

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Γενετική παραλλακτικότητα σειρών εκτρεφόμενης τσιπούρας από  
ιχθυοκαλλιέργειες»**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΙΩΑΝΝΙΔΗ**

**A.E.M: 992**

**ΒΟΛΟΣ 2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7806/1  
Ημερ. Εισ.: 25-11-2009  
Δωρεά: Συγγραφέας  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΙΥΠ  
2009  
ΙΩΑ

**«Γενετική παραλλακτικότητα σειρών εκτρεφόμενης τσιπούρας από  
ιχθυοκαλλιέργειες»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

1) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**,

2) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,

3) **Ελένη Γκολομάζου**, Λέκτορας, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Στην οικογένεια μου και  
Στην μνήμη του αγαπημένου μου  
Παππού...Νίκο,*

*Ευχαριστίες,*

Η συγκεκριμένη πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Ιχθυολογίας και Γενετικής, του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών Κρήτης (ΕΛΚΕΘΕ). Το αντικείμενο μελέτης ήταν η γενετική παραλλακτικότητα σειρών εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*) με χρήση μικροδορυφορικού DNA.

Θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω όσους με βοήθησαν και με στήριξαν ώστε να υλοποιηθεί η διατριβή μου. Χωρίς τη βοήθεια των παρακάτω ατόμων θα ήταν δύσκολο να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, τον Επίκουρο καθηγητή κ.Εξαδάκτυλο Θανάση, που με δέχτηκε στην ερευνητική του ομάδα και με βοήθησε να μάθω πολλά και απο την συγκεκριμένη διατριβή να γίνω πιο ώριμη και συνηδειτοποιημένη.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον διδάκτορα Παλαικώστα Χρήστο, τόσο για την πολύτιμη συνεισφορά του στην εργασία μου όσο και για την άμεση συνεργασία που είχα μαζί του. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ερευνητική ομάδα του τμήματος της Γενετικής σχολής καθώς απ' όλους είχα να μάθω κάτι. Μέσα απο τις βδομαδιαίες συζητήσεις μας έμαθα πολλά πάνω σε διάφορα θέματα και κυρίως την έννοια της συνεργασίας και της αλληλεγγύης.

Κλείνοντας, θέλω να εκφράσω τον θαυμασμό μου και την ευγνωμοσύνη μου για την Κατερίνα Χατζηπλή και για τον Δημήτρη Λουκοβίτη, που με καθοδήγησαν και μου δίδαξαν πως να εργάζομαι στο εργαστήριο. Παρέμειναν στο πλευρό μου και με συμβούλευαν μέχρι το τέλος της εργασίας μου. Μου έδωσαν πολλές γνώσεις και πληροφορίες που χρειαζόμουνα για να προχωρήσω.

Τις φίλες μου και συμφοιτήτριες μου Καψάλη Άρτεμη και Ανδρέου Μαρία που μου στάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια και μου συμπαραστάθηκαν όχι μόνο στον επαγγελματικό τομέα αλλά και σε προσωπικό επίπεδο. Ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου Γιάννη και Μαρία που με στήριξαν και ενθάρρυναν τις επιλογές μου, καθώς ήταν δίπλα μου σε ο,τι κι αν έκανα. Τέλος την αδερφή μου Όλγα που με στήριξε ηθικά και πνευματικά.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> .....	7
1.1 Περιγραφή της τσιπούρας ( <i>Sparus aurata</i> ) .....	7
1.1.1 Συστηματική κατάταξη και περιγραφή του είδους.....	7
1.1.2 Βιολογία και Αναπαραγωγή .....	8
1.1.3 Γεωγραφική Εξάπλωση και Τρόπος διαβίωσης .....	9
1.1.4 Διατροφικές συνήθειες της τσιπούρας.....	10
1.2. Κατηγορίες μοριακών δεικτών (molecular markers).....	11
1.2.1. Αλλοένζυμα .....	12
1.2.2. Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) .....	14
1.2.3. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	14
1.2.4. Μικροδορυφορικό DNA .....	16
1.2.5. Πολυμορφισμοί απλών βάσεων (Single Nucleotide Polymorphisms SNPs) .	18
1.2.6. Μινιδορυφόροι (Minisatellites) .....	19
1.2.7. RAPD ( Random Amplified Polymorphic DNA).....	20
1.2.8. AFLPs(Amplified fragment length polymorphism) .....	21
1.3. Σκοπός εργασίας και λόγος επιλογής μικροδορυφορικών ως μοριακός δείκτης .....	23
1.4. Απώλεια γενετικής ποικιλότητας.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> .....	25
2.1. Υλικά και μέθοδοι.....	25
2.1.1. Περιοχές προέλευσης και επεξεργασίας δειγμάτων .....	25
2.1.2. Εξαγωγή DNA .....	25
2.1.3. Ηλεκτροφόρηση DNA .....	27
2.1.4 Επιλογή μικροδορυφορικών τόπων .....	29
2.1.5 Γονοτύπιση μικροδορυφορικών αλληλουχιών .....	31
2.1.6 Στατιστική Ανάλυση.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> .....	35
3.1. Αποτελέσματα.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> .....	38
4.1. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	38
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	41
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	45

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

## 1.1 Περιγραφή της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

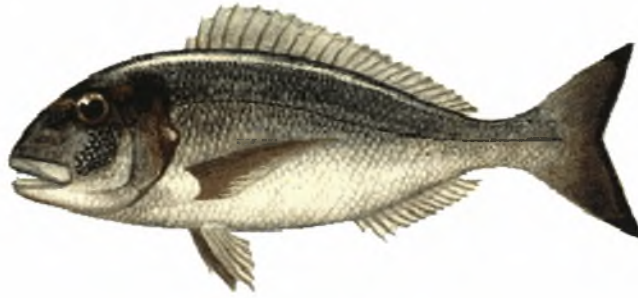
### 1.1.1 Συστηματική κατάταξη και περιγραφή του είδους

Το ψάρι *Sparus aurata* ανήκει στην κλάση των Ακτινοπτερυγίων του φύλου Χορδωτά, μέλος της οικογένειας Sparidae. Το είδος αυτό έχει σώμα επίμηκες, πεπλατυσμένο και πλευρικά πιεσμένο. Έχει κυρτή ράχη και κοντό ρύγχος. Χαρακτηρίζεται από μια μεγάλη μαύρη κηλίδα στο τέλος του βραγχιακού επικαλύμματος σε ένα ασημένιο φόντο, είναι το σήμα κατατεθέν της τσιπούρας. Το έντονο κυρτό προφίλ, δίνει στο ψάρι μια όμορφη αγκιάδα και έναν αέρα κυριαρχίας. Οι κάθετοι ασημόγκριζοι χρωματισμοί που αποκτά το ψάρι όταν είναι λίγο νευρικό, όταν είναι σε περίοδο αναπαραγωγής ή όταν κυνηγά για να συλλάβει την τροφή του, ολοκληρώνει την εικόνα του ψαριού. Η τσιπούρα μπορεί να φτάσει σε μήκος τα 70 cm ενώ το μεγαλύτερο δημοσιευμένο βάρος για ψάρι του είδους είναι τα 17,2 kg. Το ψάρι έχει μέγιστη ηλικία τα 11 χρόνια σε συνθήκες κράτησης (Νεοφύτου, 2006).

Η συστηματική κατάταξη της τσιπούρας σύμφωνα με τον Linnaeus, 1758 είναι η παρακάτω:

- **ΒΑΣΙΛΕΙΟ** : Animalia
- **ΦΥΛΟ** : Chordota
- **ΚΛΑΣΗ** : Actinopterygii
- **ΤΑΞΗ** : Perciformes
- **ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ** : Sparidae
- **ΓΕΝΟΣ** : Sparus
- **ΕΙΔΟΣ** : *aurata*





### 1.1.2 Βιολογία και Αναπαραγωγή

Η τσιπούρα είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος, δηλαδή γεννιέται πρώτα ως αρσενικό και μετά το πέρας περίπου 3 χρόνων κάνει αναστροφή φύλου και γίνεται θηλυκό. Έτσι στα πρώτα δύο χρόνια της ζωής της ως αρσενικό, έχει 20-30 cm μήκος και ζυγίζει γύρω στα 350-400 g. Στον τρίτο χρόνο, που γίνεται θηλυκό, το μήκος της είναι συνήθως 33-40 cm και ζυγίζει από 600 g και πάνω. Η αναπαραγωγή της τσιπούρας λαμβάνει χώρα από τον Οκτώβριο μέχρι και το Δεκέμβριο στην ανοιχτή θάλασσα. Ένα θηλυκό, μπορεί να γεννάει 20000-80000 αυγά καθημερινά κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Ο γόνος που θα βγει, θα κολυπήσει στα ρηχά νερά, εκεί που μπορεί να βρει μεγαλύτερη ασφάλεια και αφθονία τροφής, όπου και θα μείνει μέχρι τον επόμενο Οκτώβρη. Μετά θα ενσωματωθεί στο αρχικό κοπάδι, θα λαμβάνει μέρος στην αναπαραγωγή και θα το ακολουθεί στις μετακινήσεις του. Κάτι αξιοσημείωτο για την τσιπούρα είναι ότι ενώ μπορεί να είναι σε διαδικασία αλλαγής φύλου από αρσενικό σε θηλυκό, μπορεί να τη διακόψει, και να ξαναπαράγει σπέρμα για την ερχόμενη αναπαραγωγική περίοδο (Κλαουδάτος, 2005).



( Πηγή: <http://www.fao.org>)

### 1.1.3 Γεωγραφική Εξάπλωση και Τρόπος διαβίωσης

Είναι κοινό είδος στην κεντρική και δυτική Μεσόγειο θάλασσα. Δεν συναντάται συχνά στην Ανατολική και Νότιο – Ανατολική Μεσόγειο και πολύ σπάνια στη Μαύρη θάλασσα. Απαντάται απο την περιοχή της Αγγλίας μέχρι το Πράσινο ακρωτήριο και τα Κανάρια νησιά.

Η τσιπούρα σχηματίζει κοπάδια πολυμελή ή ολιγομελή, ενώ κάποιες φορές, μεγάλα θηλυκά άτομα μπορεί να βρεθούν να κυνηγούν μόνα τους για μια περίοδο. Τα βάθη που κινούνται συνήθως είναι μέχρι τα 40 μέτρα, ενώ το μεγαλύτερο βάθος που έχει εντοπιστεί ψάρι είναι τα 150 μέτρα. Παρ' όλα αυτά ψάρια 5 - 6 κιλά, είναι πιθανόν να τα βρούμε σε αρκετά ρηχά νερά, λιγότερο από 10 μέτρα. Το ψάρι είναι ευρύαλο και ευρύθερμο, αντέχει δηλαδή σε μεγάλες μεταβολές αλατότητας και θερμοκρασίας του νερού. Αυτό καθορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό τον τρόπο ζωής του, καθώς και που το συναντάμε. Πιο συγκεκριμένα, την τσιπούρα μπορούμε να τη βρούμε όχι μόνο στη θάλασσα, αλλά και κοντά σε εκβολές ποταμών, μέσα σε λιμνοθάλασσες και μέσα σε ποτάμια σε κοντινή απόσταση από τη θάλασσα. Πιο συγκεκριμένα βρίσκεται συνήθως σε επίπεδους βυθούς με τραγανά, λάσπη ή φύκια καθώς και σε λιβάδια ποσειδωνίας. Προτιμά αυτούς τους βιοτόπους, γιατί εκεί βρίσκει πιο εύκολα την τροφή της η οποία αποτελείται από όστρακα κυρίως, όπως μύδια, στρείδια και κυδώνια, και πιο σπάνια από θαλάσσια φυτά και φύκη. Θα τη βρούμε επίσης να κινείται και σε βυθούς, με πέτρες και πλάκες (όπου μπορεί και να βραχώσει), που συνορεύουν με τα προαναφερθέντα περιβάλλοντα(Νεοφύτου,..2006).



( Πηγή : <http://www.fishbase.com>)

#### 1.1.4 Διατροφικές συνήθειες της τσιπούρας

Το είδος αυτό είναι κυρίως σαρκοφάγο και τρέφεται με μαλάκια, μύδια, οστρακοειδή και μικρά ψάρια.

Τα ψάρια της υδατοκαλλιέργειας ταιάζονται κυρίως με ζωντανή τροφή. Συγκεκριμένα όταν περάσει το προνυμφικό στάδιο, και οι γόννοι σταματήσουν να τρέφονται από τον λεκιθικό τους σάκο, την 5<sup>η</sup> ημέρα ταιάζονται με τροχόζωα (*Branchionus plicatilis*). Στην συνέχεια την 6<sup>η</sup> έως 10<sup>η</sup> ημέρα τρέφονται με τροχόζωα και *Artemia*. Από την 11<sup>η</sup> έως την 20<sup>η</sup> ημέρα με νάυπλιους και μετανάυπλιους και συνεχίζουν έως την 30<sup>η</sup> ημέρα με μετανάυπλιους. Τα τροχόζωα που χρησιμοποιούνται για την διατροφή των ψαριών καλλιεργούνται στην μονάδα και είναι εμπλουτισμένα με γαλακτώματα (λίπη, πρωτείνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά).

Εκτός από ζωντανή τροφή στα ψάρια δίδεται και σύνθετη τροφή - αδρανής βιομηχανοποιημένη (ιχθυοτροφή) η οποία συνίσταται από θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για το ψάρι(πρωτείνες, αμινοξέα, λιπαρά, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία). Η σύνθετη τροφή δίδεται υπό την μορφή συμπύκτων τα οποία προέρχονται από ανάμειξη ιχθυάλευρου, ιχθυελαίου, σόγιας, αλευριού και ανόργανων συστατικών. Έτσι επιτυγχάνεται η δημιουργία εύγεστης τροφής η οποία έχει πλούσια θρεπτική αξία.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να αντικατασταθεί η ζωντανή τροφή από την σύνθετη (ιχθυοτροφή) καθώς η δεύτερη είναι λιγότερο δαπανηρή και πιο πλούσια σε θρεπτική και ενεργειακή αξία. Επιπρόσθετα, τα τροχόζωα λόγω της ικανότητας τους να διηθούν το νερό υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να γίνουν φορείς παθογόνων μικροοργανισμών και να μεταδώσουν ασθένειες στα ψάρια.



( Πηγή : <http://www.fishbase.com>)

## 1.2. Κατηγορίες μοριακών δεικτών (molecular markers)

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μοριακοί δείκτες που σχετίζονται με γονίδια γνωστής λειτουργίας, ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν αυτοί με τμήματα του γονιδιόματος για τα οποία δεν υπάρχουν πληροφορίες ως προς την λειτουργία τους και την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων.

Από τα παραπάνω στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται οι παρακάτω δείκτες:

- Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)
- RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- Αλλοένζυμα

Στη δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται οι παρακάτω δείκτες:

- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
- AFLPs
- Μικροδορυφόροι (Microsatellites)
- Μινιδορυφόροι (Minisatellites)
- SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

Πρέπει να σημειωθεί ότι ο παραπάνω διαχωρισμός δεν είναι απόλυτος π.χ σε ορισμένες περιπτώσεις οι Μικροδορυφόροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη γονιδίων γνωστής λειτουργίας οπότε θα ανήκαν στην πρώτη κατηγορία.

Αν και η σημασία των δεικτών της πρώτης κατηγορίας ήταν αναμφισβήτητη στην πληθυσμιακή γενετική η χρήση τους σε ζητήματα που παρουσίαζαν ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες ήταν αρχικά περιορισμένη. Σήμερα είναι πλέον ξεκάθαρο ότι αυτοί οι δείκτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι και σε αυτόν τον κλάδο και πιο συγκεκριμένα σε μελέτες που έχουν ως στόχο τα λεγόμενα QTL (Quantative Trait Loci), δηλαδή γενετικοί τόποι που ελέγχουν ποσοτικά χαρακτηριστικά (π.χ βάρος). Επίσης οι παραπάνω δείκτες βρίσκουν εφαρμογή σε μελέτες σύγκρισης γονιδιόματος, εξέλιξης του γονιδιόματος και αναγνώρισης γονιδίων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον.

Σε γενικές γραμμές οι δείκτες της δεύτερης κατηγορίας θεωρείται ότι συνήθως βρίσκονται σε μη κωδικοποιήσιμα τμήματα του DNA και άρα είναι ουδέτεροι ως προς τη

φυσική επιλογή. Οι παραπάνω δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην πληθυσμιακή γενετική όπου αποτελούν τη βάση για την εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας είτε μέσα σε έναν πληθυσμό είτε μεταξύ πληθυσμών και εξακρίβωσης για αν παρατηρείται η ισορροπία Hardy-Weinberg. Επιπλέον οι παραπάνω δείκτες έχουν εφαρμογή όπως και οι αντίστοιχοι της πρώτης κατηγορίας σε προγράμματα εκτροφής (breeding studies) και σε μελέτες εξακρίβωσης του είδους εξεταζόμενων ατόμων. Είναι απαραίτητο να θυμάται κανείς ότι δεν υπάρχει κάποια τεχνική που να θεωρείται ότι δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις. Η καλύτερη τεχνική καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά της εκάστοτε έρευνας (Πίνακας 1).

### 1.2.1. Αλλοένζυμα

Τα αλλοένζυμα είναι οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν. Είναι αλληλόμορφα ενός γενετικού τόπου, δηλαδή είναι οι διαφορετικές παραλλαγές της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί ένας γενετικός τόπος. Τα αλληλόμορφα παρατηρούνται εξαιτίας διαφορών στην αλληλουχία των αμινοξέων που αποτελούν την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι παραπάνω διαφορές αντικατοπτρίζουν διαφορές στην αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη. Οι διαφορές στα αμινοξέα των πρωτεϊνών έχουν πολλές φορές ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να κινούνται με διαφορετική ταχύτητα στο gel ηλεκτροφόρησης, με συνέπεια να παρατηρούνται διακριτές μπάντες (αλληλόμορφα) στο gel.

Ο παρατηρούμενος πολυμορφισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον υπολογισμό της γενετικής ποικιλομορφίας, στη διάκριση ατόμων σε επίπεδο πληθυσμού, είδους και άλλων ταξινομικών μονάδων. Επίσης τα αλλοένζυμα βρίσκουν εφαρμογή σε μελέτες εξέτασης ενδογαμίας (inbreeding), αναγνώρισης διαφορετικών stock (σε ιχθυοτροφεία) και στις λεγόμενες parentage analysis (αναλύσεις για την εύρεση των γονιών ενός ατόμου).

Πίνακας 1: Εφαρμογές μοριακών δεικτών (Πηγή: Liu & Cordes 2004)

<i>Σκοπός έρευνας</i>	<i>Καταλληλότερη Τεχνική</i>	<i>Άλλες χρήσιμες τεχνικές</i>
Αναγνώριση είδους	RAPD	AFLP, Μικροδορυφόροι, Αλλοένζυμα
Αναγνώριση στελέχους (strain)	AFLP, Μικροδορυφόροι	RAPD
Αναγνώριση υβριδίων	RAPD	AFLP, Μικροδορυφόροι, mtDNA
Αναγνώριση γονέων	Μικροδορυφόροι	
Εξακρίβωση γενετικού πολυμορφισμού	AFLP, Μικροδορυφόροι	RAPD
Χαρτογράφηση γονιδιόματος (Genetic mapping)	Δείκτες της 1 <sup>ης</sup> κατηγορίας, Μικροδορυφόροι, SNP	AFLP, RFLP
Συγκρίσεις γονιδιομάτων (Comparative mapping)	Δείκτες της 1 <sup>ης</sup> κατηγορίας	Μικροδορυφόροι (από συντηρητικούς γενετικούς τύπους )

Τα κυριότερα μειονεκτήματα της τεχνικής των αλλοενζύμων περιλαμβάνουν την εσφαλμένη σε πολλές περιπτώσεις έλλειψη ετεροζύγωτων εξαιτίας της παρουσίας μηδενικών αλληλόμορφων (null alleles), δηλαδή ανενεργών ενζυματικά αλληλόμορφων, καθώς και τις μεγάλες ποσότητες ιστού που απαιτούν για τη διεξαγωγή των αναλύσεων. Επίσης τα υπό εξέταση δείγματα πρέπει να είναι ποιοτικός σε καλή κατάσταση. Επιπλέον υπάρχουν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA οι οποίες δεν μεταφράζονται σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα του παρατηρούμενου πολυμορφισμού. Εκτός από τις αλλαγές στην αλληλουχία του DNA που δε μεταβάλλουν την κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη υπάρχουν και αλλαγές οι οποίες αν και προκαλούν ορισμένες αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων δεν είναι ορατές στο gel καθώς δεν μεταβάλλουν την ταχύτητα κίνησης της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατος ο διαχωρισμός των παραπάνω αλληλόμορφων. Σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής

αποτελεί και το γεγονός ότι οι περισσότεροι γενετικοί τόποι που εξετάζει η τεχνική εμφανίζουν μικρό αριθμό αλληλόμορφων συνήθως δύο ή τρία. Αν και τα αλλοένζυμα είναι codominant δείκτες, είναι εύκολη η χρήση τους και έχουν χαμηλό κόστος η χρήση τους έχει περιοριστεί σημαντικά.

### **1.2.2. Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)**

Οι πρώτες μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας σε επίπεδο DNA αφορούσαν το mtDNA, καθώς είναι ένα σχετικά μικρό κυκλικό μόριο το οποίο μπορεί να απομονωθεί ευκολότερα από το πυρηνικό DNA και απαντάται σε χιλιάδες αντίγραφα στο κύτταρο. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι στο mtDNA συσσωρεύονται πολυμορφισμοί με ταχύτερο ρυθμό από ότι στο πυρηνικό DNA. Το παραπάνω οφείλεται στους υψηλότερους ρυθμούς μετάλλαξης σε σχέση με το πυρηνικό DNA, εξαιτίας της απουσίας διορθωτικών μηχανισμών κατά την αντιγραφή του DNA, καθώς και λόγω του μικρότερου δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους ( $N_e$ ) (Liu & Cordes 2004).

Από τεχνικής άποψης οι μοριακοί δείκτες του mtDNA είναι οι ίδιοι με αυτούς των RFLPs με μόνη διαφορά ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση το υπό μελέτη μόριο είναι το mtDNA ενώ στην άλλη περίπτωση στόχος είναι το πυρηνικό DNA. Πολλά χαρακτηριστικά του mtDNA το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σε πολλές μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας. Το mtDNA είναι απλοειδές και στα ζωικά κύτταρα κληρονομείται από το θηλυκό που σημαίνει ότι οι απόγονοι κληρονομούν έναν mtDNA γενότυπο. Το mtDNA είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην κατασκευή φυλογενετικών δέντρων καθώς δεν λαμβάνει χώρα ανασυνδυασμός κατά την αντιγραφή του σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA. Αν και οι γενετικοί τόποι στη συγκεκριμένη τεχνική εμφανίζουν μεγάλο αριθμό αλληλόμορφων, ο περιορισμένος αριθμός διαθέσιμων δεικτών στο mtDNA μόριο έχουν περιορίσει τη χρήση της τεχνικής τα τελευταία χρόνια.

### **1.2.3. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Η ανακάλυψη των ενζύμων περιορισμού το 1968 από τους Meselson and Yuan σηματοδότησε μια νέα εποχή στη γενετική μηχανική (πχ το κόψιμο και 'ράψιμο')

κομματιών DNA από διαφορετικά χρωμοσώματα ή και οργανισμούς. Τα ένζυμα περιορισμού ή αλλιώς ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα που απαντώνται σε βακτήρια και χρησιμεύουν στην απομάκρυνση ξένου DNA όπως το DNA ενδοκυτταρικών βακτηριοφάγων, αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Το DNA των βακτηριών προστατεύεται από το κόψιμο γιατί μεθυλιώνεται. Το πιο κοινό ένζυμο περιορισμού είναι το EcoRI από το βακτήριο *Escherichia coli*. Κόβοντας ένα κομμάτι DNA με κάποιο ένζυμο περιορισμού κάποια άτομα θα έχουν μία θέση στην αλληλουχία του DNA τους που θα κοπεί από το ένζυμο, ενώ άλλα θα έχουν δύο ή περισσότερες με αποτέλεσμα να φαίνεται αντίστοιχος αριθμός κομματιών DNA στο gel ηλεκτροφόρησης τα οποία διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Τα παραπάνω αποτελούν τη βάση της τεχνικής RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), (Τεχνική Πολυμορφισμού Μήκους Περιοριστικών Τμημάτων). Συνήθως το DNA που εξετάζεται είναι το προϊόν της PCR. Η αντικατάσταση μιας βάσης στην αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο εξαιτίας μιας μετάλλαξης θα συντελέσει στην απώλεια της συγκεκριμένης θέσης στο άτομο, καθώς το ένζυμο δεν θα μπορεί πλέον να κόψει το DNA στο συγκεκριμένο σημείο. Ως αποτέλεσμα συγκρίνοντας διαφορετικά άτομα στις θέσεις αυτές θα παρατηρηθεί πολυμορφισμός.

Πρέπει να σημειωθεί ότι κάθε ένζυμο περιορισμού κόβει συγκεκριμένη αλληλουχία DNA (συνήθως μήκους 4-6 ζευγών βάσεων). Σήμερα είναι εμπορικά διαθέσιμα πάνω από 400 ένζυμα περιορισμού. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των RFLPs είναι ότι είναι codominant δείκτες επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη διάκριση των αλληλόμορφων σε ένα άτομο. Επιπλέον καθότι συνήθως οι διαφορές στο μήκος των αλληλόμορφων είναι μεγάλες το σκοράρισμα είναι σχετικά εύκολο (Liu & Cordes 2004). Ωστόσο η τεχνική παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα με κυριότερο τα χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού που μπορεί να διακρίνει. Επιπλέον για να είναι δυνατή η χρήση της απαιτούνται εκ των προτέρων πληροφορίες για το υπό εξέταση DNA (π.χ πληροφορίες ως προς την αλληλουχία του DNA), κάνοντας με αυτόν τον τρόπο δύσκολη και χρονοβόρα τη χρήση σε είδη για τα οποία δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες.



#### 1.2.4. Μικροδορυφορικό DNA

##### Χαρακτηριστικά

Το μικροδορυφορικό DNA (microsatellite DNA, Simple Sequence Repeats-SSRs) αποτελεί κλασμα του επαναλαμβανόμενου DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπου το βασικό μέγεθος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (μοτίβου) κυμαίνεται μεταξύ 1-5 ζευγών βάσεων (bp). Μικροδορυφορικές περιοχές, συνολικού μεγέθους 10-300 bp, βρίσκονται διάσπαρτες σε όλο το πυρηνικό DNA ευκαρυωτών, αλλά και στο DNA των χλωροπλαστών. Συγκριτικά πρέπει να αναφερθεί ότι το μιτιδορυφορικό DNA έχει συνολικό μέγεθος μερικές εκατοντάδες με μερικές χιλιάδες bp, το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας είναι 10-64 bp και βρίσκεται συνήθως σε υποτελομερικές περιοχές.

Η πυκνότητα των μικροδορυφορικών γονιδιακών τόπων ποικίλλει στα είδη. Στον ανθρώπινο γονιδίωμα και στο μπακαλιάρο του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), συναντάται ένας ανα 5-6 kb αν και συνήθως στο ζωικό βασίλειο συναντάται ένας ανά 30-50 kb. Στα φυτά είναι 5 φορές λιγότερο άφθονοι από ότι στα θηλαστικά.

Οι μικροδορυφορικοί γονιδιακοί τόποι διαχωρίζονται σε τέλειους (perfect), ατελείς (imperfect) και σύνθετους (compound). Οι τέλειοι αποτελούνται από συνεχείς επαναλήψεις του ίδιου μοτίβου, ενώ στους ατελείς υπάρχουν μία ή περισσότερες τυχαίες βάσεις ανάμεσα στις επαναλήψεις. Τέλος, οι σύνθετοι γονιδιακοί τόποι αποτελούνται από γειτονικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που διαφέρουν στο βασικό μοτίβο τους.

Έχει υπολογιστεί ότι οι μεταλλικοί ρυθμοί στο μικροδορυφορικό DNA είναι της τάξης του  $10^{-3}$  ανά τόπο και γαμέτη, μια μετάλλαξη δηλαδή ανά 1000 γαμέτες. Ενδεικτικά επίσης αναφέρουμε ότι ο μέσος ρυθμός μετάλλαξης σημείου στα γονιδιώματα είναι  $10^{-9}$ . Το γεγονός αυτό οδηγεί σε υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού, δηλαδή πολλά αλληλόμορφα και υψηλή ετεροζυγωτία (τιμές ετεροζυγωτίας που ξεπερνούν το 50% και συχνά φθάνουν το 100%).

Εξαιτίας λοιπόν της αφθονίας των μικροδορυφορικών γονιδιακών τόπων και του υψηλού πολυμορφισμού τους, το μικροδορυφορικό DNA αποτελεί πi έναν από τους σημαντικότερους γενετικούς δείκτες. Χρησιμοποιείται για μελέτες διαπίστωσης, πατρότητας, σύνδεσης, χαρτογράφησης και πληθυσμιακής δομής σε πλήθος οργανισμών.

Επίσης, πολυμορφισμός στο μικροδορυφορικό DNA έχει συσχετισθεί και με γενετικές ασθένειες.

Κατά την ανάλυση του πολυμορφισμού των μικροδορυφορικών δεικτών, αυτό που ενδιαφέρει είναι ο αριθμός των επαναλήψεων του βασικού μοτίβου. Αυτός ο αριθμός συνήθως ποικίλλει από άτομο σε άτομο, ενώ το μέγεθος και η αλληλουχία των περιοχών αριστερά και δεξιά του μικροδορυφορικού τύπου παραμένουν σταθερά. Έτσι σχεδιάζοντας εκκινήτες για τις εξωτερικές περιοχές είναι δυνατόν να ενισχυθεί με PCR αυτός ο τύπος. Ο διαφορετικός αριθμός επαναλήψεων στα διαφορετικά άτομα θα οδηγήσει να παραχθούν PCR προϊόντα διαφορετικού μεγέθους στα άτομα, που εύκολα διακρίνονται όταν τοποθετηθούν δίπλα δίπλα σε μια πηκτή ηλεκτροφόρησης. Αν και οι μικροδορυφορικοί τόποι όπως αναφέρθηκε δεν εκφράζονται, μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να δώσουν μια γενικότερη εικόνα της ποικιλότητας στο γονιδίωμα.

#### Δομικά χαρακτηριστικά του μικροδορυφορικού DNA και πολυμορφισμός

Το επίπεδο πολυμορφισμού των μικροδορυφορικών γονιδιακών τόπων έχει συσχετισθεί με πλήθος παραγόντων:

1. Μέγεθος του επαναληπτικού μοτίβου. Οι μικροδορυφορικοί τόποι όπου το μοτίβο της επανάληψης είναι δινουκλεοτίδιο εμφανίζουν υψηλότερους μεταλλακτικούς ρυθμούς. Όταν το μοτίβο είναι τρινουκλεοτίδιο ο μεταλλακτικός ρυθμός είναι χαμηλότερος και ακόμη χαμηλότερος είναι για τετρανουκλεοτιδικούς γονιδιακούς τόπους. Εξάιρεση αποτελούν οι τρινουκλεοτιδικοί τόποι που έχουν συσχετισθεί με γενετικές ασθένειες, οι οποίοι παρουσίασαν ρυθμό μετάλλαξης 3,7-6,9 φορές υψηλότερο.
2. Σύσταση του επαναληπτικού μοτίβου. Οι μικροδορυφορικοί γονιδιακοί τόποι πλούσιοι σε A/T είναι πιο πολυμορφικοί.
3. Αριθμός επαναλήψεων. Μικροδορυφορικοί γονιδιακοί τόποι με μεγάλο μέσο αριθμό επαναλήψεων είναι περισσότερο πολυμορφικοί από μικρούς γονιδιακούς τόπους.
4. «Καθαρότητα» του γονιδιακού τόπου. Τέλειοι μικροδορυφορικοί τόποι παρουσιάζουν υψηλότερη ποικιλομορφία από ατελείς ή σύνθετους τόπους με τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων.

### Ρόλος του μικροδορυφορικού DNA

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες θεωρείται ότι δεν υπόκειται σε επιλεκτικές πιέσεις. Το γεγονός ότι μέχρι τώρα δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν κάποιο γενικό ρόλο τους στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα οδηγεί τους ερευνητές να υποστηρίζουν ότι είναι επιλεκτικά ουδέτερες περιοχές. Παρ' όλα αυτά τουλάχιστο τέσσερις διαφορετικές λειτουργίες έχουν συσχετισθεί με απλές επαναλαμβανόμενες περιοχές :

- Δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων στα θηλαστικά και στη *Drosophila*
- Συμμετέχουν στον ανασυνδυασμό διευκολύνοντας στην ευθυγράμμιση / σύναψη των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση.
- Στον άνθρωπο, δινουκλεοτιδικές και τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις συνδέονται με συγκεκριμένες πυρηνικές πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας.
- Μερικές κατηγορίες επαναλήψεων, εξαιτίας της σύστασης τους, ίσως βοηθούν στη διαμόρφωση της σωστής δομής των χρωμοσωμάτων. Έτσι π.χ. επαναλήψη GT δημιουργούν δομές Z-DNA που διεκολύνουν το πακετάρισμα των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση.

Κάποιες πολύ αδύνατες επιλεκτικές πιέσεις είναι λοιπόν πιθανές με βάση τις παραπάνω λειτουργίες. Ίσως έτσινα εξηγείται και η απρόσμενη διατήρηση ορισμένων ομόλογων μικροδορυφορικών αλληλουχιών σε πολύ απομακρυσμένα taxa.

#### **1.2.5. Πολυμορφισμοί απλών βάσεων (Single Nucleotide Polymorphisms SNPs)**

Οι SNPs είναι οι πλέον συχνοί πολυμορφισμοί στο γένωμα, με συχνότητα σε πολλά είδη έναν κάθε 500 ζεύγη βάσεων περίπου (Morin et al 2004). Αν και η ύπαρξη αυτού του είδους του πολυμορφισμού ήταν γνωστή από τη δεκαετία του 1970 η χρήση της τεχνικής σε μεγάλη κλίμακα δεν ήταν εφικτή εξαιτίας τεχνολογικών αδυναμιών ως προς την ταχεία αλληλούχιση πολλών δειγμάτων. Ωστόσο η τεχνολογική πρόοδος των τελευταίων ετών (π.χ gene chip technology) έχει φέρει στο προσκήνιο την τεχνική των SNPs.

Οι SNPs πολυμορφισμοί εμφανίζονται ως συνέπεια σημειακών μεταλλάξεων οι οποίες προκαλούν την αντικατάσταση της βάσης στη συγκεκριμένη θέση. Το φαινόμενο αντικατάστασης πουρίνης με πουρίνη (A↔G) και πυριμιδίνης με πυριμιδίνη (C↔T)

καλείται transition. Αντίστοιχα αντικατάσταση πουρίνης με πυριμιδίνη ή αντίθετα καλείται transersion. Αν και υπάρχουν διπλάσιες πιθανότητες για transversions σε σχέση με transitions οι περισσότεροι SNPs στα περισσότερα είδη είναι transitions. Θεωρητικά ο κάθε γενετικός τόπος μπορεί να έχει έως και τέσσερα αλληλόμορφα (A, T, C και G). Ωστόσο στην πράξη οι περισσότεροι SNPs γενετικοί τόποι εμφανίζουν δύο αλληλόμορφα, είτε τις δύο πουρίνες είτε τις δύο πυριμιδίνες.

Οι SNPs παρουσιάζουν πολλές δυνατότητες για την μελέτη της ποικιλομορφίας σε φυσικούς πληθυσμούς. Πιστεύεται μάλιστα ότι στο μέλλον θα αντικαταστήσουν τους μικροδορυφόρους ως μοριακός δείκτης επιλογής. Είναι codominant δείκτες και παρουσιάζουν μεγάλη χρησιμότητα σε περιπτώσεις μερικώς κατεστραμμένου DNA (πχ DNA από αρχαία δείγματα) καθώς είναι μικρού μήκους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δείγματα DNA μικρότερα από 50 βάσεις. Ωστόσο η εξαγωγή συμπερασμάτων χρειάζεται προσοχή καθώς στην περίπτωση π.χ που το δείγμα αποτελείται από μικρό αριθμό ατόμων τότε γενετικοί τόποι με σπάνια αλληλόμορφα δεν θα συμπεριληφθούν στα αποτελέσματα με συνέπεια πχ οι ερευνητές να οδηγηθούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα όπως έλλειψη ετεροζυγωτίας και ύπαρξη στενωπού (bottleneck) (Allendorf & Luikart 2007). Οι SNPs θεωρούνται ως οι καταλληλότεροι δείκτες στη χαρτογράφηση γονιδιόματος και στον εντοπισμό των QTL. Ωστόσο ο εξοπλισμός που απαιτεί η τεχνική είναι ιδιαίτερα ακριβός, κάνοντας ανέφικτη τη χρήση τους για πολλά επιστημονικά εργαστήρια.

### **1.2.6. Μινιδορυφόροι (Minisatellites)**

Οι μινιδορυφόροι είναι συνεχώς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους από 20 έως αρκετές εκατοντάδες νουκλεοτιδία. Οι μινιδορυφόροι παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι σε περιπτώσεις ταυτοποίησης ατόμων καθώς και στις parentage analysis που έχουν ιδιαίτερη χρησιμότητα στα προγράμματα εκτροφής (breeding). Τα αλληλόμορφα αναγνωρίζονται από τον αριθμό των επαναλήψεων της προκύπτουσας αλληλουχίας.

Τα κυριότερα μειονεκτήματα της τεχνικής βρίσκονται στη δυσκολία αναγνώρισης αλληλόμορφων που ανήκουν σε ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο, καθώς σε ένα gel

ηλεκτροφόρησης εμφανίζονται μπάντες (αλληλόμορφα) από πολλούς γενετικούς τόπους. Επίσης εξαιτίας του γεγονότος ότι οι μινιδουφόροι είναι μεγάλου μήκους δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση δειγμάτων DNA μικρότερων από περίπου 300 ζεύγη βάσεων.

### 1.2.7. RAPD ( Random Amplified Polymorphic DNA)

Η τεχνική των RAPDs περιλαμβάνει την χρήση τυχαίων εκκινητών στη PCR χωρίς να είναι γνωστή η αλληλουχία του υπό εξέταση DNA. Σε κάθε αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται ένα είδος εκκινητή μήκους περίπου 10 ζευγών βάσεων. Ο εκκινητής λειτουργεί ταυτόχρονα και ως forward και ως reverse. Οι εκκινητές υβριδίζονται σε εκατοντάδες σημεία του γενόματος. Ωστόσο ενίσχυση (amplification) λαμβάνει χώρα μεταξύ σημείων που απέχουν λιγότερο από περίπου 2 kb ( το μεγαλύτερο δυνατό μήκος για τα προϊόντα της PCR) (Allendorf & Luikart 2007).

Οι συνθήκες της PCR διαλέγονται ούτως ώστε 10-20 κομμάτια DNA να ενισχυθούν από τον κάθε εκκινητή. Με αυτόν τον τρόπο λίγοι διαφορετικοί εκκινητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή πολλών διαφορετικών προϊόντων PCR από πολλούς γενετικούς τόπους του γενόματος. Εξαιτίας του μικρού μήκους των εκκινητών και των σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing temperatures περίπου 35-40 °C) παράγεται μεγάλος αριθμός προϊόντων (αλληλόμορφων) από την PCR. Κάθε ένα προϊόν θεωρείται ότι αναπαριστά και διαφορετικό γενετικό τόπο. Οι RAPD είναι dominant δείκτες και ο προσδιορισμός του γενετικού πολυμορφισμού επιτυγχάνεται με βάση την παρουσία/απουσία αλληλόμορφου στον κάθε γενετικό τόπο.

Πολυμορφισμός παρατηρείται εξαιτίας αντικατάστασης βάσεων στα σημεία που υβριδίζονται οι εκκινητές ή εξαιτίας πρόσθεσης ή αφαίρεσης τμημάτων DAN (indels) μεταξύ των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών. Η τεχνική παρουσιάζει υψηλή δυνατότητα στην εύρεση πολυμορφισμού. Χρησιμοποιώντας σει εκκινητών είναι δυνατή η εξέταση ολόκληρου του γενόματος με βάση τα διαφορετικά προφίλ με μπάντες που εμφανίζονται για κάθε εκκινητή. Η τεχνική των RAPD μπορούν να χρησιμοποιηθεί για κάθε είδος, χωρίς να υπάρχουν πληροφορίες για την αλληλουχία του DNA του. Η

τεχνική θεωρείται ως η καταλληλότερη, αν συνυπολογιστεί και ο οικονομικός παράγοντας, σε περιπτώσεις αναγνώρισης και ταυτοποίησης ειδών.

Ωστόσο, τα RAPD παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα όπως η δυσκολία αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων, εξαιτίας των χαμηλών θερμοκρασιών υβριδοποίησης των εκκινητών. Δηλαδή επανάληψη του πειράματος είναι δύσκολο να εμφανίσει τα ίδια αποτελέσματα, κάνοντας δύσκολη την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και συγκρίσεων παρόμοιων ερευνών. Επίσης σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί και η αδυναμία διάκρισης των ομοζύγωτων, στο κυρίαρχο αλληλόμορφο, από τα ετεροζύγωτα. Αν και σε μερικές περιπτώσεις οι μπάντες μπορεί να παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη φωτεινότητά τους ο διαχωρισμός σε γενικές γραμμές δεν είναι εφικτός. Επιπλέον είναι δύσκολο να συμπεράνει κανείς αν τα αλληλόμορφα, που παρατηρούνται με τη μορφή μπάντας στο gel, προέρχονται από τον ίδιο ή από διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Δηλαδή αλληλόμορφα διαφορετικών γενετικών τόπων τα οποία έχουν ίδιο μήκος και άρα δεν μπορούν να διαχωριστούν στην ηλεκτροφόρηση. Το τελευταίο είναι ιδιαίτερα πιθανό στην περίπτωση που ο δείκτης έχει προέλθει από πρόσθεση ή αφαίρεση τμήματος DNA στον εξεταζόμενο γενετικό τόπο, παρά αν έχει προέλθει από μετάλλαξη στο σημείο υβριδισμού του εκκινητή (Liu & Cordes 2004).

### **1.2.8. AFLPs (Amplified fragment length polymorphism)**

Η τεχνική των AFLPs κάνει χρήση της PCR για να παράγει αποτυπώματα DNA (DNA fingerprints), δηλαδή προφίλ με μπάντες από πολλαπλούς γενετικούς τόπους ταυτόχρονα. Τα AFLPs συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των RFLPs και RAPDs ξεπερνώντας ταυτόχρονα τις αδυναμίες των παραπάνω τεχνικών. Τα παραπάνω επιτυγχάνονται με επιλεκτική PCR amplification κομματιών DNA που παράγονται μετά από κόψιμο του γενομικού DNA. Η κυριότερη διαφορά της τεχνικής των AFLPs με τις προαναφερθείσες έγκειται στη χρήση κομματιών DNA γνωστής αλληλουχίας (adaptors) τα οποία ενώνονται με τα κομμάτια του εξεταζόμενου DNA, τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψη με ένζυμο. Αρχικά το DNA του δείγματος κόβεται με δύο διαφορετικά ένζυμα (συνήθως χρησιμοποιούνται τα EcoRI και MseI). Στη συνέχεια προσθέτονται οι adaptors οι οποίοι ενώνονται στα άκρα των παραγόμενων

κομματιών του γενομικού DNA. Εξαιτίας του υπερβολικά μεγάλου αριθμού κομματιών DNA οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται έχουν στο 3' άκρο τους επιπρόσθετα κάποια γνωστή βάση. Με αυτόν τον τρόπο τα κομμάτια του DNA που θα ενισχυθούν στην αντίδραση της PCR μειώνεται στο 1/4 καθώς ο εκκινητής θα υβριδιστεί μόνο με τα κομμάτια DNA που έχουν συμπληρωματική βάση ως προς της επιπλέον που έχει στο 3' άκρο του. Αντίστοιχα στην περίπτωση που απαιτεί ακόμα μεγαλύτερη μείωση των προϊόντων της PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκινητές στους οποίους έχουν προστεθεί περισσότερες επιπλέον βάσεις (Liu & Cordes 2004).

Το κύριο πλεονέκτημα των AFLPs έγκειται στο γεγονός ότι πολλοί πολυμορφικοί δείκτες μπορούν να παραχθούν γρήγορα για τα περισσότερα είδη ακόμα και στην περίπτωση όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες για την αλληλουχία του DNA. Επιπλέον η τεχνική παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία ως προς την εύρεση επιπέδων πολυμορφισμού.

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα AFLPs εμφανίζουν μόνο δύο αλληλόμορφα σε κάθε γενετικό τόπο και επεξεργάζονται ως dominant δείκτες, αν και υπάρχουν λογισμικά πακέτα (AFLP QuantaPro, Key Gene) που επιτρέπουν το σκοράρισμα ως codominant δείκτες. Το παραπάνω σκοράρισμα είναι δυνατό μόνο για οικογένειες οργανισμών για τις οποίες υπάρχουν ικανοποιητικές πληροφορίες, αλλά είναι ιδιαίτερα δύσκολο σε μελέτες που αφορούν ολόκληρο τον πληθυσμό. Συμπερασματικά οι AFLPs θεωρούνται ως dominant δείκτες με αποτέλεσμα σε ορισμένες περιπτώσεις να μην είναι δυνατός ο διαχωρισμός των ετεροζύγωτων από τα ομοζύγωτα στο κυρίαρχο αλληλόμορφο (Moen et al 2004). Παρόλα αυτά τα AFLPs είναι γρηγορότερα, απαιτούν λιγότερη δουλειά εργαστηρίου και παρέχουν περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με άλλες κοινώς χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Επιπλέον τα αποτελέσματα των AFLPs είναι περισσότερο αναπαραγόμενα σε σχέση με αυτά των RAPDs, εξαιτίας των υψηλότερων θερμοκρασιών υβριδοποίησης των εκκινητών.

### **1.3. Σκοπός εργασίας και λόγος επιλογής μικροδορυφορικών ως μοριακός δείκτης**

Βασικός σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η γενετική ποικιλότητα ενός συγκεκριμένου αριθμού ατόμων από κάποιες ιχθυομονάδες. Συγκρίνοντας με άλλα άρθρα θα παρατηρήσουμε κατά πόσο είναι μειωμένη σε σχέση με τους φυσικούς πληθυσμούς. Συνήθως οι ιχθυοκαλλιέργειες χρησιμοποιούν μικρό δραστικό μέγεθος ( $N_e$ ), όποτε βρίσκει πρόσφορο έδαφος να δράσει η γενετική παρέκκλιση. Γεγονός που οδηγεί σε ακραία φαινόμενα γενετικής ποικιλότητας.

Η γενετική ποικιλότητα μπορεί να μετρηθεί ως ο αριθμός των διαφορετικών αλληλομόρφων ενός γονιδίου ή ακόμα με βάση τα ποσοστά των ατόμων που είναι ετερόζυγα για έναν γονιδιακό τόπο. Εφόσον μελετηθούν πολλοί γονιδιακοί τόποι, το ποσοστό των πολυμορφικών γονιδιακών τόπων στο σύνολο των αναλυθέντων αποτελεί, επίσης, μια εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας ενός πληθυσμού. Γενικά όσο μεγαλύτερη είναι η γενετική ποικιλότητα ενός είδους τόσο μεγαλύτερο αριθμό αλληλομόρφων, ποσοστό πολυμορφικών γονιδιακών τόπων, και ποσοστό ετεροζυγωτών θα αναμένουμε.

Το μικροδορυφορικό DNA αποτελεί κι έναν από τους σημαντικότερους γενετικούς δείκτες, εξαιτίας της αφθονίας των μικροδορυφορικών γονιδιακών τόπων και του υψηλού πολυμορφισμού του. Επίσης παρουσιάζει ευκολία στη χρήση και ιδιαίτερη ταχύτητα στην ανάλυση με αποτέλεσμα να έχουμε σε πολύ σύντομο χρόνο τ' αποτελέσματα που επιθυμούμε. Τέλος συναντάμε πληθώρα μικροδορυφορικών, ώστε να διαλέξουμε ποιο μας εξυπηρετεί καλύτερα.

### **1.4. Απώλεια γενετικής ποικιλότητας**

Η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας σε φυσικούς πληθυσμούς συνήθως συνδέεται με μείωση του πληθυσμιακού τους μεγέθους. Αυτή η μείωση οφείλεται συνήθως σε εκτεταμένη θήρευση των ειδών ή εκμετάλλευση τους. Ένα από τα πιο πολυσυζητημένο παραδείγματα υπερεκμετάλλευσης ειδών και των συνεπειών αυτής αποτελεί η κατάρρευση των αποθεμάτων του μπακαλιάρου του Ατλαντικού ανοιχτά των ακτών της Β. Αμερικής. Αυτά τα αποθέματα ήταν κάποτε από τα πιο πλούσια. Η



καταστροφή των ενδιαιτημάτων αποτελεί επίσης έναν συνηθισμένο παράγοντα που οδηγεί σε μείωση των πληθυσμών. Καθώς ο ανθρώπινος πληθυσμός αυξάνεται, όλο και μεγαλύτερο μέρος της γης χρησιμοποιείται για οικοδόμηση και για δημιουργία χώρων για συστήματα μεταφοράς ή χρησιμοποιείται για αγροτική εκμετάλλευση, μειώνοντας ή και καταστρέφοντας πλήρως θέσεις που αποτελούσαν βιοτόπους για άγρια είδη φυτών και ζώων. Το πρόβλημα εντείνεται όχι μόνο από τη μείωση του συνολικού χώρου διαβίωση των ειδών αλλά και εξαιτίας του κατακερματισμού του σε μικρότερες περιοχές ή οποίες είναι απομονωμένες και δεν υπάρχουν διάυλοι επικοινωνίας μεταξύ τους, επειδή έχουν χρησιμοποιηθεί ως χωράφια, δρόμοι κ.ο.κ. Καθώς οι πληθυσμοί δεν ερχονται πλέον σε επαφή, η γονιδιακή ροή μέσω μετανάστευσης ή γαμετικών ανταλλαγών παύει. Συνεπώς ένας σημαντικός μηχανισμός για την διατήρηση ή και την αύξηση της γενετικής ποικιλότητας χάνεται.

Στα καλλιεργούμενα είδη, η μείωση της γενετικής ποικιλότητας δεν σχετίζεται βεβαίως με την μείωση των πληθυσμών τους ή την καταστροφή των ενδιαιτημάτων τους. Η μείωση όμως σχετίζεται περισσότερο με τις πρακτικές στην εκτροφή και καλλιέργεια των ειδών καθώς και με τις απαιτήσεις των καταναλωτών. Οι σύγχρονες τεχνικές καλλιέργειας έχουν οδηγήσει σε μεγάλη αύξηση της παραγωγής αλλά και σε μεγαλύτερη γενετική ομοιομορφία. Καθώς οι καλλιεργητές μεταπηδούν μαζικά σε νέες ποικιλίες φυτών ή, φυλές ζώων, εγκαταλείπουν τους παλιότερους καλλιεργούμενους τύπους, που μπορεί λοιπόν να εξασφαισθούν αν δεν γίνουν προσπάθειες να διατηρηθούν.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### 2.1. Υλικά και μέθοδοι

#### 2.1.1. Περιοχές προέλευσης και επεξεργασίας δειγμάτων

Για τις ανάγκες της παρούσας έρευνας συλλέχθηκαν συνολικά 162 ψάρια, τσιπούρες (*Sparus aurata*) από τους παρακάτω Ιχθυογεννητικούς Σταθμούς

1. Λάρυμνα (66)
2. Δίας (26)
3. Τρίτων (17)
4. Μανάγουλη (11)
5. Γαλαξίδι (42)

Αρχικά έγινε απομόνωση DNA από ιστό των ψαριών σύμφωνα με τα παρακάτω

#### 2.1.2. Εξαγωγή DNA

Η απομόνωση του γενομικού DNA γίνεται με διάφορες τεχνικές όπου όλες αποσκοπούν πρώτα στην αφαίρεση των πρωτεϊνών και ύστερα στην αφαίρεση των παραπροϊόντων του DNA. Ακολουθήθηκε η τεχνική της φαινόλης/χλωρορμίου (Sambrook, *et al.*, 1986)

Για την απομόνωση του DNA κομμάτι ιστού (~0,01 g) από την περιοχή του πλευρικού πτερυγίου αφαιρέθηκε με αποστειρωμένο νυστέρι. Ο ιστός τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf (Biologix, BMT-15N).

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

1. Δείγμα ιστού τοποθετείται σε αποστειρωμένο Eppendorf
2. Στο Eppendorf προστίθεται:

- 500μl διαλύματος TNE (10 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8)
  - 50 μl Tris-HCl, pH 8
  - 25 μl διαλύματος SDS περιεκτικότητας 25%
  - 20 μl Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) συγκέντρωσης 10 mg/l, όπου και ανακινούνται ελαφρώς.
3. Στη συνέχεια γίνεται η λιοτριβίση του ιστού μέσα στο μίγμα με έμβολο και ακολουθεί επώαση του σε κλίβανο (WTB Binder, Labortechnik GmbH) σε θερμοκρασία 55° C για 2 ώρες (για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών).
  4. Ύστερα από την επώαση και αφού παραμείνει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστίθεται 600μl φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1 (για την απομάκρυνση πυρηνικών οξέων και την δέσμευση των πρωτεϊνών).
  5. Ανακινείται ελαφρώς και ύστερα φυγοκεντρείται (Hettich, MIKRO 12-24 UNIVERSAL) για 10 λεπτά σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C για να διαχωριστούν οι 2 φάσεις.
  6. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο (υδατική φάση) με πιπέτα και τοποθετείται σε δεύτερο Eppendorf.
  7. Στο νέο Eppendorf προστίθεται 600μl Χλωροφόρμιο-Ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1 και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση (για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης).
  8. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές.
  9. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης αφαιρείται ξανά το υπερκείμενο και τοποθετείται σε τρίτο Eppendorff στο οποίο προστίθεται 1 ml καθαρής αιθανόλης (100%).
  10. Προστίθεται 6 μl Sodium Acetate συγκέντρωσης 3M και το Eppendorf τοποθετείται σε καταψύκτη στους - 20° C για 30 λεπτά (για την δέσμευση του DNA σε στερεά μορφή).
  11. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13000 στροφές.
  12. Στο κάτω μέρος του Eppendorf παρατηρείται ένα λευκού χρώματος ίζημα (pellet).

13. Μετά την προσεκτική αφαίρεση της αλκοόλης (προσέχοντας να μην πέσει το pellet) προστίθεται 200 μl κρύας αιθανόλης (4 °C) περιεκτικότητας 70 % και φυγοκεντρείται ξανά για 5 λεπτά στις 13000 στροφές.
14. Η αιθανόλη αφαιρείται τελείως και το Eppendorf τοποθετείται με ανοικτό το πώμα στον κλίβανο επώασης για περίπου 20 λεπτά στους 40° C για να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
15. Μετά την επώαση προστίθεται 50 μl υπερστεριωμένο νερό (Gibco ultra-sterilized water) και τοποθετείται στον καταψύκτη στους -20° C, έως ότου αναλυθεί.

### 2.1.3. Ηλεκτροφόρηση DNA

Όταν ένα ηλεκτρικό φορτίο εφαρμόζεται σε διάλυμα που περιέχει μόρια πρωτεϊνών, τότε τα μόρια θα μεταναστεύσουν σε μια ορισμένη κατεύθυνση και με ταχύτητα που αντανάκλα το μέγεθος και το καθαρό φορτίο τους. Η αρχή αυτή αποτελεί τη βάση της τεχνικής που αναφέρεται ως ηλεκτροφόρηση. Η πιο απλή μορφή ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης μιας διάστασης. Στην περίπτωση που το δείγμα περιλαμβάνει πολύπλοκα μείγματα πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η τεχνική της διδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε πηκτή.

Η ανίχνευση της ποιότητας και ποσότητας του απομονωμένου DNA έγινε ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1%.

Το διάλυμα του TAE 1% αραιωνόταν από ένα stock buffer TAE 50% (242 g Tris-HCl, 57 ml Acetic Acid, 0,05 M EDTA pH 8).

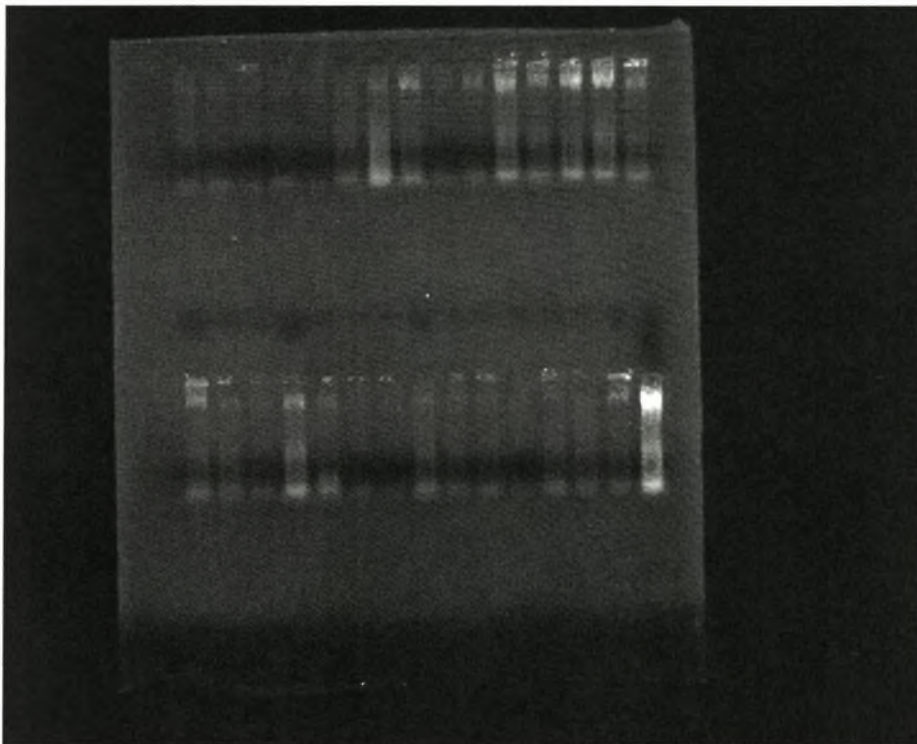
Για την πηκτή της αγαρόζης (Sambrook *et al.*, 1986) μετρήθηκαν 2 g στερεής αγαρόζης, προστέθηκαν σε 100 ml διαλύματος TAE 1% και η διάλυση της πραγματοποιήθηκε με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων (KENWOOD microwave) για 2 λεπτά, στους 90°C. Αμέσως μετά προστέθηκαν 3 μl Βρωμιούχου αιθιδίου 1% (Scharlau) και μετά από σύντομη ανακίνηση τοποθετήθηκε σε τετράγωνο Plexiglas, μήκους 10 cm. Το Plexiglas είχε 2 εσοχές (1 cm) εκατέρωθεν του πάνω μέρους των δύο πλευρικών τοιχωμάτων του όπου εφάρμοζαν 2 «χτενάκια» για τη δημιουργία των υποδοχών (πηγάδια). Με το κάθε χτενάκι ήταν δυνατή η δημιουργία 16 θέσεων όγκου 14



μl. Οι άλλες δύο πλευρές δεν είχαν τοιχώματα και καλύπτονταν με χαρτοταινία για την στεγανοποίηση του μίγματος. Μετά από περίπου 20 λεπτά είχε δημιουργηθεί η πηκτή με τις μορφοποιημένες υποδοχές-θέσεις μετά από αφαίρεση των χτενιών.

Ο συνολικός όγκος που φορτώνονταν με την "by pipetting" τεχνική στην πηκτή ήταν 12 μl: 2 μl DNA, 2 μl χρωστικής (Blue-bromophenol, Invitrogen) και 8 μl απεσταγμένου νερού. Η χρωστική είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό των προϊόντων. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση ήταν TAE 1%. Η φόρτωση των δειγμάτων γινόταν μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Στη συνέχεια γινόταν παροχή τάσης (60 volt) από το τροφοδοτικό (CONSORT E143) στη συσκευή (SCIE-PLAS) για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετούνταν σε φωτογραφική μηχανή (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems) υπό υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.



**Εικόνα 1.** Φωτογραφική απεικόνιση ποιότητας και ποσότητας DNA υπό υπεριώδη ακτινοβολία

## 2.1.4 Επιλογή μικροδορυφορικών τόπων

Πίνακας 1. Primers

Μικροδορυφόροι	Forward	Reverse	LG	Χρωστική
Fd-92-H	AGGCATTTTGCAATGAGGG	CTGGGTTGGAGAGCTCAGAT	12	FAM
C67b	GCCCTGGTTATCATCTGTCGTT	GCTCGTGTGTTGTTTGCTGTCT	5	HEX
172EP	GAGGGCATGTTGGAGGAAC	GCACTCCATGTGGCTTCAG	12	ROX
Cid-35-H	TGGGGTTTAGCTGTCAATCC	GCGGCTATGCCTACAACCTC	9	FAM
C77b	CGATGGAAC TACCCACCTC	GCGACCATGAACCTGAAA	14	TAMRA
P20	AGAGCTCACTGTGACGATCAG	CAGGATCCCATCCTTACACA	14	ROX
Dd-63-H	GGCGAAAATACAGATGCAGA	CGCAGAGATGGTAGAGGCA	19	FAM
Ct27	TTCAGATGAGAGTGGCATTAGG	GGACGCTCTGGCTGTCT	24	HEX
Bd-14-H	TGCAGTGTCAAGGAAAACCA	GCCATTATCAATCACTAACATGC	1	TAMRA

### Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

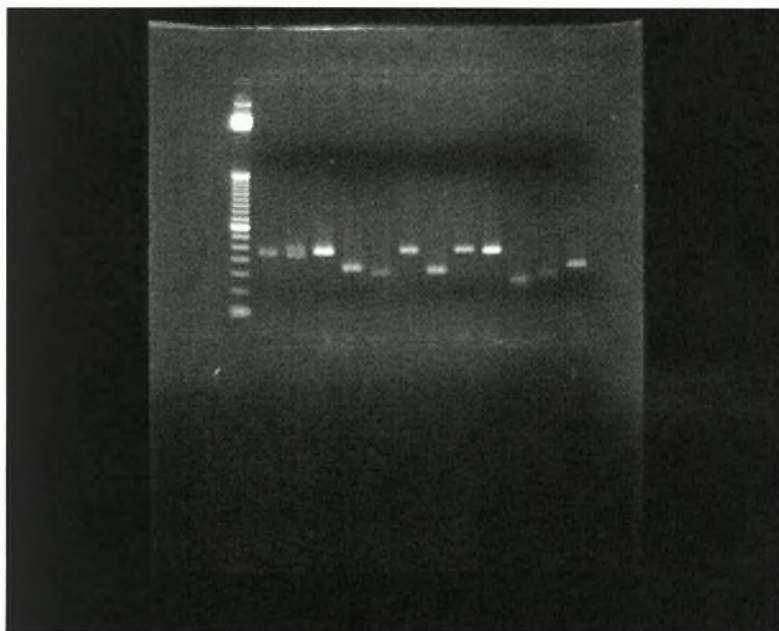
Η δυνατότητα χρησιμοποίησης μοριακών τεχνικών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ανακάλυψη της PCR. Η νέα τεχνική γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης διεκπεραιώνεται τελείως *in vitro* χωρίς να χρειάζονται κύτταρα. Με την τεχνική αυτή μια ορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων μπορεί να αντιγραφεί σε μεγάλες ποσότητες γρήγορα και εκλεκτικά από οποιοδήποτε δείγμα DNA που την περιέχει. Η PCR βασίζεται στη χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό ενός εκμαγείου DNA σε επανειλημμένους κύκλους αντιγραφής.

Η εξέτασή τους έγινε στο εργαστήριο με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή PCR (MJ Research, PTC-0150). Οι συνθήκες της PCR (Exadactylos, 1997) καθορίστηκαν με πειραματικό σχεδιασμό αλλάζοντας μία κάθε φορά συνθήκη. Η θερμοκρασία επαναδιάταξης των primer (μη σημασμένοι) βασίστηκε την μαθηματική εξίσωση (Breslauer *et al.*, 1986 & Sugimoto *et al.*, 1996):

$$T_a = 4x(G+C) + 2x(A+T)$$

όπου G ο αριθμός του νουκλεοτιδίου Γουανίνη, C ο αριθμός του νουκλεοτιδίου Κυτοσίνη, A ο αριθμός του νουκλεοτιδίου Αδενίνη και T ο αριθμός του νουκλεοτιδίου Θυμίνη στις αλληλουχίες των δύο μορφών του Primer (Reverse-Forward). Η  $T_m$  είναι μεγαλύτερη κατά 5 °C από την  $T_m$  (θερμοκρασία συγκόλλησης εκκινητή).

Το μίγμα για την ηλεκτροφόρηση είχε όγκο 12  $\mu$ l: 10  $\mu$ l προϊόν PCR και 2  $\mu$ l χρωστικής (Blue-bromophenol) (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Φωτογραφία προϊόντων PCR με διαφορετικές συγκεντρώσεις  $MgCl_2$ , DNA και Primer

Οι τελικές συνθήκες για τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων (Πίνακας 2) ήταν 2  $\mu$ l DNA, 2  $\mu$ l Reaction Buffer 10x (Invitrogen), 1,6  $\mu$ l dNTP's 10 mM (Invitrogen), 1,5  $\mu$ l  $MgCl_2$  25 mM (Invitrogen), 1  $\mu$ l από κάθε primer 15  $\mu$ M (Invitrogen), 0,1  $\mu$ l Taq-polymerase 0,5U/  $\mu$ l (Invitrogen) και συμπλήρωση μέχρι τα 20  $\mu$ l με 10,8  $\mu$ l υπερστειρωμένο νερό.

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
DNA	2 $\mu$ l
Buffer	2 $\mu$ l (10X)
MgCl <sub>2</sub>	1,5 $\mu$ l (25 mM)
DNTP's	1,6 $\mu$ l (10mM)
Primer (Re+Fw)	2 $\mu$ l (1+1) (10 $\mu$ M)
Taq-polymerase	0,15 $\mu$ l (5U/ $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	10,8 $\mu$ l

Οι συνθήκες των θερμοκρασιακών κύκλων της αρχικής αποδιάταξης (first denaturation), των τριών σταδίων αποδιάταξη (denaturation)– επαναδιάταξης (annealing) – επιμήκυνσης (extention) και της τελικής επιμήκυνσης (final extention) φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Συνθήκες θερμοκρασιακών κύκλων της PCR

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	3 min	1
Αποδιάταξη	95	1 min	30
Επαναδιάταξη	T <sub>a</sub>	50 sec	
Επιμήκυνση	72	50 sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10 min	1

Η T<sub>a</sub> ήταν διαφορετική για κάθε μικροδορυφορικό τόπο.

### 2.1.5 Γονοτύπιση μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Η γονοτύπιση έγινε με σημασμένους primer σε αυτόματο sequencer (ABI 3100). Οι σημασμένοι Primer ήταν βαμμένοι με τρεις διαφορετικές χρωστικές έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η ταυτόχρονη γονοτύπιση τριών αλληλουχιών.



Λόγω της ευαισθησίας του sequencer οι συνθήκες της PCR διαφοροποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και της θερμοκρασίας επαναδιάταξης (annealing temperature).

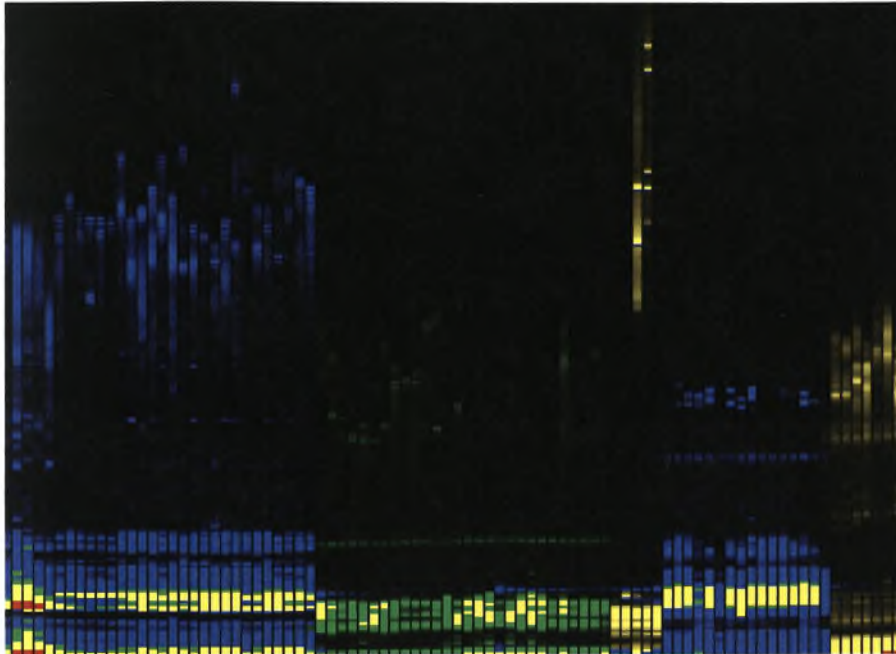
Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10  $\mu\text{l}$  με συγκεντρώσεις όπως αναφέρονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR για το sequencer.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
DNA	1 $\mu\text{l}$ (1/10 αρχικού)
Buffer	1 $\mu\text{l}$ (1X)
MgCl <sub>2</sub>	0,6 $\mu\text{l}$ (25 mM)
dNTP's	0,2 $\mu\text{l}$ (10mM)
Primer (R+Fw)	1,2 $\mu\text{l}$ (0,6+0,6) (10 $\mu\text{M}$ )
Taq-polymerase	0,1 $\mu\text{l}$ (5U/ $\mu\text{l}$ )
H <sub>2</sub> O	5,85 $\mu\text{l}$

Για το διαχωρισμό των βάσεων χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% (MJ Research) με οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Το μίγμα (RUN) της ηλεκτροφόρησης είχε όγκο 5  $\mu\text{l}$ : 1  $\mu\text{l}$  προϊόν PCR, 3,9  $\mu\text{l}$  φορμαμίδιο και 0,1  $\mu\text{l}$  μάρτυρα. Στη συνέχεια το μίγμα αποδιατάζοταν για 5 λεπτά στους 95 °C και φυλαζόταν σε πάγο μέχρι την αυτόματη φόρτωσή του στη πηκτή.

Με τη παροχή υψηλή τάσης (4000 volts) το μίγμα (RUN) εισέρχονταν στη πηκτή και με τη χρήση οπτικής ίνας Laser γινόταν η αποτύπωση των βάσεων. Η εικόνα που έβγαινε ως τελικό αποτέλεσμα (Εικόνα 3) επεξεργαζόταν με το πρόγραμμα Cartographer όπου στη συνέχεια γινόταν η μέτρηση των βάσεων των αλληλομόρφων. Στη συνέχεια το σκοράρισμα των αλληλομόρφων έγινε με το λογισμικό STRand 2.3.106



Εικόνα 3. Χρωματική απεικόνιση των βάσεων των αλληλομόρφων.

### 2.1.6 Στατιστική Ανάλυση

Για την επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά:

#### **GenAlEx**

Αποτελεί add-in του Excel με δυνατότητες επεξεργασίας στοιχείων από codominant και dominant markers. Με το παραπάνω λογισμικό υπολογίστηκαν

- Οι συχνότητες των αλληλομόρφων σε κάθε γενετικό τόπο σε όλους τους πληθυσμούς και η αναμενόμενη ετεροζυγωτία για dominant markers.
- Ισορροπία Hardy-Weinberg για κάθε γενετικό τόπο
- Το ποσοστό των πολυμορφικών γενετικών τόπων
- Σχεδιάγραμμα μέσης αναμενόμενης ετεροζυγωτίας για dominant δείκτες.
- Πίνακες γενετικής απόστασης σε όλους τους πληθυσμούς για dominant δείκτες με βάση τη μέθοδο του Huff et al 1993.
- Ο δείκτης γενετικής απόστασης D κατά Nei.
- Πίνακες γενετικής απόστασης και γενετικής ομοιότητας για όλους τους πληθυσμούς με βάση το δείκτη D κατά Nei.

- AMOVA με βάση τις μεθόδους των Excoffier et al (1992). Από τις παραπάνω αναλύσεις υπολογίστηκε ο δείκτης  $\Phi_{PT}$  ο οποίος είναι ο αντίστοιχος του  $F_{ST}$  για dominant markers. Ο δείκτης  $\Phi_{PT}$  είναι χρήσιμος και για τη σύγκριση δεδομένων από codominant markers με dominant. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο δείκτης  $\Phi_{PT}$  υπολογίστηκε από τους πίνακες γενετικής απόστασης της μεθόδου των Huff et al (1993) καθώς η AMOVA χρειάζεται μετρήσεις απόστασης που βασίζονται στην Ευκλείδεια γεωμετρία (Peakall & Smouse 2005).
- Από το δείκτη  $\Phi_{PT}$  υπολογίστηκε η γονιδιακή ροή  $Nm$  σύμφωνα με τους Peakall & Smouse (2005).

### GenePop

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απλοειδή ή διπλοειδή δεδομένα που προέρχονται από dominant ή codominant markers. Με το παραπάνω λογισμικό εξετάστηκε αν οι πληθυσμοί βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

### Phylip

Από τα πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενα λογισμικά στον εντοπισμό φυλογενετικών σχέσεων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή δένδρογραμμάτων και genetic distance matrix. Το παραπάνω λογισμικό αποτελείται από 30 διαφορετικά προγράμματα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω προγράμματα:

- Neighbor για την κατασκευή δένδρογραμμάτων με τη μέθοδο UPGMA και Neighbor Joining.

### Arlequin

Λογισμικό με μεγάλες δυνατότητες στην επεξεργασία δεδομένων κυρίως από codominant markers, καθώς περιέχει μεθόδους ανάλυσης δεδομένων που δεν συναντώνται σε άλλα λογισμικά.

- Neutrality tests (Ewens-Watterson homozygosity test, Ewens-Watterson-Slatkin exact test).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### 3.1. Αποτελέσματα

- Αρχικά ως προς την ισορροπία Hardy-Weinberg οι πληθυσμοί Τρίτων ( $P=0,13$ ) και Μανάγουλη ( $P=0,57$ ) φαίνεται να βρίσκονται σε ισορροπία. Αντίθετα οι υπόλοιποι πληθυσμοί ( $P<0,001$ ) δεν βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.
- Στο σύνολο των πληθυσμών, ο πληθυσμός της Λάρυμνας εμφανίζει κατά μέσο όρο το μεγαλύτερο πλήθος αλληλόμορφων καθώς και τη μεγαλύτερη ετεροζυγωτία ( $N_a=8,2$ ,  $H_o=0,686$  Πίνακας 10). Το μικρότερο πλήθος αλληλόμορφων παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς Τρίτων και Μανάγουλη ( $N_a= 5,4$  και  $5,5$  αντίστοιχα). Ενώ ο πληθυσμός από το Γαλαξίδι παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας ( $H_o=0,586$ ).

Πίνακας 10. Συνολικές τιμές μέσης Ετεροζυγωτίας- Πλήθος αλληλόμορφων για κάθε πληθυσμό

Πληθυσμός	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$
Λάρυμνα	8,222	4,264	0,686	0,677
Δίας	8,444	4,794	0,643	0,680
Τρίτων	5,444	3,079	0,632	0,625
Μανάγουλη	5,556	3,646	0,665	0,655
Γαλαξίδι	7,222	4,267	0,586	0,696

$N_a$ : Πλήθος αλληλόμορφων,  $N_e$ : δραστικό μέγεθος αλληλομόρφων,  $H_o$ : παρατηρούμενη ετεροζυγωτία,  $H_e$ : εκτιμώμενη ετεροζυγωτία

- Η μεγαλύτερη γενετική απόσταση σύμφωνα με το δείκτη  $D$  (Nei 1972) παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών Γαλαξίδι και Τρίτων (Πίνακας 11). Αντίθετα η μικρότερη γενετική απόσταση παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών Τρίτων και Μανάγουλη. Εκτός από το δείκτη  $D$  και ο δείκτης  $F_{st}$  χρησιμοποιείται για να εκφράσει το ποσοστό του ολικού γενετικού πολυμορφισμού το οποίο οφείλεται σε διαφορές μεταξύ πληθυσμών. Σύμφωνα με το δείκτη  $F_{st}$  μεγαλύτερη διαφοροποίηση εμφανίζεται μεταξύ των πληθυσμών Γαλαξίδι και Τρίτων

(Πίνακας 12). Τη μικρότερη διαφοροποίηση σύμφωνα με τον παραπάνω δείκτη παρουσιάζει ο πληθυσμός στην Λάρυμνα με αυτόν του Δία.

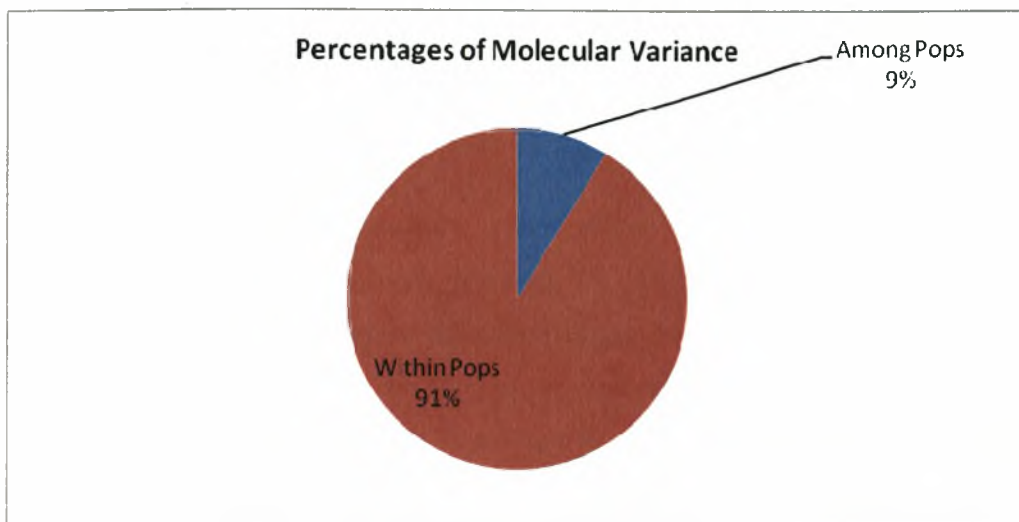
Πίνακας 11. Γενετικές αποστάσεις κατά Nei (D) (GenAlex 3.2)

	<b>Λάρυμνα</b>	<b>Δίας</b>	<b>Τρίτων</b>	<b>Μανάγουλη</b>
<b>Λάρυμνα</b>				
<b>Δίας</b>	0,100			
<b>Τρίτων</b>	0,151	0,207		
<b>Μανάγουλη</b>	0,169	0,222	0,100	
<b>Γαλαξίδι</b>	0,166	0,116	0,263	0,238

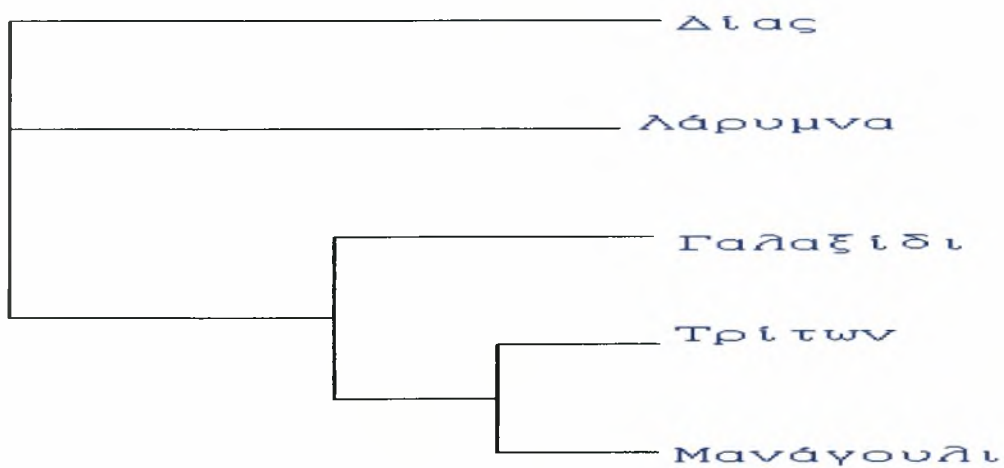
Πίνακας 12. Τιμές δείκτη  $F_{st}$  (GenAlex 3.2)

	<b>Λάρυμνα</b>	<b>Δίας</b>	<b>Τρίτων</b>	<b>Μανάγουλη</b>
<b>Λάρυμνα</b>				
<b>Δίας</b>	0,021			
<b>Τρίτων</b>	0,033	0,044		
<b>Μανάγουλη</b>	0,039	0,047	0,026	
<b>Γαλαξίδι</b>	0,033	0,024	0,054	0,048

- Από την AMOVA (Analysis of Molecular Variance) το μεγαλύτερο ποσοστό του γενετικού πολυμορφισμού οφείλεται σε πολυμορφισμό εντός πληθυσμών (91% Πίνακας 13, Διάγραμμα 1). Επίσης οι πληθυσμοί παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $p < 0,05$ ). Με το λογισμικό phylip κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα με τον αλγόριθμο Neighbor Joining (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 1 Κατανομή ποσοστού πολυμορφισμού από AMOVA (GenAlex)



Διάγραμμα 2. Δενδρόγραμμα γενετικής απόστασης με τον αλγόριθμο Neighbor Joining (phylip 3.67)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### 4.1. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Οι μικροδορυφόροι αποτελούν τους πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενους μοριακούς δείκτες στην πληθυσμιακή γενετική. Οι μικροδορυφόροι εμφανίζονται σε αφθονία σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Ειδικότερα στα ψάρια υπολογίζεται ότι εμφανίζονται σε συχνότητες που μπορεί να φθάνουν 1 σε κάθε 10 kb (Iyengar et al 2000, Wright 1993). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των μικροδορυφόρων βρίσκονται στο ότι είναι ιδιαίτερα πολυμορφικοί δείκτες ακόμα και σε μικρούς πληθυσμούς και σε είδη υπό εξαφάνιση και εμφανίζονται σε μεγάλη αφθονία στο γένομα. Τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού οφείλονται στους υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης που παρατηρούνται σε αυτές τις θέσεις. Οι μεταλλάξεις συνήθως οδηγούν σε αλλαγή του αριθμού των επαναλήψεων. Οι ρυθμοί μετάλλαξης υπολογίζεται ότι κυμαίνονται περίπου μία μετάλλαξη κάθε 1000 ή 10.000 μειώσεις.

Το μοντέλο Hardy-Weinberg διευκολύνει σημαντικά την περιγραφή της γενετικής ποικιλομορφίας των πληθυσμών, καθώς επιτρέπει την περιγραφή του πληθυσμού με βάση τις συχνότητες των αλληλόμορφων που εμφανίζονται σε κάποιο γενετικό τόπο, αντί της περιγραφής του με βάση τους πιθανούς γενότυπους που προκύπτουν. Η παραπάνω διευκόλυνση φαίνεται καθαρά ακόμη και στη σχετικά απλή περίπτωση των 10 γενετικών τόπων με δύο αλληλόμορφα ο καθένας όπου υπάρχουν 59.049 διαφορετικοί γενότυποι (Allendorf, 2007).

Απόκλιση ενός πληθυσμού από την ισορροπία Hardy-Weinberg μπορεί να οφείλεται σε δειγματοληπτικό σφάλμα ωστόσο είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι η απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες όπως μη αντιπροσωπευτικό δείγμα, παρουσία μηδενικών αλληλόμορφων με αποτέλεσμα να υπάρχει υπερεκτίμηση των ομοζύγων κ.α. με συνέπεια να είναι δύσκολη η διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής όπως εξακρίβωσης της γενετικής δομής ενός πληθυσμού η εφαρμογή τους θεωρείται αποτελεσματική (Junior et al, 2006). Σε μελέτες που έχουν ως στόχο τον προσδιορισμό των γονέων μιας ομάδας ατόμων οι μικροδορυφόροι θεωρούνται ως η αποτελεσματικότερη τεχνική. Οι παραπάνω μελέτες

έχουν ιδιαίτερη σημασία, για την υλοποίηση προγραμμάτων επιλογής γεννητόρων στις υδατοκαλλιέργειες (Bravington & Ward 2004, Jerry et al 2006, Jackson et al 2003).

Επίσης οι παραπάνω μελέτες επιτρέπουν την ιχνηλασιμότητα των προϊόντων, ενώ παράλληλα υποβοηθούν στην λήψη αποτελεσματικών μέτρων κατά των περιόδου εκτροφής (Miggiano et al 2005). Τέλος, η χρήση τους είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος (genetic linkage map).

Οι μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλά είδη υδρόβιων οργανισμών. Στην παρούσα εργασία τα επίπεδα πολυμορφισμού των εκτρεφόμενων πληθυσμών εμφανίστηκαν χαμηλά σε σχέση με τις παρακάτω εργασίες. Οι τιμές παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας κυμάνθηκαν από 0,586-0,686 ενώ της εκτιμώμενης 0,625-0,696. Ο αριθμός των αλληλομόρφων ήταν από 5-8. Ο δείκτης  $F_{st}$  πήρε τιμές από 0.021-0,054. Παρακάτω θα παρουσιαστούν κάποιες ενδεικτικές τιμές παρόμοιων εργασιών με σειρά από τις χαμηλότερες τιμές ετεροζυγωτίας προς τις υψηλότερες.

Ενδεικτικά οι Moen et al (2004) χρησιμοποίησαν 54 δείκτες μικροδορυφόρων για τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος του σολωμού του Ατλαντικού (*Salmo salar*), οι Christiakov et al (2005) χρησιμοποιώντας 174 δείκτες μικροδορυφόρων σχημάτισαν γενετικούς τόπους για το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*). Οι Karaiskou et al (2009) κατέγραψαν τιμές παρατηρούμενες ετεροζυγωτίας που κυμάνθηκαν από 0,693-0,85 για φυσικούς πληθυσμούς τσιπούρας και τιμές 0,725-0,78 για εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Στην εργασία των Launey et al (2003) καταγράφηκε μέση ετεροζυγωτία ίση με 0,752. Οι A.Navarro et al (2007) δημιούργησαν multiplex PCR για τρία είδη της οικογένειας Sparidae. Στην συγκεκριμένη εργασία ο αριθμός των αλληλόμορφων κυμαίνονταν από 10-15, η εκτιμώμενη ετεροζυγωτία ήταν 0,78 ενώ η παρατηρούμενη 0,75. Οι DeWoody and Avise (2000) στην εργασία τους κατέγραψαν την μέση τιμή ετεροζυγωτίας για τα κυριότερα θαλασσινά ψάρια. Στην παραπάνω εργασία η τιμή της ετεροζυγωτίας βρέθηκε ίση με 0,79.

Επίσης, οι Borrell et al (2007) αντίστοιχα κατέγραψαν κι αυτοί υψηλότεροι ετεροζυγωτία ίσης με 0,8 χρησιμοποιώντας 11 μικροδορυφορικούς δείκτες σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς τσιπούρας από Ισπανία. Επιπλέον, ο αριθμός αλληλομόρφων ήταν πάνω από 17, στην συγκεκριμένη εργασία η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία ήταν 0.8 ενώ η παρατηρούμενη 0.84. Οι Alarcon et al (2004) παρατήρησαν



μέση ετεροζυγωτία ίση με 0,845. Οι Innocentiis et al (2004,2005) κατέγραψαν τιμές ετεροζυγωτίας οι οποίες κυμάνθηκαν από 0,8 με 0,85. Στην εργασία του J.Castro et al. (2007) η οποία μελετούσε τη χρησιμότητα των μικροδορυφορικών ώστε να μελετηθεί η γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών της τσιπούρας, ο αριθμός των αλληλόμορφων είναι 22, ενώ η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία έχει τιμή 0.863 και η εκτιμώμενη ετεροζυγωτία ισούται με 0,879.

Σε μια άλλη παρόμοια εργασία, συγκρίνονται οι γενετικές διαφορές της τσιπούρας ανάμεσα σε κάποια ποτάμια της Γαλλίας. Σ' αυτήν την εργασία λοιπόν των L.Chaoui et al (2008) ο αριθμός των αλληλόμορφων ήταν 33, η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία 0,83 ενώ η εκτιμώμενη 0,887. Οι δείκτες μικροδορυφορικών είναι ένα ισχυρό εργαλείο ώστε ν' αναδημιουργηθούν οι γενεαλογικές σχέσεις μεταξύ απογόνου των αποθεμάτων των ψαριών για τα διαφορετικά είδη (Norris et al.2000).

Όσον αφορά τα είδη της οικογένειας Sparidae το υψηλότερο επίπεδο πολυμορφισμού έχει καταγραφεί στο είδος *Sparus aurata* (Batargias et al.1999). Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι τα επίπεδα πολυμορφισμού στο παρόν πείραμα ήταν μικρότερα από τις παραπάνω. Παρ' ολ' αυτά γενετική ποικιλομορφία συναντάμε σε καλά ποσοστά ακόμα και στους δικούς μας εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι στους υπό εξέταση εκτρεφόμενους πληθυσμούς παρατηρείται έλλειμμα ετεροζυγωτίας. Το παραπάνω πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα stock των γεννητόρων των παραπάνω πληθυσμών προέρχονταν από συγγενικά άτομα. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε τέτοιες περιπτώσεις υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για αύξηση της ενδογαμίας, η οποία πιθανόν να οδηγήσει σε χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης, υψηλή θνησιμότητα, δυσμορφίες καθώς και άλλα ανεπιθύμητα για την εκτροφή αποτελέσματα. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί δείκτες σε σχέση με τις παραπάνω εργασίες και πιθανόν αυτή να είναι η αιτία της διαφοράς.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι οι πληθυσμοί από τις ιχθυομονάδες Τρίτων και Μαναγούλη είναι πολύ μικροί κι αυτό έχει ως συνέπεια τα συμπεράσματα μας να μην είναι τόσο αντιπροσωπευτικά, καθώς ο πολυμορφισμός φαίνεται μικρός. Γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό των ατόμων που είχαμε σαν δείγμα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alarcón J.A., Magoulas A., Georgakopoulos T., Zouros E., Alvarez M.C. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230 (1-4):65-80.
- Allendorf F.W. & Luikart G., 2007. Conservation and the genetics of populations. *Blackwell Publishing*.
- Borrell Y. J., Carleos C. E., Asturiano J. F., Bernardo D., Vázquez E., Corral N., Sánchez J. A., Blanco G., 2007. Use of microsatellites and a combinatorial optimization approach in the acquisition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstocks for hatcheries. *Aquaculture* 26:200–210.
- Brown R.C., Tsalavouta M., Terzoglou V., Magoulas A., McAndrew B.J. 2005. Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. *Molecular Ecology Notes* 5(3):605-607.
- Castro J., Pino A., Hermida, M., Bouza C., Chavarrías D., Merino P., Sánchez L., Martínez P. 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 272 (SUPPL. 1):S210-S216.
- Castro J., Pino-Querido A., Hermida M., Chavarrías D., Romero R., García-Cortés L. A., Toro M. A., Martínez P., 2008. Ability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture* 279:18–22.
- Chaoui, L., Kara, M.H., Quignard, J.P., Faure, E., Bonhomme, F. 2009 Strong genetic differentiation of the gilthead sea bream *Sparus aurata* (L., 1758) between the two western banks of the Mediterranean | [Forte différenciation génétique de la daurade *Sparus aurata* (L., 1758) entre les deux rives de la Méditerranée occidentale]. *Comptes Rendus - Biologies* 332 (4):329-335.
- Darlington P.J. 1957. Zoogeography: The Geographical Distribution of Animals. *John Wiley & Sons, Inc.*, New York. xi +675pp.
- De Innocentiis S., Miggiano, E., Ungaro A., Livi, S., Sola L., Crosetti, D. 2005. Geographical origin of individual breeders from gilthead sea bream (*Sparus auratus*)

- hatchery broodstocks inferred by microsatellite profiles. *Aquaculture* 247 (1-4):227-232.
- De Innocentiis S., Lestia A., Livi S., Rossi A.R., Crosetti D., Sola L., 2004. Microsatellite markers reveal population structure in gilthead sea bream *Sparus auratus* from the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *FISHERIES SCIENCE*, 70: 852–859.
  - Franch R., Louro B., Tsalavouta M., Chatziplis D., Tsigenopoulos C. S., Sarropoulou E., Antonello J., Magoulas A., Mylonas C. C., Babbucci M., Patarnello T., Power D. M., Kotoulas G., Bargelloni L., 2006. A Genetic Linkage Map of the Hermaphrodite Teleost Fish *Sparus aurata* L. *Genetics Society of America*, 174: 851–861.
  - Karaïskou N., Triantafyllidis A., Katsares V., Abatzopoulos T.J., Triantaphyllidis C., 2009. Microsatellite variability of wild and farmed populations of *Sparus aurata* *Journal of Fish Biology* 74 (8):1816-1825.
  - Launey S., Krieg F., Haffray P., † Bruant J.-S., Vannier A., Guyomard R., 2003. Twelve new microsatellite markers for gilted seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Molecular Ecology Notes* 3:457–459.
  - Liu Y.G., Liu L.-X., Wu Z.-X., Lin H., Li B.-F., Sun X.-Q. 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) by cross-species amplification with six species of the Sparidae family. *Aquatic Living Resources* 20 (3):257-262 .
  - MacArthur, R.H. and E.O Wilson. 1967. *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press, Princeton, N.J. xi + 203pp.
  - Miggiano E., Innocentiis S. De, Ungaro A., Sola L., Crosetti D., 2005. AFLP and microsatellites as genetic tags to identify cultured gilthead seabream escapees: data from a simulated floating cage breaking event. *Aquaculture International*, 13:137–146.
  - Navarro A., Badilla R., Zamorano M.J., Pasamontes V., Hildebrandt S., Sánchez J.J., Afonso J.M. 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture*, 285 (1-4):30-37.

- Navarro A., Zamorano M.J., Hildebrandt S., Ginés R., Aguilera C., Afonso J.M., 2009. Estimates of heritabilities and genetic correlations for body composition traits and G × E interactions, in gilthead seabream (*Sparus auratus L.*). *Aquaculture* 295 (3-4):183-187.
- Navarro, A., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M. 2009. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus L.*), under industrial conditions. *Aquaculture* 289 (3-4):225-230.
- Palma J., Alarcon J.A., Alvarez C., Zouros E., Magoulas A., Andrade J.P. 2001. Developmental stability and genetic heterozygosity in wild and cultured stocks of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 81 (2):283-288.
- Pielou, E.C. 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. Interscience Publishers, New York. viii + 286pp.
- Piñera J.A., Bernardo D., Blanco G., Vázquez E., Sánchez J.A. 2007. Usefulness of microsatellite markers developed from *Pagellus bogaraveo* to genetically study five different species of Sparidae. *Marine Ecology* 28 (SUPPL. 1):184-187.
- Piñera J.A., Bernardo D., Blanco G., Vázquez E., Sánchez J.A. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Molecular Ecology Notes* 6 (1):33-35.
- Sala-Bozano M., Tsalavouta M., Mariani S. 2008. Isolation and characterisation of new polymorphic microsatellite markers for the striped sea bream (*Lithognathus mormyrus*). *Conservation Genetics* pp. 1-3.
- Sarropoulou E., Kotoulas G., Power D. M., Geisler R., 2005. Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology. *Physiol Genomics* 23: 182–191.
- Sarropoulou E., Nousedili D., Magoulas A., Kotoulas G., 2008. Linking the Genomes of Nonmodel Teleosts Through Comparative Genomics. *Mar Biotechnol*, 10:227–233.

- Senger F., Priat C., Hitte C., Sarropoulou E., Franch R., Geisler R., Bargelloni L., Power D., Galibert F., 2006. The first radiation hybrid map of a perch-like fish: The gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Genomics* 87: 793–800.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods of Enzymology*, 218:704-740.
- Wright J.M. & Bentzen P., 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Review of fish Biology*, 4:384-388.
- Zar J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*, 2<sup>nd</sup> edition. Prentice-Hall International Inc., New Jersey.
- Γκάφας Γ., 2006. Πληθυσμιακή γενετική δόμηση και αναπαραγωγή του μελανουρίου, *Oblada melanura* L., στο Αιγαίο και Ιόνιο πέλαγος. Μεταπτυχιακή διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- Παλαιοκόστας Χ., 2007. Τρόποι προσέγγισης ανάλυσης πραγματικών σειρών γενετικών-μοριακών δεδομένων με χρήση διαφόρων στατιστικών λογισμικών. Μεταπτυχιακή διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.

## 6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στους γενετικούς Πίνακες 5-9 παρουσιάζονται οι τιμές ετεροζυγωτίας καθώς και το πλήθος των αλληλόμορφων σε κάθε γενετικό τόπο για κάθε πληθυσμό. Στον πληθυσμό της Λάρυμνας ο τόπος C67b παρουσιάζει το μεγαλύτερο αριθμό αλληλόμορφων (18) καθώς και τη μεγαλύτερη ετεροζυγωτία ( $H_o=0,993$ ). Σε αντίθεση ο γενετικός τόπος 172EP και ο Bld-10-T παρουσιάζουν τα χαμηλότερα ποσοστά πολυμορφισμού ( $N_a=2$ ,  $H_o=0,485$ ,  $N_a=4$ ,  $H_o=0,152$  αντίστοιχα Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Τιμές Ετεροζυγωτίας-Πλήθος αλληλόμορφων σε πληθυσμό Λάρυμνας

Λάρυμνα				
	<b>N<sub>a</sub></b>	<b>N<sub>e</sub></b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>e</sub></b>
<b>Fd-92-H</b>	13,000	5,180	0,773	0,807
<b>C67b</b>	18,000	8,361	0,939	0,880
<b>Cld-35-H</b>	6,000	3,426	0,727	0,708
<b>Bld-10-T</b>	4,000	1,348	0,152	0,258
<b>C77b</b>	3,000	2,534	0,677	0,605
<b>P20</b>	9,000	4,533	0,892	0,779
<b>Ct27</b>	12,000	7,071	0,815	0,859
<b>Cld-29-T</b>	7,000	4,153	0,712	0,759
<b>172EP</b>	2,000	1,766	0,485	0,434

$N_a$ : Πλήθος αλληλόμορφων,  $N_e$ : δραστικό μέγεθος αλληλομόρφων,  $H_o$ : παρατηρούμενη ετεροζυγωτία,  $H_e$ : εκτιμώμενη ετεροζυγωτία

Στον πληθυσμό από τον ΙΧΣ του Δία ο τόπος με το μεγαλύτερο πολυμορφισμό είναι επίσης ο C67b ( $N_a=15$ ,  $H_o=0,885$ ). Τον χαμηλότερο πολυμορφισμό παρουσιάζει και σε αυτήν την περίπτωση ο 172EP ( $N_a=2$ ,  $H_o=0,424$  Πίνακας 6)

Πίνακας 6. Τιμές Ετεροζυγωτίας-Πλήθος αλληλόμορφων σε πληθυσμό Δίας

Δίας				
	Na	Ne	Ho	He
<b>Fd-92-H</b>	14,000	6,693	0,769	0,851
<b>C67b</b>	15,000	9,797	0,885	0,898
<b>Cld-35-H</b>	6,000	2,720	0,577	0,632
<b>Bld-10-T</b>	6,000	1,506	0,269	0,336
<b>C77b</b>	3,000	2,136	0,577	0,532
<b>P20</b>	10,000	5,681	0,923	0,824
<b>Ct27</b>	14,000	8,963	0,636	0,888
<b>Cld-29-T</b>	6,000	3,953	0,731	0,747
<b>172EP</b>	2,000	1,696	0,423	0,411

Na: Πλήθος αλληλόμορφων, Ne: δραστικό μέγεθος αλληλομόρφων, Ho: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, He: εκτιμώμενη ετεροζυγωτία

Στον πληθυσμό του ΙΧΣ Τρίτων μεγαλύτερο πολυμορφισμό παρουσιάζουν οι τόποι C67b και Ct27 (Na=9 και Ho=0,765, Ho=0,813 αντίστοιχα Πίνακας 7). Τα χαμηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού εμφανίζονται στους τόπους Bld-10-T (Ho=0,235) και 172EP (Na=2).

Πίνακας 7. Τιμές Ετεροζυγωτίας-Πλήθος αλληλόμορφων σε πληθυσμό Τρίτων

Τρίτων				
	Na	Ne	Ho	He
<b>Fd-92-H</b>	7,000	4,446	0,765	0,775
<b>C67b</b>	9,000	2,833	0,765	0,647
<b>Cld-35-H</b>	4,000	2,240	0,529	0,554
<b>Bld-10-T</b>	4,000	1,859	0,235	0,462
<b>C77b</b>	3,000	2,216	0,500	0,549
<b>P20</b>	5,000	2,860	0,688	0,650
<b>Ct27</b>	9,000	5,753	0,813	0,826
<b>Cld-29-T</b>	6,000	3,753	0,765	0,734
<b>172EP</b>	2,000	1,753	0,625	0,430

Na: Πλήθος αλληλόμορφων, Ne: δραστικό μέγεθος αλληλομόρφων, Ho: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, He: εκτιμώμενη ετεροζυγωτία

Στον πληθυσμό του ΙΧΣ Μανάγουλη μεγαλύτερο πολυμορφισμό παρουσιάζει ο τόπος Fd-92-H (Na=8, Ho=0,909 Πίνακας 8). Τα χαμηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού εμφανίζονται στον τόπο C77b με Ho=0,3.

Πίνακας 8. Τιμές Ετεροζυγωτίας-Πλήθος αλληλόμορφων σε πληθυσμό Μανάγουλη

Μανάγουλη				
	Na	Ne	Ho	He
<b>Fd-92-H</b>	8,000	6,368	0,909	0,843
<b>C67b</b>	6,000	3,559	0,727	0,719
<b>Cld-35-H</b>	5,000	2,034	0,455	0,508
<b>Bld-10-T</b>	6,000	2,602	0,455	0,616
<b>C77b</b>	4,000	2,105	0,300	0,525
<b>P20</b>	4,000	1,849	0,571	0,459
<b>Ct27</b>	7,000	5,765	0,857	0,827
<b>Cld-29-T</b>	7,000	6,250	1,000	0,840
<b>172EP</b>	3,000	2,279	0,714	0,561

Na: Πλήθος αλληλόμορφων, Ne: δραστικό μέγεθος αλληλομόρφων, Ho: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, He: εκτιμώμενη ετεροζυγωτία

Στον πληθυσμό του ΙΧΣ Γαλαξίδι μεγαλύτερο πολυμορφισμό παρουσιάζει ο τόπος C67b (Na=12, Ho=0,833 Πίνακας 9). Τα χαμηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού εμφανίζονται στον τόπο Bld-10-T με Ho=0,262.

Πίνακας 9. Τιμές Ετεροζυγωτίας-Πλήθος αλληλόμορφων σε πληθυσμό Γαλαξίδι

Γαλαξίδι				
	Na	Ne	Ho	He
<b>Fd-92-H</b>	12,000	8,798	0,833	0,886
<b>C67b</b>	14,000	6,824	0,881	0,853
<b>Cld-35-H</b>	7,000	3,907	0,714	0,744
<b>Bld-10-T</b>	5,000	1,648	0,262	0,393
<b>C77b</b>	4,000	2,645	0,711	0,622
<b>P20</b>	7,000	3,810	0,486	0,738
<b>Ct27</b>	8,000	5,091	0,321	0,804
<b>Cld-29-T</b>	6,000	3,690	0,714	0,729
<b>172EP</b>	2,000	1,994	0,351	0,499

Na: Πλήθος αλληλόμορφων, Ne: δραστικό μέγεθος αλληλομόρφων, Ho: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, He: εκτιμώμενη ετεροζυγωτία



Πίνακας 13. AMOVA (GenAlex 3.2)

<b>Source</b>	<b>df</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>Est. Var.</b>	<b>%</b>	<b>F<sub>pt</sub></b>	<b>P</b>
<b>Among Pops</b>	4	99,992	24,998	0,628	9%	0,089	0,01
<b>Within Pops</b>	157	1030,293	6,562	6,562	91%		
<b>Total</b>	161	1130,285		7,190	100%		

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000102045

