

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ-ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Γενετικό απόθεμα караβίδας στον Παγασητικό Κόλπο»

ΟΛΓΑ ΝΤΑΝΤΑΛΗ

ΒΟΛΟΣ 2010

«Γενετικό απόθεμα καραβίδας στον Παγασητικό Κόλπο»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Μόνιμη Επίκουρος Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**,
- 2) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3) **Νικόλαος Νεοφύτου**, Λέκτορας, Υδατοκαλλιέργειες και Περιβάλλον, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία (Μ. Δ. Ε), πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο οποίο έγινε η γενετική ανάλυση των δειγμάτων. Η πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής έγινε με τη σημαντική συμβολή πολλών προσώπων, τα οποία νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω.

Καταρχήν, οφείλω θερμές ευχαριστίες στην επιβλέπουσά μου Μόνιμη Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Παναγιώτα Παναγιωτάκη. Η βοήθεια που μου παρείχε ήταν ουσιαστική και στήριξε τις προσπάθειές μου, τόσο ακαδημαϊκά, όσο και ηθικά καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο. Η βοήθεια και καθοδήγησή του σε ότι αφορούσε την έρευνα που πραγματοποίησα υπήρξε πολύτιμη και καθοριστική για την επιτυχή διεξαγωγή της εργασίας μου. Χωρίς το χρόνο που μου αφιέρωσε, δε θα μπορούσα να φέρω σε πέρας τις υποχρεώσεις μου στο παρόν Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, το Λέκτορα κ. Νικόλαο Νεοφύτου, για τη συμμετοχή του στην επιτροπή και το ενδιαφέρον που έδειξε για την επιτυχή εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας και κυρίως τους γονείς μου για τα όσα μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Η караβίδα (<i>Nephrops norvegicus</i> L.)	14
1.2 Διαχείριση αλιείας.....	17
1.2.1 Παγίδες	18
1.2.2 Δίχτυα	19
1.3 Μοριακές τεχνικές	21
1.3.1 Γενετικοί δείκτες.....	24
1.3.2 Τύποι γενετικών δεικτών	24
1.3.3 Οι γενετικοί δείκτες στην εκτίμηση των ιχθυοαποθεμάτων.....	26
1.3.4 Εφαρμογές στις υδατοκαλλιέργειες.....	27
1.4 Σκοπός της παρούσας έρευνας.....	28
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1 Περιοχές έρευνας	30
2.2 Απομόνωση DNA	32
2.3 Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης.....	35
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA	36
2.5 Επιλογή μικροδορυφορικών τόπων	37
2.6 Γονοτύπηση μικροδορυφορικών αλληλουχιών	39
2.7 Γενετική στατιστική ανάλυση.....	41
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

6 ABSTRACT 77
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 79

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τοπικές ονομασίες της караβίδας (FAO, 2007).	20
Πίνακας 2: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των παραπάνω γενετικών δεικτών....	26
Πίνακας 3: Περιοχές δειγματοληψίας, συντεταγμένες περιοχής και αριθμός δειγμάτων.	31
Πίνακας 4: Ονομασία, κωδικοποίηση καταγραφής, αλληλουχία, επανάληψη στον κλώνο και χρώση των σημασμένων εκκινήτων.	37
Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR.....	38
Πίνακας 6: Συνθήκες θερμοκρασιακών κύκλων της PCR.....	39
Πίνακας 7: Συχνότητες μηδενικών αλληλομόρφων κατά Brookfield (1996).....	42
Πίνακας 8: Ονομασία τόπου, εύρος βάσεων, αριθμός αλληλομόρφων και τυπικά σφάλματα στους υπό εξέταση γενετικούς τόπους όλων των πληθυσμών.....	43
Πίνακας 9: Αριθμός αλληλομόρφων ανά τόπο και πληθυσμό.....	44
Πίνακας 10: Τιμές μέσης αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (H_e) και μέσης παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας και τυπικά σφάλματα.	44
Πίνακας 11: Σημαντικότητες του κριτηρίου χ^2 ανάμεσα στις αναμενόμενες και παρατηρούμενες ετεροζυγωτίες για την επαλήθευση γενετικής ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg	45
Πίνακας 12: Δείκτες F_{IT} , F_{ST} και F_{IS}	46
Πίνακας 13: Τιμές του δείκτη F_{ST}	47
Πίνακας 14: Σημαντικότητες του κριτηρίου χ^2 ανάμεσα στις αλληλομορφικές συχνότητες των πληθυσμών (Arlequin 3.11).	48
Πίνακας 15: Γονιδιακή ροή (Nm) μεταξύ πληθυσμών.....	49
Πίνακας 16: Αποτελέσματα ανάλυσης μοριακής διακύμανσης AMOVA.....	50

Πίνακας 17: Ποσοστά διαφοροποίησης των πληθυσμών, σε τρεις άξονες, στηριζόμενα σε γενετικά δεδομένα.	51
Πίνακας 18: Γενετική απόσταση πληθυσμών σύμφωνα με το δείκτη D (Nei 1972) (GenAlEx).	52
Πίνακας 19: Γενετική απόσταση πληθυσμών σύμφωνα με το δείκτη D (Nei 1972) (TFPGA).....	52
Πίνακας 20: Γενετική απόσταση κατά Roger (1972) (TFPGA)	53
Πίνακας 21: Γενετική απόσταση κατά Wright (1978) (TFPGA).....	54

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Καραβίδα (<i>Nephrops norvegicus</i>).....	14
Εικόνα 2: Παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση καραβίδας (FAO, 2007).	16
Εικόνα 3: Αλιευτικά εργαλεία, παγίδες.....	19
Εικόνα 4: Αλιευτικά εργαλεία, δίχτυα.....	20
Εικόνα 5: Περιοχές δειγματοληψίας καραβίδας.....	31
Εικόνα 6: Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης.....	35
Εικόνα 7: Φωτογραφική απεικόνιση ποιότητας DNA υπό υπεριώδη ακτινοβολία (ίδια πηγή).....	36
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση «σκοραρίσματος» αλληλομόρφων (ίδια πηγή).....	40

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Παγκόσμιες αλιεύσεις καραβίδας, <i>N. norvegicus</i> , τα τελευταία πενήντα έτη (FAO, 2007).	17
Σχήμα 2: Εκφορτώσεις καραβίδας <i>N. norvegicus</i> για το έτος 2007 στην Ευρώπη.....	18
Σχήμα 3: Ποσοστά μοριακής παραλλακτικότητας μεταξύ και εντός των 6 φυσικών πληθυσμών.	50
Σχήμα 4: Απεικόνιση των γενετικών αποστάσεων των πληθυσμών με ανάλυση κύριων συνιστωσών	51
Σχήμα 5: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης (Nei, 1972) με τον αλγόριθμο Neighbour joining (TFPGA)	55
Σχήμα 6: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης (Nei, 1972) με τον αλγόριθμο UPGMA (TFPGA).....	55
Σχήμα 7: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη (Roger, 1972) με τον αλγόριθμο Neighbour joining (TFPGA)	56
Σχήμα 8: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη (Roger, 1972) με τον αλγόριθμο UPGMA (TFPGA)	56
Σχήμα 9: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη (Wright, 1978) με τον αλγόριθμο Neighbour joining (TFPGA)	57
Σχήμα 10: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη (Wright, 1978) με τον αλγόριθμο UPGMA (TFPGA)	57
Σχήμα 11: Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των πληθυσμών με βάση τη γενετική απόσταση με τον αλγόριθμο Neighbour joining (phylip 3.67).	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η караβίδα, *Nephrops norvegicus* (L.), είναι ένα δεκάποδο καρκινοειδές, με ευρεία γεωγραφική κατανομή και απαντάται στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, από το Μαρόκο έως τη Νορβηγία και την Ισλανδία, καθώς και στη Μεσόγειο θάλασσα. Η εμπορική αξία αυτού του είδους είναι ιδιαίτερα υψηλή και οι πρόσφατες τάσεις για καταναλωτική ζήτηση, δικαιολογούν το αυξημένο ενδιαφέρον για τη δυνατότητα εντατικής εκτροφής. Επομένως, πληροφορίες για τη γενετική πληθυσμιακή δομή της είναι απαραίτητες για τη βιώσιμη εκμετάλλευση και τη σωστή διαχείριση των αποθεμάτων της. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το μικροδορυφορικό DNA ως μοριακός γενετικός δείκτης για τη μελέτη του γενετικού αποθέματος της караβίδας και πιο συγκεκριμένα για τη μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής του δομής, στο Βόρειο Αιγαίο. Η προσπάθεια εκτίμησης της γενετικής ποικιλότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μικροδορυφορικού DNA, επειδή είναι ένας γενετικός δείκτης συγκυρίαρχος, εύκολος στη χρήση, πολύ ακριβής, υψηλά πολυμορφικός και απαιτεί πολύ λίγο και όχι ιδιαίτερα υψηλής ποιότητας DNA.

Επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν τρεις πληθυσμοί από τον Παγασητικό κόλπο (Π.Κ. 2005, 2006 και 2007), δύο από τον Τορωναίο κόλπο (Τ.Κ. 2006 και 2007) και ένας από το βόρειο Ευβοϊκό κόλπο (Β.Ε.Κ. 2005). Συνολικά γονοτυπήθηκαν 648 άτομα. Εξετάσθηκαν οχτώ ζεύγη εκκινητών, αλλά μόνο οι έξι από αυτούς έδωσαν επαναλήψιμα αποτελέσματα με υψηλό πολυμορφισμό. Επομένως, οι αλληλομορφικές συχνότητες υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας έξι πολυμορφικούς γενετικούς τόπους. Αναλύσεις μοριακής παραλλακτικότητας, υπολογισμοί των *F*-κριτηρίων, της

γονιδιακής ροής, των γενετικών αποστάσεων, καθώς και τυχόν αποκλίσεις από το νόμο των Hardy-Weinberg (H-W) υπολογίστηκαν εντός και μεταξύ των πληθυσμών.

Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση των παρατηρηθέντων και αναμενόμενων τιμών της ετεροζυγωτίας, μόνο ορισμένοι γενετικοί τόποι βρέθηκαν σε συμφωνία με το νόμο των Hardy-Weinberg. Αυτές οι σημαντικές αποκλίσεις από το νόμο αυτό, που ανιχνεύθηκαν σε όλους τους γενετικούς τόπους και όλους τους πληθυσμούς, υποδηλώνουν ότι το είδος ενδεχόμενα δεν έχει φτάσει ακόμη σε γενετική ισορροπία. Οι αποκλίσεις από το νόμο H-W, ίσως και να οφείλονται σε διάφορους λόγους, όπως είναι για παράδειγμα η παρουσία υποπληθυσμών, το ζευγάρισμα μεταξύ στενών συγγενικών ειδών (inbreeding), η διασταύρωση πληθυσμών με διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων γονιδίων (Wahlund effect), καθώς και η επίδραση της γενετικής παρέκκλισης. Η απόκλιση αυτή θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται και στη φυσική επιλογή. Οι πληθυσμοί παρουσίασαν μια σημαντική έλλειψη ετεροζυγωτίας ($F_{IS} = 0,204$), ελαφρώς υψηλότερη από εκείνη που έχει αναφερθεί σε προηγούμενες γενετικές μελέτες στο είδος. Η παρατηρηθείσα υψηλή τιμή του δείκτη F_{IS} φανερώνει πιθανή ενδογαμία. Η ανάλυση των αλληλομορφικών συχνοτήτων αποκάλυψε υψηλά επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού, ίσως λόγω της χρησιμοποιούμενης τεχνικής, παρόλο που η ανάλυση της μοριακής παραλλακτικότητας ήταν υψηλότερη εντός των πληθυσμών (85%) απ' ό,τι μεταξύ αυτών (15%). Οι τιμές της γενετικής απόστασης φανέρωσαν αυτή τη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των πληθυσμών χωροταξικά. Η παρουσία γενετικής δομής των ειδών (substructuring), πιθανώς λόγω της ύπαρξης υποπληθυσμών, επιβεβαιώθηκε, επίσης, από τη μέση τιμή δείκτη διαφοροποίησης των αλληλομορφικών συχνοτήτων ανάμεσα στους πληθυσμούς ($R_{ST}=0,148$). Η καραβίδα, *N. norvegicus*, είναι ένα καρκινοειδές με πελαγικές λάρβες, κατά τη δημιουργία των οποίων αναμένεται

υψηλή γονιδιακή ροή. Αντίθετα, σε ενήλικα στάδια αναμένεται να είναι περιορισμένη. Εντούτοις, η μέση τιμή της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών ήταν αρκετά υψηλή ($N_m=1,441$), υποδηλώνοντας ότι η γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών δεν είναι περιορισμένη, καθώς και το γεγονός ότι επικρατεί πανμιξία μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ενός γενετικά ευδιάκριτου αποθέματος καραβίδων στο Αιγαίο Πέλαγος. Τα στοιχεία συγκρίθηκαν με παλαιότερες γενετικές μελέτες άλλων θαλασσιών καρκινοειδών και ψαριών και συζητούνται λύσεις για τη σωστή διαχείριση των αποθεμάτων.

Λέξεις κλειδιά: *Nephrops norvegicus*, μικροδορυφορική αλληλουχία, ετεροζυγωτία, γενετική απόσταση, υποδιαίρεση πληθυσμών.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η караβίδα (*Nephrops norvegicus* L.)

Η караβίδα ανήκει στην οικογένεια των *Nephropidae* και στην τάξη των δεκαπόδων (*Decapoda*). Έχει σχετικά πιο μακρύ και περισσότερο «κομψό» σώμα σε σχέση με τα άλλα είδη των δεκαπόδων (Relini *et al.*, 1998). Η κοιλιακή περιοχή (abdomen) είναι μακριά και τελειώνει με ένα τέλσο σχήματος βεντάλιας, που επιτρέπει στην караβίδα να κολυμπήσει. Εντούτοις, κατά τη διάρκεια κίνησής της, η караβίδα περπατά περισσότερο απ' ό τι κολυμπά (Relini *et al.*, 1998). Διαθέτει 5 ζεύγη ποδιών. Το πρώτο ζευγάρι των ποδιών φέρει ισχυρές δαγκάνες ενώ το δεύτερο και τρίτο ζεύγος έχουν λεπτότερες δαγκάνες (Relini *et al.*, 1998). Το κεφάλι περιλαμβάνει ένα ζευγάρι «σύνθετων» οφθαλμών, όπου κάθε ένας είναι συνδεδεμένος με ένα κινητό μίσχο (*peduncle*). Οι οφθαλμοί της είναι μεγάλοι, μαύροι και μετακινούμενοι (Farmer, 1975). Γενικά, έχει χρώμα πορτοκαλί με κόκκινες-κίτρινες λωρίδες στις δαγκάνες και στο επάνω μέρος του κεφαλοθώρακα (Εικ. 1). Παρόλο που οι Fisher *et al.*, (1987a) παρατήρησαν ότι το μέγιστο ολικό μήκος της φτάνει τα 24 cm, έχουν εντοπιστεί και



Εικόνα 1: Καραβίδα (*Nephrops norvegicus*).

μεγαλύτερα άτομα, κυρίως στη βόρεια Αδριατική (26,5 cm). Κατά μέσο όρο, τα αρσενικά είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και παρουσιάζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής συγκριτικά με τα θηλυκά (Mytilineou *et al.*, 1990).

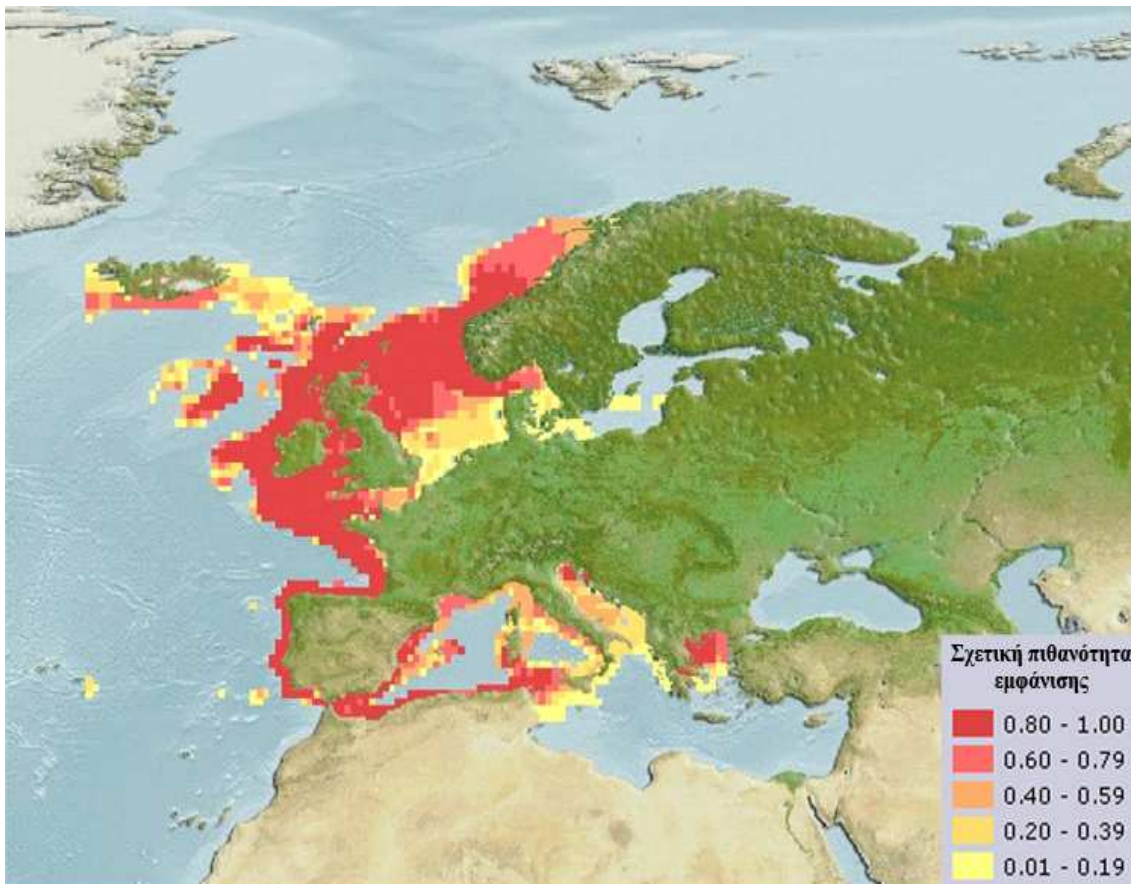
Η караβίδα ανήκει στα παμφάγα είδη. Έχει αποδειχθεί ότι οι διατροφικές προτιμήσεις της βρίσκονται κυρίως στον πυθμένα (Froggia and Gramitto, 1981). Το γεγονός αυτό συσχετίζεται με τη συνήθεια του σκαψίματος που έχει το συγκεκριμένο είδος αναζητώντας καταφύγιο. Το διαιτολόγιό της αποτελείται από διάφορα είδη ασπόνδυλων, καρκινοειδών και άλλους αργοκίνητους ζωικούς οργανισμούς. Επίσης τρέφεται με μικροφύκη και πλαγκτόν.

Τα στάδια ανάπτυξης της караβίδας, όπως και σε άλλα καρκινοειδή, είναι μια ασυνεχής διαδικασία με μια διαδοχή αφαίρεσης του εξωσκελετού της. Κατά τη διάρκεια αυτής, ο παλιός εξωσκελετός απομακρύνεται και το ζώο αυξάνεται πολύ γρήγορα πριν ακόμα δημιουργηθεί ο καινούργιος σκληρός εξωσκελετός. Μια καθορισμένη περιοδικότητα απομάκρυνσης του περιβλήματος (αφαίρεση) δε βρέθηκε μεταξύ των νεαρών ατόμων, εφόσον φαίνεται ότι πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει ένας συγχρονισμός απομάκρυνσής του στα ενήλικα άτομα. Η αναπαραγωγή της караβίδας, λαμβάνει χώρα την περίοδο Μαρτίου – Νοεμβρίου και γενικά, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι στη Μεσόγειο θάλασσα τα θηλυκά άτομα ωοτοκούν κάθε δεύτερο χρόνο. Η γονιμοποίηση των αυγών γίνεται εκτός νερού. Γεννά πάνω από 4.000 αυγά, τα οποία κρατάει στην υπογάστρια κοιλότητά της μέχρι την εκκόλαψη, η οποία διαρκεί 8 – 9 μήνες (Gramitto, 1998).

Η караβίδα είναι νυκτόβιο είδος που χαρακτηρίζεται από αργή ανάπτυξη και μικρό ρυθμό θνησιμότητας (Abello and Sarda, 1982). Δεν ανήκει στα μεταναστευτικά είδη και ζει σε περιοχές με μαλακούς, αμμώδεις πυθμένες, φθάνοντας σε βάθος

μεγαλύτερο από αυτό των 50 m. Στη βόρεια Αδριατική θάλασσα, το είδος καταγράφηκε σε βάθη από 30 έως 400 m, στο νότιο μέρος της (Karlovac, 1953; Fisher *et al.*, 1987b; Froggia and Gramitto, 1981).

Η κατανομή του είδους περιορίζεται στον ανατολικό Ατλαντικό, από το Μαρόκο έως τη Νορβηγία και την Ισλανδία καθώς και στη Μεσόγειο (Fisher *et al.*, 1987a; Relini *et al.*, 1998). Στο βόρειο μέρος της ανοικτής Αδριατικής συναντάται ο πυκνότερος πληθυσμός της, ενώ στη νότια Αδριατική, κατά μήκος των δυτικών (ιταλικών) και ανατολικών (αλβανικών) ακτών, ο πληθυσμός δεν είναι τόσο πυκνός (Karlovac, 1953). Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται η παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση της καραβίδας.

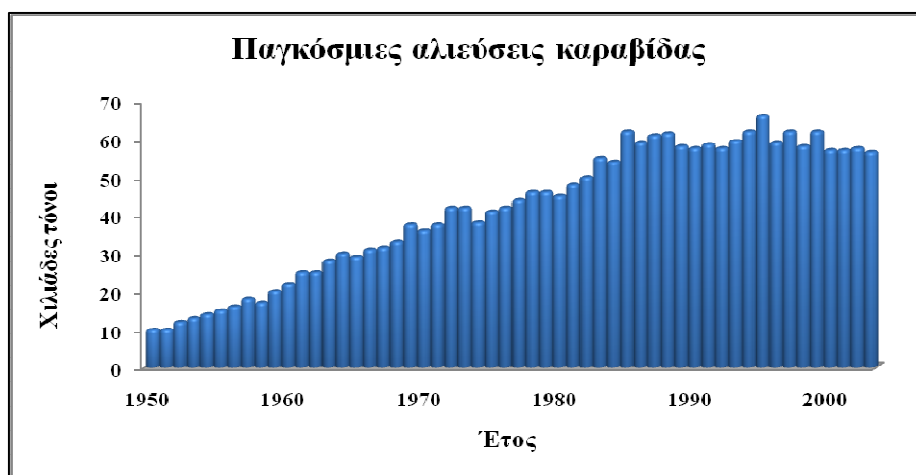


Εικόνα 2: Παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση καραβίδας (FAO, 2007).

1.2 Διαχείριση αλιείας

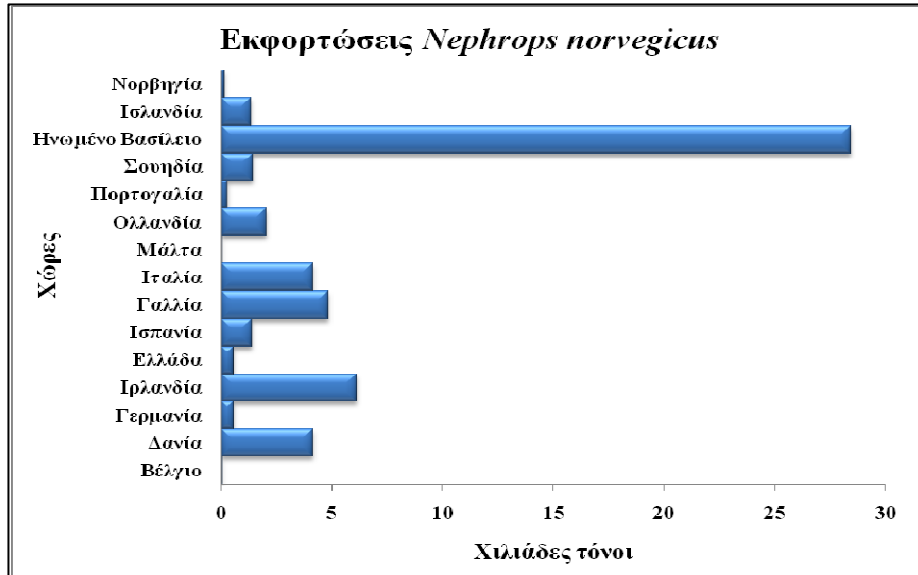
Η караβίδα, *N. norvegicus* (Linnaeus), είναι ένα από τα πολυτιμότερα είδη αλιείας, καθώς παρουσιάζει υψηλό ποσοστό προτίμησης από τους καταναλωτές. Τα καρκινοειδή, και κατά επέκταση η караβίδα, αποτελούν τροφή υψηλής διαιτητικής αξίας, καθώς είναι πολύ θρεπτικά, έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών και μετάλλων. Συνεπώς, το υπό μελέτη είδος έχει μεγάλη εμπορική αξία και η εξαλίευσή του γίνεται σε όλες τις περιοχές εξάπλωσής του.

Σύμφωνα με το FAO, το 1987 εξαλιεύθηκαν 59.761 tn και το 1988 εξαλιεύθηκαν 62.382 tn, κυρίως στην περιοχή του Νοτιοδυτικού Ατλαντικού. Το είδος αυτό αλιεύεται κυρίως την περίοδο της άνοιξης και του καλοκαιριού. Το συνολικό αλιεύμα σύμφωνα με το FAO για το 1999 έφτασε τους 61.737 tn. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη εξαλίευση του είδους το 1999 ήταν το Ηνωμένο Βασίλειο (31.312 tn) και η Ιρλανδία (8.492 tn). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η ετήσια αλιεία της караβίδας στην Πορτογαλία φτάνει τους 61.000 tn (Rosa *et al.*, 2003). Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται οι παγκόσμιες αλιεύσεις караβίδας τα τελευταία πενήντα έτη.



Σχήμα 1: Παγκόσμιες αλιεύσεις караβίδας, *N. norvegicus*, τα τελευταία πενήντα έτη (FAO, 2007).

Στο Σχήμα 2 απεικονίζονται οι εκφορτώσεις *N. norvegicus* για το έτος 2007 στην Ευρώπη.



Σχήμα 2: Εκφορτώσεις καραβίδας *N. norvegicus* για το έτος 2007 στην Ευρώπη

Στον Παγασητικό κόλπο, το είδος αυτό αλιεύεται κυρίως με δύο τύπους αλιευτικών εργαλείων, με τις παγίδες και τα δίχτυα.

1.2.1 Παγίδες

Οι παγίδες είναι αλιευτικά εργαλεία, τα οποία πρέπει να έχουν τις σωστές προδιαγραφές, ώστε να μη συλλαμβάνουν άλλα είδη ή νεαρά άτομα. Αποτελούν επιλεκτικά αλιευτικά εργαλεία, εφόσον είναι υποχρεωτικό να έχουν ανοίγματα ορισμένων διαστάσεων ανάλογα με το είδος που αλιεύεται (Εικ. 3). Επίσης, ανήκουν στα παθητικά εργαλεία, τα οποία δε μετακινούνται, αλλά οι οργανισμοί συλλαμβάνονται σε αυτά. Η αλιεία των καραβίδων διενεργείται με παγίδες που

περιέχουν δόλωμα (οικιακά υπολείμματα φαγητού, βατράχια, καπνιστές ρέγγες, καπνιστό δέρμα ψαριών ή κόκαλα από κοτόπουλο). Το καλύτερο δόλωμα μπορεί να θεωρηθεί οποιοδήποτε ψάρι το οποίο βρίσκεται σε αποσύνθεση. Οι παγίδες συνήθως περιλαμβάνουν κυλινδρικό μεταλλικό πλαίσιο που καλύπτεται από πλαστικό ή δικτυωτό πλέγμα με είσοδο στην κορυφή ή στα πλάγια. Τα «χείλη» της εισόδου είναι ανεστραμμένα προς το εσωτερικό ώστε να διευκολύνουν την είσοδο των καραβίδων, αλλά και να εμποδίζουν την έξοδό τους. Έτσι, οι καραβίδες εγκλωβίζονται στον κεντρικό θάλαμο της παγίδας.

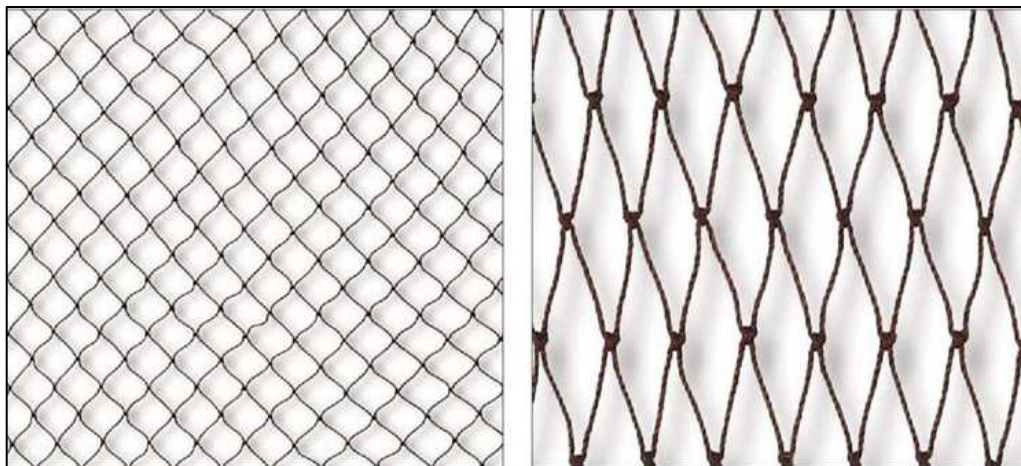


Εικόνα 3: Αλιευτικά εργαλεία, παγίδες.

1.2.2 Δίχτυα

Τα δίχτυα είναι ο απλούστερος και συνηθέστερος τρόπος αλιείας (Εικ. 4). Ανάλογα με το ψάρι που επιδιώκει να πιάσει ο ψαράς, είναι κατασκευασμένο και το δίχτυ. Αν πρόκειται, για μικρά ψάρια (σαρδέλες, μπαρμπούνια, γαρίδες κ.ά.), το δίχτυ είναι κατασκευασμένο από ψιλό νήμα κι έχει μικρές τρύπες. Αν πρόκειται για μεγάλα ψάρια, το δίχτυ είναι χοντρό και γερό με μεγάλα ανοίγματα. Πάνω στο δίχτυ είναι

δεμένοι φελλοί και βαρίδια. Τα δίχτυα διακρίνονται σε δίχτυα βυθού και σε δίχτυα επιφάνειας.



Εικόνα 4: Αλιευτικά εργαλεία, δίχτυα.

Στον Πίνακα 1 καταγράφονται οι τοπικές ονομασίες της караβίδας.

Πίνακας 1: Τοπικές ονομασίες της караβίδας (FAO, 2007).

Χώρες	Ονομασίες
ΕΛΛΑΣ:	Καραβίδα
DENMARK:	Bogstavhummer
GERMANY:	Buchstabenkrebs, Kaisergranat, Kaiserhummer, Norwegischer Hummer
ICELAND:	Letur humar
ITALY:	Scampo, Scampolo
MONACO:	Lengustina
MOROCCO:	Azeffane , Langoustine
NETHERLANDS:	Noorse kreeft .
NORWAY:	Bokstavhummer, Keiserhurnmer, Sjøkreps.
PORTUGAL:	Lagostim.
SPAIN:	Cigala, Escamarlanc, Maganto
SWEDEN:	Havskrifta, Kejsarhummer
TUNISIA:	Jarradh el bahr
UK:	Dublin bay prawn, Dublin prawn, Norway lobster
YUGOSLAVIA:	Skamp

1.3 Μοριακές τεχνικές

Η μοριακή και βιοχημική προσέγγιση αποτελεί σήμερα ένα απαραίτητο και αναπόσπαστο κομμάτι της θαλάσσιας έρευνας και συγκεκριμένα στους κλάδους της αλιείας, των υδατοκαλλιεργειών, της μεταποίησης αλιευμάτων και της θαλάσσιας οικολογίας. Η εφαρμογή μεθόδων μοριακής βιολογίας και βιοχημείας, στην αντιμετώπιση σημαντικών προβλημάτων των παραπάνω κλάδων, συμβάλλει ουσιαστικά στην ορθολογική και βιώσιμη (αειφόρο) αξιοποίηση των θαλάσσιων βιολογικών πόρων. Τα τελευταία χρόνια, η χρησιμοποίηση μοριακών μεθόδων έχει αυξηθεί θεαματικά, εξαιτίας της αυξανόμενης διαθεσιμότητας τεχνικών και της καλύτερης κατανόησης της αξίας των γενετικών δεδομένων. Η περιγραφή του γενετικού πολυμορφισμού, που εντάσσεται σε μια γενικότερη προσπάθεια μελέτης της βιοποικιλότητας οικοσυστημάτων, ενδιαιτημάτων, ειδών, πληθυσμών, θεωρείται το πλέον απαραίτητο βήμα τόσο για επιστημονικούς σκοπούς (κατανόηση μηχανισμών επιλογής, προσαρμογής και εξέλιξης των ειδών) όσο και για εφαρμοσμένους (διαχείριση, προστασία, διατήρηση αποθεμάτων).

Αναλύσεις γενετικής ποικιλότητας γίνονται με χρήση μοριακών δεικτών σε πληθυσμούς ιχθύων και άλλων ειδών, με σκοπό την υποβοήθηση της διαχείρισης φυσικών και εκτρεφόμενων αποθεμάτων. Οι αναλύσεις αυτές, περιλαμβάνουν:

- την εκτίμηση της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ πληθυσμών,
- την εκτίμηση του βαθμού ομομιξίας και απώλειας γενετικής ποικιλότητας από γενιά σε γενιά,
- τον προσδιορισμό γονέων σε μαζικές διασταυρώσεις,
- την υποβοήθηση προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης και

- την εκτίμηση επιπτώσεων από την απελευθέρωση εκτρεφόμενων αποθεμάτων στα φυσικά οικοσυστήματα.

Η χρήση μοριακών δεικτών αποτελεί την πιο σύγχρονη και αποτελεσματική τεχνική για την μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας, τη γενετική ταυτοποίηση ποικιλιών και τη μοριακή βελτίωση. Η χρησιμοποίηση αυτών στην επιστήμη της Ιχθυολογίας έχει αναπτυχθεί κατά πολύ τα τελευταία χρόνια λόγω τόσο της αλματώδους ανάπτυξης των ίδιων των μοριακών τεχνικών όσο και της σημασίας των γενετικών δεδομένων. Στις μέρες μας, οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται περικλείουν έρευνες που αναφέρονται από την αναγνώριση δεικτών για την περιγραφή ιχθυοαποθεμάτων (Park and Moran, 1994), σε ανάλυση της γενετικής δομής παθογόνων οργανισμών των περισσότερων ιχθύων εμπορικής σημασίας (Meyers *et al.*, 1992) μέχρι της έκφραση παραγόντων αύξησης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Duguay *et al.*, 1992). Παρά το γεγονός ότι οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται πάνω από δύο δεκαετίες, οι έρευνες είναι ακόμη σε πρωταρχικά στάδια. Η ανάπτυξη ωστόσο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) συνέβαλλε σημαντικά στην καλύτερη ανάλυση της διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών. Η εισαγωγή δηλαδή της βιοτεχνολογίας με τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA διαμέσου της PCR είχε ως αποτέλεσμα η όλη διαδικασία ανίχνευσης πολυμορφισμών στην αλληλουχία του DNA να απλοποιηθεί σημαντικά.

Οι μοριακές μελέτες κατατάσσονται σε:

- ✓ Γενετική
- ✓ Γενωμική
- ✓ Πληθυσμιακή Γενετική
- ✓ Λειτουργική Γενετική

Η **Γενετική** ασχολείται με τη μεταβίβαση των βιολογικών πληροφοριών από γενιά σε γενιά, με την αποσαφήνιση της φύσης του γενετικού υλικού, με τη δημιουργία των παραλλαγών του γενετικού υλικού, με τους τρόπους που δρα και εκφράζεται το γενετικό υλικό για να καθορίσει τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού, καθώς επίσης με τον τρόπο δημιουργίας και εξέλιξης της βιοποικιλότητας (Αλαχιώτης, 2005).

Η **Γενομική** έχει ως στόχο να προβάλλει την κατανόηση της κατασκευής, λειτουργίας και εξέλιξης των γενομάτων σε όλα τα βασίλεια της ζωής, καθώς και της εφαρμογής γενομικών επιστημών και τεχνολογιών με σκοπό την επίλυση προβλημάτων της βιολογίας και της ιατρικής (Λουκάς, 2003).

Η **Γενετική Πληθυσμών** είναι η επιστήμη η οποία χρησιμοποιεί μαθηματική θεωρία και εμπειρικές μελέτες για να κατανοήσει τη γενετική ποικιλότητα, τους ρυθμούς και τη δυναμική των γενετικών αλλαγών ανάμεσα στους πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που οδηγούν σε προσαρμογή και κατανομή. Εστιάζει στην κατανομή συχνότητας διαφόρων γονιδίων σε διαφορετικούς πληθυσμούς, χρησιμοποιεί δηλαδή τεχνικές που προέρχονται από τον κλάδο της στατιστικής. Με αυτό τον τρόπο επιδιώκει να δώσει απαντήσεις σε ερωτήματα που σχετίζονται με τις μετακινήσεις πληθυσμών κατά το παρελθόν, τις φυλογενετικές τους σχέσεις, το βαθμό ανάπτυξης διαφόρων φυλετικών τύπων και τον τρόπο προσαρμογής τους στο περιβάλλον. Αυτός ο τομέας συμπεριλαμβάνει τις επιδράσεις των μεταλλάξεων, τις τυχαίες αλλαγές, τη φυσική επιλογή και την απομόνωση (Futuyma, 1986).

Η **Λειτουργική Γενετική** έγκειται στην έκφραση, τη δομή και τη λειτουργία του γονιδίου. Χρησιμοποιεί την καινοτόμα γενετική τεχνολογία με σκοπό την επίλυση πολύπλοκων βιολογικών προβλημάτων.

1.3.1 Γενετικοί δείκτες

Γενετικός δείκτης είναι ένα γονίδιο ή μία αλληλουχία που καταλαμβάνει συγκεκριμένη θέση πάνω στο χρωμόσωμα. Περιγράφεται από έντονη παραλλακτικότητα, η οποία προέρχεται από μετάλλαξη ή άλλη διαφοροποίηση (π.χ. λόγω τυχαίας διασταύρωσης). Ένας γενετικός δείκτης μπορεί να είναι επίσης μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (ένα ή παραπάνω νουκλεοτίδια), που διαφέρει ανάμεσα στα δύο αλληλόμορφα γονίδια ή ένα ζεύγος ενζύμων (ισοένζυμα – αλλοένζυμα). Οι γενετικοί δείκτες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, του μορφολογικούς, τους πρωτεϊνικούς και τους DNA δείκτες.

Για να χαρακτηριστεί ένας δείκτης ως γενετικός δείκτης (genetic marker), θα πρέπει να δείχνει πολυμορφισμό μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Ο γενετικός δείκτης είναι οποιοδήποτε ζεύγος αλληλομόρφων που η κληρονομικότητα του καθορίζεται από το είδος της διασταύρωσης. Ένας DNA δείκτης είναι τυπικά μια μικρή περιοχή του DNA που δείχνει μια πολυμορφική αλληλουχία διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους. Οι τεχνικές του υβριδισμού και της ενίσχυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώρισή τους.

1.3.2 Τύποι γενετικών δεικτών

Τα τελευταία χρόνια, ένα μεγάλο εύρος μοριακών δεικτών όπως, Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), Random Amplified Polymorphism DNAs (RAPDs), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), Simple Sequence

Repeats (SSR) or microsatellites, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), έχουν αναπτυχθεί και έχουν εφαρμοστεί σε μια σειρά διαφόρων ειδών ψαριών.

Οι γενετικοί δείκτες, μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω ως κυρίαρχοι ή συγκυρίαρχοι. Οι κυρίαρχοι επιτρέπουν την ανάλυση πολλών γονιδιακών τόπων συγχρόνως, π.χ. RAPD. Ένας εκκινητής που ενισχύει έναν κυρίαρχο δείκτη θα μπορούσε να ενισχύσει πολλούς γονιδιακούς τόπους σε ένα δείγμα DNA με μια αντίδραση PCR. Οι συγκυρίαρχοι δείκτες αναλύουν έναν γονιδιακό τόπο τη φορά. Ένας εκκινητής που ενισχύει έναν συγκυρίαρχο δείκτη θα παράγει ένα συγκεκριμένο προϊόν.

Οι γενετικοί δείκτες μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί η σχέση μεταξύ κληρονομούμενης ασθένειας και της γενετικής της αιτίας (όπως είναι για παράδειγμα η μετάλλαξη του γονιδίου, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας ελαττωματικής πρωτεΐνης). Είναι γνωστό ότι τα τμήματα του DNA που βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο σε ένα χρωμόσωμα τείνουν να κληρονομηθούν από κοινού.

Οι γενετικοί δείκτες πρέπει να είναι εύκολα προσδιορίσιμοι, συνδεδεμένοι με έναν συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο με υψηλό πολυμορφισμό. Η ανίχνευση του δείκτη μπορεί να είναι άμεση με την αλληλούχιση του τμήματος ή έμμεση με τη χρήση ηλεκτροφόρησης.

Η χρήση των γενετικών δεικτών απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, διότι υπάρχει η πιθανότητα να μας οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα. Πιο συγκεκριμένα, οι μικροδορυφορικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή, έχουν κάποια μειονεκτήματα, τα οποία μπορούν να ελεγχθούν και να αποφευχθούν. Αυτά είναι: α) τα μηδενικά αλληλόμορφα (μη επαρκής ενίσχυση του DNA λόγω μεταλλάξεων στις περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών), β) ο «θόρυβος» στο διάγραμμα της ηλεκτροφόρησης και γ) η αδυναμία ενίσχυσης μεγαλύτερων αλληλομόρφων σε σχέση

με τα μικρότερα. Για τον έλεγχο των παραπάνω προβλημάτων έχει αναπτυχθεί το λογισμικό Microchecker (van Oosterhout *et al.*, 2004).

Τα σχετικά πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των γενετικών δεικτών συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των παραπάνω γενετικών δεικτών.

Χαρακτηριστικά	RFLPs	RAPDs	AFLPs	SSRs	SNPs
Απαιτούμενη ποσότητα DNA	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
Ποιότητα DNA	Υψηλή	Υψηλή	Μέτρια	Μέτρια	Υψηλή
Εξάρτηση από PCR	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Ευκολία στη χρήση	Όχι Μεγάλη	Μεγάλη	Μεγάλη	Μεγάλη	Μεγάλη
Υπαγόμενη σε αυτοματισμό	Χαμηλή	Μέτρια	Μέτρια	Υψηλή	Υψηλή
Ικανότητα αναπαραγωγής	Υψηλή	Αναξιόπιστη	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή
Κόστος ανάπτυξης	Χαμηλό	Χαμηλό	Μέτριο	Υψηλό	Υψηλό
Κόστος ανάλυσης	Υψηλό	Χαμηλό	Μέτριο	Χαμηλό	Χαμηλό

1.3.3 Οι γενετικοί δείκτες στην εκτίμηση των ιχθυοαποθεμάτων

Οι εφαρμογές των μοριακών τεχνικών στους υδρόβιους οργανισμούς και σε πληθυσμούς ιχθύων έχουν ως στόχο κυρίως τον έλεγχο και την καταγραφή της γενετικής ποικιλομορφίας, τη μελέτη των πληθυσμών και του βαθμού μετανάστευσης

πληθυσμών ιχθύων, την συστηματική κατάταξη ειδών και αναγνώριση τους, την αναπαραγωγική και γεωγραφική απομόνωση ειδών, καθώς και την ταυτοποίηση ειδών σε νεαρά στάδια ανάπτυξης.

1.3.4 Εφαρμογές στις υδατοκαλλιέργειες

Οι μοριακές τεχνικές εφαρμόζονται επίσης και στις υδατοκαλλιέργειες για τον έλεγχο των επιπέδων της γενετικής ποικιλότητας, ώστε τα προγράμματα αναπαραγωγής στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς να μην οδηγούν σε μείωση της γενετικής παραλλακτικότητας.

Τέλος, πολλές εφαρμογές των μοριακών τεχνικών είναι πολύ σημαντικές στις υδατοκαλλιέργειες, διότι η μοριακή βιολογία μπορεί να εξαλείψει πολλά προβλήματα στην αναπαραγωγή και εκτροφή των ειδών αυτών (Liu and Cordes, 2004).

Πιο συνοπτικά, οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες για τους ακόλουθους λόγους:

- Σύγκριση γενετικών αποθέματων εκτρεφόμενων και άγριων πληθυσμών.
- Ταυτοποίηση και διάκριση αποθεμάτων ιχθυογεννητικών σταθμών.
- Παρακολούθηση παμμιξίας και λοιπών αλλαγών στη γενετική παραλλακτικότητα.
- Σύνδεση γονέων / απογόνων με γενετική ταυτοποίηση.
- Επαλήθευση γενετικών μεταχειρίσεων όπως η πολυπλοειδία και η γυνογένεση.

1.4 Σκοπός της παρούσας έρευνας

Στο πλαίσιο δύο ερευνητικών προγραμμάτων (Πυθαγόρας II και Ε.Π.ΑΛ. 2000-2006) έγινε προσπάθεια για την εκτίμηση των αλιευτικών αποθεμάτων της караβίδας, *N. norvegicus*, του Αιγαίου Πελάγους με τη χρήση της μικροδορυφορικής αλληλουχίας, ως μοριακού δείκτη. Πιο συγκεκριμένα, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η εξέταση του γενετικού πολυμορφισμού σε άτομα του είδους από τρεις διαφορετικές περιοχές (Παγασητικός, Τορωναίος και βόρειος Ευβοϊκός κόλπος), αλλά και διάφορες ηλικιακές κλάσεις σε διάστημα τριών ετών. Εκτιμήθηκε ο βαθμός διαφοροποίησης με *F-statistics* και γενετικές αποστάσεις και συγκρίθηκαν με προηγούμενες μοριακές προσεγγίσεις του είδους, βιβλιογραφικά. Επιπλέον, η ανάδειξη της πληθυσμιακής και γενετικής δομής και διαφοροποίησης των πληθυσμών, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των παρακάτω:

- ✓ *F_{st}* : δείκτης διαφοροποίησης ανάμεσα στους πληθυσμούς.
- ✓ *F_{is}* : δείκτης μέτρησης της έλλειψης ετεροζυγωτίας μέσα σε έναν πληθυσμό.
- ✓ *F_{IT}*: απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg στον συνολικό πληθυσμό.
- ✓ *H_e* : αναμενόμενη ετεροζυγωτία & *H_o* : παρατηρούμενη ετεροζυγωτία.
- ✓ *N_m* : γονιδιακή ροή.
- ✓ *D* : δείκτης - μέτρο εύρεσης της γενετικής απόστασης μεταξύ των πληθυσμών.

Συνεπώς, στόχος της τρέχουσας έρευνας ήταν να απαντηθούν οι ακόλουθες μηδενικές υποθέσεις:

- Υπάρχει γενετική παραλλακτικότητα εντός και μεταξύ των πληθυσμών;
- Πώς σχετίζονται αυτοί οι πληθυσμοί;
- Ποιο είναι το μέγεθος της γονιδιακής ροής μεταξύ αυτών των πληθυσμών;

- Είναι αυτοί οι πληθυσμοί γενετικά δομημένοι;
- Μπορούν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη νέων μέτρων και αποφάσεων όσον αφορά στη διαχείριση-διατήρησή τους;

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιοχές έρευνας

Τα αλιευτικά πεδία καθορίστηκαν με γνώμονα προηγούμενες πληροφορίες επιστημονικών ερευνών καθώς και με συζητήσεις με τους αλιείς για τα αποθέματα του Παγασητικού κόλπου.

Ο Παγασητικός κόλπος είναι ένας ημίκλειστος κόλπος, ο οποίος βρίσκεται στο δυτικό μέρος του Αιγαίου, βόρεια της νήσου Εύβοιας. Το μέσο βάθος του κόλπου είναι 69m, με το βαθύτερο σημείο του να βρίσκεται στο ανατολικό μέρος. Η περιοχή που καλύπτει ο κόλπος είναι 520 km², με συνολικό όγκο νερού τα 36 km³ (Petihakis *et al.*, 2000). Ο Παγασητικός συνδέεται με το νότιο μέρος του Αιγαίου και το βόρειο Ευβοϊκό μέσω του διαύλου του Τρικεριού. Στον Παγασητικό κόλπο λαμβάνει χώρα αλιεία της караβίδας με διαφόρων μεγεθών αλιευτικά σκάφη. Από την περιοχή του Τρικεριού αλιεύουν με δίχτυα και παγίδες αποκλειστικά караβίδες, πέντε σκάφη μήκους 15 – 20 m, από την περιοχή του Βόλου, τρία σκάφη 12 – 15 m και από την περιοχή της Μηλίνας, τρία σκάφη μήκους 10 -12 m. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την θερινή περίοδο αυξάνει ο αριθμός των αλιευτικών σκαφών που συμμετέχουν στην αλιεία της караβίδας σε όλες τις προαναφερθείσες περιοχές.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος, συλλέχθηκαν συνολικά 648 άτομα. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από επαγγελματίες δύτες, σε μικρή απόσταση από την ξηρά. Οι περιοχές από τις οποίες έγιναν οι δειγματοληψίες είναι ο Παγασητικός, ο βόρειος Ευβοϊκός κόλπος και ο Τορωναίος κόλπος (Πίν. 3, Εικ. 5).

Πίνακας 3: Περιοχές δειγματοληψίας, συντεταγμένες περιοχής και αριθμός δειγμάτων.

Περιοχές δειγματοληψίας	Συντεταγμένες περιοχής	Αριθμός ατόμων
Παγασητικός κόλπος	B 60°66'00'', A 23°00'00''	572
Τορωναίος κόλπος	B 03°30'00'', A 98°00'00''	56
Βόρειος Ευβοϊκός κόλπος	B 45°50'00'', A 36°33'00''	20

**Εικόνα 5:** Περιοχές δειγματοληψίας καραβίδας.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν μια φορά χωρίς επανάληψη και σε διαφορετικούς μήνες. Πιο συγκεκριμένα, οι δειγματοληψίες στον Παγασητικό κόλπο πραγματοποιήθηκαν τέσσερις φορές το 2005 (Ιούλιο, Σεπτέμβριο, Οκτώβριο, Νοέμβριο), πέντε φορές το 2006 (Μάρτιο, Απρίλιο, Μάιο, Ιούνιο, Αύγουστο) και δέκα φορές το 2007 (όλο το έτος εκτός από Ιούνιο και Νοέμβριο). Στον Τορωναίο κόλπο πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε τον Οκτώβριο

του 2005 και η δεύτερη τον Ιανουάριο του 2006. Η δειγματοληψία στον Ευβοϊκό κόλπο πραγματοποιήθηκε μία μόνο φορά, τον Νοέμβριο του 2005.

Ύστερα από την αλίευση τους, για τη σωστή συντήρησή τους, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ψυγεία με πάγο και μεταφέρθηκαν σε καταψύκτη στους -20°C . Πριν την κατάψυξη, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες με συγκεκριμένη κωδικοποίηση, όπου αναγράφονταν η ημερομηνία και η τοποθεσία συλλογής, καθώς και ο αριθμός κάθε δείγματος. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στον καταψύκτη μέχρι την επεξεργασία τους.

2.2 Απομόνωση DNA

1. **Προετοιμασία δειγμάτων:** Η ποσότητα ιστού που απαιτείται για εξαγωγή DNA είναι μικρή (50 mgr μαλακού ιστού). Συνεπώς, από το μυϊκό ιστό της ουράς του δεκάποδου ελήφθησαν 0,1 έως 1 g και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένη κυβέτα τύπου Eppendorf (1,5 ml) που περιείχε διάλυμα DMSO 20%. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια μιας χειρουργικής λεπίδας, ο ιστός τεμαχίστηκε σε μικρότερα κομμάτια για περαιτέρω επεξεργασία.
2. **Απομόνωση ολικού DNA:** Η μέθοδος για απομόνωση ολικού DNA (total DNA) που ακολουθήθηκε είναι η εξής:
 - ✓ Με χρήση φαινόλης – χλωροφόρμιου.

Τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Πρώτο στάδιο: Στα δείγματα που βρίσκονταν μέσα σε αποστειρωμένη κυβέτα προστέθηκαν από:
 - ✓ 500 µl Extraction Buffer (0,1 M EDTA pH 8.00 & 0,05M Tris HCl pH 8.00),
 - ✓ 20 µl SDS 10% και
 - ✓ 20 µl Proteinase K (10 mg/ml).
- Δεύτερο στάδιο: Για την πλήρη ομογενοποίηση του ιστού, χρησιμοποιήθηκε έμβολο και έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 55⁰C για τουλάχιστον 2 ώρες. Σε αυτό το στάδιο γίνεται η λύση των κυττάρων για να απελευθερωθούν τα νουκλεϊκά οξέα (επίδραση της Proteinase K).
- Τρίτο στάδιο: Στη συνέχεια, απομακρύνθηκαν οι κυβέτες από το υδατόλουτρο και αφήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Έπειτα, στα δείγματα προστέθηκαν από 600µl φαινόλη – χλωροφόρμιο. Ακολούθως, τα δείγματα ανακινήθηκαν ελαφρώς (για 5 min) και ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 12000 στροφές σε θερμοκρασία 4⁰C, με σκοπό να διαχωριστούν οι 2 φάσεις.
- Τέταρτο στάδιο: Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο των κυβετών μεταφέρθηκε σε καθαρές κυβέτες με πιπέτα. Σε κάθε μια κυβέτα, προστέθηκαν 400 µl Φαινόλη – Χλωροφόρμιο - Ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1 και ακολούθησε ελαφρά ανάδευση (για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης), μέχρι να δημιουργηθεί γαλακτώδες, ομογενοποιημένο

υγρό. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 12.000 στροφές στους 4⁰C.

- Πέμπτο στάδιο: Μετά το τέλος των 5 min, στο κάτω μέρος των κυβετών έχει δημιουργηθεί δημιουργήθηκε μια πελέτα (pellet) από DNA. Το υγρό απομακρύνθηκε προσεκτικά ώστε να μην χαθεί η πελέτα του DNA. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 1/10 της περιεχόμενης ποσότητας, οξικό νάτριο (Sodium Acetate) συγκέντρωσης 3M και ίσος όγκος με το διάλυμα, παγωμένη ισοπροπανόλη, με σκοπό να γίνει η κατακρήμιση των νουκλεϊκών οξέων. Ακολούθησε η επώαση των δειγμάτων στους -20⁰C για 1 ώρα, η φυγοκέντρησή τους στις 13.000 στροφές για 10 min, ώστε να εμφανιστεί λευκό ίζημα (DNA pellet) καθώς και η αφαίρεση της ισοπροπανόλης.
- Έκτο στάδιο: Στη συνέχεια, ακολούθησε ξέπλυμα με 200 μl κρύας αιθανόλης περιεκτικότητας 100 % αιθανόλη (ΕΤΟΗ), με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αλατιού. Η αιθανόλη αφαιρέθηκε τελείως και το Eppendorf τοποθετήθηκε με ανοικτό το πώμα σε φούρνο για περίπου 20 min στους 40° C, έτσι ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
- Έβδομο στάδιο: Ακολούθησε επαναδιάλυση του DNA σε 50 μl T.E. (10 mM Tris HCl pH 8,00, 1 mM EDTA pH 8,00) και φύλαξη στον καταψύκτη στους -20⁰C.

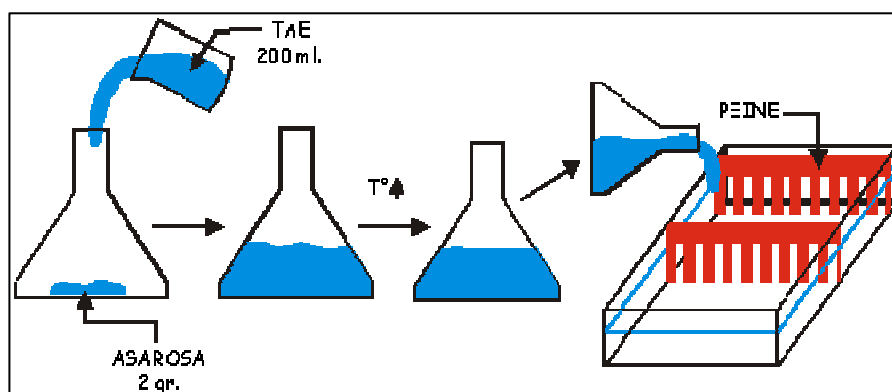
3. Ποσοτικοποίηση DNA: Η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίζεται είτε από τα μεγέθη των ζωνών αυτού σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση, είτε διαβάζοντας το φάσμα απορρόφησής του, γνωρίζοντας ότι το δίκλωνο μόριο του DNA απορροφά στα 260 nm. Η ποσοτικοποίηση του

DNA συμβάλλει στο να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί το προϊόν της εξαγωγής (γενωμικό DNA) ως μήτρα (template) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ενζυμικής ενίσχυσης (PCR).

4. Έλεγχος ποσότητας DNA: Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ρυθμιστικό διάλυμα TBE.

2.3 Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης

Σε μια κωνική φιάλη μεταφέρθηκαν 2 g στερεής αγαρόζης (Invitrogen) και 100 ml 1X TBE. Έπειτα η φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 min περίπου, με σκοπό να πραγματοποιηθεί η διάλυσή της. Μετά το πέρας των 5 min, στη φιάλη προστεθήκαν 1,5 μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το πήκτωμα αυτό, τοποθετήθηκε ομοιογενώς στην ειδική πλάκα ηλεκτροφόρησης, ξεκινώντας από τη μέση, στην οποία τοποθετήθηκαν 'χτενάκια' με πηγαδάκια και αφέθηκε για λίγα λεπτά μέσα στον απαγωγό για να στερεοποιηθεί (πολυμερισμός). Στην Εικόνα 6 απεικονίζεται η προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης.

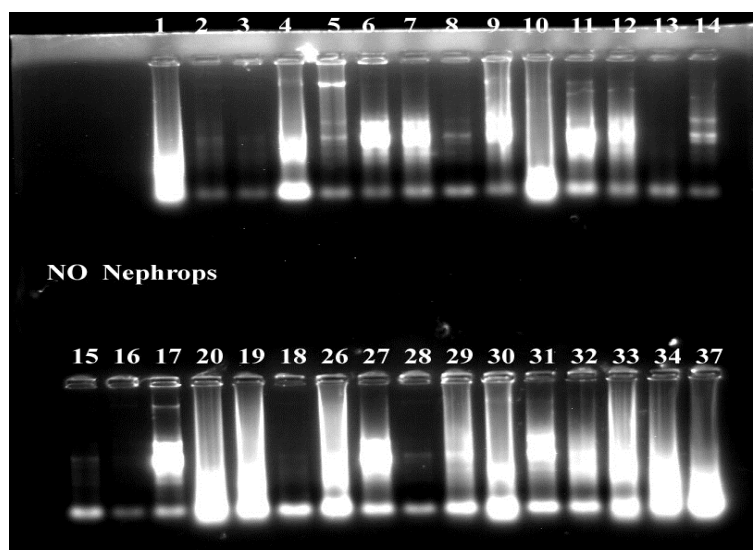


Εικόνα 6: Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης.

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική διαχωρισμού φορτισμένων μορίων DNA. Το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο το οποίο κινείται με το ηλεκτρικό ρεύμα διαμέσου του πηκτώματος της αгарόζης. Μετακινείται (μεταναστεύει) από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Μέσα στην πλάκα με το πήκτωμα της αгарόζης, μεταφέρθηκαν 2 μl marker και τοποθετήθηκαν από 8 μl H₂O, 2 μl χρωστική blue και 2 μl total DNA από το κάθε δείγμα. Η χρώση είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό των προϊόντων. Στο «μπάνιο» (ή συσκευή) ηλεκτροφόρησης, προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1X μέχρις ότου να καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα και έπειτα φορτώθηκε το DNA στα πηγαδάκια, με πιπέτα. Με την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας, η συσκευή ηλεκτροφόρησης τέθηκε σε λειτουργία για 30 min στα 80 Volt. Μετά το πέρας των 20 min το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη μηχανή φωτογράφισης UV η οποία εξοπλισμένη με CCD κάμερα (UVP VILBER LOURMAT). Η επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με το πρόγραμμα gel capture (Εικ. 7).



Εικόνα 7: Φωτογραφική απεικόνιση ποιότητας DNA υπό υπεριώδη ακτινοβολία (ίδια πηγή).

2.5 Επιλογή μικροδορυφορικών τύπων

Εξετάστηκαν συνολικά 8 ζεύγη εκκινητών μικροδορυφορικής αλληλουχίας (microsatellite Primers) με κωδική ονομασία στη βάση δεδομένων NCBI: AF221987, AF221988, AF221989, AF221990, AF221991, CN952278, CN949888 και CN952085. Οι 8 αυτοί μικροδορυφόροι επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία για είδη που έχουν σχεδιαστεί για το ίδιο είδος (Streiff *et al.*, 2001) και συγγενικά είδη (Hodgins-Davis *et al.*, 2007). Στα άτομα της καραβίδας εντοπίστηκαν και τα 8 ζεύγη εκκινητών, εκ των οποίων οι 6 μόνο βρέθηκαν πολυμορφικοί. Η αλληλουχία τους δίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Ονομασία, κωδικοποίηση καταγραφής, αλληλουχία, επανάληψη στον κλώνο και χρώση των σημασμένων εκκινητών.

Ονομασία Primer	Κωδικοποίηση καταγραφής στην τράπεζα γονιδίων NCBI	Αλληλουχία	Επανάληψη στον κλώνο	Χρώση
Nnmic2-E4	AF221987	F:GGCGTGATGTCCGATTTTACTG R:AGTAATGCCATCGCCGCTGTAGG	(TG)... (GT)10	HEX (πράσινο)
Nnmic1-F2	AF221988	F:TGCTAAGCCTTCTGTCTGATAAGCTA R:ATTCTCGGAGGTAACCAGACTTTT	(AAG)...(AG)11	FAM (μπλε)
Nnmic1B11	AF221989	F:TACAACAAAGGGTCACTACAC R:CCATAGAGCTAACTAACGCAGG	(GA)10	ROX (κόκκινο)
Nnmic1- C12	AF221990	F:TGTCGTCGTAACCTACCCGCTG R:ATACATCGTCCACTGCTCCAC	(GT)6	TAMRA (μαύρο)
NnmicT-G2	AF221991	F:ACTGTCCGGTCAGGTTGAGA R:TCAGTCAAGAGATTGGGGAG	(CT)30	HEX (πράσινο)
LOBP3	CN949888	F:AGGTAGGTGGTTATGCTGGGTTG R:CCAAGATAGTCAGGCAGTCAGTCA	(CCT)6	ROX (κόκκινο)

Η εξέτασή τους έγινε στο εργαστήριο με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή PCR. Οι συνθήκες της PCR καθορίστηκαν με πειραματικό σχεδιασμό αλλάζοντας μία, κάθε φορά, συνθήκη.

Οι τελικές συνθήκες για τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ήταν 1 μ l DNA, 2 μ l Reaction Buffer 10x, (0,1 x 4) μ l dNTP's 10 mM (Invitrogen), 1 μ l $MgCl_2$ 25 mM, (1 + 1) μ l από κάθε primer 15 μ M (Invitrogen), 0,2 μ l Taq-polymerase 0,5 U/ μ l (Invitrogen) και συμπλήρωση μέχρι τα 20 μ l με υπερκάθαρο νερό (18,2 Ω). Οι συγκεντρώσεις των επί μέρους αντιδραστηρίων της PCR για τους παραπάνω τύπους δίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR

Αντιδραστήρια	Αρχικές Συγκεντρώσεις Αντιδραστηρίων	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα (reaction buffer)	10X	2 μ l
Χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$)	25 mM	1 μ l
Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)	10 mM	1,5 μ l
Πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	15 μ M	1 μ l
Ανάστροφος εκκινητής (reverse primer)	15 μ M	1 μ l
Πολυμεράση Taq (Taq polymerase)	0,2 U/ μ l	0,15 μ l
DNA	50 ng / μ l	1 μ l
Νερό (ddH₂O)		Υπόλοιπο έως τα 20 μ l

Οι συνθήκες των θερμοκρασιακών κύκλων της αρχικής αποδιάταξης (first denaturation), των τριών σταδίων αποδιάταξης (denaturation) – επαναδιάταξης

(annealing) – επιμήκυνσης (extension) και της τελικής επιμήκυνσης (final extension) δίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Συνθήκες θερμοκρασιακών κύκλων της PCR

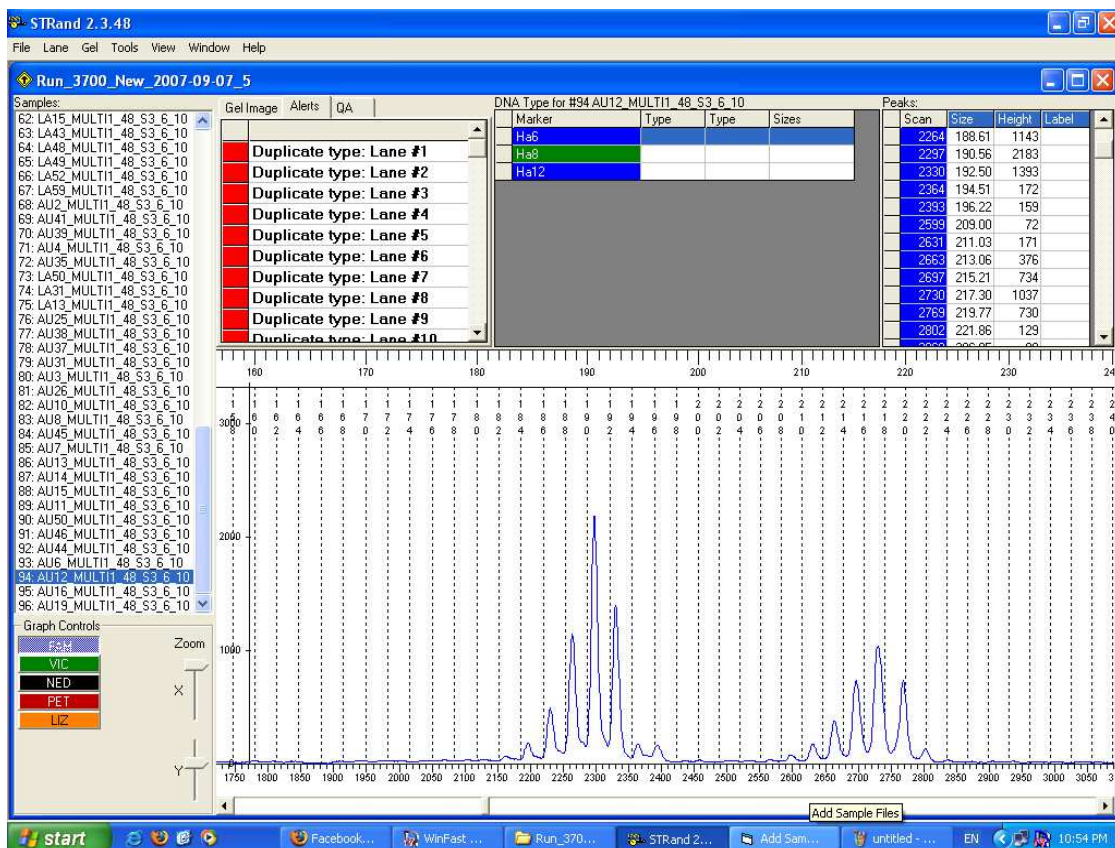
Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Προεπώαση	94	8΄	1
Αποδιάταξη (Denaturation)	94	30΄΄	30
Επαναδιάταξη (Annealing)	46/48	1΄	
Επιμήκυνση (Extension)	72	1΄	
Τελική επιμήκυνση	72	10΄	1

2.6 Γονοτύπηση μικροδορυφορικών αλληλουχιών

Η γονοτύπηση έγινε με σημασμένους εκκινητές σε αυτόματο sequencer (MJ Research, Base Station) στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε).

Για το διαχωρισμό των βάσεων χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% (MJ Research) με οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης είχε όγκο 5 μl: 1 μl προϊόν PCR, 3,9 μl φορμαμίδιο και 0,1 μl μάρτυρα (ladder). Στη συνέχεια το διάλυμα αποδιατάχθηκε για 5 min στους 95°C και αποθηκεύθηκε σε πάγο μέχρι την αυτόματη φόρτωσή του στην πηκτή.

Με την παροχή υψηλή τάσης (4000 volts) το διάλυμα εισήλθε στην πηκτή και με τη χρήση οπτικής ίνας laser πραγματοποιήθηκε η αποτύπωση των βάσεων. Τέλος, με το λογισμικό STRAND (2.3.0.48), πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των βάσεων των αλληλομόρφων (Εικ. 8).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση «σκοραρίσματος» αλληλομόρφων (ίδια πηγή).

2.7 Γενετική στατιστική ανάλυση

Για τον έλεγχο παρουσίας μηδενικών αλληλομόρφων γονιδίων (null alleles) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό microchecker (van Oosterhout *et al.*, 2004).

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της γενετικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά προγράμματα γενετικής, GeneAlex (Sherwin, 2006), Fstat (Goudet, 1995) και Arlequin 3.11 (Schneider, 1999). Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση αυτών των λογισμικών υπολογίστηκε η ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA) (Weir and Cockerham, 1984), ο δείκτης παραλλακτικότητας (F_{st}), ο δείκτης ενδογαμίας (F_{IS}), ο δείκτης F_{IT} , η αναμενόμενη και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία της μεθόδου Hardy - Weinberg (H_e , H_o), ο δείκτης γονιδιακής ροής (Nm) καθώς και οι συχνότητες των αλληλομόρφων.

Οι γενετικές αποστάσεις D και οι 2x2 πίνακες γενετικής απόστασης (matrix distance) υπολογίστηκαν σύμφωνα με την ελάχιστη γενετική απόσταση κατά Nei (Nei's minimum genetic distance, 1972), με τις γενετικές αποστάσεις κατά Roger (Roger's genetic distance, 1972) και κατά Wright (Wright's modification of Roger's distance, 1978) με τα λογισμικά πακέτα GenAlEx, TFGPA και Arlequin 3.11.

Γενικά, για τον υπολογισμό της γενετικής απόστασης χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι, οι οποίοι υπολογίζουν τις διαφορές ανάμεσα στις γονιδιακές συχνότητες κοινών γενετικών τόπων σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Στην παρούσα έρευνα, για την απεικόνιση των κλαδογραμμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Neighbor-Joining (Saitou, 1987) και η μέθοδος UPGMA (Sokal, 1958) με τα λογισμικά πακέτα Phyliip 3.62 (Felsenstein, 1993) και TFGPA (Miller, 1997), αντίστοιχα.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του λογισμικού Microchecker δεν έδειξαν σημαντική ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων γονιδίων για όλους τους γενετικούς τόπους (Πίν. 7).

Πίνακας 7: Συχνότητες μηδενικών αλληλομόρφων κατά Brookfield (1996).

	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2006	Παγασητικός 2005	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2005	Ευβοϊκός 2005
Τόπος 1	0,1302	0,1181	0,152	0,0791	0	0,0847
Τόπος 2	0,1437	0,2331	0,166	0,1702	0,2073	0,1789
Τόπος 3	0,0915	0,131	0,1112	0,1636	0,1026	0
Τόπος 4	0,0171	0,0193	0	0	0,0079	0
Τόπος 5	0,098	0,0734	0,0761	0,094	0,1189	0
Τόπος 6	0,0183	0,1081	0,1344	0,2669	0,1452	0,0069

Από τις 8 μικροδορυφορικές αλληλουχίες που εξετάστηκαν στο γονιδίωμα της καραβίδας μόνο οι έξι γενετικοί τόποι βρέθηκαν υψηλά πολυμορφικοί και χαρακτηρίζονται από υψηλό αριθμό αλληλομόρφων (7–33 αλληλόμορφα). Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται οι πολυμορφικοί τόποι που χρησιμοποιήθηκαν για την πληθυσμιακή ανάλυση της καραβίδας.

Πίνακας 8: Ονομασία τόπου, εύρος βάσεων, αριθμός αλληλομόρφων και τυπικά σφάλματα στους υπό εξέταση γενετικούς τόπους όλων των πληθυσμών (GenAlex).

Ονομασία τόπου	Εύρος βάσεων	Αριθμός αλληλομόρφων	Τυπικό σφάλμα
AF221987	178 - 202	14	2,917
AF221988	189 - 225	33	8,366
AF221989	141 - 179	14	2,512
AF221990	85 - 103	7	1,549
AF221991	140 - 162	23	4,177
CN949888	105 - 126	10	1,258

Ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά τόπο και πληθυσμό παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Ο πληθυσμός του Παγασητικού 2007 έχει τα περισσότερα αλληλόμορφα σε σχέση με τους άλλους πληθυσμούς σε όλους τους τόπους, εκτός από τον CN949888. Ο AF221988 είχε τα περισσότερα αλληλόμορφα σε όλους τους πληθυσμούς εκτός του Ευβοϊκού 2005 και εμφάνισε το μεγαλύτερο πολυμορφισμό (33 διαφορετικά αλληλόμορφα), σε αντίθεση με τον AF221990 που είχε τον χαμηλότερο πολυμορφισμό σε όλους τους πληθυσμούς εκτός από τον Παγασητικό 2007 και τον Παγασητικό 2005 (7 διαφορετικά αλληλόμορφα).

Πίνακας 9: Αριθμός αλληλομόρφων ανά τόπο και πληθυσμό.

Όνομασία τόπου	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
AF221987	25	18	17	9	12	5
AF221988	64	40	44	20	18	9
AF221989	22	19	16	8	9	8
AF221990	12	10	9	3	4	4
AF221991	39	28	28	18	16	11
CN949888	11	9	15	7	7	8

Οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy–Weinberg εξετάστηκαν για όλους τους γενετικούς τόπους και για τους 6 πληθυσμούς της караβίδας (Πίν. 10). Οι τιμές που προέκυψαν έδειξαν ότι δεν ισχύει ο νόμος με όλες τις παραδοχές του. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι παρατηρηθείσες ετεροζυγωτίες ήταν αρκετά υψηλές για όλους τους τόπους.

Πίνακας 10: Τιμές μέσης αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (H_e) και μέσης παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας και τυπικά σφάλματα (GenAlEx).

Πληθυσμός	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
H_e (GenAlEx)	0,781	0,751	0,789	0,686	0,678	0,680
Τυπικό σφάλμα	0,056	0,062	0,071	0,079	0,082	0,077
H_o (GenAlEx)	0,629	0,564	0,581	0,522	0,479	0,630
Τυπικό σφάλμα	0,037	0,054	0,053	0,074	0,070	0,089

Η συμφωνία με το νόμο ή η απόκλιση από αυτόν, η οποία υποδηλώνει μη τυχαίες συζεύξεις, επιλογή ή και μίξη πληθυσμών, ελέγχεται με στατιστική σύγκριση της αναμενόμενης και της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας. Τα αποτελέσματα του λογισμικού GenAlix με το οποίο πραγματοποιήθηκε έλεγχος του θεωρήματος H-W, είναι συγκεντρωτικά για όλους τους πληθυσμούς και όλους τους τόπους (Πίν. 11). Η ανάλυση του κριτηρίου χ^2 έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις από το νόμο.

Πίνακας 11: Σημαντικότητες του κριτηρίου χ^2 ανάμεσα στις αναμενόμενες και παρατηρούμενες ετεροζυγωτίες για την επαλήθευση γενετικής ισορροπίας κατά Hardy-Weinberg (GenAlix).

χ^2	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
AF221987	***	***	***	*	***	**
AF221988	***	***	***	***	***	***
AF221989	***	***	***	ns	*	ns
AF221990	***	ns	***	ns	ns	ns
AF221991	***	***	***	***	***	***
CN949888	***	***	***	***	***	ns

(ns = non significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ και *** $P < 0.001$)

Για όλους τους τόπους σε όλους τους πληθυσμούς, ο συντελεστής παραλλακτικότητας F_{ST} , ο δείκτης F_{IS} και ο δείκτης F_{IT} των πληθυσμών παρουσιάζεται

στον Πίνακα 12. Σύμφωνα με το λογισμικό GenAlEx, οι δείκτες F_{IS} και F_{IT} παρουσιάζουν αρνητικές τιμές στον τόπο AF221990, ο οποίος είναι και ο λιγότερο πολυμορφικός. Ο δείκτης F_{IS} έχει εύρος από -0,032 έως 0,405. Η μικρότερη τιμή του εντοπίζεται στον τόπο AF221990, ενώ η μεγαλύτερη στον τόπο AF221988. Ομοίως με το δείκτη F_{IS} , στο δείκτη F_{IT} η μικρότερη τιμή του παρατηρείται στον τόπο AF221990 (-0,008), ενώ η μεγαλύτερη στον τόπο AF221988 (0,487). Τέλος, ο συντελεστής παραλλακτικότητας F_{ST} παρατηρείται να έχει χαμηλές τιμές (0,0655 μέση τιμή).

Πίνακας 12: Δείκτες F_{IT} , F_{ST} και F_{IS} (GenAlEx).

Όνομασία Primer	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
AF221987	0,200	0,331	0,163
AF221988	0,405	0,487	0,138
AF221989	0,215	0,231	0,020
AF221990	-0,032	-0,008	0,024
AF221991	0,158	0,177	0,022
CN942888	0,275	0,294	0,026
Ολικό	0,204	0,252	0,066
Τυπικό σφάλμα	0,059	0,068	0,027

Στον Πίνακα 13 καταγράφονται οι τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των πληθυσμών της караβίδας.

Η γενετική ποικιλομορφία κυμάνθηκε από 0,06625 έως 0,18036 (Πίν. 13). Σύμφωνα με το λογισμικό Arlequin, οι μικρότερες τιμές για το συντελεστή F_{ST} παρατηρήθηκαν μεταξύ Παγασητικού 2005 και Χαλκιδικής 2006 (0,06394) και μεταξύ Παγασητικού 2005 και Χαλκιδικής 2007 (0,06625). Αντίθετα, οι μεγαλύτερες τιμές του, παρατηρήθηκαν μεταξύ Παγασητικού 2005 και Ευβοϊκού 2005 (0,18036) και μεταξύ Χαλκιδικής 2007 και Ευβοϊκού 2005 (0,17298). Συνολικά, στους περισσότερους πληθυσμούς, οι τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας εμφάνισαν υψηλές τιμές.

Πίνακας 13: Τιμές του δείκτη παραλλακτικότητας F_{ST} (οι τιμές βασίστηκαν σε permutation τιμής 999, Arlequin 3.11).

Δείκτης παραλλακτικότητας F_{ST}	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
Παγασητικός 2007						
Παγασητικός 2005	0,11711					
Παγασητικός 2006	0,09169	0,08502				
Τορωναίος 2006	0,10982	0,06394	0,07466			
Τορωναίος 2007	0,13020	0,06625	0,08747	0,06843		
Ευβοϊκός 2005	0,13603	0,18036	0,13855	0,16800	0,17298	

Τα αποτελέσματα σύγκρισης των συχνοτήτων των αλληλομόρφων (με επίπεδο σημαντικότητας 0,05) είναι συγκεντρωτικά για όλους τους πληθυσμούς (Πίν. 14). Οι πληθυσμοί Παγασητικός 2007 και Παγασητικός 2005 εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επίσης, στατιστικώς σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν μεταξύ των πληθυσμών του Παγασητικού 2005 και του Παγασητικού 2006, καθώς και μεταξύ του Παγασητικού 2006 και του Παγασητικού 2007. Για όλα τα υπόλοιπα δείγματα, δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Συνεπώς, παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$) μόνο για τον πληθυσμό του Παγασητικού, με όλους τους υπόλοιπους εποχικούς πληθυσμούς να ομαδοποιούνται.

Πίνακας 14: Σημαντικότητες του κριτηρίου χ^2 ανάμεσα στις αλληλομορφικές συχνότητες των πληθυσμών (Arlequin 3.11).

	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
Παγασητικός 2007						
Παγασητικός 2005	0,00340 **					
Παγασητικός 2006	0,03290 *	0,00120 **				
Τορωναίος 2006	0,38640	0,18685	0,67185			
Τορωναίος 2007	0,57165	0,24730	0,60545	1,00000		
Ευβοϊκός 2005	0,78465	0,38055	0,87695	1,00000	1,00000	

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$,

Στον Πίνακα 15 υπολογίστηκε η γονιδιακή ροή (Nm) για το σύνολο των πληθυσμών. Η μεγαλύτερη γονιδιακή ροή (7,31992) παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων του Παγασητικού 2005 και Χαλκιδικής 2006, ενώ η μικρότερη γονιδιακή ροή (2,39055) παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων του Ευβοϊκού 2005 και Χαλκιδικής 2007. Η μέση τιμή της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών ήταν αρκετά υψηλή (1,441).

Πίνακας 15: Γονιδιακή ροή (Nm) μεταξύ πληθυσμών (Arlequin 3.11).

Γονιδιακή ροή Nm	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
Παγασητικός 2007						
Παγασητικός 2005	3,76936					
Παγασητικός 2006	4,95290	5,38085				
Τορωναίος 2006	4,05285	7,31992	6,19673			
Τορωναίος 2007	3,34038	7,04726	5,21653	6,80676		
Ευβοϊκός 2005	3,17575	2,27224	3,10869	2,47625	2,39055	

Η ανάλυση μοριακής παραλλακτικότητας (AMOVA) έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του γενετικού πολυμορφισμού οφείλεται σε διαφορές μέσα στους πληθυσμούς

που ανήκουν σε μια περιοχή (85%) και κατόπιν σε διαφορές μεταξύ πληθυσμών (15%) (Πίν. 16, Σχ. 3).

Πίνακας 16: Αποτελέσματα ανάλυσης μοριακής διακύμανσης AMOVA (GenAlEx).

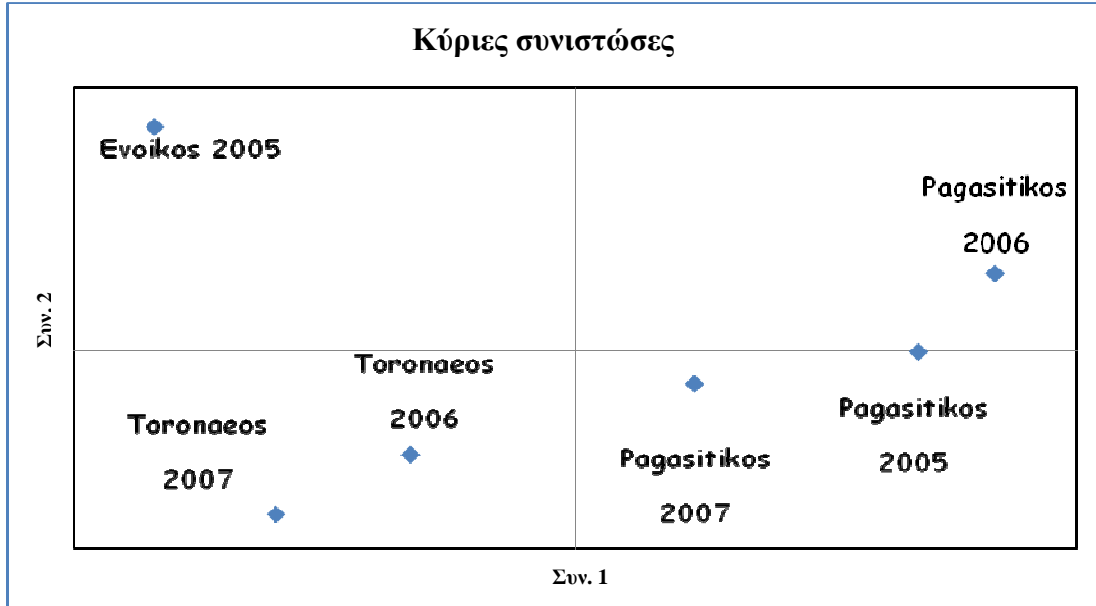
	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνων	Μέσα τετράγωνα	Εκτιμώμενη παραλλακτικότητα	Ποσοστό %
Μεταξύ πληθυσμών	5	307,385	61,477	0,958	15%
Εντός πληθυσμών	413	2279,055	5,518	5,518	85%
Σύνολο	418	2586,439		6,476	100%



Σχήμα 3: Ποσοστά μοριακής παραλλακτικότητας μεταξύ και εντός των 6 φυσικών πληθυσμών.

Στο Σχήμα 4, απεικονίζεται η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) σύμφωνα με το GenAlex. Από την PCA ανάλυση, διαπιστώθηκε η απεικόνιση τριών σημαντικών παραγόντων, στηριζόμενων σε γενετικά δεδομένα (γενετικές αποστάσεις). Πιο

αναλυτικά, η ομαδοποίηση που προκύπτει από την PCA ανάλυση, κατηγοριοποιεί τους πληθυσμούς σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες, οι οποίες εξηγούν το 81.16% της συνολικής παραλλακτικότητας (Σχ. 4, Πίν. 17).



Σχήμα 4: Απεικόνιση των γενετικών αποστάσεων των πληθυσμών με ανάλυση κύριων συνιστωσών.

Πίνακας 17: Ποσοστά διαφοροποίησης των πληθυσμών, σε τρεις άξονες, στηριζόμενα σε γενετικά δεδομένα.

Άξονες	1	2	3
Eigen value	0,150	0,055	0,043
%	49,04	66,98	81,16

Οι δείκτες γενετικής απόστασης (Nei 1972) που υπολογίστηκαν από το λογισμικό GenAlex παρουσιάζονται στον Πίνακα 18. Οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ Παγασητικού 2007 και Ευβοϊκού 2005 ($D=0,452$) και μεταξύ Παγασητικού 2005 και Ευβοϊκού 2005 ($D=0,421$). Η μικρότερη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων του Παγασητικού 2007 και του Παγασητικού 2005 ($D=0,113$) σε σχέση με τη γενετική απόσταση άλλων πληθυσμών.

Πίνακας 18: Γενετική απόσταση πληθυσμών σύμφωνα με το δείκτη D (Nei 1972) (GenAlEx).

	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
Παγασητικός 2007						
Παγασητικός 2005	0,113					
Παγασητικός 2006	0,186	0,185				
Τορωναίος 2006	0,323	0,261	0,187			
Τορωναίος 2007	0,398	0,332	0,258	0,190		
Ευβοϊκός 2005	0,452	0,421	0,317	0,238	0,238	

Οι δείκτες γενετικής απόστασης (Nei, 1972) που υπολογίστηκαν από το λογισμικό TFPGA παρουσιάζονται στον Πίνακα 19. Οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις (Nei, 1972) παρατηρήθηκαν μεταξύ Ευβοϊκού 2005 και Χαλκιδικής 2007 ($D=0,6359$) και μεταξύ Χαλκιδικής 2006 και Ευβοϊκού 2005 ($D=0,5731$). Η μικρότερη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων Χαλκιδικής 2006 και του Παγασητικού 2005 ($D=0,1852$) σε σχέση με τη γενετική απόσταση άλλων πληθυσμών.

Πίνακας 19: Γενετική απόσταση πληθυσμών σύμφωνα με το δείκτη D (Nei 1972) (TFPGA).

	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
Παγασητικός 2007		0,3734	0,3127	0,3586	0,4741	0,4641
Παγασητικός 2005			0,2693	0,1852	0,2066	0,6337
Παγασητικός 2006				0,2499	0,3198	0,5206
Τορωναίος 2006					0,2263	0,5731
Τορωναίος 2007						0,6359
Ευβοϊκός 2005						

Με το λογισμικό TFPGA υπολογίστηκαν επίσης και ο δείκτης γενετικής απόστασης κατά Roger (1972) και ο τροποποιημένος δείκτης του τελευταίου κατά Wright (1978). Οι τιμές για τη γενετική απόσταση των πληθυσμών κατά Roger (Πίν. 20), δε διαφέρουν από αυτές που αναφέρονται κατά Nei. Πιο συγκεκριμένα, οι μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις (Roger, 1972) παρατηρήθηκαν μεταξύ Ευβοϊκού 2005 και Παγασητικού 2005 ($D=0,3556$) και μεταξύ Χαλκιδικής 2006 και Ευβοϊκού 2005 ($D=0,3359$). Η μικρότερη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων Χαλκιδικής 2006 και του Παγασητικού 2005 ($D=0,1793$), σε σχέση με τη γενετική απόσταση άλλων πληθυσμών.

Πίνακας 20: Γενετική απόσταση κατά Roger (1972) (TFPGA).

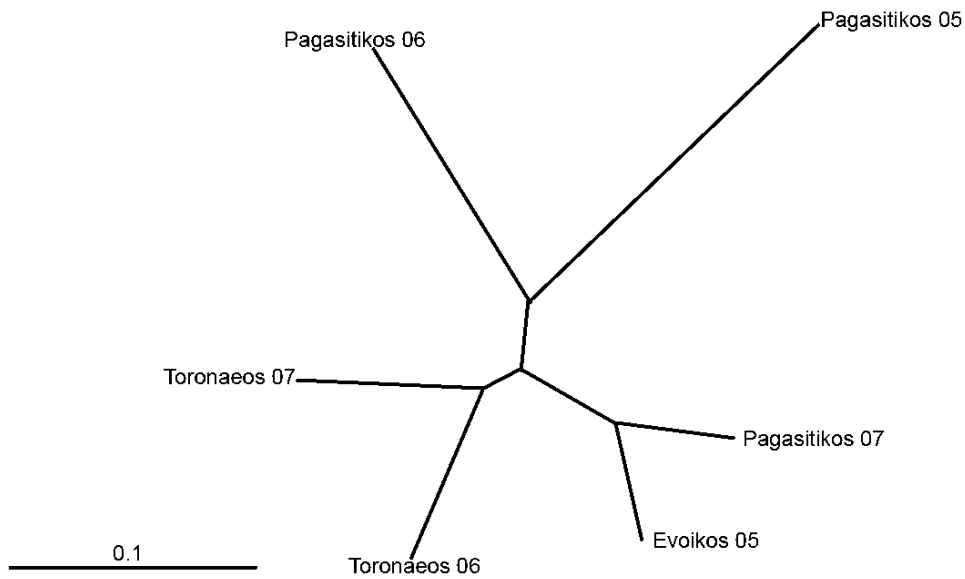
	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
Παγασητικός 2007						
Παγασητικός 2005	0,2636					
Παγασητικός 2006	0,2396	0,2101				
Τορωναίος 2006	0,2633	0,1793	0,2189			
Τορωναίος 2007	0,3080	0,1986	0,2332	0,2198		
Ευβοϊκός 2005	0,2810	0,3556	0,3140	0,3359	0,3519	

Οι δείκτες γενετικής απόστασης κατά Wright που υπολογίστηκαν από το λογισμικό TFPGA παρουσιάζονται στον Πίνακα 21. Σύμφωνα με τη γενετική απόσταση κατά Wright, είναι φανερό ότι μεταξύ του Ευβοϊκού 2005 και της Χαλκιδικής 2007 παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη γενετική απόσταση και μεταξύ του Παγασητικού 2005 και της Χαλκιδικής 2007 παρατηρήθηκε η μικρότερη.

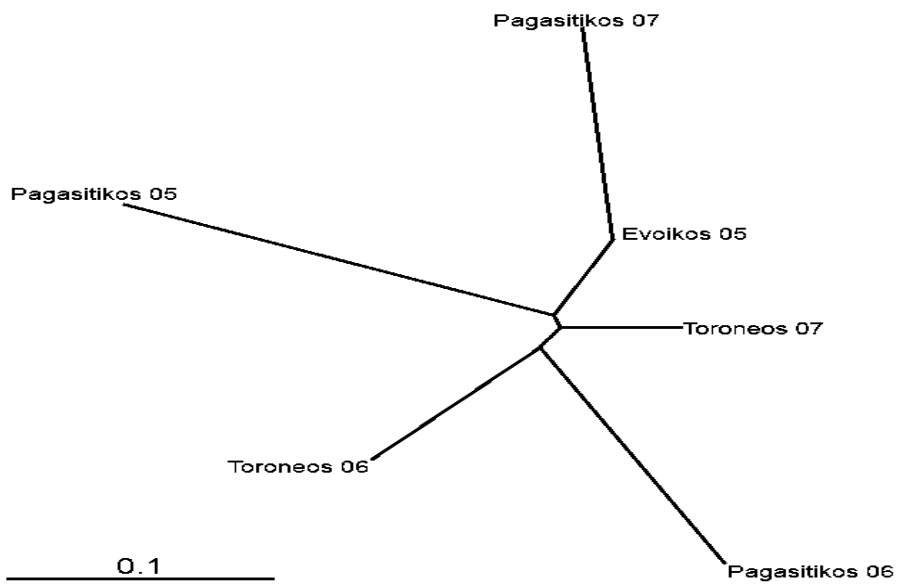
Πίνακας 21: Γενετική απόσταση κατά Wright (1978) (TFPGA).

	Παγασητικός 2007	Παγασητικός 2005	Παγασητικός 2006	Τορωναίος 2006	Τορωναίος 2007	Ευβοϊκός 2005
Παγασητικός 2007						
Παγασητικός 2005	0,3103					
Παγασητικός 2006	0,2748	0,2654				
Τορωναίος 2006	0,3079	0,2352	0,2599			
Τορωναίος 2007	0,3435	0,2465	0,2874	0,2586		
Ευβοϊκός 2005	0,3565	0,4070	0,3664	0,3949	0,4092	

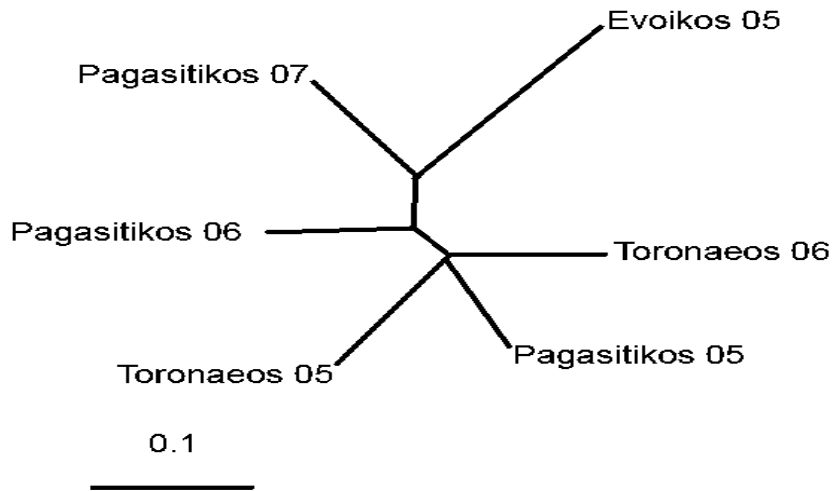
Οι γενετικές αποστάσεις κατά Nei (1972) (Σχ. 5, 6) κατά Roger (1972) (Σχ. 7, 8) και κατά Wright (Σχ. 9, 10) απεικονιζόμενες με τα κλαδογράμματα Neighbor-Joining και UPGMA, φανερώνουν τις εξελικτικές σχέσεις των πληθυσμών. Όλοι οι πληθυσμοί, εκτός του Ευβοϊκού 2005 και του Παγασητικού 2007, τείνουν να ομαδοποιηθούν στην ίδια συστοιχία περιοχών, ενώ οι δύο αυτοί πληθυσμοί είναι ταξινομημένοι σε γειτονική συστοιχία.



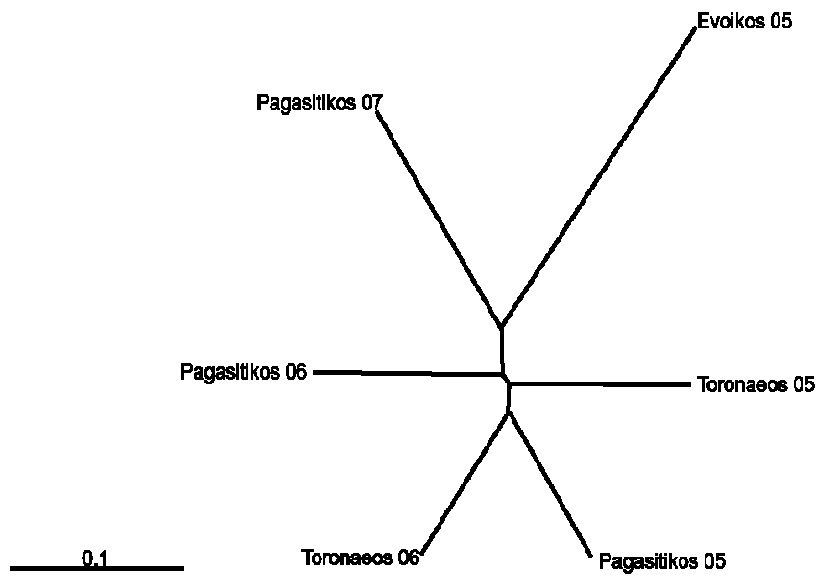
Σχήμα 5: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης (Nei, 1972) με τον αλγόριθμο Neighbour joining (TFPGA).



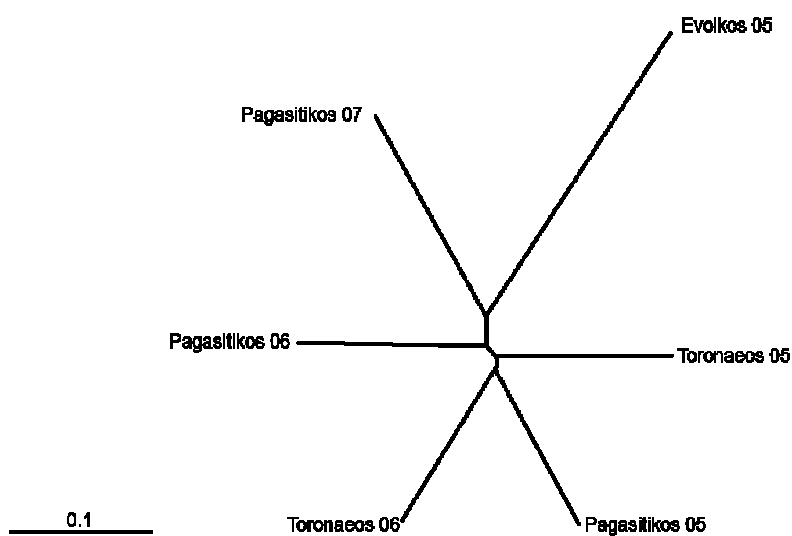
Σχήμα 6: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης (Nei, 1972) με τον αλγόριθμο UPGMA (TFPGA).



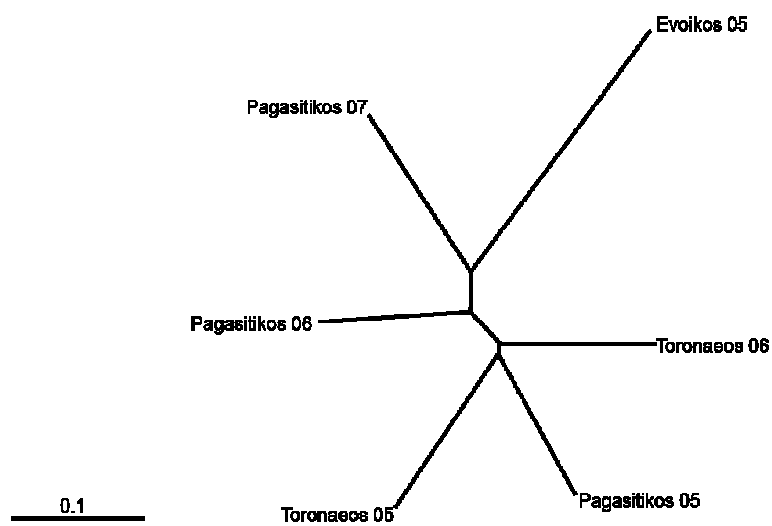
Σχήμα 7: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη (Roger, 1972) με τον αλγόριθμο Neighbour joining (TFPGA).



Σχήμα 8: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη (Roger, 1972) με τον αλγόριθμο UPGMA (TFPGA).

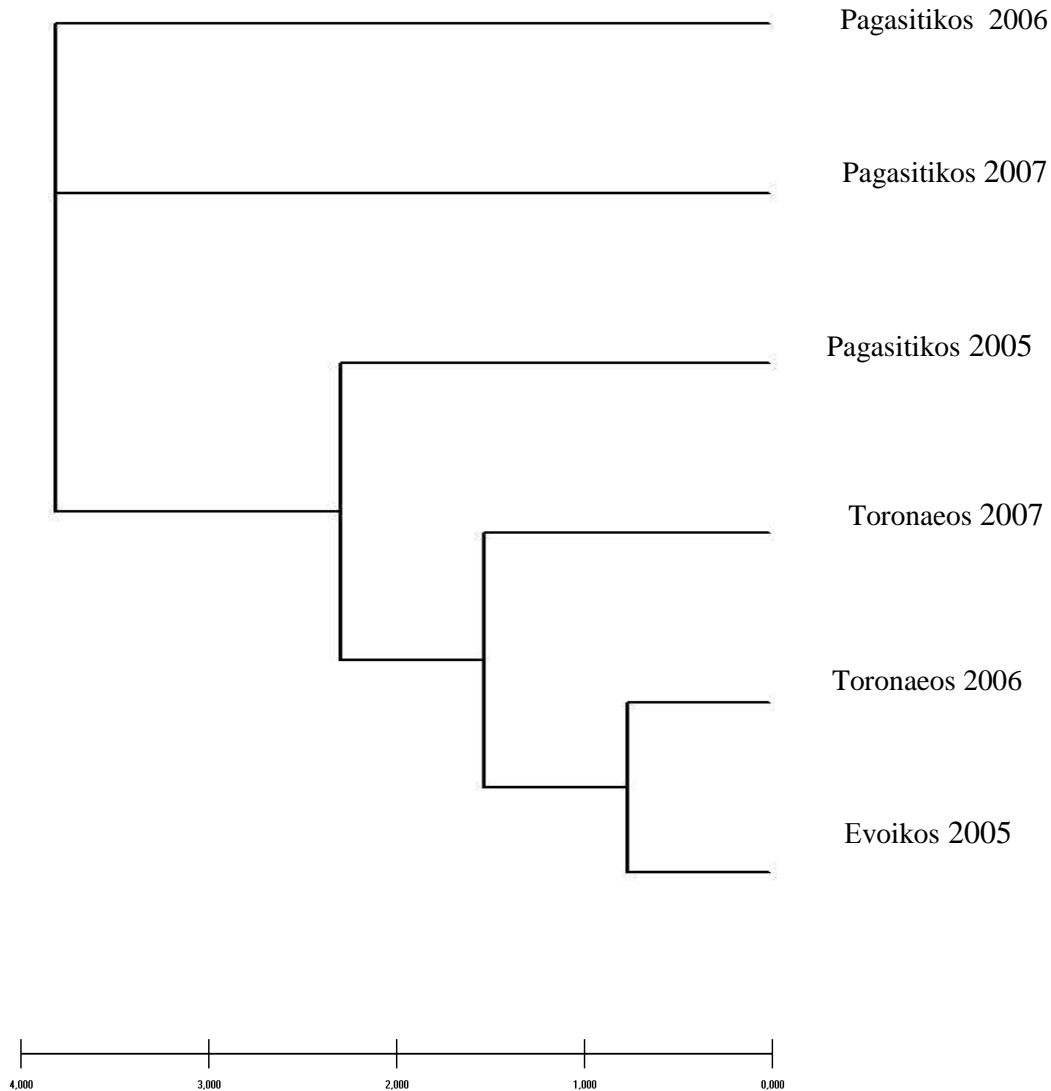


Σχήμα 9: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη (Wright, 1978) με τον αλγόριθμο Neighbour joining (TFPGA).



Σχήμα 10: Κλαδόγραμμα γενετικής απόστασης του δείκτη (Wright, 1978) με τον αλγόριθμο UPGMA (TFPGA).

Το δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των πληθυσμών με βάση τη γενετική απόσταση με τον αλγόριθμο Neighbour joining φαίνονται στο Σχήμα 11.



Σχήμα 11: Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης των πληθυσμών με βάση τη γενετική απόσταση με τον αλγόριθμο Neighbour joining (phylip 3.67).

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με το Mantel test (Arlequin), δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ των γενετικών αποστάσεων και των γεωγραφικών περιοχών στις οποίες διαβιούν οι πληθυσμοί ($r = 0.089$ και $P = 0.010$) (Mantel, 1967).

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τις βασικότερες παραμέτρους για τη σωστή διαχείριση των αλιευτικών πόρων είναι ο προσδιορισμός των αποθεμάτων των εμπορικά σημαντικών ειδών καθώς και η γνώση της γενετικής τους δομής. Η караβίδα, *N. norvegicus* (L.), αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη αλιείας, δικαιολογώντας έτσι το πρόσφατο ενδιαφέρον ως νέο υποψήφιο είδος για εκτροφή. Επομένως, πληροφορίες για τη γενετική πληθυσμιακή δομή της είναι απαραίτητες για τη βιώσιμη εκμετάλλευση και τη σωστή διαχείριση του αποθέματός της.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παλαιότερες γενετικές μελέτες της πληθυσμιακής δομής του μελετηθέντος είδους έχουν πραγματοποιηθεί με διάφορους μοριακούς δείκτες και σε διάφορες περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στην ανάλυση των γενετικών δεδομένων, το συγκεκριμένο είδος έχει αναλυθεί με μιτοχονδριακό DNA σε πληθυσμούς του βορειοανατολικού Ατλαντικού και της Μεσογείου (Stamatis *et al.*, 2004). Επίσης, ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα μελέτης του συγκεκριμένου είδους είναι και η εργασία των Passamonti *et al.* (1997), οι οποίοι μελέτησαν τον πολυμορφισμό μέσω της τεχνικής των αλλοενζύμων από πληθυσμούς του Αιγαίου και της Σκωτίας. Στην πιο εκτεταμένη γενετική μελέτη των πληθυσμών του είδους αυτού μέχρι σήμερα, οι Maltagliati *et al.* (1998) μελέτησαν τον πολυμορφισμό με τη χρήση αλλοενζύμων, σε πληθυσμούς της δυτικής Μεσογείου και ενός πληθυσμού του Ατλαντικού. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε από τους Triantafyllidis *et al.* (2005) μια προσπάθεια εκτίμησης της γενετικής ποικιλότητας του αστακού, *Homarus gammarus*, σε όλη τη γεωγραφική κατανομή του (από τη Νορβηγία έως την Ελλάδα), με τη χρήση της τεχνικής του μιτοχονδριακού DNA.

Παρ' όλα αυτά, ελάχιστες δημοσιεύσεις υπάρχουν για την πληθυσμιακή δομή της караβίδας στον Ελλαδικό χώρο και ιδιαίτερα στον Παγασητικό κόλπο. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία, σε πρώτη φάση επιχειρήθηκε να αξιολογηθεί το γενετικό απόθεμα της караβίδας στον Παγασητικό κόλπο μέσω της τεχνικής των μικροδορυφόρων. Μερικές μόνο αναφορές είναι διαθέσιμες σχετικά με την ανάπτυξη και το χαρακτηρισμό των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων του συγκεκριμένου είδους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εργασία των Streiff *et al.* (2001), η οποία ήταν μια έρευνα για τον εντοπισμό μικροδορυφορικών τόπων, αναλύοντας δύο πληθυσμούς της Πορτογαλικής ακτής. Παρ' όλα αυτά, από τις 8 μικροδορυφορικές αλληλουχίες που εξετάστηκαν (Streiff *et al.*, 2001; Hodgins–Davis *et al.*, 2007), οι 6 από αυτές εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα της. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι γενετικοί τόποι που εξετάστηκαν έχουν σχεδιαστεί για την караβίδα *N. norvegicus* και για το *Homarus americanus*.

Οι προαναφερθέντες έξι γενετικοί τόποι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, είναι ιδιαίτερα πολυμορφικοί (7–33 αλληλόμορφα) και μπορούν να χαρακτηριστούν ως γενετικοί δείκτες για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών της караβίδας. Γενικά, στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι ο πληθυσμός του Παγασητικού 2007 έχει τα περισσότερα αλληλόμορφα σε σχέση με τους άλλους πληθυσμούς σε όλους τους τόπους (εκτός από τον CN949888), γεγονός που μπορεί να δικαιολογηθεί εξαιτίας του κατά πολύ μεγαλύτερου μεγέθους του δειματοληπτικά.

Επιπλέον, στην παρούσα έρευνα, η ανάλυση των αλληλομορφικών συχνοτήτων αποκάλυψε υψηλά επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού. Πιο αναλυτικά, η ανάλυση του κριτηρίου χ^2 των συχνοτήτων των αλληλομόρφων έδειξε στατιστικά σημαντικές

διαφορές μόνο για τον πληθυσμό του Παγασητικού σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, υποδηλώνοντας τον μεγάλο βαθμό γενετικής ποικιλομορφίας του είδους εκεί. Η παρουσία αρκετά υψηλού πολυμορφισμού και γενετικής ποικιλομορφίας, ίσως να οφείλεται στην τεχνική της μικροδορυφορικής αλληλουχίας που χαρακτηρίζεται από υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού και την ικανότητα της να ανιχνεύει γενετική παραλλακτικότητα σε υποπληθυσμούς (Zouros, 1994). Αντίθετα, στην εργασία των Maltagliati *et al.* (1998), δεν ανιχνεύθηκε καμία σαφής αλλαγή στις αλληλομορφικές συχνότητες. Κατά συνέπεια, η γενετική παραλλακτικότητα φάνηκε να διανέμεται τυχαία μεταξύ των πληθυσμών και οι προαναφερθέντες πληθυσμοί φάνηκε να ακολουθούν «το μοντέλο των νησιών» (island model).

Επιπρόσθετα, στην παρούσα έρευνα ανιχνεύθηκαν ιδιαίτερα σημαντικές αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg, που υποδηλώνουν ότι οι πληθυσμοί της караβίδας παρουσίασαν σημαντικό έλλειμμα ετεροζυγωτίας ($F_{IS}=0,204$). Οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές της παρέκκλισης αυτής από το νόμο Hardy-Weinberg, φανερώνουν ότι το είδος δεν έχει φτάσει ακόμη σε γενετική ισορροπία. Συνεπώς, δε φαίνεται να υπάρχει ισορροπία μεταξύ των εξελικτικών δυνάμεων. Αυτό το φαινόμενο έχει αναφερθεί επίσης και για άλλα καρκινοειδή. Μελετώντας τη γαρίδα, *Penaeus monodon*, οι Supungul *et al.* (2000), αποκάλυψαν σημαντικές αποκλίσεις από το νόμο Hardy-Weinberg σχεδόν σε όλα τα δείγματα λόγω του ελλείμματος ετεροζυγωτίας. Ακόμη, κάτι παρόμοιο διαπιστώθηκε και για τη γαρίδα *Litopenaeus setiferus* (Ball and Charman, 2003). Οι αποκλίσεις από το νόμο HW που παρατηρήθηκαν στους πληθυσμούς της караβίδας οφείλονται σε διάφορους λόγους, όπως είναι για παράδειγμα η επίδραση της γενετικής παρέκκλισης, η διασταύρωση πληθυσμών με διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων γονιδίων (Wahlund effect)

καθώς και το ζευγάρωμα μεταξύ στενά συγγενικών ειδών (inbreeding). Η απόκλιση αυτή θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται και στη φυσική επιλογή. Η γενετική παρέκκλιση προκαλεί αλλαγές στις γονιδιακές συχνότητες λόγω δειγματοληπτικών ποικιλομορφιών από γενεά σε γενεά. Πρόκειται δηλαδή για δειγματοληπτικά σφάλματα που έχουν τη μέγιστη επίδρασή τους στους μικρούς πληθυσμούς. Ο Mayr (1954) χρησιμοποίησε τον όρο «αρχή του ιδρυτή» (founder effect), για να περιγράψει την αρχική αλλαγή στις συχνότητες των αλληλομόρφων λόγω γενετικής παρέκκλισης. Υποστήριξε ότι, ναι μεν η γενετική αλλαγή σε έναν πληθυσμό είναι μια βραδεία διαδικασία, όμως η εξέλιξη νεοϊδρυθεισών αποικιών μπορεί να είναι τόσο γρήγορη, που να επιφέρει αλλαγές τέτοιου μεγέθους έτσι ώστε να σηματοδοτήσουν μέχρι και τη δημιουργία νέων ειδών (ειδογένεση). Η έλλειψη ετεροζυγωτίας που παρατηρείται σε σχέση με την ισορροπία Hardy-Weinberg, οφείλεται στο ότι οι εξεταζόμενοι πληθυσμοί αποτελούνται από σχετικά απομονωμένους αναπαραγωγικά υποπληθυσμούς (Allendorf and Luikart, 2007). Τέλος, έχει γίνει προσπάθεια ερμηνείας αποκλίσεων από την ισορροπία HW σαν αποτέλεσμα φυσικής επιλογής, η οποία είναι ένας από τους διάφορους μηχανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν γενετικές αλλαγές στους φυσικούς πληθυσμούς και μπορεί να αλλάξει την ετεροζυγωτία στην επόμενη γενιά.

Τα F -statistics αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την αποκάλυψη πληθυσμιακών δομών και μέσα εκτίμησης του γενετικού πολυμορφισμού. Τα F -statistics, στην παρούσα εργασία, εμφάνισαν υψηλές τιμές γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν. Η ιδιαίτερα υψηλή μέση τιμή του δείκτη F_{ST} που υπολογίστηκε για το σύνολο των δεδομένων, κατέδειξε σημαντική γενετική διαφοροποίηση σε επίπεδο πληθυσμών χωροταξικά και όχι χρονολογικά.

Η παρουσία ισχυρής γενετικής δομής του είδους, πιθανώς λόγω της ύπαρξης υποπληθυσμών (substructuring), επιβεβαιώθηκε από την υψηλή μέση τιμή του δείκτη διαφοροποίησης των αλληλομορφικών συχνοτήτων ανάμεσα στους πληθυσμούς ($R_{ST} = 0,148$). Αξίζει να αναφερθεί ότι η τιμή του δείκτη R_{ST} προτιμάται να χρησιμοποιείται από την αντίστοιχη τιμή του δείκτη F_{ST} , παρόλο που και οι δύο είναι ίδιοι δείκτες παραλλακτικότητας και μπορούν να προσαρμοστούν σε απαιτήσεις μικροδορυφορικών τόπων (Slatkin, 1995). Επιπρόσθετα, η παρουσία υποπληθυσμών στους υπό μελέτη πληθυσμούς του συγκεκριμένου είδους διαπιστώθηκε και από τους Maltagliati *et al.* (1998), από την μέση τιμή του δείκτη παραλλακτικότητας ($F_{ST} = 0,122$). Στην εργασία των Triantafyllidis *et al.* (2005), διαπιστώθηκε σημαντική ετερογένεια μεταξύ των δειγμάτων των υπό εξέταση πληθυσμών ($F_{ST} = 0,078$). Όλες οι προσεγγίσεις στη μελέτη της πληθυσμιακής δομής του αστακού *H. gammarus* συμφωνούν στο γεγονός ότι ο πληθυσμός δε μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ενιαίο πανμικτικό απόθεμα. Σε αντίθετα αποτελέσματα κατέληξαν οι Stamatis *et al.* (2004) όπου η κύρια διαπίστωση της εργασίας τους ήταν οι χαμηλές τιμές γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των πληθυσμών που μελετήθηκαν ($F_{ST} = 0,018$, $P < 0,001$). Αυτό ίσως να εξηγείται από την περιορισμένη διασπορά των ενήλικων ατόμων του είδους. Το επίπεδο γενετικής παραλλακτικότητας που υπολογίστηκε για τα δείγματα της караβίδας, στην μελέτη των Passamonti *et al.* (1997) ήταν αρκετά χαμηλό. Η μέση τιμή του δείκτη F_{ST} (0,016) ήταν σύμφωνη με εκείνες για άλλα θαλάσσια είδη (Buonaccorsi *et al.*, 2001). Σύμφωνα με τους Borsa *et al.* (1997), έχουν αναφερθεί τιμές του δείκτη F_{ST} σε εύρος από 0,02 έως 0,50 για μια σύγκριση πληθυσμών από ψάρια του Ατλαντικού και της Μεσογείου. Επιπρόσθετα, ένα ακόμη παράδειγμα υψηλού δείκτη παραλλακτικότητας βρέθηκε από τους Valles-Jimenez *et al.* (2004), οι οποίοι κάνοντας χρήση των μικροδορυφόρων

διαπίστωσαν ότι ο πληθυσμός των «λευκών» γαρίδων (*Litorpenaeus vannamei*) είναι δομημένος σε υποσύνολα πληθυσμού ($F_{ST}=0,055$). Οι μελέτες σχετικά με τα θαλάσσια ασπόνδυλα είναι λιγότερες. Παρ' όλα αυτά υψηλή διαφοροποίηση έχει βρεθεί επίσης και για τα στρείδια (*Ostrea edulis*), (Launey *et al.*, 2001), τα μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), (Quesada *et al.*, 1998) και για καρκινοειδή όπως στην караβίδα *Meganyctiphanes norvegica* (Zane *et al.*, 2000) και στο κινεζικό καβούρι *Eriocheir sinensis* (Sui *et al.*, 2009) ($F_{ST}=0,021$).

Για την ποσοτικοποίηση του βαθμού γενετικής παραλλακτικότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς της караβίδας πραγματοποιήθηκε η AMOVA. Η AMOVA, που αναπτύχθηκε από τον Excoffier (1992) είναι μια μεθοδολογία ανάλυσης της ποικιλομορφίας, η οποία χρησιμοποιεί μοριακά δεδομένα από την ανάλυση του DNA, με μοριακούς δείκτες. Τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι το ποσοστό της μοριακής παραλλακτικότητας εντός των πληθυσμών είναι υψηλότερο (85%) από αυτό μεταξύ των πληθυσμών (15%). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης AMOVA εξηγούν τη σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων ενδοπληθυσμιακά, γεγονός που δεν ήταν αναμενόμενο. Παρόμοια αποτελέσματα ενδοπληθυσμιακής παραλλακτικότητας βρέθηκαν και στην εργασία των Stamatis *et al.* (2004) και των Maltagliati *et al.* (1998). Επίσης σύμφωνα με την ανάλυση κύριων παραγόντων διαπιστώνεται η ομαδοποίηση των πληθυσμών χωροταξικά σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες (PCA), σύμφωνα με τις γενετικές αποστάσεις: Παγασητικός (2005, 2006, 2007), Τορωναίος (2006, 2007) και Ευβοϊκός Κόλπος (2005). Με άλλα λόγια, εμφανίστηκε γεωγραφική ετερογένεια μεταξύ των προαναφερθέντων πληθυσμών και όχι χρονολογική. Λαμβάνοντας υπόψη την ομοιότητα μεταξύ των χρονικών δειγμάτων

από κάθε πληθυσμό, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι αυτοί οι πληθυσμοί φαίνονται να είναι μάλλον σταθεροί.

Η γονιδιακή ροή ορίζεται ως η κίνηση των γονιδίων ενδο- και δια- πληθυσμιακά, η οποία στην πραγματικότητα αποτελεί το ρυθμό μετανάστευσης. Η караβίδα, *N. norvegicus*, είναι ένα καρκινοειδές όπου η διασπορά των πελαγικών λαρβών της σε ανήλικο στάδιο είναι συνηθισμένη, ενώ η διασπορά των ενηλίκων της είναι περιορισμένη. Η γονιδιακή ροή θα μπορούσε να προωθηθεί μόνο από τη λαρβική παθητική μετακίνηση, η οποία καθορίζεται από διάφορους υδρολογικούς και ωκεανογραφικούς παράγοντες που επικρατούν στις θαλάσσιες περιοχές. Παρά τις δυσκολίες αυτές, στην παρούσα εργασία, τα στοιχεία μας δεν παρέχουν αποτελέσματα περιορισμένης διασποράς των ενηλίκων ατόμων της. Συνεπώς, το συγκεκριμένο είδος χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό γονιδιακής ροής, γεγονός που καταδεικνύει υψηλά επίπεδα μετανάστευσης, καθώς και γενετική ομοιογένεια μεταξύ τους. Η προκύπτουσα υψηλή τιμή της γονιδιακής ροής που υπονοεί την πιθανή παρουσία πανμιξίας για αυτούς τους πληθυσμούς, πιθανό να μπορεί να εξηγηθεί εάν ληφθεί υπόψη η διαφορετικής έντασης, εξελικτική δύναμη της φυσικής επιλογής. Ίσως, μια ακόμη πιθανή εξήγηση να είναι και ο συνδυασμός φυσικών, ωκεανογραφικών και βιολογικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα οι δυσχερείς περιβαλλοντικές συνθήκες, οι άνεμοι, τα ρεύματα και τα ωκεανογραφικά μέτωπα, τα οποία ενισχύουν την εξάπλωση των πελαγικών μορφών του θαλάσσιου αυτού οργανισμού (Lessios *et al.*, 2001). Αυτό είναι ένα κοινό και πολύ συζητημένο μοτίβο και για τους θαλάσσιους οργανισμούς των εσωτερικών υδάτων και ειδικά εκείνων των οργανισμών που διαβιούν σε μέρη που έχουν περάσει από επαναλαμβανόμενες περιόδους παγετώνων (Avisé *et al.*, 1998). Είναι γεγονός πως χαμηλή τιμή της γονιδιακής ροής ισοδυναμεί με υψηλή τιμή του

δείκτη F_{ST} . Συνεπώς, στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι υψηλές τιμές της γονιδιακής ροής, έρχονται σε αντίθεση με τις υψηλές τιμές του δείκτη παραλλακτικότητας F_{ST} . Η γονιδιακή ροή που βρέθηκε για τις караβίδες στην παρούσα εργασία ($Nm=1,44$), έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εργασίας των Maltagliati *et al.* (1998), όπου βρέθηκε γονιδιακή ροή περίπου ίση με 1,80 μεταξύ πληθυσμών της караβίδας. Ακόμη, στην εργασία του Tzeng (2007) για τη γαρίδα *Parapenaeopsis hardwickii*, η γονιδιακή ροή βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη από τα παραπάνω αποτελέσματα ($Nm=8,4$). Σε αντίθετα συμπεράσματα κατέληξαν οι Xu *et al.* (2009) όσον αφορά στη μελέτη της γενετικής πληθυσμιακής δομής του καβουριού (*Portunus trituberculatus*) στη θάλασσα της ανατολικής Κίνας, βασισμένη στην τεχνική του μιτοχονδριακού DNA. Υπολογισμοί της γονιδιακής ροής, υποστήριζαν την υπόθεση ότι τα δείγματα από τη θάλασσα της ανατολικής Κίνας ήταν γενετικά μη ομογενοποιημένα, δείχνοντας έτσι ότι η γονιδιακή ροή είναι περιορισμένη σε εκείνες τις περιοχές, παρά την υψηλή διασπορά των ενήλικων ατόμων τους.

Οι γενετικές αποστάσεις κατά Nei (1972), κατά Roger (1972) και κατά Wright (1978) απεικονιζόμενες με τα κλαδογράμματα UPGMA και Neighbor-Joining, φανερώνουν ότι η κατανομή της γενετικής ποικιλομορφίας εντός και μεταξύ των πληθυσμών της караβίδας, ακολουθεί ένα απροσδόκητο σύνθετο πρότυπο. Το πρότυπο αυτό των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών παρουσιάζει μερικά γεωγραφικά στοιχεία, που μόνο εν μέρει απεικονίζουν τη χωρική διαμόρφωση των πληθυσμών. Με άλλα λόγια δηλαδή, σύμφωνα με τα κλαδογράμματα αυτά, που επεξηγούν τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών, η συσχέτιση μεταξύ της γενετικής και γεωγραφικής απόστασης εξηγεί μόνο ένα μικρό μέρος της γενετικής ποικιλομορφίας. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και στην εργασία των Maltagliati

et al. (1998) και των Stamatis *et al.* (2004) οι οποίοι χρησιμοποιώντας UPGMA δένδρογράμματα, απέτυχαν να αποκαλύψουν ένα σαφές γεωγραφικό μοτίβο της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών που ερεύνησαν.

Ο κυριότερος στόχος της εργασίας ήταν να χρησιμοποιηθεί η τεχνική των μικροδορυφόρων, για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν διακριτοί πληθυσμοί μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα της χωρικής και χρονικής έρευνας επιβεβαιώνουν μερικώς την ύπαρξη γενετικά ευδιάκριτων αποθεμάτων καραβίδων σε μια αρκετά μεγάλη γεωγραφική κλίμακα στο Αιγαίο Πέλαγος, αλλά με υψηλή γονιδιακή ροή μεταξύ τους. Ο λόγος της σημασίας που έχει ο εντοπισμός διακριτών πληθυσμών έγκειται στο γεγονός ότι σε αυτήν την περίπτωση είναι δυνατή η πιο αποτελεσματική διαχείρισή του. Κάτι παρόμοιο μελετήθηκε από τους Jorstad *et al.* (2004), οι οποίοι χρησιμοποίησαν με επιτυχία τις μεθόδους των μικροδορυφόρων, των αλλοενζύμων και του μιτοχονδριακού DNA, για τη μελέτη των υποαρκτικών πληθυσμών του *Homarus gammarus*, στη βόρεια Νορβηγία. Τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας εργασίας επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ενός γενετικά ευδιάκριτου αποθέματος, αν και η εκτεταμένη δειγματοληψία αποκάλυψε την ύπαρξη περισσότερων επιπέδων της γενετικής δομής στην περιοχή. Διαπιστώθηκε στους δύο αυτούς υποαρκτικούς πληθυσμούς, ένα πρότυπο διαφοροποίησης πληθυσμών, σχετικά κοντινών γεωγραφικών αποστάσεων, σε θαλάσσιο είδος με χαμηλή διασπορά των ανηλίκων της. Το πιο εντυπωσιακό όμως παράδειγμα είναι αυτό από το Isle of Man στην Ιρλανδική θάλασσα, όπου μελετήθηκαν δύο διαφορετικά είδη καβουριού (Weber *et al.*, 2000). Και τα δύο είδη έχουν μια σχετικά μεγάλη λαρβική περίοδο (40–80 ημέρες). Χρησιμοποιώντας την τεχνική των αλλοενζύμων, οι πραγματοποιηθείσες αναλύσεις σε δείγματα που συλλέχθηκαν από περιοχές που είχαν απόσταση μόνο 40

χιλιομέτρων, αποκάλυψαν σημαντικές γενετικές διαφορές σε διάφορους γενετικούς τύπους και για τα δύο είδη.

Συνοψίζοντας, από τη συγκεκριμένη εργασία, έχουν εξαχθεί χρήσιμα συμπεράσματα για την αξιολόγηση της δομής των φυσικών αποθεμάτων της караβίδας. Μελλοντικές αποφάσεις σχετικά με την προστασία των αποθεμάτων της, καθώς και μετακινήσεις των ατόμων για πιθανό εμπλουτισμό, πρέπει, να λάβουν υπόψη τα υψηλά και σημαντικά επίπεδα διαφοροποίησης που βρέθηκαν στην έρευνα αυτή. Από αυτήν την χωρική και χρονολογική μελέτη που επικεντρώθηκε στο Αιγαίο Πέλαγος, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι χρειάζεται να αξιολογηθούν νέες διαφορετικές στρατηγικές για τη μελλοντική ανάπτυξη, λογίζοντας την караβίδα ως ένα τοπικό απόθεμα συνολικά στο Αιγαίο Πέλαγος. Ένα νέο μοντέλο διαχείρισης, όπως είναι για παράδειγμα μια ενδεχόμενη απαγόρευση στην αλιεία του είδους τοπικά ίσως και σε συγκεκριμένες εποχές, πιθανό να υποβοηθήσει την αναπαραγωγή του. Ως μελλοντική κατεύθυνση κρίνεται απαραίτητη περισσότερη έρευνα για το είδος της караβίδας ή μέσω της επεξεργασίας των υπάρχοντων δειγμάτων και με άλλους μοριακούς δείκτες ή/και μέσω συμπλήρωσης των δειγμάτων για μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της γενετικής δομής του είδους.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- **Abello, P. and Sarda F. (1982).** The Fecundity of the Norway Lobster (*Nephrops-Norvegicus* (L)) Off the Catalan and Portuguese Coasts. *Crustaceana*, 43:13-20.
- **Allendorf, F.W. and Luikart G. (2007).** Conservation and the genetics of populations. Blackwell Pub, Malden, MA.
- **Avise, J.C., Walker D. and Johns G.C. (1998).** Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 265:1707-1712.
- **Ball, A.O. and Chapman R.W. (2003).** Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. *Molecular Ecology*, 12:2319-2330.
- **Borsa, P., Blanquer A. and Berrebi P. (1997).** Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P-stellatus* at different geographic scales. *Marine Biology*, 129:233-246.
- **Brookfield, J.F.Y. (1996).** A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5:453-455.
- **Buonaccorsi, V.P., Starkey E. and Graves J.E. (2001).** Mitochondrial and nuclear DNA analysis of population subdivision among young-of-the-year Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*) from the western Atlantic and Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 138:37-45.

- **Duguay, S. J., Park L. K., Samadpour M. and Dickhoff W.W. (1992).** Nucleotide-Sequence and Tissue Distribution of 3 Insulin-Like Growth Factor-I Prohormones in Salmon. *Molecular Endocrinology*, 6:1202-1210.
- **Excoffier, L., Smouse P.E. and Quattro J. M. (1992).** Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among Dna Haplotypes - Application to Human Mitochondrial-Dna Restriction Data. *Genetics*, 131:479-491.
- **Excoffier, L., Laval G. and Schneider S. (2005).** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50
- **Farmer (1975).** Synopsis of biological data on the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). 112:1-97. *FAO Fisheries Synopses* .
- **Felsenstein, J. (1993).** PHYLIP: Phlogeny Inference Package. Seattle: University of Washington.
- **Fisher, W., Schneider M. and Bauchot M.L. (1987a).** Fishes FAO d'identification des especes pour les besoins de la peche. 1-2:760. Rome, Fao.
- **Fisher, W., Schneider M. and Bauchot M.L. (1987b).** Fishes FAO d'identification des especes pour les besoins de la peche. 1-2:760. Rome, Fao.
- **Froglia, C. and Gramitto M.E, (1981).** Summary of biological parameters on the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.), in the Adriatic. 253:165-178. *FAO Fish. Rep.*
- **Froglia, C. and Gramitto M.E. (1988).** An estimate of growth and mortality parameters for Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) in the Central Adriatic Sea. 394:189-203. *FAO Fish. Rep.*

- **Futuyma, J.D. (1986).** Evolutionary biology. Sinauer associates INC, Second edition.
- **Goudet, J. (1995).** Fstat version 1.2: A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86:485-486.
- **Gramitto, M. E. (1998).** Molt pattern identification through gastrolith examination on *Nephrops norvegicus* (L.) in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 62:17-23.
- **Hodgins-Davis, A., Roberts S., Cowan D.F., Atema J., Bennie M., Avolio C., Defaveri J. and Gerlach G. (2007).** Characterization of SSRs from the American lobster, *Homarus americanus*. *Molecular Ecology Notes*, 7:330-332.
- **Jorstad, K.E., Prodohl P.A., Agnalt A.L., Hughes M., Apostolidis A.P., Triantafyllidis A., Farestveit E., Kristiansen T.S., Mercer J. and Svasand T. (2004).** Sub-arctic populations of European lobster, *Homarus gammarus*, in northern Norway. *Environmental Biology of Fishes*, 69:223-231.
- **Karlovac, O. (1953).** An ecological study of *Nephrops norvegicus* (L) of the high Adriatic. *Izv.rep.Rib.biol.Eksp."Hvar"*, 5:1-50.
- **Launey, S., Barre M., Gerard A. and Naciri-Graven Y. (2001).** Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genetical Research*, 78:259-270.
- **Lessios, H.A., Kessing B.D. and Pearse J.S. (2001).** Population structure and speciation in tropical seas: Global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolution*, 55:955-975.
- **Liu, Z.J. and Cordes J.F. (2004).** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238:1-37.

- **Maltagliati, F., Camilli L., Biagi F. and Abbiati M. (1998).** Genetic structure of Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.) (Crustacea : Nephropidae), from the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 62:91-99.
- **Mantel, N. (1967).** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- **Mayr, E. (1954).** Change of genetic environment and evolution, pp. 157–180 in *Evolution as a Process*, edited by J. HUXLEY, A. C. HARDY and E. B. FORD. Allen & Unwin, London.
- **Meyers, T. R., Sullivan J., Emmenegger E., Follett J., Short S., Batts W. N. and Winton J.R. (1992).** Identification of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Isolated from Pacific Cod *Gadus-Macrocephalus* in Prince-William-Sound, Alaska, Usa. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12:167-175.
- **Miller, M.P. (1997).** Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Distributed by the author.
- **Mytilineou, C., Papaconstantinou C. and Fourtouni A. (1990).** Some aspects of the biology of Norway lobster *Nephrops norvegicus* in the N. Euboikos Gulf (Greece). *Rassports et Proces Verbaux des Reunions du Conseil international pour l'Exploration de la Mer Mediterranee*, 32:34.
- **Nei, M. (1972).** Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-292.
- **Park, L. K. and Moran P. (1994).** Developments in Molecular-Genetic Techniques in Fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4:272-299.

- **Passamonti, M., Mantovani B., Scali V. and Froggia C. (1997).** Allozymic characterization of Scottish and Aegean populations of *Nephrops norvegicus*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 77:727-735.
- **Petihakis, G., Triantafyllou G. and Theodorou A. (2000).** A numerical approach to simulate nutrient dynamics and primary production of a semi-enclosed coastal ecosystem (Pagassitikos Gulf, Western Aegean, Greece). Periodicum Biologorum, 102:339-348.
- **Quesada, H., Gallagher C., Skibinski D.A.G. and Skibinski D.O.F. (1998).** Patterns of polymorphism and gene flow of gender-associated mitochondrial DNA lineages in European mussel populations. Molecular Ecology, 7:1041-1051.
- **Relini, L.O., Zamboni A., Fiorentino F. and Massi D. (1998).** Reproductive patterns in Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L.), (Crustacea Decapoda Nephropidae) of different Mediterranean areas. Scientia Marina, 62:25-41.
- **Rogers, J.S. (1972).** Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in Genetics III (pp. 145-153). Texas: University of Texas.
- **Rosa, R., Morais S., Calado R., Narciso L. and Nunes M.L. (2003).** Biochemical changes during the embryonic development of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. Aquaculture, 221:507-522.
- **Saitou, N. and Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology. Evolution, 4:406-425.

- **Sherwin, W.B., Jobot F., Rush R. and Rossetto M. (2006).** Measurement of biological information with applications from genes to landscapes. *Molecular Ecology*, 15:2857-2869.
- **Slatkin, M. (1995).** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies, *Genetics*, 139(1):457-462.
- **Sokal, R.R. and Michener C.D. (1958).** A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin* 28:1409-1438.
- **Stamatis, C., Triantafyllidis A., Moutou K.A. and Mamuris Z. (2004).** Mitochondrial DNA variation in northeast atlantic and mediterranean populations of Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. *Molecular Ecology*, 13:1377-1390.
- **Streiff, R., Guillemaud T., Alberto F., Magalhaes J., Castro M. and Cancela M. L. (2001).** Isolation and characterization of microsatellite loci in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Molecular Ecology Notes*, 1:71-72.
- **Sui, L.Y., Zhang F.M., Wang X.M., Bossier P., Sorgeloos P. and Hanfling B. (2009).** Genetic diversity and population structure of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, in its native range. *Marine Biology*, 156:1573-1583.
- **Supungul, P., Sootanan P., Klinbunga S., Kamonrat W., Jarayabhand P., and Tassanakajon A. (2000).** Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Marine Biotechnology*, 2:339-347.
- **Triantafyllidis, A., Apostolidis A.P., Katsares V., Kelly E., Mercer J., Hughes M., Jorstad K., Tsolou A., Hynes R. and Triantaphyllidis C. (2005).**

- Mitochondrial DNA variation in the European lobster (*Homarus gammarus*) throughout the range. *Marine Biology*, 146:223-235.
- **Tzeng, T.D. (2007).** Population structure of the sword prawn (*Parapenaeopsis hardwickii*) (Decapoda : Penaeidae) in the East China sea and waters adjacent to Taiwan inferred from the mitochondrial control region. *Zoological Studies*, 46:561-568.
 - **Valles-Jimenez, R., Cruz P. and Perez-Enriquez R. (2004).** Population genetic structure of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology*, 6:475-484.
 - **Van Oosterhout, C., Hutcinson, W.F. and Shipley, P. (2004).** Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3):535-538.
 - **Weber, L.I., Hartnoll R.G. and Thorpe J.P. (2000).** Genetic divergence and larval dispersal in two spider crabs (Crustacea: Decapoda), *Hydrobiologia*, 420(1-3):211-219.
 - **Weir, B.S. and Cockerham C.C. (1984).** Estimating Fstatistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6):1358-1370.
 - **Wright, S. (1978).** *Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Chicago, IL: Variability within and among natural populations.* University of Chicago Press.
 - **Xu, Q.H., Liu R.L. and Liu Y. (2009).** Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 371:121-129.

- **Zane, L., Ostellari L., Maccatrozzo L., Bargelloni L., Cuzin-Roudy J., Buchholz F. and Patarnello T. (2000).** Genetic differentiation in a pelagic crustacean (*Meganyctiphanes norvegica*: Euphausiacea) from the North East Atlantic and the Mediterranean Sea, *Marine Biology*, 136(2):191-199.
- **Zouros, E. (1994).** Associative Overdominance - Evaluating the Effects of Inbreeding and Linkage Disequilibrium. *Genetica*, 92:148.

Ελληνική βιβλιογραφία

- **Αλαχιώτης, Σ.Ν. (2005).** Εισαγωγή στη γενετική, εκδόσεις Ελληνικά Γράμματα. Αθήνα:53-79.
- **Λουκάς, Μ. (2003).** Γενετική των πληθυσμών, εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα:92-104.

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- **FAO (2007).** FAO Fisheries and Aquaculture Department
<http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699E00.HTM>
- **EUROSTAT**
[.http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/about_eurostat/corporate/introduction](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/about_eurostat/corporate/introduction)

6 ABSTRACT

Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.), is a decapod crustacean with wide geographical distribution, extending from the North Sea, south to Morocco, and east into the whole Mediterranean Sea. The commercial value of this species is particularly high and recent trends in consumer demand, justify the interest in the possibility of commercial aquaculture. Therefore information about its population structure is necessary to adequate elements for sustainable exploitation and management. In the present study, microsatellite DNA was used as a molecular genetic marker to investigate the genetic stock of Norway lobster populations and more specifically to study its population genetic structure, in Northern Hellas. The effort to estimate genetic diversity was achieved with the use of microsatellite DNA as a molecular genetic marker as it is a codominant marker, easy to use, highly accurate, highly polymorphic and it uses very little and not necessarily high quality DNA.

Three year classes populations from Pagasitikos Gulf (PG 2005, 2006 and 2007), two from Toroneos Gulf (TG 2006 and 2007) and one from North Evoikos Gulf (NEG 2005) were sampled; in total 648 individuals were genotyped. Eight microsatellite primers were studied but only six of them gave reproducible results. Therefore, allele frequencies were computed using six polymorphic microsatellite loci. Molecular variance, F -statistics, gene flow values, genetic distance values and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were calculated within and among populations.

According to statistical comparison of observed and expected heterozygosity, only a few loci conformed to Hardy-Weinberg expectations. These significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), that were detected in all loci and all

populations, suggest that the studied populations may not be in genetic equilibrium yet. Hardy–Weinberg disequilibrium observed in *N. norvegicus* may be due to many reasons like mating of close relatives (inbreeding), population mixing (Wahlund effect) or genetic drift. The observed deficit of heterozygotes as compared with HWE could be a result of natural selection. Norway lobster populations exhibited a significant heterozygote deficiency ($F_{IS} = 0.204$), slightly higher than those reported in previous genetic studies on the species. The observed high value of F_{IS} indicates possible inbreeding. The analysis of allelic frequencies revealed high levels of genetic polymorphism, maybe due to the technique used, although molecular variance within the studied populations was significantly higher (85%) than among them (15%). Values of Nei's genetic distance demonstrated this genetic diversity between populations spatially. The presence of genetic substructuring of the species, probably due to the existence of subpopulations, was also confirmed by the mean value of the standardized variance in allelic frequencies ($R_{ST} = 0.148$). *N. norvegicus* is a burrowing crustacean with pelagic larval forms, however dispersal of adults is considered to be limited. The estimated average value of gene flow between populations was high enough ($N_m = 1,441$) suggesting that gene flow among Norway lobster populations is not restricted and implying near-panmixia among them. The results of the present investigation clearly confirm the existence of a genetically distinct lobster stocks in the Aegean Sea. Data were compared with genetic studies of other marine crustaceans and fish suggestions for their stock management are discussed.

Keywords: *Nephrops norvegicus*, microsatellites, heterozygosity, genetic distance, population subdivision

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Περίληψη στο συνέδριο «11th International Congress on the Zoogeography, Ecology and Evolution of Eastern Mediterranean», 21-25 Σεπτεμβρίου 2009, Ηράκλειο Κρήτης.

Temporal and spatial genetic diversity of the edible decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758)

¹Dadali O., ¹Malandrakis E.E., ¹Palaiokostas C., ²Tsigenopoulos C., ²Magoulas A.,
¹Karapanagiotidis I.T., ¹Neofitou N., ¹Zampounis A., ¹Mente E., ¹Panagiotaki P.,
¹Vafidis D., ¹Exadactylos A*.

¹Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Fytokou str., 384 46, Nea Ionia Magnesia's, Hellas

²Institute for Marine Biology and Genetics, Hellenic Centre for Marine Research, 71003 Gournes Heraklion, Crete, Hellas

*email: exadact@uth.gr

Nephrops norvegicus (L.) is a highly important fishery species, justifying the recent interest as a new candidate for aquaculture production. VNTRs were used as a molecular genetic marker in order to investigate the genetic stock of Norway lobster populations in Northern Hellas.

Four populations from Pagasitikos Gulf (PG 2005, 2006, 2007, and 2008), two from Toronaeos Gulf (TG 2006 and 2007) and one from North Evoikos Gulf (NEG 2005) were sampled; 519 individuals were genotyped in total. Allele frequencies were computed using six polymorphic microsatellite loci.

Only a few loci conformed to Hardy-Weinberg expectations, hence there was little evidence for genetic structuring temporally. Norway lobster populations exhibited a significant heterozygote deficiency ($F_{IS} = 0.204$), slightly higher than those reported in previous genetic studies. The analysis of allelic frequencies revealed high levels of genetic polymorphism, maybe due to the technique used, although molecular variance within the studied populations was significantly higher (85%) than among them (15%). Values of Nei's genetic distance demonstrated this genetic diversity between populations spatially. The presence of genetic substructuring of the species, probably due to the existence of subpopulations, was also confirmed by the mean value of the standardized variance in allelic frequencies ($R_{ST} = 0.148$). However, the estimated average value of gene flow between populations was high enough ($N_m = 1,441$) to imply near-panmixia among them. Furthermore, a significant increase of the N_e estimates in PG 2008 compared to the previous year's ones, was notable.