοειδών, όπως είναι ο Αρκτικός σολομός *Salvelinus alpinus* (Linnaeus, 1758), η μελέτη του Andersson (2003) ανέφερε ότι η σύσταση της ιχθυοτροφής ως μοναδικός παράγοντας δεν ήταν αρκετός ώστε να προκαλέσει την εμφάνιση διαφορετικών φαινοτύπων και ότι η ανάπτυξη πολυμορφισμών ήταν αποτέλεσμα επίδρασης άλλων παραγόντων, όπως είναι η δυναμική του πληθυσμού ή ο κίνδυνος ύπαρξης θηρευτών. Αντίθετα, η μελέτη του Hegrenes (2001) εξέτασε την επίδραση τριών διαφορετικών ιχθυοτροφών στα μορφολογικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με την πρόσληψη τροφής στα εκτρεφόμενα ηλιόψαρα *Lepomis humilis* (Girard, 1858) συμπεραίνοντας πως η σύσταση της ιχθυοτροφής είχε καθοριστική επίδραση στην εμφάνιση μορφολογικών διαφοροποιήσεων.

## 5.5 Συμπέρασμα

Επομένως, η χρήση της γεωμετρικής μορφομετρίας αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο το οποίο δύναται να συμβάλλει αποτελεσματικά στην ιχθυλασιμότητα των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών ιριδιζουσας πέστρφας, καθώς το σχήμα του

σώματος των ιχθύων διαφαίνεται πως επηρεάζεται από την γεωγραφική προέλευση των εντατικών εκτροφών. Η μέθοδος αυτή μπορεί να συνδράμει στην αξιολόγηση περιβαλλοντικών κινδύνων και στην εκτίμηση ενδεχόμενων οικολογικών επιπτώσεων, προάγοντας την επιστημονική έρευνα, αναφορικά με το πεδίο της αειφορικής διαχείρισης των υδατοκαλλιεργειών.

## 6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διενεργηθείσα πληθυσμιακή γενετική μελέτη που περιλάμβανε τα ίδια δείγματα από τους εντατικά εκτρεφόμενους πληθυσμούς ιριδίζουσας πέστροφας που εξετάστηκαν, τόσο στην μορφομετρική ανάλυση, όσο και στην ανάλυση των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων του μυϊκού ιστού, κατέδειξε τον σαφή διαχωρισμό των ιχθυοπληθυσμών σε δύο ομάδες (1<sup>η</sup> Ομάδα: Άγκιστρο – Άγιος Ιωάννης – Τριπόταμος – Εδεσσαίος2) και (2<sup>η</sup> Ομάδα: Λούρος – Κράθης – Μπουρνιά – Εδεσσαίος1 – Αράπιτσα – Μέγδοβας) ως προς τον άξονα 1 (77,64%), σύμφωνα με την Ανάλυση Κύριων Συντεταγμένων (Principal Coordinates Analysis – PCoA). Αυτός ο διαχωρισμός σε δύο ομάδες ήταν σε μεγάλο βαθμό ταυτόσημος με τον διαχωρισμό σε δύο ομάδες που ανιχνεύθηκε με τη χρήση της γεωμετρικής μορφομετρίας και των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής γενετικής μελέτης με τα αντίστοιχα της γεωμετρικής μορφομετρικής ανάλυσης, οι κύριες διαφορές συνοψίζονται στο γεγονός ότι ο πληθυσμός του Εδεσσαίου2 κατανεμήθηκε στην πρώτη ομάδα, ενώ οι πληθυσμοί Αράπιτσας και Μέγδοβα στη δεύτερη ομάδα, αντίστοιχα. Εξαιτίας του γεγονότος ότι ο διαχωρισμός των ιχθυοπληθυσμών σε δύο ομάδες ήταν ταυτόσημος συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ της γεωμετρικής μορφομετρικής ανάλυσης και των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων, οι κύριες

διαφορές μεταξύ των προφίλ των ελεύθερων αμινοξέων και της προηγούμενης πληθυσμιακής γενετικής μελέτης ήταν όμοιες με τις προαναφερθείσες διαφορές μεταξύ της γεωμετρικής μορφομετρικής ανάλυσης και της γενετικής πληθυσμιακής μελέτης.

Επιπρόσθετα, η πληθυσμιακή γενετική μελέτη αποκάλυψε πως η συνολική γενετική ποικιλότητα οφείλονταν κυρίως σε διαφορές ενδοπληθυσμιακά, παρά σε διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Παράλληλα, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος STRUCTURE v. 2.3 αποκαλύφθηκε η ύπαρξη δύο πιθανών ομάδων μεταξύ των εντατικά εκτρεφόμενων πληθυσμών και όλες οι εντατικές εκτροφές ιριδίζουσας πέστροφας που εξετάστηκαν απαρτίζονταν από άτομα που ανήκαν και στις δύο ομάδες. Εντούτοις, οι αναλύσεις των Γενικών Γραμμικών Μοντέλων έδειξαν ότι οι απλότυποι δεν είχαν επίδραση στην παρατηρούμενη μορφολογική διαφοροποίηση (GLM,  $P > 0,05$ ), καταδεικνύοντας πως τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά επηρεάστηκαν κατά κύριο λόγο από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τις συνθήκες εκτροφής, σε σύγκριση με τη συμβολή του γενετικού παράγοντα.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Adams, D. C., Rohlf F. J. and Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71(1), pp. 5-16. doi: 10.1080/11250000409356545

Agreste, 2009. La salmoniculture française à l'étiage. Agreste Primeur: 4 (in French).



Aguilar, A. and Garza, J. C. (2006). A comparison of variability and population structure for major histocompatibility complex and microsatellite loci in California coastal steelhead (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Molecular Ecology*, 15(4), pp. 923–937.

Anaya, J. P. and D'Aniello, S. (2006). Free amino acids in the nervous system of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. *International Journal of Biological Sciences*, 2(2), pp. 87–92. doi:10.7150/ijbs.2.87

Andersson, J. (2003). Effects of diet-induced resource polymorphism on performance in arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Evolutionary Ecology Research*, 5, pp. 213–228.

Antoine, F. R., Wei, C. I., Littell, R. C., Quinn, B. P., Hogle, A. D. and Marshall, M. R. (2001). Free amino acids in dark- and white-muscle fish as determined by O-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Journal of Food Science*, 66(1), pp. 72-77.

Apostolidis, A. P., Loukovitis, D. and Tsigenopoulos, C. (2008). Genetic characterization of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the Southern Balkans using mtDNA sequencing and RFLP analysis. *Hydrobiologia*, 600, pp. 169-176. doi: 10.1007/s10750-007-9229-4

AQUABREEDING – 6<sup>th</sup> Framework Programme for Research (FP6) (2008). Final Report Summary – Towards enhanced and sustainable use of genetics and breeding in the European aquaculture industry.

Archer, G. P., Evans, J., Jessen, F., Nielsen, J. and James, S. (1998). Factors affecting the quality of frozen meat and fish. In: C. J. Kennedy, & A. G.P., *Maximising quality*

*and stability of frozen food - A producers guide to the state of the art*, vol. 2 (pp. 1-53): University of Leeds, UK.

Bandelt, H. J., Forster, P. and Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, pp. 37-48.

Beacham, T. D. (1990). A genetic analysis of meristic and morphometric variation in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) at three different temperatures. *Canadian Journal of Zoology*, 68, pp. 225–229.

Behnke, R. J. (2002). Trout and Salmon of North America. The Free Press, New York, 359 pp.

Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Brannon, E. L., Powell M. S., Quinn, T. P. and Talbot, A. (2004). Population Structure of Columbia River Basin Chinook Salmon and Steelhead Trout. *Reviews in Fisheries Science*, 12, pp. 99-232. doi:10.1080/10641260490280313

Buentello, A. J. and Gatlin, D. M. (2002). Preliminary observations on the effects of water hardness on free taurine and other amino acids in plasma and muscle of channel Catfish. *North American Journal of Aquaculture*, 64(2), pp. 95-102.

Cadrin, S. (2000). Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, pp. 91-112.

Camarena-Rosales, F., Ruiz-Campos, G., de La Rosa-Velez, J., Mayden, L.R., Hendrickson, D.A. and Varela-Romero, A. (2008). Mitochondrial haplotype variation

in wild trout populations (Teleostei: Salmonidae) from northwestern Mexico. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 18, pp. 33–45. doi: 10.1007/s11160-007-9060-z

Campana, S. E., Gagné, J. A. and McLaren, J. W. (1995). Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS. *Marine Ecology Progress Series*, 122, pp. 115–120.

Carter, C. G., Hel, Z. Y., Houlihan, D. F., McCarthy, I. D. and Davidson, I. (1995). Effect of feeding on the tissue free amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, 14, pp. 153–164.

Carter, C. G. and Houlihan, D. F. (2001). Protein synthesis. In Wright, P. A. & P. M. Anderson (eds), Nitrogen Excretion. Academic Press, San Diego: 31–76

Casselman, J. M., Collins, J. J., Crossman, E. J., Ihssen, P. E. and Spangler, G. R. (1981). Lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in the Great Lakes region. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38, pp. 1772–1789.

Cleveland, B. M. and Burr, G. S. (2011). Proteolytic response to feeding level in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 319, pp. 194–204.

Copp, G. H., Wesley, K. J. and Vilizzi, L. (2005). Pathways of ornamental and aquarium fish introductions into urban ponds of Epping Forest (London, England): the human vector'. *Journal of Applied Ichthyology*, 21, pp. 263-274.

Cowey, C. B. and Walton, M. (1989). Intermediary metabolism. In *Fish Nutrition* (ed. J. E. Halver), pp. 259–329. New-York: Academic Press.

Day, T. and McPhail, J. D. (1996). The effect of behavioral and morphological plasticity on foraging efficiency in the threespine stickleback (*Gasterosteus sp.*). *Oecologia*, 108, pp. 380–388.

Deiner, K., Garza, J. C., Coey, R. and Girman, D. J. (2007). Population structure and genetic diversity of trout (*Oncorhynchus mykiss*) above and below natural and man-made barriers in the Russian River, California. *Conservation Genetics*, 8, pp. 437-454. doi: 10.1007/s10592-006-9183-0

Earl, D.A. and von Holdt, B.M. (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resource*, 4, pp. 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

Economidis, P. S., Dimitriou, E., Pagoni, R., Michaloudi, E. and Natsis, L. (2000). Introduced and translocated fish species in the inland waters of Greece. *Fisheries Management and Ecology*, 7, pp. 239-250. doi: 10.1046/j.1365-2400.2000.00197.x

EFSA (2009). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed rainbow trout. *The EFSA Journal*, 1013, pp. 1–55.

ELSTAT (Hellenic Statistical Authority) (2014). Quantity and value of cultivated species: 2

Eskin, N. A. (2012). *Biochemistry of Foods* 2nd Edition. Academic Press.

EUMOFA (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products), 2013. Monthly Highlights August-September: 14.

- Excoffier, L. and Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite v3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource*, 10, pp. 564-567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x;
- Farrington, L. W., Austin, C. M., Burridge, C. P., Gooley, G. J., Ingram, B. A. and Talbot, B. (2004). Allozyme diversity in Australian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Management and Ecology*, 11, pp. 97-106.
- Favaloro, E. and Mazzola, A. (2003). Shape change during the growth of sharpsnout seabream reared under different conditions in a fish farm of the southern Tyrrhenian Sea. *Aquacultural Engineering*, 29, pp. 57–63.
- FEAP, (2016). European Aquaculture Production Report 2007-2015. (ed FEAP Secretariat). Federation of European Aquaculture Producers.
- Fleming, I. A., Jonsson, B. and Gross, M. R. (1994). Phenotypic divergence of sea-ranched, farmed and wild salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, pp. 2808–2824.
- Foegeding, E., Lanier, T. and Hultin, H. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. *Food Chemistry*, 3, pp. 879-942.
- Framian, B.V. (2009). Review of the EU aquaculture sector and results of costs and earnings survey. Final Report, Reference No FISH/2006/15 - Lot 6, 69 pp.
- Fraser, D. J., Weir, L. K., Bernatchez, L., Hansen, M. M. and Taylor, E. B. (2011). Extent and scale of local adaptation in salmonid fishes: review and meta-analysis. *Heredity*, 106(3), pp. 404-420. doi: 10.1038/hdy.2010.167

- Fuentes, A., Fernandez-Segovia, I., Escriche, I. and Serra, J. A. (2009). Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. *Food Chemistry*, 112, pp. 295–302.
- Fuke, S. (1994). Taste-active components of seafoods with special reference to umami substances. In F. Shahidi & J. R. Botta (eds), *Seafoods Chemistry Processing Technology and Quality*. Blackie Academic & Professional, Glasgow: 115–139.
- Gall, G.A.E. and Crandell, P. A. (1992). The rainbow trout. *Aquaculture*, 100, pp. 1-10.
- Giuffra, E., Bernatchez, L. and Guyomard, R. (1994). Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from Northern Italy. *Molecular Ecology*, 3, pp. 161–172. doi: 10.1111/j.1365-294X.1994.tb00117.x
- Glover, K. A. (2008). Genetic characterisation of farmed rainbow trout in Norway: intra- and inter-strain variation reveals potential for identification of escapees. *BMC Genetics*, 9, pp. 87. doi:10.1186/1471-2156-9-87
- Goodall, C. (1991). Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 53, pp. 285–339.
- Gregg, R. E., Rhodes, O. E. and Armstrong, G. (2001). A Genetic Analysis of the London Strain of Rainbow Trout. *Animal Genetics*, 32(4), pp. 210-214.
- Gross, R., Lulla, P. and Naver, T. (2007). Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe. *Aquaculture*, 272, pp. 139–146. doi: 10.1016/j.

Haard, N. F. (1992). Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, 25, pp. 289-307.

Haas, G. R. and McPhail, J. D. (2001). The post-Wisconsinan glacial biogeography of bull trout (*Salvelinus confluentus*): a multivariate morphometric approach for conservation biology and management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58, pp. 2189–2203.

Haefeli, R. J. and Glaser, D. (1990). Taste responses and thresholds obtained with the primary amino acids in humans. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 23, pp. 523–527.

Hard, J. J., Winans, G. A. and Richardson, J. C. (1999). Phenotypic and genetic architecture of juvenile morphology in Chinook salmon. *The American Genetic Association*, 90, pp. 597–606.

Hard, J. J., Berejikian, B. A., Tezak, E. P., Schroder, S. L., Knudsen, C. M. and Parkerd, L. T. (2000). Evidence for morphometric differentiation of wild and captive reared adult coho salmon: a geometric analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 58, pp. 61–73.

Haugen, T. O. and Vøllestad, L. A. (2000). Population differences in early life-history traits in grayling. *Journal of Evolutionary Biology*, 13, pp. 897-905.

Hauser, L., Seamons, T. R., Dauer, M., Naish, K. A. and Quinn, T. P. (2006). An empirical verification of population assignment methods by marking and parentage data: hatchery and wild steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) in Forks Creek, Washington, USA. *Molecular Ecology*, 15, pp. 3157–3173. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03017.x

- Heath, D. D., Bettles, C.M., Jamieson, S., Stasiaka, I. and Dockera, M.F. (2008). Genetic differentiation among sympatric migratory and resident life history forms of rainbow trout in British Columbia. *Transaction of the American Fisheries Society*, 137(4), pp. 1268-127. doi:10.1577/T05-278.1
- Hedenskog, M., Petersson, E., Jarvi, T. and Khamis, M. (1997). Morphological comparison of natural produced Atlantic salmon (*Salmo salar* L), anadromous brown trout (*Salmo trutta* L), and their hybrids. *Nordic Journal of Freshwater Research*, 73, pp. 35–43.
- Hegrenes, S. (2001). Diet-induced phenotypic plasticity of feeding morphology in the orange spotted sunfish, *Lepomis humilis*. *Ecology of Freshwater Fish*, 10, pp. 35–42.
- Hendry, A. P., Wenburg, J. K., Bentzen, P., Volk, E. C. and Quinn, T. P. (2000). Rapid evolution of reproductive isolation in the wild: evidence from introduced salmon. *Science*, 290, pp. 516–518.
- Hilderbrand, R. H., Lemly, A. D., Dolloff, C. A. and Harpster, K. L. (1997). Effects of large woody debris placement on stream channels and benthic macroinvertebrates. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, pp. 931-939.
- Hockaday, S., Beddow, T. A., Stone, M., Hancock, P. and Ross, L. G. (2000). Using truss networks to estimate the biomass of *Oreochromis niloticus*, and to investigate shape characteristics. *Journal of Fish Biology*, 57, pp. 981–1000. doi: 10.1006/jfbi.2000.1363
- Hollander, J. and Butlin, R. G. (2010). The adaptive value of phenotypic plasticity in two ecotypes of a marine gastropod. *BMC Evolutionary Biology*, 10, pp. 333 <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/333>



Houlihan, D. F., Carter, C. G. and McCarthy, I. D. (1995a). Protein synthesis in fish, In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* Vol. 4 (eds Hochachka, P. & Mommsen, T.). Amsterdam: Elsevier. Chapter 8.

Hunter, C. J. (1991). *Better trout habitat*. Montana Land Reliance. Island Press, Washington, DC. 320 pp.

Hwang, D. F., Chen, T. Y., Shiau, C. Y. and Jeng, S. S. (2000). Seasonal variations of free amino-acids and nucleotide-related compounds in the muscle of cultured Taiwanese puffer *Takifugu rubripes*. *Fisheries Science*, 66, pp. 1123–1129.

Ihssen, P. E., Booke, H. E., Casselman, J. M., McGlade, J. M., Payne, N. R. and Utter, F. M. (1981). Stock identification: materials and methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38, pp. 1838–1855.

Janssen, K., Chavanne, H., Beventsen, P. and Komen, H. (2015). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – Current status of selective breeding in Europe. FISHBOOST-7<sup>th</sup> Framework Programme for Research and Technical Development under grant agreement No 613611.

Jerry, D. R. and Cairns, S. C. (1998). Morphological variation in the catadromous Australian bass, from seven geographically distinct riverine drainages. *Journal of Fish Biology*, 52(4), pp. 829-843.

Johnson, N. A., Rexroad, C. E., Hallerman, E. M., Vallejo, R. L. and Palti, Y. (2007). Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture*, 266(1-4), pp. 53-62. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02. 054

Jombart, T., Pontier, D. and Dufour, A.B. (2009). Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity*, 102, pp. 330–341. doi:10.1038/hdy.2008.130

Karlsson, A., Eliason, E. J., Mydland, L. T., Farrell, A. P. and Kiessling, A. (2006). Postprandial changes in plasma free amino acid levels obtained simultaneously from the hepatic portal vein and the dorsal aorta in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 209, pp. 4885–4894. doi: 10.1242/jeb.02597

Katsares, V., Apostolidis, A. P., Triantafyllidis, A., Kouvatsi, A. and Triantafyllidis, C. (2003). Development of mitochondrial DNA primers for use with homarid lobsters. *Marine Biotechnology*, 5, pp. 469-479. doi: 10.1007/s10126-002-0097-7

Kavanagh, K. D., Haugen, T. O., Gregersen, F., Jernvall, J. and Vøllestad, L. A. (2010). Contemporary temperature-driven divergence in a Nordic freshwater fish under conditions commonly thought to hinder adaptation. *BMC Evolutionary Biology*, 10, pp. 350. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-350>

Kendall, D. (1986). The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9, pp. 428–430.

Kiessling, A., Espe, M., Ruohonen, K. and Mørkøre, T. (2004). Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO<sub>2</sub> anaesthesia. *Aquaculture*, 236, pp. 645-657.

Kinnison, M. T., Unwin, M. J. and Quinn, T. P. (2008). Ecoevolutionary versus habitat contributions to invasion in salmon: experimental evaluation in the wild. *Molecular Ecology*, 17, pp. 405–414.

Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11, pp. 353-357. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x

Kohlmann, K., Kersten, P. and Flajshans, M. (2005). Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture*, 247, pp. 253-266. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.024

Kosmas, C., Danalatos, N. and Mizara, A. (1998a). Land degradation in Mediterranean environments of the world. Nature and extent, causes and solutions. In Conacher, A. & M. Sala (eds), John Wiley & Sons, Chichester, England: 67–77.

Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Esaiassen, M., Olsson, G. B., Godvik, L. A., Seppola, M. A., and Olsen, R. L. (2006). Effects of pre-rigour filleting on quality aspects of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 37(15), pp. 1556-1564.

Landergren, P. (1999). Spawning of anadromous rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a threat to sea trout, *Salmo trutta* L., populations? *Fisheries Research*, 40, pp. 55-63.

Limin, L., Feng, X. and Jing, H. (2006). Amino acid composition difference and nutritive evaluation of the muscle of five species of marine fish, *Pseudosciaena crocea* (large yellow croaker), *Lateolabrax japonicus* (common sea perch), *Pagrosomus major* (red seabream), *Seriola dumerili* (Dumeril's amberjack) and *Haplogenyx nitens* (black grunt) from Xiamen Bay of China. *Aquaculture Nutrition*, 12, pp. 53–59.

Lõhmus, M., Sundström, L. F., Björklund, M. and Devlin, R. H. (2010). Genotype-Temperature Interaction in the Regulation of Development, Growth, and Morphometrics in Wild-Type, and Growth-Hormone Transgenic Coho Salmon. *PLoS ONE*, 5, e9980. doi:10.1371/journal.pone.0009980

Loy, A., Boglione, C., Gagliardi, F., Ferrucci, L. and Cataudella, S. (2000). Geometric morphometrics and internal anatomy in sea bass shape analysis (*Dicentrarchus labrax* L., Moronidae). *Aquaculture*, 186, pp. 33–44.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, pp. 209–220.

Mantel, N. and Valand, R. S. (1970). A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics*, 26, pp. 547–558. doi: 10.2307/2529108

Martsikalis, P., Gkafas, G. A., Apostolidis, A. P. and Exadactylos, A. (2014). Genetic Structure Profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farmed Strains in Greece. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14, pp. 749–757. doi: 10.4194/1303-2712-v14\_3\_17

Martsikalis, P. V., Kavouras, M., Gkafas, G. A., Apostolidis, A. P., Boziaris, I. S. and Exadactylos, A. (2018). Morphological and free amino acid profile variability, as a tool for stock identification among farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* of different origin. *Aquaculture Research*, 49(2), pp. 621–630. <https://doi.org/10.1111/are.13491>

McCusker, M. R., Parkinson, E. and Taylor, E. B. (2000). Mitochondrial DNA variation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across its native range: testing

biogeographical hypotheses and their relevance to conservation. *Molecular Ecology*, 9, pp. 2089–2108. doi: 10.1046/j.1365-294X.2000.01121.x;

Medail, F. and Diadema, K. (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, 36, pp. 1333–1345.

Metusalach, Brown, J. A. and Sharibi, F. (2000). Variations in the contents of crude protein, total and free amino acids of Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) reared at different stocking densities. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 9(3), pp. 39–56.

Minitab 17 Statistical Software, (2010). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com)

Mittelbach, G. G., Osenberg, C. W. and Wainwright, P. C. (1999). Variation in feeding morphology between pumpkinseed populations: phenotypic plasticity or evolution? *Evolutionary Ecology Research*, 1, pp. 111–128.

Murta, A. G. (2000). Morphological variation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Iberian and North African Atlantic: implications for stock identification. *ICES Journal of Marine Science*, 57, pp. 1240–1248.

Narum, S. R., Contor, C., Talbot, A. and Powell, D. M. S. (2004). Genetic divergence of sympatric resident and anadromous forms of *Oncorhynchus mykiss* in the Walla Walla River, USA. *Journal of Fish Biology*, 65(2), pp. 471–488. doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00461.x;

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.

Nei, M. and Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97, pp. 145–163.

Nielsen, J. L. and Fountain, M. C. (1999). Microsatellite diversity in sympatric reproductive ecotypes of Pacific steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) from the Middle Fork Eel River, California. *Ecology of Freshwater Fish*, 8, pp. 159–168.

Norris, A. T., Bradley, D. G. and Cunningham, E. P. (1999). Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon, *Salmo salar* populations. *Aquaculture*, 180, pp. 247–264. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00212-4

Ok, I. H., Bai, S. C., Park, G. J., Choi, S. M. and Kim, K. W. (2001). The patterns of plasma free amino acids after force-feeding in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) with and without dorsal aorta cannulation. *Aquaculture Research*, 32, pp. 70–75.

O'Higgins, P. (2000). The study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry. *Journal of Anatomy*, 197, pp. 103–120.

Ollson, J. & Eklöv, P. (2005). Habitat structure, feeding mode and morphological reversibility: factors influencing phenotypic plasticity in perch. *Evolutionary Ecology Research*, 7, pp. 1109–1123.

Oscoz, J., Leunda, P. M., Campos, F., Escala, M. C., García-Fresca, C. and Miranda, R. (2005). Spring diet composition of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in the Urederra River (Spain). *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 41(1), pp. 27–34.

Pakkasmaa, S. and Piironen, J. (2001). Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72, pp. 231–239.

Panigrahi, A. K., Rath, S. and Misra, B. N. (1979). Change in DNA, protein and free amino acids of a freshwater fish *Tilapia mossambica* Peters, during aging. *Indian Journal of Experimental Biology*, 17, pp. 699–701.

Peakall, R. and Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, pp. 2537–2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460;

Peres-Neto, P. R and Magnan, P. (2004). The influence of swimming demand on phenotypic plasticity and morphological interaction: a comparison of two polymorphic charr species. *Oecologia*, 140, pp. 36–45.

Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L. and Estoup, A. (2004). GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95, 536–539.

Pottinger, T. G. (2001). Effects of husbandry stress on flesh quality indicators in fish. In Kestin, S. C. & P. D. Warriss (eds), *Farmed Fish Quality*. Blackwell Science, London: 145–160.

Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, pp. 945 – 959.

Proulx, R. and Magnan, P. (2004). Contribution of phenotypic plasticity and heredity to the trophic polymorphism of lacustrine brook charr (*Salvelinus fontinalis* M.). *Evolutionary Ecology Research*, 6, pp. 631–658.

Pulcini, D., Wheeler, P. A., Cataudella, S., Russo, T. and Thorgaard, G. H. (2013). Domestication shapes morphology in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 82, pp. 390–407. doi:10.1111/jfb.12002

Pulcini, D., Russo, T., Reale, P., Massa-Gallucci, A., Brennan, G. and Cataudella, S. (2014). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) develop a more robust body shape under organic rearing. *Aquaculture Research*, 45, pp. 397–409. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03236.x

Quinn T. P., Kinnison M. T. and Unwin, M. J. (2001). Evolution of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) populations in New Zealand: pattern, rate and process. *Genetica*, 112-113, pp. 493–513.

R Development Core Team, (2012). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R foundation for statistical Computing URL <http://www.R-project.org>.

Rannala, B. and Mountain, J. L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, pp. 9197–9201.

Raymond, M. and Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49, pp. 1280–1283.

Rice, W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, pp. 223–225.

Robinson, B. W. and Wilson, D. S. (1995). Experimentally induced morphological diversity in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Copeia*, 2, pp. 294–305.



Robinson, J. W., Yanke, D., Mizra J. and Ballantyne, J. S. (2011). Plasma free amino acid kinetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a bolus injection of 15N-labelled amino acids. *Amino Acids*, 40, pp. 689–696.

Rohlf, F. J., 2006. *TpsDig Version 2.10, Digitalized Landmarks and Outlines*. Stony Book, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.

Rohlf, F. J. and Marcus, L. F., (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8, pp. 129–132.

Rohlf, F. J. and Slice, D. (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39, pp. 40–59.

Sajedi, R. H., Aminzadeh, S., Naderi-Manesh, H., Sadeghizadeh, M., Abdolhay, H. and Naderi-Manesh, M. (2003). Genetic Variation Within and Among Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Hatchery Populations from Iran Assessed by PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA Segments. *Journal of Food Science*, 68(3), pp. 870–873. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb08258.x

Savini, D., Occhipinti-Ambrogi, A., Marchini, A., Tricarico, E., Gherardi, F., Olenin, S. and Gollasch, S. (2010). The top 27 animal alien species introduced into Europe for aquaculture and related activities. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, pp. 1–7.

Scheiner, S. M. (1993). Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 24, pp. 35–68.

Schumacher, A., Wax, C. and Gropp, J. (1997). Plasma amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed intact protein or a crystalline amino acid diet. *Aquaculture*, 151, pp. 15–28.

Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T. S. and Seland, A. (1997). Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, 62(4), pp. 898–905.

Sigurðsladóttir, S., Sigurðardóttir, M. S., Ingvarsdóttir, H., Torrissen, O. J. and Hafsteinsson, H. (2001). Microstructure and texture of fresh and smoked Atlantic salmon, *Salmo salar* L., filets from fish reared and slaughtered under different conditions. *Aquaculture Research*, 32(1), pp. 1–10.

Silverstein, J. T., Rexroad, C. E. and King, T. L. (2004). Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquatic Research*, 35(1), pp. 40–48. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.00979.x

Skoulikidis, N. Th. (1993). Significance evaluation of factors controlling river water composition. *Environmental Geology*, 22, pp. 178–85.

Skoulikidis, N. Th., Amaxidis, Y., Bertahas, I., Laschou, S. and Gritzalis, K. (2006). Analysis of factors driving stream water composition and synthesis of management tools. A case study on small/medium Greek catchments. *Science of the Total Environment*, 362, pp. 205–241.

Skoulikidis, N. Th., Gritzalis, K., Kouvarda, Th. and Buffagni, A. (2004). The development of an ecological quality assessment and classification system for Greek running waters based on benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, 516, pp. 149–60.

Stanković, D., Stephens, M. R. and Snoj, A. (2016). Origin and introduction history of self-sustaining rainbow trout populations in Europe as inferred from mitochondrial

DNA and a Y-linked marker. *Hydrobiologia*, 770, pp. 129 – 44. doi:10.1007/s10750-015-2577-6

Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) – Economic Report of the EU Aquaculture Sector (EWG-16-12); Publications Office of the European Union, Luxembourg

Staley, K. and Mueller, J. (2000). Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). USDA Natural Resources Conservation Service. Fish and Wildlife Habitat Management Leaflet. Volume 13. [on-line]

<ftp://ftp-fc.sc.egov.usda.gov/WHMI/WEB/pdf/RAINBOW1.pdf>

Suyama, M., Hirano, T. and Suzuki, T. (1986). Buffering capacity of free histidine and its related dipeptides in white and dark muscles of yellowfin tuna. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 52, pp. 2171–2175.

Swain, D. P., Riddell, B. E. and Murray, C. B. (1991). Morphological differences between hatchery and wild populations of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): environmental versus genetic origin. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 18, pp. 1783–1791.

Swain, D. P. and Foote, C. J. (1999). Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*, 43, pp. 113–128.

Tantikitti, C. and March, B. E. (1995). Dynamics of plasma free amino acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under variety of dietary conditions. *Fish Physiology & Biochemistry*, 14, pp. 179–194.

Tajima, F. (1989). Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, pp. 585–595.

Taylor, E. B. (1986). Differences in morphology between wild and hatchery populations of juvenile coho salmon. *Progressive Fish-Culturist*, 48, pp. 171–176.

Tzedakis, P. C., Lawson, I. T., Frogley, M. R., Hewitt, G. M. and Preece, R. C. (2002b). Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. *Science*, 297, pp. 2044–2047.

Unwin, M. J., Kinnison, M. T., Boustead, N. C. and Quinn, T. P. (2003). Genetic control over survival in Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.): experimental evidence between and within populations of New Zealand chinook salmon (*O. tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60, pp. 1–11.

Van Marrewijk, W. J. A. and Ravestein, H. J. L. (1974). Amino acid metabolism of *Astacus leptodactylus* esch-I. Composition of the free and protein-bound amino acids in different organs of the crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47, pp. 531–542.

Van Waarde, A. (1988). Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 91, 207–228.

Venugopal, V. and Shahidi, F. (1996). Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, 12, pp. 175–197.

von Cramon-Taubadel, N., Ling, E. N., Cotter, D. and Wilkins, N. P. (2005). Determination of body shape variation in Irish hatchery-reared and wild Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 66, pp. 1471–1482.

Ward, R. D., Jorstada, K. E. and Maguire, G. B. (2003). Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) introduced to Western Australia. *Aquaculture*, 219, pp. 169–179. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00569-0

Weiss, S. M. and Kulikowski, C. A. (1991). *Computer Systems That Learn*. Morgan Kaufmann. San Mateo CA.

Welcomme, R. L. and Bartley, D. M. (1998). Current approaches to the enhancement of fisheries. *Fisheries Management and Ecology*, 5, pp. 351–382.

Wessel, M. L., Smoker, W. W. and Joyce, J. E. (2006). Variation of morphology among juvenile chinook salmon of hatchery, hybrid, and wild origin. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135, pp. 333–340.

Williams, I., Reeves, G. H., Graziano, S. L. and Nielsen, J. L. (2007). Genetic investigation of natural hybridization between rainbow and coastal cutthroat trout in the Copper River Delta, Alaska. *Transactions of the American Fisheries Society*, 136(4), pp. 926–942. doi: 10.1577/T06-214.1

Wright, S. (1951). The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, pp. 323–354. doi: 10.1111/j. 1469-1809.1949.tb02451.x;

Yamamoto, T., Unuma, T. and Akiyama, T. (2000). The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 182, pp. 353–372.

Yousefian, M., Laloei, F., Hedayatifard, M., Bahrekazemi, M., Tagavi, M. J., Irani, M., Azizifar, V. and Khasaesi, E. (2012). Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stocks of different origin. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 11(9), pp. 1196–1201. doi: 10.5829/idosi.mejsr.2012.11. 09. 63218

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. and Fink, W. L. (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier Academic Press, San Diego CA.

Zhao, Y., Zhu, X. and Sun, X. (2008). Microsatellite diversity in cultured populations of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in China. *Journal of Fish Biology*, 73, pp. 1249–1255. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.01894.x

Zhou, J., Wu, Q., Wang, Z. and Yuzhen, Y. (2004). Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 40, pp. 1144–1148. doi: 10.1023/B:RUGE.0000044758.51875.25



## PROOF

**Genetic Structure Profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farmed Strains in Greece****Petros Martsikalis<sup>1</sup>, Georgios A. Gkafas<sup>1</sup>, Apostolos P. Apostolidis<sup>2</sup>, Athanasios Exadactylos<sup>1,\*</sup>**<sup>1</sup> University of Thessaly, School of Agricultural Sciences, Department of Ichthyology and Aquatic Environment, Volos.<sup>2</sup> Aristotle University of Thessaloniki, School of Agriculture, Department of Animal Production, Thessaloniki, 54124, Greece.\* Corresponding Author: Tel.: +30.24210 93073; Fax: +30.24210 93157;  
E-mail: exadact@uth.grReceived 15 March 2014  
Accepted 19 August 2014**Abstract**

The rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, comprises a non-indigenous species of the European freshwater ecosystem. Due to its remarkable advantages of fast-growing and facultative adaptability in various habitats under different conditions, it has become the most dominant commercially reared species of freshwater aquaculture in Greece. Despite its economic importance, there is a dearth of population genetic studies regarding the origin of any posterior introduction by the private aquaculture sector. In this study, a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay was used, in order to assess variation in five mitochondrial DNA protein-encoding regions and the control region, covering more than 5,500 bp of the 16,600 bp total mitochondrial genome size. The samples derived from 10 rainbow trout farms throughout Greece representative of the freshwater aquaculture sector. The conducted population structure analysis revealed two major clusters among the farmed-rainbow trout populations. Moreover, the overall genetic diversity was substantially attributed to the diversity within populations rather than among them. In any case, both factors obtained from AMOVA analysis were statistically significant. The obtained haplotype network reinforced the existence of two central haplotype clusters among the farmed-rainbow trout populations in the Greek freshwater aquaculture sector.

**Keywords:** *Oncorhynchus mykiss*, freshwater aquaculture, genetic structure, founder populations.

**Introduction**

The rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has a worldwide distribution, fact that is strongly related to its remarkable fast-growing and facultative adaptability in various habitats, under different conditions. The commercial aquaculture took advantage of these attributes and in 2012 its global production reached a total of 732,432 tons, rendering it among the most dominant reared commercial species of freshwater aquaculture with an estimated economic value of 2.6 billion Euros (FAO, 2013).

The native range of the rainbow trout includes south-western Alaska to the Sierra Madre Occidental in Mexico and tributaries of the Pacific Ocean in Asia (Behnke, 2002). As far as its naturalized range is concerned, it is currently distributed throughout the eastern coast of North America where self-sustaining populations have proliferated (Behnke, 2002). It comprises a non-indigenous species of the Greek freshwater ecosystem (Economidis *et al.*, 2000). Since its deliberate introduction as eggs from Switzerland in the early 1950s, focusing primarily on the enhancement of the domestic freshwater fish

production and the economic growth of the sector, it inhabits in aquaculture facilities. These are established mainly in rivers, streams and lakes throughout Greece (Economidis *et al.*, 2000). Since the 1950s, the origin of any posterior introduction by the private aquaculture sector has not been documented. Particularly, there are 94 producers in total, of which only 6 major companies produce more than 100 tons, 14 medium ones produce from 50 to 100 tons and 74 small establishments produce less than 50 tons (Framian, 2009; Anonymous, 2009). In 2006, the total production of rainbow trout in Greece accounted for 3,643 tons, contributing to a value of 10 million Euros to Gross National Income (GNI) (Framian, 2009).

Despite the fact that rainbow trout comprises the major freshwater reared species in Greece, literature review revealed a dearth of population genetic studies. Likewise, only two population genetic studies of reared *O. mykiss* have been conducted in Europe, the first referred to northern and eastern Europe (Finland, Denmark, Sweden, Norway, Estonia and Poland) (Gross *et al.*, 2007) and the second regarding to Norwegian fjords (Glover, 2008). Particularly,

according to Gross *et al.* (2007) the majority of European strains presented similar levels of variation with Shasta strain derived from California, USA, apart from two Polish strains. In contrast, Glover's (2008) study revealed a considerable genetic variation within and among rainbow trout strains farmed in Norway, a fact that enabled management authorities to identify the farm of origin for escapees.

On the contrary, in other continents and mainly in northern America several population genetic studies have been conducted for natural stocks (McCusker *et al.*, 2000; Narum *et al.*, 2004; Deiner *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Heath *et al.*, 2008) and reared rainbow trout (Sajedi *et al.*, 2003; Silverstein *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007; Camarena-Rosales *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Briefly, concerning the natural rainbow trout populations, McCusker *et al.* (2000) assessed mtDNA variation of *O. mykiss* in northern America by means of RFLPs, revealing two phylogenetically distinct mitochondrial lineages (resident and anadromous). Likewise, Narum *et al.* (2004) using six microsatellites detected a genetic structure between the two major drainages, Walla Walla River and Touchet River, regarding the anadromous and resident trout forms. Heath's *et al.* (2008) study, by means of three types of genetic markers (microsatellites, major histocompatibility complex - MHC, RFLPs), revealed that the migratory and resident forms of *O. mykiss* were genetically differentiated in two different groups. On the other hand, concerning reared rainbow trout, Silverstein's *et al.* (2004) study results, by means of nine microsatellites, implied that three examined domesticated strains (Clear Springs, Troutlodge and University of Washington) were differentiated. Moreover, Johnson *et al.* (2007), using twelve microsatellites studied genetic structure among annual broodstocks, revealing substructure for many generations. Finally, Camarena-Rosales *et al.* (2008) studied the variation and composition of mtDNA haplotypes of four hatcheries from northwestern Mexico, focusing on the mtDNA region between Cytb and D-loop by means of RFLPs. The obtained results showed that trout hatcheries presented more unique haplotypes in comparison with the native populations.

Despite the fact that worldwide aquaculture is the fastest growing animal food-producing sector, the used aquaculture broodstocks are yet to be genetically adequately characterized. Population genetic research using mtDNA markers has contributed substantially to aquaculture management (Billington, 2003) and to the elucidation of genetic relationship among aquaculture strains. Among other advantages (Benzie *et al.*, 2002), their use became quite popular among aquaculture geneticists due to the fact that they successfully revealed significant genetic differences among reared populations (Sajedi *et al.*, 2003; Camarena-Rosales *et al.*, 2008).

The aim of the present study is (1) to evaluate

the specific genetic variation of the mtDNA using PCR-RFLP within and among populations of *O. mykiss* derived from different freshwater aquacultures throughout Greece; (2) to document the current mtDNA composite haplotypes of each aquaculture unit/farm. Both these aims are putting the underpinning stone for future development of selection breeding programs, which would in the long term increase the domestic production, in the framework of the implementation of a sustainable ecosystem conservation management plan.

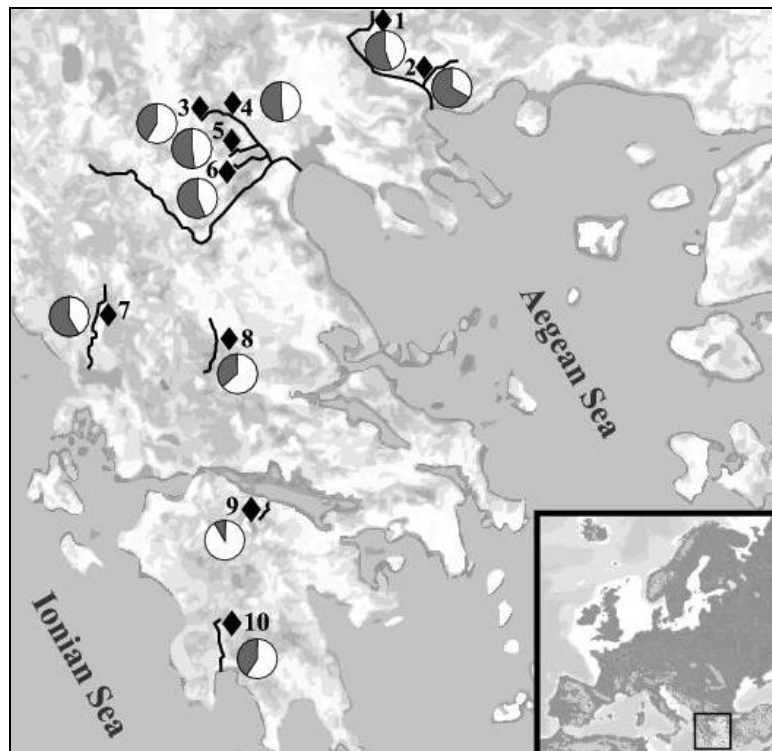
## Materials and Methods

According to the sampling procedure, a total of 564 *Oncorhynchus mykiss* specimens were collected. The samples derived from 10 rainbow trout farms sited in six rivers, two streams and one spring throughout Greece, representative of the freshwater aquaculture sector. Fish were stunned and transported to Aquatic Animal Genetics Lab in UTh according to the Council Regulation (EC) No 1/2005 that sets the framework for the protection and welfare of farmed fish in Hellas. Concerning the infrastructure facilities of each aquaculture, these consisted of raceways adjacent to rivers, streams and springs. The majority of aquaculture enterprises use broodstocks which are mostly derived from the local State Aquaculture Institutes with an inner replenishment every three years, but there are also reported occasional imports of fry fish from abroad. In Figure 1 details concerning the sampling procedure are presented and the coordinates of the sampling sites are indicated.

Total DNA was extracted from muscle tissue, using phenol-chloroform protocol of Taggart *et al.* (1992). Taking into account the study design, all samples were included in the composite RFLP analysis of five mitochondrial DNA protein-encoding regions (including the whole control region and two tRNA genes), covering approximately more than 5,500 bp of the 16,600 bp total mitochondrial genome size. Specifically, a segment consisting of the entire Control Region-Cytb gene (2,096 bp) was amplified using the newly designed forward CR<sub>1</sub>-(5'-CAACTACAAGAACCTAAT-3') and reverse CR<sub>2</sub>-(5'-TAACAGGAACATAAGGAT-3') primers, taking into account the GenBank *O. mykiss* sequences. Moreover, the amplification of the entire NADH dehydrogenase subunits 5 and 6 (ND5/6) segment (2,500 bp) was applied, using the primers ND<sub>L</sub> and ND<sub>G</sub> (Sajedi *et al.*, 2003). Likewise, a fragment of 948 bp, which comprises a part of ATPase-VI and COIII, was amplified using the newly designed forward AT<sub>1</sub>-(5'-GCAGGYATTACTACTCTA-3') and reverse AT<sub>2</sub>-(5'-AGGTAAAGCTGAAGTGTA-3') primers based on *O. mykiss* sequences from GenBank.

In all cases, DNA amplification reaction mixtures consisted of approximately 100 ng template DNA, 10 µl 5× PCR Buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM





**Figure 1.** Map of Greece showing sampling sites of farmed-rainbow trout. Each freshwater aquaculture population is coded with rhombus [1. Agistro (N = 59), 41°22'50.39''N 23°26'18.15''E; 2. Agios Ioannis (N = 57), 41°5'57.30''N 23°35'15.15''E; 3. Edesseos 1 (N = 59), 40°48'30.94''N 22°0'57.25''E; 4. Edesseos 2 (N = 57), 40°48'25.00''N 22°1'19.12''E; 5. Arapitsa (N = 55), 40°36'47.46''N 22°2'49.15''E; 6. Tripotamos (N = 55) 40°28'26.68''N 22°10'37.37''E; 7. Louros (N = 54), 39°25'39.82''N 20°50'43.41''E; 8. Megdovas (N = 57), 39°13'1.53''N 21°44'43.74''E; 9. Krathes (N = 54), 38°1'4.07''N 22°15'5.36''E; 10. Bourmia (N = 57), 37°19'54.77''N 21°55'53.43''E.] Pies denote the presence of two putative clusters K (white, grey color) in each population revealed by STRUCTURE analysis.

of each dNTP, 30 pmol of each primer, 1.2 units of Taq Polymerase (Kapa Biosystems, USA) and sterilized water was added to a final volume of 50  $\mu$ l. The optimized amplification conditions performed in the MJ Research PTC-200 Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) were an initial denaturation at 95°C for 5 min, a strand denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 56.2°C (for CR<sub>1</sub> and CR<sub>2</sub>) or 60°C (for ND<sub>L</sub> and ND<sub>G</sub>) or 62°C (for AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) for 1 min, a primer extension step at 72°C for 1.30 min, repeated for 34 cycles and a final extension step at 72°C for 10 min. The length of PCR products was verified by electrophoresis on 1.5 % agarose gel containing 0.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> ethidium bromide.

Initially, a preliminary screening of a representative sample of PCR products with 10 restriction endonucleases (*AluI*, *AvaII*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII*, *MspI*, *NciI*, *RsaI*, *Taq<sup>q</sup>I*) was conducted. The representative sample consisted of 5 individuals per population, focusing on the detection of at least two restriction patterns for each enzyme. Digestions were performed by incubation in 10  $\mu$ l reaction volumes according to manufacture instructions (New England Biolabs Inc., USA). Afterwards, the separation of the PCR products digested fragments was accomplished by electrophoresis on agarose gel 2 % stained with ethidium bromide and immersed in 1 ×

TAE (Tris base-acetic acid-EDTA) buffer. The restriction patterns on stained gel were visualized under UV light and photographs were taken using the MiniBIS Pro gel documentation system (BioSystematica, United Kingdom).

#### Data Analysis

Initially, the obtained distinct restriction patterns were coded with capital letters, generating composite haplotypes (genotypes) consisting of 10 capital letters, one for each restriction enzyme (Table 1). Moreover, genotypic richness,  $R$  ( $G/N$  ratio), per population was estimated, where  $G$  denotes the number of different observed composite genotypes and  $N$  denotes the number of the tested individuals. ARLEQUIN 3.5 software (Excoffier and Lischer, 2010) was used for the estimation of fixation index  $F_{ST}$  (Wright, 1951), as a measure of genetic differentiation, in parallel with haplotype diversity  $h$  (Nei 1987), nucleotide diversity  $\pi$  (Nei and Tajima, 1981) and Tajima's  $D$  index (Tajima, 1989). Tajima's  $D$  index was estimated in order to identify deviations from the neutral theory of mutation drift equilibrium. ARLEQUIN 3.5 software (Excoffier and Lischer, 2010) was also used for the estimation of statistical significance of pairwise differentiation, taking into account the composite

**Table 1.** Twenty-four composite genotypes (haplotypes-denoted with capital letters) based on RFLP digests of six restriction endonucleases (*AluI*, *AvaII*, *HaeIII*, *HinfI*, *RsaI*, *Taq<sup>q</sup>I*) in ND5/6, one restriction enzyme (*HaeIII*) in ATPase VI-COIII and three restriction enzymes (*AvaII*, *HinfI*, *Taq<sup>q</sup>I*) in Control Region - Cytb fragments of mtDNA; relative frequencies of haplotypes per population, sample size (*N*), genotypic richness (*R*), haplotype diversity (*h*) and nucleotide diversity ( $\pi$ ), including standard deviation (*SD*) and Tajima's *D* index (ns = non-significant)

Haplotype	Composite genotype	Agistro	Ag. Ioannis	Edesseos 1	Edesseos 2	Araptisa	Tripotamos	Louros	Megdovas	Krathes	Bournia
1	BBBBBAABBB				0.04	0.04					
2	BBBBABABAB					0.04			0.04		
3	BBBBAAACAB					0.04					
4	BBBBAAABAB							0.04			
5	BABBBAAABAB							0.04		0.12	
6	BABABABBBB			0.03							
7	BABABAABBB		0.07	0.45	0.26	0.32	0.04	0.09	0.07	0.17	0.15
8	BABABAABAB	0.45	0.22	0.15	0.07	0.08	0.40	0.25	0.44	0.46	0.19
9	BABABAABAA	0.03									
10	BABABABAB				0.04						
11	BABAAAABAB		0.04		0.04						
12	BABAAAAAAB					0.04		0.04	0.07	0.17	0.25
13	ABBBBAABBB				0.07						
14	ABBBABABAB	0.32	0.19	0.25	0.26	0.24	0.04	0.04	0.19		0.15
15	ABBBAAACAB		0.11	0.03		0.08					
16	ABBBAAACAA	0.03									
17	ABBBAAABAB	0.07	0.30	0.03	0.10	0.04	0.52	0.5	0.04		0.07
18	ABBAABABAB		0.07			0.04					
19	ABBAAAABAB					0.04					
20	ABABAABBAB	0.07									
21	ABABAABBAA	0.03		0.03	0.04				0.11	0.08	0.15
22	ABABAAABAA			0.03							0.04
23	AABABAABAB				0.04				0.04		
24	AABAABABAB				0.04						
<i>N</i>		59	57	59	57	55	55	54	57	54	57
<i>R=G/N</i>		0.119	0.123	0.136	0.193	0.200	0.073	0.130	0.140	0.093	0.123
<i>h</i>		0.71±0.06	0.83±0.04	0.74±0.06	0.87±0.04	0.85±0.05	0.59±0.06	0.7±0.08	0.77±0.07	0.74±0.07	0.86±0.03
$\pi$		0.32±0.17	0.26±0.14	0.31±0.17	0.31±0.17	0.31±0.17	0.21±0.12	0.22±0.12	0.32±0.17	0.18±0.10	0.36±0.19
Tajima's <i>D</i>		1.40 <sup>ns</sup>	1.76 <sup>ns</sup>	0.96 <sup>ns</sup>	1.27 <sup>ns</sup>	2.34 <sup>ns</sup>	1.49 <sup>ns</sup>	0.97 <sup>ns</sup>	1.04 <sup>ns</sup>	-0.73 <sup>ns</sup>	1.64 <sup>ns</sup>

haplotype frequencies (Raymond and Rousset, 1995). Analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier and Lischer, 2010) was applied on restriction sites using the ARLEQUIN 3.5 software (Excoffier and Lischer, 2010). Fixation index and variance components were permuted 10,000 times using a Bonferroni correction (Rice, 1989).

Additionally, the Bayesian cluster analysis was implemented using STRUCTURE 2.3 software (Pritchard *et al.*, 2000), enabling the classification of individuals of each population into *K* clusters according to their membership coefficients. The parameters burn-in length and simulation length were finally set at 500,000 and 1,000,000 repetitions respectively after the conduction of a preliminary test, where three independent repeats were run for each value of *K* ( $1 \leq K \leq 14$ ). The adequate value for *K* was chosen, taking into account the HARVESTER online software, which provided the likelihood value for each *K* value (Earl and Von Holdt, 2012).

The visualization of the genetic relationships among the farmed-rainbow trout populations was applied through the conduction of Principal Coordinates Analysis (PCoA) (Jombart *et al.*, 2009) with Nei's standard genetic pairwise distances by

means of GenAlex 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). Pairwise geographic distances among freshwater farmed-rainbow trout aquacultures were calculated as Euclidean distances in kilometers (km). A Mantel's Test (Mantel, 1967; Mantel and Valand, 1970) (1,000 permutations) was applied to test the relationship between matrices of geographical distance and Nei's genetic distance using GenAlex 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). Phylogenetic relationships among the generated composite haplotypes were examined by calculating an unrooted haplotype network by means of NETWORK 4.6.1.2 (Fluxus Technology Ltd; www.fluxus-engineering.com). The Median Joining (MJ) and Maximum Parsimony (MP) algorithms were used in order to calculate the adequate haplotype network (Bandelt *et al.*, 1999).

## Results

According to the obtained restriction patterns, six enzymes (*AluI*, *AvaII*, *HaeIII*, *HinfI*, *RsaI*, *Taq<sup>q</sup>I*) presented polymorphism in ND5/6 region; three enzymes (*AvaII*, *HinfI*, *Taq<sup>q</sup>I*) in CR - Cytb region and one enzyme (*HaeIII*) in ATPase-VI-COIII region, respectively. Four restriction endonucleases (*AluI*,

*HaeIII*, *RsaI*, *Taq<sup>o</sup>I*) recognize tetranucleotide sequences and two enzymes (*AvaII* and *HinfI*) recognize pentanucleotide sequences. The composite haplotypes consisted of 10 restriction endonucleases, generating a total of 23 restriction sites. The restriction sites analysis showed 24 different haplotypes among the screened individuals and the relative haplotype frequencies of the 10 populations are presented in Table 1. The relative haplotype frequencies ranged from 0.03 to 0.52 among the different populations of freshwater aquacultures. Taking into account the relative haplotype frequencies, it seemed that the different composite genotypes within populations ranged between 4 and 11. Additionally, it is worth noting that only the composite genotype 8 (4.17%) was presented in all rainbow trout aquacultures. In contrast, among the 24 different composite genotypes, three were detected solely in populations of Agistro and Edesseos-2 rivers; two haplotypes in Arapitsa population and one haplotype in Edesseos-1 and Louros populations, respectively. Furthermore, the highest average haplotype diversity ( $h = 0.87 \pm 0.04$ ) was presented in Edesseos-2 population and the highest nucleotide diversity ( $\pi = 0.36 \pm 0.19$ ) was presented in the population of Bournia spring. As far as the genotypic richness  $R$  is concerned, the lowest value  $R = 0.16$  was presented in the population of Tripotamos river and the highest value  $R = 0.44$  was presented in the population of Arapitsa river. Tajima's  $D$  index was non-significant for all populations (Table 1).

Regarding the pairwise  $F_{ST}$  values, it was revealed that the highest value 0.3496 was presented

between Agios Ioannis stream and Krathes river populations ( $P < 0.001$ ; Table 2), with a significant ( $P < 0.001$ ) average  $F_{ST}$  value 0.056 (Table 3). The global exact test of sample differentiation based on haplotype frequencies was statistically significant ( $P < 0.0001$ ). Taking into account the differentiation tests among all pairs of samples, it seems that the majority of population pairs present haplotype frequency distribution that differs with highly significant probability (Table 2). According to the AMOVA results obtained, only 5.65% of the overall genetic diversity was attributed to be among populations and the substantial 94.35% of variation exists within populations (Table 3).

The use of software STRUCTURE 2.3 unraveled two putative clusters ( $K = 2$ ; Figure 2) among the 10 populations considering the membership coefficients which sum to 1 for each individual. The vast majority of populations appeared to have individuals in both clusters. Nevertheless, the percentages of the two clusters in the examined populations varied considerably (Figure 1). Similarly to the results of STRUCTURE 2.3 software, the use of NETWORK 4.6.1.2 indicated that all the examined farmed-rainbow trout populations derived from two founder nodes (Figure 3).

According to PCoA, the genetic differences among the 10 populations were visualized and each population assigned a location in a low-dimensional space (Figure 4). The obtained results showed that the first axis revealed a higher percentage of variation 77.64 %, in comparison with the low percentage of variation of the second and third axes 13.82 % and

**Table 2.** Pairwise differentiation exact tests of farmed-rainbow trout is presented below diagonal, and population pairwise ( $F_{ST}$ ) values (after Bonferroni correction) are presented above diagonal

	AGS	AIO	IED	2ED	ARA	TRI	LOU	MEG	KRA	BOU
AGS	-	0.0102	0.0235	-0.0116	-0.0018	0.0125	0.0164	-0.0090	0.2026***	0.0125
AIO	0.0063**	-	0.1008*	0.0117	0.0139	0.0130	0.0045	0.0799	0.3496***	0.0688*
IED	0.0001***	0.0019**	-	0.0006	0.0017	0.0643	0.0695	-0.0085	0.1076*	0.0285
2ED	0.0004***	0.0335*	0.4279	-	-0.0246	0.0251	0.0249	0.0150	0.2316***	0.0359
ARA	0.0003***	0.0341*	0.8031	0.6936	-	0.0306	0.0240	0.0141	0.2143***	0.0269
TRI	0.0001***	0.0674	0.0001***	0.0001***	0.0001***	-	-0.0381	0.0370	0.2641***	0.0445
LOU	0.0001***	0.1512	0.0001***	0.0010**	0.0001**	0.7687	-	0.0443	0.2742***	0.0375
MEG	0.2641	0.0077**	0.0029**	0.0124**	0.0077**	0.0004***	0.0006***	-	0.0860**	-0.0084
KRA	0.0001***	0.0001***	0.0001***	0.0001***	0.0003*	0.0001***	0.0005***	0.0935	-	0.1252*
BOU	0.0009***	0.002**	0.0083**	0.0211*	0.0257*	0.0001***	0.001**	0.2283	0.0475*	-

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P < 0.05$ . Abbreviations - AGS: Agistro, AIO: Ag. Ioannis, IED: Edesseos1, 2ED: Edesseos 2, ARA: Arapitsa, TRI: Tripotamos, LOU: Louros, MEG: Megdovas, KRA: Krathes, BOU: Bournia.

**Table 3.** Analysis of molecular variance (AMOVA) among and within populations.  $F_{ST}$  index represented the sum of variation among populations and variation within populations divided by total variation

	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation Index
Among populations	9	75.453	0.19456 Va	5.65	$F_{ST} = 0.056^{***}$
Within populations	554	825.422	3.24969 Vb	94.35	
Total	563	900.875	3.44426		

(\*\*\*  $P \leq 0.001$ )

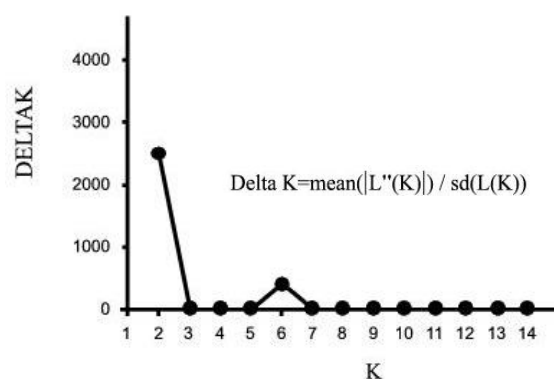
8.54 %, respectively. The Eigenvalues were 0.608 for the first axis, 0.108 for the second axis and 0.067 for the third axis, expressing the level of variation on each axis. Taking into account the bi-dimensional scatter-plot of PCoA, the farmed-rainbow trout populations were clearly separated into four groups along coordinates 1 and 2. The discriminated groups were Arapitsa-Megdovas-Bournia / Edesseos1-Louros-Krathes / Agistro-Tripotamos-Edesseos2 / Agios Ioannis. Nevertheless, Mantel's Test resulted in a non-significant correlation between genetic and geographical distances ( $R^2 = 0.1891$ ,  $P > 0.05$ ).

## Discussion

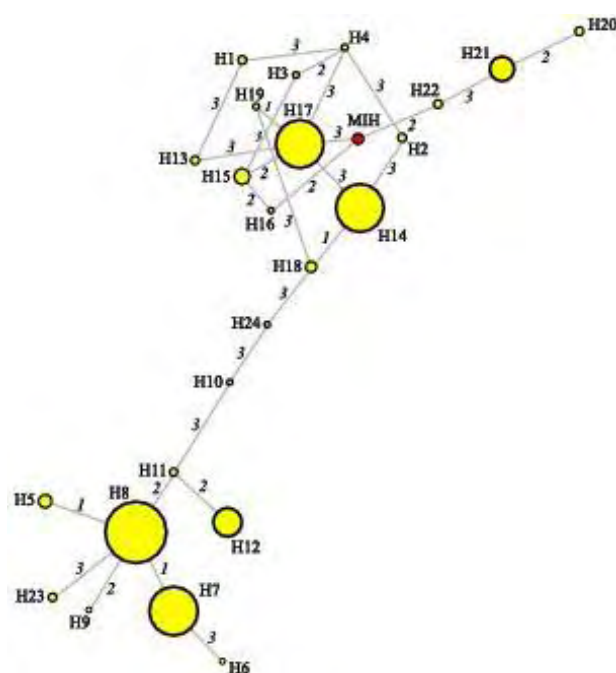
In the present study, more than 5,500 bp of the 16,600 bp total mitochondrial genome size were

assessed using PCR-RFLP, in order to evaluate the specific genetic variation within and among populations of rainbow trout derived from different farms throughout Greece. Particularly, apart from the ND5/6 and the Control Region-Cytb entire regions, the 948 bp fragment of ATPase VI-COIII protein-encoding regions of *O. mykiss* had never been assessed by means of restriction endonucleases prior to this study. However, the study of these protein-encoding regions in various aquatic animals (Katsares et al., 2003) and relative species, such as *S. trutta* (Giuffra et al., 1994; Apostolidis et al., 2008) confirmed the existence of polymorphism.

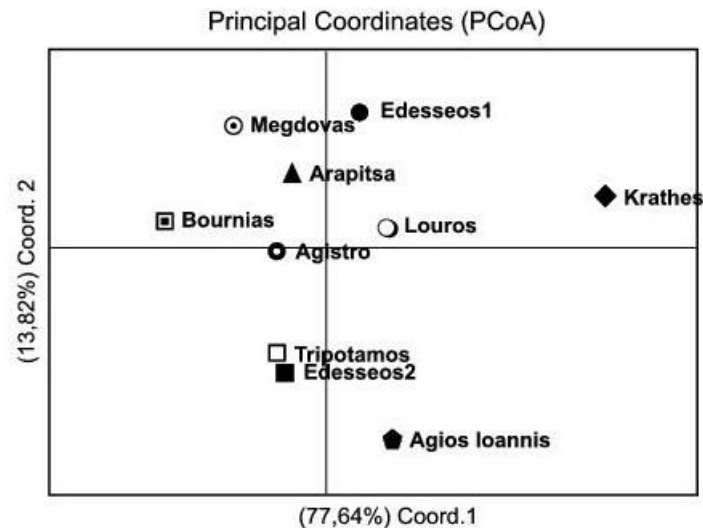
The conducted population structure analysis revealed the presence of two central haplotype clusters among the farmed-rainbow trout populations in the Greek freshwater aquaculture sector (Figure 1;



**Figure 2.** Selection of the adequate number of clusters (K) taking into consideration the highest peak, which represents the most likely number of clusters ( $K = 2$ ) according to the Pritchard Bayes Formula.



**Figure 3.** Median-joining network indicating the phylogenetic relationships among mtDNA haplotypes of the 10 farmed-rainbow trout populations. Each haplotype (H1-H24) is represented by a yellow circle, while the missing intermediate haplotype (MIH) is represented by a red circle. The mutational step between haplotypes is indicated by italicized numerals.



**Figure 4.** Principal Coordinates Analysis (PCoA) of farmed-rainbow trout populations. The amount of variation explained by each axis is 77.64 % for Coordinate 1 and 13.82% for Coordinate 2.

Figure 3). The coexistence of haplotypes from both clusters in all populations might denote the common broodstock gene pool. Only the population of Krathes River appeared to have an extremely high percentage of individuals belonging to the 1<sup>st</sup> cluster, in contrast to the others which have an admixture of both clusters revealed from the structure analysis. Moreover, the extent of polymorphism was, as expected, lower compared to the diversity recorded for natural populations. Such levels of genetic variability in reared populations comparatively to the natural populations is a common phenomenon, taking into account a considerable number of conducted population genetic studies regarding reared and natural populations of other aquatic species, such as common carp (*Cyprinus carpio*) (Zhou *et al.*, 2004; Kohlmann *et al.*, 2005) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Norris *et al.*, 1999).

Apart from Tripotamos population, the vast majority of the examined reared populations presented substantial high haplotype diversity and a relatively low nucleotide diversity, implying that nearly all haplotypes were related to each other. This may be typical of diversity from former source populations. This fact might reinforce the potential common broodstock gene pool of the studied strains. Specifically, in the case of Tripotamos population, the haplotype diversity was quite low relative to nucleotide diversity, denoting the existence of few haplotypes which presented high divergence among them. This may be characteristic of divergent haplotypes from multiple source regions. In the present study, the majority of Tajima's *D* (Tajima, 1989) values were non-significantly positive, implying that there is a deficit of low-frequency mutations compared to our expectations under neutral theory. On the contrary, only Krathes River showed a non-significantly negative Tajima's *D* value denoting an excess of low-frequency mutations compared to our expectations under neutral theory.

The results of AMOVA analysis indicated that only 5.65% of the total genetic diversity accounted for the detected variance among populations. However, a substantial variance of 94.35% was detected within populations. Moreover, the level of differentiation among the farmed *O. mykiss* populations ranged from -0.0381 to a substantial high value of 0.3496 with an average  $F_{ST}$  value of 0.056. In other European studies, such as the study among 12 European farmed rainbow trout strains (Gross *et al.*, 2007) and the study of nine rainbow trout farms in Norway (Glover, 2008), the reported pairwise  $F_{ST}$  values ranged from 0.04 to 0.36 with an average  $F_{ST}$  value equal to 0.14 and from 0.001 to 0.127 with an average  $F_{ST}$  value equal to 0.053, respectively. It seems that the obtained values from the present study were within the range of the observed values in other European countries. Furthermore, in Western Australia the introduced farmed-rainbow trout presented a similar range of  $F_{ST}$  values with European countries (Gross *et al.*, 2007), ranging from 0.016 to 0.404 with an average  $F_{ST}$  value equal to 0.19 (Ward *et al.*, 2003). On the contrary, both in the USA and in northern Iran the range of  $F_{ST}$  values reported for the reared rainbow trout was low, ranging from 0 to 0.048 with an average  $F_{ST}$  value 0.028 in the USA (Silverstein *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007) and from 0.062 to 0.080 with an average  $F_{ST}$  value 0.072 in northern Iran, respectively (Yousefian *et al.*, 2012).

Although genetic differentiation among populations was statistically significant (after Bonferroni correction) for most of the pairwise comparisons, either for haplotype frequencies distributions (exact tests) or pairwise  $F_{ST}$  values, the overall genetic diversity was substantially attributed to the diversity within populations rather than among them. Thus, taking into account the reported average  $F_{ST}$  values of farmed populations in Norway and Iran, in comparison with the obtained  $F_{ST}$  values of Greek farmed-rainbow trout populations, it can be inferred

that farmed-rainbow trout populations in Greece possess similar levels of polymorphism. However, it seems that the domesticated populations of Western Australia and those in northern and eastern European countries presented a substantially higher divergence in comparison with Greek farmed-rainbow trout populations.

According to PCoA results, the first two coordinates explained 81.2% of the variation revealed by the distance matrix. The bi-dimensional scatterplot does not reveal a discrimination of populations according to their geographical distance. In accordance with the latter, the Mantel's Test results indicated a non-significant relationship between geographic distance and Nei's genetic distance matrices.

## Conclusions

The current study comprises the first attempt to assess the genetic variation among and within farmed rainbow trout populations throughout Greece. The obtained percentage of overall genetic variation that was observed, was assumed to be within populations rather than among populations. The percentage of genetic variation among populations to the overall reported variation reflected the admixture of the two founder populations (strains), pinpointing a common gene pool broodstock for all freshwater aquacultures throughout Greece. This fact was reinforced by the obtained haplotype network, which clearly revealed the existence of two founder nodes throughout Greek farms. Finally, this effort could act as the foundation for further experiments in the molecular genetics characterization of rainbow trout (i.e. Heterozygosity Fitness Correlation-HFC), contributing to the adoption of sophisticated rearing programs by the freshwater aquaculture companies.

## Acknowledgments


The authors would like to express their deepest gratitude to the farmed-rainbow trout aquaculture owners for their willingness and cooperative spirit to provide all the necessary samples and whose contribution was vital to the successful completion of the present study.

## References

- Anonymous 2009. Inventory of farmed-rainbow trout freshwater aquacultures in Greece. Hellenic Ministry of Rural Development and Food, Greece, 119 pp.
- Apostolidis, A.P., Loukovitis, D. and Tsigenopoulos, C. 2008. Genetic characterization of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the Southern Balkans using mtDNA sequencing and RFLP analysis. *Hydrobiologia* 600: 169-176. doi: 10.1007/s10750-007-9229-4
- Bandelt, H.J., Forster, P. and Rhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Behnke, R.J. 2002. Trout and Salmon of North America. The Free Press, New York, 359 pp.
- Benzie, J.A.H., Ballment, E., Forbes, A.T., Demetriades, N.T., Sugama, K. and Haryanti, K. 2002. Mitochondrial DNA variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Molecular Ecology*, 11: 2553-2569. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01638.x
- Billington, N. 2003. Mitochondrial DNA. In: E.M. Hallerman (Ed.), Population genetics: principles and applications for fisheries scientists, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland: 59-100.
- Camarena-Rosales, F., Ruiz-Campos, G., de La Rosa-Velez, J., Mayden, L.R., Hendrickson, D.A. and Varela-Romero, A. 2008. Mitochondrial haplotype variation in wild trout populations (Teleostei: Salmonidae) from northwestern Mexico. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 18: 33-45. doi: 10.1007/s11160-007-9060-z
- Deiner, K., Garza, J.C., Coey, R. and Girman, D.J. 2007. Population structure and genetic diversity of trout (*Oncorhynchus mykiss*) above and below natural and man-made barriers in the Russian River, California. *Conservation Genetics*, 8: 437-454. doi: 10.1007/s10592-006-9183-0
- Earl, D.A. and von Holdt, B.M. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resource*, 4: 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Economidis, P.S., Dimitriou, E., Pagoni, R., Michaloudi, E. and Natsis, L. 2000. Introduced and translocated fish species in the inland waters of Greece. *Fisheries Management and Ecology*, 7: 239-250. doi: 10.1046/j.1365-2400.2000.00197.x
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite v3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource*, 10: 564-567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x;
- FAO 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oncorhynchus mykiss*. In: I.G. Cowx (Ed.), Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus\\_mykiss/en#tcNA0112](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en#tcNA0112). accessed 26 April 2013.
- Framian, B.V. 2009. Review of the EU aquaculture sector and results of costs and earnings survey. Final Report, Reference No FISH/2006/15 - Lot 6, 69 pp.
- Giuffra, E., Bernatchez, L. and Guyomard, R. 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from Northern Italy. *Molecular Ecology*, 3: 161-172. doi: 10.1111/j.1365-294X.1994.tb00117.x
- Glover, K.A. 2008. Genetic characterisation of farmed rainbow trout in Norway: intra- and inter-strain variation reveals potential for identification of escapees. *BMC Genetics*, 9: 87. doi:10.1186/1471-2156-9-87
- Gross, R., Lulla, P. and Naver, T. 2007. Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe. *Aquaculture*, 272: 139-146. doi: 10.1016/j.

- aquaculture.2007.08.004
- Heath, D.D., Bettles, C.M., Jamieson, S., Stasiaka, I. and Dockera, M.F. 2008. Genetic differentiation among sympatric migratory and resident life history forms of rainbow trout in British Columbia. *Transaction of the American Fisheries Society*, 137 (4): 1268-127. doi:10.1577/T05-278.1
- Johnson, N.A., Rexroad, C.E., Hallerman, E.M., Vallejo, R.L. and Palti, Y. 2007. Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture*, 266(1-4): 53-62. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.054
- Jombart, T., Pontier, D. and Dufour, A.B. 2009. Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity*, 102: 330-341. doi:10.1038/hdy.2008.130
- Katsares, V., Apostolidis, A.P., Triantafyllidis, A., Kouvatsi, A. and Triantafyllidis, C. 2003. Development of mitochondrial DNA primers for use with homarid lobsters. *Marine Biotechnology*, 5: 469-479. doi: 10.1007/s10126-002-0097-7
- Kohlmann, K., Kersten, P. and Flajshans, M. 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture*, 247: 253-266. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.024
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Mantel, N. and Valand, R.S. 1970. A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics*, 26: 547-558. doi: 10.2307/2529108
- McCusker, M.R., Parkinson, E. and Taylor, E.B. 2000. Mitochondrial DNA variation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across its native range: testing biogeographical hypotheses and their relevance to conservation. *Molecular Ecology*, 9: 2089-2108. doi: 10.1046/j.1365-294X.2000.01121.x;
- Narum, S.R., Contor, C., Talbot, A. and Powell, D.M.S. 2004. Genetic divergence of sympatric resident and anadromous forms of *Oncorhynchus mykiss* in the Walla Walla River, USA. *Journal of Fish Biology*, 65 (2): 471-488. doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00461.x;
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.
- Nei, M. and Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.
- Norris, A.T., Bradley, D.G. and Cunningham, E.P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon, *Salmo salar* populations. *Aquaculture*, 180: 247-264. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00212-4
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460;
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Raymond, M. and Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Sajedi, R.H., Aminzadeh, S., Naderi-Manesh, H., Sadeghizadeh, M., Abdolhay, H. and Naderi-Manesh, M. 2003. Genetic Variation Within and Among Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Hatchery Populations from Iran Assessed by PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA Segments. *Journal of Food Science*, 68(3): 870-873. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb08258.x
- Silverstein, J.T., Rexroad, C.E. and King, T.L. 2004. Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquatic Research*, 35(1): 40-48. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.00979.x
- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodöuhl, P.A. and Ferguson, A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, 40: 963-965. doi: 10.1111/j.1095-8649.1992.tb02641.x;
- Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Ward, R.D., Jorstada, K.E. and Maguire, G.B. 2003. Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) introduced to Western Australia. *Aquaculture*, 219: 169-179. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00569-0
- Williams, I., Reeves, G.H., Graziano, S.L. and Nielsen, J.L. 2007. Genetic investigation of natural hybridization between rainbow and coastal cutthroat trout in the Copper River Delta, Alaska. *Transactions of the American Fisheries Society*, 136(4): 926-942. doi: 10.1577/T06-214.1;
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354. doi: 10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x;
- Yousefian, M., Laloei, F., Hedayatifard, M., Bahrekazemi, M., Tagavi, M.J., Irani, M., Azizifar, V. and Khasaesi, E. 2012. Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stocks of different origin. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 11(9): 1196-1201. doi: 10.5829/idosi.mejrsr.2012.11. 09. 63218
- Zhao, Y., Zhu, X. and Sun, X. 2008. Microsatellite diversity in cultured populations of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in China. *Journal of Fish Biology*, 73: 1249-1255. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.01894.x
- Zhou, J., Wu, Q., Wang, Z. and Yuzhen, Y. 2004. Genetic variation analysis within and among six varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in China using microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 40: 1144-1148. doi: 10.1023/B:RUGE.0000044758.51875.25

# Morphological and free amino acid profile variability, as a tool for stock identification among farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* of different origin

Petros V Martsikalis<sup>1</sup>  | Menelaos Kavouras<sup>1</sup> | Georgios A Gkafas<sup>1</sup> | Apostolos P Apostolidis<sup>2</sup> | Ioannis S Boziaris<sup>1</sup> | Athanasios Exadactylos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ichthyology and Aquatic Environment (DIAE), School of Agricultural Sciences, University of Thessaly (Uth), Volos, Greece

<sup>2</sup>Lab of Ichthyology and Fisheries, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

## Correspondence

Petros V. Martsikalis, Department of Ichthyology and Aquatic Environment (DIAE), School of Agricultural Sciences, University of Thessaly (Uth), Volos, Greece.  
Email: martsikalis@uth.gr

## Abstract

As a tool for stock identification the body morphology and the free amino acid (FAA) profile variability were determined among farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) from different geographical areas throughout Greece, using geometric morphometrics and Reversed Phase-High-Performance Liquid Chromatography. Significant intraspecific body shape variation was detected among the fish stocks of different origin. Canonical Variate Analysis distinguished populations into two groups being consistent to a great extent with a previous population genetics study. General linear models did not support an association of haplotypes and diet with shape. However, shape was significantly correlated with origin, water temperature, geological-chemical-climatic zones, histidine and arginine. Therefore, morphological variation was primarily driven by environmentally induced differences among these zones being the result of phenotypic plasticity. Environmental cues and rearing conditions played the pivotal role in comparison to broodstock origin. Specimens presented different FAA profiles depending on their geographical origin. Principal Component Analysis showed a division between eastern and western Greece which might be owed to the existence of climatic fluctuations affecting the abiotic factors. This combined approach offers an important tool for stock identification thus assisting environmental risk assessments in evaluation of potential ecological effects and fostering research excellence in sustainable aquaculture management.

## KEYWORDS

freshwater aquaculture, geometric morphometrics, phenotypic plasticity, population structure, reversed-phase high-performance liquid chromatography

## 1 | INTRODUCTION

In the European Union (EU) the aquaculture production of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792), is disaggregated to large (>1.2 kg) and portion-size (<1.2 kg) rainbow trout, with the latter being the dominant among the vast majority of Member States. Since the 1940s, hatcheries located in 13 European countries

imported more than three million eggs from the US Fish Commission (Stanković, Stephens & Snoj, 2016). According to the available data derived from the Data Collection Framework (DCF) in 2011 the total production of rainbow trout in EU reached the amount of 179,000 tons in weight and 507 million Euro in value comprising 15% of the EU aquaculture sector. Particularly, freshwater aquaculture in Greece is orientated mainly to the production of portion-size rainbow trout



and in 2014 their total production accounted 1,611.4 tons (ELSTAT 2014).

In EU fish market, rainbow trout can be sold either as a whole or fillets depending on the consumer preferences. Recently, however, there was an increment trend from 9% to 65% in France for slaughtered rainbow trout weighing more than 300 g due to the remarkable increase in marketability of rainbow trout fillets (Agreste 2009) implying that they comprise products of great interest for the consumer. Their quality could be affected by farming practices and environmental characteristics of each aquaculture site (Pottinger, 2001) and hence geometric morphometrics and free amino acids (FAAs) profile could shed light on diversity among farmed-rainbow trout of different origin.

Both broodstock origin (Hard, Winans & Richardson, 1999; Pakkasmaa & Piironen, 2001; Swain, Riddell & Murray, 1991; Wessel, Smoker & Joyce, 2006) and rearing environment (von Cramon-Taubadel, Ling, Cotter & Wilkins, 2005; Fleming, Jonsson & Gross, 1994; Hard et al., 2000; Hedenskog, Petersson, Jarvi & Khamis, 1997; Löhmus, Sundström, Björklund & Devlin, 2010; Peres-Neto & Magnan, 2004; Pulcini, Wheeler, Cataudella, Russo & Thorgaard, 2013; Pulcini et al., 2014; Taylor, 1986) seem to have a substantial contribution to the occurrence of morphometric variation among fish populations. Geometric morphometrics comprise a state-of-the-art method for the quantitative representation and analysis of morphological shape of organisms (Bookstein, 1991). Therefore, this method could be used for the elucidation of stock identification among reared rainbow trout of different origin (Cadrin, 2000; Cadrin & Friedland, 1999). The main difference between "traditional" morphometrics and geometric morphometrics is that the latter use landmark configurations, which are translated and rotated into a common position removing any size differences between them and as a result, shape is totally dissociated from size allowing their distinct analysis (Kendall, 1986). Landmarks selected are homologous anatomical loci recognizable in each specimen providing a sufficient summary of morphology. Moreover, the application of Procrustes-based geometric morphometrics (Bookstein, 1991; Goodall, 1991; O'Higgins, 2000; Rohlf & Slice, 1990; Zelditch, Swiderski, Sheets & Fink, 2004) through the Procrustes Superimposition could contribute to the removal of variation regarding location, size and orientation. Thus, the remaining variation corresponds to differences in shape between landmark configurations which are analysed by multivariate statistical methods.

According to the literature review, geometric morphometrics have been used for other salmonid species such as Coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum 1792), (Hard et al., 2000; Löhmus et al., 2010) Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum 1792) (Hard et al., 1999; Wessel et al., 2006) and Atlantic salmon *Salmo salar* (Linnaeus 1758) (von Cramon-Taubadel et al., 2005) focusing mainly on the body shape differences between wild and reared populations. Nevertheless, geometric morphometric studies regarding rainbow trout populations are limited. Particularly, Seiler and Keeley (2007) examined the differences in body shape between cutthroat trout *Oncorhynchus clarkii bouvieri* (Richardson 1836),

rainbow trout (*O. mykiss*) and their hybrids revealing that cutthroat trout had slender bodies and small caudal peduncles, in contrast to rainbow trout which presented deep bodies and long caudal peduncles respectively. Moreover, Nichols, Edo, Wheeler and Thorgaard (2008) applied geometric morphometric shape analysis to quantify the variability in body shape among phenotypically divergent doubled-haploid progeny of *O. mykiss*. Significant variation was revealed in body morphology and the application of thin-plate spline analysis showed that the first six relative warps explained 77% of body shape variation. On the other hand, Fischer-Rousseau, Chu and Cloutier (2010) assessed by means of geometric morphometrics the early developmental changes in body shape of *O. mykiss* induced by various levels of water velocity. The geometric analyses identified significant differences in mean shapes ( $p < .0083$ ) among different treatments. Furthermore, Pulcini et al. (2013) analysed six rainbow trout clonal lines unravelling significant body shape variation between wild and captive clonal lines and between resident and migratory ones. Specifically, the overall body shape was deeper in captive lines, with longer dorsal and anal fins and shorter and deeper caudal peduncles. Finally, Pulcini et al. (2014) examined the potential differences in shape between intensive and organic aquacultures of reared rainbow trout populations. The rearing method had a significant effect on rainbow trout shape as organically reared trout showed a higher body profile mainly in the head and trunk regions, shorter median fins and a deeper caudal peduncle.

In parallel, apart from the use of geometric morphometrics, the free amino acids (FAAs) profile of white muscle tissue could substantially contribute to the identification of farm origin for reared rainbow trout populations. FAAs concentration might be site-specific as it is affected by different environmental and nutritional conditions at each farm site (Hwang, Chen, Shiau & Jeng, 2000). This is also supported by a recent study which confirmed significant differences in FAA profiles of reared mussels according to their origin (Fuentes, Fernandez-Segovia, Escrache & Serra, 2009).

The role of FAAs is crucial in osmoregulation and buffering capacity of fish muscle (Suyama, Hirano & Suzuki, 1986; Van Waarde, 1988). Their role in the proper function of nervous system is of utmost importance implicating as substrates for key enzymatic reaction and regulating the volume of nitrogen compounds (Anaya & D'Aniello, 2006). Furthermore, not only do they comprise a significant energy source (Van Marrewijk & Ravesteyn, 1974), but they are also responsible for the characteristic taste of seafood, a fact that enables their use as indicators for the evaluation of fish taste (Fuke, 1994).

Although many studies have focused on the measurement of FAAs in plasma of *O. mykiss* (Cleveland & Burr, 2011; Karlsson, Eliason, Mydland, Farrell & Kiessling, 2006; Ok, Bai, Park, Choi & Kim, 2001; Robinson, Yanke, Mizra & Ballantyne, 2011; Schumacher, Wax & Gropp, 1997; Tantikitti & March, 1995), few previous studies have been conducted in white muscle tissue of *O. mykiss* (Carter, Hel, Houlihan, McCarthy & Davidson, 1995; Yamamoto, Unuma & Akiyama, 2000), despite the fact that it presents the highest rate of protein accretion (Carter & Houlihan, 2001). Specifically, Carter et al.

(1995) using a single diet investigated the impact of feeding in FAA concentration of white muscle tissue after different time intervals, revealing that only the essential FAA concentrations of valine, leucine and isoleucine were reduced in contrast to total FAA concentrations which were altered slightly. On the other hand, Yamamoto et al. (2000) examined the influence of six different experimental diets on the FAA concentrations of white muscle tissue inferring that higher protein levels in diet provoke an increase in both total essential FAA and total non-essential FAA levels.

The aim of this study was the stock identification of reared rainbow trout of different origin by means of a combined geometric morphometrics - FAAs profile approach. This innovative "cross-curricular" approach that integrates geometric morphometrics and FAA profiles comprises the next step following a previous population genetics study of these reared rainbow trout populations and they seem to act complementary to each other (Martsikalidis, Gkafas, Apostolidis & Exadactylos, 2014). Hence, geometric morphometrics - FAA profiles and genetics are the interrelated "cross-curricular" dimensions of this approach articulating its benefits to tackle successfully the key issue of stock identification. The adoption of this approach was based on the intention to support and to raise standards in the field of stock identification of aquaculture species worldwide.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Sampling

The spatial selection planning process of the examined farmed-rainbow trout aquaculture sites was based on geographical criteria providing a wide spectrum covering six rivers, two streams and one spring throughout Greece, representative of the entire freshwater aquaculture sector, varying in several features such as location, geological-chemical-climatic zone, water temperature and diet composition (Table 1). According to the planning process 10 rainbow trout farms located at different geographical areas were chosen and a total number of 264 *O. mykiss* specimens were selected via dip-net collection. All selected samples were of similar portion size adult

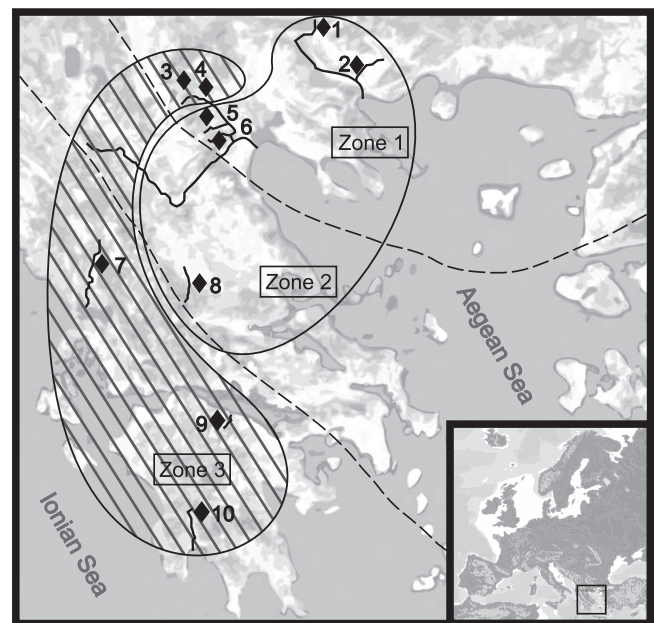
**TABLE 1** Specific rearing conditions of each aquaculture site

Location	Zone	Water temperature °C	Diet	Protein (%)	Fat (%)
Agistro	1	12.5	Koppens NL	42	30
Ag.ioannis	1	16.0	Skretting NL	42–45	21–25
Edesseos 1	1	12.0	Trouvit	47	9
Edesseos 2	1	12.0	Biomar	42–45	25–28
Arapitsa	1	9.5	Skretting NL	42–45	21–25
Tripotamos	1	13.0	Biomar	42–45	25–28
Louros	3	14.0	Skretting NL	42–45	21–25
Megdovas	2	9.0	Skretting NL	42–45	21–25
Krathes	3	16.0	Skretting NL	42–45	21–25
Bournia	3	15.0	Skretting NL	42–45	21–25

individuals of about equal weight  $250 \pm 20$  g and 20 months of age (Agistro  $n = 29$ , Agios Ioannis  $n = 27$ , Edesseos1  $n = 29$ , Edesseos2  $n = 27$ , Arapitsa  $n = 25$ , Tripotamos  $n = 25$ , Louros  $n = 24$ , Megdovas  $n = 27$ , Krathes  $n = 24$ , Bournia  $n = 27$ ) (Figure 1). Throughout the different aquaculture sites the farmed specimens were reared in concrete flow-through raceways of 1.0 m depth and prior to their collection the fish were starved for one day. A single sampling procedure was conducted when visiting each aquaculture site at 10.00 am in a non-reproductive period during May of 2013. The specimens were immediately killed using the semi-automatic percussive stunning method, then transported under refrigeration in the University facilities, photographed, filleted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the conduction of analyses. Throughout the sampling procedure, priority was given to fish welfare and maintenance of flesh quality.

### 2.2 | Geometric morphometrics

Initially, prior to filleting and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , lateral digital photographs of the left side of *O. mykiss* specimens were taken using a Nikon Coolpix 4500 camera mounted on a tripod. The fish size was

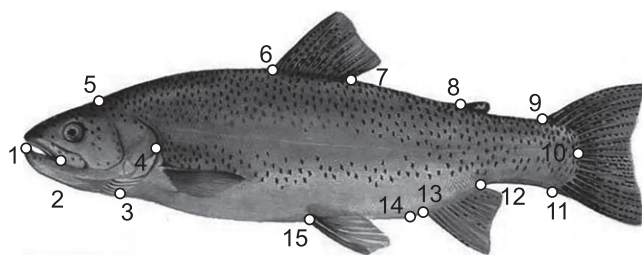


**FIGURE 1** Map of Greece showing the sampling sites of farmed-rainbow trout, the three core geological-chemical-climatic zones (Skoulidakis, 1993; Skoulidakis et al., 2004, 2006) and the two groups of fish populations according to geometric morphometrics and free amino acid profile analyses. The unhatched portion corresponds to the first group and the hatched portion to the second group. Each freshwater aquaculture population is coded with rhombus [1. Agistro ( $n = 29$ ),  $41^{\circ}22'50.39''\text{N}$   $23^{\circ}26'18.15''\text{E}$  / 2. Agios Ioannis ( $n = 27$ ),  $41^{\circ}5'57.30''\text{N}$   $23^{\circ}35'15.15''\text{E}$  / 3. Edesseos 1 ( $n = 29$ ),  $40^{\circ}48'30.94''\text{N}$   $22^{\circ}0'57.25''\text{E}$  / 4. Edesseos 2 ( $n = 27$ ),  $40^{\circ}48'25.00''\text{N}$   $22^{\circ}1'19.12''\text{E}$  / 5. Arapitsa ( $n = 25$ ),  $40^{\circ}36'47.46''\text{N}$   $22^{\circ}2'49.15''\text{E}$  / 6. Tripotamos ( $n = 25$ )  $40^{\circ}28'26.68''\text{N}$   $22^{\circ}10'37.37''\text{E}$  / 7. Louros ( $n = 24$ ),  $39^{\circ}25'39.82''\text{N}$   $20^{\circ}50'43.41''\text{E}$  / 8. Megdovas ( $n = 27$ ),  $39^{\circ}13'1.53''\text{N}$   $21^{\circ}44'43.74''\text{E}$  / 9. Krathes ( $n = 24$ ),  $38^{\circ}1'4.07''\text{N}$   $22^{\circ}15'5.36''\text{E}$  / 10. Bournia ( $n = 27$ ),  $37^{\circ}19'54.77''\text{N}$   $21^{\circ}55'53.43''\text{E}$ ]

denoted in each photo by a ruler and prior to imaging the excessive water on the fish skin was removed to eliminate any detrimental reflections. In total, 15 landmarks (Figure 2) were identified in the lateral aspect of rainbow trout and were digitized by TPSDIG2 software (free available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>) to set landmark coordinates which are forming landmark configurations (Rohlf, 2006). All the selected digitized landmarks were well defined and homologous across specimens. The identification of potential outliers was checked using the function "Find outliers" of the software MORPHOJ (Klingenberg, 2011). In addition, a generalized least squares (Procrustes) superimposition was applied on the formed landmark configurations (Rohlf & Slice, 1990). Procrustes residuals derived from Generalized Procrustes Analysis (GPA) were processed by means of Thin-plate spline (TPS) (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>) interpolating function (Bookstein, 1991). On the other hand, by means of the free available MORPHOJ software (Klingenberg, 2011) a Canonical Variate Analysis (CVA) was used to display the linear separation among the farmed fish of different origin and to calculate the Procrustes distances between all samples. In addition, patterns of shape change along CV1 were visualized using wireframe graphs. Similarly, a Discriminant Function Analysis (DFA) was performed using MORPHOJ (Klingenberg, 2011) to examine the differences between specimens derived from different aquaculture sites implementing pairwise comparisons. Finally, the correct assignment of the examined specimens was evaluated by leave-one-out cross-validation (Weiss & Kulikowski, 1991).

### 2.3 | FAAs profile

The separation and quantitative analysis of FAAs was conducted by Reversed Phase-High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) technique using *o*-phthalaldehyde (OPA) pre-column derivatization. FAAs were extracted from fish white muscle tissue using the protocol of Antoine et al. (2001) with minor modifications. Specifically, ten grams of white muscle tissue from each sample were



**FIGURE 2** Selection of landmarks (white circles) on body of *Oncorhynchus mykiss*: 1. Anterior tip of premaxilla; 2. Most posterior point of maxilla; 3. Insertion of the operculum on the ventral profile; 4. Most posterior point of the operculum on the dorsal profile; 5. Projection of the operculum on the dorsal profile; 6. Anterior of base of the dorsal fin; 7. Posterior of base of the dorsal fin; 8. Anterior of base of adipose fin; 9. Anterior attachment of dorsal membrane from caudal fin; 10. Base of middle caudal rays; 11. Anterior attachment of ventral membrane from caudal fin; 12. Anterior of base of anal fin; 13. Posterior of base of anal fin; 14. Anus; 15. Origin of the left pelvic fin

weighed and homogenized with 40 ml 75% (v/v) Methanol, HPLC grade for 2 min by means of Ultra-Turrax T 25 model (IKA-Labor-technik, Staufen, Germany). In all cases, solely Milli-Q ultrapure water (Fisher Scientific International Inc., New Hampshire, USA) was used for the preparation of chemical solutions and their dilutions. The extract was transferred to a 100 ml volumetric flask and 75% (v/v) Methanol was added up to the standard volume of 100 ml. Afterwards, the extract was stored at +4°C for 60 min and then was centrifuged at 14,000 *g* for 40 min using the refrigerated centrifuge apparatus 5810R (Eppendorf, Hamburg, Germany). The supernatant was filtered by Whatman Puradisc syringe filters 0.2  $\mu$ m PTFE (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), diluted adequately and derivatized precisely for 2 min using OPA reagent. Likewise, the preparation of OPA solution and the derivatization process were applied according to Antoine et al. (2001) protocol.

The analysis of the derivatized FAAs was conducted by the injection of extract samples in a Perkin-Elmer 200 series HPLC instrument equipped with a series 200 micro pump, autosampler, column oven, degasser and fluorescence detector (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). The separation was accomplished by binary gradient elution via a Brownlee Pecosphere 3  $\mu$ m C18 (84  $\times$  4.6 mm) column (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Particularly, Mobile Phase A consisted of Methanol and Mobile Phase B consisted of 1.5% (v/v) Tetrahydrofuran in 50 mM Sodium acetate adjusted to pH 5.9. Moreover, a linear gradient elution program of 5% Mobile phase A to 80% Mobile phase A in 15 min was performed and the total time of each run was 25 min. The injection of samples was applied using a 20  $\mu$ l sample loop. Throughout the linear gradient elution program both the temperature of column oven and the flow rate remained stable at 35°C  $\pm$  1°C and 1.5 ml/min respectively. As far as the fluorescence detector settings are concerned, the excitation monochromator set at 340 nm and the emission monochromator set at 450 nm. Instrument parameters adjustment and analysis of the obtained data were performed using TOTALCHROM NAVIGATOR Version 6.3. Identification of FAAs was achieved by comparison of retention times between the chromatograms derived from the known standard solutions and the sample extract. An external calibration curve was used for the quantitation of each FAA.

The statistical analysis of the obtained data was performed by means of MINITAB 17 Statistical software (Minitab 17 Statistical Software, 2010). Initially, an analysis of variance (one-way ANOVA) was applied assessing the potential existence of significant differences between the different farmed rainbow trout aquaculture sites. In addition, a Principal Component Analysis (PCA) was performed indicating the relationships among the examined fish populations in a multidimensional space.

### 2.4 | Association of genetic data with shape data, FAA profiles, water temperature, diet, zones, clusters and aquaculture origin

To assess any potential association, general linear models (GLM) were conducted among the dominant haplotype variate of genetic

data as dependent variable and shape data, FAA profiles, water temperature, diet, zones, clusters and aquaculture origin as independent variables. The use of GLM revealed whether the haplotypes, shape and FAA profiles differed among the aquaculture sites and their contribution to this differentiation. A Bonferroni correction for multiple tests for an experiment-wise error rate of 0.05 was used. GLM analyses were conducted in R version 2.15.1 (R Development Core Team 2012).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Morphological variability

In most cases, significant differences in mean body shape of farmed-rainbow trout of different origin were detected (Table 2). In addition, taking into account the CVA scatter-plot (Figure 3a), the separation of farmed-rainbow trout specimens in two groups according to their origin along CV1 (44.5%) was accomplished. These two groups consisted of (Agistro-Ag.Ioannis-Arapitsa-Tripotamos-Megdovas) which were located in the positive portion of CV1 and (Louros-Krathes-Bournia-Edesseos1-Edesseos2) in the negative portion respectively. Moreover, according to the wireframe patterns (Figure 3b), the farmed-rainbow trouts seem to present a relatively smaller cranial region and slender body profile along CV1. Similarly, the vast majority of pairwise comparisons performed by DFA was statistically significant ( $p < .001$ ) apart from the population pairs of Bournia-Krathes, Bournia-Louros and Krathes-Louros. As far as the reliability of the relative classifications is concerned, cross-validation revealed that it was substantially high. In most cases, the cross-validation rate of correct specimen

assignment was higher than 90%. However, there was an inaccuracy of classification regarding the population pairs of Bournia-Krathes (58%), Krathes-Louros (56.5%) and Bournia-Louros (54%).

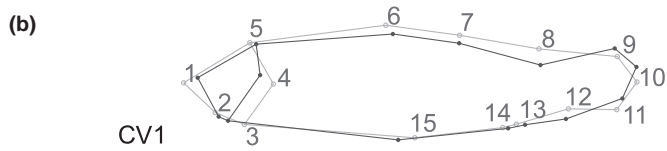
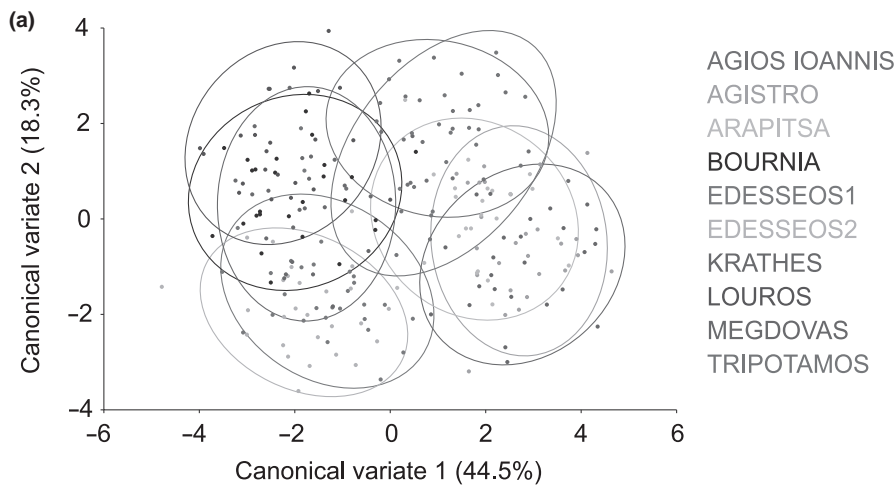
#### 3.2 | FAAs profile variability

The identification and quantitation of fifteen FAAs (Asp: Aspartic Acid, Glu: Glutamic acid, Asn: Asparagine, His: Histidine, Gln: Glutamine, Gly: Glycine, Arg: Arginine, Thr: Threonine, Ala: Alanine, Tyr: Tyrosine, Phe: Phenylalanine, Ile: Isoleucine, Leu: Leucine, Orn: Ornithine & Lys: Lysine) in fish white muscle tissue was accomplished during the analysis of the examined specimens. It is worth noting that the results showed remarkable reproducibility. Total FAA values in farmed-rainbow trout populations ranged from 30.38 to 59.54  $\mu\text{mol g}^{-1}$ . Particularly, the lowest and the highest total FAA values were presented in fish populations derived from Edesseos 1 and Arapitsa respectively. On the other hand, Gly was the most abundant FAA in white muscle tissue throughout the fish populations of different aquaculture sites. It was followed by Ala which presented the second highest concentration in all samples. Moreover, ANOVA revealed that the majority of FAA concentrations showed significantly different profiles ( $p < .05$ ) depending on farmed-rainbow trout origin, apart from Gln. Furthermore, according to the PCA results of FAA profile mean values per population (Figure 4), the existence of two groups was observed along PC1. The first group (Agistro-Ag.Ioannis-Arapitsa-Tripotamos-Megdovas) solely consisted of fish populations situated in the east of the country (Zones 1 and 2). On the contrary, the second group consisted of the

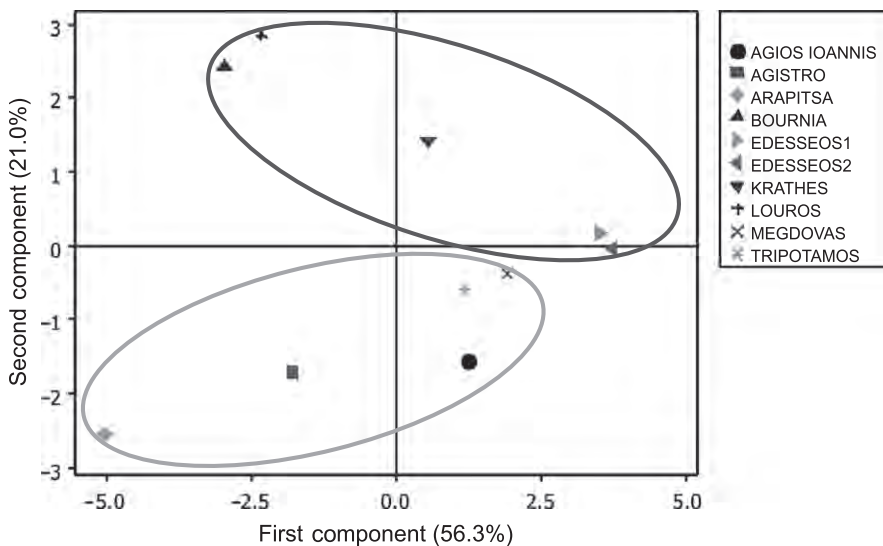
**TABLE 2** Procrustes distances between mean body shapes of ten farmed-rainbow trout populations established in different geographical areas and the correspondent  $p$  values (bold) from permutation tests (10,000 permutation rounds)

	AIO	AGS	ED1	ED2	ARA	TRI	LOU	MEG	KRA
AGS	0.026 <b>&lt;.001</b>								
ED1	0.047 <b>&lt;.001</b>	0.042 <b>&lt;.001</b>							
ED2	0.046 <b>&lt;.001</b>	0.040 <b>&lt;.001</b>	0.030 <b>.001</b>						
ARA	0.019 <b>.015</b>	0.024 <b>.002</b>	0.040 <b>&lt;.001</b>	0.037 <b>&lt;.001</b>					
TRI	0.031 <b>&lt;.001</b>	0.033 <b>&lt;.001</b>	0.038 <b>&lt;.001</b>	0.034 <b>.001</b>	0.024 <b>.009</b>				
LOU	0.043 <b>&lt;.001</b>	0.048 <b>&lt;.001</b>	0.032 <b>&lt;.001</b>	0.035 <b>&lt;.001</b>	0.039 <b>&lt;.001</b>	0.032 <b>.001</b>			
MEG	0.038 <b>&lt;.001</b>	0.025 <b>.001</b>	0.036 <b>&lt;.001</b>	0.038 <b>&lt;.001</b>	0.028 <b>.001</b>	0.031 <b>&lt;.001</b>	0.039 <b>&lt;.001</b>		
KRA	0.042 <b>&lt;.001</b>	0.041 <b>&lt;.001</b>	0.021 <b>.054</b>	0.026 <b>.034</b>	0.036 <b>.001</b>	0.031 <b>.010</b>	0.018 <b>.212</b>	0.033 <b>.002</b>	
BOU	0.038 <b>&lt;.001</b>	0.042 <b>&lt;.001</b>	0.020 <b>.052</b>	0.028 <b>.008</b>	0.033 <b>.001</b>	0.030 <b>.008</b>	0.018 <b>.178</b>	0.036 <b>.001</b>	0.011 <b>.776</b>

AGS, Agistro; AIO, Agios Ioannis; ED1, Edesseos1; ED2, Edesseos2; ARA, Arapitsa; TRI, Tripotamos; LOU, Louros; MEG, Megdovas; KRA, Krathes; BOU, Bournia.



**FIGURE 3** (a) Canonical variate analysis (CVA) scatter-plot illustrating shape variance among farmed-rainbow trout of different origin; (b) Wireframe changes (dark colour) showing shape variation associated with Canonical variate 1 (CV1) in relation to the consensus configuration (light colour)



**FIGURE 4** Differentiation of mean free amino acid profiles among farmed-rainbow trout populations of different origin using Principal Component Analysis (PCA) ordination plot. The amount of variation explained by each axis is 56.3% for the First Component and 21.0% for the Second Component

farmed-rainbow trout populations (Louros-Krathes-Bournia-Edesseos1-Edesseos2), which are mainly located in the western part of Greece (Zone3) apart from Edesseos1 and Edesseos2 which are located in Zone1 (Figure 1). Specifically, PC1 explained 56.3% of the total variance of the examined farmed rainbow trout populations and PC2 explained 21% respectively. Finally, the PCA ordination plot showed a division of FAA profiles between specimens located in the eastern and western part of Greece (Figure 5).

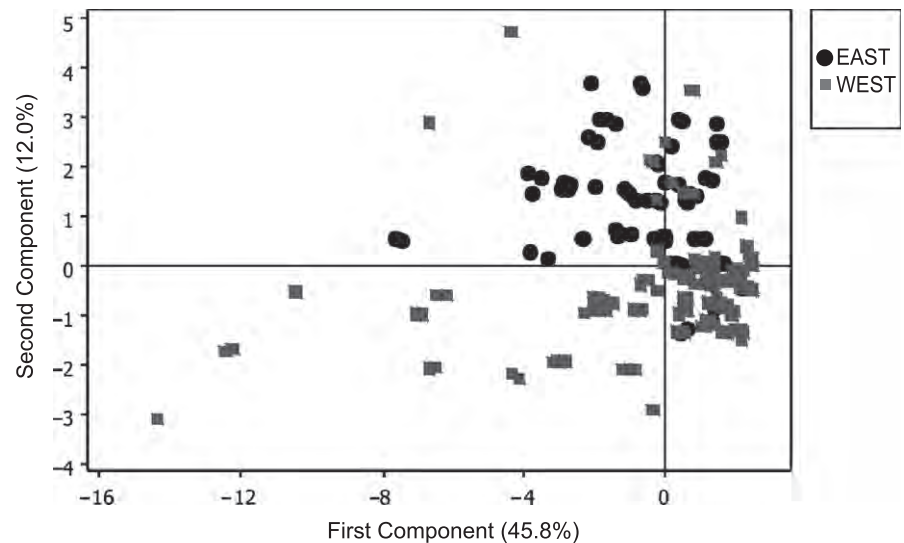
### 3.3 | Association of genetic data with shape data, FAA profiles, water temperature, diet, zones, clusters and aquaculture origin

According to GLM results, interactions between haplotypes, clusters obtained from STRUCTURE 2.3 ( $p < .0001$ ) and both Asp ( $p < .05$ ), Arg ( $p < .01$ ) were significant. Similarly, there was a significant interaction between haplotypes and different types of commercial diets

( $p < .05$ ). Nevertheless, haplotypes did not contribute to body shape variations ( $p = .443$ ). On the other hand, GLMs on shape (CV1) indicated that it was influenced by the aquaculture origin, water temperature ( $p < .01$ ), zones ( $p < .0001$ ) and the FAAs His ( $p < .001$ ) and Arg ( $p < .05$ ). Specifically, shape significantly differed between the aquaculture sites of Agistro ( $p < .001$ ), Edesseos2 ( $p < .01$ ), Louros ( $p < .001$ ), Megdovas ( $p < .01$ ) and Tripotamos ( $p < .001$ ). In contrast, haplotypes and diets had no effect on fish shape. In addition, there was a significant interaction between water temperature and several FAAs such as the Asp ( $p < .01$ ), Asn ( $p < .01$ ), Gln ( $p < .001$ ), Phe ( $p < .01$ ) and Leu ( $p < .05$ ).

## 4 | DISCUSSION

This study showed that farmed-rainbow trout populations derived from several aquaculture sites, established in different geographical



**FIGURE 5** Principal Component Analysis (PCA) ordination plot showing the differentiation of free amino acid profiles among farmed-rainbow trout specimens located in eastern and western Greece

areas, under various rearing conditions can be sufficiently distinguished by means of geometric morphometrics and FAA profiles.

Significant intraspecific body shape variation was detected among the examined fish stocks of different origin. Particularly, the performed CVA scatter-plot accomplished the separation of the aquaculture sites in two groups, (Agistro-Ag.loannis-Arapitsa-Tripotamos-Megdovas) and (Louros-Krathes-Bournia-Edesseos1-Edesseos2) respectively (Figure 3a). Moreover, wireframe changes along CV1 revealed a relatively smaller cranial region and slender body profile, attributes which both maximize fast starts of fish (Figure 3b). These morphological differences could be both habitat-associated depending on the particular environmental and rearing conditions at each farm site (von Cramon-Taubadel et al., 2005; Fleming et al., 1994; Hard et al., 2000; Hedenskog et al., 1997; Peres-Neto & Magnan, 2004; Pulcini et al., 2013, 2014; Taylor, 1986) and genetics-related depending on the broodstock origin (Hard et al., 1999; Pakkasmaa & Piironen, 2001; Swain et al., 1991; Wessel et al., 2006).

Nevertheless, due to the fact that haplotypes and shape were not fit-correlated according to GLM results, these morphological differences were assumed to reflect adaptation to local environmental cues and specific rearing conditions at each farm site. This assumption was enhanced by the fact that a prolonged separation of post larval fish in different environmental regimes could lead to phenotypic variation between stocks (Campana, Gagné & McLaren, 1995). Specifically, GLM analyses revealed a significant correlation of body shape with aquaculture origin, water temperature, zones and the FAAs His and Arg. According to the classification of Greek rivers in three zones considering their hydrological, chemical, geological and climatic features (Skoulikidis, 1993; Skoulikidis, Amaxidis, Bertahas, Laschou & Gritzalis, 2006; Skoulikidis, Gritzalis, Kouvarda & Buffagni, 2004) and the apparent separation in two groups obtained by the CVA analysis, it was revealed that the first group had fish stocks which stemmed from north-eastern and north-central territories (Zones 1 and 2) in contrast to the second group whose populations derived from north-eastern and western territories (Zones 1 and 3) respectively (Figure 1). Therefore, one possible explanation is that

morphological variation was primarily driven by environmentally induced differences among these two groups supporting the likelihood of being the result of phenotypic plasticity (Swain & Foote, 1999). However, such results may be interpreted with caution since factors like age or the ability to collect fully representative samples from a shallow raceway versus a dip net-pen, or whether fish were sampled prior to or after feeding are of major importance. Geographic morphology is likely not as responsive to such factors as FAA profile could be. Taking into account previous studies, the critical factor that can alter the formation of body shape was water temperature comprising the primary influencing mechanism (Beacham, 1990; Brannon, Powell, Quinn & Talbot, 2004; Löhmus et al., 2010). Salmonids were found to be susceptible at even minor temperature shifts regarding their development and fitness (Brannon et al., 2004). Similarly, Löhmus et al. (2010) observed that different rearing temperatures had a significant impact on the body morphology of juvenile wild-type and GH-enhanced coho salmon, highlighting that there was a tendency to longer ventral and shorter arcs at higher temperatures. Water temperature presents a significant fluctuation over short distances due to the prevalence of mosaic environments in the Greek landscape (Medail & Diadema, 2009; Tzedakis, Lawson, Frogley, Hewitt & Preece, 2002b) contributing to the detected body shape variation among the different sampled aquaculture sites. Particularly, taking into account the rearing conditions of each aquaculture site (Table 1) the rivers of the first group had a lower mean of water temperature (12.0°C) in comparison with the second group (13.8°C) causing the generation of such different phenotypes.

Despite the fact that several studies mentioned a diet-induced morphological divergence indicating that different diets can trigger a morphological response (Andersson, 2003; Day & McPhail, 1996; Hegrenes, 2001; Mittelbach, Osenberg & Wainwright, 1999; Ollson & Eklöv, 2005; Proulx & Magnan, 2004; Robinson & Wilson, 1995), GLM analyses revealed that farmed-rainbow trout morphology was not correlated with diet suggesting that shape variation was mainly attributed to water temperature and climatic fluctuations among the Greek rivers rather than the differing commercial diets administered

to each aquaculture. Similar to our study and regarding other salmonids species, such as the Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Linnaeus 1758), Andersson (2003) reported that diet itself was not enough to induce different specialists and that the development of resource polymorphism was the result of other factors, such as population dynamics or predation risk. On the contrary, Hegrenes (2001) study examined the effect of three different diets on feeding morphology body shape of reared orangespotted sunfish *Lepomis humilis* (Girard 1858) and it concluded that diet significantly affected it.

A previous population genetics study on the same samples of farmed-rainbow trout populations (Martsikalis et al., 2014) showed that fish populations were clearly separated in two groups (Agistro-Ag.Ioannis-Tripotamos-Edesseos2) and (Louros-Krathes-Bournia-Edesseos1-Arapitsa-Megdovas), along coordinate 1 (77.64%), according to Principal Coordinates Analysis (PCoA). This separation in two groups was consistent to a great extent with the separation in two groups obtained by means of geometric morphometrics and FAA profiles analyses (Figure 1). In comparison with the geometric morphometrics analysis, the main differences were the allocation of Edesseos2 to the first group and Arapitsa and Megdovas populations to the second respectively. Due to the fact that the separation of fish stocks in two groups was identical comparing the results between geometric morphometrics and FAA profile analyses, the main differences between FAA profiles and the previous population genetics study were similar to the aforementioned differences between geometric morphometrics and the previous population genetics study.

Moreover, Martsikalis et al. (2014) study reported that the overall genetic diversity was substantially attributed to the diversity within populations rather than among them. In addition, using STRUCTURE 2.3 software (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000) unravelled two putative clusters among the farmed-rainbow trout populations and all appeared to have individuals in both clusters. However, GLM analyses in this study indicated that these haplotypes did not have any influence on morphological variation (GLM,  $p > .05$ ), suggesting that the morphometric traits response to environmental cues and rearing conditions was dominant in comparison to the genetic component.

As far as the FAA profiles are concerned, ANOVA showed that the majority of the examined farmed-rainbow trout populations presented different FAA profiles ( $p < .05$ ) depending on their geographical origin. In congruence with our results, a similar study in reared mussels from three Spanish sites showed different FAA profiles attributed to different environmental and nutritional conditions of each farm site (Fuentes et al., 2009). Therefore, the detected divergence in our study may be linked to the particular local environmental attributes (Medail & Diadema, 2009; Tzedakis et al., 2002b) and rearing conditions (Fuentes et al., 2009; Hwang et al., 2000) of each habitat. This fact was also enhanced by the PCA results, which showed a division of fish populations based on their FAA profiles between eastern and western Greece (Figure 5) taking into account the Pindus mountain range acting as a natural boundary. Given that the eastern part on the east of Pindus mountain

range is subjected to the influence of the Siberian anticyclone receiving substantially lower amounts (380–640 mm) of rainfalls per year in contrast to the western part which is influenced by low pressures in the western Mediterranean leading to an increased annual amount (780–1280 mm) of rainfalls (Kosmas, Danalatos & Mizara, 1998a), it is evident that the existence of climatic fluctuations between eastern and western Greece affects the abiotic factors of each aquaculture ecosystem playing a pivotal role to the above mentioned divergence. This explanation could also be supported by several conducted studies concerning the taxonomy of brown trout *Salmo trutta* (Linnaeus 1758) species complex, as morphological divergence was detected between the native brown trout (*Salmo trutta*) populations located in Louros, Agios Germanos (Lake Prespa) and Aaos regions. According to standard morphological methods, Louros population (Delling, 2010) has been described as *Salmo lourosensis* (Delling, 2011), Agios Germanos population as *Salmo peristericus* (Karaman, 1938) and Aaos population as *Salmo dentex* (Pallas, 1814) (Kottelat & Freyhof, 2007).

This combined approach using geometric morphometrics and FAA profiles, offers an important new tool for stock identification of farmed-rainbow trout as both shape and FAA profile were affected by origin, assisting environmental risk assessments in evaluation of potential ecological effects and fostering research excellence in sustainable aquaculture management.

## ACKNOWLEDGMENTS

In acknowledgement of their invaluable support the authors would like to express their gratitude to the farmed-rainbow trout aquaculture owners whose prompt response to provide all the necessary samples and data contributed to the successful completion of this study.

## ORCID

Petros V Martsikalis  <http://orcid.org/0000-0001-9198-5092>

## REFERENCES

- Agreste (2009). La salmoniculture française à l'étiage. Agreste Primeur: 4 (in French).
- Anaya, J. P., & D'Aniello, S. (2006). Free amino acids in the nervous system of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. *International Journal of Biological Sciences*, 2, 87–92.
- Andersson, J. (2003). Effects of diet-induced resource polymorphism on performance in arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Evolutionary Ecology Research*, 5, 213–228.
- Antoine, F. R., Wei, C. I., Littell, R. C., Quinn, B. P., Hogle, A. D., & Marshall, M. R. (2001). Free amino acids in dark- and white-muscle fish as determined by O-phthalaldehyde precolumn derivatization. *Journal of Food Science*, 66(1), 72–77.
- Beacham, T. D. (1990). A genetic analysis of meristic and morphometric variation in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) at three different temperatures. *Canadian Journal of Zoology*, 68, 225–229.
- Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric tools for landmark data: Geometry and biology*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Brannon, E. L., Powell, M. S., Quinn, T. P., & Talbot, A. (2004). Population structure of Columbia River Basin Chinook Salmon and Steelhead Trout. *Reviews in Fisheries Science*, 12, 99–232. <https://doi.org/10.1080/10641260490280313>
- Cadrin, S. (2000). Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 91–112.
- Cadrin, S. X., & Friedland, K. D. (1999). The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fisheries Research*, 43, 129–139.
- Campana, S. E., Gagné, J. A., & McLaren, J. W. (1995). Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS. *Marine Ecology Progress Series*, 122, 115–120.
- Carter, C. G., Hel, Z. Y., Houlihan, D. F., McCarthy, I. D., & Davidson, I. (1995). Effect of feeding on the tissue free amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, 14, 153–164.
- Carter, C. G., & Houlihan, D. F. (2001). Protein synthesis. In P. A. Wright & P. M. Anderson (Eds.), *Nitrogen excretion* (pp. 31–76). San Diego: Academic Press.
- Cleveland, B. M., & Burr, G. S. (2011). Proteolytic response to feeding level in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 319, 194–204.
- von Cramon-Taubadel, N., Ling, E. N., Cotter, D., & Wilkins, N. P. (2005). Determination of body shape variation in Irish hatchery-reared and wild Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 66, 1471–1482.
- Day, T., & McPhail, J. D. (1996). The effect of behavioral and morphological plasticity on foraging efficiency in the threespine stickleback (*Gasterosteus* sp.). *Oecologia*, 108, 380–388.
- Delling, B. (2010). Diversity of western and southern Balkan trouts, with the description of a new species from the Louros River, Greece (Teleostei: Salmonidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 21, 331–344.
- ELSTAT (Hellenic Statistical Authority) (2014). Quantity and value of cultivated species: 2.
- Fischer-Rousseau, L., Chu, K. P., & Cloutier, R. (2010). Developmental plasticity in fish exposed to a water velocity gradient: A complex response. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314B, 67–85.
- Fleming, I. A., Jonsson, B., & Gross, M. R. (1994). Phenotypic divergence of sea-ranched, farmed and wild salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 2808–2824.
- Fuentes, A., Fernandez-Segovia, I., Escriche, I., & Serra, J. A. (2009). Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. *Food Chemistry*, 112, 295–302.
- Fuke, S. (1994). Taste-active components of seafoods with special reference to umami substances. In F. Shahidi & J. R. Botta (Eds.), *Seafoods chemistry processing technology and quality* (pp. 115–139). Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Goodall, C. (1991). Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 53, 285–339.
- Hard, J. J., Berejikian, B. A., Tezak, E. P., Schroder, S. L., Knudsen, C. M., & Parker, L. T. (2000). Evidence for morphometric differentiation of wild and captive reared adult coho salmon: A geometric analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 58, 61–73.
- Hard, J. J., Winans, G. A., & Richardson, J. C. (1999). Phenotypic and genetic architecture of juvenile morphology in Chinook salmon. *The American Genetic Association*, 90, 597–606.
- Hedenskog, M., Petersson, E., Jarvi, T., & Khamis, M. (1997). Morphological comparison of natural produced Atlantic salmon (*Salmo salar* L), anadromous brown trout (*Salmo trutta* L), and their hybrids. *Nordic Journal of Freshwater Research*, 73, 35–43.
- Hegrenes, S. (2001). Diet-induced phenotypic plasticity of feeding morphology in the orange spotted sunfish, *Lepomis humilis*. *Ecology of Freshwater Fish*, 10, 35–42.
- Hwang, D. F., Chen, T. Y., Shiau, C. Y., & Jeng, S. S. (2000). Seasonal variations of free amino-acids and nucleotide-related compounds in the muscle of cultured Taiwanese puffer *Takifugu rubripes*. *Fisheries Science*, 66, 1123–1129.
- Karlsson, A., Eliason, E. J., Mydland, L. T., Farrell, A. P., & Kiessling, A. (2006). Postprandial changes in plasma free amino acid levels obtained simultaneously from the hepatic portal vein and the dorsal aorta in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 209, 4885–4894. <https://doi.org/10.1242/jeb.02597>
- Kendall, D. (1986). The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9, 428–430.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11, 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Kosmas, C., Danalatos, N., & Mizara, A. (1998a). The causes in land degradation: Climate: Greece. In A. Conacher & M. Sala (Eds.), *Land degradation in Mediterranean environments of the world. Nature and extent, causes and solutions* (pp. 67–77). Chichester, England: John Wiley & Sons.
- Kottelat, M., & Freyhof, J. (2007). Handbook of European freshwater fishes, (ed. by M. Kottelat & J. Freyhof), pp. 646. Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin: Kottelat.
- Löhmus, M., Sundström, L. F., Björklund, M., & Devlin, R. H. (2010). Genotype-temperature interaction in the regulation of development, growth, and morphometrics in wild-type, and growth-hormone transgenic Coho Salmon. *PLoS ONE*, 5, e9980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009980>
- Martsikalis, P., Gkafas, G. A., Apostolidis, A. P., & Exadactylos, A. (2014). Genetic structure profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed strains in Greece. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14, 749–757. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14\\_3\\_17](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_3_17)
- Medail, F., & Diadema, K. (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, 36, 1333–1345.
- Minitab 17 Statistical Software (2010). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. Retrieved from [www.minitab.com](http://www.minitab.com)
- Mittelbach, G. G., Osenberg, C. W., & Wainwright, P. C. (1999). Variation in feeding morphology between pumpkinseed populations: Phenotypic plasticity or evolution? *Evolutionary Ecology Research*, 1, 111–128.
- Nichols, K. M., Edo, A. F., Wheeler, P. A., & Thorgaard, G. H. (2008). The genetic basis of smoltification-related traits in *Oncorhynchus mykiss*. *Genetics*, 179, 1559–1575. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.084251>
- O'Higgins, P. (2000). The study of morphological variation in the hominid fossil record: Biology, landmarks and geometry. *Journal of Anatomy*, 197, 103–120.
- Ok, I. H., Bai, S. C., Park, G. J., Choi, S. M., & Kim, K. W. (2001). The patterns of plasma free amino acids after force-feeding in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) with and without dorsal aorta cannulation. *Aquaculture Research*, 32, 70–75.
- Ollson, J., & Eklöv, P. (2005). Habitat structure, feeding mode and morphological reversibility: Factors influencing phenotypic plasticity in perch. *Evolutionary Ecology Research*, 7, 1109–1123.
- Pakkasmaa, S., & Piironen, J. (2001). Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72, 231–239.
- Peres-Neto, P. R., & Magnan, P. (2004). The influence of swimming demand on phenotypic plasticity and morphological interaction: A comparison of two polymorphic charr species. *Oecologia*, 140, 36–45.
- Pottinger, T. G. (2001). Effects of husbandry stress on flesh quality indicators in fish. In S. C. Kestin & P. D. Warriss (Eds.), *Farmed fish quality* (pp. 145–160). London: Blackwell Science.



- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*, 945–959.
- Proulx, R., & Magnan, P. (2004). Contribution of phenotypic plasticity and heredity to the trophic polymorphism of lacustrine brook charr (*Salvelinus fontinalis* M.). *Evolutionary Ecology Research*, *6*, 631–658.
- Pulcini, D., Russo, T., Reale, P., Massa-Gallucci, A., Brennan, G., & Cataudella, S. (2014). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) develop a more robust body shape under organic rearing. *Aquaculture Research*, *45*, 397–409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03236.x>
- Pulcini, D., Wheeler, P. A., Cataudella, S., Russo, T., & Thorgaard, G. H. (2013). Domestication shapes morphology in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, *82*, 390–407. <https://doi.org/10.1111/jfb.12002>
- R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R foundation for statistical Computing. Retrieved from <http://www.R-project.org>.
- Robinson, B. W., & Wilson, D. S. (1995). Experimentally induced morphological diversity in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Copeia*, *2*, 294–305.
- Robinson, J. W., Yanke, D., Mizra, J., & Ballantyne, J. S. (2011). Plasma free amino acid kinetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a bolus injection of <sup>15</sup>N-labelled amino acids. *Amino Acids*, *40*, 689–696.
- Rohlf, F. J. (2006). *TpsDig Version 2.10, Digitalized Landmarks and Outlines*. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Rohlf, F. J., & Slice, D. (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, *39*, 40–59.
- Schumacher, A., Wax, C., & Gropp, J. (1997). Plasma amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed intact protein or a crystalline amino acid diet. *Aquaculture*, *151*, 15–28.
- Seiler, S. M., & Keeley, E. R. (2007). Morphological and swimming stamina differences between Yellowstone cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii bouvieri*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and their hybrids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *64*, 127–135.
- Skoulikidis, N. T. (1993). Significance evaluation of factors controlling river water composition. *Environmental Geology*, *22*, 178–185.
- Skoulikidis, N. T., Amaxidis, Y., Bertahas, I., Laschou, S., & Gritzalis, K. (2006). Analysis of factors driving stream water composition and synthesis of management tools. A case study on small/medium Greek catchments. *Science of the Total Environment*, *362*, 205–241.
- Skoulikidis, N. T., Gritzalis, K., Kouvarda, T., & Buffagni, A. (2004). The development of an ecological quality assessment and classification system for Greek running waters based on benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, *516*, 149–160.
- Stanković, D., Stephens, M. R., & Snoj, A. (2016). Origin and introduction history of self-sustaining rainbow trout populations in Europe as inferred from mitochondrial DNA and a Y-linked marker. *Hydrobiologia*, *770*, 129–144. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2577-6>
- Suyama, M., Hirano, T., & Suzuki, T. (1986). Buffering capacity of free histidine and its related dipeptides in white and dark muscles of yellowfin tuna. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, *52*, 2171–2175.
- Swain, D. P., & Foote, C. J. (1999). Stocks and chameleons: The use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*, *43*, 113–128.
- Swain, D. P., Riddell, B. E., & Murray, C. B. (1991). Morphological differences between hatchery and wild populations of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Environmental versus genetic origin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *18*, 1783–1791.
- Tantikitti, C., & March, B. E. (1995). Dynamics of plasma free amino acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under variety of dietary conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, *14*, 179–194.
- Taylor, E. B. (1986). Differences in morphology between wild and hatchery populations of juvenile Coho Salmon. *Progressive Fish-Culturist*, *48*, 171–176.
- Tzedakis, P. C., Lawson, I. T., Frogley, M. R., Hewitt, G. M., & Preece, R. C. (2002b). Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: Evolutionary implications. *Science*, *297*, 2044–2047.
- Van Marrewijk, W. J. A., & Ravesteyn, H. J. L. (1974). Amino acid metabolism of *Astacus leptodactylus* esch.-l. Composition of the free and protein-bound amino acids in different organs of the crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *47*, 531–542.
- Van Waarde, A. (1988). Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *91*, 207–228.
- Weiss, S. M., & Kulikowski, C. A. (1991). *Computer systems that learn*. San Mateo, CA: Morgan Kaufmann.
- Wessel, M. L., Smoker, W. W., & Joyce, J. E. (2006). Variation of morphology among juvenile chinook salmon of hatchery, hybrid, and wild origin. *Transactions of the American Fisheries Society*, *135*, 333–340.
- Yamamoto, T., Unuma, T., & Akiyama, T. (2000). The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *182*, 353–372.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: A primer*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.

**How to cite this article:** Martsikalos PV, Kavouras M, Gkafas GA, Apostolidis AP, Boziaris IS, Exadactylos A. Morphological and free amino acid profile variability, as a tool for stock identification among farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* of different origin. *Aquac Res*. 2017;00:1–10. <https://doi.org/10.1111/are.13491>