

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

Διεύθυνση: Ν. Μιλτιάδη 1, 63200 Νέα Μουδανιά  
Τηλ.: 2373065313, Fax: 2373026450, E-mail:  
imsiri@otenet.gr

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΜΣΙΡΙΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ  
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΓΟΝΟΥ  
ΚΕΦΑΛΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ**

ΙΜΣΙΡΙΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ, ΜΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ,  
ΚΑΤΣΑΡΕΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ, ΤΣΙΩΡΑ ΑΝΝΑ

Θεσσαλονίκη, 2007



**ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣΠΟΥ  
ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΗΝ  
ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΡΕΥΝΩΝ**

**Τίτλος Ερευνητικού προγράμματος:**

Γενετική ταυτοποίηση διαφορετικών ειδών γόνου κεφαλοειδών με τη χρήση πυρηνικών δεικτών

**Συνεργαζόμενα Τμήματα:** Τμήμα

Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών

**Επιστημονικός Υπεύθυνος:** Ιμσιρίδου

Αναστασία

**Επιστημονικοί συνεργάτες:**

Όνομα: Μίνος Γεώργιος, Θέση: Επίκουρος Καθηγητής, Ειδικότητα: Ιχθυολογία

Όνομα: Κατσαρές Βασίλειος, Θέση: Εργαστηριακός Συνεργάτης ΤΑΥ, Ειδικότητα: Γενετική

Όνομα: Τσιώρα Άννα, Θέση: Επιστημονικός Συνεργάτης ΤΑΥ, Ειδικότητα: Ζωολογία

**Διάρκεια Ερευνητικού Προγράμματος:**

14/3/2006 -14/3/2007

**Ποσό χρηματοδότησης Επιτροπής**

**Ερευνών:** 6.000 Ευρώ

**Δημοσιεύσεις/παρουσιάσεις εργασιών**

1. Identification of fry of different grey mullet species with the use of nuclear 5S rDNA markers. Imsiridou A., Minos G., Tsiora A., Katsares V. and Douka S. 10<sup>th</sup> International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions. Patras – Greece, 26-30 June 2006.
2. Identification of different fry Mugilidae species using 5S rDNA Markers (2006). *Journal of Applied Ichthyology* – submitted. A. Imsiridou, G. Minos, V. Katsares, N. Karaiskou and A. Tsiora

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Εισαγωγή.....	9
Θεωρητικό πλαίσιο.....	11
Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.....	12
Μεθοδολογία της έρευνας.....	13
Αποτελέσματα.....	14
Συμπεράσματα.....	19
Προτάσεις.....	21
Βιβλιογραφία.....	21



**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ  
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΓΟΝΟΥ  
ΚΕΦΑΛΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ  
ΙΜΣΙΡΙΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ  
ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η εκτροφή των κεφαλοειδών γίνεται σε μεγάλη κλίμακα και στηρίζεται σε άγριο γόνο. Η αναγνώριση των ειδών του γόνου που αλιεύεται είναι πολύ δύσκολη αλλά και σημαντική για τους καλλιεργητές, εφόσον ο ρυθμός αύξησης διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ειδών. Ο σκοπός της παρούσας δουλειάς είναι η χρήση μιας απλής γενετικής μεθοδολογίας, της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), για την επιβεβαίωση της συστηματικής ταξινόμησης των διαφορετικών ειδών γόνου κεφαλοειδών και την παραπέρα διάκρισή τους. Έγινε συλλογή γόνου από έξι είδη κεφαλοειδών (*M. cephalus*, *M. so-iuy*, *C. labrosus*, *L. aurata*, *L. Ramada*, *L. saliens*). Ακολούθησε συστηματική ταξινόμηση των ατόμων, εξαγωγή DNA, ενίσχυση του γονιδίου 5S rDNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, έλεγχος των προϊόντων ενίσχυσης σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης, κλωνοποίηση των προϊόντων PCR και ανάλυση

πρωτοδιάταξης. Τα δύο είδη *M. so-iuy* και *L. saliens* μπορούν να διακριθούν με μία απλή αντίδραση PCR, εφόσον παρουσιάζουν ένα μοναδικό πρότυπο στη πηκτή αгарόζης. Τα υπόλοιπα τέσσερα είδη *M. cephalus*, *L. ramada*, *L. aurata* και *C. labrosus* παρουσιάζουν – μετά τη τεχνική της ανάλυσης πρωτοδιάταξης - μοναδικούς ειδο-ειδικούς απλότυπους, με νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις σε διαφορετικές θέσεις. Η παραπάνω μεθοδολογία μπορεί να οδηγήσει σε ακριβή διάκριση διαφορετικών ειδών γόνου.



**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ  
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΓΟΝΟΥ  
ΚΕΦΑΛΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ**

ΙΜΣΙΡΙΔΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ, ΜΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ,  
ΚΑΤΣΑΡΕΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ, ΤΣΙΩΡΑ ΑΝΝΑ

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η οικογένεια των κεφαλοειδών περιλαμβάνει 17 γένη και περισσότερα από 60 είδη (Nelson 1994). Τα κεφαλοειδή έχουν παγκόσμια εξάπλωση καθώς μπορούν να επιβιώσουν από την τροπική έως και την εύκρατη ζώνη. Τα 7 είδη των κεφαλοειδών που απαντώνται στην Ελλάδα είναι: *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758), *Mugil so-iuy* (Basilewsky 1855), *Chelon labrosus* (Risso 1826), *Oedalechilus labeo* (Cuvier 1829), *Liza aurata* (Risso 1810), *Liza ramada* (Risso 1826) και *Liza saliens* (Risso 1810).

Σήμερα η εκτροφή των κεφαλοειδών γίνεται σε μεγάλη κλίμακα, κυρίως σε εκτατικής μορφής καλλιέργειες, που στην Ελλάδα αντιπροσωπεύουν το 50% της αλιευτικής παραγωγής των λιμνοθαλασσών. Τα τελευταία χρόνια αρχίζει και στην Ελλάδα να υπάρχει ενδιαφέρον για την εντατική εκτροφή των

κεφαλοειδών και τον εμπλουτισμό λιμνών και λιμνοθαλασσών. Η καλλιέργεια των κεφαλοειδών στηρίζεται σε άγριο γόνου. Η αναγνώριση των ειδών του γόνου που αλιεύεται είναι προβληματική, καθώς στηρίζεται κυρίως στη διάταξη των μελανοφόρων κυττάρων στην κοιλιακή περιοχή της κεφαλής (Perlmutter et al., 1957; Zismann, 1981; Reay & Cornel 1988; Minos et al. 2002) σε συνδυασμό με τη διάταξη των χρωματοφόρων κατά μήκος του σώματος (Perlmutter et al., 1957; Zismann, 1981; Cambrony 1984; Serventi et al. 1996). Οποιαδήποτε εποχή και αν αλιευθεί ο γόνος αυτός, μπορούν να συλλεχθούν δύο έως τέσσερα διαφορετικά είδη τα οποία όμως έχουν διαφορετικές ανοχές σε αλατότητα και ο ρυθμός αύξησης διαφέρει σημαντικά μεταξύ τους. Συνεπώς η ταυτότητα του είδους είναι πολύ σημαντική πληροφορία για τους καλλιεργητές.

Ο σκοπός της παρούσας δουλειάς είναι η χρήση μιας απλής γενετικής μεθοδολογίας, της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), για την επιβεβαίωση της συστηματικής ταξινόμησης των διαφορετικών ειδών γόνου κεφαλοειδών και την παραπέρα διάκρισή τους.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ**

Στους ανώτερους ευκαρυώτες, το γονίδιο 5S rDNA αποτελείται από μία συντηρημένη κωδικοποιούσα περιοχή 120 ζευγών βάσεων και από μία μη μεταγραφόμενη περιοχή μεταβλητού μεγέθους (NTS). Η μονάδα αυτή (120 βάσεις+NTS), επαναλαμβάνεται χιλιάδες φορές επάνω στο χρωμόσωμα. Το μέγεθος της NTS διαφέρει από είδος σε είδος και είναι συνήθως χαρακτηριστική για κάθε είδος (Pendas et al. 1994; Martins & Galetti 2001; Martins et al. 2002). Σε κάποια είδη εντοπίζονται περισσότερες από μία μονάδες του γονιδίου 5S rDNA, οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Συνεπώς το γονίδιο 5S rDNA έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για διάκριση και γενετική ταυτοποίηση πολλών οργανισμών, μεταξύ των οποίων και πολλά είδη ψαριών (Karaiskou et al., 2003; Aranishi 2005a, b). Με την εκπόνηση του προτεινόμενου ερευνητικού έργου έγινε εφικτή η γρήγορη γενετική ταυτοποίηση διαφορετικών ειδών γόνου κεφαλοειδών, με την PCR ενίσχυση του γονιδίου 5S rDNA.

## **ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ**

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές γενετικές μεθοδολογίες για διάκριση διαφορετικών ειδών ψαριών. Οι τεχνικές αυτές αφορούν την ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών (Andrews 1998; Mackie et al. 1999), τον πολυμορφισμό μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA ή την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing) ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA (Cespedes et al. 2000; Karaiskou et al. 2003).

Έτσι, προηγούμενη γενετική διάκριση των διαφορετικών ειδών κεφαλοειδών έχει επιτευχθεί με ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA και χρήση ειδο-ειδικών εκκινητών, για την ενίσχυση της περιοχής D-loop του μιτοχονδριακού γενώματος (Murgia et al. 2001). Λίγο αργότερα έγινε χρήση της τεχνικής του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) του γονιδίου 16S rRNA του μιτοχονδριακού DNA (Klossa-Kilia et al. 2002), για τη διάκριση του είδους *M. cephalus* από άλλα τέσσερα είδη κεφαλοειδών. Και οι δύο μελέτες αποσκοπούν στην αναγνώριση της προέλευσης των αυγών (αυγοτάραχο) από διαφορετικά είδη κεφαλοειδών, με σκοπό τον έλεγχο της

ποιότητας μεταποιημένων προϊόντων. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που χρησιμοποιεί ανάλυση του πυρηνικού γονιδίου 5S rDNA, για διάκριση διαφορετικών ειδών γόνου κεφαλοειδών.

## **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ**

1. Έγινε συλλογή γόνου από πέντε είδη κεφαλοειδών (*M. cephalus*, *C. labrosus*, *L. aurata*, *L. ramada* and *L. saliens*), στο λιμάνι των Ν. Μουδανιών Χαλκιδικής. Για το νεοεισαγόμενο είδος *M. so-iuy*, ενήλικα άτομα συλλέχθηκαν από το Βόρειο Αιγαίο. Η περίοδος δειγματοληψίας ήταν Μάρτιος 2006 – Οκτώβριος 2006.
2. Ακολούθησε συστηματική ταξινόμηση των ατόμων, με τη χρήση εξειδικευμένων για την περιοχή της Μεσογείου κλειδών προσδιορισμού.
3. Έγινε εξαγωγή DNA σύμφωνα με τη μεθοδολογία CTAB (Hillis et al. 1996).
4. Ακολούθησε ενίσχυση του γονιδίου 5S rDNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που

- σχεδιάστηκαν από τους Pendas et al. (1994).
5. Έγινε έλεγχος των προϊόντων ενίσχυσης σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1,5%.
  6. Ακολούθησε εξαγωγή των προϊόντων PCR από την πηκτή αγαρόζης και καθαρισμός αυτών (εκτός από το είδος *M. so-iuy*, εφόσον το είδος αυτό έδωσε ένα μοναδικό πρότυπο στην πηκτή αγαρόζης).
  7. Τα προϊόντα PCR κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο TOPO TA (Invitrogen) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό κυττάρων *Escherichia coli* (strain DH5a, GibcoBRL).
  8. 18 κλώνοι αναλύθηκαν με την τεχνική της ανάλυσης πρωτοδιάταξης και τη χρήση του εκκινητή M13(-20).
  9. Οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες από τα πέντε είδη μελετήθηκαν με τη χρήση των πακέτων Clustal X software (Thompson et al. 1997) και BioEdit software (Hall 1999).

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Αναλύθηκαν συνολικά 180 άτομα – 30 άτομα από κάθε είδος – με την αλυσιδωτή αντίδραση

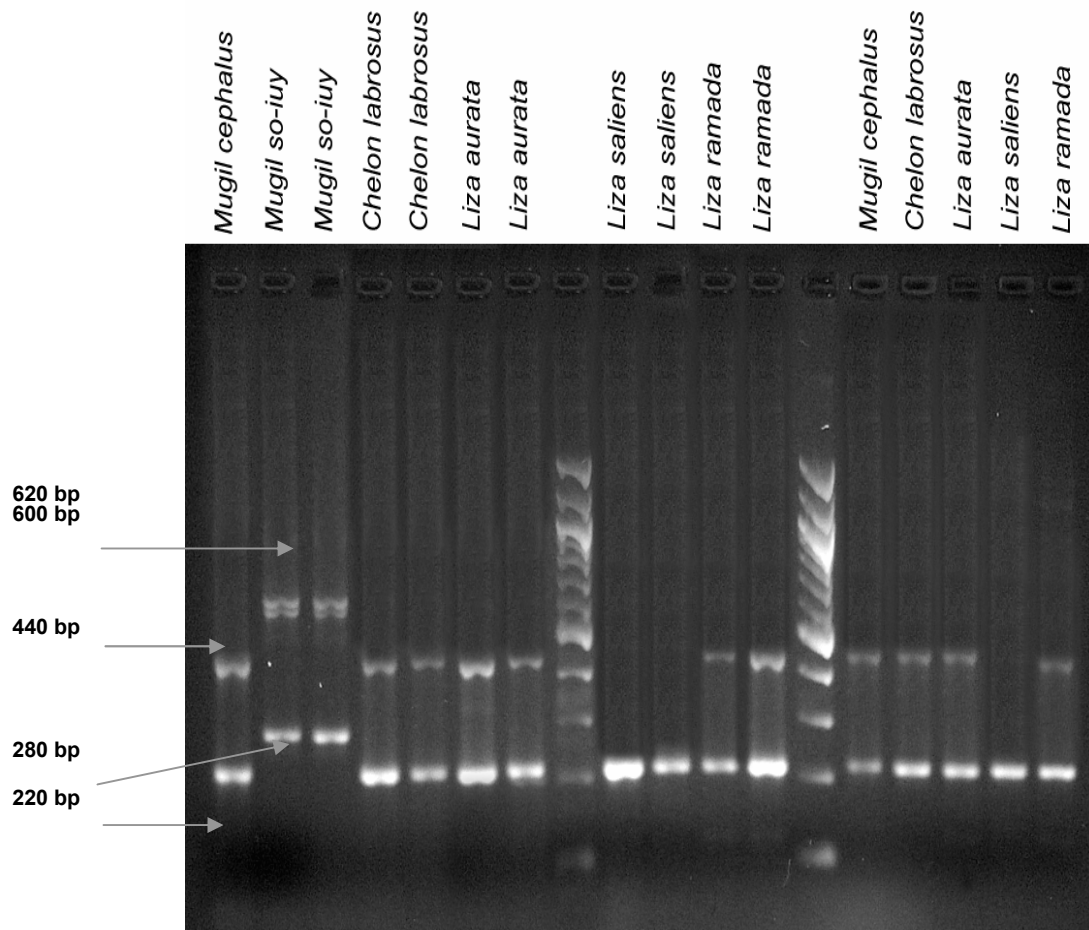
πολυμεράσης. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1, μόνο δύο από τα έξι είδη παρουσιάζουν ειδοειδικά πρότυπα. Το είδος *M. so-iuy* δίνει ένα πρότυπο τριών ζωνών: μία ζώνη 280 bp και μία διπλή ζώνη 600 bp και 620 bp. Το είδος *L. saliens* δίνει ένα πρότυπο μίας ζώνης το μέγεθος της οποίας είναι 220 bp. Τα υπόλοιπα τέσσερα είδη *M. cephalus*, *C. labrosus*, *L. aurata* και *L. ramada* παρουσιάζουν ένα κοινό πρότυπο δύο ζωνών, 220 bp και 440 bp. Δεν παρατηρήθηκε ενδοειδικός πολυμορφισμός, εφόσον όλα τα άτομα του ίδιου είδους εμφάνισαν το ίδιο πρότυπο μετά την αντίδραση PCR.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρωτοδιάταξης μετά την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR έδειξαν ότι το τμήμα των 220 bp (στα είδη *M. cephalus*, *C. labrosus*, *L. aurata* και *L. ramada*) αντιστοιχεί σε μία μονάδα του γονιδίου 5S rDNA, ενώ το τμήμα των 440 bp αποτελείται από δύο διαδοχικά επαναλαμβανόμενες μονάδες του γονιδίου (Εικόνα 2). Επίσης η ζώνη των 220 bp στο είδος *L. saliens*, αντιστοιχεί σε μία μονάδα του γονιδίου 5S rDNA. Παρόμοια δομή των 5S rDNA επαναλήψεων έχει αποκαλυφθεί και για άλλα είδη ψαριών όπως *Solea solea* (Cespedes et al.

1999), *Brycon cephalus* (Wasko et al. 2001) και *Brycon sp.* (Wasko et al. 2001).

Έγινε σύγκριση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών (για τη ζώνη των 220 bp) στα πέντε είδη κεφαλοειδών *M. cephalus*, *C. labrosus*, *L. aurata*, *L. saliens* και *L. ramada*. Βρέθηκαν συνολικά 43 πολυμορφικές θέσεις, από τις οποίες οι τρεις εντοπίστηκαν στην κωδικοποιούσα περιοχή και οι υπόλοιπες 40 εντοπίστηκαν στην NTS. Οι ακολουθίες κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank με κωδικούς πρόσβασης DQ780572-6.





**Εικ. 1.** Ηλεκτροφορητικό πρότυπο του ενισχυμένου 5S rDNA γονιδίου για τα έξι είδη κεφαλοειδών (δύο άτομα από κάθε είδος). Το μέγεθος των ενισχυμένων προϊόντων ελέγχθηκε με το μοριακό μάρτυρα 100 bp DNA ladder.

## ***L. ramada***

TACGCCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCG  
CCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTGATTTCCGTCAGTAGTAATAGGAACATTCCGCATCATAATGA  
TGGACACAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAAGCTTACGGCCATA  
CCAGCCTGAACACGCCCGATCTCGTCTGATCTCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGG  
TGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTGATTTTCATCACGAGTAATAGGAACATTCAC  
ATCATAGTGATGGACACAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAAGCT  
TACGGCCATACCAGCCTGAA

## ***M. cephalus***

TACGCCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCTAAGCACGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATCGGAGACCG  
CCTGGGAATACTAGGTGCTGTAAGCCTTTTCATTTTCATCAGGAGACATGGTAATATTTACATCATCAAAA  
TACATGCAATGATGATTTTGAGCACTTATATATACTGCGTTTGTGACAGTTACCATTGCTTACGGCCATA  
CCAGCCTGATTACGCCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCTAAGCAGTGTAGGGCCTGGTTAGTATTTGGA  
TGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAACCTTTTCATTCTCATCAGGAAACATGGTAACATTTAC  
ATCATCAAAATACATGCAATGATCATTTTGACCACTTATATATACTGCTTTAGTGACATTTGACATTGCT  
TACGGCCATACCAGCCTGAA

**Εικ. 2.** Οι δύο διαδοχικά επαναλαμβανόμενες μονάδες του γονιδίου 5S rDNA για τα είδη *L. ramada* and *M. Cephalus*. Η κωδικοποιούσα περιοχή δίνεται με έντονα γράμματα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση είναι υπογραμμισμένοι.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι φυλογενετικές σχέσεις στην οικογένεια των κεφαλοειδών έχουν μελετηθεί με τη βοήθεια μοριακών δεικτών, όπως δεδομένα αλληλοenzυμικής ανάλυσης (Parasotirooulos et al. 2001), δεδομένα πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων του mtDNA (Parasotirooulos et al. 2002), δεδομένα ανάλυσης πρωτοδιάταξης του mtDNA (Caldara et al. 1996; Rossi et al. 2004). Όλες οι παραπάνω μελέτες συνηγορούν σε δύο βασικά σημεία: α) τη γενετική διαφοροποίηση του είδους *M. cephalus*, η οποία οδηγεί πάντα σε ξεχωριστή ομαδοποίησή του β) την κοινή ομαδοποίηση των ειδών *L. ramada* και *L. aurata*. Τα αποτελέσματα της παρούσας δουλειάς συμφωνούν απόλυτα με αυτά των προηγούμενων μελετών εφόσον το είδος *M. cephalus* παρουσιάζει 37 πολυμορφικές θέσεις από τις 43 που συνολικά βρέθηκαν, ενώ τα είδη *L. ramada* και *L. aurata* μοιράζονται μόνο μία νουκλεοτιδική αντικατάσταση σε όλο το γονίδιο.

Τα δύο είδη *M. so-iuy* και *L. saliens* μπορούν να διακριθούν με μία απλή αντίδραση PCR, εφόσον παρουσιάζουν ένα μοναδικό πρότυπο στη πηκτή αγαρόζης. Το είδος *M.*

*cephalus* φαίνεται να διαφοροποιείται περισσότερο συγκρινόμενο με τα υπόλοιπα, και παρουσιάζει ένα μοναδικό DNA απλότυπο μετά από την τεχνική της ανάλυσης πρωτοδιάταξης. Το είδος αυτό είναι το πιο σημαντικό για τους καλλιεργητές καθώς έχει τον υψηλότερο ρυθμό αύξησης σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, και το αυγοτάραχο το οποίο παράγεται από τα ώριμα θηλυκά έχει υψηλή τιμή στην αγορά. Κάθε ένα από τα υπόλοιπα τρία είδη *L. ramada*, *L. aurata* και *C. labrosus* παρουσιάζει επίσης ένα μοναδικό είδο-ειδικό απλότυπο, με νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις σε διαφορετικές θέσεις.

Συμπερασματικά λοιπόν, μία απλή αντίδραση PCR η οποία συνοδεύεται από την τεχνική της ανάλυσης πρωτοδιάταξης του 5S rDNA γονιδίου, μπορεί να οδηγήσει σε ακριβή διάκριση των διαφορετικών ειδών γόνου κεφαλοειδών που θα γεμίσουν τα εκκολαπτήρια. Επιπλέον, η μεθοδολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την επιβεβαίωση της μορφολογικής διάκρισης και παραπέρα συστηματικής ταξινόμησης των ειδών αυτών.

## **ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ**

Η παρούσα προτεινόμενη εργασία παρέχει μια γρήγορη και κυρίως αδιαμφισβήτητη μεθοδολογία (εφόσον το γενετικό υλικό των οργανισμών δεν επηρεάζεται από εξωτερικούς παράγοντες), για την ταυτοποίηση των διαφορετικών ειδών γόνου. Οι συγκεκριμένες γενετικές τεχνικές – οι οποίες θα έπονται της αρχικής αναγνώρισης και συστηματικής ταξινόμησης των ειδών – έρχονται να επιβεβαιώσουν ή τυχόν να αναιρέσουν την αρχική κατάταξη.

Κάθε ένα από τα έξι είδη κεφαλοειδών χαρακτηρίζεται από διαφορετικό πρότυπο του γονιδίου 5S rDNA. Έτσι εάν ένας ιχθυοκαλλιεργητής έχει τυχόν αμφιβολίες για το είδος του γόνου με το οποίο γεμίζει τις δεξαμενές του, μπορεί να επισκεφτεί το Τμήμα μας και σε χρονικό διάστημα δύο έως τριών ημερών θα είναι σίγουρος για το είδος του γόνου με το οποίο κάνει τη δουλειά του.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Andrews A.T., 1998. Electrophoretic methods.  
In: Analytical Methods of Food

- Authentication. Eds: P. R. Ashurt; M. J. Dennis, London, UK. pp. 204-239.
- Aranishi F., 2005a. Rapid PCR-RFLP method for discrimination of imported and domestic mackerel. *Marine Biotechnology*, 7: 571-575.
- Aranishi F., 2005b. PCR-RFLP analysis of nuclear nontranscribed spacer for mackerel species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 508-511.
- Caldara F., Bargelloni L., Ostellari L., Penzo E., Colombo L. & T. Patarnello, 1996. Molecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: Evidence of a different rate of evolution at the intrafamily level. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6 (3): 416-424.
- Cambrony M., 1984. Identification et périodicité du recrutement des juvéniles de mugilidae dans les étangs littoraux du Languedoc-Rosillon. *Vie Milieu*, 34 (4): 221-227.
- Cespedes A., Garcia T., Carrera E., Gonzalez I., Fernandez A., Hernandez P.E., & R. Martin, 1999. Identification of sole (*Solea solea*) and greenland halibut (*Reinhardtius*

- hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1046 – 1050.
- Cespedes A. Garcia T., Carrera E., Gonzalez L., Fernandez A., Asensio L., Hernandez P.E. & R. Martin, 2000. Genetic differentiation between sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR – RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 29-32.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hillis D.M., Moritz C. & B.K. Mable, 1996. *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates
- Karaiskou N., Triantafyllidis A. & C. Triantaphyllidis, 2003. Discrimination of three *Trachurus* species using both mitochondrial and nuclear based DNA approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4935-4940.

- Klossa – Killia E., Papasotiropoulos V., Killias G. & S. Alahiotis, 2002. Authentication of Messolongi (Greece) fish roe using PCR-RFLP analysis of 16S rRNA mtDNA segment. *Food Control*, 13: 169-172.
- Mackie I.M., Pryde S.E., Gonzales-Sotelo C., Medina I., Pérez-Martin R., Quinteiro J., Rey-Mendez M. & H. Rehbein, 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Food Science and Technology*, 10: 9-14.
- Martins C. & P.M. Galetti, 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish Leporinus: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome*, 44: 903-910.
- Martins C., Wasko A.P., Oliveira C., Porto-Foresti F., Parise-Maltempo P.P., Wright J.M. & F. Foresti, 2002. Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenetic and Genome Research*, 98: 78-85.
- Minos G., Katselis G., Ondrias I. & I.J. Harrison, 2002. Use of melanophore patterns on the



- ventral side of the head to identify fry of grey mullets (Teleostei : Mugilidae). *Israeli Journal of Aquaculture:Bamidgeh*, 54 (1): 12-26.
- Murgia R., Tola G., Archer S.N., Vallegra S. & J. Hirano, 2001. Genetic identification of grey mullet species (mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (Bottarga). *Marine Biotechnology*, 21: 119-126.
- Nelson J.S., 1994. *Fishes of the World*. Wiley, New York.
- Papasotiropoulos V., Klossa-Killia E., Killias G. & S. Alahiotis, 2001. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) using allozyme data. *Biochemical Genetics*, 39 (5/6): 155-168.
- Papasotiropoulos V., Klossa-Killia E., Killias G. & S. Alahiotis, 2002. Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. *Biochemical Genetics*, 40 (3/4): 71-86.
- Pendas A.M., Moran P., Freije J.L. & E. Garcia-Vazquez, 1994: Chromosomal mapping and

- nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rRNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 67: 31-36.
- Perlmutter A., Bograd L. & J. Pruginin, 1957. Use of the estuarine and sea fish of the family Mugilidae (grey mullets) for pond culture in Israel. *Gen. Fish. Coun. Med. Proc. Tech. Pap.* 4: 289-304.
- Reay P.J. & V. Cornell, 1988. Identification of grey mullet (Teleostei: Mugilidae) juveniles from British waters. *Journal of Fish Biology*, 32: 95-99.
- Rossi A.R., Ungaro A., De Innocentiis S., Crosetti D. & L. Sola, 2004. Phylogenetic analysis of Mediterranean mugilids by allozymes and 16S mtrRNA genes species of investigation: are the Mediterranean *Liza* monophyletic? *Biochemical Genetics*, 42 (9-10): 301-315.
- Serventi M., Harrison I.J., Torricelli P. & G. Gandolfi, 1996. The use of pigmentation and morphological characters to identify Italian mullet fry. *Journal of Fish Biology*, 49: 1163-1173.
- Thompson, J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & D.G. Higgins, 1997. The

CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.

Wasko A.P., Martins C., Wright J.M. & P.M. Galetti, 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome*, 44: 893-902.

Zismann L., 1981. Means of identification of grey mullet fry for culture In: *Aquaculture of grey mullets*. Ed: O. H. Oren. Cambridge, UK. pp. 17-63.