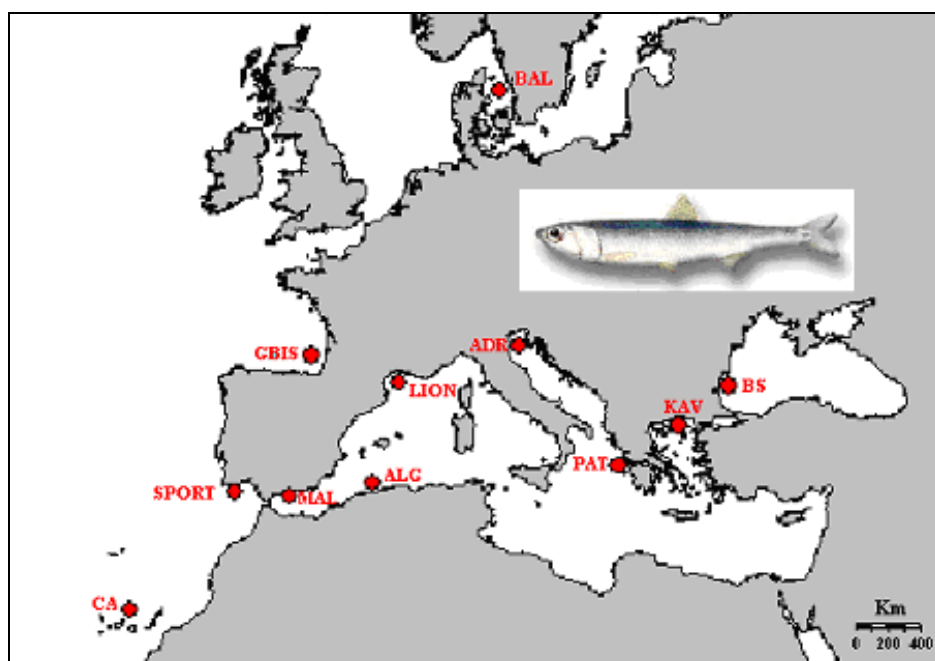


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«Ανάπτυξη μικροδορυφορικών γενετικών δεικτών στον  
ευρωπαϊκό γάυρο (*Engraulis encrasicolus*) και μελέτη της  
γενετικής δομής των πληθυσμών του»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΚΑΚΗ ΒΙΚΤΩΡΙΑ

Ηράκλειο 2008

### **ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

A. Μαγουλάς                      Ερευνητής Α΄ ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

M. Παυλίδης                      Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ**

Π. Κασαπίδης                      Ερευνητής Δ΄ ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

### **ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

A. Μαγουλάς                      Ερευνητής Α΄ ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

M. Παυλίδης                      Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

*Στους γονείς μου*

*Βαγγέλη και Φανή*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων» του Βιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο εργαστήριο Γενετικής του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής (Ι.ΘΑ.ΒΙ.Γ.) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.).

Το θέμα της εργασίας μου εντάσσεται σε «δουλειά ετών» του ερευνητή και διευθυντή του Ι.ΘΑ.ΒΙ.Γ., Μαγουλά Αντώνη, τον οποίο και ευχαριστώ ιδιαίτερα για την επίβλεψη, καθώς και για την υποστήριξη της παρούσας εργασίας με την παροχή μεταπτυχιακής υποτροφίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή του Βιολογικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης, Παυλίδη Μιχάλη, για την επίβλεψη του.

Στον επιβλέποντά μου Δρ. Κασαπίδη Παναγιώτη οφείλω την εργαστηριακή και ερευνητική μου εκπαίδευση και το συνολικό αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ πολύ για το χρόνο που μου διέθεσε, τη στήριξη που μου παρείχε και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στη συνεργασία μου με τον Δρ. Πουλακάκη Νίκο. Η δύο μηνών συνεργασία μας, μου προσέφερε όχι μόνο γνώσεις που άλλοτε μου ήταν άγνωστες, αλλά και το ερέθισμα να συνεχίσω στο χώρο της γενετικής, με περισσότερο ζήλο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Τσιγγενόπουλο Κώστα για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ευχαριστώ επίσης τον ερευνητή Κωτούλα Γιώργο για την βοήθειά του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στους συναδέλφους και καλούς φίλους για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί και την ηθική στήριξη που μου παρείχαν. Χωρίς την βοήθεια και την παρέα των φίλων: Βάσω Τερζόγλου, Εμμανουέλλα Βογιατζή, Δημήτρη Λουκοβίτη, Κατερίνα Βασιλειάδου, Σίλια Αντωνίου, Σπύρο Κόλλια, Jon Bent Kristoffersen, Νίκο Νικολιουδάκη, Γιώργο Λαγωνικάκη, Μιχάλη Ταβερνάρη και Στέλλα Κουλούρη όλα θα ήταν πιο δύσκολα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το εργαστηριακό προσωπικό του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε: τον Στέλιο Δαριβιανάκη, την Κατερίνα Οικονομάκη και την Μαρία Καμπακλή για την πολύ καλή συνεργασία μας.

Την οικογένεια μου Βαγγέλη, Φανή και Μαρία-Δήμητρα ευχαριστώ για την αγάπη, την κατανόηση, τη στήριξη και τα εφόδια που μου παρείχαν. Από τους γονείς μου διδάχθηκα την υπομονή και την επιμονή στοιχεία που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Στους γονείς μου αφιερώνω αυτή την εργασία, χωρίς την βοήθειά τους τίποτα δεν θα είχε πραγματοποιηθεί...

σας ευχαριστώ...

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	V
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
1.1 Ο ευρωπαϊκός γαύρος <i>Engraulis encrasicolus</i> (Linnaeus 1758). Στοιχεία Βιολογίας – Οικολογία .....	2
1.1.1 Εξάπλωση στον Ελλαδικό χώρο - Αλιεία στις ελληνικές θάλασσες .....	5
1.1.2 Εμπορική σημασία του γαύρου.....	5
1.2 Χρήση μοριακών δεικτών στη γενετική έρευνα των πληθυσμών και στη διάκριση των ιχθυοαποθεμάτων.....	6
1.2.1 Το μικροδορυφορικό DNA (microsatellite DNA) και η εξελικτική δυναμική του.....	9
1.2.2 Η χρήση των μικροδορυφορικών ως γενετικών δεικτών.....	12
1.3 Γενετικές μελέτες στον ευρωπαϊκό γαύρο <i>E. encrasicolus</i> .....	13
1.4 Σκοπός της εργασίας.....	17
<b>2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
2.1 Δείγματα.....	18
2.2 Ανάπτυξη μικροδορυφορικών δεικτών μέσω εμπλουτισμένης γενωμικής βιβλιοθήκης.....	20
2.2.1 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA.....	20
2.2.2 Πρωτόκολλο εμπλουτισμού (Enrichment Protocol).....	20
I. Πέψη του DNA (DNA Digestion/ Restriction).....	22
II. Σύνδεση του DNA με συνδέσμους (Ligation to Adaptors/Linkers).....	22
III. Υβριδισμός του DNA με ολιγονουκλεοτίδια σημασμένα με βιοτίνη (Hybridization between Ligated DNA and Biotinylated Primers).....	23
IV. Σύλληψη με παραμαγνητικά σφαιρίδια (Capture by Paramagnetic Particles).....	24
V. Σύνδεση του DNA με βακτηριακό φορέα (vector) και μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων.....	25
VI. Αντίδραση PCR για διαλογή των κλώνων που περιέχουν επαναλήψεις (PCR screening of clones containing repeats).....	26

VII.	Εξαγωγή πλασμιδίων (Plasmid Extraction) (με FilterPlates της Millipore®)..	27
2.2.3	Αντίδραση αλληλούχησης (Sequencing).....	28
2.2.4	Πρωτόκολλο Καθαρισμού προϊόντος Sequencing (Sequencing cleanup/ EDTA-NaOC-EtOH precipitation) και Αλληλούχηση των κλώνων.....	29
2.3	Επεξεργασία των αλληλουχιών και σχεδιασμός των εκκινητών.....	30
2.4	Βελτιστοποίηση των εκκινητών, Multiplex και γονοτύπηση των δειγμάτων..	31
2.5	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των γονοτυπήσεων.....	32
<b>3</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
3.1	Ανάπτυξη μικροδορυφορικών γενετικών τόπων στο γάυρο και βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR.....	36
3.2	Γενετική διαφοροποίηση εντός των δειγμάτων.....	40
3.3	Γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων και ιεραρχική δομή τους....	45
<b>4</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	56
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	63
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</b> .....	75
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ</b> .....	79

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ευρωπαϊκός γαύρος (*Engraulis encrasicolus*) είναι ένα από τα οκτώ είδη της οικογένειας Engraulidae. Κατανέμεται στη Μεσόγειο, στη Μαύρη Θάλασσα, στη Θάλασσα της Αζοφικής και στον ανατολικό Ατλαντικό από τις ακτές της Σκανδιναβίας μέχρι τις ακτές της δυτικής Αφρικής. Η αφθονία του είδους και η εξάρτησή του από χαμηλότερα επίπεδα πελαγικής τροφής, το καθιστούν πολύ σημαντικό συνδετικό κρίκο της αλυσίδας της ενεργειακής ροής των ανώτερων τροφικών επιπέδων.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μικροδορυφορικό DNA ως μοριακός δείκτης για τη γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών του ευρωπαϊκού γαύρου. Το μικροδορυφορικό DNA είναι μικρές, επαναλαμβανόμενες, απλές αλληλουχίες DNA, μήκους 1-6 bp. Το μικροδορυφορικό DNA επιλέχθηκε ως ο καταλληλότερος δείκτης καθώς παρουσιάζει υψηλό πολυμορφισμό επιτρέποντας έτσι το διαχωρισμό μεταξύ ομοζυγωτικών και ετεροζυγωτικών καταστάσεων σε διπλοειδείς οργανισμούς. Είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό επειδή συνήθως βρίσκεται σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (μη κωδικές περιοχές) κι επομένως καμιά μεταλλαγή δεν μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία του. Ακόμη, εμφανίζεται συχνά και συνήθως κατανέμεται ομοιόμορφα στο πυρηνικό γονιδίωμα, και θεωρείται ότι έχει ουδέτερη συμπεριφορά όσον αφορά την επιλογή.

Από άτομα γαύρου κατασκευάστηκαν εμπλουτισμένες γενωμικές βιβλιοθήκες για μικροδορυφορικό DNA. Από τις βιβλιοθήκες αυτές επιλέχθηκαν θετικοί κλώνοι, αλληλουχήθηκαν, και για όσους απ' αυτούς περιείχαν κατάλληλη μικροδορυφορική αλληλουχία σχεδιάστηκαν εκκινητές. Επιλέχθηκαν οι καλύτεροι μικροδορυφορικοί τόποι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της γενετικής δομής των πληθυσμών του γαύρου. Η παρούσα μελέτη ολοκληρώθηκε με τη γονοτύπηση 10 πληθυσμιακών δειγμάτων γαύρου (48-100 άτομα για κάθε δείγμα) που καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της γεωγραφική εξάπλωσης του είδους, από τη Μαύρη Θάλασσα μέχρι το Βόρειο Ατλαντικό.

Τα αποτελέσματα των γονοτυπήσεων ερμηνεύονται σύμφωνα με την τοπογραφία των περιοχών και συγκρίνονται με αντίστοιχες πληροφορίες που έχουν δημοσιευθεί για το συγκεκριμένο είδος, με χρήση άλλων μοριακών τεχνικών (μιτοχονδριακό DNA και αλλοένζυμα).

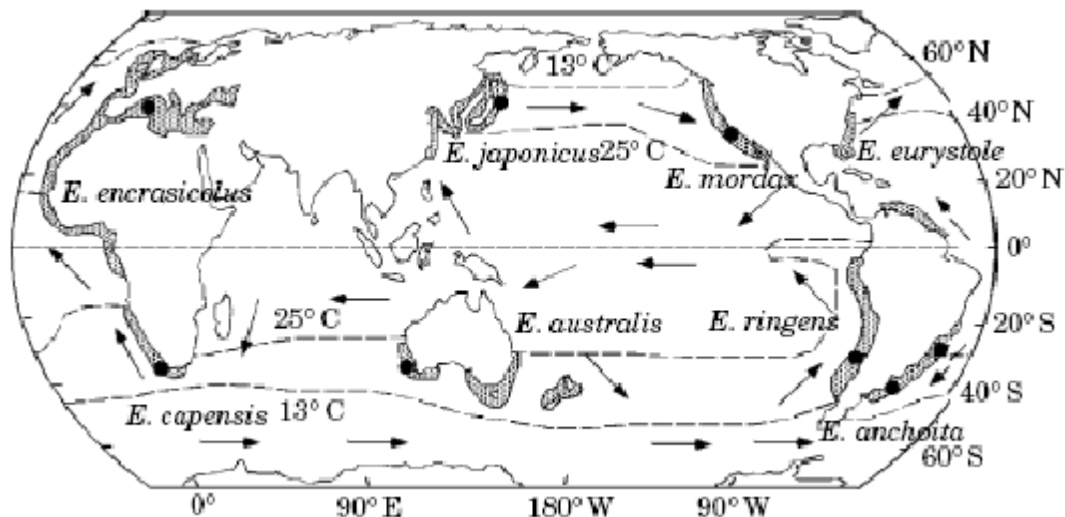


# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ο ευρωπαϊκός γαύρος *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus 1758).

### Στοιχεία Βιολογίας - Οικολογία

Η οικογένεια Engraulidae περιλαμβάνει οκτώ είδη με παγκόσμια κατανομή (Εικ. 1.1): *Engraulis encrasicolus* (Ευρώπη), *Engraulis anchoita* (Αργεντινή), *Engraulis ringens* (Χιλή και Περού), *Engraulis japonicus* (Ιαπωνία), *Engraulis mordax* (Ειρηνικός, ακτές Αμερικής), *Engraulis eurystole* (Ατλαντικός, ακτές Αμερικής), *Engraulis capensis* (Αφρική) και *Engraulis australis* (Αυστραλία) (Santaclara *et al.* 2006). Φυλογενετική μελέτη βασισμένη σε αλληλουχίες μιτοχονδριακού DNA, έδειξε ότι ο γαύρος της νότιας Αφρικής *E. capensis* προέρχεται από πληθυσμούς του *E. encrasicolus* (Grand & Bowen 1998).



Εικόνα 1.1: Χάρτης κατανομής του γένους *Engraulis* (Grant *et al.* 2005).

Ο ευρωπαϊκός γαύρος (*E. encrasicolus*) (Εικόνα 1.2) αποτελεί το μόνο αντιπρόσωπο της οικογένειας Engraulidae στην Μεσόγειο. Η κατανομή του περιλαμβάνει τη Μεσόγειο, τη Μαύρη Θάλασσα, τη Θάλασσα της Αζοφικής και τον Ανατολικό Ατλαντικό από τις ακτές της Σκανδιναβίας μέχρι τις ακτές της Δυτικής Αφρικής (Reid 1967; Whitehead 1985; Whitehead *et al.* 1988; Grant *et al.* 1998; Borsa *et al.* 2004).



**Εικόνα 1.2:** Ενήλικο άτομο Ευρωπαϊκού γαύρου (*E. encrasicolus*).

Παλαιοντολογικά, ο γαύρος εμφανίζεται από την εποχή του Νεωκομίου (140-120 εκατομμύρια χρόνια πριν), ενώ μεγάλη εξάπλωση φαίνεται ότι γνωρίζει, σύμφωνα με παλαιοντολογικά ευρήματα στην Ιταλία, κατά τα τέλη του Ηωκαίνου (περίπου 40 εκατομμύρια χρόνια πριν) (Βιδάλης 1949).

Ο γαύρος είναι πελαγικό ψάρι 12-15 cm, σχηματίζει κοπάδια και είναι μεταναστευτικό και πολλαπλώς ωοτόκο είδος με πελαγικά αυγά και λάρβες (περισσότερες από 10 ωοτοκίες ανά έτος στη Μαύρη Θάλασσα) (Whitehead 1984). Είναι κατ' εξοχήν ζωοπλαγκτονοφάγος (Tudela & Palomera 1997), αν και στη Μαύρη Θάλασσα έχει αναφερθεί και σποραδική κατανάλωση φυτοπλαγκτού (Mikhman & Tomanovich 1978; Bulganova 1993). Τρέφεται κυρίως κατά τη διάρκεια της ημέρας, συνήθως με μικρού μεγέθους (<2 mm) κωπήποδα και κατά δεύτερο λόγο με κλαδοκεραιωτά, νύμφες μαλακίων και οστρακώδη, καθώς και μεγαλύτερα άτομα όπως νύμφες δεκαπόδων και ψαριών, αμφίποδα, κωπηλάτες κ.α. Σύμφωνα με τους Tudela & Palomera (1997), στη δυτική Μεσόγειο η ένταση της διατροφής κορυφώνεται κατά τις απογευματινές ώρες και φαίνεται να εξαρτάται από το βάθος όπου παρατηρείται το μέγιστο της χλωροφύλλης (deep chlorophyll maximum). Η αφθονία του είδους και η εξάρτησή του από χαμηλότερα επίπεδα πελαγικής τροφής, το καθιστούν πολύ σημαντικό συνδετικό κρίκο της αλυσίδας της ενεργειακής ροής των ανώτερων τροφικών επιπέδων (Tudela & Palomera 1997).

Ο γαύρος είναι ένα ευρύαλο είδος, ικανό να αντεπεξέρχεται σε συνθήκες μειωμένης αλατότητας. Είναι χαρακτηριστικό ότι συχνά βρίσκεται σε εκβολές ποταμών, ενώ δεν είναι σπάνιο και το φαινόμενο να εισέρχεται σε λιμνοθάλασσες ή σε ποτάμια (Στεργίου 1990). Στη Μαύρη Θάλασσα, όπου η αλατότητα είναι περίπου 17‰ (έναντι 36-39 στη Μεσόγειο) ο γαύρος αποτελεί το πολυπληθέστερο είδος ψαριού (Ivanov 1985). Σύμφωνα με τους Lisovenko & Andrianov (1996) και Reger (1996) ο γαύρος είναι ικανός να αναπαράγεται σε μεγάλο εύρος αλατότητας (7-39‰) και θερμοκρασίας (12-28 °C).

Μελέτες της μακροδομής των ωτολίθων από το σύνολο της περιοχής εξάπλωσης του είδους έχουν δείξει ότι ο γαύρος δεν ξεπερνά τα τέσσερα έτη ζωής (Τσιμενίδης & Καραγκίτσου 1984; Karacam & Duzgunes 1990; Morales-Nin & Pertierra 1990). Στη Μεσόγειο ο γαύρος ωριμάζει αναπαραγωγικά πρώτη φορά με τη συμπλήρωση του πρώτου έτους ζωής και σε μήκος 10-11cm (Demir 1965; Τσιμενίδης & Καραγκίτσου 1984; Motos *et al.* 1991; Uriarte *et al.* 1996). Αντίθετα στη Μαύρη Θάλασσα (Mikhailov 1993) ακόμα και άτομα 0+, δηλαδή, άτομα που γεννήθηκαν στην αρχή της αναπαραγωγικής περιόδου, ωριμάζουν και ωτοκοούν στο τέλος της ίδιας αναπαραγωγικής περιόδου (μήκους 8cm περίπου). Οι Lisovenko & Andrianov (1996) υποστηρίζουν ότι ορισμένα άτομα γαύρου μπορούν να αναπαραχθούν ακόμη και 2-3 εβδομάδες μετά την εκκόλασή τους.

Η αναπαραγωγική περίοδος του γαύρου είναι παρατεταμένη και εκτείνεται από την άνοιξη έως το φθινόπωρο (Palomera & Sabates 1990; Motos *et al.* 1991; Palomera 1992; Σωμαράκης 1993; Motos *et al.* 1996). Συγκεκριμένα στη Μεσόγειο η αναπαραγωγική περίοδος αρχίζει τον Απρίλιο και ολοκληρώνεται τον Οκτώβριο (σπάνια από το Μάρτιο ή και μετά το Νοέμβριο), ενώ στη Μαύρη Θάλασσα από το τέλος του Μαΐου μέχρι τον Σεπτέμβριο. Η έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου φαίνεται να σχετίζεται με την αρχή της θέρμανσης των επιφανειακών υδάτων κατά την άνοιξη (Demir 1965; Palomera 1992; Motos *et al.* 1996), ενώ η λήξη της με την αρχή κάποιας απότομης ψύξης των υδάτων κατά το φθινόπωρο (Palomera 1992).

Στις ελληνικές θάλασσες το μέγιστο της αναπαραγωγής του γαύρου λαμβάνει χώρα κατά την περίοδο μετάβασης από την άνοιξη στο καλοκαίρι (Σωμαράκης 1993; 1999), δηλαδή την περίοδο των μεγάλων περιβαλλοντικών αλλαγών (π.χ.: ελάττωση της εκροής των ποταμών, αύξηση της διάρκειας της ημέρας και της θέρμανσης απ' τον ήλιο, αλλαγές στους επικρατούντες ανέμους) (Koutsikopoulos & Le Cann 1996).

Η ένταση και τα πεδία αναπαραγωγής σχετίζονται με εποχές/περιοχές υψηλής παραγωγικότητας και συγκεκριμένα με συνθήκες ευνοϊκές για τη διατροφή των ενηλίκων (π.χ. χερσαίες εκροές, ανοδικά ρεύματα (upwellings) και μετωπικά συστήματα (fronts) (Palomera 1992; Garcia *et al.* 1994; Motos *et al.* 1996).

### 1.1.1 Εξάπλωση στον Ελλαδικό χώρο - Αλιεία στις ελληνικές θάλασσες

Ο γούρος είναι από τα πιο άφθονα είδη των Ελληνικών θαλασσών και μαζί με τη σαρδέλα, *Sardina pilchardus*, αποτελούν το επικρατές ζεύγος των μικρών πελαγικών (Stergiou *et al.* 1997). Ο Βιδάλης (1949) αναφέρει ότι ο γούρος αφθονεί και ψαρεύεται στον Πατραϊκό, Σαρωνικό, Ευβοϊκό και Παγασητικό Κόλπο, στο Θρακικό πέλαγος και στη Λέσβο, ενώ πιο περιστασιακές είναι οι αναφορές του στα στενά της Κέρκυρας, στις Κυκλάδες, στα Δωδεκάνησα και στο Κρητικό πέλαγος.

Ο κύριος όγκος των αλιευμάτων του γούρου εκφορτώνεται στο Βόρειο Αιγαίο (Τσιμενίδης & Καραγκίτσου 1984; Stergiou & Georgopoulos 1993; Stergiou *et al.* 1997a). Σχεδόν το σύνολο των αλιευόμενων ποσοτήτων του γούρου προκύπτει από την αλιεία με κυκλικά δίχτυα (γρι-γρι) (Stergiou 1986), ενώ οι ποσότητες που αλιεύονται παρουσιάζουν ένα εποχιακό πρότυπο (Stergiou 1990) που οφείλεται σε αντίστοιχες εποχιακές μεταναστεύσεις. Ο γούρος φαίνεται να μετακινείται προς βαθύτερα νερά κατά το τέλος του καλοκαιριού-αρχές φθινοπώρου και ξανά πίσω προς τα παράκτια πεδία την άνοιξη (Τσιμενίδης & Καραγκίτσου 1984; Stergiou 1990).

Στο Δυτικό Κεντρικό Αιγαίο και στο Ιόνιο οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του γούρου αναφέρονται στον Βόρειο Ευβοϊκό Κόλπο, στο βόρειο τμήμα του Νότιου Ευβοϊκού Κόλπου και στον Πατραϊκό Κόλπο (Machias *et al.* 2001). Η παραγωγή του γούρου στην Ελλάδα το 1987 ανήλθε σε 24,736 tn (Στεργίου 1990) ενώ η αντίστοιχη παραγωγή στην Ιταλία το 1995 έφτασε τους 41,102 tn (Sebastio *et al.* 2001).

### 1.1.2 Εμπορική σημασία του γούρου

Το απόθεμα του γούρου είναι μια σημαντική πλουτοπαραγωγική πηγή για την Ελληνική και γενικότερα για την παγκόσμια αλιεία (Εθνική Στατιστική Υπηρεσία 2000; Whitehead *et al.* 1988). Ο ευρωπαϊκός γούρος αλιεύεται κυρίως στη Μεσόγειο και στις παρακείμενες θάλασσες. Συγκεκριμένα, ο ευρωπαϊκός γούρος που αλιεύθηκε το 2000, ήταν 280.000 τόνους στις Τουρκικές ακτές της Μαύρης Θάλασσας, οι οποίες αποτελούν το 72% του παγκόσμιου αλιεύματος γούρου (FAO 2002).

Ο γούρος καταναλώνεται στην Ελλάδα τόσο νωπός όσο και μεταποιημένος, δηλαδή αλίπαστος, καπνιστός ή κονσερβαρισμένος και το απόθεμά του αποτελεί την

πλέον αξιόλογη πρώτη ύλη για την Ελληνική βιοτεχνία και βιομηχανία μεταποίησης αλιευμάτων. Έτσι, στην Ελλάδα από τη συνολική παραγωγή γαύρου, ποσοστό 60-70% μεταποιείται και το υπόλοιπο 30-40% καταναλώνεται νωπό (Υπουργείο Γεωργίας 2000).

Στην Ελλάδα ο γαύρος αποτελεί το κύριο αλίευμα μεταποίησης στις περισσότερες μονάδες, αν και κατατάσσεται δεύτερο σε ποσότητα μεταποιημένο αλίευμα, μετά τη σαρδέλα, στο σύνολο μεταποιημένων αλιευμάτων. Αυτό οφείλεται στο ότι δύο από τις μεγαλύτερες μονάδες παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες μεταποιημένης σαρδέλας, και μόνο τα τελευταία χρόνια άρχισαν την παραγωγή μεταποιημένου γαύρου, σε μικρές όμως ποσότητες.

Ο γαύρος μετά το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας του (υγρή άλμιση) αποστέλλεται στο εξωτερικό για περαιτέρω διαδικασίες παραγωγής. Ενώ, από μία μόνο εταιρία αναφέρθηκε κατάψυξη της πρώτης ύλης και ακόλουθη εξαγωγή της στην αγορά της Γερμανίας. Το μεγαλύτερο ποσοστό των προϊόντων του γαύρου διοχετεύεται προς κατανάλωση στην Ελληνική αγορά αν και μερικές μονάδες εξάγουν μικρό ποσοστό μεταποιημένου γαύρου σε χώρες της υπόλοιπης Ε.Ε., στην Αμερική και στην Αυστραλία.

## **1.2. Χρήση μοριακών δεικτών στη γενετική έρευνα των πληθυσμών και στη διάκριση των ιχθυοαποθεμάτων**

Η επιστήμη της αλιευτικής βιολογίας είναι βασισμένη στην έννοια του “εξιδανικευμένου μοναδιαίου αποθέματος”, μια ιδιαίτερη οντότητα με δική της προέλευση, δημογραφία και μοίρα (Waldman 2005). Η κατανόηση της δομής των αποθεμάτων είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των κατάλληλων διαχειριστικών αλιευτικών κανονισμών, όπου πολλαπλά αποθέματα υφίστανται διαφορετική αλιευτική πίεση (Ricker 1981).

Πάνω από το 90% των παγκόσμιων ιχθυοαποθεμάτων γίνεται αντικείμενο υπερεκμετάλλευσης, με πιθανά αρνητικά αποτελέσματα σε φαινοτυπικά γνωρίσματα που επηρεάζουν τον κύκλο ζωής και παραγωγής και με πιθανές αμετάκλητες μετατοπίσεις της γενετικής δομής και ποικιλομορφίας (Ryman *et al.* 1995). Αυτοί οι κίνδυνοι ακεραιότητας και σταθερότητας του υπό εκμετάλλευση ιχθυοπληθυσμού

έχουν προωθήσει την αναζήτηση για περιγραφή και παρακολούθηση της δομής των ιχθυοπληθυσμών.

Το μεγάλο μειονέκτημα στη χρησιμοποίηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών για την διάκριση των διαφόρων ιχθυοπληθυσμών είναι ότι επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον. Η ερμηνεία της γενετικής βάσης της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας καθίσταται περισσότερο πολύπλοκη λόγω της πολυγονιδιακής κληρονόμησης και του μικρού συντελεστή κληρονομησιμότητας που εμφανίζουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, ακόμη και στην περίπτωση που κάποιο από αυτά δεν επηρεάζεται από το περιβάλλον. Λύση στο παραπάνω πρόβλημα μπορεί να δώσει η μοριακή γενετική, μέσω της χρήσης μοριακών γενετικών δεικτών.

Οι γενετικές μέθοδοι μπορεί να είναι εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία στην αλιευτική διαχείριση, επιτρέποντας την αναγνώριση γενετικά διαφοροποιημένων πληθυσμών, που αναφέρονται και ως γενετικά αποθέματα (genetic stocks) (Jamieson, 1973; Ovenden, 1990), δηλαδή μονάδες που είναι λίγο πολύ αναπαραγωγικά απομονωμένες ή μία από την άλλη και θα αντιδράσουν ανεξάρτητα σε περίπτωση υπερεκμετάλλευσης. Αυτοί οι πληθυσμοί μπορεί να διαφέρουν και σε σημαντικές παραμέτρους που χρησιμοποιούνται στα αλιευτικά μοντέλα (όπως ανάπτυξη, θνησιμότητα, στρατολόγηση) (Hauser and Ward, 1998). Παρόλα αυτά, μπορεί να υπάρχουν ιχθυοπληθυσμοί που χωρίς να είναι γενετικά διαφοροποιημένοι αντιδρούν ανεξάρτητα στην εκμετάλλευση. Αυτές οι ανεξάρτητες μονάδες αντιπροσωπεύουν διαφορετικά αλιευτικά αποθέματα (harvest stocks), που ορίζονται ως τοπικοί ιχθυοπληθυσμοί όπου η αλιευτική πίεση στον ένα δεν έχει επίδραση στην αφθονία του παρακείμενου (Gauldie, 1988). Αυτές οι τελευταίες μονάδες ενδιαφέρουν τους διαχειριστές των αλιευτικών αποθεμάτων, αλλά αυτός ο ορισμός δεν υποδηλώνει κάποια γενετική ή φαινοτυπική διαφορά μεταξύ των αποθεμάτων. Και οι δύο ορισμοί (γενετικός και αλιευτικός) αποτελούν ερμηνείες του γενικότερου ορισμού των Ihssen *et al.* (1981), που όρισαν το απόθεμα ως “μια ενδοειδική ομάδα ατόμων που συζεύγνυνται τυχαία μεταξύ τους, και εμφανίζουν χρονική και χωρική αυτοτέλεια”.

Οι πρώτες γενετικές έρευνες στα ψάρια έκαναν την εμφάνιση τους κατά τη δεκαετία του '50. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ομάδων αίματος, όπου και βρέθηκε γενετικά ελεγχόμενη ποικιλότητα. Αργότερα, με την ανακάλυψη της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης σε άμυλο (Smithies 1955) και των ιστοχημικών τεχνικών χρώσης (Hunter & Markert 1957), η έρευνα εμβάθυνε περισσότερο και μεταφέρθηκε στο επίπεδο των πρωτεϊνών. Ωστόσο, με την πρόοδο που έχει επιτευχθεί σήμερα στη μοριακή

βιολογία και γενετική, υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές νέες μοριακές μεθοδολογίες και μοριακοί γενετικοί δείκτες που επιτρέπουν την αξιόπιστη ανάλυση του γονιδιώματος των οργανισμών για τη μελέτη της γενετικής δομής των πληθυσμών τους και της εξελικτικής τους ιστορίας.

Ως μοριακοί δείκτες DNA έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί (Gelehrter *et al.* 2000):

- πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών τμημάτων (Restriction Fragment Length Polymorphisms - **RFLPs**). Στηρίζεται στα διαφορετικά ηλεκτροφορητικά πρότυπα που εμφανίζουν διαφορετικά άτομα ή είδη. Τα τμήματα του DNA που ηλεκτροφορούνται είναι προϊόντα πέψης με διάφορα περιοριστικά ένζυμα.
- τυχαίως πολλαπλασιαζόμενα πολυμορφικά τμήματα DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNAs - **RAPDs**). Πρόκειται για μέθοδο παραπλήσια με την προηγούμενη μόνο που τα τμήματα του DNA που ηλεκτροφορούνται είναι προϊόντα PCR με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (μήκους περίπου 10bp) και όχι προϊόντα πέψης με περιοριστικά ένζυμα.
- Πολυμορφισμοί μήκους πολλαπλασιαζόμενων τμημάτων DNA (Amplified Fragment Length Polymorphisms - **AFLPs**). Η διαφορά από τη μέθοδο των RAPDs είναι ότι προηγείται πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού πριν την PCR και ότι οι εκκινητές της PCR δεν είναι τυχαίοι, αλλά αποτελούνται κατά το μεγαλύτερο μέρος τους (περίπου 15 bp) από μία περιοχή ειδική για την περιοχή κοψίματος της ενδονουκλεάσης και κατά το μικρότερο μέρος τους (2-4 bp) από τυχαία νουκλεοτίδια
- τυχαίοι σημειακοί πολυμορφισμοί μιας νουκλεοτιδικής βάσης (Single Nucleotide Polymorphisms - **SNPs**). Τα SNPs σχετίζονται με την ποικιλομορφία λόγω ενός μόνο ζεύγους νουκλεοτιδίων που διαφέρει (μετάλλαξη σημείου).
- πολυμορφισμοί στον αριθμό επαναλήψεων μικροδορυφορικών αλληλουχιών (**microsatellites**) και (**minisatellites**). Η διαφορά των minisatellites από τα microsatellites είναι ότι η επαναλαμβανόμενη ακολουθία είναι πολύ μεγαλύτερη (20-100bp) και ότι η καταλληλότητά τους ως δείκτες είναι γενικά κατώτερη αυτής των microsatellites.
- εύρεση της πρωτοταγούς δομής των βάσεων μιας περιοχής του γονιδιώματος (Αλληλούχηση - **sequencing**).
- μιτοχondριακό DNA (**mtDNA**). Η μελέτη του πολυμορφισμού του γίνεται κυρίως με αλληλούχηση (sequencing) ή με RFLPs.

### 1.2.1 Το μικροδορυφορικό DNA (microsatellite DNA) και η εξελικτική δυναμική του

Το μικροδορυφορικό DNA είναι μικρές, επαναλαμβανόμενες, απλές αλληλουχίες DNA, μήκους 1-6 bp, όπως για παράδειγμα  $(CA/GT)_n$  ή  $(AGC/TCG)_n$  (Schlötterer 2000). Ανήκει στην κατηγορία των γενομικών αλληλουχιών γνωστών ως μεταβλητός αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων (Variable Number of Tandem Repeat - VNTR) (Buschiazoo & Gemmell 2006). Είναι δυνατόν να ανιχνευθούν τόσο στο πυρηνικό γονιδίωμα όσο και στο χλωροπλαστικό (Lefort *et al.* 1999), αλλά ακόμα και στο μιτοχονδριακό (Lefort & Douglas 1999). Μεταξύ των τριών υποομάδων του επαναλαμβανόμενου DNA (satellite, minisatellite and microsatellite DNA) (Tautz 1993), το μικροδορυφορικό DNA δείχνει το μικρότερο βαθμό επαναληπτικότητας. Το μικροδορυφορικό DNA, που καλείται επίσης και simple sequence repeats (SSR), short tandem repeats (STR) ή simple sequence length polymorphisms (SSLP), έχει μικρό βαθμό επαναληπτικότητας (5-100 επαναλήψεις) και τυχαία κατανομή στο γονιδίωμα ( $10^4$ - $10^5$  ανά γονιδίωμα).

Όσον αφορά την αφθονία του μικροδορυφορικού DNA στο γονιδίωμα έχει εκτιμηθεί ότι τα  $(CA/GT)_n$ , τα οποία είναι τα πιο άφθονα στα ανώτερα σπονδυλωτά (Beckman & Weber 1992), εμφανίζονται κατά μέσο όρο κάθε 30 kb, 21 kb, 18 kb στον άνθρωπο, στον αρουραίο και στο ποντίκι, αντίστοιχα. Λιγότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για άλλα είδη εκτός των θηλαστικών. Παρόλα αυτά μικροδορυφορικοί τόποι έχουν αναλυθεί και σε πολλά είδη πουλιών (Ellegren 1992), ψαριών (Goff *et al.* 1992; Brooker *et al.* 1994), φυτών (Akkaya *et al.* 1992) και εντόμων (Tautz & Renz 1984; Thoren *et al.* 1995) και τα αποτελέσματα δείχνουν πως είναι εξίσου άφθονοι. Οι διαφορές που υπάρχουν αφορούν στον τύπο των μικροδορυφορικών τόπων που είναι ο πιο κοινός σε κάθε ταξινομική ομάδα οργανισμών. Για παράδειγμα, στο γονιδίωμα των θηλαστικών, όπως αναφέρθηκε, ο πιο κοινός τύπος είναι ο  $(CA/GT)_n$ , σε αντίθεση με τα φυτά που συναντάται πιο συχνά ο  $(AT/TA)_n$  (Akkaya *et al.* 1992).

Οι αλληλουχίες του μικροδορυφορικού DNA χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: στις τέλεια επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, στις διακοπτόμενες (μία ή δύο διακοπές του πυρήνα των επαναλήψεων) και στις σύνθετες, όπου ένας τύπος μικροδορυφορικού ακολουθείται από έναν άλλο (Weber 1990). Ο αριθμός των αλληλομόρφων ενός μικροδορυφορικού τόπου αυξάνεται με την αύξηση των



επαναλήψεων, ειδικά για ένα εύρος 11-17 επαναλήψεων. Σε γενικές γραμμές τα διακοπτόμενα μικροδορυφορικά DNA είναι λιγότερο πολυμορφικά από τα τέλεια, ενώ για τα σύνθετα δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα.

Γενικότερα, το μικροδορυφορικό DNA εμφανίζει υψηλό πολυμορφισμό, παρουσιάζει συνεπικρατή (co-dominant) κληρονομικότητα, επιτρέποντας έτσι τον διαχωρισμό μεταξύ ομοζυγωτικών και ετεροζυγωτικών καταστάσεων σε διπλοειδείς οργανισμούς, εμφανίζεται συχνά και συνήθως κατανέμεται ομοιόμορφα στο πυρηνικό γονιδίωμα, και θεωρείται ότι εμφανίζει ουδέτερη συμπεριφορά όσον αφορά την επιλογή. Είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό και συνήθως βρίσκεται σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (μη κωδικές περιοχές).

Αν και η ύπαρξη απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα ήταν γνωστή από τη δεκαετία του 1970, ο μεγάλος αριθμός και η ευρεία κατανομή τους στους ευκαρυώτες επιβεβαιώθηκε το 1982 από τον Hamada, ο οποίος βρήκε εκατοντάδες αντίγραφα αλληλουχιών (CA/GT)<sub>n</sub> στο σακχαροκάλαμο και δεκάδες χιλιάδων στα σπονδυλωτά. Το εύρημα του Hamada επιβεβαιώθηκε το 1984 από τους Tautz και Renz, οι οποίοι συστηματικά υβριδοποίησαν απλές αλληλουχίες, με γενωμικό DNA από μια πληθώρα οργανισμών και βρήκαν πολλούς τύπους απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Βρέθηκε επίσης, ότι η ίδια μικροδορυφορική αλληλουχία μπορούσε να διαφέρει στον αριθμό των επαναλήψεων μεταξύ των ατόμων.

Με την εμφάνιση της τεχνικής PCR (Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) αυτή η ιδιότητα του μικροδορυφορικού DNA το κατέστησε ως σε έναν ιδιαίτερα χρήσιμο γενετικό δείκτη. Το 1989 τρεις ανεξάρτητες δημοσιεύσεις (Litt & Luty 1989, Weber & May 1989, Tautz 1989) αναφέρθηκαν στην απομόνωση και στο χαρακτηρισμό μικροδορυφορικών τόπων. Στις μελέτες αυτές, μικροδορυφόροι από διάφορα είδη κλωνοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η αλληλουχία τους ή αναγνωρίστηκαν απλώς από βάσεις δεδομένων. Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν εκκινητές PCR που αναγνωρίζουν αλληλουχίες εκατέρωθεν των μικροδορυφορικών και τα πολυμορφικά προϊόντα των αντιδράσεων PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης.

Ο ρυθμός μεταλλαγής του μικροδορυφορικού DNA (συχνότητα αλλαγής αριθμού επαναλήψεων σε μια αλληλουχία ανά αντιγραφή), κυμαίνεται μεταξύ  $10^{-2}$  με  $10^{-6}$  μεταλλαγές ανά γενιά και είναι αρκετά υψηλότερος από το ρυθμό αντικατάστασης βάσεων (Schlötterer 2000). Φυσικά ο ρυθμός αυτός δεν μπορεί

άμεσα να συγκριθεί με αυτόν των μοναδικών αλληλουχιών, αφού η φύση των μεταλλαγών στις μοναδικές αλληλουχίες είναι αρκετά διαφορετική.

Το μικροδορυφορικό DNA φαίνεται ότι μεταλλάσσεται με δύο κύριους μηχανισμούς, το γλίστρημα κατά την αντιγραφή (replication slippage) και τον άνισο επιχιασμό (unequal crossing-over). Το γλίστρημα κατά την αντιγραφή είναι ο πιο συνηθισμένος τρόπος και δημιουργεί αλληλόμορφα που διαφέρουν κυρίως κατά μια επανάληψη, και σπάνια κατά περισσότερες. Αυτός είναι ο κύριος λόγος που το μικροδορυφορικό DNA πιστεύεται ότι ακολουθεί το μοντέλο μεταλλαγής κατά βήμα (stepwise mutation model) (Ohta & Kimura 1973), σε αντίθεση με τις μοναδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κυρίως ακολουθούν το μοντέλο μεταλλαγής απείρων αλληλομόρφων (infinite alleles model) (Kimura & Crow 1964).

Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA το δημιουργούμενο και το πρότυπο σκέλος μπορούν αν αποσυνδεθούν και να ευθυγραμμιστούν εκ νέου. Στις περιοχές που υπάρχουν μικροδορυφορικές αλληλουχίες η ευθυγράμμιση μπορεί να μη γίνει σωστά (π.χ. μπορεί η δεύτερη επανάληψη στη δημιουργούμενη αλυσίδα να ευθυγραμμιστεί με τη τρίτη της αλυσίδας μήτρας). Αν η σύνθεση του DNA συνεχιστεί σε αυτό το μόριο, τότε ο αριθμός επανάληψης των μικροδορυφορικών αλλάζει.

Τα *in vitro* πειράματα έχουν αποδείξει ότι το γλίστρημα της αλυσίδας του DNA παρατηρείται σε πολύ υψηλούς ρυθμούς (Hentschel 1982; Streisinger & Owen 1985; Schlötterer & Tautz 1992). Η απόκλιση μεταξύ του πολύ υψηλού ρυθμού μεταλλαγής των μικροδορυφορικών, όπως αναμένεται βάσει των *in vitro* πειραμάτων και του παρατηρούμενου *in vivo* ρυθμού μεταλλαγής από  $10^{-2}$  έως  $10^{-6}$ , μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία ενός συστήματος διόρθωσης των λανθασμένων συνδυασμών. Έχει αποδειχθεί ότι ένα λειτουργικό σύστημα διόρθωσης των λανθασμένων συνδυασμών μειώνει το ποσοστό μεταλλαγής των μικροδορυφορικών από 100 έως και 1000 φορές (Strand *et al.* 1993).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό μεταλλαγής των μικροδορυφορικών είναι: ο αριθμός των επαναλήψεων, ο τύπος των επαναλήψεων, οι γειτονικές αλληλουχίες (flanking sequences) και η συχνότητα ανασυνδυασμού (recombination) (Schlötterer 2000).

### 1.2.2 Η χρήση των μικροδορυφορικών ως γενετικών δεικτών

Ο γενετικός δείκτης είναι ένα κομμάτι DNA με μία αναγνωρίσιμη φυσική θέση πάνω σε ένα χρωμόσωμα, του οποίου η κληρονομικότητα μπορεί να παρακολουθηθεί. Μπορεί να είναι ένα γονίδιο, μία περιοχή-στόχος ενός περιοριστικού ενζύμου, ένας μικροδορυφορικός τόπος κ.τ.λ. Οι γενετικοί δείκτες χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του γενετικού πολυμορφισμού των πληθυσμών, ο οποίος στα φυλετικά αναπαραγόμενα είδη επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της μείωσης (παραγωγή γαμετών, φαινόμενα ανασυνδυασμού, τυχαίος διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων) και με τις μεταλλάξεις.

Οι μικροδορυφορικοί τόποι χρησιμοποιούνται ως γενετικοί δείκτες σε διάφορους κλάδους της Βιολογίας. Η χαρτογράφηση - κατασκευή γενετικών χαρτών, η ταυτοποίηση δειγμάτων, ο έλεγχος πατρότητας - DNA fingerprinting και η γενετική δομή πληθυσμών αποτελούν τις κυριότερες εφαρμογές των μικροδορυφορικών.

Η σχεδόν τυχαία κατανομή των μικροδορυφορικών στο γονιδίωμα και το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού τους διευκολύνουν πολύ την κατασκευή γενετικών χαρτών (Dietrich *et al.* 1994; Dib *et al.* 1996). Μέχρι και σήμερα οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες θεωρούνται το πιο σημαντικό εργαλείο στη γενετική ανάλυση σύνδεσης και στη χαρτογράφηση γονιδιωμάτων των ευκαρυωτικών οργανισμών (Weissenbach *et al.* 1992; Zheng *et al.* 1993).

Το μικροδορυφορικό DNA χρησιμοποιείται επιτυχώς σε ελέγχους πατρότητας και συγγένειας σε ανθρώπους και σε άλλα είδη (Amos *et al.* 1993). Η υψηλή ευαισθησία της μικροδορυφορικής ανάλυσης, μέσω PCR, δεν ήταν μόνο το καλύτερο ευεργέτημα για τους ιατροδικαστές, αλλά ανοίγει νέους ερευνητικούς τομείς, όπως η ανάλυση δειγμάτων με περιορισμένη ποσότητα DNA ή αλλοιωμένο DNA (Schlötterer & Pemberton 1998).

Το μικροδορυφορικό DNA αποτελεί έναν απ' τους σημαντικότερους δείκτες στη γενετική πληθυσμών (Goldstein & Schlötterer 1999). Αυτό οφείλεται στο ότι, είναι ευρέως κατανεμημένο στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα (Tautz & Renz 1984), εμφανίζει υψηλό πολυμορφισμό, λόγω της ποικιλότητας στον αριθμό των επαναλήψεων (Amos *et al.* 1993), τα αλληλόμορφα που διαφέρουν στον αριθμό των επαναλήψεων κληρονομούνται Μεντελικά, είναι συνεπικρατή και συνήθως επιλεκτικά ουδέτερα (Ashley & Dow 1994) και η μέθοδος για την ανάλυσή του είναι απλή και γρήγορη, εφόσον στηρίζεται στην αντίδραση PCR (Saiki *et al.* 1988).

Εντούτοις, η εφαρμογή των μικροδορυφορικών σε κάποια ερωτήματα της πληθυσμιακής γενετικής προϋποθέτει μια πιο λεπτομερή κατανόηση της διαδικασίας μεταλλαγής του μικροδορυφορικού DNA, που δεν έχει ακόμα επιτευχθεί.

### 1.3 Γενετικές μελέτες στον ευρωπαϊκό γάυρο *E. encrasicolus*

Σύμφωνα με τον Fage (1911; 1920) ο ευρωπαϊκός γάυρος υποδιαιρείται σε δύο φυλογενετικές ομάδες, του Ατλαντικού και της Μεσογείου, που διαχωρίζονται περαιτέρω, ο γάυρος του Ατλαντικού Ωκεανού σε βόρεια και νότια ομάδα και ο γάυρος της Μεσογείου σε δυτική και ανατολική ομάδα.

Ο Alexandron (1927) υποστηρίζει ότι ο γάυρος της Μαύρης Θάλασσας διαβιεί στο δυτικό τμήμα της, καθώς ο γάυρος της Αζοφικής κατοικεί στο ανατολικό τμήμα της Μαύρης Θάλασσας ερχόμενος εκεί για αναπαραγωγή και διαβίωση. Ο Pousanov (1936) συνδέει το γάυρο της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας σε μια ομάδα και θεωρεί το γάυρο της Αζοφικής ξεχωριστό είδος το οποίο αποκαλεί *E. maeoticus*.

Βασισμένος σε ανοσολογικές αναλύσεις ο Altuchov (1974) βρήκε διαφορές μεταξύ του γάυρου της Μαύρης Θάλασσας και του γάυρου της Αζοφικής. Ο Shevchenko (1980) θεωρεί το γάυρο της Αζοφικής ως σπάνιο εναπομένον είδος από την Καρανγάτια (Karangatian) περίοδο (Ανώτερο Πλειστόκαινο) και το γάυρο της Μαύρης Θάλασσας ως επακόλουθο μεταναστευτικό είδος της σύγχρονης Μεσογειακής περιόδου. Οι Kalnina & Kalnin (1984), Kalnin *et al.* (1984) και Kalnin & Kalnina (1985) μελέτησαν την υβριδοποίηση, την πληθυσμιακή δομή, το βιοχημικό πολυμορφισμό, τη γενετική διάκριση και την αναπαραγωγική απομόνωση των «φυλών» του γάυρου, της Μαύρης Θάλασσας και της Αζοφικής, χρησιμοποιώντας βιοχημικές και γενετικές μεθόδους και βρήκαν γενετική διαφοροποίηση ως προς τις συχνότητες των αλληλομόρφων.

Οι Spanakis *et al.* (1989) χρησιμοποίησαν αλλοένζυμα και μορφομετρικά δεδομένα και ανακάλυψαν σημαντική γενετική διαφοροποίηση στο γάυρο μεταξύ πληθυσμών του Αιγαίου και του Ιονίου. Μελέτη με αλλοένζυμα έγινε από τους Pla *et al.* (1994) και Tudela (1996) οι οποίοι μελέτησαν τη βορειοδυτική κατανομή του γάυρου από την Λιγουρία (Ιταλία) έως τον Κόλπο της Βαλένθιας (Ισπανία) και διαπίστωσαν την ομοιογενή γενετική δομή του γάυρου στις περιοχές αυτές. Οι Tudela *et al.* (1999) ενισχύουν την άποψη του Pertierra (1992), ο οποίος υποστηρίζει τη

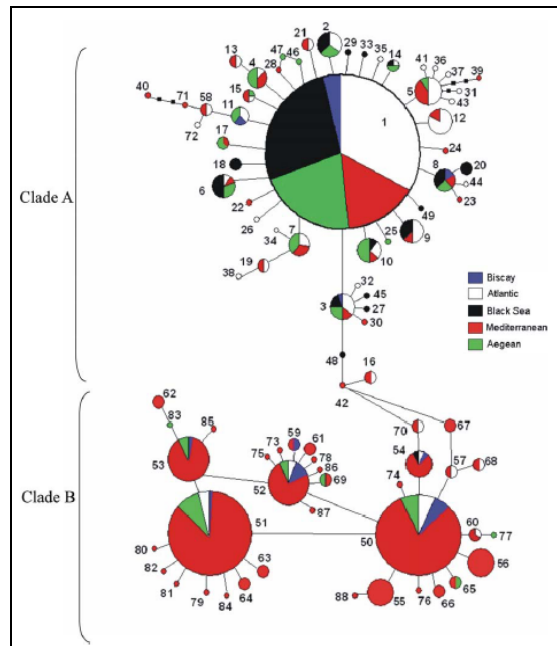
γενετική ομοιογένεια αναπαραγωγικών ατόμων του γαύρου από τη νότια Καταλονία και τον Κόλπο των Λεόντων, και διευρύνουν την περιοχή μελέτης σε ολόκληρη τη βορειοδυτική Μεσόγειο. Επιπλέον, ο Tudela (1999) ενδυναμώνει τα αποτελέσματα της προηγούμενης έρευνάς του χρησιμοποιώντας, εκτός από γενετικές, μορφολογικές και μεριστικές αναλύσεις. Οι Bembo *et al.* (1996a; b) μελέτησαν με τη χρήση αλλοένζυμων τον πολυμορφισμό του γαύρου του Βισκαϊκού Κόλπου και της βορειοδυτικής και κεντρικής Μεσογείου, και βρήκαν μεγάλη διαφοροποίηση σε τρεις τόπους μεταξύ των δειγμάτων του Βισκαϊκού και των δειγμάτων της Μεσογείου.

Ο Borsa (2002) & οι Borsa *et al.* (2004) εξετάζοντας τη σχέση μεταξύ γεωγραφικής και γενετικής απόκλισης χρησιμοποιώντας αλλοένζυμα, μορφολογικά χαρακτηριστικά και πολυμορφισμούς ιντρονίων, υποστήριξαν ότι το είδος *E. encrasicolus* μπορεί να διαχωριστεί σε δύο νέα είδη το *E. encrasicolus* και το *E. albidus* που κατανέμονται σε ωκεάνια και παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα, αντίστοιχα. Οι Grant *et al.* (2005), βασισμένοι στις γενετικές αποστάσεις των αλλοένζυμων, αμφισβήτησαν την παραπάνω άποψη των Borsa *et al.* (2002; 2004) επισημαίνοντας ότι αυτή η απόκλιση μπορεί να συνέβη λόγω διασποράς του *E. eurystole* από τον δυτικό Ατλαντικό Ωκεανό (βλ. Εικόνα 1.1).

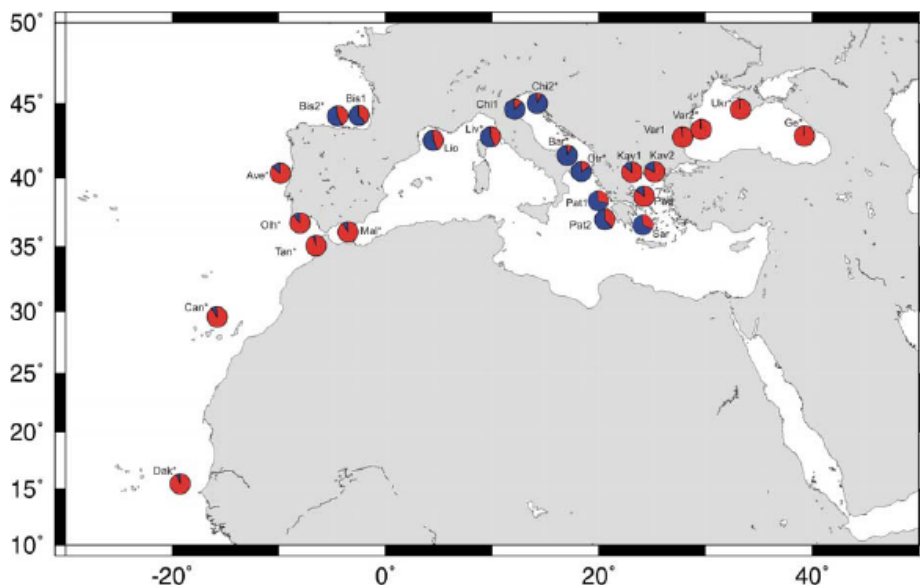
Οι Bembo *et al.* (1995) μελέτησαν τη διάκριση των αποθεμάτων του γαύρου (*E. encrasicolus*) της Μεσογείου χρησιμοποιώντας RFLPs σε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού DNA (γονίδια ND5 και ND6). Στη μελέτη αυτή επιβεβαιώθηκε η γενετική ετερογένεια κυρίως μεταξύ των γαύρων του Αιγαίου και αυτών της Αδριατικής, της Τυρρηνικής και του Ιονίου.

Οι Magoulas *et al.* (1996) χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική σε ολόκληρο το μόριο του μιτοχονδριακού DNA και σε δείγματα από περισσότερες περιοχές, διαπίστωσαν την ύπαρξη δύο ξεχωριστών φυλογενετικών κλάδων του γαύρου, Α και Β (Εικόνα 1.3). Ο κλάδος Α αποτελείται από ένα κεντρικό απλότυπο και αρκετούς σπάνιους περιφερειακούς που απέχουν ένα μεταλλακτικό βήμα από τον κεντρικό, γεγονός που υποδεικνύει πρόσφατη πληθυσμιακή επέκταση. Ο κλάδος Β είναι πολύ πιο σύνθετος και παρουσιάζει υψηλή νουκλεοτιδική ποικιλότητα. Ο κλάδος Α είναι ο μόνος που εμφανίζεται στη Μαύρη Θάλασσα, ενώ η συχνότητά του μειώνεται στο 85% στο Βόρειο Αιγαίο και κάτω από 40% στην υπόλοιπη Μεσόγειο και το Βισκαϊκό Κόλπο. Αυτή η εικόνα οδήγησε τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι η Μαύρη Θάλασσα είναι πιθανώς η περιοχή προέλευσης του κλάδου Α. Σε νεότερη μελέτη των Magoulas *et al.* (2006), όπου συμπεριλήφθηκαν επιπλέον δείγματα από τον

Ατλαντικό και τη Μεσόγειο βρέθηκε ότι στον Ατλαντικό, από τις Αφρικανικές ακτές μέχρι την Πορτογαλία επικρατεί ο κλάδος A σε ποσοστό >80% (Εικόνα 1.4). Αυτό δείχνει ότι η Μαύρη Θάλασσα δεν ήταν η περιοχή προέλευσης του κλάδου A, αλλά μάλλον μια περιοχή αποδέκτης του, καθώς η πηγή προέλευσής του φαίνεται να είναι ο Ατλαντικός Ωκεανός.



**Εικόνα 1.3:** Δέντρο Median joining των 88 απλοτύπων που ανιχνεύτηκαν στον *E. encrasicolus* όπου διακρίνονται οι δύο κλάδοι A και B (Magoulas *et al.* 2006).



**Εικόνα 1.3:** Χάρτης συχνότητας των φυλογενετικών κλάδων του μιτοχονδριακού DNA σε διάφορα πληθυσμιακά δείγματα του *E. encrasicolus*. (Κόκκινο: κλάδος A, μπλέ: κλάδος B) (Magoulas *et al.* 2006).

Τα δεδομένα από τη χρήση του μιτοχονδριακού DNA που δημοσίευσαν οι Magoulas *et al.* (1996) επαναδιατυπώθηκαν συγκεντρωτικά από τον Grant (2005). Ο Grant υποστήριξε την ύπαρξη υψηλής διαφοροποίησης στον πληθυσμό του ευρωπαϊκού γαύρου λόγω της εκτεταμένης ακτογραμμής και της ωκεάνιας πολυπλοκότητας της Μεσογειακής λεκάνης. Ακόμη, πρότεινε ότι, προγονικοί πληθυσμοί των δύο κλάδων, Α και Β, απομονώθηκαν στον Ατλαντικό απ' όπου και εποίκησαν τη Μεσογειακή Λεκάνη σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κατά το Ανώτερο Πλειστόκαινο.

Μελετώντας το μιτοχονδριακό DNA, οι Grant & Bowen (1998), έδειξαν ότι ο γαύρος της νότιας Αφρικής *E. capensis* προέρχεται από τον πληθυσμό του *E. encrasicolus* του βορειοανατολικού Ατλαντικού και της Μεσογείου. Τέλος, οι Grant & Bowen (2006) συνέδεσαν τις κλιματικά οδηγούμενες διακυμάνσεις με τους συχνούς πληθυσμιακούς περιορισμούς ή εξαλείψεις, του γένους *Engraulis*.

Οι Kristoffersen & Magoulas (2008) διερεύνησαν την πληθυσμιακή δομή του γαύρου της βόρειας Μεσογείου μελετώντας το σχήμα του σώματος, τη μορφή και την αύξηση των ωτολίθων, τον πολυμορφισμό μήκους ιντρονίων του πυρηνικού DNA και την ποικιλομορφία του μιτοχονδριακού DNA. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τις αναλογίες των δύο φυλογενετικών κλάδων του μιτοχονδριακού DNA, τις συχνότητες των αλληλόμορφων των πυρηνικών γονιδίων και της μορφής του σώματος και των ωτολίθων, δείχνοντας έτσι ότι υπάρχουν διάφοροι αναπαραγωγικά απομονωμένοι πληθυσμοί του γαύρου στη βόρεια Μεσόγειο.

Οι Ivanova & Dobronolov (2006) χρησιμοποίησαν ηλεκτροφόριση μυϊκών πρωτεϊνών για να μελετήσουν τη γενετική δομή των πληθυσμών του ευρωπαϊκού γαύρου από τη Μαύρη Θάλασσα, την Αζοφική, τη Β. Μεσόγειο και τις ακτές της Δ. Αφρικής. Βασισμένοι σε γενετικά και βιοχημικά δεδομένα, υπέθεσαν την ύπαρξη δύο υποειδών γαύρου, ενός Ευρωπαϊκού και ενός Αφρικανικού. Επίσης, συμπέραναν ότι ο πληθυσμός του Αιγαίου είναι υβριδικός μεταξύ Ευρωπαϊκών και Αφρικανικών πληθυσμών και ότι οι γενετικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών της Μαύρης Θάλασσας και της Αζοφικής δείχνουν ότι πρόκειται για διαφορετικούς πληθυσμούς.

Το 2005, οι Santaclara *et al.*, μελέτησαν τη μοριακή αναγνώριση των γαύρων με PCR-RFLP και FINS (Forensically informative nucleotide sequencing) χρησιμοποιώντας το γονίδιο κυτόχρωμα *b* (*cyt b*) για τη διάκριση των πιο κοινών εμπορικών ειδών γαύρου: *E. encrasicolus*, *E. anchoita*, *E. ringens* και *E. japonicus*.

Υποστήριξαν ότι τα δεδομένα τους επιβεβαιώνουν την άποψη των Borsa *et al.* (2002; 2004) για το διαχωρισμό του είδους *E. encrasicolus* σε δύο υποείδη.

Τέλος, οι Landi *et al.* (2005) συντέλεσαν στην έρευνα της πληθυσμιακής γενετικής δομής του γαύρου, σχεδιάζοντας πέντε πολυμορφικούς μικροδορυφορικούς τόπους για τον ευρωπαϊκό γαύρο. Τρεις από τους πέντε παραπάνω τόπους δεν είναι ιδιαίτερα αξιόπιστοι, καθώς παρουσιάζουν μεγάλο έλλειμμα ετεροζυγωτίας.

#### **1.4 Σκοπός της εργασίας**

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών του γαύρου με τη χρήση του μικροδορυφορικού DNA. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκαν εμπλουτισμένες γενωμικές βιβλιοθήκες για μικροδορυφορικό DNA από άτομα γαύρου (*E. encrasicolus*). Από τις βιβλιοθήκες αυτές επιλέχθηκαν θετικοί κλώνοι, αλληλουχήθηκαν, και για όσους απ' αυτούς περιείχαν κατάλληλη μικροδορυφορική αλληλουχία σχεδιάστηκαν εκκινητές. Επιλέχθηκαν οι καλύτεροι μικροδορυφορικοί τόποι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της γενετικής δομής των πληθυσμών του γαύρου. Η παρούσα μελέτη ολοκληρώθηκε με τη γονοτύπηση 10 πληθυσμιακών δειγμάτων γαύρου (48-100 άτομα για κάθε δείγμα) που καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της γεωγραφική εξάπλωσης του είδους, από τη Μαύρη Θάλασσα μέχρι το Βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό.



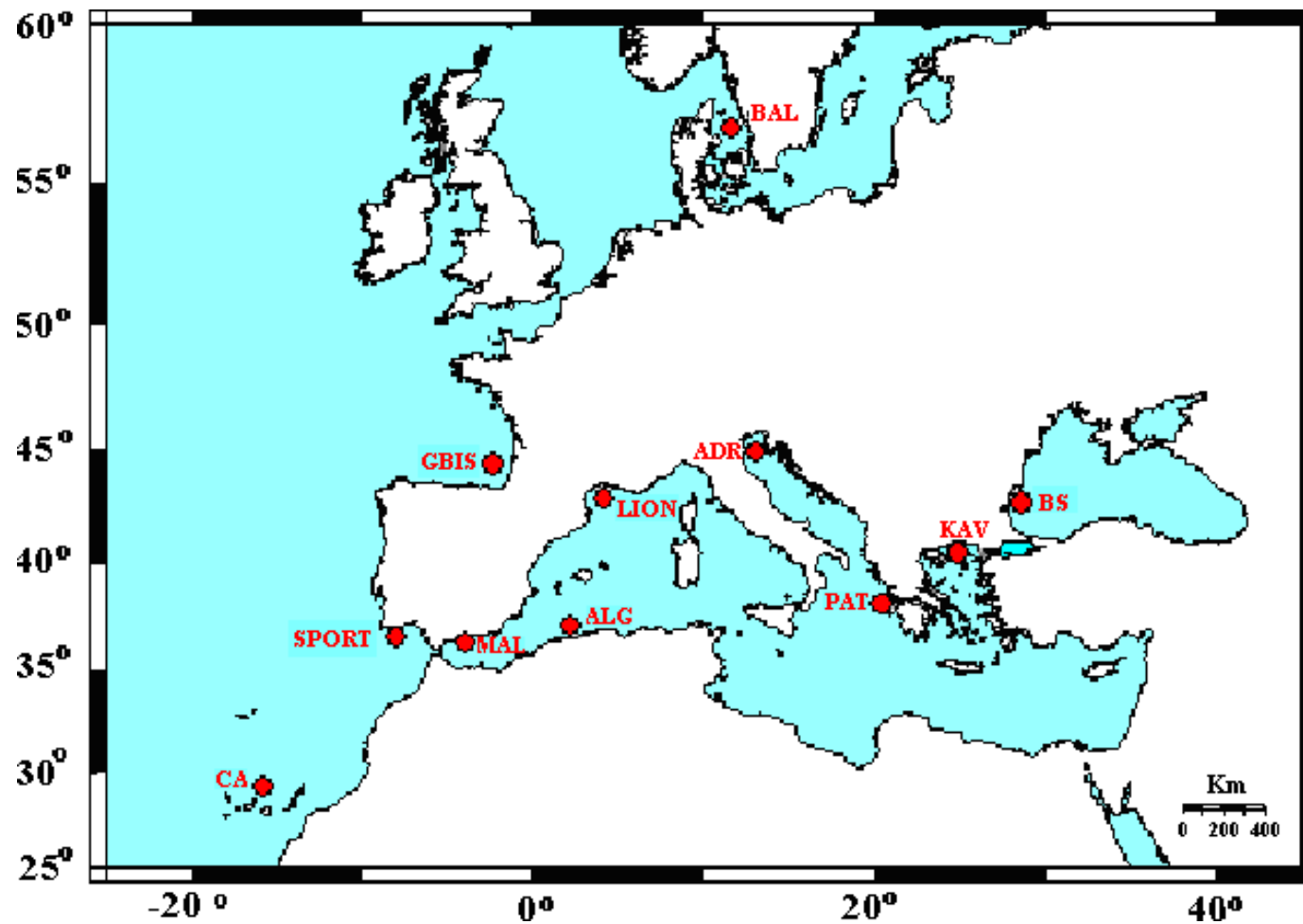
## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δείγματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 891 ενήλικα άτομα γαύρου (*E. encrasicolus*) από 11 διαφορετικές περιοχές (Πίνακας 2.1 και Εικόνα 2.1). Τα δείγματα βρίσκονται αποθηκευμένα στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας και Γενετικής (Ι.ΘΑ.ΒΙ.Γ.) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών της Κρήτης (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) και η εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA (tDNA) είχε γίνει στα πλαίσια προηγούμενων ερευνών.

**Πίνακας 2.1:** Πληροφοριακά στοιχεία για τα δείγματα γαύρου που χρησιμοποιήθηκαν.

Όνομα δείγματος	Περιοχή	Χρόνος συλλογής	Κωδικός αρχείου	Μέγεθος δείγματος
KAV	Καβάλα / Αιγαίο	1989	K	95
BS	Βάρνα - Βουλγαρία / Μαύρη Θάλασσα	1997	BS'' (BU)	96
PAT	Πάτρα / Ιόνιο	1989	P	100
ADR	Chioggia - Ιταλία / Β. Αδριατική	1993	Ad'	61
ALG	Bai de Bou Ismail - Αλγερία / Δ. Μεσόγειος	2003	Alg	96
LION	Κόλπος των Λεόντων - Γαλλία / Δ. Μεσόγειος	1992	Fr	50
SPORT	N. Πορτογαλία / Β.Α. Ατλαντικός	2000	S. Port	93
MAL	Μάλαγα – Ισπανία / Κόλπος Αλπμορά	1998	M	60
BAL	Kattegat / Βαλτική Θάλασσα	2004	St. Nr 9888	13
			St. Nr 9892	43
			St. Nr 9891	40
GBIS	Gironde - Γαλλία / Βισκαϊκός	2000	Gir	96
CA	Κανάρια Νησιά / Ατλαντικός	1999	Ca	48



Εικόνα 2.1: Γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων γαύρου: BAL: Βαλτική, GBIS: Βισκαϊκός, SPORT: Ν. Πορτογαλία, CA: Κανάρια Νησιά, MAL: Μάλαγα, ALG: Αλγερία, LION: Κόλπος των Λεόντων, ADR: Αδριατική, PAT: Πάτρα, KAV: Καβάλα, BS: Μαύρη Θάλασσα.

## **2.2 Ανάπτυξη μικροδορυφορικών δεικτών μέσω εμπλουτισμένης γενωμικής βιβλιοθήκης**

Η ανάπτυξη των μικροδορυφορικών δεικτών έγινε με τη χρήση του πρωτόκολλο εμπλουτισμένης γενωμικής βιβλιοθήκης από τους Edwards *et al.* (1996), τροποποιημένο από τους Tsigenopoulos *et al.* (2003), ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα (Εικόνα 2.2).

### **2.2.1 Εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA**

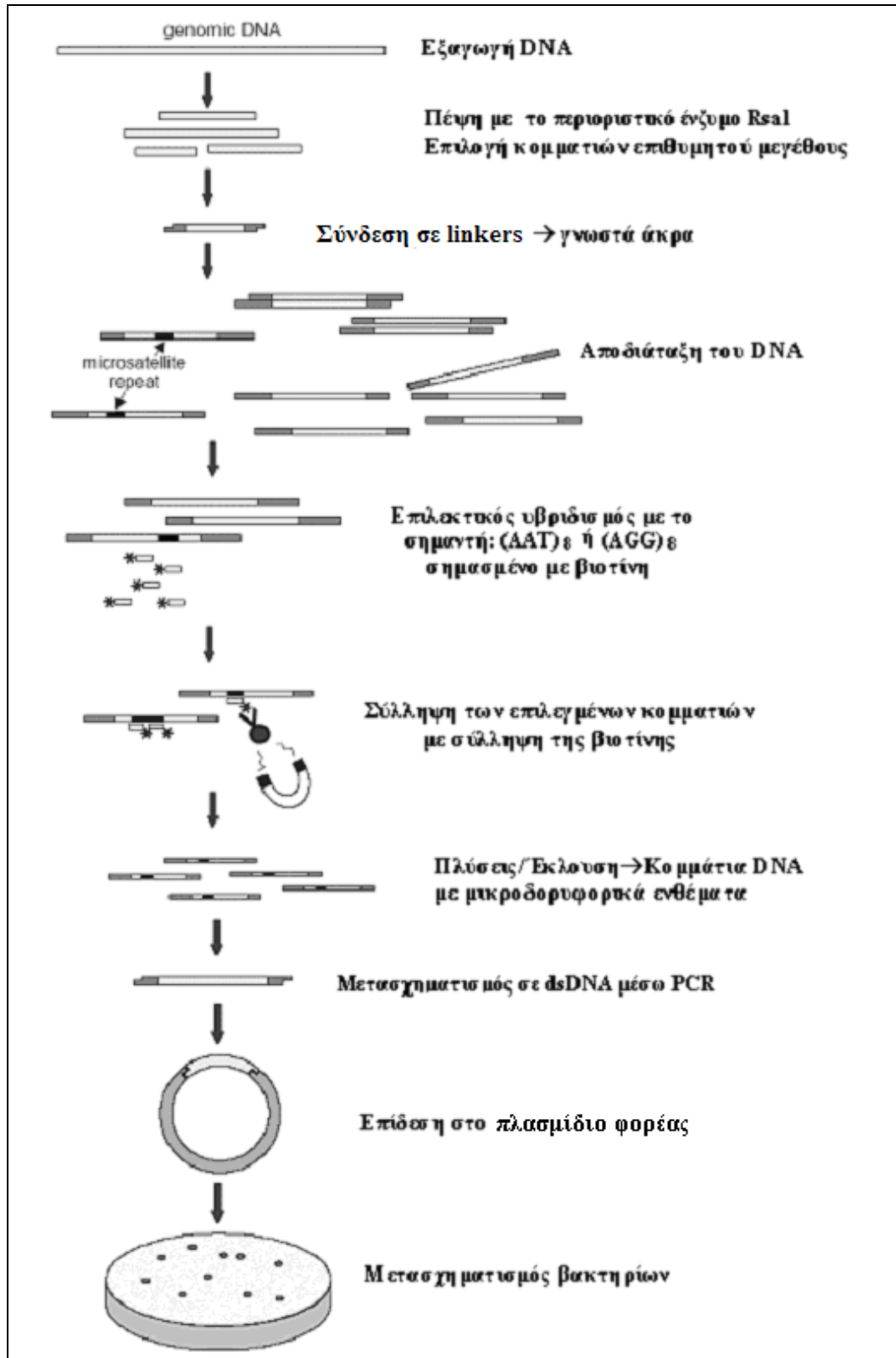
Για την κατασκευή της γενωμικής βιβλιοθήκης έγινε εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA από πέντε άτομα γαύρου σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Miler *et al.* 1988. Τα άτομα αυτά συλλέχθηκαν τον Ιούλιο του 2007, από τη δειγματοληψία του εργαστηρίου Αλιείας του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., στις εκβολές του Νέστου, στο Βόρειο Αιγαίο.

Μετά την εξαγωγή του DNA τα δείγματα αραιώθηκαν με 100 μl διαλύματος TE. Σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ηλεκτροφορήθηκαν για κάθε άτομο, 2 μl από το προϊόν της εξαγωγής. Ως «μάρτυρας μεγέθους» (size marker) χρησιμοποιήθηκε ο Takara 100 bp DNA Ladder (20 ng/ml). Το πήκτωμα αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση εκτέθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός για την οπτικοποίηση των ζωνών DNA και φωτογραφήθηκε. Από τη φωτογραφία του πηκτώματος έγινε εκτίμηση της ποσότητας και της ποιότητας του εξαγόμενου DNA. Το DNA και των πέντε ατόμων ήταν καλής ποιότητας, άφθονο και σε άριστη κατάσταση, και η επιλογή δύο από αυτών, για περαιτέρω χρήση, έγινε τυχαία.

### **2.2.2 Πρωτόκολλο εμπλουτισμού (Enrichment Protocol)**

Δύο άτομα γαύρου (Ee2 και Ee5) χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης. Από το δείγμα Ee2 πάρθηκαν 25 μl tDNA και αραιώθηκαν με 25 μl ddH<sub>2</sub>O, λόγω της αυξημένης πυκνότητας του δείγματος, ενώ από το δείγμα Ee5 πάρθηκαν 50 μl tDNA, χωρίς να γίνει αραιώση. Έπειτα στα δείγματα τοποθετήθηκε 1 μl RNase (10 mg/ml) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα για την απομάκρυνση του RNA. Μετά την επώαση έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε

πήκτωμα αγαρόζης 1%, χρησιμοποιώντας 1 μl DNA. Η φωτογραφία του πήκτωματος έδειξε ότι τα δείγματα είναι αρκετά πυκνά οπότε, στη διαδικασία πέψης του DNA που ακολούθησε, χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα από αυτά.



Εικόνα 2.2: Τα κύρια βήματα του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού (Enrichment Protocol).

## **I. Πέψη του DNA (DNA Digestion/ Restriction)**

Η διαδικασία πέψης του DNA, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου *RsaI* το οποίο παράγει θραύσματα με πλήρη άκρα (blunt-ends). Το ένζυμο *RsaI* κόβει το μόριο DNA δίνοντας προϊόντα μεγέθους κυρίως μεταξύ 300-800 βάσεων. Για κάθε δείγμα γαύρου παρασκευάστηκε διάλυμα 100 μl, το οποίο περιείχε από: 10 μl DNA, 6 μl *RsaI*, 10 μl Enzyme Buffer 10X και 74 μl ddH<sub>2</sub>O. Τα διαλύματα αυτά τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο 37°C για 2,5 ώρες. Μετά την επώαση έγινε μια ακόμα ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιώντας 2 μl DNA, σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, για να διαπιστωθεί αν έγινε πέψη του DNA. Η φωτογραφία του ηλεκτόματος έδειξε την ύπαρξη ζωνών επιθυμητού μεγέθους. Μετά την πέψη τα δείγματα τοποθετήθηκαν για ενζυμική απενεργοποίηση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 15 λεπτά.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία πέψης του DNA, ακολούθησε ο καθαρισμός των δειγμάτων με τη χρήση του Kit NucleoSpin Extract II της Macherey-Nagel (πρωτόκολλο για άμεσο καθαρισμό από προϊόν PCR). Μετά τον καθαρισμό με το Kit έγινε μια ακόμα ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιώντας 2 μl DNA, σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

## **II. Σύνδεση του DNA με συνδέσμους (Ligation to Adaptors/Linkers)**

Ακολούθησε η διαδικασία σύνδεσης του DNA με τους συνδέσμους, όπου ως σύνδεσμοι χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια με συμπληρωματική αλληλουχία, τα Rsa21 και Rsa25:

- ♦ Rsa21 (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3')
- ♦ Rsa25 (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3')

Οι δύο σύνδεσμοι υβριδοποιούνται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα τυφλό άκρο που συνδέεται με το DNA στόχο και ένα cohesive άκρο που θα συνδεθεί με το κατάλληλο βακτηριακό πλασμίδιο-φορέα (vector). Παρασκευάστηκε για κάθε δείγμα, διάλυμα τελικού όγκου 100 μl, που περιείχε: 50 μl DNA μετά την πέψη και τον καθαρισμό, 10 μl από κάθε σύνδεσμο (συγκέντρωσης 50 μM ο καθένας), 10 μl Ligase Buffer 10X, 5 μl λιγάση (3 u/μl) και 25 μl ddH<sub>2</sub>O. Τα παραπάνω διαλύματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο 37°C για 2 ώρες και κατόπιν σε υδατόλουτρο 65°C για 15 λεπτά για την απενεργοποίηση της λιγάσης.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ξανά καθαρισμός με το Kit NucleoSpin Extract II και στην συνέχεια, 2 μl από τα δείγματα, μετρήθηκαν σε συσκευή Nanodrop για την

ποσοτικοποίησή τους. Για κάθε δείγμα παρασκευάστηκαν τρεις αραιώσεις: 1/10, 1/100 και 1/1000 και ακολούθησε αντίδραση PCR για επιβεβαίωση της σύνδεσης των θραυσμάτων DNA με τους συνδέσμους, χρησιμοποιώντας ως εκκινητή (primer) τον Rsa21. Για την αντίδραση PCR παρασκευάστηκαν για κάθε δείγμα, τρία διαλύματα των 25 μl που περιείχαν από: 1 μl DNA από τις παραπάνω αραιώσεις, 2.5 μl Taq Buffer 10X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μl dNTPs (10 mM), 0.2 μl Taq Axxon (5 u/μl) και 16.8 μl ddH<sub>2</sub>O. Ο πολλαπλασιασμός των αντιδράσεων PCR έλαβε χώρα σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή (μηχανή PCR, DYAD<sup>TM</sup>-MJ Research). Η αντίδραση PCR περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- ♦ αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 4 λεπτά.
- ♦ 30 κύκλους που ο καθένας περιλάμβανε: αποδιάταξη του DNA στους 93°C για 45 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση εκκινητών-αλληλουχίας στόχου στους 56°C για 45 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72°C για 90 δευτερόλεπτα.
- ♦ τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά.
- ♦ παραμονή στους 12°C.

Μετά την αντίδραση πολλαπλασιασμού ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, χρησιμοποιώντας για κάθε δείγμα, 2 μl από κάθε αραιώση DNA. Η φωτογραφία του ηλεκτώματος έδειξε την επιτυχή διεξαγωγή της αντίδραση PCR, την απόδοση των αραιώσεων των δειγμάτων και την ύπαρξη επιθυμητών ζωνών μεγέθους 300-1000 βάσεων με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην περιοχή γύρω στις 600 βάσεις όπου αποτελεί το συνηθέστερο μήκος κλώνων.

### **III. Υβριδισμός του DNA με ολιγονουκλεοτίδια σημασμένα με βιοτίνη** **(Hybridization between Ligated DNA and Biotinylated Primers)**

Στο στάδιο αυτό παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα που περιείχαν: 440 μl ddH<sub>2</sub>O και 43 μl DNA από το άτομο Ee2 και 438 μl ddH<sub>2</sub>O και 45 μl DNA από το άτομο Ee5. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν έτσι, ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση περίπου 20 ng/μl και τελικό όγκο 483 μl. Τα παραπάνω διαλύματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο 95°C για 15 λεπτά, για να αποδιαταχθούν οι αλυσίδες του DNA και στη συνέχεια προστέθηκαν σ' αυτά από 20 μl ολιγονουκλεοτιδίων σημασμένων με βιοτίνη στο 5' άκρο τους. Στο άτομο Ee2 προστέθηκε το βιοτινιλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο (AAT)<sub>8</sub> ενώ στο άτομο Ee5 προστέθηκε το βιοτινιλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο (AGG)<sub>8</sub>. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο 95°C για 30 δευτερόλεπτα. Μετά το πέρας των 30

δευτερολέπτων, στα διαλύματα προστέθηκαν από 13 μl SSC 20X. Στη συνέχεια, τα δείγματα, ανάλογα με το βιοτινιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που περιείχαν, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία, ώστε να υβριδοποιηθούν οι βιοτινιωμένοι εκκινητές με τα κομμάτια του DNA που περιείχαν την συμπληρωματική μικροδορυφορική ακολουθία. Το βιοτινιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο (AAT)<sub>8</sub> χρειάστηκε υδατόλουτρο 48°C για 2 ώρες. Αυτή η θερμοκρασία προκύπτει από το άθροισμα των δεσμών υδρογόνου που περιέχουν οι βάσεις του, πολλαπλασιασμένο με τον αριθμό των επαναλήψεών τους, δηλαδή  $2+2+2=6$ ,  $6*8=48$ . Αντίστοιχα για το βιοτινιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο (AGG)<sub>8</sub> έχουμε  $2+3+3=8$ ,  $8*8=64$  δηλαδή, παραμονή του διαλύματος Ee5 σε υδατόλουτρο 64°C για 2 ώρες. Κάθε 15 λεπτά γίνονταν ήπια ανάδευση των διαλυμάτων και επανατοποθέτησή τους στο υδατόλουτρο.

#### **IV. Σύλληψη με παραμαγνητικά σφαιρίδια (Capture by Paramagnetic Particles)**

Για την σύλληψη των τμημάτων DNA που είναι προσδεμένα με τους βιοτινιωμένους εκκινητές (τα οποία αναμένεται να περιέχουν την επιθυμητή μικροδορυφορική αλληλουχία) χρησιμοποιήθηκαν παραμαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Η σύλληψη των προϊόντων του επιλεκτικού υβριδισμού γίνεται με τη σύνδεση της βιοτίνης με την στρεπταβιδίνη. Τα παραμαγνητικά σφαιρίδια διατίθενται στο εμπόριο (Promega Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles®) μέσα σε υδατικό διάλυμα και πριν τη χρήση είναι απαραίτητη η πλύση τους, τρεις φορές, με 300 μl SSC 0.5X, με τη βοήθεια ειδικής μαγνητικής βάσης. Μετά την πλύση προστέθηκαν 100 μl SSC 0.5X στα αφυδατωμένα σφαιρίδια για τη διαλυτοποίησή τους. Στη συνέχεια, στα σφαιρίδια προστέθηκε το DNA που είχε υβριδοποιηθεί με τον αντίστοιχο βιοτινιωμένο μικροδορυφορικό ολιγονουκλεοτίδιο και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, με ελαφρά περιοδική ανάδευση ανά δύο λεπτά, για να συνδεθεί η βιοτίνη με την στρεπταβιδίνη. Έπειτα, μαγνητίστηκαν τα σφαιρίδια στην ειδική μαγνητική βάση και αφαιρέθηκε το διάλυμα. Ακολούθησαν δύο πλύσεις των σφαιριδίων με 300 μl SSC 0.1X θερμοκρασίας 50°C και δύο επόμενες πλύσεις των σφαιριδίων με 300 μl SSC 0.1X θερμοκρασίας δωματίου για την απομάκρυνση των θραυσμάτων DNA που δεν είχαν υβριδοποιηθεί με τα μικροδορυφορικά ολιγονουκλεοτίδια. Στη συνέχεια έγινε έκλυση του δεσμευμένου στα σφαιρίδια DNA, με προσθήκη 100 μl ddH<sub>2</sub>O

50°C στα αφυδατωμένα σφαιρίδια, επαναιώρηση των σφαιριδίων και επαναμαγνήτιση. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ειδικά φιαλίδια (eppendorfs). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για μια ακόμα φορά σε κάθε δείγμα, προσθέτοντας από 120 μl ddH<sub>2</sub>O 50°C και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ξανά σε νέα φιαλίδια. Τα τέσσερα φιαλίδια που συγκεντρώθηκαν τοποθετήθηκαν για περαιτέρω χρήση στους -20°C.

Ακολούθησε αντίδραση PCR, για την επιβεβαίωση της έκλουσης του DNA και τη μετατροπή του σε δίκλωνο DNA. Για την αντίδραση PCR παρασκευάστηκε, για κάθε δείγμα, διάλυμα των 50 μl που περιείχε από: 10 μl DNA, 5 μl Taq Buffer 10X, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μl dNTPs (10 mM), 5 μl Rsa21 (10 μM), 0.5 μl Taq Axxon (5 u/μl) και 25.5 μl ddH<sub>2</sub>O. Η αντίδραση πολλαπλασιασμού είναι ίδια με εκείνη του σταδίου B (Ligation), τροποποιώντας μόνο το στάδιο της επέκτασης στους 72°C από 90 σε 105 δευτερόλεπτα.

Μετά την αντίδραση πολλαπλασιασμού πάρθηκαν 3 μl από κάθε δείγμα και το υπόλοιπο καθαρίστηκε με τη χρήση του Kit NucleoSpin Extract II (πρωτόκολλο για άμεσο καθαρισμό από PCR προϊόν). Στη συνέχεια 3 μl από κάθε δείγμα πριν και μετά τον καθαρισμό, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% για να ελεγχθεί η επιτυχία των τελευταίων σταδίων.

#### **V. Σύνδεση του DNA με βακτηριακό φορέα (vector) και μετασηματισμός των βακτηριακών κυττάρων**

Για τη σύνδεση του DNA με το βακτηριακό φορέα χρησιμοποιήθηκε το TOPO TA Cloning kit (Invitrogen). Κάθε αντίδραση σύνδεσης περιείχε: 2 μl προϊόν PCR, 1 μl Salt Solution, 1 μl TOPO Vector και 2 μl ddH<sub>2</sub>O (τελικός όγκος 6 μl). Ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων, παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά και άμεση τοποθέτησή τους σε πάγο. Έπειτα προστέθηκαν 2 μl από την παραπάνω αντίδραση σε ένα φιαλίδιο κυττάρων Mach1 cell-*E.coli* (Invitrogen). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε τρεις φορές, μια για κάθε δείγμα και μια για την παρασκευή τυφλού διαλύματος (Negative) που παρασκευάστηκε με προσθήκη πλασμιδίου χωρίς ένθεμα σε κύτταρα Mach1. Έγινε επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 25 λεπτά και ακολούθησε θερμικό σοκ (Heat Shock) για 30 δευτερόλεπτα σε υδατόλουτρο 42°C και άμεση μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο. Στο στάδιο αυτό τα τοιχώματα των βακτηριακών κυττάρων γίνονται διαπερατά, ώστε να εισέλθει το πλασμίδιο μέσα στα κύτταρα. Τέλος, στα δείγματα προστέθηκαν από 250 μl SOC



medium και στη συνέχεια επώσθησαν σε ειδική συσκευή με ανάδευση στους 37°C για 1 ώρα.

Για την επίστρωση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν πέντε τρυβλία με στερεό θρεπτικό διάλυμα LB και αντιβιοτικό καναμικίνη, που είχαν τοποθετηθεί νωρίτερα στους 37°C. Στα τρυβλία αυτά έγινε άσηπτο άπλωμα 40 µl X-gal και τοποθετήθηκαν στους 37°C για 30 λεπτά. Το X-gal είναι ανάλογο της λακτόζης και κύτταρα που έχουν πλασμίδιο χωρίς ένθεμα το μεταβολίζουν σε β-γαλακτοσιδάση, η οποία προσδίδει μπλε χρώμα στην αποικία. Κύτταρα που έχουν προσλάβει πλασμίδιο με ένθεμα παράγουν λευκές αποικίες, καθώς η θέση ένθεσης διακόπτει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (LacZa). Δύο διαφορετικές ποσότητες από κάθε δείγμα (15 και 25 µl) επιστρώθηκαν σε τέσσερα από τα παραπάνω τρυβλία. Το πέμπτο τρυβλίο επιστρώθηκε με το τυφλό δείγμα. Και τα πέντε τρυβλία επώσθησαν στους 37°C για 24 ώρες και κατόπιν ελέγχθηκε ποια ποσότητα διαλύματος κυττάρων δίνει τη βέλτιστη πυκνότητα των αποικιών. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν και τα υπόλοιπα κύτταρα στα τρυβλία και επώσθησαν όπως προηγουμένως. Κατόπιν επιλέχθηκαν οι λευκές αποικίες και μεταφέρθηκαν σε αριθμημένα, διαγραμμισμένα, τετράγωνα πιάτα που περιείχαν στερεό θρεπτικό διάλυμα LB και καναμικίνη, τα οποία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 24 ώρες.

Από τα τετράγωνα πιάτα έγινε μεταφορά τμήματος των αποικιών σε πλάκες PCR που περιείχαν από 20 µl ddH<sub>2</sub>O. Στις πλάκες αυτές ακολούθησε λύση των κυττάρων μέσω θερμικού σοκ στους 95°C για 5 λεπτά. Μετά το θερμικό σοκ έγινε φυγοκέντρηση των πλακών για 5 λεπτά στις 3700 στροφές.

#### **VI. Αντίδραση PCR για διαλογή των κλώνων που περιέχουν επαναλήψεις (PCR screening of clones containing repeats)**

Για τη διαλογή των κλώνων που περιέχουν το επιθυμητό επαναλαμβανόμενο μοτίβο πραγματοποιήθηκε τριπλή αντίδραση PCR (με τρεις εκκινητές), χρησιμοποιώντας ως DNA μήτρα 1µl από το υπερκείμενο καθεμίας από της παραπάνω πλάκες. Στη τριπλή αυτή αντίδραση PCR, παρασκευάστηκε, για το δείγμα Ee2, ένα διάλυμα 10 µl που περιείχε από: 1 µl DNA, 1 µl Taq Buffer 10X, 0.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µl dNTPs (10 mM), 0.5 µl primer:

- ♦ T7: (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (10 µM),
- ♦ Sp6: (5'-ATTCTATAGTGTACCTAAAT-3') (10 µM),

0.5 μl repeat primer (AAT)<sub>8</sub> (10 μM), 0.1 μl Taq Αχxon (5 u/μl) και 5.6 μl ddH<sub>2</sub>O. Για το δείγμα Ee5, παρασκευάστηκε αντίστοιχο διάλυμα χρησιμοποιώντας ως τρίτο εκκινητή τον (AGG)<sub>8</sub> αντί του (AAT)<sub>8</sub>. Η τριπλή αντίδραση PCR περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- ♦ αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 3 λεπτά.
- ♦ 35 κύκλους που ο καθένας περιλάμβανε: αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 1 λεπτό, υβριδοποίηση εκκινητών-αλληλουχίας στόχου στους 48°C για 1 λεπτό και επέκταση στους 72°C για 1 λεπτό.
- ♦ τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά.
- ♦ παραμονή στους 12°C.

Μετά τη τριπλή αντίδραση πολλαπλασιασμού ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αραρόζης 1.7%, χρησιμοποιώντας για κάθε δείγμα 10μl DNA. Η φωτογραφία του πηκτώματος έδειξε την επιτυχία της αντίδρασης PCR και την ύπαρξη κυττάρων *E. coli* που περιείχαν το πλασμίδιο με το επιθυμητό επαναλαμβανόμενο τμήμα. Κλώνοι με περισσότερες από δύο ζώνες θεωρούνται θετικοί. Κλώνοι με μια μόνο ζώνη περιέχουν το πλασμίδιο χωρίς το επαναλαμβανόμενο τμήμα.

## **VII. Εξαγωγή πλασμιδίων (Plasmid Extraction) (με FilterPlates της Millipore®)**

Για την εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA, οι παραπάνω θετικοί κλώνοι εμβολιάστηκαν σε ειδικές πλάκες 96 θέσεων (Dear Well Plates) που περιείχαν από 1.78 ml LB και 500 μl καναμικίνη. Στη συνέχεια οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε συσκευή επώασης με ανακίνηση στους 37°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, 90 μl από την καλλιέργεια των Dear Well Plates τοποθετήθηκαν σε νέες πλάκες PCR που περιείχαν 10 μl Hogness 10X, επώασθηκαν στους 37°C για 24 ώρες και αποθηκεύτηκαν στους -20°C για μελλοντική χρήση.

Στα Dear Well Plates με την υπόλοιπη καλλιέργεια, έγινε φυγοκέντρηση στους 4°C για 30 λεπτά στις 3700 στροφές. Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό, προσέχοντας να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα που είχαν καθιζάνει στη βάση των θέσεων της πλάκας. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 170 μl διαλύματος GTE/-RNAse (διάλυμα P1), διαλύοντας με πιπετταρίσματα τα κύτταρα που είχαν καθιζάνει, και κατόπιν προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 170 μl διαλύματος P2. Έγινε ήπια ανάδευση των πλακών και παραμονή τους για 5 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη 170  $\mu\text{l}$  διαλύματος P3, τοποθετήθηκε ειδική αυτοκόλλητη μεμβράνη και έγινε τρεις φορές αναστροφή των πλακών για να ομογενοποιηθούν τα υλικά. Οι πλάκες παρέμειναν σε πάγο για 5 λεπτά και έγινε ξανά τρεις φορές αναστροφή τους.

Σε νέα αποστειρωμένα Deep Well Plates τοποθετήθηκαν από 540  $\mu\text{l}$  ισοπροπανόλης. Πάνω από τα νέα αυτά Plates προσαρμόστηκαν ειδικά Filterplates (Millipore) και μεταφέρθηκε σ' αυτά όλο το περιεχόμενο με τα διαλυμένα κύτταρα από τις πλάκες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 60 λεπτά στις 3700 στροφές. Κατά τη φάση αυτή το πλασμιδιακό DNA διαπερνά το φίλτρο και πέφτει μέσα στην ισοπροπανόλη, όπου και κατακρημνίζεται ενώ το υπόλοιπο βακτηριακό DNA παραμένει στο φίλτρο. Μετά τη φυγοκέντρηση αφαιρέθηκε όλο το υπερκείμενο υγρό με αναστροφή της πλάκας και προστέθηκαν από 200  $\mu\text{l}$  EtOH 70%. Έπειτα έγινε μια ακόμη φυγοκέντρηση στους  $4^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά στις 3700 στροφές, χωρίς τα Filterplates αυτή τη φορά. Μετά τη φυγοκέντρηση αφαιρέθηκε πάλι όλο το υπερκείμενο υγρό, με ιδιαίτερη προσοχή. Τέλος, οι πλάκες αφέθηκαν για ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά τη ξήρανση τοποθετήθηκαν από 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, διαλύοντας την πελέτα του DNA που υπήρχε στη βάση τους. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των πλακών και παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Τα περιεχόμενο των πλακών μεταφέρθηκε σε πλάκες PCR και από αυτές πάρθηκε από 1  $\mu\text{l}$  DNA για την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Οι φωτογραφίες των πηκτωμάτων και η ενδεικτική μέτρηση των δειγμάτων σε συσκευή Nanodrop βοήθησαν στην ποσοτικοποίηση των πλασμιδίων.

### **2.2.3 Αντίδραση αλληλούχησης (Sequencing)**

Για την αντίδραση αλληλούχησης χρειάστηκε, για κάθε δείγμα, συγκέντρωση DNA μεταξύ 100-400 ng/ $\mu\text{l}$ . Παρασκευάστηκε διάλυμα 10  $\mu\text{l}$  που περιείχε την ανάλογη ποσότητα DNA και ddH<sub>2</sub>O, 1.5  $\mu\text{l}$  Buffer 5X, 1  $\mu\text{l}$  Big Dye v.31 (Applied Biosystems) και 0.16  $\mu\text{l}$  primer T<sub>7</sub> ή primer Sp6 (10  $\mu\text{M}$ ). Στα δείγματα που παρουσίαζαν δυσκολίες στην αλληλούχηση λόγω υψηλού περιεχομένου σε G/C, παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε την ανάλογη ποσότητα DNA και ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{l}$  Buffer 5X, 1.3  $\mu\text{l}$  Big Dye v.31, 0.7  $\mu\text{l}$  dGTP's Big Dye (Applied Biosystems) και

0.32  $\mu$ l primer T<sub>7</sub> ή primer Sp6 (10  $\mu$ M). Η Sequencing PCR σε κάθε περίπτωση περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- ♦ προεπώση του DNA στους 96°C για 3 λεπτά.
- ♦ 35 κύκλους που ο καθένας περιλάμβανε: αποδιάταξη στους 96°C για 10 δευτερόλεπτα, πρόσδεση του εκκινητή στους 50°C για 20 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 60°C για 4 λεπτά. Μεταξύ κάθε σταδίου η μεταβολή της θερμοκρασίας ήταν 1°C / δευτερόλεπτο.
- ♦ παραμονή στους 12°C.

#### **2.2.4 Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντος sequencing (Sequencing cleanup/EDTA-NaOC-EtOH precipitation) και αλληλούχηση των κλώνων**

Μετά τη sequencing PCR ακολούθησε ο καθαρισμός του προϊόντος. Έτσι, σε κάθε δείγμα προστέθηκε από 0.25  $\mu$ l EDTA 500 mM και από 1  $\mu$ l οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa). Ακολούθησε ήπια φυγοκέντρηση (spin) των δειγμάτων και προσθήκη από 20.24  $\mu$ l αιθανόλης 99%. Έγινε ανάδευση με ήπιο Vortex και παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C για 30 λεπτά στις 3700 στροφές. Μετά η πλάκα PCR που περιείχε τα δείγματα τοποθετήθηκε ανάστροφα πάνω σε απορροφητικό χαρτί και φυγοκεντρήθηκε στις 600 στροφές για 20 δευτερόλεπτα και ακολούθησε προσθήκη από 70  $\mu$ l EtOH 70%. Έγινε ξανά φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C για 15 λεπτά στις 3700 στροφές και πάλι ανάστροφη φυγοκέντρηση στις 600 στροφές για 20 δευτερόλεπτα. Τέλος τα δείγματα αφέθηκαν για ξήρανση στους 37°C για 2 ώρες.

Μετά τον καθαρισμό στα δείγματα προστέθηκαν από 10  $\mu$ l HiDi Formamide (Applied Biosystems) και ακολούθησε η αντίδραση αποδιάταξης του DNA (Denaturation) πριν τα δείγματα τοποθετηθούν στον ABI 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems) για αλληλούχηση.

### 2.3. Επεξεργασία των αλληλουχιών και σχεδιασμός των εκκινητών

Η επεξεργασία των αλληλουχιών έγινε με τη συνδυασμένη χρήση των προγραμμάτων **Bio Edit 7.0.0** (Hall 1999) και **Lasergene SeqMan v7.0.0** (DNASTAR). Με το τελευταίο πρόγραμμα ελέγχθηκε η παρουσία του ίδιου ενθέματος σε διαφορετικούς κλώνους. Οι ελεγχόμενες αλληλουχίες αξιολογήθηκαν ως προς την ποιότητά τους, την παρουσία, τον τύπο και το μέγεθος μικροδορυφορικής επανάληψης, καθώς και την παρουσία περιοχών ικανού μήκους (> 20 βάσεις) και υψηλής πολυπλοκότητας εκατέρωθεν της μικροδορυφορικής επανάληψης για το σχεδιασμό εκκινητών.

Επιλέχθηκαν αλληλουχίες με μικροδορυφορικό μοτίβο σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: α) δινουκλεοτιδικό μοτίβο 6-40 επαναλήψεων, τρι- τέτρα- και πέντα-νουκλεοτιδικό μοτίβο μεγαλύτερο των 5 επαναλήψεων καθώς και ορισμένα σύνθετα μοτίβα. Γι' αυτές τις αλληλουχίες έγινε σχεδιασμός εκκινητών εκατέρωθεν της μικροδορυφορικής επανάληψης με τη χρήση του προγράμματος **Primer 3** (Rozen & Scaletsky 1998), και ορίζοντας τις ακόλουθες παραμέτρους: μήκος εκκινητών: 20 βάσεις κατά μέσο όρο,  $T_m$  περίπου 60°C, GC content 20-80% και μέγιστος αριθμός επανάληψης μιας βάσης, στις περιοχές εκατέρωθεν της μικροδορυφορικής αλληλουχίας, 3-4 φορές.

Οι γενικές αρχές που πρέπει να ακολουθούνται κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών είναι οι ακόλουθες: (Gelfand & White 1990):

- ♦ Να αποφεύγονται αλληλουχίες που δημιουργούν ενδομοριακές ή διαμοριακές δευτεροταγείς δομές.
- ♦ Οι αλληλουχίες να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους και ιδιαίτερα στο 3' άκρο γιατί αυτό μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό διμερών εκκινητών.
- ♦ Καλό είναι οι δύο εκκινητές να έχουν παρόμοιο ποσοστό σε G+C βάσεις έτσι ώστε να έχουν παρόμοια  $T_m$  και να μπορούν να υβριδισθούν ικανοποιητικά στην ίδια περίπου θερμοκρασία.
- ♦ Φυσικά ο σχεδιασμός των εκκινητών πρέπει να γίνει έτσι ώστε να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με την προς ενίσχυση αλληλουχία. Για τον σωστό υβριδισμό περισσότερο σημαντικές είναι οι βάσεις στα άκρα των εκκινητών. Η παρουσία G ή C στην περιοχή αυτή συμβάλει στη σωστή πρόσδεση του 3' άκρου, διότι σχηματίζονται ισχυρότεροι δεσμοί υδρογόνου.

- ♦ Έχει αναφερθεί επίσης πως καλό είναι να αποφεύγεται η T στο 3' άκρο των εκκινητών, γιατί εμφανίζει μεγαλύτερη πιθανότητα να υβριδισθεί μη ειδικά σε σχέση με τις υπόλοιπες βάσεις που μπορεί να καταλάβουν το 3' άκρο.

#### **2.4. Βελτιστοποίηση των εκκινητών, Multiplex και γονοτύπηση των δειγμάτων**

Μετά το σχεδιασμό των εκκινητών ακολούθησε η παραγγελία τους και μετέπειτα η βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR ώστε να πολλαπλασιάζεται ειδικά ο αντίστοιχος μικροδορυφορικός τόπος. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR έγινε ενδεικτικά σε τέσσερα άτομα διαφορετικών πληθυσμών (Πάτρας, Καβάλας, Βισκαϊκού και Μαύρης Θάλασσας). Χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικές συνθήκες συνδυάζοντας τρεις θερμοκρασίες σύνδεσης ( $T_a$ ) 55, 58 και 61°C και δύο συγκεντρώσεις  $MgCl_2$ , 1.5 και 3.0 mM. Οι αντιδράσεις PCR είχαν τελικό όγκο 10  $\mu$ l και περιείχαν από: 1  $\mu$ l DNA (συγκέντρωσης 20-80 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l Taq Buffer 10X, 0.2  $\mu$ l dNTPs (10 mM), 0.04  $\mu$ l Taq Αχχον (5 u/ $\mu$ l), 0.4  $\mu$ l από τον εκάστοτε primer forward (F) (10  $\mu$ M), 0.4  $\mu$ l από τον εκάστοτε primer reverse (R) (10  $\mu$ M), 1.5 ή 3.0 mM  $MgCl_2$  και την ανάλογη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O. Ο πολλαπλασιασμός των αντιδράσεων PCR έλαβε χώρα σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή και η εκάστοτε αντίδραση PCR περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- ♦ αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 2 λεπτά.
- ♦ 35 κύκλους που ο καθένας περιλάμβανε: αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 45 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση εκκινητών-αλληλουχίας στόχου στους 55/ 58/ 60°C για 45 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72°C για 45 δευτερόλεπτα.
- ♦ τελική επέκταση στους 72°C για 5 λεπτά.
- ♦ παραμονή στους 12°C.

Στη συνέχεια το προϊόν της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% για να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης PCR σε κάθε συνθήκη. Για τους γενετικούς τόπους που εμφανίσθηκε μία καθαρή ζώνη PCR στο αναμενόμενο μέγεθος παραγγέλθηκε ο forward (F) εκκινητής σημασμένος με ένα από τα 4 είδη φθορίζουσών χρωστικών: FAM, TAMRA, ROX ή HEX και με τη χρήση τους έγινε η αντίστοιχη βελτιστοποίησή των συνθηκών PCR ( $T_a$  και  $MgCl_2$ ) με ηλεκτροφόρηση στον αυτόματο γενετικό αναλυτή ABI 3700. Όσοι γενετικοί τόποι έδιναν

πολυμορφικό και ευανάγνωστο πρότυπο αλληλομόρφων χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση αντιδράσεων πολλαπλής PCR (multiplex PCR). Η multiplex PCR είναι μια μέθοδος PCR, η οποία χρησιμοποιείται για γενετικό έλεγχο, ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών, καθώς και άλλες εφαρμογές όπου κρίνεται απαραίτητος ο ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός (σε μια αντίδραση) αρκετών γενετικών τόπων. Κατά το σχεδιασμό των multiplex PCR λήφθηκε υπόψη να είναι παρόμοια η θερμοκρασία σύνδεσης ( $T_a$ ) των γενετικών τόπων, να διαφέρουν σε μέγεθος τα προϊόντα κάθε τόπου και να είναι διαφορετική η χρωστική σήμανσης του F εκκινητή (ή τουλάχιστον γενετικοί τόποι των οποίων ο F εκκινητής είναι σημασμένος με την ίδια χρωστική, να δίνουν προϊόντα διαφορετικού μεγέθους). Οι multiplex αντιδράσεις PCR είχαν τελικό όγκο 10  $\mu$ l και για την παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα αντίστοιχα με εκείνα των απλών αντιδράσεων PCR. Ο πολλαπλασιασμός των multiplex αντιδράσεων PCR έλαβε χώρα σε αυτόματο θερμοκόκυκλοποιητή με στάδια ίδια με εκείνα των απλών αντιδράσεων PCR. Στη συνέχεια, οι multiplex αντιδράσεις PCR αραιώθηκαν με την προθήκη 40  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Ένα μικρόλιτρο ( $\mu$ l) από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε πλάκες ABI όπου προστέθηκαν από 12  $\mu$ l HiDi Formamide που περιείχαν 0.2  $\mu$ l μάρτυρα μεγέθους LIZ 500 (Applied Biosystems). Ακολούθησε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5 λεπτά και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον ABI 3700 DNA Sequencer για τη γονοτύπησή τους.

Για την ανάγνωση των γονοτύπων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **STRand** (Toonen 2007). Άτομα για τα οποία υπήρχε αμφιβολία στη γονοτύπηση ή δεν είχε επιτυχία η αντίδραση PCR ή η ηλεκτροφόρηση, επαναλήφθηκαν.

## 2.5. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των γονοτυπήσεων

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **MicroChecker v2.2.1** (Van Oosterhout *et al.* 2004) για να ελεγχθούν τα δεδομένα, ανά μικροδορυφορικό τόπο και πληθυσμό, για πιθανά σφάλματα κατά τη γονοτύπηση που σχετίζονται: α) με την παρουσία μηδενικών αλληλομόρφων (null alleles), δηλαδή αλληλόμορφων που αποτυγχάνουν να ενισχυθούν κατά το στάδιο της PCR λόγω μεταλλαγής στη θέση πρόσδεσης των εκκινητών, β) stuttering (μικρές αλλαγές στα μεγέθη των αλληλόμορφων και δευτερεύοντα προϊόντα που εμφανίζονται κατά την PCR) και γ) απώλεια μεγάλων

αλληλομόρφων (large allele dropout) λόγω του ότι τα μεγάλα αλληλόμορφα μπορεί να μην ενισχύονται τόσο αποτελεσματικά όσο τα μικρά κατά την PCR.

Οι αλληλικές και γονοτυπικές συχνότητες, οι τιμές της παρατηρούμενης (Hobs) και της αναμενόμενης (Hexp) ετεροζυγωτίας, η γενετική ποικιλομορφία και η αφθονία των αλληλομόρφων υπολογίσθηκαν με τη χρήση των προγραμμάτων **GENETIX 4.05** (Belkhir 2000) και **FSTAT 2.9.3** (Goudet 1995).

Η απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) ανά γενετικό τόπο και πληθυσμό ελέγχθηκε με τρεις διαφορετικές δοκιμές: α) exact H-W test, β) U test για έλλειμμα ετεροζυγωτών και γ) U test για πλεόνασμα ετεροζυγωτών, με τη χρήση του προγράμματος **GenePop 3.4** (Raymond & Rousset, 1995). Με το ίδιο πρόγραμμα έγινε δοκιμή για ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) μεταξύ των γενετικών τόπων και υπολογίσθηκαν οι τιμές των συντελεστών ( $F_{IS}$ ), ( $F_{ST}$ ) και ( $F_{IT}$ ) ανά τόπο για όλους τους πληθυσμούς.

Το  $F_{IS}$  είναι δείκτης διαφοροποίησης μεταξύ των ατόμων (I, individual) στον πληθυσμό (S, subpopulation). Η παράμετρος  $F_{IS}$  δείχνει την απόκλιση της συχνότητας των ετεροζυγωτών, από την αναμενόμενη από την ισορροπία Hardy-Weinberg, μέσα στους πληθυσμούς και μπορεί να πάρει θετικές και αρνητικές τιμές.

Το  $F_{IT}$  είναι δείκτης διαφοροποίησης μεταξύ των ατόμων (I) σε σχέση με ολόκληρο το σύνολο των πληθυσμών (T, total population). Η παράμετρος  $F_{IT}$  μετράει την απόκλιση της συχνότητας των ετεροζυγωτών, από την αναμενόμενη από την ισορροπία Hardy-Weinberg, στον ενιαίο πληθυσμό που προκύπτει από τη συγκέντρωση όλων των υποπληθυσμών και ως εκ τούτου βοηθάει στο να εκτιμηθεί εάν υπάρχει σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των υποπληθυσμών. Μπορεί να λάβει θετικές ή αρνητικές τιμές εάν ο πληθυσμός διαιρείται σε υποπληθυσμούς.

Το  $F_{ST}$  είναι δείκτης διαφοροποίησης μεταξύ δύο πληθυσμών (S) σε σχέση με το σύνολο των πληθυσμών (T). Η παράμετρος  $F_{ST}$  αποτελεί μέτρο της αρχής του Wahlund (Wahlund 1928) και μετρά το ποσοστό της γενετικής διαφοροποίησης ανάμεσα στους πληθυσμούς. Μπορεί να πάρει μόνο θετικές τιμές από 0 έως 1, όπου η τιμή 0 δείχνει ότι υπάρχει πλήρης γενετική ομοιότητα ανάμεσα στους πληθυσμούς. Τιμές της  $F_{ST}$  ακόμα και 0.05 (5%) δείχνουν μικρή γενετική διαφοροποίηση, τιμές από 0.05 (5%) έως 0.15 (15%) δηλώνουν μέτρια διαφοροποίηση, τιμές από 0.15 (15%) έως 0.25 (25%) δηλώνουν μεγάλη διαφοροποίηση, ενώ εάν η τιμή της  $F_{ST}$  υπερβαίνει το 0.25 (25%) η διαφοροποίηση μεταξύ των υποπληθυσμών θεωρείται πολύ μεγάλη (Wright 1978, Hartl & Clark 1997).



Ελέγχθηκαν στατιστικά οι διαφορές στην κατανομή των αλληλικών και γονοτυπικών συχνοτήτων ανά ζεύγη μεταξύ των πληθυσμιακών δειγμάτων χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Fisher (Fisher's exact tests) όπως αυτές εφαρμόζεται στο **GenePop 3.4**.

Η γενετική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων εκτιμήθηκε μέσω των τιμών  $F_{ST}$  που υπολογίστηκαν μεταξύ όλων των ζευγών των δειγμάτων και οι τιμές σημαντικότητας  $p$  ( $p$ -values) εκτιμήθηκαν μέσω 1000 επαναλήψεων bootstrap επί των δεδομένων, με το πρόγραμμα **ARLEQUIN 3.0** (Excoffier *et al.* 2005). Με τη χρήση του προγράμματος **MEGA 3.1** (Kumar *et al.* 2004) κατασκευάστηκε άρριζο ακτινωτό δενδρόγραμμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο σύνδεσης γειτόνων (Neighbor Joining) και τις γενετικές αποστάσεις  $F_{ST}$ .

Τα επίπεδα σημαντικότητας των πολλαπλών δοκιμών ρυθμίστηκαν χρησιμοποιώντας τις διαδοχικές διορθώσεις κατά Bonferroni (Rice 1989).

Η ιεραρχική δομή των πληθυσμών εκτιμήθηκε μέσω AMOVA (Analysis of Molecular Variance) (Excoffier *et al.* 1992) με τη χρήση του προγράμματος **SAMOVA 1.0** (SAMOVA, Spatial Analysis of MOlecular VAriance) (Duranloup *et al.* 2002). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μια προσέγγιση για να ορίσει τις ομάδες των πληθυσμών που είναι γεωγραφικά πλησιέστερες και ταυτόχρονα εμφανίζουν τη μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ τους. Στηρίζεται σε μια διαδικασία προσομοίωσης που στοχεύει στο να μεγιστοποιήσει το ποσοστό της ολικής γενετικής ποικιλότητας που οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των ομάδων πληθυσμών. Μαζί με τα γενετικά δεδομένα στο πρόγραμμα εισάγονται και οι γεωγραφικές συντεταγμένες των δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε θεωρώντας 2-10 ομάδες πληθυσμών.

Η Παραγοντική Ανάλυση των Αντιστοιχιών (AFC "Analyse Factorielle des Correspondances" ή FCA "Factorial Correspondence Analysis") που περιγράφηκε από τον Benzecri (1973) υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος **GENETIX 4.05** (Belkhir 2000). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, αρχικά πραγματοποιείται μετασχηματισμός των γονοτύπων των ατόμων για τους υπό μελέτη γενετικούς τόπους σε πίνακα συνάφειας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολλαπλού πίνακα συνάφειας (multiple contingency table). Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύνδεση του παραπάνω πίνακα με νέφος σημείων  $N(I)$  τοποθετημένων σε χώρο  $K$  διαστάσεων ( $R_k$ ) (She *et al.* 1987). Η μέτρηση της σχέσης μεταξύ δύο οποιωνδήποτε σημείων του χώρου  $R_k$  πραγματοποιείται με τη  $\chi^2$  απόσταση του Benzecri (Benzecri  $\chi^2$ ). Η απόσταση αυτή χρησιμοποιείται στη

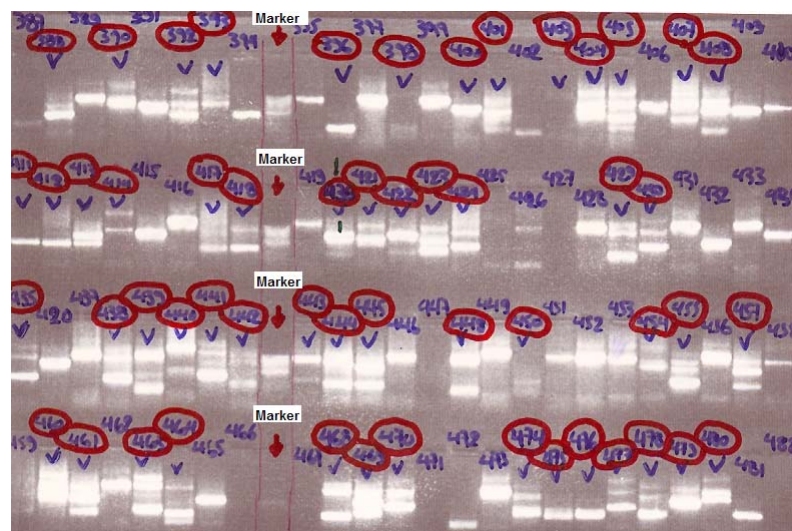
συνέχεια στην Ανάλυση Συνιστωσών (Benzecri 1973). Η επιλογή της πιθανολογικής αυτής απόστασης δικαιολογείται από την ιδιότητά της να προσθέτει διαφορετικές γραμμές ή στήλες ενός πίνακα συνάφειας χωρίς να μεταβάλλει τη γεωμετρία του νέφους  $N(I)$  (She *et al.* 1987). Η τελική θέση ενός ατόμου (σημείου) στο γράφημα καθορίζεται από το γονότυπο (αλληλόμορφα) του ατόμου αυτού σε όλους τους γενετικούς τύπους.

Η δοκιμή Mantel χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της συσχέτισης μεταξύ γενετικών και γεωγραφικών αποστάσεων, με τη χρήση του διαδικτυακού προγράμματος **IBDWS v3.15** (Jensen 2005). Η θεωρία της απομόνωσης λόγω απόστασης (Isolation by Distance) αναφέρει ότι, εάν η χωρική διασπορά είναι περιορισμένη, άτομα από πληθυσμούς που είναι σε στενή εγγύτητα είναι πιθανότερο να διασταυρωθούν μεταξύ τους απ' ό,τι με άτομα πιο απομακρυσμένων πληθυσμών. Κατά συνέπεια, οι συχνότητες των αλληλομόρφων γειτονικών πληθυσμών είναι περισσότερο όμοιες μεταξύ τους απ' ό,τι εκείνες απομακρυσμένων πληθυσμών. Οι γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ των τοποθεσιών των δειγμάτων (η πλησιέστερη θαλάσσια απόσταση εντός της ισοβαθούς των 200 μέτρων, όπου ήταν δυνατόν) μετρήθηκαν σε χιλιόμετρα (kilometers) με τη χρήση του λογισμικού Google Earth. Έγινε παλινδρόμηση των γενετικών αποστάσεων κατά Rousset ( $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ) έναντι των γεωγραφικών αποστάσεων. Η κλίση και το σημείο τομής με τον άξονα των  $y$  της ευθείας παλινδρόμησης υπολογίστηκαν με παλινδρόμηση RMA (reduced major axis).

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Ανάπτυξη μικροδορυφορικών γενετικών τόπων στο γαύρο και βελτιστοποίηση των συνθηκών PCR

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας απομονώθηκαν συνολικά 1110 λευκές αποικίες (604 αποικίες από το άτομο Ee2 και 506 αποικίες από το άτομο Ee5) οι οποίες έφεραν ένθεμα προερχόμενο από εμπλουτισμένο για μικροδορυφορικά, κατακερματισμένο γενωμικό DNA γαύρου. Ο έλεγχος μέσω της αντίδρασης PCR με 3 εκκινήτες (Εικόνα 3.1) έδειξε ότι από τους 1110 κλώνους, οι 162 από το άτομο Ee2 (27%) και οι 185 από το άτομο Ee5 (36%) είχαν ένθεμα που πιθανώς περιείχε μικροδορυφορική αλληλουχία.



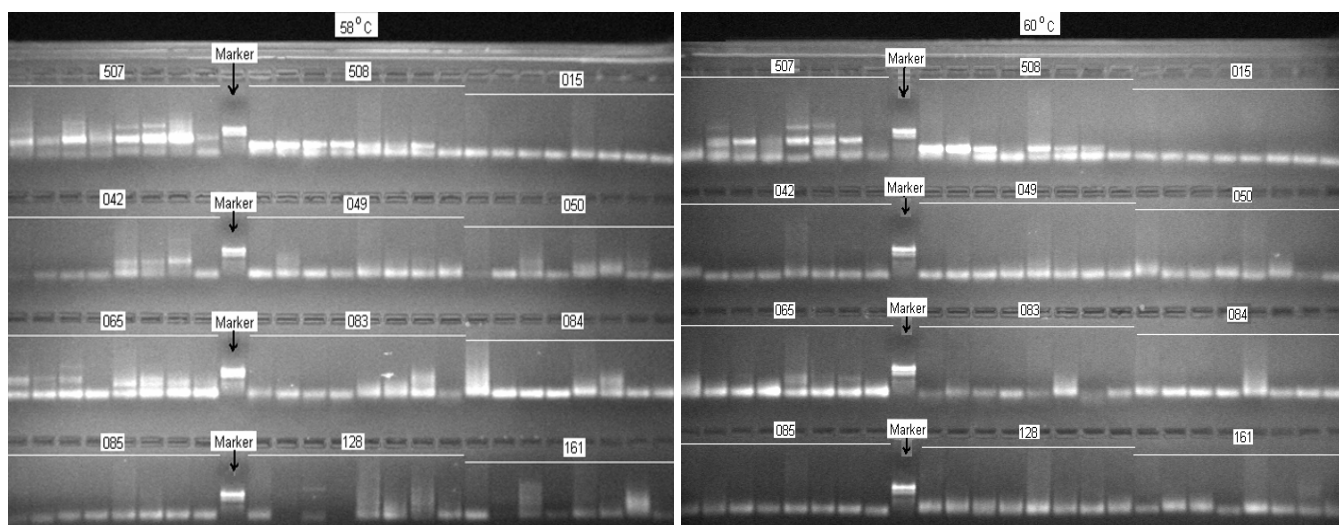
**Εικόνα 3.1:** Προϊόντα της τριπλής PCR, 96 κλώνων του δείγματος Ee5. Κλώνοι με περισσότερες από δύο ζώνες περιέχουν μικροδορυφορική αλληλουχία (κόκκινη επισήμανση).

Αυτοί οι κλώνοι αλληλουχήθηκαν και κατόπιν επελέγησαν εκείνοι που περιείχαν μικροδορυφορική αλληλουχία με κατάλληλο αριθμό επαναλήψεων (δινουκλεοτιδικό μοτίβο 6-40 επαναλήψεων, τρι- τέτρα- και πέντα-νουκλεοτιδικό μοτίβο μεγαλύτερο των 5 επαναλήψεων και ορισμένα σύνθετα μοτίβα) καθώς και περιοχές εκατέρωθεν της μικροδορυφορικής επανάληψης με υψηλή πολυπλοκότητα και ικανό μέγεθος (> 20 νουκλεοτίδια) για το σχεδιασμό εκκινήτων. Έτσι, από τις 347

αλληλουχίες, 88 χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό εκκινητών εκατέρωθεν της μικροδορυφορικής αλληλουχίας. Στο Παράρτημα I φαίνονται τα χαρακτηριστικά όλων των μικροδορυφορικών εκκινητών που σχεδιάστηκαν για το γαύρο.

Από τα 88 ζεύγη εκκινητών που σχεδιάστηκαν τελικά παραγγέλθηκαν τα 51 (26 για το άτομο Ee2 και 25 για το άτομο Ee5), που αντιστοιχούσαν στους καλύτερους μικροδορυφορικούς τύπους από άποψη ποιότητας και μεγέθους μικροδορυφορικής επανάληψης.

Ο έλεγχος απόδοσης της PCR σε διάφορες συνθήκες, έδειξε ότι από τους 51 μικροδορυφορικούς τύπους οι 27 (21 το άτομο Ee2 και 6 για το άτομο Ee5) έδωσαν προϊόν αναμενόμενου μεγέθους (με βάση την αλληλουχία του κλώνου) τουλάχιστον σε μία συνθήκη. Οι υπόλοιποι 24 δεν είχαν ικανοποιητική απόδοση (δεν έδωσαν προϊόν ή έδωσαν προϊόν αλλά μη αναμενόμενου μεγέθους ή με πολλά παραπροϊόντα). Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζεται η απόδοση 12 ενδεικτικών μικροδορυφορικών τύπων σε δύο θερμοκρασίες αποδιάταξης (58 και 60°C) και δύο συγκεντρώσεις MgCl<sub>2</sub> (1.5 και 3.0 mM).



**Εικόνα 3.2:** Απόδοση 12 μικροδορυφορικών τύπων σε θερμοκρασίες αποδιάταξης 58°C (αριστερά) και 60°C(δεξιά). Για κάθε τύπο τα πρώτα τέσσερα άτομα έχουν συγκέντρωση MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM και τα επόμενα τέσσερα συγκέντρωση 3.0 mM.

Αυτοί οι 27 μικροδορυφορικοί τύποι παραγγέλθηκαν σημασμένοι με φθορίζουσα χρωστική: FAM, TAMRA, ROX ή HEX για κάθε forward (F) εκκινητή. Σε αυτό το στάδιο βελτιστοποίησης επιλέχθηκαν 13 μικροδορυφορικοί τύποι για το άτομο Ee2 και 2 για το άτομο Ee5 (σύνολο 15 τύποι). Από τη γονοτύπηση 8 ατόμων γαύρου διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, διαπιστώθηκε ότι 3 από τους 15 μικροδορυφορικούς τύπους ήταν μονομορφικοί, διότι και στους 8 πληθυσμούς που

εξετάσθηκαν απέδιδαν ένα μόνο αλληλόμορφο. Οι υπόλοιποι 12 μικροδορυφορικοί τόποι εμφάνιζαν ικανοποιητικό επίπεδο πολυμορφισμού και χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω πληθυσμιακή ανάλυση των 891 ατόμων γαύρου. Στον Πίνακα 3.1 δίδονται τα χαρακτηριστικά των παραπάνω 12 μικροδορυφορικών τόπων.

Οι 12 μικροδορυφορικοί τόποι συνδυάστηκαν σε τέσσερις Multiplex PCR. Η πρώτη περιελάμβανε τους τόπους Ee2\_091, Ee2\_135, Ee2\_483b και Ee2\_508 σε θερμοκρασία σύνδεσης ( $T_a$ ) 55°C και συγκέντρωση  $MgCl_2$  1.5 mM. Η δεύτερη περιελάμβανε τους τόπους Ee2\_165b, Ee2\_452 και Ee5\_245 σε θερμοκρασία σύνδεσης ( $T_a$ ) 59°C και συγκέντρωση  $MgCl_2$  2.5 mM. Η τρίτη περιελάμβανε τους τόπους Ee2\_477, Ee2\_507 και Ee5\_376 σε θερμοκρασία σύνδεσης ( $T_a$ ) 60°C και συγκέντρωση  $MgCl_2$  1.5 mM. Και η τέταρτη περιελάμβανε τους τόπους Ee2\_091b και Ee2\_407 σε θερμοκρασία σύνδεσης ( $T_a$ ) 60°C και συγκέντρωση  $MgCl_2$  2.0 mM.

**Πίνακας 3.1:** Χαρακτηρισμός των 12 πολυμορφικών μικροδορυφορικών τόπων του ευρωπαϊκού γαύρου *E. encrasicolus*. **T<sub>a</sub>:** θερμοκρασία σύνδεσης σε °C και **Σήμανση:** φθορίζουσα χρωστική του F εκκινητή. Στην πρώτη στήλη οι διαφορετικοί χρωματισμοί συμβολίζουν την ομαδοποίηση των μικροδορυφορικών τόπων σύμφωνα με τα τέσσερα multiplex που χρησιμοποιήθηκαν. Όλοι οι τόποι γονοτυπήθηκαν με βάση το μικροδορυφορικό τους μοτίβο, εκτός από τον τόπο Ee2\_477 που είχε αλληλόμορφα που απείχαν κατά μία βάση και του τόπου Ee2\_507 που γονοτυπήθηκε ως δινουκλεοτιδικός.

A/A	Μικροδ. τύπος	Επαναλαμβανόμενο μοτίβο	Αλληλουχία εκκινητών	T <sub>a</sub> (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Εύρος αλληλομόρφων (bp)	Σήμανση
1	Ee2_091	(AGG)12	F5' AGAGCAGGTTCTTGCTGTGG R5' TGTGGTGCCTACTATCAGG	55	1.5	199-292	HEX
2	Ee2_091b	(CCGCA)8	F5' GGTCTTGAGCTTGGCATAGG R5' CCGGAAGACACTCTGCACAC	60	2.0	100-295	FAM
3	Ee2_135	(ATTAG)10	F5' AGGGCAGTGACAGGAGAGTC R5' TCGTTACCCTGCGTTTATACTG	55	1.5	105-170	HEX
4	Ee2_165b	(CCT)7	F5' GGGTGGGTAAAGATGAAGC R5' AGGGATCTTCAGGGAACCAG	59	2.5	151-202	TAMRA
5	Ee2_407	(CA)13	F5' AGGAATCTCCTTCCCGTCTC R5' GTGGGTCTGTGGGTGTTTTG	60	2.0	136-272	HEX
6	Ee2_452	(AC)13	F5' CCAACCCTAGGGAGACATC R5' TCGTTCAGCAAGCATACACC	59	2.5	235-313	FAM
7	Ee2_477	(AGG)7	F5' TTGGTGAGGAAGCAACAGTG R5' TAAGATGGCACGCTGACTTG	60	1.5	209-338	FAM
8	Ee2_483b	(AGG)11	F5' ATGAGAAGGAGGACGGTGTG R5' AATGGGATAGCTCGTTGTGC	55	1.5	169-247	FAM
9	Ee2_507	(GAAA)14GAAC(GAAA)6GAGA(GAAA)4	F5' GGAAGGGACCTAGATGGAGTG R5' ATCCATTGATGTCCTGAGC	60	1.5	223-379	TAMRA
10	Ee2_508	(AGG)8	F5' CACATGCTCGCTAAACATTG R5' ACCTGATGCTGCTTGGTAGC	55	1.5	156-216	ROX
11	Ee5_245	(TG)7(CG TG)5	F5' CGCCACCTCCTCATAATACC R5' GTAGGCACACATGCATACCC	59	2.5	116-190	FAM
12	Ee5_376	(TG)11	F5' CCACACCTACGGTGAGTGAC R5' GCAAAGAGAATAGCACATGCAG	60	1.5	148-274	TAMRA

### 3.2 Γενετική διαφοροποίηση εντός των δειγμάτων

Η ανάλυση των πληθυσμιακών δειγμάτων με το πρόγραμμα MicroChecker έδειξε ότι δύο από τους δώδεκα μικροδορυφορικούς τόπους, ο Ee5\_245 και ο Ee5\_376, εμφανίζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας σε όλους τους υπό μελέτη πληθυσμούς. Οι μικροδορυφορικοί τόποι Ee2\_507 και Ee2\_477 εμφανίζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας σε 9 από τους 11 πληθυσμούς, ο τόπος Ee2\_483b σε 6 πληθυσμούς, ενώ οι υπόλοιποι γενετικοί τόποι εμφανίζουν έλλειμμα ετεροζυγωτίας σε δύο ή λιγότερους πληθυσμούς. Αυτό το έλλειμμα ετεροζυγωτίας πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία μηδενικών αλληλόμορφων (Πίνακας 3.2). Τρεις μικροδορυφορικοί τόποι (Ee2\_477, Ee2\_483b και Ee2\_507) φαίνεται να εμφανίζουν προβλήματα stuttering σε 3 και από 1 πληθυσμούς αντίστοιχα, ενώ κανένας τόπος δεν εμφάνισε πρόβλημα απώλειας αλληλομόρφων μεγάλου μεγέθους. Τα αποτελέσματα των δοκιμών για απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg συμφωνούν με τα αποτελέσματα του MicroChecker και οι αποκλίσεις οφείλονται αποκλειστικά σε έλλειμμα ετεροζυγωτίας.

**Πίνακας 3.2:** Αποτελέσματα των αναλύσεων με βάση το πρόγραμμα MicroChecker. Αναμενόμενος και παρατηρούμενος αριθμός ομοζυγών ατόμων ανά τόπο για κάθε πληθυσμιακό δείγμα στις περιπτώσεις που εμφανίζεται έλλειμμα ετεροζυγωτίας, πιθανώς οφειλόμενο σε παρουσία μηδενικών αλληλομόρφων. **st:** περιπτώσεις που πιθανώς να υπάρχει πρόβλημα stuttering.

	ADR	ALG	BAL	BS	CA	GBIS	KAV	LION	MAL	PAT	SPORT
Ee2_091							12.4/23		7.9/17		
Ee2_091b		22.5/35									
Ee2_135				15.9/23					8.0/14		
Ee2_165											
Ee2_407											
Ee2_452				8/14							
Ee2_477	6.0/17	6.3/31 st		9.1/21	3.9/8	10.6/30 st		4.7/13	5.0/13 st	11.3/27	6.4/18
Ee2_483b					5.1/20 st	21.2/31		9.4/19	9.6/18	20.3/30	11.9/25
Ee2_507	3.1/13	4.8/11	6.2/11	4.7/10 st	2.8/7	4.9/19	4.5/14		3.2/8	4.8/15	
Ee2_508		12.6/28	11.6/19		5.1/10				8.7/23	33.0/43	10.2/18
Ee5_245	6.7/33	7.2/40	8.1/53	9.4/37	3.3/20	8.4/44	9.3/33	4.7/20	5.8/35	9.3/50	7/42
Ee5_376	5.9/21	10.5/28	11.1/19	8.3/22	15.2/27	8.3/28	7.2/42	4.3/12	10.7/28	6.9/36	11.6/29

Οι τιμές του συντελεστή ομομιξίας  $F_{IS}$  ανά τόπο για το σύνολο των πληθυσμών (Πίνακας 3.3) δείχνουν ότι ο τόπος Ee5\_245 εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή (0.4125). Ο συντελεστής πληθυσμιακής υποδιαίρεσης  $F_{ST}$  κυμαίνεται από 0.0012 για τον τόπο Ee2\_165b έως 0.0447 για τον τόπο Ee5\_376, με μέση τιμή για όλους τους τόπους ίση με 0.0156. Ο τόπος Ee2\_407 εμφανίζει το μεγαλύτερο αριθμό αλληλομόρφων ( $N_A=60$ ) ενώ ο τόπος Ee2\_165b το μικρότερο ( $N_A=12$ ).

**Πίνακας 3.3:** Χαρακτηρισμός των 12 πολυμορφικών μικροδορυφορικών τόπων του ευρωπαϊκού γαύρου *E. encrasicolus*. Συντελεστές εγκαθίδρυσης ( $F_{IS}$ ), ( $F_{ST}$ ) και ( $F_{IT}$ ) ανά γενετικό τόπο,  $N_A$ : αριθμός αλληλομόρφων και (Hobs) μέσος παρατηρούμενος και (Hexp) μέσος αναμενόμενος βαθμός ετεροζυγωτίας.

Μικροδ. Τόπος	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$	$N_A$	Hobs	Hexp
Ee2_091	0.0665	0.0050	0.0711	24	0.80514	0.86585
Ee2_091b	0.0255	0.0066	0.0319	18	0.78121	0.79950
Ee2_135	0.0291	0.0024	0.0314	15	0.83630	0.85689
Ee2_165b	0.0170	0.0012	0.0182	12	0.58955	0.59660
Ee2_407	0.0323	0.0171	0.0489	60	0.82386	0.85095
Ee2_452	0.0430	0.0098	0.0524	35	0.88219	0.92030
Ee2_477	0.1637	0.0419	0.1987	45	0.74106	0.88582
Ee2_483b	0.1339	0.0066	0.1396	22	0.70197	0.82581
Ee2_507	0.0930	0.0024	0.0951	41	0.86669	0.95296
Ee2_508	0.0908	0.0427	0.1297	18	0.73305	0.80879
Ee5_245	0.4125	0.0018	0.4135	37	0.53773	0.91641
Ee5_376	0.2569	0.0447	0.2901	54	0.65250	0.88058
<b>Μέση τιμή</b>	<b>0.1184</b>	<b>0.0156</b>	<b>0.1321</b>			

Οι μέσες τιμές αναμενόμενης (Hexp) και παρατηρούμενης (Hobs) ετεροζυγωτίας, η τυπική απόκλισή τους και ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων για κάθε πληθυσμό φαίνονται στον Πίνακα 3.4. Στον ίδιο πίνακα, ο μέγιστος μέσος αριθμός αλληλομόρφων (20) εμφανίζεται στον πληθυσμό της Ν. Πορτογαλίας και ο ελάχιστος (16.417) στους πληθυσμούς της Βαλτικής και του Κόλπου των Λεόντων (Γαλλία).



**Πίνακας 3.4:** Μέσες τιμές αναμενόμενης (Hexp), παρατηρούμενης (Hobs) ετεροζυγωτίας, τυπική απόκλισή τους και μέσος αριθμός αλληλομόρφων για κάθε πληθυσμό.

	<b>Hexp</b>	<b>Hobs</b>	<b>N<sub>A</sub>/ τόπο</b>
<b>ADR</b>	0.8455	0.7582	18.500
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.1053	0.1306	
<b>ALG</b>	0.8486	0.7223	18.583
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.0903	0.1110	
<b>BAL</b>	0.8132	0.7355	16.417
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.1177	0.1363	
<b>BS</b>	0.8442	0.7833	17.833
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.1001	0.0998	
<b>CA</b>	0.8506	0.7401	16.667
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.1039	0.1507	
<b>GBIS</b>	0.8396	0.7402	18.167
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.0937	0.1024	
<b>KAV</b>	0.8336	0.7473	18.667
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.0996	0.1037	
<b>LION</b>	0.8431	0.7700	16.417
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.0946	0.1202	
<b>MAL</b>	0.8450	0.7165	16.750
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.0979	0.1526	
<b>PAT</b>	0.8370	0.7323	19.417
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.1039	0.1295	
<b>SPORT</b>	0.8501	0.7596	20.000
<b>Τυπ. αποκλ.:</b>	0.1045	0.1389	

Ο Πίνακας 3.5 παρουσιάζει τις τιμές της αναμενόμενης (Hexp) και της παρατηρούμενης (Hobs) ετεροζυγωτίας και τον αριθμό των αλληλομόρφων (N<sub>A</sub>) ανά πληθυσμό για κάθε μικροδορυφορικό τόπο. Η μεγαλύτερη απόκλιση της μέσης αναμενόμενης προς τη μέση παρατηρούμενη ετεροζυγωτία εμφανίζεται για το μικροδορυφορικό τόπο Ee5\_245 (0.486) στον πληθυσμό της Μάλαγα και ο μέγιστος αριθμός αλληλομόρφων συναντάται στον πληθυσμό του Βισκαϊκού (N<sub>A</sub>=40) για το μικροδορυφορικό τόπο Ee5\_376. Θα πρέπει

ακόμα να σημειωθεί ότι, για τους μισούς περίπου μικροδορυφορικούς τόπους (7/12), ο πληθυσμός της Ν. Πορτογαλίας απέδωσε το μέγιστο αριθμό αλληλομόρφων.

**Πίνακας 3.5:** Τιμές της αναμενόμενης (Hexp) και της παρατηρούμενης (Hobs) ετεροζυγωτίας και αριθμός των αλληλομόρφων ( $N_A$ ) ανά πληθυσμό για κάθε μικροδορυφορικό τόπο.

Γενετικός Τόπος	Γενετικός Πληθυσμός											
	ADR	ALG	BAL	BS	CA	GBIS	KAV	LION	MAL	PAT	SPORT	
Ee2_091	Hexp.	0.869	0.843	0.831	0.878	0.854	0.867	0.869	0.876	0.866	0.855	0.8524
	Hobs.	0.853	0.777	0.771	0.885	0.771	0.821	0.758	0.84	0.712	0.84	0.8295
	$N_A$	14	14	11	13	13	13	14	13	13	14	17
Ee2_091b	Hexp.	0.832	0.765	0.766	0.824	0.796	0.759	0.807	0.802	0.812	0.799	0.7738
	Hobs.	0.853	0.635	0.729	0.865	0.771	0.76	0.8	0.82	0.797	0.79	0.7738
	$N_A$	16	10	8	10	8	8	9	8	10	10	10
Ee2_135	Hexp.	0.835	0.862	0.822	0.835	0.87	0.854	0.848	0.867	0.864	0.853	0.8536
	Hobs.	0.869	0.84	0.792	0.76	0.896	0.792	0.853	0.92	0.763	0.83	0.8851
	$N_A$	10	11	9	10	11	12	11	12	10	12	11
Ee2_165b	Hexp.	0.536	0.618	0.577	0.565	0.611	0.632	0.643	0.611	0.56	0.613	0.553
	Hobs.	0.607	0.558	0.573	0.594	0.604	0.635	0.632	0.6	0.6	0.6	0.4828
	$N_A$	5	6	6	6	7	6	5	8	6	7	8
Ee2_407	Hexp.	0.835	0.824	0.871	0.801	0.9	0.866	0.775	0.849	0.862	0.858	0.8547
	Hobs.	0.787	0.761	0.844	0.76	0.875	0.885	0.716	0.8	0.915	0.85	0.869
	$N_A$	24	20	20	22	20	24	26	23	21	26	23
Ee2_452	Hexp.	0.922	0.921	0.914	0.915	0.921	0.922	0.904	0.915	0.895	0.923	0.9031
	Hobs.	0.918	0.883	0.896	0.851	0.896	0.884	0.853	0.86	0.9	0.89	0.8736
	$N_A$	19	24	19	22	21	18	23	19	18	21	26
Ee2_477	Hexp.	0.902	0.927	0.607	0.904	0.916	0.887	0.901	0.905	0.917	0.886	0.9253
	Hobs.	0.721	0.644	0.59	0.777	0.826	0.681	0.872	0.74	0.783	0.727	0.7907
	$N_A$	21	25	16	19	19	19	22	19	23	24	26
Ee2_483b	Hexp.	0.842	0.814	0.757	0.809	0.893	0.78	0.818	0.811	0.838	0.797	0.8628
	Hobs.	0.754	0.755	0.698	0.768	0.583	0.677	0.758	0.62	0.695	0.7	0.7126
	$N_A$	15	15	11	12	14	12	13	11	13	14	16
Ee2_507	Hexp.	0.95	0.946	0.935	0.95	0.941	0.948	0.953	0.936	0.947	0.952	0.955
	Hobs.	0.787	0.875	0.884	0.894	0.851	0.798	0.853	0.96	0.867	0.85	0.9157
	$N_A$	29	27	26	30	28	28	31	23	29	32	31
Ee2_508	Hexp.	0.832	0.863	0.88	0.842	0.892	0.737	0.659	0.725	0.855	0.67	0.8819
	Hobs.	0.836	0.696	0.802	0.874	0.787	0.708	0.663	0.72	0.617	0.57	0.7907
	$N_A$	15	14	12	13	13	15	11	12	14	11	13
Ee5_245	Hexp.	0.89	0.923	0.916	0.901	0.931	0.913	0.902	0.905	0.903	0.907	0.9222
	Hobs.	0.459	0.57	0.448	0.611	0.583	0.542	0.653	0.6	0.417	0.5	0.5333
	$N_A$	19	27	24	23	25	23	22	19	20	23	27
Ee5_376	Hexp.	0.903	0.878	0.883	0.91	0.683	0.911	0.924	0.914	0.822	0.931	0.8639
	Hobs.	0.656	0.674	0.8	0.761	0.438	0.699	0.558	0.76	0.533	0.64	0.6588
	$N_A$	35	30	35	34	21	40	37	30	24	39	32

Ο έλεγχος για ανισορροπία σύνδεσης (**linkage disequilibrium**) έδειξε τέσσερα ζεύγη μικροδορυφορικών τόπων να εμφανίζουν ανισορροπία σύνδεσης σε 5 διαφορετικούς πληθυσμούς (Πίνακας 3.6). Πιο συγκεκριμένα οι μικροδορυφορικοί τόποι Ee2\_091 και Ee2\_091b εμφανίζονται να είναι συνδεδεμένοι στους πληθυσμούς της Αλγερίας και του Βισκαϊκού, οι μικροδορυφορικοί τόποι Ee2\_507 και Ee2\_452 εμφανίζονται να είναι συνδεδεμένοι στους πληθυσμούς της Βαλτικής και της Καβάλας, οι μικροδορυφορικοί τόποι Ee2\_477 και Ee2\_508 εμφανίζονται να είναι συνδεδεμένοι στον πληθυσμό της Αλγερίας και τέλος οι μικροδορυφορικοί τόποι Ee2\_507 και Ee2\_135 εμφανίζονται να είναι συνδεδεμένοι στον πληθυσμό της Πάτρας. Ο μικροδορυφορικός τόπος Ee2\_507 φαίνεται να συνδέεται τόσο με τον τόπο Ee2\_452 (Βαλτική και Καβάλα) όσο και με τον τόπο Ee2\_135 (Πάτρα), αν και μεταξύ τους οι τόποι Ee2\_452 και Ee2\_135 δεν φαίνεται να συνδέονται (Πίνακας 3.6). Η σύνδεση των τόπων Ee2\_091 και Ee2\_091b ήταν αναμενόμενη καθώς βρίσκονται στο ίδιο κλώνο σε κοντινή απόσταση (απέχουν περίπου 130 βάσεις). Η επαλήθευση αυτής της σύνδεσης σε δύο μόνο από τους 11 πληθυσμούς και η αντίστοιχη σύνδεση των υπολοίπων τόπων θα συζητηθούν στην επόμενη ενότητα.

**Πίνακας 3.6:** Περιπτώσεις εμφάνισης ανισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium).

S.E.: Τυπικό σφάλμα.

Πληθυσμός	Τόπος #1	Τόπος #2	S.E	p-value Bonferroni
<b>ALG</b>	Ee2_091b	Ee2_091	0.000000	0.000000
<b>ALG</b>	Ee2_477	Ee2_508	0.000000	0.000000
<b>BAL</b>	Ee2_507	Ee2_452	0.000000	0.000000
<b>GBIS</b>	Ee2_091b	Ee2_091	0.000000	0.000000
<b>KAV</b>	Ee2_507	Ee2_452	0.000000	0.000000
<b>PAT</b>	Ee2_507	Ee2_135	0.000000	0.000000

### 3.3 Γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων και ιεραρχική δομή των πληθυσμών

Ο έλεγχος για τη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών με τη μέθοδο Fisher (**Fisher's exact tests**) έδειξε ότι όλα σχεδόν τα ζεύγη των πληθυσμών εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή των αλληλικών τους συχνοτήτων (Πίνακας 3.7). Μόνο τα ζεύγη των πληθυσμών LION (Κόλπος των Λεόντων) - PAT (Πάτρα), MAL (Μάλαγα) - SPORT (N. Πορτογαλία) και GBIS (Βισκαϊκός) - LION (Κόλπος των Λεόντων) εμφανίζονται να μη διαφέρουν σε επίπεδο σημαντικότητας  $p=0.05$  έπειτα από διόρθωση κατά Bonferroni.

Παρόμοια εικόνα εμφανίζουν και οι τιμές  $F_{ST}$  μεταξύ ζευγών δειγμάτων (Πίνακας 3.8). Τιμές  $p$ -value μεγαλύτερες του 0.05 εμφανίζεται μεταξύ των πληθυσμών: Αδριατικής - Μαύρης Θάλασσας, Αδριατικής - Κόλπου των Λεόντων, Αλγερίας - Μάλαγας, Αλγερίας - N. Πορτογαλίας, Βισκαϊκού - Κόλπου των Λεόντων, Βισκαϊκού - Πάτρας, Κόλπου των Λεόντων - Πάτρας και Μάλαγας - N. Πορτογαλίας. Οι τιμές αυτές εκφράζουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των συγκρινόμενων πληθυσμών. (Πίνακα 3.8).

Η μέγιστη τιμή  $F_{ST}$  (0.05115) εμφανίζεται μεταξύ των πληθυσμών της Βαλτικής και των Κανάριων Νήσων. Μεγάλες τιμές  $F_{ST}$  δηλώνουν την έντονη γενετική διαφοροποίηση των συγκρινόμενων πληθυσμών, ενώ μηδενικές τιμές εκφράζουν την πλήρη γενετική ομοιότητα των συγκρινόμενων πληθυσμών (Πίνακα 3.8).

**Πίνακας 3.7:** Σύγκριση αλληλικών και γονοτυπικών συχνοτήτων μεταξύ ζευγαρωτών δειγμάτων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Fisher (Fisher's exact tests).

Πληθυσμοί	$\chi^2$	p-value	p-value Bonferroni
ADR - GBIS	87.151178	0.000000	0.000000
BS - LION	93.340463	0.000000	0.000000
ADR - ALG	Infinity	0.000000	0.000000
ADR - BAL	Infinity	0.000000	0.000000
ALG - BAL	Infinity	0.000000	0.000000
ALG - BS	Infinity	0.000000	0.000000
BAL - BS	Infinity	0.000000	0.000000
ADR - CA	Infinity	0.000000	0.000000
ALG - CA	Infinity	0.000000	0.000000
BAL - CA	Infinity	0.000000	0.000000
BS - CA	Infinity	0.000000	0.000000
ALG - GBIS	Infinity	0.000000	0.000000
BAL - GBIS	Infinity	0.000000	0.000000
BS - GBIS	Infinity	0.000000	0.000000
CA - GBIS	Infinity	0.000000	0.000000
ADR - KAV	Infinity	0.000000	0.000000
ALG - KAV	Infinity	0.000000	0.000000
BAL - KAV	Infinity	0.000000	0.000000
BS - KAV	Infinity	0.000000	0.000000
CA - KAV	Infinity	0.000000	0.000000
GBI - KAV	Infinity	0.000000	0.000000
ALG - LION	Infinity	0.000000	0.000000
BAL - LION	Infinity	0.000000	0.000000
CA - LION	Infinity	0.000000	0.000000
ADR - MAL	Infinity	0.000000	0.000000
BAL - MAL	Infinity	0.000000	0.000000
BS - MAL	Infinity	0.000000	0.000000
GBIS - MAL	Infinity	0.000000	0.000000
KAV - MAL	Infinity	0.000000	0.000000
LION - MAL	Infinity	0.000000	0.000000
ADR - PAT	Infinity	0.000000	0.000000
ALG - PAT	Infinity	0.000000	0.000000
BAL - PAT	Infinity	0.000000	0.000000
BS - PAT	Infinity	0.000000	0.000000
CA - PAT	Infinity	0.000000	0.000000
KAV - PAT	Infinity	0.000000	0.000000
MAL - PAT	Infinity	0.000000	0.000000
ADR - SPORT	Infinity	0.000000	0.000000
BAL - SPORT	Infinity	0.000000	0.000000
BS - SPORT	Infinity	0.000000	0.000000
CA - SPORT	Infinity	0.000000	0.000000
GBIS - SPORT	Infinity	0.000000	0.000000
KAV - SPORT	Infinity	0.000000	0.000000
LION - SPORT	Infinity	0.000000	0.000000
PAT - SPORT	Infinity	0.000000	0.000000
CA - MAL	73.555913	0.000001	0.000010
ADR - BS	64.029310	0.000017	0.000153
ALG - SPORT	63.736992	0.000019	0.000152
GBIS - PAT	52.871599	0.000601	0.004207
ADR - LION	52.082966	0.000763	0.004578
ALG - MAL	49.782422	0.001509	0.007545
KAV - LION	49.614534	0.001585	0.006340
MAL - SPORT	44.388127	0.006875	0.020625 **
LION - PAT	41.504376	0.014654	0.029308 **
GBIS - LION	25.580487	0.374788	0.374788 *

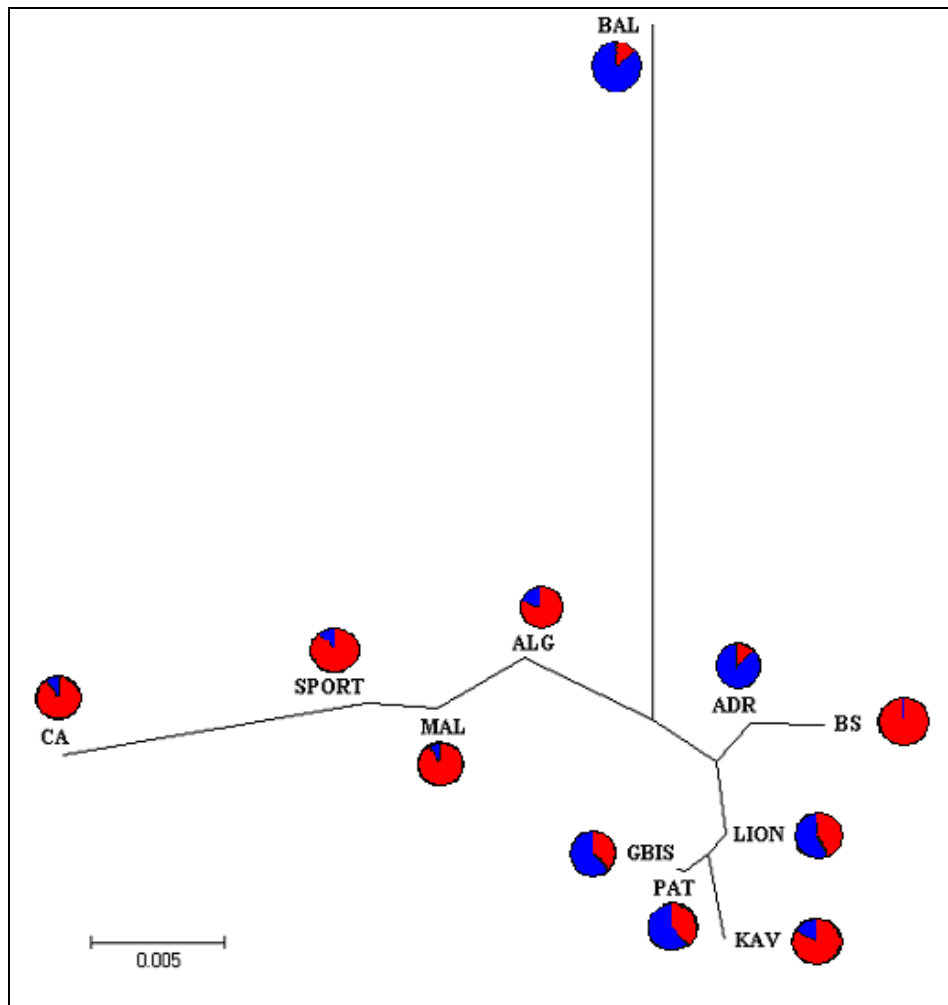
\*p<0.05, \*\*p<0.01 μετά από διόρθωση κατά Bonferroni.

**Πίνακας 3.8:** Εκτίμηση της γενετικής απόκλισης μεταξύ των πληθυσμών με βάση τις τιμές  $F_{ST}$ . Κάτω τριγωνικός πίνακας τιμές pairwise  $F_{ST}$  και άνω τριγωνικός πίνακας τιμές p-value για 1000 επαναλήψεις.

	ADR	ALG	BAL	BS	CA	GBIS	KAV	LION	MAL	PAT	SPORT
ADR		<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	0.11426+0.0100	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	0.10742+0.0124	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>
ALG	0.00709		<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	0.71680+0.0123	<b>0.00000+0.0000</b>	0.06152+0.0071
BAL	0.02879	0.02815		<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>
BS	0.00192	0.01412	0.03069		<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>
CA	0.02610	0.01346	0.05115	0.03328		<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00000+0.0000</b>
GBIS	0.00817	0.00838	0.02978	0.01196	0.03250		<b>0.00000+0.0000</b>	0.60254+0.0125	<b>0.00000+0.0000</b>	0.38379+0.0129	<b>0.00000+0.0000</b>
KAV	0.00602	0.00983	0.04068	0.00867	0.03591	0.00621		<b>0.03027+0.0044</b>	<b>0.00000+0.0000</b>	<b>0.00098+0.0010</b>	<b>0.00000+0.0000</b>
LION	0.00283	0.00684	0.02849	0.00672	0.02730	0.00037	0.00347		<b>0.00000+0.0000</b>	0.78613+0.0139	<b>0.00000+0.0000</b>
MAL	0.01067	0.00012	0.03175	0.01565	0.00891	0.01292	0.01291	0.00991		<b>0.00000+0.0000</b>	0.83105+0.0092
PAT	0.00603	0.01008	0.03499	0.01087	0.03579	0.00084	0.00364	-0.00019	0.01553		<b>0.00000+0.0000</b>
SPORT	0.00899	0.00221	0.03209	0.01576	0.00877	0.01690	0.01725	0.01211	-0.00057	0.01692	

Bold:  $p < 0.05$

Με βάση τις γενετικές αποστάσεις  $F_{ST}$  κατασκευάστηκε το άρριζο ακτινωτό δενδρόγραμμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο σύνδεσης γειτόνων (Neighbor Joining) (Εικόνα 3.3). Στο δέντρο αυτό ο κλάδος της Βαλτικής είναι γενετικά ο πιο απομακρυσμένος. Ο κλάδος των Κανάριων Νήσων διαχωρίζεται εμφανώς από τους υπόλοιπους πληθυσμούς και στη βάση του συνδέεται σε σειρά με τους γεωγραφικά κοντινούς πληθυσμούς του. Οι πληθυσμοί του γαύρου της Μεσογείου (εκτός αυτών της Μάλαγα και της Αλγερίας) και της Μαύρης Θάλασσας ομαδοποιούνται, χωρίς όμως η διάταξή τους στο δένδρο να ανταποκρίνεται στη γεωγραφική τους εγγύτητα. Ο κλάδος του Βισκαϊκού ομαδοποιείται και αυτός μαζί με την προηγούμενη ομάδα και εμφανίζεται δίπλα στον κλάδο της Πάτρας.



**Εικόνα 3.3:** Άρριζο ακτινωτό δενδρόγραμμα με τη μέθοδο Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbour Joining) χρησιμοποιώντας τιμές  $F_{ST}$ . Τα κυκλικά διαγράμματα δείχνουν τη συχνότητα των δύο κλάδων του μιτοχονδριακού DNA (κόκκινο: κλάδος A, μπλε: κλάδος B) σε κάθε πληθυσμό (δεδομένα από Magoulas *et al.* 2006 και αδημοσίευτα).

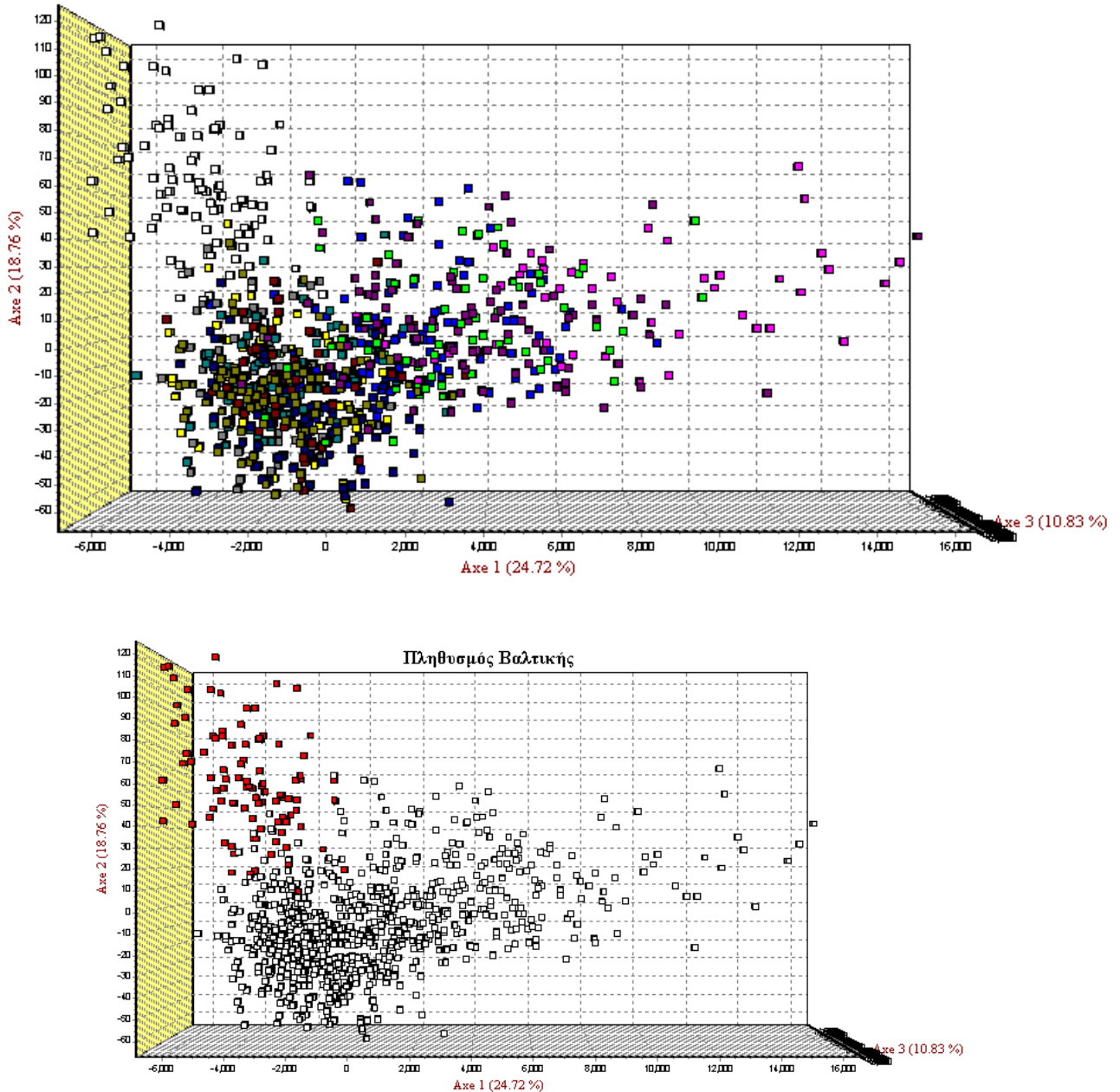
Οι αναλύσεις της ιεραρχικής δομής των πληθυσμών μέσω του προγράμματος SAMOVA έδωσε τις παρακάτω ομαδοποιήσεις που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων για αριθμό ομάδων από 2-10 (Πίνακας 3.9). Η μεγιστοποίηση της τιμής της συνολικής γενετικής διακύμανσης λόγω των διαφορών μεταξύ των ομάδων των πληθυσμών ( $F_{CT}$ ), η οποία είναι ταυτόχρονα και στατιστικά σημαντική επιτυγχάνεται με τον χωρισμό σε 7 ομάδες πληθυσμών: οι πληθυσμοί του Βισκαϊκού, του Κόλπου των Λεόντων και της Πάτρας αποτελούν μια ομάδα, οι πληθυσμοί της Αλγερίας, της Μάλαγας και της Ν. Πορτογαλίας μια επόμενη ομάδα και οι υπόλοιποι πέντε πληθυσμοί αποτελούν ξεχωριστές ομάδες.

**Πίνακας 3.9:** Αποτελέσματα ανάλυσης SAMOVA (Spatial Analysis of MOlecular VAriance). Με κίτρινο χρώμα αποδείχεται η μέγιστη τιμή  $F_{CT}$  η οποία είναι ταυτόχρονα και στατιστικά σημαντική.

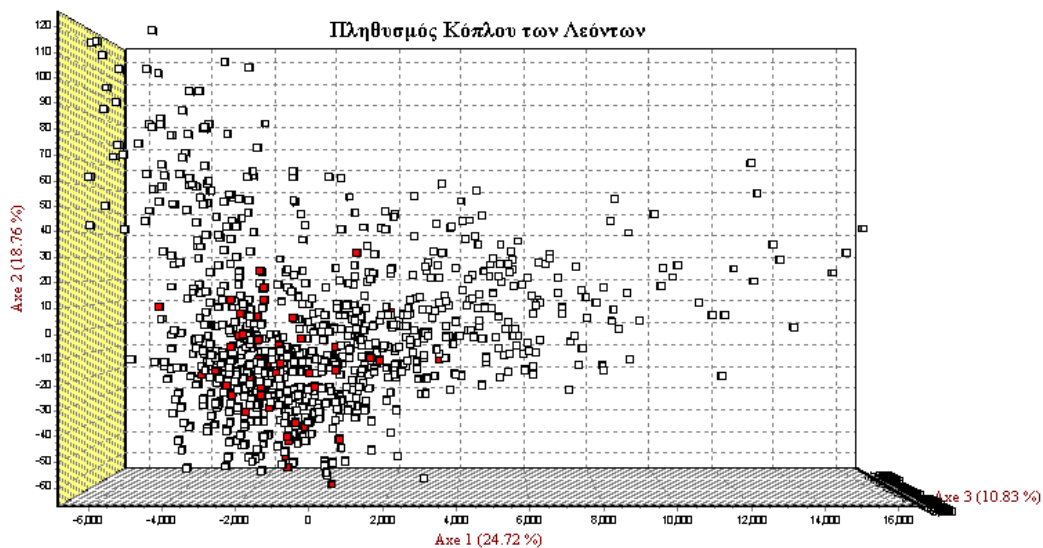
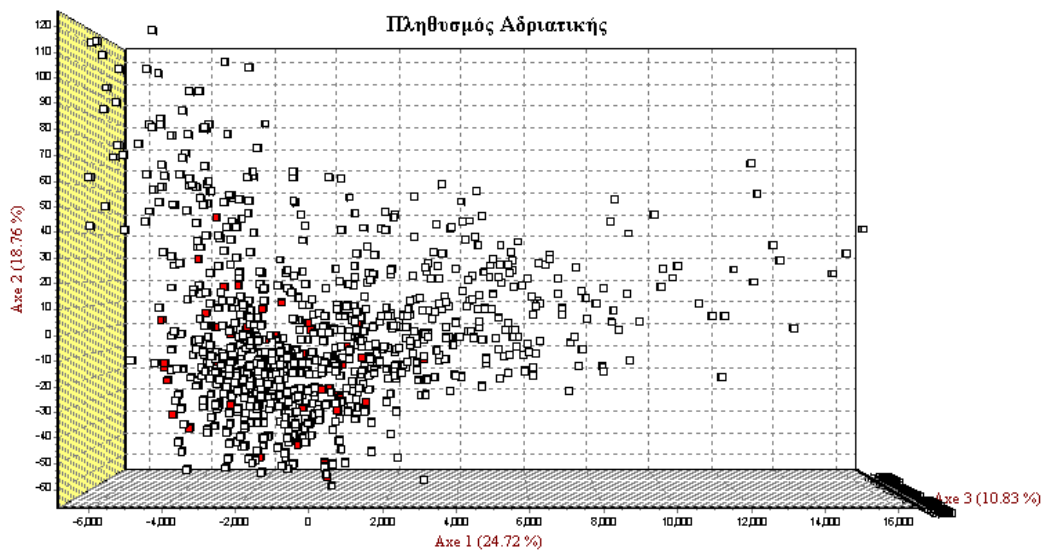
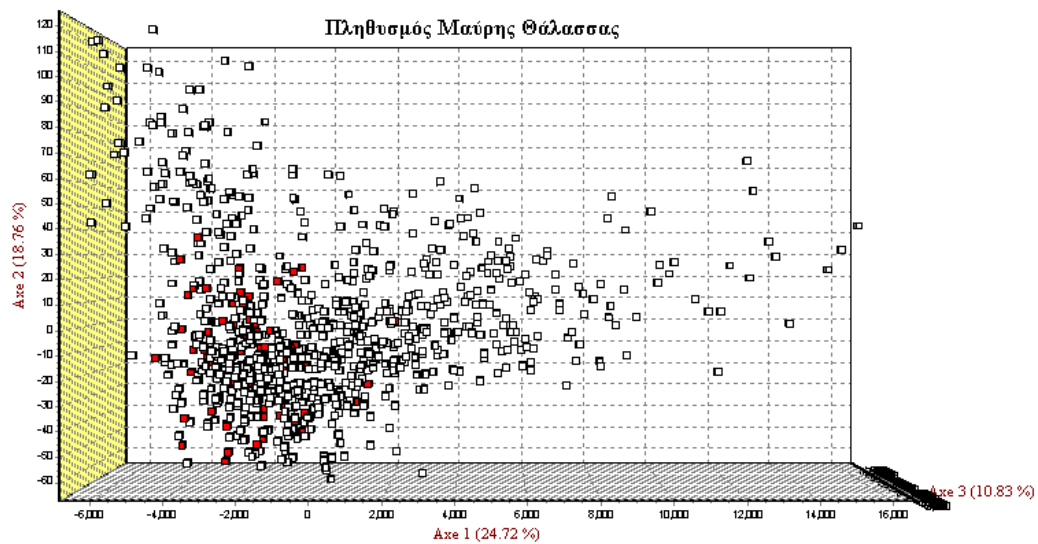
Αριθμός ομάδων	Ομάδες	Ποσοστό Ποικιλότητας			p-value
		Μεταξύ των ομάδων	Μεταξύ των πληθυσμών εντός των ομάδων	Εντός των πληθυσμών	
2	(BAL)(CA,BS,GBIS,KAV,LION,PAT,ADR,ALG,MAL,SPORT)	2.23	1.08	96.69	0.09384±0.00694
3	(BAL)(CA)(BS,GBIS,KAV,LION,PAT,ADR,ALG,MAL,SPORT)	2.23	0.86	96.92	0.01369±0.00463
4	(BAL)(CA)(BS)(GBIS,KAV,LION,PAT,ADR,ALG,MAL,SPORT)	1.61	0.78	97.61	0.01173±0.00335
5	(BAL)(CA)(BS)(GBIS,KAV,LION,PAT)(ADR,ALG,MAL,SPORT)	1.58	0.33	98.08	±0.00000
6	(BAL)(CA)(BS)(KAV)(GBIS,LION,PAT)(ADR,ALG,MAL,SPORT)	1.56	0.25	98.19	0.00098±0.00098
7	(BAL)(CA)(BS)(KAV)(GBIS,LION,PAT)(ADR)(ALG,MAL,SPORT)	1.71	0.05	98.23	±0.00000
8	(BAL)(CA)(BS)(KAV)(GBIS,LION,PAT)(ADR)(ALG)(MAL,SPORT)	1.68	0.01	98.31	±0.00000
9	(BAL)(CA)(BS)(KAV)(GBIS)(LION,PAT)(ADR)(ALG)(MAL,SPORT)	1.67	-0.05	98.37	±0.00000
10	(BAL)(CA)(BS)(KAV)(GBIS)(LION,PAT)(ADR)(ALG)(MAL,SPORT)	1.69	-0.09	98.39	0.01466±0.00340



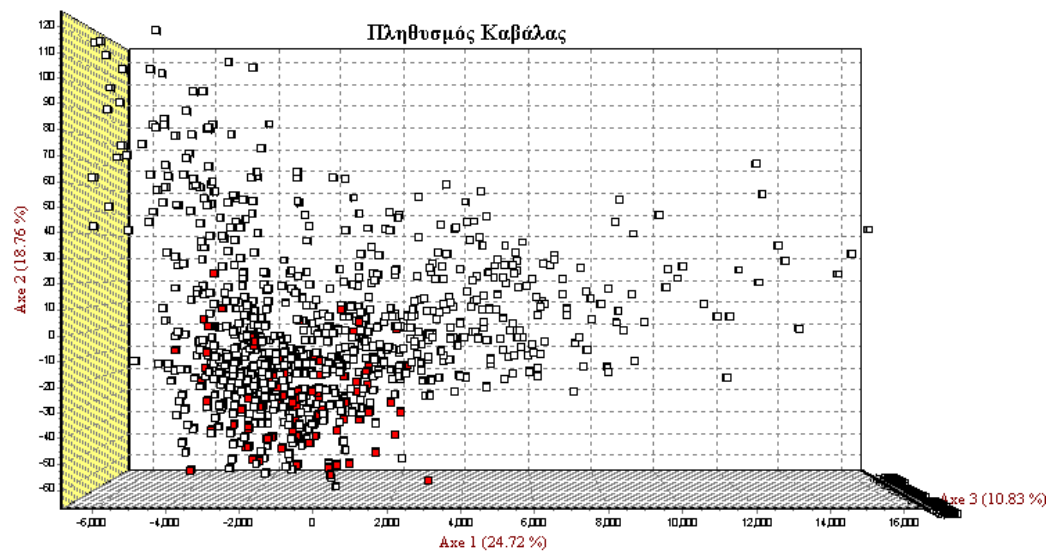
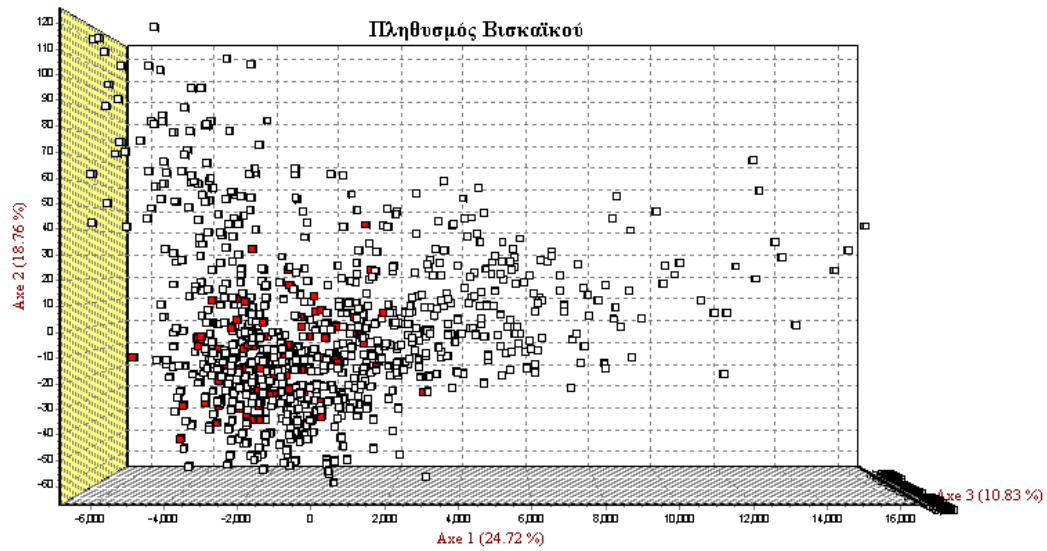
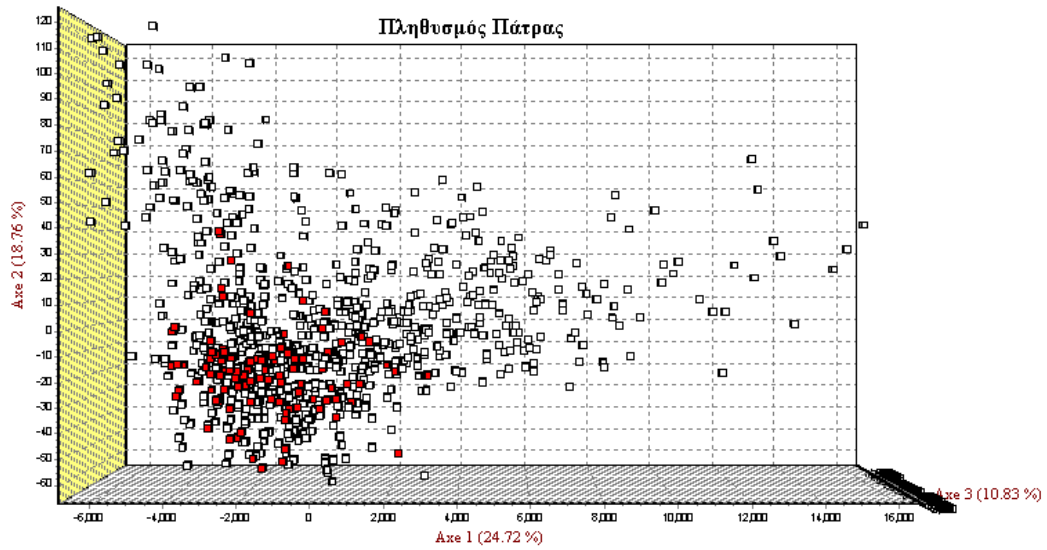
Τα τρισδιάστατα γραφήματα που προέκυψαν από την Παραγοντική Ανάλυση των Αντιστοιχιών (FCA) παρατίθενται στην Εικόνα 3.4. Στην ανάλυση αυτή, οι πληθυσμοί που εμφανίζουν εντονότερη διαφοροποίηση είναι εκείνοι της Βαλτικής και των Κανάριων Νήσων.



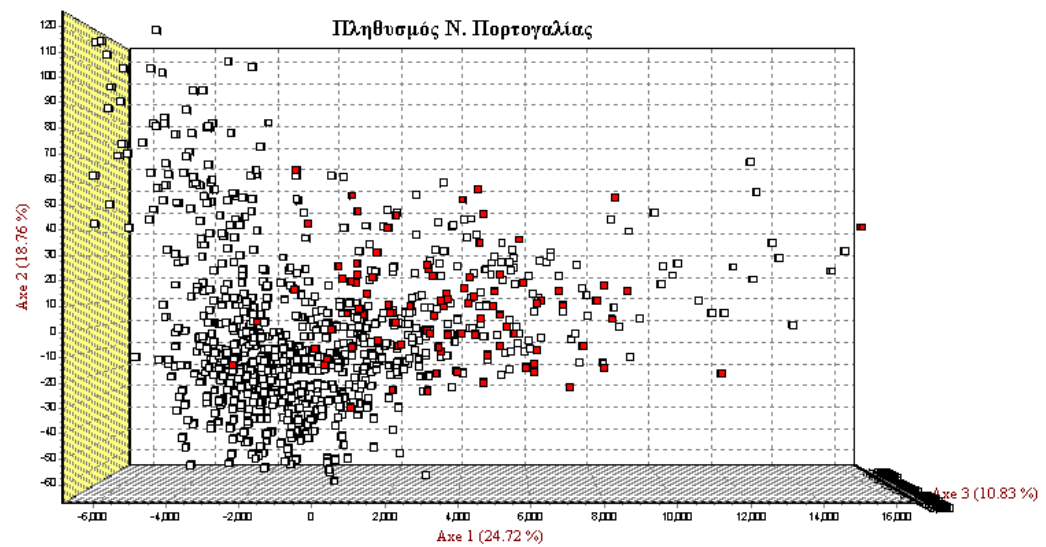
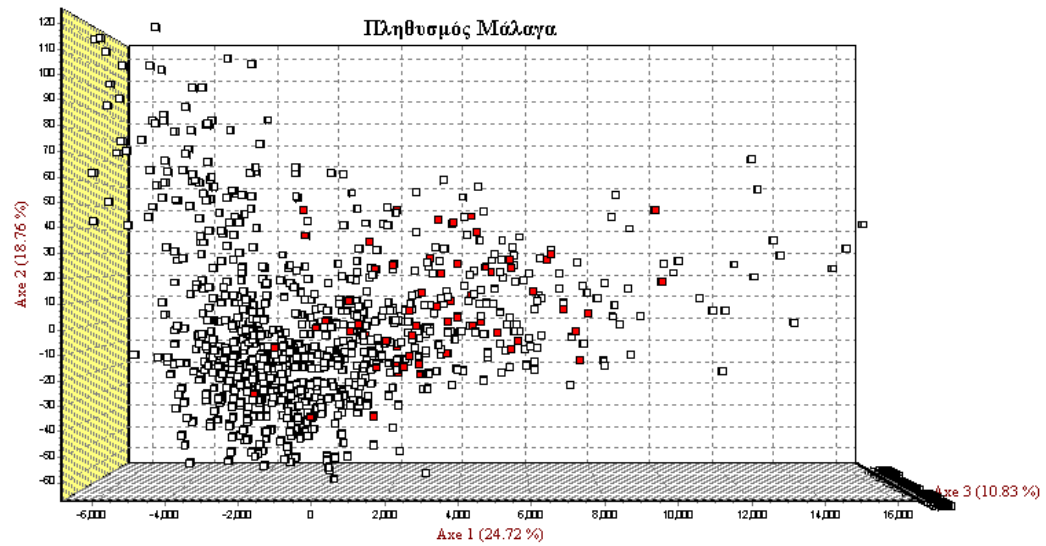
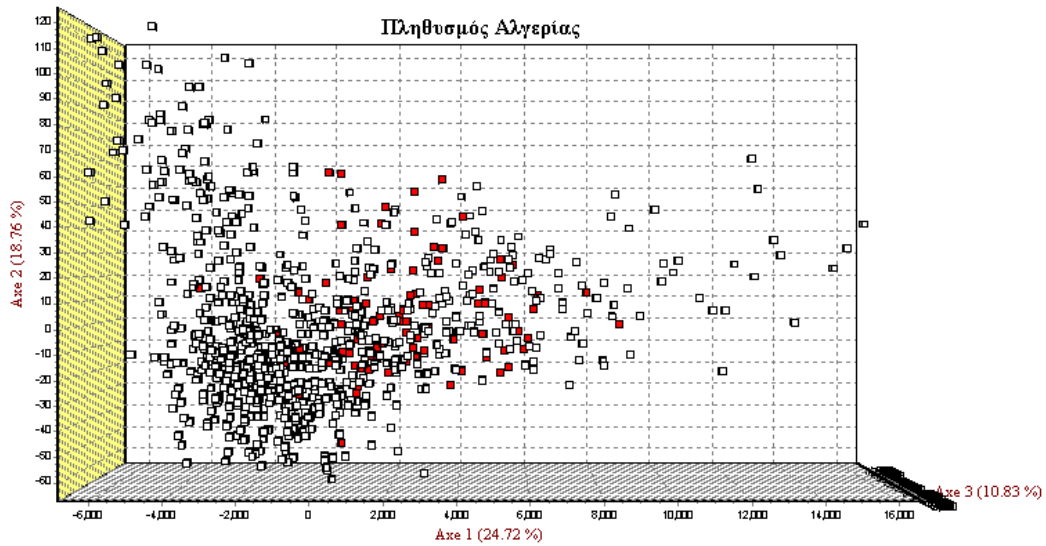
**Εικόνα 3.4α:** Παραγοντική Ανάλυση των Αντιστοιχιών (FCA). Στο πρώτο γράφημα παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα τα άτομα όλων των πληθυσμών που αναλύθηκαν. Στο επόμενο γραφήματα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα τα άτομα των πληθυσμών που αναγράφονται στον τίτλο του γραφήματος σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα εξεταζόμενα άτομα.



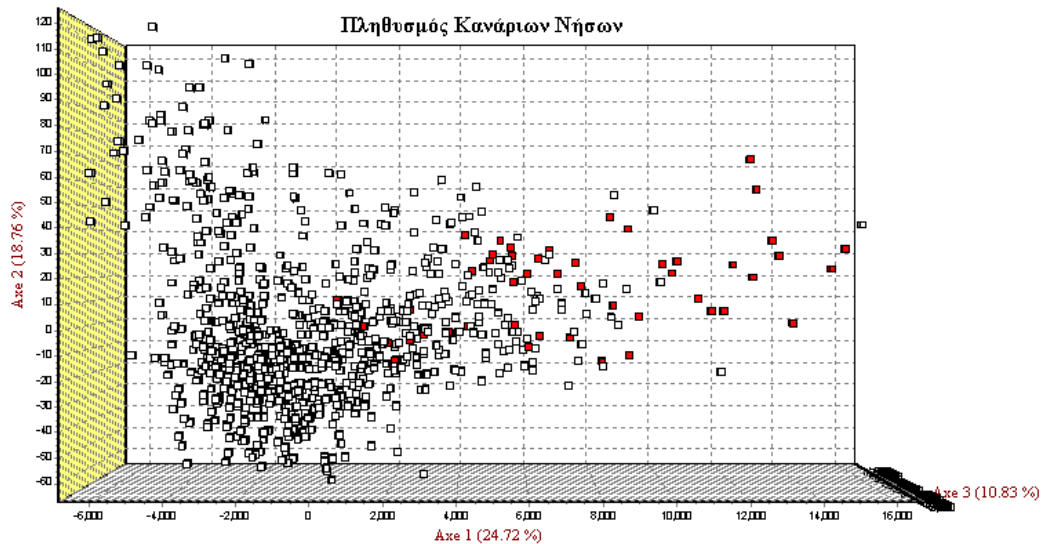
**Εικόνα 3.4β:** Παραγοντική Ανάλυση των Αντιστοιχιών (FCA). Στα παραπάνω διαδοχικά γραφήματα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα τα άτομα των πληθυσμών που αναγράφονται στον τίτλο κάθε γραφήματος σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα εξεταζόμενα άτομα.



Εικόνα 3.4γ: Παραγοντική Ανάλυση των Αντιστοιχιών (FCA). Στα παραπάνω διαδοχικά γραφήματα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα τα άτομα των πληθυσμών που αναγράφονται στον τίτλο κάθε γραφήματος σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα εξεταζόμενα άτομα.

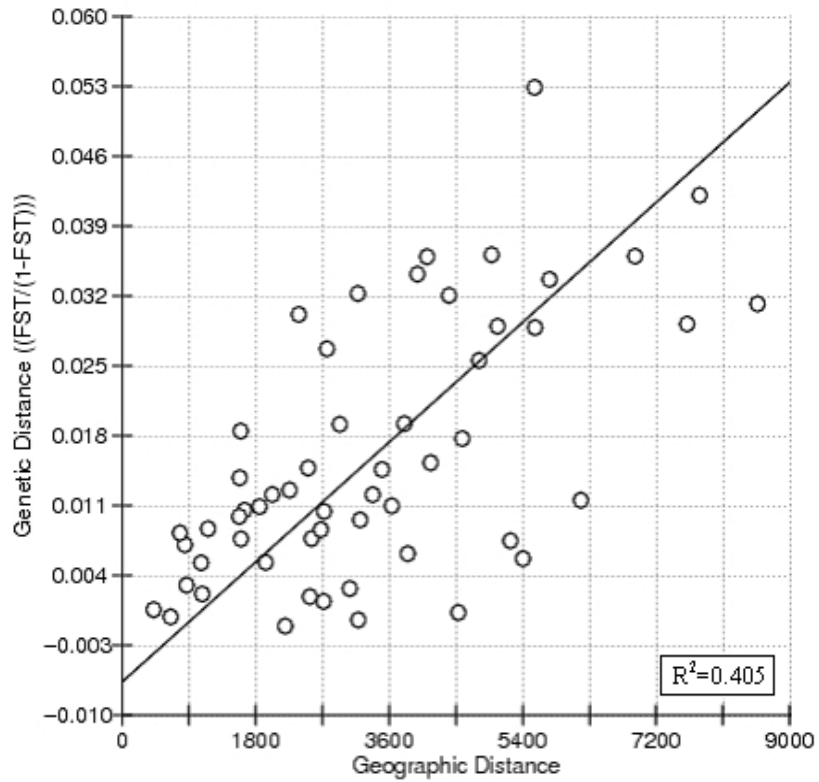


**Εικόνα 3.4δ:** Παραγοντική Ανάλυση των Αντιστοιχιών (FCA). Στα παραπάνω διαδοχικά γραφήματα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα τα άτομα των πληθυσμών που αναγράφονται στον τίτλο κάθε γραφήματος σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα εξεταζόμενα άτομα.



**Εικόνα 3.4ε:** Παραγοντική Ανάλυση των Αντιστοιχιών (FCA). Στο παραπάνω γραφήματα παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα τα άτομα του πληθυσμού των Κανάριων Νήσων σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα εξεταζόμενα άτομα.

Για τον έλεγχο της συσχέτισης μεταξύ γενετικών και γεωγραφικών αποστάσεων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Mantel. Με τη δοκιμή αυτή συσχετίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών που υπολογίστηκαν με βάση τα  $F_{ST}$  και εκφράστηκαν κατά Rousset ( $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ), και οι γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ των τοποθεσιών των δειγμάτων μετρημένες σε χιλιόμετρα (kilometers) (Εικόνα 3.5). Η συσχέτιση ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0.001$ ) και ο συντελεστής  $R^2$  της γραμμικής παλινδρόμησης RMA ήταν ίσος με 0.405. Η θετική συσχέτιση μεταξύ γεωγραφικών και γενετικών αποστάσεων δηλώνει την ύπαρξη απομόνωσης λόγω απόστασης στους εξεταζόμενους πληθυσμούς του γαύρου (*E. encrasicolus*).



**Εικόνα 3.5:** Έλεγχος απομόνωσης λόγω απόστασης. Η θετική συσχέτιση μεταξύ γεωγραφικών και γενετικών αποστάσεων ( $R^2=0.405$ ) δηλώνει την ύπαρξη απομόνωσης λόγω απόστασης στους εξεταζόμενους πληθυσμούς του γαύρου.



## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέχρι σήμερα, γνωρίζουμε δύο προηγούμενες ανεξάρτητες προσπάθειες ανάπτυξης δινουκλεοτιδικών μικροδορυφορικών τόπων για το γαύρο, μία στο εργαστήριο Γενετικής του Ι.ΘΑ.ΒΙ.Κ. στα πλαίσια του προγράμματος FAIR (Zampicini) και μία από τους Landi *et al.* 2005. Η πρώτη προσπάθεια δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχής, καθώς οι δινουκλεοτιδικοί τόποι που αναπτύχθηκαν ήταν πολύ πολυμορφικοί. Σχεδόν κάθε εξεταζόμενο άτομο είχε διαφορετικά αλληλόμορφα, οπότε ήταν αδύνατη η εξαγωγή συμπερασμάτων πληθυσμιακής διαφοροποίησης λόγω χαμηλής στατιστικής στήριξης. Οι πέντε δημοσιευμένοι τόποι από τους Landi *et al.* (2005) φαίνεται να έχουν επίσης υψηλό πολυμορφισμό και τρεις από αυτούς εμφανίζουν υψηλό έλλειμμα ετεροζυγωτίας προφανώς λόγω ύπαρξης μηδενικών αλληλομόρφων.

Γι' αυτό το λόγο στην παρούσα εργασία η ανάπτυξη μικροδορυφορικών γενετικών τόπων για το γαύρο, μέσω εμπλουτισμένης γενωμικής βιβλιοθήκης, έγινε χρησιμοποιώντας αυστηρά κριτήρια επιλογής, όπως πρότυπο επανάληψης μεγαλύτερο των δύο βάσεων ή δινουκλεοτιδικούς τόπους με μικρό σχετικά αριθμό επαναλήψεων. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, παρότι δίνει γενωμικές βιβλιοθήκες εμπλουτισμένες για μικροδορυφορικά, αποδίδει μικρό αριθμό γενετικών τόπων που αναπτύσσονται και είναι κατάλληλοι για γονοτύπηση. Από τους 1110 θετικούς κλώνους που απομονώθηκαν αρχικά, μόνο οι 347 (31.3%) φάνηκε να περιέχουν ένθεμα με μικροδορυφορική αλληλουχία και από αυτούς οι 51 (4.6%) θεωρήθηκαν κατάλληλοι για σχεδιασμό εκκινήτων, με βάση και τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν. Τελικά μόνο 12 τόποι (1.1%) ήταν κατάλληλοι να χρησιμοποιηθούν για γονοτυπήσεις, καθώς μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν μέσω της αντίδρασης PCR και στη συνέχεια να γονοτυπηθούν, δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα.

Οι τόποι αυτοί είχαν μέτριο έως υψηλό πολυμορφισμό. Κάποιοι από τους τόπους εμφάνιζαν έλλειμμα ετεροζυγωτίας, πιθανώς οφειλόμενο στην ύπαρξη μη πολλαπλασιαζόμενων, κατά την PCR, αλληλομόρφων (μηδενικά αλληλόμορφα). Ειδικά οι τόποι Ee5\_376 και Ee5\_245 εμφανίζουν μεγάλο **έλλειμμα ετεροζυγωτίας** σε όλους τους πληθυσμούς που εξετάστηκαν και γι' αυτό ίσως να μην είναι ιδιαίτερα αξιόπιστοι, αν και δίνουν παρόμοια εικόνα με τους υπόλοιπους, όσον αφορά τις τιμές Fst. Ίσως θα πρέπει να μην χρησιμοποιηθούν στο μέλλον ή για τους τόπους αυτούς να

επανασχεδιασθούν εκκινητές σε νέες θέσεις. Και άλλοι μικροδορυδορικοί τόποι της παρούσας μελέτης εμφάνισαν έλλειμμα ετεροζυγωτίας σε λιγότερα όμως δείγματα και σε μικρότερο βαθμό. Τελικά το γεγονός αυτό είναι μάλλον αναπόφευκτο σε είδη με πολύ μεγάλα πληθυσμιακά μεγέθη όπως είναι ο γαύρος, όμως γενικά δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τα αποτελέσματα.

Κάποιοι ζεύγη τόπων εμφάνιζαν **ανισορροπία σύνδεσης** σε κάποιους πληθυσμούς, έναν ή δύο. Οι μικροδορυφορικοί τόποι Ee2\_091 και Ee2\_091b ήταν αναμενόμενο να βρεθούν συνδεδεμένοι καθώς σχεδιάστηκαν για τον ίδιο κλώνο καλύπτοντας διαφορετική μικροδορυφορική επανάληψη. Παρόλα αυτά, μόνο δύο από τους 11 πληθυσμούς φαίνεται να εμφανίζουν ανισορροπία σύνδεσης. Ο μικροδορυφορικός τόπος Ee2\_507 φαίνεται να συνδέεται τόσο με τον τόπο Ee2\_452 (Βαλτική και Καβάλα) όσο και με τον τόπο Ee2\_135 (Πάτρα), αν και μεταξύ τους οι τόποι Ee2\_452 και Ee2\_135 δεν εμφανίζονται συνδεδεμένοι. Οι μικροδορυφορικοί τόποι Ee2\_507 και Ee2\_452 παρουσιάζονται συνδεδεμένοι σε 2 από τους 11 υπό μελέτη πληθυσμούς και αυτό ίσως να οφείλεται σε πραγματική σύνδεση μεταξύ τους. Ο μικροδορυφορικός τόπος Ee2\_507 φαίνεται επίσης να συνδέεται με τον τόπο Ee2\_135 στον πληθυσμό της Πάτρας, παρ' όλα αυτά αυτή η σύνδεση είναι μάλλον τυχαία καθώς παρατηρήθηκε μια μόνο φορά.

Οι γενετικές αναλύσεις (exact tetsts,  $F_{ST}$ ) έδειξαν ότι όλα σχεδόν τα πληθυσμιακά δείγματα του γαύρου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη διαφέρουν μεταξύ τους. Στα **exact tets** ο πληθυσμός του Βισκαϊκού δεν διαφέρει από τον πληθυσμό του Κόλπου των Λεόντων ενώ ο τελευταίος φαίνεται να διαφέρει οριακά από τον πληθυσμό της Πάτρας ( $p=0.029308$ ). Οριακά φαίνεται να διαφέρει και ο πληθυσμός της Μάλαγα με της Ν. Πορτογαλίας ( $p=0.020625$ ). Όλοι οι υπόλοιποι πληθυσμοί διαφέρουν με υψηλό επίπεδο σημαντικότητας.

Στις γενετικές αναλύσεις των τιμών  $F_{ST}$  τα περισσότερα ζεύγη πληθυσμών εμφανίζονται διαφοροποιημένα. Οι πληθυσμοί της Ν. Πορτογαλίας, Μάλαγα και Αλγερίας δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει αυξημένη γονιδιακή ροή μεταξύ τους. Οι πληθυσμοί αυτοί βρίσκονται γεωγραφικά κοντά, η Ν. Πορτογαλία δυτικά του Γιβραλτάρ και η Μάλαγα με την Αλγερία ανατολικά. Η γενετική τους ομοιότητα επιβεβαιώνει ότι, το γεωγραφικό φράγμα, για το γαύρο, μεταξύ Ατλαντικού-Μεσογείου δεν είναι το Γιβραλτάρ αλλά ανατολικότερα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση (αν έχει καταγραφεί σωστά η γεωγραφική προέλευση του δείγματος της Αλγερίας) φαίνεται ότι αυτό το



φράγμα είναι ανατολικότερα από το μέτωπο Αλμερίας-Οράν που αποτελεί γεωγραφικό φράγμα για πολλά είδη θαλάσσιων ψαριών και άλλων θαλάσσιων οργανισμών.

Μέσα στη Μεσόγειο, οι πληθυσμοί εμφανίζουν μικρή γενετική διαφοροποίηση μεταξύ τους, που όμως σε αρκετές περιπτώσεις είναι στατιστικά σημαντική. Μόνο ο Κόλπος των Λεόντων φαίνεται να μη διαφέρει από την Πάτρα και την Αδριατική, ενώ και η Αδριατική φαίνεται να μην διαφοροποιείται σημαντικά από τη Μαύρη Θάλασσα. Η έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ Πάτρας και Κόλπου των Λεόντων δείχνει ότι υπάρχει αυξημένη γενετική ροή μεταξύ Ιονίου και βορειοδυτικής Μεσογείου, ενώ η γενετική ομοιότητα μεταξύ Μαύρης Θάλασσας και Αδριατικής μάλλον είναι τυχαία. Αξιοσημείωτη είναι η γενετική ομοιότητα των γαύρων του Βισκαϊκού Κόλπου (Ατλαντικός Ωκεανός) με τους πληθυσμούς της Πάτρας και της βορειοδυτικής Μεσογείου που θα συζητηθεί παρακάτω.

Από τις γενετικές αναλύσεις τόσο των exact tests όσο και των τιμών  $F_{ST}$  φαίνεται ότι το δείγμα της Βαλτικής είναι το πλέον διαφοροποιημένο. Ο πληθυσμός αυτός βρίσκεται στο βόρειο άκρο της κατανομής του γαύρου, είναι σχετικά πρόσφατος και διαφέρει και από τον πλησιέστερό του στο Βισκαϊκό Κόλπο, από τον οποίο θεωρητικά θα μπορούσε να είχε προέλθει μέσω επέκτασης της κατανομής προς τα Βόρεια. Αυτή η διαφοροποίηση θα μπορούσε να οφείλεται σε γενετική παρέκκλιση, αν οι βόρειοι πληθυσμοί ιδρύθηκαν από λίγα άτομα, με αποτέλεσμα να υπάρχει τυχαία αλλαγή των αλληλικών συχνοτήτων. Πάντως ο πληθυσμός του Kattegat έχει πολυμορφισμό παρόμοιου μεγέθους με τα υπόλοιπα δείγματα που αναλύθηκαν άρα αν υπήρξε γενετική παρέκκλιση δεν συνέβη πρόσφατα και μεσολάβησε αρκετός χρόνος ώστε να αναπληρωθεί, μέσω μεταλλάξεων, η γενετική ποικιλότητα. Από τα αποτελέσματα είναι σαφές ότι υπάρχει κάποιο φράγμα στη γονιδιακή ροή πιθανώς κάπου μεταξύ Μάγχης και στενών του Kattegat στη Βόρεια Θάλασσα που διατηρεί αυτή τη μεγάλη γενετική διαφοροποίηση. Αυτή η διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών του Βισκαϊκού και της Βαλτικής αντιπαρατίθεται με την ομοιότητά τους στο mtDNA (Magoulas *et al.* 2006).

Με βάση τις παραπάνω αναλύσεις, διαφοροποιημένος εμφανίζεται και ο πληθυσμός των Κανάριων Νήσων που βρίσκεται προς το νότιο δυτικό άκρο της κατανομής του γαύρου. Ο πληθυσμός αυτός εμφανίζει τη μικρότερη διαφοροποίηση με τους γεωγραφικά πλησιέστερους πληθυσμούς της Ν. Πορτογαλίας, Μάλαγα και Αλγερίας.

Οι τιμές  $F_{ST}$  στη παρούσα μελέτη είναι όμοιες με εκείνες που εμφανίζονται, χρησιμοποιώντας μικροδορυφορικούς τόπους, σε άλλους θαλάσσιους πληθυσμούς, οι οποίοι παρουσιάζουν σημαντική γενετική διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, για το *Gadus morhua*  $F_{ST}=0.015$  (Bentzen *et al.* 1996), για το *Dicentrarchus labrax*  $F_{ST}=0.007$  (García de León *et al.* 1997), για το *Mycteroperca microlepis*  $F_{ST}=0.008$  (Charman *et al.* 1999) και για το *Merluccius merluccius*  $F_{ST}=0.013$  (Lundy *et al.* 1999). Οι παραπάνω τιμές  $F_{ST}$  επιβεβαιώνουν την άποψη του Wright (1978) σύμφωνα με την οποία η διαφοροποίηση δεν είναι σε καμία περίπτωση αμελητέα όταν οι τιμές  $F_{ST}$  είναι μικρές, όπως η τιμή 0.05 ή ακόμα και μικρότερες από αυτή. Δηλαδή, η αναμενόμενη τιμή της παραμέτρου  $F_{ST}$ , κάτω από το καθεστώς ολοκληρωτικής απομόνωσης, δεν είναι πάντα η μονάδα. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η τιμή αυτή δεν είναι 1 γιατί η επίδραση του ομοπλασιακού πολυμορφισμού (εξαιτίας των μεταλλαγών) έχει ως αποτέλεσμα την υποεκτίμηση των τιμών  $F_{ST}$  σε μεγάλο βαθμό (Wright 1978 από Balloux *et al.* 2002, Charlesworth 1998, Nagylaki 1998, Hedrick 1999). Επομένως ένα φαινομενικά χαμηλό  $F_{ST}$  της τάξεως του 0.05 μπορεί στην πραγματικότητα να είναι ένδειξη σημαντικής γενετικής διαφοροποίησης.

Η μελέτη δομής των πληθυσμών μέσω SAMOVA, έδειξε ότι οι 11 πληθυσμοί που μελετήθηκαν μπορούν να ομαδοποιηθούν σε 7 ομάδες, που εμφανίζουν τη μέγιστη στατιστικά σημαντική, μεταξύ των ομάδων, ποικιλότητα. Οι περισσότεροι πληθυσμοί εμφανίζονται ως χωριστές ομάδες, αφού εμφανίζουν σχετικά υψηλή γενετική διαφοροποίηση ενώ μία ομάδα σχηματίζουν οι πληθυσμοί της Ν. Πορτογαλίας-Μάλαγα-Αλγερίας και μια δεύτερη ομάδα οι πληθυσμοί Πάτρας-Κόλπου των Λεόντων-Βισκαϊκού. Στην τελευταία περίπτωση, η ομαδοποίηση του Βισκαϊκού μαζί με τη Δυτική Μεσόγειο και το Ιόνιο προφανώς αντικατοπτρίζει κάποιο κεφάλαιο της πληθυσμιακής ιστορίας του γαύρου. Όμως, από γεωγραφική και διαχειριστική σκοπιά ο πληθυσμός του Βισκαϊκού είναι προφανώς διακριτός λόγω γεωγραφικής απόστασης αλλά και λόγω ότι μεταξύ Βισκαϊκού και Δυτικής Μεσογείου παρεμβάλλονται πληθυσμοί γενετικά διαφοροποιημένοι.

Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται γενικά να συμφωνούν με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών στο γαύρο όπου είχε χρησιμοποιηθεί το μιτοχονδριακό DNA ως γενετικός δείκτης (Magoulas *et al.* 1996, Magoulas *et al.* 2006). Η γενετική δομή των πληθυσμών του γαύρου με βάση το μιτοχονδριακό DNA καθορίζεται κυρίως με βάση την αναλογία των δύο κλάδων Α και Β στους πληθυσμούς. Οι πληθυσμοί του Ατλαντικού, από την Πορτογαλία μέχρι τις ακτές της Δυτικής Αφρικής μαζί με

αυτούς της Θάλασσας του Αλμποράν, εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό ατόμων του κλάδου A (>89%) και θεωρήθηκαν ως μία γενετικά ομοιογενής ομάδα (Magoulas *et al.* 2006). Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και με τη μικροδορυφορική ανάλυση, με μόνη διαφορά ότι ο πληθυσμός των Καναρίων εμφανίζεται πιο διαφοροποιημένος από τους υπόλοιπους. Κάτι παρόμοιο ισχύει και για τη Μεσόγειο, όπου με βάση το μιτοχονδριακό DNA οι πληθυσμοί της Δυτικής Μεσογείου, του Ιονίου, της Αδριατικής και του Σαρωνικού (με ποσοστό κλάδου B>50%) ομαδοποιούνται, ενώ με βάση το μικροδορυφορικό DNA η Αδριατική φαίνεται κάπως πιο διαφοροποιημένη, αν και στην παρούσα μελέτη, δεν υπήρχε δείγμα από το Σαρωνικό.

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι η γενετική ομοιότητα μεταξύ Βισκαϊκού και Δυτικής Μεσογείου που βρέθηκε με βάση το μιτοχονδριακό DNA επιβεβαιώνεται και με το μικροδορυφορικό DNA. Αντιθέτως, η ομοιότητα μεταξύ Μαύρης Θάλασσας-B. Αιγαίου και των πληθυσμών του Ατλαντικού που έχουν υψηλή συχνότητα ατόμων κλάδου A δεν παρατηρήθηκε στο επίπεδο του μικροδορυφορικού DNA. Ο πληθυσμός της Μαύρης Θάλασσας ήταν αρκετά διαφοροποιημένος σε σχέση με αυτόν της Καβάλας, στο επίπεδο του μικροδορυφορικού DNA, περίπου όσο και με τους πληθυσμούς του Ιονίου και της Δυτικής Μεσογείου. Επίσης, οι πληθυσμοί της Μαύρης Θάλασσας και της Καβάλας διέφεραν πολύ περισσότερο από τους πληθυσμούς του Ατλαντικού-Θάλασσας Αλμποράν (με τους οποίους έχουν παρόμοια συχνότητα ατόμων κλάδου A) απ' ότι με τους πληθυσμούς της Μεσογείου (με τους οποίους έχουν αρκετά διαφορετικές συχνότητες στους κλάδους A και B).

Η γενετική δομή των πληθυσμών του γαύρου που αποκαλύφθηκε με το μικροδορυφορικό DNA συμφωνεί, σε κάποια σημεία, και με τα αποτελέσματα μελετών που είχαν γίνει με αλλοενζυμικούς δείκτες. Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώθηκαν τόσο η σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών του Αιγαίου και του Ιονίου που βρέθηκε από τους Spanakis *et al.* (1989) όσο και η γενετική ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών. Άλλες αλλοενζυμικές μελέτες είχαν δείξει γενετική ομοιογένεια μεταξύ των πληθυσμών της βορειοδυτικής Μεσογείου (Pla *et al.* 1994, Tudela 1996, Tudela *et al.* 1999). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα δείγμα από εκείνη την περιοχή, αλλά η γενετική ομοιότητα που βρέθηκε μεταξύ αυτού του δείγματος και ενός του Ιονίου, υποστηρίζει την ύπαρξη γενετικής ομοιογένειας σε μια ευρύτερη περιοχή. Υπήρξαν και αλλοενζυμικές μελέτες που έδειξαν γενετική διαφοροποίηση μεταξύ του

Βισκαϊκού Κόλπου και της βορειοδυτικής και κεντρικής Μεσογείου (Bembo *et al.* 1996a; b), εύρημα που δεν συμφωνεί με τα αποτελέσματα του μιτοχονδριακού και μικροδορυφορικού DNA.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν τη σύνθετη εξελικτική ιστορία των πληθυσμών του γαύρου. Με βάση τα ευρήματα του μιτοχονδριακού DNA, οι Magoulas *et al.* (1996) είχαν διατυπώσει αρχικά την υπόθεση ότι η Μαύρη Θάλασσα είναι η πιθανότερη περιοχή προέλευσης του κλάδου A, ο οποίος απομονώθηκε εκεί κατά τη διάρκεια της τελευταίας παγετώδους περιόδου, και στη συνέχεια εισήλθε στο Αιγαίο, την υπόλοιπη Μεσόγειο και τον Ατλαντικό Ωκεανό. Σε επόμενη μελέτη όπου συμπεριέλαβαν περισσότερα δείγματα από τον Ατλαντικό (ακτές Πορτογαλίας και δυτικής Αφρικής), το πρότυπο κατανομής των κλάδων άλλαξε, οπότε επαναδιατύπωσαν το παραπάνω σενάριο, θεωρώντας ότι ο κλάδος A απομονώθηκε κάπου στον Ατλαντικό Ωκεανό (πιθανώς στις αφρικανικές ακτές), ενώ ο κλάδος B στη Μεσόγειο. Διαδοχικά γεγονότα εξάπλωσης και υποχώρησης των πληθυσμών, προκαλούμενα από κλιματικές αλλαγές του τέλους του Πλειστοκαίνου, διαμόρφωσαν το παρατηρούμενο πρότυπο.

Οι Grant *et al.* (2005) αναλύοντας ξανά τα αποτελέσματα των Magoulas *et al.* (1996) υποστήριζαν ότι και οι δύο κλάδοι πιθανώς απομονώθηκαν στον Ατλαντικό Ωκεανό (αφού οι συνθήκες στη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα κατά την τελευταία παγετώδη περίοδο ήταν απαγορευτικές για την επιβίωση του είδους) και από εκεί εισέβαλαν στη Μεσόγειο, σε διαφορετικές περιόδους.

Τα μικροδορυφορικά δεδομένα δεν μπορούν αδιαμφισβήτητα να υποστηρίξουν κάποιο από τα δύο σενάρια, αν και το πρώτο σενάριο φαίνεται πιο πιθανό. Αν ισχύει το πρώτο σενάριο, τότε ο κλάδος B ήταν απομονωμένος στη Μεσόγειο και εισήλθε στο Ατλαντικό προς τα Βόρεια εποικίζοντας το Βισκαϊκό Κόλπο. Σε μια επόμενη φάση ο κλάδος A, από τις αφρικανικές ακτές του Ατλαντικού, μετακινήθηκε προς τα Βόρεια, αντικατέστησε τους πληθυσμούς του κλάδου B, στις ακτές της Πορτογαλίας (που ίσως να είχαν εξαφανιστεί παροδικά από εκείνη την περιοχή) και παράλληλα εισήλθε στη Μεσόγειο. Φαίνεται ότι άτομα με απλότυπο τύπου A διαχύθηκαν προς την ανατολική Μεσόγειο και αναμίχθηκαν με τους εκεί πληθυσμούς και τυχαία η Μαύρη Θάλασσα αποικήθηκε μόνο από άτομα με απλότυπο A, που όμως στο πυρηνικό επίπεδο δεν διέφεραν από τα υπόλοιπα άτομα της Μεσογείου.

Είναι γεγονός ότι για να διαλευκανθεί πλήρως η εξελικτική ιστορία του γαύρου χρειάζονται δείγματα από περιοχές των νότιων ακτών της Μεσογείου καθώς και από

περιοχές του Δυτικού Ατλαντικού. Εκεί υπάρχει το είδος *E. eurystole* το οποίο δεν διακρίνεται μορφολογικά από το *E. encrasicolus* και πιθανώς αποτελεί υποείδος του τελευταίου. Αν αυτό ισχύει, μένει να αποδειχθεί αν το *E. eurystole* αποτελεί τον πληθυσμό προέλευσης ενός από τους δύο μιτοχονδριακούς κλάδους ή αποτελεί πρόσφατη επέκταση της εξάπλωσης του *E. encrasicolus* προς το δυτικό Ατλαντικό.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., Dubnick M., Polymeropoulos M.H., Xiao H., Merril C.R., Wu A., Olde B., & Moreno R.F. et al. (1991).** Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252**: 651-656.
- Akkaya M.S., Bhagwat A.A., & Cregan P.B. (1992).** Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* **132**: 1131-1139.
- Alexandrov A.I. (1927).** Anchovy from Azov-Black Sea basin and its origin and taxonomy. *Proc. Kerch Fish. Stn.*, 1/2 & 3: 43 pp.
- Altuchov J. P. (1974).** *Fish Population Genetics*. Moscow 245 pp.
- Amos B., Schlotter C., & Tautz D. (1993).** Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science* **260**: 670-672.
- Ashley M., & Dow B.D. (1994).** The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. *Mol. Ecol. Evol.* **10**: 185-198.
- Beckman J.S., & Weber J.L. (1992).** Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* **12**: 627-631.
- Belkhir K., Borsa P., Raufaste N., Chikhi L., Bonhomme F. (2000).** Genetix version 4.02. logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations. université Montpellier-2. Montpellier. France.
- Bembo D.G., Carvalho G.R., Cingolani N., & Pitcher T.J. (1996a).** Electrophoretic analysis of stock structure in Northern Mediterranean anchovies, *Engraulis encrasicolus*. *ICES J. Mar. Sci.* **53**: 115-128.
- Bembo D.G., Carvalho G.R., Cingolani N., Arneri E., Giannetti G., & Pitcher T.J. (1996b).** Allozymic and morphometric evidence for two stocks of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* in Adriatic waters. *Marine Biology* **126**: 529-538.
- Bembo D.G., Carvalho G.R., Snow M., Cingolani N., & Pitcher T.J. (1995).** Stock discrimination among European anchovies, *Engraulis encrasicolus*, by means of PCR-amplified mitochondrial DNA analysis. *Fishery Bulletin* **94**: 31-40.

- Bentzen P., Taggart C.T., Ruzzante D.E., & Cook D. (1996).** Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**: 2706–2721.
- Benzécri J. P. (1973).** L'Analyse des Données: T.2, l'Analyse des correspondances. Paris: Dunod.
- Borsa P. (2002).** Allozyme, mitochondrial-DNA, and morphometric variability indicate cryptic species of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Biol. J. Linn. Soc.* **75**: 261–269.
- Borsa P. Collet A., & Durand J.D. (2004).** Nuclear-DNA markers confirm the presence of two anchovy species in the Mediterranean. *C. R. Biol.* **327**: 1113–1123.
- Broude N.E., Zhang L., Woodward K., Englert D., & Cantor C.R. (2001).** Multiplex allele-specific target amplification based on PCR suppression. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*, **98**(1): 206-211.
- Brouker A.L., Cook D., Bentzen P., Wright J.M., & Doyle R.W. (1994).** Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **51** (9): 1959-1966.
- Bulganova Y. (1993).** Daily feeding dynamics of the Black Sea anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Journal of Ichthyology* **33**: 78-88.
- Buschiazoo E., & Gemmell N.J. (2006).** The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bio. Essays.* **28**: 1040-1050.
- Chapman R. W., Patton J. C., & Eleby. B. (1994).** Comparisons of mitochondrial DNA variation in four alosid species as revealed by the total genome, the NADH dehydrogenase I and cytochrome *b* regions. In A. R. Beaumont (ed.), *Genetics and evolution of aquatic organisms*. p. 249-263. Chapman and Hall. London, England.
- Chapman R.W., Sedberry G.R., Koenig C.C., & Eleby B.M. (1999).** Stock identification of gag, *Mycteroperca microlepis*, along the Southeast coast of the United States. *Mar. Biotechn.* **1**: 137–146.
- Charlesworth B. (1998).** Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. *Mol.Biol.Evol.* **15**: 538-543.
- Chiu T.S., Lee Y.J., Huang S.W., & Yu H.T. (2002).** Polymorphic microsatellite markers for stock identification in Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *Molecular Ecology Notes.* **2**: 49-50.

- Chow S., Clarke M. E., & Walsh P. J. (1993).** PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. *Fish. Bull.* **91**: 619-627.
- Cronin M. A., Spearman W. J., Wilmot R. L., Patton J. C., & Bickham J. W. (1993).** Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon *O. keta* detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 708-715.
- Demir M., & Demir N. (1961).** Note on the sardine (*Clupea pilchardus Walb.*) and its reproduction in the sea of Marmara. *Proc. gen. Fish. Coun. Medit.* **6**: 221-223.
- Dib C., Faure S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J., & Weissenbach J. (1996).** A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380**: 152-154.
- Dietrich W.F., Miller J.C., Steen R.G., Merchant M., Damron D., Nahf R., Gross A., Joyce D.C., Wessel M., Dredge R.D., Marquis A., Stein L.D., Goodman N., Page D.C., & Lander E.S. (1994).** A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nat. Genet.* **7**: 220-245.
- Dupanloup I., Schneider S., & Excoffier L. (2002).** A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**: 2571-2581.
- Edwards K.J., Barker J.H.A., Daly A., Jones C., & Karp A. (1996)** Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques*, **20**: 758-760.
- Ellegren H. (1992).** DNA typing of museum birds. *Nature* **351**: 113.
- Excoffier L., Laval G., & Schneider S. (2005).** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- Excoffier L., Smouse P., & Quattro J. (1992).** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Fage L. (1911).** Recherches sur la biologie de l'anchois *Engraulis encrasicolus* (L.) *Ann. Inst. Oceanography, Monaco* **2**(4):1-40.



- Fage L. (1920).** Engraulidae. Report. Danish Ocean. Expedition 1908-1910 to the Mediterranean and Adjacent Seas, 2, Biology A **9**:1-33.
- FAO (2002).** FAO Fisheries Statistics Capture Production 2000, Vol.90/1, FAO Fisheries Series No.60: 617.
- Garcia A., Palomera I., Liorzou B., Giovanardi O., & Pla C. (1994).** Northwestern Mediterranean anchovy: distribution, biology, fisheries and biomass estimation by different methods. Final Project Report to the Commission of the European Community MA.3.730. European Commission, Brussels.
- Garcia de León F.J., Chikhi L., & Bonhomme F. (1997).** Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural population of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Mol. Ecol. **6**: 51–62.
- Gelehrter T.D., Collins F.S., Ginsburg D. (2000).** Αρχές Ιατρικής Γενετικής, 2<sup>η</sup> Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη. σελ. 77-112.
- Gelfand D.H., White T.J. (1990).** In: PCR protocols: a guide to methods and applications (eds) M.A. Innis D.H., Gelfand J.J., Shinsky T.J. White. Academic Press, San Diego, pp129.
- Glenn T.C. (1995).** Microsatellite Manual, version 4. Laboratory of molecular Systematics. Smithsonian Institution.
- Goff D.J., Galvin K., Katz H., Westerfield M., Lander E.S., & Tabin C.J. (1992).** Identification of polymorphic simple sequence repeat in the genome of the zebrafish. Genomics **14**: 200-202.
- Goldstein D.B., & Schlötterer C. (eds). (1999). Microsatellites: evolution and applications. In: Schlötterer C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma **109**: 365-371.**
- Goudet 1999.** [www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm](http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm).
- Goudet J. (1995).** FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. J. Hered. **86**: 485-486.
- Grant S.W. & Bowen B.W. (2006).** Living in a tilted world: climate change and geography limit speciation in Old World anchovies (*Engraulis*; Engraulidae). Biol. J. Lin. Soc. **88**: 673-689.
- Grant S.W. (2005).** A second look at mitochondrial DNA variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*): test of the “basin” model and Black Sea isolation hypothesis. Genetica **125**: 293-309.

- Grant S.W., & Bowen B.W. (1998).** Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* **89**: 415–426.
- Grant S.W., Leslie R.W., & Bowen B.W. (2005).** Molecular genetic assessment of bipolarity in the anchovy genus *Engraulis*. *J. Fish Biol.* **67**: 1–24.
- Haddad L.A., Fuzikawa A.K., & Pena S.D.J. (1997).** Simultaneous detection of size and sequence polymorphisms in the transcribed trinucleotide repeat D2S196E (EST00493). *Hum. Genet.* **99**: 796-800.
- Hall T.A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- Hamada H., Petrino M.G., & Kakunaga T. (1982).** A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl Acad Sci. USA* **79**: 6465-6469.
- Hartl D.L., & Clark A.G. (1997).** Principles of population genetics. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Hedrick P.W. (1999).** High variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution.* **53**: 313-318.
- Hentschel C.C. (1982).** Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene repeat are sensitive to S1 nuclease. *Nature* **295**: 714-716.
- Hunter B.L., & Markert C.L. (1957).** Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*: **125**. 1294-1295.
- Ivanov L. (1985).** The fisheries resources of the Mediterranean. Part two: Black Sea. F.A.O studies and reviews 60. Rome.
- Ivanova P.P., & Dobrovolov I.S. (2006).** Population-genetic structure on European anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) (Osteichthyes: Engraulide) from Mediterranean Basin and Atlantic Ocean. *Acta Adriatica.* **47**(1): 13-22.
- Jensen J.L., Bohonak A.J., & Kelley S.T. (2005).** Isolation by distance, Web Service, BMC. Genetics. vol. 6.13. March.
- Kalnina V.V., & Kalnina O.V. (1985).** Genetic differentiation and reproductive relationship between the Azov and Black Sea races of anchovy. 3. Introgressive race hybridization and population structure of the Black Sea anchovy (in Russian). *Genetics* **21**(8): 1352-1360.

- Kalnin V.V., Kalnina O.V., & Dashova M.B. (1984).** Genetic differentiation and reproductive relationship in the Azov and Black Sea races of anchovy. 1. Biochemical polymorphism (in Russian). *Genetics* **20**(2): 303-308.
- Kalnina O.V., & Kalnin V.V. (1984).** Genetic differentiation and reproductive relationship between the Black Sea race and Azov Sea race of European anchovy. 2. Genetic differences between the Black Sea race and the Azov Sea race and their intrarace heterogeneity. *Genetics* **20**(2): 309-313.
- Karacam H., & Duzgunes E. (1990).** Age, growth and meat yield of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) in the Black Sea. *Fisheries Research* **9**: 181-186.
- Kimura M., & Crow J.F. (1964).** The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**: 725-738.
- Koutsikopoulos C., & Le Cann B. (1996).** Physical processes and hydrological structure to the Bay of Biscay anchovy. *Scientia Marina* **60**(Supl. 2): 9-19.
- Kristoffersen J. B., & Magoulas A. (2008).** Population structure of anchovy *Engraulis encrasicolus* L. in the Mediterranean Sea inferred from multiple methods. *Fisheries Research* **91**: 187–195.
- Kumar S., Tamura K., & Nei M. (2004).** MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Landi M., Garoia F., Piccinetti C., & Tinti F. (2005).** Isolation of polymorphic microsatellite loci from the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Molecular Ecology Notes* **5**: 266–268.
- Lefort F., & Douglas G.C. (1999).** An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Ann. Forest Sci.* **56**: 259-263.
- Lefort F., Echt C., Streiff R., & Vendramin G.G. (1999).** Microsatellite sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics. *Forest Genetics* **6**(1): 5-10.
- Lisovenko L.A., & Andriyanov D.P. (1996).** Reproductive biology of anchovy (*Engraulis encrasicolus ponticus* Alexandrov 1927) in the Black Sea. *Sci. Mar.* **60**(2): 209–218.

- Litt M., & Luty J.A. (1989).** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* **44**: 397-401.
- Lundy C.J., Moran P., Rico C., Milner R.S., & Hewitt G.M. (1999).** Macrogeographic population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish. *Mol. Ecol.* **8**: 1889–1898.
- Machias A., Giannoulaki M., Somarakis S., Koutsikopoulos C., Manousakis L., Kapantagakis A., & Tsimenides N. (2001).** Stock assessment of anchovy biomass in Central Aegean and Ionian sea through acoustic method. *Proc. 10th Hell. Conference of Ichthyologists*: 57-60.
- Magoulas A., Castilho R., Caetano S., Marcato S., & Patarnello T. (2006).** Mitochondrial DNA reveals a mosaic pattern of phylogeographical structure in Atlantic and Mediterranean populations of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**: 734-746.
- Magoulas A., Tsimenides N., & Zouros E. (1996).** Mitochondrial DNA Phylogeny and the Reconstruction of the Population History of a Species: The Case of the European Anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Molecular Biology and Evolution* **13**(1): 178-190.
- Mikhailov K.R. (1993).** Sex maturation of the young of the year anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.), off the Bulgarian Black Sea coast in August 1987. (unpublished manuscript).
- Mikhman S.A., & Tomanovich L.V. (1978).** The feeding of the Azov anchovy, *Engraulis encrasicolus maeoticus*. *Journal of Ichthyology* **17**: 240-244.
- Miller S.A., Dykes D.D., & Polesky H.F. (1988).** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**:1215.
- Morales-Nin B., & Pertierra J.P. (1990).** Growth rates of the anchovy *Engraulis encrasicolus* and the sardine *Sardina pilchardus* in the Northwestern Mediterranean Sea. *Marine Biology* **107**: 349-356.
- Motos L., Santiago J., & Uriarte A. (1991).** Assessment of spawning biomass of the Bay of Biscay anchovy population (*Engraulis encrasicolus* L.) using the Daily Egg Production Method. *ICES CM 1991/H*: p 33.

- Motos L., Uriarte A., & Valencia V. (1996).** The spawning environment of the Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). *Scientia Marina* **60** (Suppl. 2): 117-140.
- Nagylaki T. (1998).** Fixation indices in subdivided populations. *Genetics*. **148**: 1325-1332.
- Ohta T., & Kimura M. (1973).** A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res.* **22**: 201-204.
- Palomera I. (1992).** Spawning of the anchovy *Engraulis encrasicolus*, in the North-Eastern Mediterranean relative to hydrographic features in the region. *Marine Ecology Progress Series* **79**:215-223.
- Palomera I., & Sabates A. (1990).** Co-occurrence of *Engraulis encrasicolus* and *Sardinella aurita* eggs and larvae in the western Mediterranean. *Scientia Marina* **54**(1): 61-67.
- Patarnello T., Filip A., Volckaert M. J., & Castilho R. (2007).** Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*. **16**(21): 4426-4444.
- Pertierra J.P. (1992).** Biología pesquera de la anchoa (*Engraulis encrasicolus*) en el litoral Catalan. Ph.D. Thesis. Universitat Politècnica de Catalunya. pp. 281.
- Pla C., Tudela S., Roldan M.I., & Garcia-Marin J.L. (1994).** Population and stock units by genetic identification. In: García, A. (coord), *Northwestern Mediterranean Anchovy: Distribution, Biology, Fisheries and Biomass estimation by different methods*. pp. 43-46. Final Project Report to the Commission of the European Community MA.3.730. European Commission, Brussels.
- Pousanov I.I. (1936).** Anchovy. Scientificcommercial monography. Notes of Gorkij Univ. **5**:101.
- Rabinow P. (1996).** Making PCR. A story of biotechnology. The University of Chicago Press / Chicago & London.
- Raymond M., & Rousset F. (1995).** GENEPOP (ver. 1.2): a population genetics software for exact test and ecumenicism, *J. Heder*. **86**: 248-249.
- Regner S. (1996).** Effects of environmental changes on early states and reproduction of anchovy in the Adriatic Sea. *Sci. Mar.* **60**(2): 167-177.

- Reid J.L. (1967).** Oceanic environments of the genus *Engraulis* around the world. CalCOFI Rep. **11**: 26-33.
- Rice W.R. (1989).** Analysing tables of statistical tests. *Evolution*. **43**: 223-225.
- Rozen S., & Skaletsky H. (1998).** Primer3. Code available at [http://www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.htm](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.htm).
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., & Erlich H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Santaclara F.J., Cabado A.G., Vieietes J.M. (2006).** Development of a method for genetic identification of four species of anchovies: *E. encrasicolus*, *E. anchoita*, *E. ringens*, *E. japonicus*. *Eur. Food Res. Technol.* **223**: 609-614.
- Schlötterer C. (2000).** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**: 365-371.
- Schlötterer C., & Pemberton J. (1998).** The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations-a critical review. In: DeSalle, R., Schierwater, B. *Molecular approaches to ecology and evolution*. Birkhäuser, Basel, 71-86.
- Schlötterer C., & Tautz D. (1992).** Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 211-215.
- Sebastio P., Zanelli P., Neri T.M. (2001).** Identification of Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and Gilt Sardine (*Sardinella aurita*) by Polymerase Chain Reaction, Sequence of Their Mitochondrial Cytochrome b Gene, and Restriction Analysis of Polymerase Chain Reaction Products in Semipreserves. *J. Afric. Food Chem* **49**: 1194-1199.
- Sefc K.M., Lefort F., Grando M.S., Scott K., Steinkellner H., & Thomas M.R. (2001).** Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*, K.A.Roubelakis-Angelakis (editor), Kluwer Publishers, Amsterdam. 433-463.
- She J.X., Autem M., Kotoulas G., Pasteur N., & Bonhomme F. (1987).** Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts, Soleidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **32**: 357-371.
- Shevchenko N.F. (1980).** Geographical changing of anchovy *Engraulis encrasicolus* (L.) in the Mediterranean basin (in Russian). *Ichthyol. J.* **20**(1/120): 20-30.

- Smithies O. (1955).** Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal individuals. *Biochemical Journal* **61**: 629-641.
- Spanakis E., Tsimenides N., & Zouros E. (1989).** Genetic differences between populations of sardine, *Sardina pilchardus*, and anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the Aegean and Ionian seas. *J. Fish. Biol.* **35**: 417-437.
- Stergiou K.I. (1986).** On the anchovy and pilchard fishery in Greek waters, 1964-1982. *Rap. Comm. Int. Mer. Medit.* **30**: 241.
- Stergiou K.I. (1990).** A seasonal autoregressive model of the anchovy *Engraulis encrasicolus* fishery in the eastern Mediterranean. *Fish Bull US* **88**(2): 411-414.
- Stergiou K.I., & Georgopoulos D. (1993).** The distribution of phytoplankton pigments and the fishery of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Hellenic Seas. *Naga* **16**(2): 34-37.
- Stergiou K.I., Christou E.D., Georgopoulos D., Zenetos A., & Souvermezoglou C. (1997).** The Hellenic Seas: Physics, chemistry, biology and fisheries. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review.* **35**: 415-538.
- Strand M., Prolla T.A., Liskay R.M., & Petes T.D. (1993).** Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**: 274-276.
- Streisinger G., & Owen J.E. (1985).** Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* **109**: 633-659.
- Tautz D. (1989).** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6463-6471.
- Tautz D. (1993).** Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *In: DNA fingerprinting, State of the art*, S.D.J. Pena S.D.J., R. Chakraborty, J.T. Epplen, and A.J. Jeffreys (Eds). Birkhäuser Verlag, Basel, 21-28.
- Tautz D., & Renz M. (1984).** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4127-4138.
- Thoren A.P., Paxton R.J., & Estoup A. (1995).** Unusually high frequency of (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). *Insect Mol Biol* **4**(3): 141-148.
- Toonen R.J., & Tyre A.J. (2007).** If larvae were smart: A simple model for optimal settlement choices of competent larvae. *Marine Ecology Progress Series.* **349**: 43-61.

- Tsigenopoulos C.S., Hellemans B., Chistiakov D.A. et al. (2003)** Eleven new microsatellites of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mol. Ecol. Notes* **3**: 352–354.
- Tudela S. (1996)**. Estructura poblacional i ecologia tròfica del seitó, *Engraulis encrasicolus*, de la Mediterrània nord-occidental (in Catalan). Ph. D. Thesis. University of Girona.
- Tudela S. (1999)**. Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fisheries Research* **42**: 229-243.
- Tudela S., & Palomera I. (1997)**. Trophic ecology of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Catalan Sea (northwest Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series* **160**: 121-134.
- Tudela S., Garcia-Marin J.L., & Pla C. (1999)**. Genetic structure of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L., in the north-west Mediterranean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **234**: 95-109.
- Uriarte A., Prouzet P., & Villamor B. (1996)**. Bay of Biscay and Ibero Atlantic anchovy populations and their fisheries. *Scientia Marina* **60**(Suppl. 2): 237-255.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. (2004)**. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. **4**: 535–538.
- Wahlund S. (1928)**. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* **11**: 65–106.
- Weber J.L. (1990)**. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> Polymorphisms. *Genomics* **7**: 524-530.
- Weber J.L., & May P.E. (1989)**. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* **44**: 388-396.
- Weissenbach J., Gyapay G., Dib C., Vignal A., Morissette J., Millaseau P., Vaysseix G., & Lathrop M. (1992)**. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**: 794-801.
- Whitehead P.J.P. (1984)**. Clupeidae – Engraulididae. In *Fishes of the North Eastern Atlantic and Mediterranean*, ed. Whitehead P.J.P., Bouchot M.L., Hurgan J.C., Nielsen J., & Tortonese E. pp.268-283. UNESCO.



- Whitehead P.J.P. (1985).** FAO species catalogue. vol. 7. Clupeoid fishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, shads, anchovies and wolf-herring. Part I. Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. FAO Fish Synops. **125**: 7.
- Whitehead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J., & Tortonese E. (1986).** Fishes of the North-Eastern Atlantic and Mediterranean. Volume I, Unesco, 1987 Paris.
- Whitehead P.J.P., Nelson G., Wongratana T. (1988).** FAO species catalogue, vol. 7, Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidea), an annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 2. Engraulididae, FAO Fish. Synop. 125 305–579.
- Wright S. (1978).** Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago.
- Yue G.H., Ho M.Y., Orban L., & Komen J. 2004.** Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. Aquaculture **234**: 85-98.
- Zheng L., Collins F.H., Kumar V., & Kafatos F.C. (1993).** A detailed genetic map for the X chromosome of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Science **261**: 605-608.
- Βιδάλης Ε. (1949).** Συμβολή εις τη μελέτην της βιολογίας του γαύρου (*Engraulis encrasicolus*) των Ελληνικών θαλασσών. Πρακτ. Ελλ. Υδροβ. Ινστ. **3**(2): 41-70.
- Εθνική Στατιστική Υπηρεσία της Ελλάδας (1985-2000).** Αποτελέσματα έρευνας θαλάσσιας αλιείας με μηχανοκίνητα σκάφη έτους 1982-1998. Αθήνα 1985-2000.
- Στεργίου Κ.Τ. (1990).** Διάρθρωση ελληνικής αλιευτικής παραγωγής. Αλιευτικά Νέα. **103**: 31-38.
- Σωμαράκης Σ. (1993).** Συμβολή στη μελέτη των πλαγκτονικών σταδίων του γαύρου στο Αιγαίο. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, σελ. 85.
- Τσιμενίδης Ν., & Καραγκίτσου Η. (1984).** Αλιευτική κατάσταση των αποθεμάτων σαρδέλας και γαύρου στις ελληνικές θάλασσες. Πρακτικά Α Πανελληνίου Συμποσίου ωκεανογραφίας και Αλιείας. Αθήνα. 578-589.
- Υπουργείο Γεωργίας. Γενική 3/υση Αλιείας. 3/υση Αλιευτικών Εφαρμογών και Ε.Α.Π. (2000).** Μεταποίηση προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας. Ενημερωτικό έντυπο. σελ. 37.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πίνακας με τα χαρακτηριστικά όλων των μικροδορυφορικών εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για το γαύρο.

Locus	Repeat Motif	Primer Sequences	Ta (°C)	Prod. size
Ee2_091	(AGG)12	F5' AGAGCAGGTTCTTGCTGTGG R5' TGTGGTGCCTACTATCAGG	60.59 59.89	259
Ee2_091 2	(CCGCA)8	F5' GGTCTTGAGCTTGGCATAGG R5' CCGGAAGACACTCTGCACAC	59.84 61.9	140
Ee2_095	(TG)40	F5' TAGGCTGAGTTAGGGCACTG R5' TCTGGTCAGGCACATACGAG	58.13 59.86	196
Ee2_104	(AC)6	F5' CTCTCACACTCTGACATACACACC R5' CCAATGTATTGCAAGGCAAG	58.8 59.18	109
Ee2_112	(CT)10	F5' GCACAGAAGCTACGACATGG R5' AAGGAAAGACGTAGCACAGTGAG	59.47 59.99	287
Ee2_130	(AGG)7	F5' AACACAAACAACAACATGTGGAG R5' TGACTTCTCTCGACTGAGTTTCC	59.85 60.05	100
Ee2_134	(AGG)10	F5' CCCCAAATATTGGAGCAAG R5' CACCCCTTCTCCTCTTCC	58.02 57.09	133
Ee2_135	(ATTAG)10	F5' AGGGCAGTGACAGGAGAGTC R5' TCGTTACCCTGCGTTTATACTG	59.43 59.21	143
Ee2_139	(AC)14GT(AC)5GT(AC)5	F5' AGATGAGCTGCGTGCTACTG R5' GATGGCATGCATGTATACGG	59.37 59.8	143
Ee2_156	(CA)7AA(CA)20	F5' CAACTGGGTTCCCTCAGAAG R5' TCCTCTCCAAGTAACAATGACATC	59.69 59.53	270
Ee2_161	(TCC)8	F5' CATCGAGAACTCGCCCTATC R5' AGCAGGCTCCTGTAGGTTAC	59.8 56.16	224
Ee2_165	(TTC)4CTC(TCC)8	F5' TACGTCTGCGGAGTTCACAC R5' AAATTCCTGGCACACGTCTC	59.9 60.12	243
Ee2_165 2	(CCT)7	F5' GGGTGGGTTAAAGATGAAGC R5' AGGGATCTTCAGGGAACCAG	58.5 60.45	193
Ee2_167	(AGG)8	F5' TGGACCATGTTCTTCATGACC R5' TCCTTcTCCGTCTCCTCATC	60.77 59.33	136
Ee2_167 2	(AGG)4AAG(AGG)5	F5' ATGAGGAGACGGAgAAGGAG R5' GTGGAGCATGTGGGATTGAG	58.41 61.5	204
Ee2_167 3	(AGG)8.... (AGG)4AAG(AGG)5	F5' TGGACCATGTTCTTCATGACC R5' TCCGTCTGCCTTAACTCACTC	60.77 59.49	232
Ee2_184	(GAG)6	F5' GCAGGTGGATGTTGATGATG R5' AGTGTCTCCCTCCACCTCAG	59.93 59.27	220
Ee2_260	(TCC)8	F5' AACACCTTCTGCAGGGTGAG R5' AGGATGGAGGAGGGTAGAGG	60.3 59.51	134
Ee2_260 2	(TCC)11	F5' TGGGTCTGGATCCCTAGGTC R5' GGAGAAGCAGGAGGAGAGAGT	61.25 59.19	170
Ee2_263	(TC)17	F5' TTCGGTTTCACTGTCATTTCG R5' GAGGAGCAGGAGGAAGAGG	59.69 59.06	181
Ee2_321	(AGG)10	F5' CTGAGCACCAGGAGGAAGAG R5' CAGTTCATGCATGGGTCATC	60.13 59.93	239
Ee2_346	(AC)13(GCAC)6	F5' TTTGTAGCCCACTGCTACCC R5' CTCAACCTAAGGCCTCGTG	60.13 59.87	285
Ee2_349	(AGG)9	F5' TGAGGAGATGGGAGGAAGAG R5' TCACAGACGATCATGCTTCAG	59.33 60	264

Locus	Repeat Motif	Primer Sequences	Ta (°C)	Prod. size
Ee2_407	(CA)13	F5' AGGAATCTCCTTCCCCTCTC R5' GTGGGTCTGTGGGTGTTTTG	59.64 61.27	165
Ee2_412	(TG)5TA(TG)7	F5' GCCGAATAAATTCTCTGCTTG R5' AGATGCACATGCAGGAACAC	59.12 59.71	109
Ee2_414	(CA)11	F5' TTTCACGACTATTCTGACCAC R5' CAGCAGTAGTCACTAAAGATGAGG	56.88 57.43	113
Ee2_414 2	(TCC)6ACC(TCC)4	F5' CATCTTTAGTGACTACTGCTGTTC R5' AGGCATGGCCTGTAAATGAG	58.6 60.1	128
Ee2_452	(AC)13	F5' CCCAACCCCTAGGGAGACATC R5' TCGTTCAGCAAGCATAACACC	60.7 59.87	264
Ee2_452 2	(TC)8	F5' TGGTGTATGCTTGCTGAACG R5' CCCAGTTAGGAGGAATGCAG	60.87 59.69	170
Ee2_477	(AGG)7	F5' TTGGTGAGGAAGCAACAGTG R5' TAAGATGGCACGCTGACTTG	59.87 60.01	223
Ee2_478	(TCC)9	F5' TCCTCTATGTCTCGTCTCTCTC R5' CTTGTTCCGCTGCATGTTC	59.84 60.41	202
Ee2_478 2	(AGG)9	F5' CTGTGTTCCGCTGCATGTTC R5' CCCACCTTCTTCTCCTC	60.41 57.09	161
Ee2_483	(AGG)9	F5' AGCTGTTTCTCCAGCTCCTG R5' TTTACCTCCTCCTCCACACC	59.75 58.99	235
Ee2_483 2	(AGG)11	F5' ATGAGAAGGAGGACGGTGTG R5' AATGGGATAGCTCGTTGTGC	60.11 60.1	227
Ee2_489	(CT)12TT(CT)16	F5' TCTGTGTCTGCTCTCTCTGTC R5' ATCCAGAGCCAGCTTGAATC	59.78 59.39	211
Ee2_507	(GAAA)14GAAC(GAAA)6GAGA(GAAA)4	F5' GGAAGGGACCTAGATGGAGTG R5' ATCCCATTGATGTCCTGAGC	59.94 59.89	279
Ee2_508	(AGG)8	F5' CACATGCTCGCTAAACATTG R5' ACCTGATGCTGCTTGGTAGC	57.95 60.43	160
Ee5_015	(CCT)8	F5' ATGAGGGTCTGTTGCTGCTC R5' TCTCCTCACGGATGATGTTG	60.42 59.63	300
Ee5_025	(TCC)6	F5' CCAGCCAACACAATTCTTC R5' TTTCGGGATGGAGCTATGAG	60.5 60.17	191
Ee5_040	(AGG)6	F5' CTGGACTATGGCCTCAAAGC R5' TAAGGCCTGTATCCCTGTGG	59.84 59.95	297
Ee5_042	(AGG)3AT(AGG)8	F5' TGACGTGTGAACCCTGTCAC R5' TTTCCGTCCTCCGTCCTC	60.64 61.21	213
Ee5_049	(TCC)7	F5' CCAACAAGGTGTCACTGTCC R5' CGATCATGGCGTGATTTATG	58.99 59.91	214
Ee5_050	(AGG)9	F5' TTATGACGGGAGCAAAGGAG R5' AGTGGTTCGAGTTTGGTTG	60.21 59.74	224
Ee5_065	(CT)12TT(CT)16	F5' GTTGGCTGCCAGTGTCTTG R5' CAGAGCTGAAGCCAGAGCAG	60.46 61.57	287
Ee5_083	(AGG)8	F5' TGTCAGACTGCTGGTGGTTC R5' TCTGGACTCCTTTGTTGCAG	59.87 59.01	171
Ee5_084	(TG)15	F5' ATTTCCATGAGCCTCCTCTG R5' GCTGGAGCAAAGGTGGATAG	59.24 59.84	278
Ee5_085	(AC)8	F5' GTGCAGGCATGTTGATATGG R5' CGCAGAGCCAGAGATAGACC	59.96 60.12	183
Ee5_085 2	(TC)7	F5' CAGAAACACCCTGCACACAC R5' AAGCCTGGAGGAGAAAGAGG	60.2 59.95	181

Locus	Repeat Motif	Primer Sequences	Ta (°C)	Prod. size
Ee5_111	(GGA)6	F5' AGATGCACAACAGGGAGGAG R5' GACGGTCTGGGACTGATTTG	60.26 60.51	102
Ee5_114	(GA)36	F5' TGCACTATGGGACACAATGG R5' CCCATTGGCTAGAATGATGG	60.39 60.29	208
Ee5_128	(CA)6	F5' TCGTTTCCCGCTCTACAAAG R5' AACTCTCAGCTCGAGCAACC	60.38 59.75	252
Ee5_128 2	(CA)7	F5' GTTGCTCGAGCTGAGAGTTG R5' ACATGAACAGAGGCAGATCG	58.91 58.83	101
Ee5_128 3	(GGA)8	F5' AGGCGATCTGCCTCTGTTC R5' TGCAATTACATCTGAATCCAAC	60.51 57.63	111
Ee5_161	(AC)7	F5' CGGAGACCCTGGGCTATAA R5' GCAAATGTCCCACTCCAAC	60.04 60.36	116
Ee5_161 2	(TGCC)5AG(CCTA)5	F5' TGTTTGGAGTGGGACATTTG R5' TGCAAACtTGtCACCTTTCG	59.39 59.88	297
Ee5_161 3	(CT)4(CG)2(CT)8	F5' CCGAAAGGTGaCAAgtTTGC R5' TCTGCAAACCAGAGACATGC	60.67 59.99	132
Ee5_178	(TCC)5	F5' TGTTGACAGCAGGGCTAATG R5' TGCGCCTCTCTCGTACTC	59.86 60.68	216
Ee5_227	(GGAGTA)7	F5' TCTCGCAGAAGCACGAAAG R5' TctGGCAGCCATACAGAAGG	60.42 61.34	223
Ee5_245	(TG)7(CG TG)5	F5' CGCCACCTCCTCATAATACC R5' GTAGGCACACATGCATACCC	59.41 58.88	143
Ee5_326	(CCT)6	F5' AAAGCCTCCTCCAGTCAAGC R5' AGACAAGGATGGAGCAGGTG	60.9 60.26	231
Ee5_334	(CA)3GA(CA)11	F5' CCACCCATGTTGTTTCATCAC R5' CAGCCCGTAGAACTCAAGC	59.66 60.02	269
Ee5_335	(AGG)8	F5' TATCCGAGGCTTCAACCAG R5' TCCTTACAACCACCTCCTG	60.21 61.1	300
Ee5_345	(CGCA)5	F5' GCACGAGAGTAAACCCAAGG R5' ACTGTGCGTGTGTGCGACT	59.73 61.64	253
Ee5_345 2	(CA)7	F5' GTCGCACACACGCACAGT R5' ACAGAATGAATGTTCCAATTTT	60.56 55.33	163
Ee5_357	(GT)7CTGTGC(GT)3GAGA(GT)5	F5' GAGGCCAGCTTTGAACAGAC R5' AGTCCTTAACCCAGCAGCAG	60 59.5	269
Ee5_369	(GAA)3(GGA)6GAA(GGA)5	F5' AAGCCATTGTGTCTGGTGAAG R5' GTTTAGCGGCGTATGTGTTG	60.16 59.25	189
Ee5_376	(TG)11	F5' CCACACCTACGGTGAGTGAC R5' GCAAAGAGAATAGCACATGCAG	59.02 60.05	149
Ee5_376 2	(TG)6	F5' TAGAAGATGTGTGCGTGTGC R5' TGCCTCACATTTATGCACTG	58.44 58.29	107
Ee5_376 3	(GATA)25(GT)8(GCGT)20	F5' CCTCAGAGGTGGATTCTATGTG R5' ACATGCCCATGCACTCAC	58.67 58.99	247
Ee5_392	(GGA)9	F5' TAAGCTTGACGCGAGAGAGG R5' CGCGGATTATTCCACATTTT	60.81 60.29	192
Ee5_393	(GGA)6	F5' ACAACCATGAGGAAGGAAGG R5' TCGGCTAGTGGAGTTCAAGC	58.99 60.54	186
Ee5_408	(CTT)12CG(TCC)8	F5' AGCTGTGTCAAAGCCAGATG R5' TTCTGGGTGGAGGTGAGAAC	59.04 60.09	200
Ee5_421	(CA)3TA(CA)9	F5' TCCTGAATTTGGTGCTATTCC R5' GTGTGTGTGTGCCCATGC	59.03 60.64	111

Locus	Repeat Motif	Primer Sequences	Ta (°C)	Prod. size
Ee5_421 2	(CA)6...(CA)18	F5' ATCATACGCACACACAAGC R5' AAAGCAGGCAACAGGAGATG	55.51 60.4	228
Ee5_429	(TCC)8	F5' CATCTTCATCCTCGGCTCTC R5' TGTCTTGCAGGAGCTTATCG	59.91 59.17	161
Ee5_441	(TCC)7	F5' CCGGAAGAGTCTGAGTGAGG R5' GCCGGGAGTGAAATTAGATG	59.98 59.53	243
Ee5_454	(AC)10	F5' GGTGTTCTCCCTGATCTTATGG R5' GGGCACTCTGTAGGCTACTCC	59.83 60.28	188
Ee5_454 2	(TC)18	F5' GGCATCTCAGCAGCATAAC R5' CCCTGACCACATCAACAGG	59.43 59.94	295
Ee5_460	(TCA)5	F5' TTCGCCAAATGCATTATCTTC R5' AGGAGATGATCAGCCGTCAG	60.05 60.37	294
Ee5_460 2	(TCA)5	F5' CGCCAAATGCATTATCTTCA R5' AAGTAGGATTCGGCCTCAGA	59.66 58.89	136
Ee5_464	(GA)27	F5' GAAGGAGTGAGAGCGTTTGC R5' TGGCCGGGTTTAATAATAGC	60.14 58.96	283
Ee5_464 2	(CA)14	F5' ATTATTAACCCGGCCACAC R5' GTAGCCGGTA <sub>g</sub> AGGATGAGG	58.7 58.77	245
Ee5_477	(TG)12	F5' GCAACACTGTGGGTCGTAAC R5' CAAGGTGAAGGAAGCTGGAG	59.06 59.98	220
Ee5_477 2	(TCC)5	F5' GGATCCTGTTACGCCAAATG R5' GCCGAGTGAAGGTGAAGTAG	60.33 61.18	175
Ee5_477 3	(CA)6	F5' TTCCGCTCCCTTGAACATC R5' CAATCTCCTCCTGCTCACC	59.27 59.8	231
Ee5_484	(GT)7	F5' CATGCCAACACAGCGATAAC R5' GAGGCTGGACAGCTGGATAC	60.14 59.83	146
Ee5_484 2	(TCC)5	F5' TTCCCTGTATCCAGCTGTCC R5' GGTGTCCAGAcGACTTGCTC	60.07 60.87	292
Ee5_497	(AGG)7	F5' AAACCACGTCTCCAGACC R5' CTCCTTGCAGCCATTG	59.95 60.34	205

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι Ι

Παρασκευή διαλύματος TE:

<b>TE (Tris/EDTA)</b>	
Tris-HCl 2M, pH 7.4	0.5ml
EDTA 0.5M, pH 8.0	0.2ml
dH <sub>2</sub> O	99.3ml

Παρασκευή διαλύματος SSC:

<b>SSC 20X</b>	
NaCl	17.53gr
Sodium Citrate	8.82gr
dH <sub>2</sub> O	80ml

Παρασκευή διαλύματος LB Agar:

<b>LB Agar</b>	
Bactotryptone	10gr
Yeast Extract	5gr
NaCl	5gr
Agar	15gr
dH <sub>2</sub> O	1liter

Παρασκευή διαλύματος LB Liquid:

<b>LB Liquid</b>	
Bactotryptone	10gr
Yeast Extract	5gr
NaCl	5gr
dH <sub>2</sub> O	1liter

Παρασκευή διαλύματος SOC medium:

<b>SOC medium</b>	
Bactotryptone	20gr
Yeast Extract	5gr
NaCl	0.5gr
dH <sub>2</sub> O	1liter
MgCl <sub>2</sub> 1M	10ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	10ml
Glucose 2M	1ml

Παρασκευή διαλύματος GTE:

<b>GTE buffer</b>	
Glucose 1M	30ml
Tris-Cl 1M	15ml
EDTA 0.5M	12ml
dH <sub>2</sub> O	543ml

Παρασκευή διαλύματος P1:

<b>GTE/RN<sub>ASE</sub> (P1)</b>	
GTE buffer	600ml
RNase A (100mg/ml)	900ml

Παρασκευή διαλύματος P2:

<b>P2 solution</b>	
1% SDS	50ml
NaOH 0.2N	10ml
dH <sub>2</sub> O	460ml

Παρασκευή διαλύματος P3:

<b>K<sub>A</sub>A<sub>C</sub> (P3) 3M pH 5.5</b>	
K <sub>A</sub> C 5M	300ml
Glacial acetic acid	57.5ml
dH <sub>2</sub> O	142.5ml

Παρασκευή διαλύματος Hognes:

<b>Hognes 10X</b>	
Glycerol	20ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.8ml
Tri-sodium citrate	1ml
MgSO <sub>4</sub>	0.5ml