

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ & ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

ΚΑΖΑΝΤΖΗ ΘΕΟΔΟΥΛΗ

**ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΡΙΩΝ ΕΙΔΩΝ ΓΟΝΟΥ ΚΕΦΑΛΟΕΙΔΩΝ
ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ 5S rDNA ΔΕΙΚΤΗ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

N. ΜΟΥΔΑΝΙΑ 2008

Στην οικογένεια μου, με την ευρύτερη έννοια.....

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- 1. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΙΜΣΙΡΙΔΟΥ – ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**
- 2. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΙΝΟΣ – ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**
- 3. ΕΛΙΣΑΒΕΤ ΒΑΡΔΑΚΑ – ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΡΙΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ MUGILIDAE	1
1.2 ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ MUGILIDAE	7
1.3 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA	9
1.4 ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΑΝ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ 5S rDNA	11
1.5 ΛΟΓΟΙ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΑΜΕ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΕΦΑΛΟΕΙΔΩΝ	12

2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 14

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΤΟΜΩΝ	15
3.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	16
3.3.ΛΗΨΗ ΙΣΤΟΥ	16
3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ DNA	17
3.5 ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ DNA	17
3.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	19
3.7 ΕΛΕΓΧΟΣ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	20
3.7.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΡΑΓΟΖΗΣ	20
3.7.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	20
3.7.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΡΑΓΟΖΗΣ	21
3.8 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ PCR	21
3.9 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	22
3.9.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΡΑΓΟΖΗΣ	22
3.9.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	22
3.9.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	23

3.10 ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	23
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
4.1 ΕΞΑΓΩΓΗ DNA	24
4.2 ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ <i>MUGIL CEPHALUS</i>	25
4.3 ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ <i>LIZA RAMADA</i>	26
4.4 ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ <i>LIZA HAEMATOCHEILUS</i>	27
4.5 ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΕΙΔΩΝ <i>MUGIL CEPHALUS</i> , <i>LIZA RAMADA</i> , <i>LIZA HAEMATOCHEILUS</i>	28
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	29
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	34
7. SUMMARY	35
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η σύνθεση, η εκτέλεση και η συγγραφή της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν έπειτα από συζήτηση και με τις υποδείξεις της καθηγήτριας κ. Ιμισιρίδου Αναστασίας, την οποία θέλω να ευχαριστήσω για την άψογη συνεργασία, την πολύτιμη βοήθεια και την υπομονή μέχρι το πέρας της εργασίας.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Τσιώρα Άννα για την βοήθεια που μου προσέφερε κατά το εργαστηριακό μέρος, τον καθηγητή κ. Μίνο Γεώργιο για την προμήθεια δειγμάτων και πληροφοριών όπως επίσης τον καθηγητή κ. Φάνη Καρύδαγια την συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος, το εργαστηριακό μέρος πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά χαρακτηριστικά των τριών ειδών της οικογένειας *Mugilidae*

Η οικογένεια *Mugilidae* αποτελείται από 17 γένη και 60 είδη (Nelson, 1994). Ορισμένα γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας είναι το μεγάλο εύρος ανοχής της αλατότητας και της θερμοκρασίας. Ζουν σε μικρές ομάδες κοντά στον πυθμένα και τρέφονται με ασπόνδυλους οργανισμούς, οργανικές ουσίες που βρίσκονται στη λάσπη καθώς και φύκη που φύονται σε βράχους, τοιχώματα λιμανιών και σε αγωγούς. Είναι διάδρομα ψάρια τα οποία περνούν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους σε εκβολές ποταμών, λίμνες και λιμνοθάλασσες, ενώ κατά την αναπαραγωγική περίοδο εναποθέτουν τα γενετικά τους προϊόντα στη θάλασσα (Μίνος, 2004).

Στη Μεσόγειο, τα 7 είδη που συναντάμε είναι τα εξής (Tortonese, 1975):

- *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758)
- *Liza ramada* (Risso, 1826)
- *Liza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845)
- *Liza aurata* (Risso, 1910)
- *Liza saliens* (Risso, 1810)
- *Clelon labrosus* (Risso, 1826)
- *Liza carinata* (Ehrenberg, 1836)

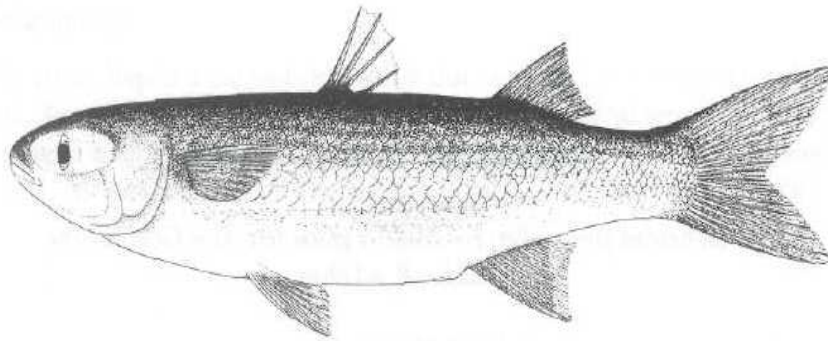
Από αυτά, τα τρία πρώτα πραγματεύεται η παρούσα εργασία ενώ μέρος των υπολοίπων έχουν ήδη μελετηθεί με την ίδια φιλοσοφία (Δούκα, 2007).

***Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758)**

Στα ενήλικα άτομα το πρώτο ραχιαίο πτερύγιο αποτελείται από τέσσερις σκληρές ακτίνες (D1:IV) ενώ το δεύτερο ραχιαίο πτερύγιο αποτελείται από οκτώ έως

δέκα μαλακές ακτίνες (D2:8–10). Το εδρικό πτερύγιο έχει τρεις σκληρές και οκτώ μαλακές ακτίνες (A: III/8) και τα θωρακικά πτερύγια έχουν δεκαπέντε έως δεκαεπτά μαλακές ακτίνες (P:15–17) (Harrison, 2003). Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του είδους είναι το λιπώδες βλέφαρο και τα δύο πυλωρικά τυφλά (Harrison, 2003).

Ο βασικός χρωματισμός του είδους είναι γκρι, με αποχρώσεις του καφέ ή του λαδί στη ραχιαία περιοχή. Πλευρικά έχει χρώμα ασημί με 7-10 γκριζες λωρίδες κατά μήκος, ενώ στην κοιλιακή περιοχή επικρατεί το λευκό χρώμα. Τα ραχιαία πτερύγια και το ουραίο πτερύγιο είναι μαυριδερά σε αντίθεση με τα θωρακικά και το εδρικό που είναι ωχρά ή γκριζα, καθώς επίσης υπάρχει μία μαύρη κηλίδα σε κάθε θωρακικό (Ben-Tuvia, 1986; Harrison, 2003). Ο χρωματισμός του δέρματος επηρεάζεται από το βίοτοπο. Σε πληθυσμούς που διαβιώνουν σε εκβολικά συστήματα, παρατηρούνται στη ράχη θαμπές αποχρώσεις του μπλε ή του καφέ και ποιο σκούρα πτερύγια.



Εικόνα 1. *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758)

Η κατανομή του συγκεκριμένου είδους παρατηρείται σε τροπικά, υποτροπικά και θερμά νερά, με γεωγραφικές συντεταγμένες από 42° S έως 51° N. Στην Ευρώπη το συναντάμε από τις περιοχές της νότιας Ισπανίας έως και τη βόρεια Πορτογαλία

από τη μεριά του Ατλαντικού, σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου καθώς επίσης στη Μαύρη Θάλασσα και στην Αζοφική θάλασσα (Trewavas, 1973; De Silva, 1980; Thomason, 1981; Ben-Tuvia, 1986; Reay, 1992; Harrison, 2003). Η ανάδρομη πορεία του είδους σε ποταμούς της Ευρώπης τις περιόδους της άνοιξης και του καλοκαιριού (Gandolfi et al., 1991; Harrison, 2003) έχουν ως αποτέλεσμα αναφορές του στους ποταμούς Rhône (Guillard & Colon, 1998; Harrison, 2003), Gronde και Adour της δυτικής Γαλλίας (Keit & Allardi, 2001; Harrison, 2003), στη Βουλγαρία (Grupcheva, 1993; Harrison, 2003), σε γλυκά νερά της κεντρικής Ιταλίας (Gandolfi et al., 1991; Harrison, 2003), στην Κασπία θάλασσα (Ben-Tuvia, 1986; Harrison, 2003), στη λίμνη Qarum της Αιγύπτου (Abdel'-Malek, 1981; Harrison, 2003), καθώς και σε άλλες περιοχές της Ευρώπης με γλυκό νερό.

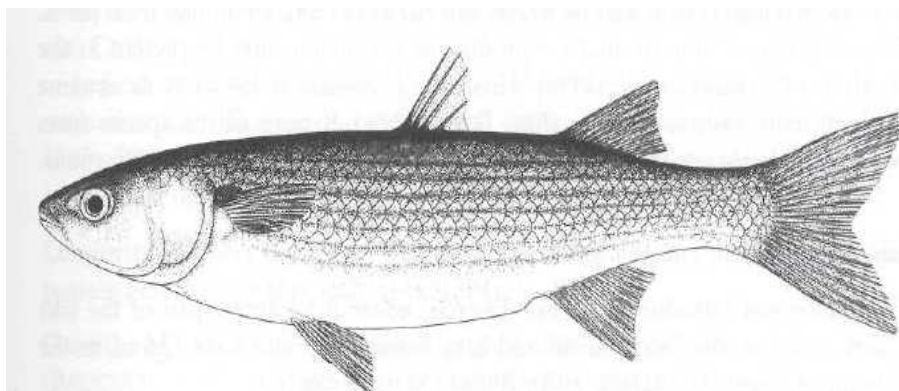
Τα ενδιαίτηματα στα οποία παρατηρείται το συγκεκριμένο είδος είναι παράκτιες περιοχές (σπάνια ξεπερνούν τα 200m βάθος), εκβολές ποταμών, λιμνοθάλασσες και λίμνες. Το περιβάλλον και ο χρόνος διαβίωσης εξαρτάται από την ηλικία του ατόμου. Ενήλικα άτομα παραμένουν σε λιμνοθάλασσες και σε εκβολές ποταμών μέχρι τη σεξουαλική τους ωρίμανση, ενώ στη συνέχεια η εναπόθεση των γενετικών τους προϊόντων γίνεται στη θάλασσα. Στη Μεσόγειο συμβαίνει από τον Αύγουστο έως τον Οκτώβριο (Bauchot, 1987; Ardizzone et al., 1988; Demirkalp, 1992; Ergene, 1999; Harrison, 2003).

Τα χαρακτηριστικά του τόπου διαβίωσης των ενήλικων ατόμων είναι εύρος αλατότητας 0-125 ‰ και εύρος θερμοκρασίας 5-37°C (Hotos & Vlahos, 1998; Chang & Hur, 1999; Harrison, 2003). Η διατροφή τους στηρίζεται κυρίως σε νεκρή οργανική ύλη, μικροάλγη και διάτομα (Drake et al., 1984; Cardona et al., 1996; Harrison, 2003).

***Liza ramada* (Risso, 1826)**

Στα ενήλικα άτομα το πρώτο ραχιαίο πτερύγιο αποτελείται από τέσσερις σκληρές ακτίνες (D1:IV) ενώ το δεύτερο ραχιαίο πτερύγιο έχει οκτώ έως δέκα μαλακές ακτίνες (D2:8 –10). Το εδρικό πτερύγιο έχει τρεις σκληρές ακτίνες και οκτώ έως εννιά μαλακές ακτίνες (A: III/8-9) και τα θωρακικά πτερύγια έχουν δεκαπέντε έως δεκαεπτά μαλακές ακτίνες (P:15-17) (Harrison, 2003). Κάποια από τα εξωτερικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα του είδους είναι τα άκρα των αναδιπλωμένων θωρακικών πτερυγίων τα οποία μόλις που φθάνουν την οπίσθια άκρη του ματιού, καθώς και η χρυσή κηλίδα που φέρει κάθε βραγχιακό επικάλυμμα. Ο αριθμός των πυλωρικών τυφλών κυμαίνεται από έξι έως εννέα (Μίνος, 2004).

Το χρώμα των ενήλικων ατόμων είναι γκριζο - γαλάζιο στη ράχη ενώ πλευρικά είναι ασημί, γκρι και μαύρο. Κατά μήκος του σώματος υπάρχουν λωρίδες γκριζου χρώματος, ενώ στην κοιλιακή περιοχή το χρώμα που επικρατεί είναι το άσπρο. Το χαρακτηριστικό του είδους είναι η χρυσή κηλίδα στο βραγχιακό επικάλυμμα. Τα χρωματοφόρα κύτταρα των πτερυγίων αποδίδουν χρωματισμούς ανοιχτού γκρι ή κίτρινου, με μία μαύρη κηλίδα σε κάθε θωρακικό πτερύγιο (Gandalfi, 1991; Harrison, 2003).



Εικόνα 2. *Liza ramada* (Risso, 1826)

Πληθυσμοί του είδους εμφανίζονται στη Μεσόγειο Θάλασσα, στη Μαύρη Θάλασσα και στην Αζοφική Θάλασσα. Στον ανατολικό Ατλαντικό απαντάται από τις Αζόρες έως την Μαδέρα και από το Μαρόκο έως και τις βόρειες Βρετανικές νήσους, καθώς επίσης στη Σκανδιναβία και στη νότια Βαλτική (Ben-Tuvia, 1986; Thomson, 1990). Αναφορές του είδους έγιναν στους ποταμούς Rhône και Saone της Γαλλίας (Changeux & Zyberblat, 1993; Harrison, 2003) και από τη μεριά του Ατλαντικού στις λίμνες Seine και Adour (Keith & Allardi, 2002). Η παρουσία του είδους στη λίμνη Weser της Γερμανίας υποδηλώνει ότι η αναπαραγωγή του πληθυσμού είναι πολύ πιθανόν να συμβαίνει στη Βόρεια Θάλασσα (Scheffel et al., 1996; Harrison, 2003). Ωστόσο έχουν καταγραφεί άτομα του είδους στα βορειότερα σημεία που εκτείνονται οι πληθυσμοί, κατά την περίοδο του καλοκαιριού (Ben-Tuvia, 1986; Harrison, 2003).

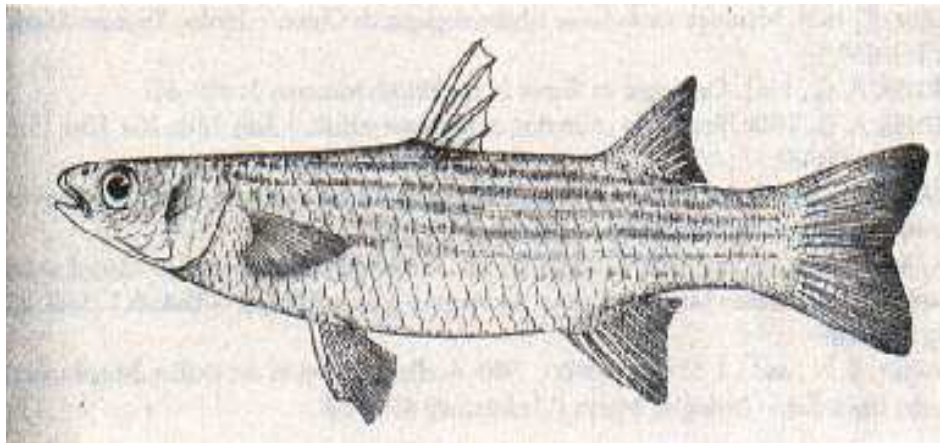
Επομένως, αναφερόμαστε σε ένα είδος που διαβιώνει σε παράκτια νερά, σε λιμνοθάλασσες και ποτάμια (Ben-Tuvia, 1986; Bauchot, 1987; Harrison, 2003). Έχει το μεγαλύτερο εύρος αλατότητας, σε σύγκριση με όλα τα είδη της οικογένειας που συναντάμε στην Ευρώπη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η διαβίωση του είδους στις λίμνες Tiberias και Qarum όπου η αλατότητα είναι ιδιαίτερα αυξημένη (Trewavas, 1973; Harrison, 2003). Συνεπώς, δικαιολογείται η ανάδρομη πορεία του στους ποταμούς όπου παραμένει για πολλούς μήνες (Hickling, 1970; Claridge & Potter, 1985; Ben-Tuvia, 1986; Harrison, 2003). Το φάσμα της αλατότητας που διαβιώνει το είδος αποδίδεται με το χαρακτηρισμό «από γλυκά έως αλμυρά νερά» ενώ η θερμοκρασία κυμαίνεται από 8–24° C (Gandalfi et al., 1991; Harrison, 2003).

Τα ενήλικα άτομα τρέφονται κυρίως με πλαγκτόν, μικροάλγη, πελαγικά αυγά, λάρβες καθώς και ανόργανη ύλη στη στήλη του νερού και μεταξύ στήλης του νερού και επιφάνειας (Drake et al., 1984; Almeida et al., 1993; Cardona & Castello, 1994; Cardona, 1996; Shapiro, 1998; Harrison, 2003). Συγκρίνοντας το με άλλα είδη της

οικογένειας στην περιοχή της Ευρώπης, έχει την ικανότητα να διηθεί το νερό και να συγκρατεί τα στερεά υπόλοιπα της διήθησης μεγέθους έως και 63 μm.

***Liza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845)**

Τα ενήλικα άτομα του είδους έχουν δύο ραχιαία πτερύγια. Το πρώτο έχει τέσσερις σκληρές ακτίνες (D1:IV) ενώ το δεύτερο έχει μία σκληρή και οχτώ μαλακές ακτίνες (D2: I/8). Το εδρικό πτερύγιο έχει μία σκληρή και οκτώ έως εννέα μαλακές ακτίνες (A: I/8-9). Το θωρακικό πτερύγιο αποτελείται από μία σκληρή και δεκατέσσερις μαλακές ακτίνες (P: I/14) ενώ τα κοιλιακά πτερύγια έχουν μία σκληρή και πέντε μαλακές ακτίνες (V: I/5). Το είδος έχει έξη πυλωρικά τυφλά (Kaya et. al., 1998) ενώ τα χείλη του είναι κοκκινωπά (Harrison, 2003).



Εικόνα 3. *Liza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845)

Το είδος ήταν αυτόχθονο στην παράκτια ζώνη της βορειοανατολικής Ασίας και της Μαύρης θάλασσας, μεταξύ της περιόδου 1972 και 1984 (Kazansky & Starushenko, 1997; Starushenko & Kazansky, 1996; Zaitzen & Starushenko, 1997; Harrison, 2003). Στη συνέχεια μέσω εσωτερικών υδάτων πέρασε στη θάλασσα του

Μαρμαρά και στη συνέχεια στο Βόρειο Αιγαίο. Στην Ελλάδα έχει καταγραφεί στις περιοχές του Έβρου, του Νέστου, και στη λίμνη Βισθωνίδα (Kaya et al., 1998; Koutrakis & Economidis, 2000; Harrison, 2003)

2. Προηγούμενες γενετικές μελέτες στην οικογένεια Mugilidae

Γενετικές μελέτες που διεξήχθησαν στην οικογένεια Mugilidae έχουν χρησιμοποιήσει διάφορες περιοχές του γενετικού υλικού, εστιάζοντας κυρίως στο μιτοχονδριακό γένωμα (mtDNA).

Μια αξιολογη μελέτη για την εξελικτική συγγένεια μεταξύ επτά ειδών της οικογένειας Mugilidae (*M. cephalus*, *C. labrosus*, *L. ramada*, *L. saliens*, *L. aurata*, *O. labeo*, *M. curema*), βασίστηκε στην ενίσχυση με την αντίδραση PCR και ανάγνωση της ακολουθίας των βάσεων του 12S rRNA και του κυτοχρώματος b, του μιτοχονδριακού DNA. Τα συμπεράσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα δύο (*M. cephalus* και *M. curema*) από τα επτά είδη έχουν αξιοσημείωτη γενετική απόκλιση συγκριτικά με τα υπόλοιπα (Caldara et al., 1996).

Με τη χρήση αλληλοενζύμων έγινε προσπάθεια ανάλυσης της φυλογενετικής συγγένειας πέντε ειδών της οικογένειας Mugilidae (*M. cephalus*, *C. labrosus*, *L. ramada*, *L. saliens*, *L. aurata*). Τα αποτελέσματα της έρευνας δηλώνουν την ύπαρξη τριών φυλογενετικών ομάδων. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα τρία είδη του γένους *Liza* (*L. ramada*, *L. saliens*, *L. aurata*), η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει το είδος *C. labrosus* ενώ η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει το είδος *M. cephalus* το οποίο αποκλίνει και περισσότερο (Papasotiropoulos et al., 2001).

Με τη λήψη ωαρίων πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA σε τέσσερα είδη της οικογένειας (*C. labrosus*, *L. ramada*, *L. saliens*, *L. aurata*). Για την επίτευξη της διάκρισης των τεσσάρων ειδών ακολούθησε χρήση τριών διαφορετικών

ενζύμων περιορισμού (Taq I, Hinf I, BstN I) στα προϊόντα PCR, ώστε να αποδοθούν με επιτυχία τα περιοριστικά πρότυπα μεταξύ των τεσσάρων ειδών στην πηκτή αγαρόζης (Kossa-Kilia et al., 2002). Η ίδια τεχνική PCR-RFLPs, χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της φυλογενετικής συγγένειας πέντε ειδών της οικογένειας Mugilidae (*M. cephalus*, *C. labrosus*, *L. ramada*, *L. saliens*, *L. aurata*), όπου πραγματοποιήθηκε PCR ανάλυση τριών τμημάτων του mtDNA (12S rRNA, 16S rRNA και COI) και χρήση διαφορετικών ενζύμων περιορισμού (Papasotiropoulos et al., 2002).

Άλλη μια προσπάθεια για τη φυλογενετική ανάλυση έξι ειδών που διαβιώνουν στη Μεσόγειο (*M. cephalus*, *C. labrosus*, *L. ramada*, *L. saliens*, *L. aurata*, *O. labeo*) καθώς επίσης και για την εξακρίβωση της υπόθεσης που αναφέρεται στην μονοφυλετικότητα του γένους *Liza* στη Μεσόγειο, έγινε με τη μέθοδο της αλλοενζυμικής ανάλυσης και με τη μέθοδο της ανάλυσης πρωτοδιάταξης του γονιδίου 16S rRNA (Rossi et al., 2004). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι το είδος *M. cephalus* έχει τη μεγαλύτερη γενετική απόκλιση μεταξύ των υπολοίπων. Παράλληλα επεσήμαναν την ύπαρξη μιας φυλογενετικής ομάδας η οποία περιλαμβάνει τα είδη του γένους *Liza* μαζί με το είδος *C. labrosus*, γεγονός που δηλώνει ότι τα είδη του γένους *Liza* δεν ανήκουν σε μία μονοφυλετική ομάδα (Rossi et al., 2004).

Τέλος, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) καθώς και η ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA, χρησιμοποιήθηκαν για τη διάκριση και τη φυλογενετική ανάλυση έξι διαφορετικών ειδών της οικογένειας Mugilidae που διαβιώνουν στη Μεσόγειο (*M. cephalus*, *M. so-iuy*, *C. labrosus*, *L. aurata*, *L. ramada*, *L. saliens*) (Imsiridou et al., 2007). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν α) τη γενετική διαφοροποίηση του είδους *M. cephalus* η οποία οδηγεί σε ξεχωριστή ομαδοποίησή του β) τη γενετική ομοιότητα των ειδών *L. ramada* και *L. aurata* τα

οποία και ομαδοποιούνται μαζί και γ) τη μη μονοφυλετική προέλευση του γένους *Liza* (εφόσον το είδος *L. saliens* ομαδοποιείται μαζί με το είδος *C. labrosus*).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι κυτογενετικές αναλύσεις, όπως αυτή που πραγματοποιήθηκε από δείγμα διαφόρων πληθυσμών του είδους *M. cephalus* ανά τον κόσμο. Η επίτευξη της προσπάθειας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της τεχνικής του υβριδισμού *in situ*. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι όλοι οι πληθυσμοί που μελετήθηκαν έχουν ίδιο αριθμό και την ίδια μορφολογία χρωμοσωμάτων και δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στις ετεροχρωματινικές περιοχές και στην περιοχή του οργανωτή του πυρηνίσκου (NOR - Nuclear organizer regions) (Rossi et al., 1996). Με την ίδια τεχνική ερευνητές πραγματοποίησαν κυτογενετική ανάλυση στο είδος *L. ramada* (Rossi et al., 1997) και απέδωσαν με ακρίβεια τα χαρακτηριστικά και το μέγεθος των χρωμοσωμάτων του είδους. Αντίστοιχη ανάλυση για το είδος *O. labeo* έδωσε αξιόλογα αποτελέσματα για το μέγεθος των τελομερών των χρωμοσωμάτων καθώς και για την περιοχή του οργανωτή του πυρηνίσκου NOR (Rossi et al., 2000).

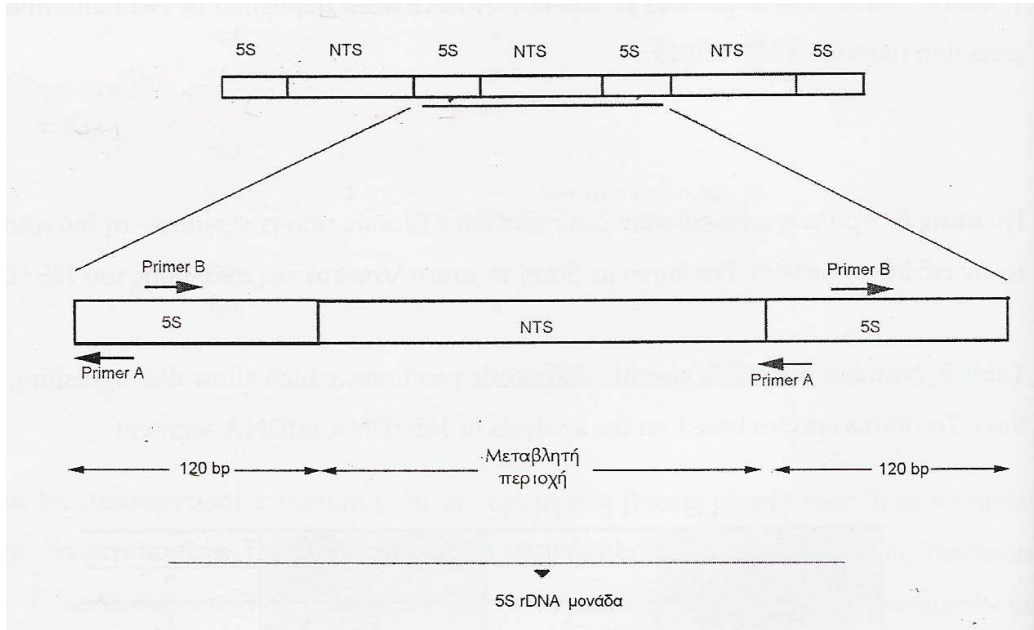
3. Η δομή του γονιδίου 5S rDNA

Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα γονίδια για το ριβοσωμικό RNA (rRNA) αποτελούν δύο ομάδες οι οποίες απαρτίζονται από χιλιάδες αντίγραφα. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα γονίδια για τα 18S, 5.8S, και 28S rRNA ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει μόνο το γονίδιο 5S rDNA που κωδικοποιεί για το 5S rRNA (Long και David, 1980).

Η επιλογή του συγκεκριμένου γονιδίου έγινε λόγω της ιδιότητας του να παρουσιάζει χαμηλό βαθμό ενδοειδικού πολυμορφισμού και παράλληλα υψηλό ποσοστό διαειδικού πολυμορφισμού. Αυτά τα χαρακτηριστικά το καθιστούν πολύ καλό μάρτυρα για τη διάκριση στενά συγγενικών ειδών.

Μελετώντας τη δομή του, παρατηρούμε αρχικά την περιοχή που κωδικοποιεί και αριθμεί 120 ζεύγη βάσεων ενώ έπεται η μη κωδικοποιούσα περιοχή (NTS = nontranscribed spacer). Η μεταξύ τους διαφορά είναι ότι το τμήμα των 120 ζευγών βάσεων δεν εμφανίζει ούτε σημειακό πολυμορφισμό ούτε πολυμορφισμό μεγέθους. Σε αντίθεση, το τμήμα NTS παρουσιάζει υψηλό βαθμό σημειακού πολυμορφισμού όπως επίσης και πολυμορφισμό μεγέθους (Long & David, 1980; Williams & Strobeck, 1985). Ο σημειακός πολυμορφισμός οφείλεται σε αλλαγές βάσεων που παρατηρούνται στη μη κωδικοποιούσα περιοχή, ενώ ο πολυμορφισμός μεγέθους έχει να κάνει με τον αριθμό των βάσεων από τις οποίες αποτελείται η περιοχή NTS. Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των περιοχών NTS των ατόμων διαφορετικών ειδών, είναι αυτές που χαρακτηρίζουν κάθε είδος. Εξαιτίας του γεγονότος ότι η περιοχή NTS παρουσιάζει τόσο πολυμορφισμό μεγέθους όσο και σημειακό πολυμορφισμό μεταξύ διαφορετικών ειδών, έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές περιπτώσεις ταυτοποίησης ειδών καθώς και σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων διαφόρων ειδών.

Όσον αφορά τη μεταγραφική μονάδα για το 5S rDNA δεν είναι όμοια για όλους τους οργανισμούς. Σε ορισμένους μύκητες το γονίδιο για το 5S rRNA παρατηρείται διασκορπισμένο σε όλο το γένωμα (Mao et al., 1982). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς παρατηρείται σε διαφορετική περιοχή του γονιδιώματος από ότι τα άλλα rDNA γονίδια - μαζί με άλλα πολυαντίγραφα γονιδίων όπως αυτά των ιστονών και του 45S rDNA - και έχει τη μορφή πολλαπλών αντιγράφων. Τέλος, δεν πρέπει να παραλείψουμε τη διαφορετική διάταξη του γονιδίου μεταξύ των σωματικών κυττάρων και των ωοκυττάρων, η οποία έχει μελετηθεί σε σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών και των αμφιβίων (Komiyama et al., 1986).



Εικόνα 4. Απεικόνιση της δομής του γονιδίου για το 5S rRNA, και οι θέσεις στις οποίες υβριδίζεται το ζεύγος εκκινητών για την ενίσχυση της επαναλαμβανόμενης μονάδας (Καραίσκου, 2004).

4. Προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποίησαν το γονίδιο 5S rDNA

Αφορμή για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης προσπάθειας έγιναν βιβλιογραφικές πηγές, που αναφερόταν σε αξιόπιστα αποτελέσματα διάκρισης διαφορετικών ειδών με τη χρήση του γονιδίου 5S rDNA. Ο στόχος της παρούσας δουλειάς ήταν ο σαφής διαχωρισμός των ειδών, τόσο για τον επιστημονικό κλάδο όσο και τον κλάδο της αγοράς (καταναλωτή – καλλιεργητή).

Προσπάθεια που στέφθηκε με επιτυχία ήταν αυτή που περιελάμβανε τη διάκριση τριών ειδών του γένους *Trachurus*. Η ενίσχυση με PCR του γονιδίου 5S rDNA αποκάλυψε διαφορετικά PCR πρότυπα για κάθε είδος (Karaïskou et al., 2003). Επίσης το γονίδιο 5S rDNA αποδείχτηκε κατάλληλο για τη διάκριση μεταξύ των ειδών *Solea solea* και *Reinhardtius hippoglossoides* (Cespedes et al., 1999) καθώς και

μεταξύ τριών ειδών του γένους *Scomber* (Aranishi, 2005). Επιπρόσθετα, με τη χρήση του συγκεκριμένου γονιδίου έχει γίνει διάκριση μεταξύ χήνας (*Anser anser*) και πάπιας (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*) (Rodriguez, 2001).

Επίσης η μοριακή οργάνωση του γονιδίου 5S rDNA έχει μελετηθεί στο σολομό του Ατλαντικού *Salmo salar* (Pendas et al., 1994), σε επτά διαφορετικά είδη ψαριών του γένους *Brycon* (Wasko et al., 2001), σε επτά νεοτροπικά είδη ψαριών (*Steindachnerina elegans*, *Prochilodus affinis*, *Parodon tortuosus*, *Hoplias malabaricus*, *Pseudoplatistoma coruscans*, *Hypostomus* sp., *Cichla ocellaris*,) (Martins & Galetti, 2001) καθώς και σε διαφορετικά είδη του γένους *Leporinus* (Martins & Galetti, 2001). Τέλος, η εξέλιξη και η χρωμοσωμική θέση των μονάδων 5S rDNA έχει μελετηθεί στα είδη *Allium cepa* και *Allium schoenoprasum* (Shibata & Hizume, 2002). Στις περισσότερες από τις παραπάνω μελέτες οι ερευνητές προχωρούν στην ανάγνωση της ακολουθίας των βάσεων του 5S rDNA, έχοντας σαν στόχο τον ακριβή εντοπισμό των διαφορετικών μεταγραφικών μονάδων επάνω στο χρωμόσωμα καθώς και την εύρεση των διαφορών μεταξύ των γονιδίων των διάφορων ειδών.

5. Λόγοι για τους οποίους χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο 5S rDNA για την διάκριση των κεφαλοειδών

Οι λόγοι που χρησιμοποιήσαμε τη συγκεκριμένη μεθοδολογία κατατάσσονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αφορά την επιστημονική κοινότητα. Γνωρίζοντας ότι η οικογένεια *Mugilidae* αποτελείται από 17 γένη και 60 είδη (Nelson, 1994) τα οποία διαβιώνουν σε διαφορετικά μήκη και πλάτη ανά τον κόσμο, αντιλαμβανόμαστε τον βαθμό δυσκολίας για τη διάκρισή τους. Η αναγνώριση επίσης των διαφορετικών ειδών γόνου κεφαλοειδών είναι προβληματική καθώς βασίζεται κυρίως στον

ιδιαίτερο χρωματισμό του σώματος (Zismann, 1981; Cambrony, 1984; Serventi, 1996) και στη διάταξη των μελανοφόρων κυττάρων στην κοιλιακή περιοχή της κεφαλής (Zismann, 1981; Reay & Cornel, 1988; Minos et al., 2002).

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τον κλάδο της αγοράς. Ο μεγάλος βαθμός ομοιότητας των ειδών γόνου, η κατανάλωση των γενετικών προϊόντων που προέρχονται από τα θηλυκά άτομα (αυγοτάραχο) και η άγνοια του καταναλωτή, οδηγούν στην αισχροκέρδεια. Θύματα εξαπάτησης είναι και οι καλλιεργητές εφόσον η καλλιέργεια των κεφαλοειδών στηρίζεται κυρίως σε άγριο γόνο. Συνήθως οι ιχθυοκαλλιεργητές δε γνωρίζουν το είδος των ατόμων του γόνου που προμηθεύονται από τους ψαράδες. Η ταυτότητα των ειδών είναι μια πολύ σημαντική πληροφορία, διότι κάθε είδος έχει διαφορετικό ρυθμό αύξησης και διαφορετική ανοχή στην αλατότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κεφαλοειδή κατέχουν σημαντικό κομμάτι στην αλιεία και στις υδατοκαλλιέργειες σε όλο τον κόσμο (Nash & Shenadeh, 1980). Μόνο το 2006 η παραγωγή του είδους *M. cephalus* έφτασε τους 42.738 τόνους που αντιστοιχεί στο 60% της συνολικής παραγωγής, οι οποίοι παρήχθησαν από καλλιέργειες σε θάλασσα, σε υφάλμυρα και εσωτερικά ύδατα και από περιοχές που βρίσκονται γύρω από τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα (FAO, 2006).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο μορφολογικός διαχωρισμός του γόνου των κεφαλοειδών δεν γίνεται εύκολα και δεν είναι λίγες οι φορές που η επιστημονική κοινότητα έχει προβληματιστεί. Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εκφράζουν οι ιχθυοκαλλιεργητές καθώς και οι επιχειρήσεις μεταποίησης οι οποίες επηρεάζονται άμεσα από τα είδη. Λόγοι όπως ο ρυθμός αύξησης των διαφορετικών ειδών γόνου και η ποιότητα του αυγοτάραχου των εκάστοτε ειδών, έχουν οικονομικές επιπτώσεις στις επιχειρήσεις. Το γεγονός αυτό έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ανθρώπων που ασχολούνται με τη γενετική μηχανική. Οι περισσότερες μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί στη διάκριση των ειδών βασίζονται κυρίως στην πρωτεϊνική ανάλυση (Andrews, 1998; Mackie et al., 1999), ενώ οι διαδικασίες επικεντρώνονται στην ενίσχυση γονιδίων (Carrera et al., 1999; Martins et al., 2001; Wasko et al., 2001; Shibata et al., 2002; Karaiskou et al., 2003) στην ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών (Papasotiropoulos et al., 2001) και στην ανάγνωση ακολουθιών βάσεων διαφόρων τμημάτων του DNA (Carrera et al., 1999; Martins et al., 2002). Τα αποτελέσματα των προσπαθειών έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και προσφέρουν νέες πληροφορίες για την συγκεκριμένη οικογένεια.

Στόχος μας ήταν η διάκριση των τριών ειδών κεφαλοειδών (*Mugil cephalus*, *Liza ramada* και *Liza haematocheilus*), με την ενίσχυση του 5S rDNA γονιδίου. Με τη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ενισχύσαμε το συγκεκριμένο γονίδιο και τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ήταν μοναδικά για το κάθε είδος. Με την παραπέρα εφαρμογή της τεχνικής αυτής οι ιχθυοκαλλιεργητές θα μπορούν να είναι σίγουροι για το είδος του γόνου με το οποίο γεμίζουν τις δεξαμενές τους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Συλλογή των ατόμων

Η συλλογή των ατόμων ήταν μια χρονοβόρα διαδικασία, διότι η παρατήρηση των ατόμων κάθε είδους γίνεται σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Αυτό συνεπάγεται την παραπέρα συντήρηση των ατόμων ή των τμημάτων του μυϊκού ιστού σε κατάψυξη. Το μέγεθος και η ηλικία των ψαριών δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα, αρκεί να γίνει σωστή συστηματική ταξινόμηση του γόνου, λόγω των ιδιαίτερων και συνεχώς μεταβαλλόμενων μορφολογικών χαρακτηριστικών.

Για την επίτευξη του στόχου, χρησιμοποιήσαμε τριάντα άτομα από το είδος *M. cephalus*, τριάντα άτομα από το είδος *L. ramada* και έντεκα άτομα από το είδος *L. haematocheilus*. Ο μικρός αριθμός των ατόμων του τρίτου είδους οφείλεται στην υποαλίευση του στις περιοχές της λίμνης Βισθωνίδας και της παράκτιας περιοχής του Νομού Ροδόπης, από όπου προέρχεται το δείγμα. Το δείγμα αλιεύθηκε στο διάστημα Μάιος – Οκτώβριος 2006. Τα άτομα γόνου του είδους *L. ramada* αλιεύθηκαν στον κόλπο του Θερμαϊκού και μεταφέρθηκαν αυθημερόν στο εργαστήριο στις 2/11/2006. Αντίστοιχα ο γόνος του είδους *M. cephalus*, αλιεύθηκε στο λιμάνι των Ν. Μουδανιών το χρονικό διάστημα Οκτώβριος – Δεκέμβριος 2006.

Τα αλιευτικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή του γόνου είναι συρόμενα δίχτυα παραλίας (γρίπος ή μπραγάνι) χωρίς κόμπους, με άνοιγμα ματιού 3mm και ύψος 1,5 m, με σχοινοβάριδα στο κάτω μέρος τους και φελλούς στην επιφάνεια. Η προμήθεια των ώριμων ατόμων *L. haematocheilus* έγινε από επαγγελματίες ψαράδες.

2. Συστηματική ταξινόμηση των ατόμων

Η συστηματική κατάταξη των ειδών είναι:

Κλάση	Οστειχθύες	Οστειχθύες	Οστειχθύες
Υποκλάση	Ακτινοπερύγιοι	Ακτινοπερύγιοι	Ακτινοπερύγιοι
Τάξη	Perciformes	Perciformes	Perciformes
Υποτάξη	Mugiloidei	Mugiloidei	Mugiloidei
Οικογένεια	Mugilidae	Mugilidae	Mugilidae
Γένος	<i>Mugil</i>	<i>Liza</i>	<i>Liza</i>
Είδος	<i>Mugil cephalus</i>	<i>Liza haematocheilus</i>	<i>Liza ramada</i>

3. Λήψη ιστού

Στα ώριμα άτομα η λήψη δείγματος γίνεται με τεμαχισμό ορθογώνιου τμήματος μυϊκού ιστού, κάτω από το δεύτερο ραχιαίο περύγιο. Ο ιστός είναι απαλλαγμένος από δέρμα, λέπια, οστά και αίμα. Σε περίπτωση που δεν είναι καθαρός, υπάρχει πιθανότητα να επηρεάσει τα επόμενα στάδια. Στην περίπτωση που το δείγμα μας είναι γόνος, παίρνουμε όλο το άτομο.

Τα εργαλεία που χρησιμοποιούμε είναι λαβίδα και νυστέρι. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στο σχολαστικό καθαρισμό τους, έπειτα από λήψη ιστού από κάθε άτομο. Η καθαριότητα γίνεται αρχικά με νερό της βρύσης, στη συνέχεια με απορροφητικό χαρτί και στο τέλος με καθαρό οινόπνευμα. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγουμε μόλυνση επόμενων δειγμάτων, από μυϊκό ιστό προηγούμενων ατόμων. Επιτόπου, το δείγμα τοποθετείται σε σωληνάκια τύπου erpendorf τα οποία αριθμούνται και στη συνέχεια τοποθετούνται στην κατάψυξη.

4. Παρασκευή διαλυμάτων για την εξαγωγή DNA

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε για την εξαγωγή του DNA είναι τα ακόλουθα και καταγράφονται με σειρά προτεραιότητας:

- CTAB: Για τη παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 10 ml 1M Tris - HCl pH = 8, 35 ml 4M NaCl, 4ml 0,5M EDTA, 2gr CTAB και δις-απεσταγμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 100 ml. Στη συνέχεια αναδεύουμε με θέρμανση μέχρι η σκόνη να διαλυθεί πλήρως. Ενώ στο τέλος προσθέτουμε 100 μl μερκαπτοαιθανόλης.
- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K 10mg/ml: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 10mg πρωτεΐνας και 1ml δις-απεσταγμένο νερό. Ενώ τέλος αναδεύσαμε το διάλυμα για την ομογενοποίησή του.
- Διάλυμα SAVAGE (εξισορροπημένη φαινόλη – χλωροφόρμιο – ισοαμυλική αλκοόλη): Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 25ml διαλύματος εξισορροπημένης φαινόλης και 25ml διαλύματος χλωροφορμίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 70%: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 70ml απόλυτη αλκοόλη και 30ml δις-απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα TE (10mM Tris-HCl pH = 7,4, 1mM EDTA pH = 8): Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 5ml διαλύματος 2MTris-HCl pH = 7,4, 2ml διαλύματος 0,5M EDTA pH = 8, καλή ανάδευση ώστε να ομογενοποιηθεί και συμπλήρωση με δις-απεσταγμένο νερό ώστε ο όγκος του διαλύματος φτάσει τα 1000 ml.

5. Εξαγωγή DNA

Από την αρχική ποσότητα μυϊκού ιστού που πήραμε, μεταφέρουμε μικρή ποσότητα 70 μgr σε νέα σωληνάκια. Στη συνέχεια τοποθετούμε σε κάθε ένα από αυτά

0,5ml διαλύματος CTAB 2X, με το οποίο επιτυγχάνουμε καταστροφή των λιπιδίων της πλασματικής και πυρηνική μεμβράνης. Έπειτα, σε κάθε σωλήνα προσθέτουμε 5 μl διαλύματος 10 mg/ml πρωτεΐνης K, η οποία καταστρέφει όλες σχεδόν τις πρωτεΐνες των κυττάρων αλλά και τις ιστόνες του DNA. Αμέσως μετά, γίνεται η επώαση των δειγμάτων σε επωαστικό κλίβανο στους 55°C, για 2 ώρες τουλάχιστον. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα δείγματα ανακινούνται κάθε μισή ώρα, ώστε να διαλυθεί πλήρως ο ιστός.

Μετά το τέλος της επώασης έχουμε προσθήκη 0,5 ml διαλύματος SAVAGE, με το οποίο διαλύονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες των κυττάρων, ενώ το DNA διαλύεται στο υπόλοιπο νερό του ομογενοποιημένου. Στη συνέχεια γίνεται έντονη ανάδευση του δείγματος, περιστροφή των σωλήνων για 5 λεπτά και φυγοκέντρησή τους στις 12.000 στροφές για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέους σωλήνες erppendorf και προσθέτουμε 0,5 ml διαλύματος χλωροφορμίου. Ακολουθεί περιστροφή των σωλήνων για 5 λεπτά και φυγοκέντρησή τους στις 12.000 στροφές για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, έχουμε μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα σωληνάκια erppendorf και προσθήκη 1 ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης. Στο σημείο αυτό είναι ορατό το DNA σε μορφή νήματος, ενώ η παρουσία της αλκοόλης βοηθά στην αφυδάτωση του.

Σε περίπτωση που σε ορισμένα δείγματα δεν παρατηρήσουμε το DNA σε μορφή νήματος, τα φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές, ώστε να γίνει το DNA ορατό και να αποφύγουμε τυχόν απώλειές του κατά την αφαίρεση της απόλυτης αλκοόλης. Έπειτα αφαιρούμε προσεκτικά την απόλυτη αλκοόλη και προσθέτουμε 1ml διαλύματος αλκοόλης 70%, η οποία βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου. Εάν το DNA αιωρείται, τα δείγματα αυτά φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές, ώστε αυτό να προσκολληθεί στα τοιχώματα του σωλήνα erppendorf.

Στη συνέχεια, αναδεύουμε το δείγμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά απομακρύνουμε όλη την αλκοόλη και προσθέτουμε 100 μl διαλύματος TE, επιτυγχάνοντας τη διάλυση του DNA. Η συντήρηση των διαλυμάτων DNA γίνεται σε θερμοκρασία 4°C.

6. Παρασκευή διαλυμάτων για έλεγχο DNA σε πηκτή αγαρόζης

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης είναι τα ακόλουθα και καταγράφονται με σειρά προτεραιότητας:

- Διάλυμα 1XTBE: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 200ml διαλύματος 5XTBE και 800 ml δις-απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα 1% βρωμιούχου εθιδίου: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 1gr βρωμιούχου εθιδίου και 100ml δις – απεσταγμένο νερό. Στην συνέχεια αναδεύουμε για αρκετή ώρα μέχρι η σκόνη να διαλυθεί πλήρως. Το σκεύασμα μπαίνει σε σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο.

Ενώ τα αντίστοιχα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων είναι τα ακόλουθα και καταγράφονται με σειρά προτεραιότητας:

- Διάλυμα 1XTBE: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 200ml διαλύματος 5XTBE και 800ml δις-απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα 1% κυανού της βρωμοφαινόλης: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε 1gr κυανού της βρωμοφαινόλης και 100ml δις-απεσταγμένο νερό. Το σκεύασμα αναδεύεται καλά και τοποθετείται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

7. Έλεγχος DNA σε πηκτή αγαρόζης

7.1. Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης, αρχικά αναμιγνύουμε σε ειδική κωνική φιάλη 1,2 gr αγαρόζης υπό μορφή σκόνης με 120ml διαλύματος 1XTBE (πηκτή 1%). Στη συνέχεια, το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείο βρασμού. Έπειτα για να κρυώσει το διάλυμα, τοποθετείται κάτω από συνεχή ροή νερού βρύσης και αναδεύεται κυκλικά. Αμέσως μετά προσθέτουμε 7,5 ml διαλύματος 1% βρωμιούχου εθιδίου και αναδεύουμε. Ακολουθεί η έκχυση του διαλύματος σε ειδικό πλαίσιο, και απομακρύνονται οι φυσαλίδες που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί. Σε ειδικές εγκοπές του πλαισίου τοποθετούμε μια "χτένα" η οποία δημιουργεί "πηγαδάκια". Για τη στερεοποίηση της αγαρόζης χρειάζονται περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού πήξει η αγαρόζη, αφαιρείται η χτένα προσεκτικά από τη πηκτή. Με αυτόν τον τρόπο έχουν σχηματιστεί τα πηγαδάκια μέσα στην πηκτή.

7.2. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Τοποθετούμε την πηκτή αγαρόζης μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει 700 ml διαλύματος 1XTBE. Για κάθε δείγμα, αναμιγνύουμε πάνω σε ειδική επιφάνεια parafilm 5ml διαλύματος DNA με 3ml διαλύματος φόρτωσης (1% κυανού της βρωμοφαινόλης). Κάθε δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό πηγαδάκι της πηκτής, με τη βοήθεια μιας μικροπιπέτας. Μετά το τέλος της διαδικασίας, συνδέουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τροφοδοτικό μηχάνημα και εφαρμόζουμε ηλεκτρικό πεδίο (150 Volts, 90 mAmpere). Εφόσον γνωρίζουμε ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω της φωσφορικής του ομάδας, τα μόρια του DNA θα μετακινηθούν

προς την άνοδο. Σε αυτό το στάδιο παρατηρούμε τη μετακίνηση του δείκτη κυανού της βρωμοφαινόλης. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 1 ώρα.

7.3. Έλεγχος της πηκτής αγαρόζης

Το αποτέλεσμα της ηλεκροφόρησης γίνεται ορατό με τη βοήθεια συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV), ώστε να μπορούμε να δούμε με ευκρίνεια τις ζώνες που έχουν δημιουργηθεί. Εάν η απομόνωση DNA είναι επιτυχής, το γενετικό υλικό θα εμφανίζεται σαν μία φωτεινή ζώνη επάνω στην πηκτή αγαρόζης. Το μηχάνημα συνδέεται με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέσω ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος, γίνεται η επεξεργασία και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκροφόρησης.

8. Ενίσχυση με τη μέθοδο PCR

Για τη διαδικασία της PCR, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές:

5'- TACGCCCGATCTCGTCCGATC -3'

5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3'

Η σειρά των νουκλεοτιδίων είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να ενισχύεται μια μονάδα του γονιδίου 5S rDNA (κωδικοποιούσα περιοχή των 120 ζευγών βάσεων και η μεταβαλλόμενη περιοχή NTS). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης PCR σε κάθε δείγμα είναι 25 μl. Σε κάθε σωλήνα προσθέτουμε:

- 1μl από το διάλυμα του DNA
- 5μl ρυθμιστικού διαλύματος Taq DNA πολυμεράσης
- 0,5μl διαλύματος 100mM MgSO₄
- 1,25 μl διαλύματος 10mM dNTPs
- 0,4μl διαλύματος 50 pmoles/μl από τον εκκινητή 1

- 0,4μl διαλύματος 50 pmoles/μl από τον εκκινητή 2
- 0,3μl διαλύματος 5 units/μl Taq DNA πολυμεράσης
- 16,15 μl δις-απεσταγμένο νερό

Το πρόγραμμα ενίσχυσης για την περιοχή το γονιδίου 5S rDNA που επιθυμώ να ενισχύσω έχει ως εξής:

- Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, για 4 λεπτά στους 95°C.
- 20 δευτερόλεπτα στους 95°C (αποδιάταξη του δίκλωνου DNA)
- 50 δευτερόλεπτα στους 65°C (σύνδεση των εκκινητών στο DNA-στόχο)
- 30 δευτερόλεπτα στους 72°C (δράση της πολυμεράσης και επιμήκυνση των αλυσίδων DNA).

Ο θερμοκρασιακός αυτός κύκλος (αποδιάταξη - σύνδεση εκκινητών-επιμήκυνση) επαναλαμβάνεται 30 φορές. Στη συνέχεια ακολουθεί μια συμπληρωματική επιμήκυνση, για επτά λεπτά στους 72°C. Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου 5S rDNA γίνεται σε συσκευή Eppendorf. Η συσκευή προγραμματίζεται με τους χρόνους επώασης και τις αντίστοιχες θερμοκρασίες. Τα σωληνάκια τοποθετούνται στις υποδοχές της συσκευής και η συσκευή κλείνει. Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου 5S rDNA με το παραπάνω πρόγραμμα διαρκεί περίπου μία ώρα. Μετά το τέλος της διαδικασίας οι σωλήνες τοποθετούνται στο ψυγείο.

9. Έλεγχος των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης

9.1. Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης

Η διαδικασία είναι αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 7.1. Η διαφορά είναι ότι αναμιγνύουμε σε ειδική κωνική φιάλη 2,4gr αγαρόζης υπό μορφή σκόνης με 120ml διαλύματος 1XTBE (πηκτή 2%).

9.2. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Η διαδικασία είναι αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 7.2. Επίσης σε ένα πηγαδάκι της πηκτής τοποθετούμε έναν "μάρτυρα" DNA. Ο μάρτυρας είναι

συνήθως ένα πλασμίδιο, το οποίο έχει κοπεί με ένζυμα περιορισμού σε γνωστές θέσεις. Έτσι προκύπτει ένας αριθμός θραυσμάτων DNA που έχουν γνωστό μήκος. Όταν ο μάρτυρας "φορτώνεται" μαζί με τα ενισχυμένα τμήματα DNA στην πηκτή αγαρόζης, γίνεται σύγκριση των θέσεων τους στη πηκτή με τα θραύσματα γνωστού μήκους του μάρτυρα. Σε ένα πηγαδάκι της πηκτής λοιπόν, τοποθετούμε 1μl διαλύματος 100 bp DNA ladder συγκέντρωσης 0,5 μg/μl, το οποίο αναμιγνύουμε με 3μl διαλύματος φόρτωσης.

9.3. Έλεγχος των προϊόντων PCR

Το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR γίνεται ορατό με τη βοήθεια της συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Εάν η αντίδραση PCR είναι επιτυχής, τα προϊόντα της αντίδρασης θα εμφανίζονται σαν φωτεινές ζώνες διαφορετικού μεγέθους επάνω στην πηκτή αγαρόζης.

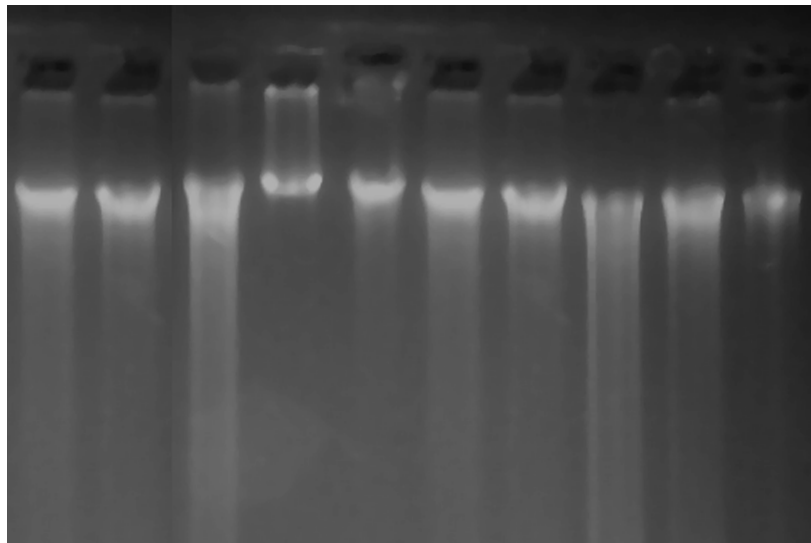
10. *Φωτογράφιση της πηκτής και ανάλυση των αποτελεσμάτων*

Η συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδέεται με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και έτσι οι πηκτές φωτογραφίζονται άμεσα. Το όλο σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και με τη βοήθεια ενός ειδικού λογισμικού προγράμματος, γίνεται επεξεργασία και αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εξαγωγή DNA

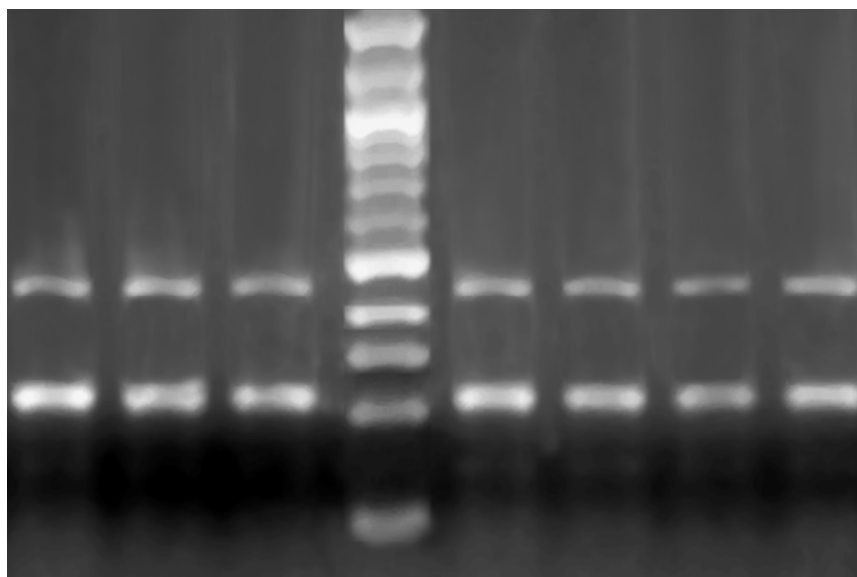
Ακολουθώντας τη σειρά των διαδικασιών, τα πρώτα αποτελέσματα ήταν αυτά που άφησε η επιτυχημένη απομόνωση του DNA έπειτα από το στάδιο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η ορθή διαδικασία εφαρμογής των σταδίων εμφανίζεται με τη μορφή παράλληλων φωτεινών λωρίδων όπως παρατηρούμε στη φωτογραφία που ακολουθεί.



Εικόνα 5. Οι ζώνες DNA των τριών ειδών *M. cephalus*, *L. ramada* και *L. haematocheilus* σε πηκτή αγαρόζης, όπως φωτογραφήθηκαν στη τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας

2. Προϊόντα PCR του είδους *Mugil cephalus*

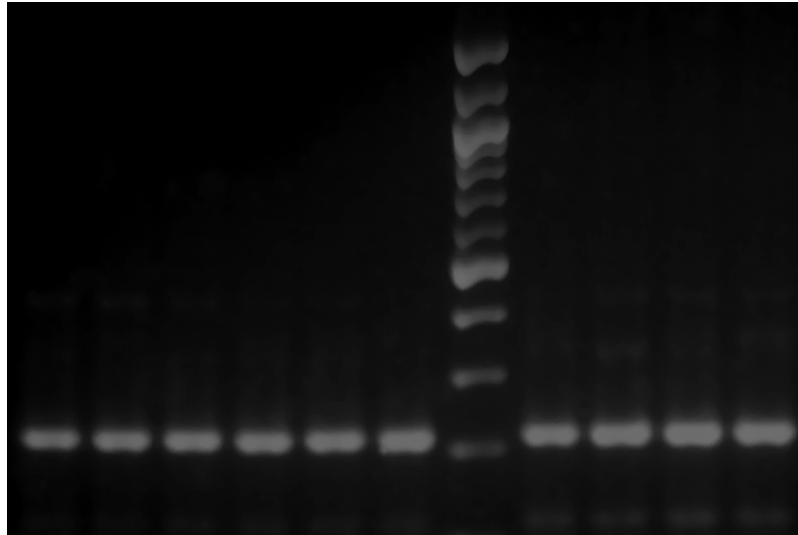
Στη συνέχεια παρουσιάζεται η φωτογραφία των προϊόντων PCR για το είδος *M. cephalus*. Το αποτύπωμα που αφήνουν οι ενισχυμένες περιοχές πάνω στην πηκτή αгарόζης, είναι δύο φωτεινές ζώνες. Από τη προβολή τους στο αποτύπωμα του μάρτυρα των 100 ζευγών βάσεων, αντιλαμβανόμαστε ότι η πρώτη ζώνη είναι λίγο πιο πάνω από τα 200 ζεύγη βάσεων και αντιστοιχεί στα 220 ζεύγη βάσεων. Ενώ η δεύτερη ενισχυμένη περιοχή παρατηρείται στα 440 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 6. Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR του 5S rDNA γονιδίου, για το είδος *M. cephalus*. Ως μοριακός μάρτυρας για τον υπολογισμό του ενισχυμένου τμήματος, χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός μάρτυρας 100 bp – DNA ladder.

3. Προϊόντα PCR του είδους *Liza ramada*

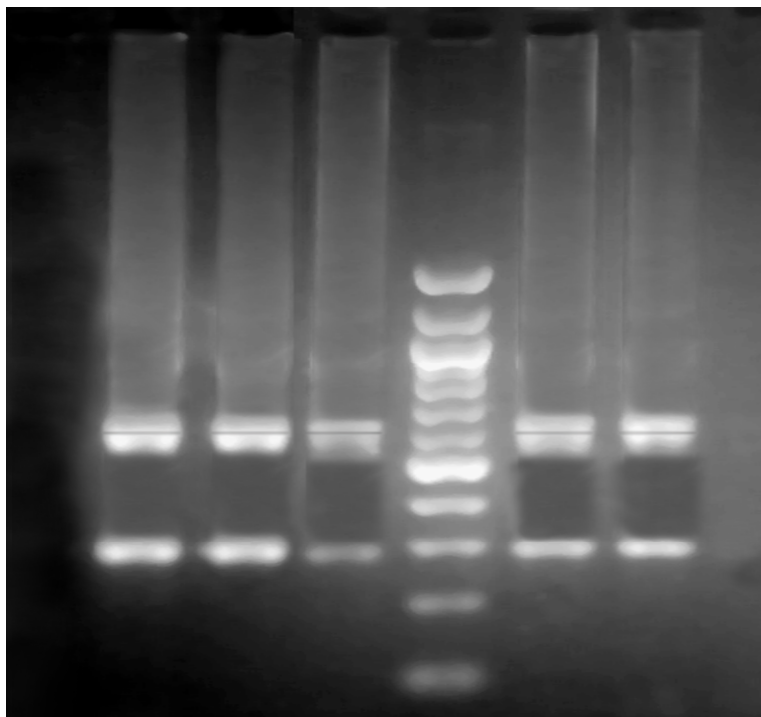
Αντίστοιχα, στη φωτογραφία της πηκτής των προϊόντων PCR για το είδος *L. ramada*, παρατηρούμε μια ζώνη που αντιστοιχεί στα 220 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 7. Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR του 5S rDNA γονιδίου, για το είδος *L. ramada*. Ως μοριακός μάρτυρας για τον υπολογισμό του ενισχυμένου τμήματος, χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός μάρτυρας 100 bp – DNA ladder.

4. Προϊόντα PCR του είδους *Liza haematocheilus*

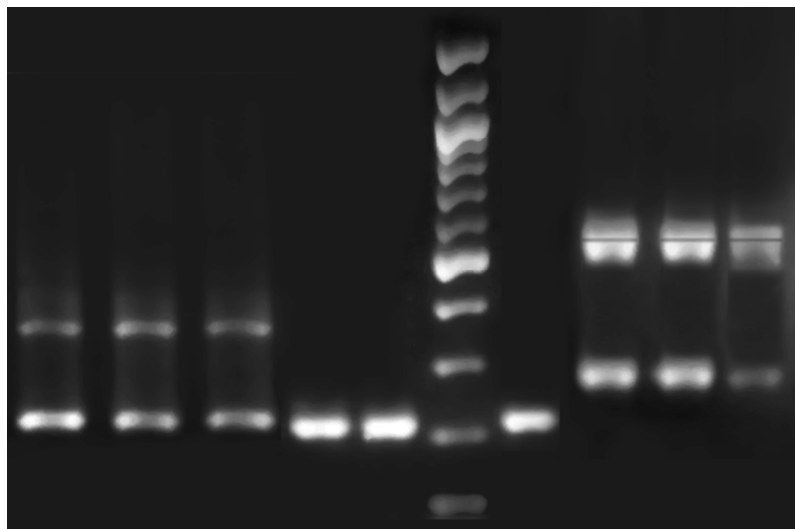
Τέλος, παρουσιάζεται η φωτογραφία των προϊόντων PCR για το είδος *L. haematocheilus*. Το αποτύπωμα που αφήνουν οι ενισχυμένες περιοχές πάνω στην πηκτική αγαρόζη, είναι τρεις φωτεινές ζώνες. Από τη προβολή τους στο αποτύπωμα του μάρτυρα των 100 ζευγών βάσεων, αντιλαμβανόμαστε ότι η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί περίπου στα 280 ζεύγη βάσεων. Η δεύτερη ενισχυμένη περιοχή παρατηρείται στα 600 ζεύγη βάσεων ενώ η τρίτη ζώνη αντιστοιχεί στα 620 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 8. Έλεγχος σε πηκτική αγαρόζη των προϊόντων PCR του 5S rDNA γονιδίου, για το είδος *L. haematocheilus*. Ως μοριακός μάρτυρας για τον υπολογισμό του ενισχυμένου τμήματος, χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός μάρτυρας 100 bp – DNA ladder.

5. Προϊόντα PCR των τριών ειδών *Mugil cephalus*, *Liza ramada* και *Liza haematocheilus*

Τα προϊόντα PCR και των τριών ειδών μαζί φαίνονται στην Εικόνα 9 όπου διακρίνονται οι ζώνες για το κάθε είδος. Συγκρίνοντας βλέπουμε τις δύο ζώνες για το είδος *M. cephalus*, τη μία ζώνη για το είδος *L. ramada* και τις τρεις ζώνες για το είδος *L. haematocheilus*.



Εικόνα 9. Έλεγχος σε πηκτή αгарόζης του ενισχυμένου πυρηνικού γονιδίου 5S rDNA και των τριών ειδών. Ως μοριακός μάρτυρας για τον υπολογισμό των ενισχυμένων τμημάτων, χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός μάρτυρας 100 bp - DNA ladder.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία βασίζεται στην ενίσχυση του πυρηνικού γονιδίου 5S rDNA με τη διαδικασία της PCR, και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Οι λόγοι για τους οποίους καταλήξαμε στη συγκεκριμένη σύνθεση της εργασίας είναι διότι το DNA φέρει τη γενετική πληροφορία για όλους τους τύπους κυττάρου, καθώς επίσης και για τη βιολογική λειτουργία των κυττάρων (Bartlet & Davidson, 1992; Ferguson et al., 1995). Η επιλογή του συγκεκριμένου γενετικού τόπου έγινε λόγω του χαμηλού ποσοστού ενδο-ειδικού πολυμορφισμού που παρουσιάζει και παράλληλα λόγω του υψηλού ποσοστού δια-ειδικού πολυμορφισμού. Ο συνδυασμός αυτός τον καθιστά άριστο μάρτυρα για τον διαχωρισμό στενά συγγενικών ειδών.

Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις στις οποίες ήταν δύσκολη η διάκριση των ειδών με την εφαρμογή της παρούσας τεχνικής, δηλαδή μόνο με την ενίσχυση με την αντίδραση PCR του συγκεκριμένου γονιδίου. Έτσι οι γενετιστές πέρασαν στη μέθοδο του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLPs), ενώ για να αποδώσουν τις διαφορές σε επίπεδο βάσεων ανέπτυξαν την μέθοδο της ανάλυσης πρωτοδιάταξης. Οι παραπάνω μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί και σε άλλους γενετικούς τόπους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν διαγνωστικοί δείκτες (16S rDNA, D-loop, κυτόχρωμα b) για την διάκριση οργανισμών.

Επιτυχημένες γενετικές ταυτοποιήσεις ειδών με την χρήση της ενίσχυσης PCR του 5S rDNA γονιδίου, έχουν γίνει από διάφορες ομάδες ερευνητών. Όπως προαναφέραμε τα δείγματα τριών ειδών του γένους *Trachurus* (*T. mediterraneus*, *T. trachurus* και *T. picturatus*), έδωσαν το κάθε ένα διαφορετικό πρότυπο σε πηκτή αγαρόζης μετά το τέλος της ηλεκτοφόρησης (Karaiskou et al., 2003). Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν εργασίες που ως αντικείμενο μελέτης είχαν είδη του γένους

Solea (Cespedes et al., 1999), σολομό του Ατλαντικού και πέστροφα (Pendas et al., 1995), όπως επίσης ποντίκια (Suzuki et al., 1994) και υπόγεια φυτά (Linder et al., 2000).

Όσον αφορά φυλογενετικές αναλύσεις στην οικογένεια Mugilidae, φυλογενετική έρευνα (Imsiridou et al., 2007) απέδειξε ότι τα είδη που βάσει της συστηματικής τους κατάταξης ανήκουν στο ίδιο γένος, έχουν περισσότερες ομοιότητες μεταξύ τους από ότι με είδη διαφορετικού γένους. Συγκεκριμένα τα είδη *L. ramada* και *L. aurata* έχουν μεγάλη γενετική ομοιότητα μεταξύ τους απ' ότι με το είδος *C. labrosus*. Παράλληλα όμως το γένος *Liza* έχει μικρή γενετική απόσταση (0,037-0,042) με το γένος *Chelon* (Imsiridou et al., 2007).

Στην προσπάθεια για ανίχνευση της γενετικής απόκλισης και της φυλογενετικής συγγένειας στην οικογένεια Mugilidae, η ομάδα Papasotiropoulos et al. (2002) κατέληξε στη δημιουργία τριών φυλογενετικών ομάδων: η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει το είδος *M. cephalus*, η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα είδη *L. ramada* και *L. aurata* και τέλος η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τα είδη *L. saliens* και *C. labrosus*. Η ομαδοποίηση αυτή συμφωνεί απόλυτα με αυτήν που προέκυψε από την ανάλυση του γονιδίου 5S rDNA (Imsiridou et al., 2007), όπου αποκαλύφθηκαν οι ίδιες ομάδες ειδών. Τα συμπεράσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τη στενή μορφολογική συγγένεια των ειδών. Παρόμοιες αναφορές για προσπάθεια διάκρισης από ανάλυση DNA και από συστηματική ταξινόμηση, έχουν πραγματοποιηθεί και σε άλλες ομάδες ψαριών που παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά (Meyer et al., 1990; Sturmbauer & Meyer 1992; Patarnello et al., 1994). Τα παραπάνω αντικρουόμενα αποτελέσματα από τις δύο μεθοδολογίες, ερμηνεύονται ως έλλειψη παράλληλης εξέλιξης ορισμένων χαρακτηριστικών (Caldara et al., 1996; Rossi et al., 1998).

Υψηλό βαθμό δυσκολίας στη διάκριση των ειδών *L. ramada*, *L. saliens*, *L. aurata* και *C. labrosus* αντιμετώπισε η επιστημονική ομάδα των Cataubella et al. (1974) με την τεχνική της ανάλυσης των χρωμοσωμάτων, η οποία δεν επιβεβαιώνει σημαντική διαφορά μεταξύ του είδους *C. labrosus* και ειδών του γένους *Liza*. Δυσκολίες επίσης στον διαχωρισμό των ειδών που ανήκουν στα γένη *Liza* και *Chelon* αντιμετώπισαν ερευνητές που μελέτησαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι είναι δύο στενά συγγενικά γένη (Schultz, 1946; Senou et al., 1996; Harrison & Hower, 1991).

Τέλος, η τεχνική της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης πρωτεϊνών (Autem & Bonhomme, 1980; Papasotiropoulos et al., 2001) καθώς και αναλύσεις αιμοσφαιρίνης (Rizzotti, 1993), κατέληξαν στο διαχωρισμό μεταξύ *Liza* και *Chelon* επιβεβαιώνοντας την κλασική άποψη της μονοφυλετικότητας του γένους *Liza*.

Προηγούμενη γενετική διάκριση διαφορετικών ειδών της οικογένειας Mugilidae έχει επιτευχθεί με ανάλυση μιτοχονδριακού DNA, χρησιμοποιώντας ειδοειδικούς εκκινητές για την περιοχή D-loop του μιτοχονδριακού γενώματος (Murgia et al., 2001). Έτσι το κάθε είδος έδωσε διαφορετικό πρότυπο PCR στην ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης, και έτσι μπόρεσαν να διακριθούν τα τέσσερα είδη που μελετήθηκαν. Αργότερα, οι Klossa – Killia et al. (2002) χρησιμοποίησαν την PCR-RFLP ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου του μιτοχονδριακού DNA με σκοπό να διακρίνουν τα αυγά του είδους *M. cephalus* από τα αυγά τεσσάρων άλλων ειδών της οικογένειας. Και οι δύο προηγούμενες μελέτες είχαν σαν στόχο να εντοπίσουν την προέλευση των αυγών διαφορετικών ειδών κεφαλοειδών, για τον έλεγχο ποιότητας εμπορικών προϊόντων.

Επίσης, η ηλεκτροφορητική ανάλυση του ενζύμου ισομεράση της 6 – φωσφορικής γλυκόζης, αποκάλυψε την ύπαρξη διαφορετικών αλληλομόρφων τα

οποία χρησιμοποιήθηκαν για διάκριση διαφορετικών ιχθυοαποθεμάτων του είδους *M. cephalus* (Huang et al., 2001). Τέλος, αρκετοί αλληλοενζυμικοί γονιδιακοί τόποι (Papasotiropoulos et al., 2001) καθώς και διαφορετικά περιοριστικά πρότυπα τμημάτων του μιτοχondριακού DNA (Papasotiropoulos et al., 2002) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν διαγνωστικοί μάρτυρες για τη διάκριση διαφορετικών ειδών της οικογένειας Mugilidae.

Η παρούσα εργασία έχει διαχωρίσει με επιτυχία τα τρία είδη της οικογένειας αποδίδοντας στο καθένα ένα χαρακτηριστικό πρότυπο PCR. Από αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών (Δούκα, 2007) εικάζουμε ότι στο πρότυπο του είδους *M. cephalus*, είναι πιθανόν η ζώνη των 440 ζευγών βάσεων να προήλθε έπειτα από διπλασιασμό της ζώνης των 220 ζευγών βάσεων. Μόνο η τεχνική της ανάλυσης πρωτοδιάταξης των δύο ζωνών θα μπορέσει να επιβεβαιώσει ή να αναιρέσει την προηγούμενη υπόθεση.

Η ίδια τεχνική της ενίσχυσης με PCR του γονιδίου 5S rDNA, χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των ειδών *L. saliens*, *L. aurata* και *C. labrosus* (Δούκα, 2007). Τα αποτελέσματα της τεχνικής αυτής δεν απέδωσαν ένα χαρακτηριστικό πρότυπο για κάθε είδος, εφόσον τα είδη *L. aurata* και *C. labrosus* έδωσαν ένα ίδιο πρότυπο δύο ζωνών. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρωτοδιάταξης των προϊόντων PCR, ώστε να αποκαλυφθούν σε επίπεδο βάσεων οι ομοιότητες και οι διαφορές των δύο ειδών (Δούκα, 2007).

Συγκρίνοντας τις διάφορες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για την διάκριση των ειδών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ανάλυση του συγκεκριμένου πυρηνικού δείκτη δίνει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Στην παρούσα δουλειά, η απλή ενίσχυση με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης του γονιδίου 5S rDNA έκανε δυνατή τη διάκριση των τριών ειδών κεφαλοειδών. Έτσι σε διάστημα

μιας και μόνο ημέρας, οι ιχθυοκαλλιεργητές θα μπορούν να είναι σίγουροι για το είδος του γόνου με το οποίο γεμίζουν τις δεξαμενές τους. Με τη ραγδαία εξέλιξη της επιστήμης της γενετικής και της τεχνολογίας, σε σύντομο χρονικό διάστημα θα δοθούν επιπλέον λύσεις σε προβλήματα συστηματικής κατάταξης που αφορούν τους κλάδους της επιστήμης και της αγοράς.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται τη διάκριση τριών ειδών της οικογένειας Mugilidae με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής. Τα είδη στα οποία πραγματοποιήθηκε η γενετική ταυτοποίηση είναι: *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), *Liza ramada* (Risso, 1826) και *Liza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845).

Το δείγμα αλιεύθηκε από το Θερμαϊκό κόλπο και τη λιμνοθάλασσα της Βισθωνίδας, σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Αφού πρώτα έγινε η συστηματική αναγνώριση των ειδών βάσει κλείδας, αμέσως μετά περάσαμε στη διαδικασία της μεταφοράς και της συντήρησης των δειγμάτων στο εργαστήριο η οποία έγινε σε συνθήκες κατάψυξης. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της λήψης το μυϊκού ιστού από τη ραχιαία περιοχή των ατόμων, η εξαγωγή του DNA, και ο έλεγχος του DNA σε πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας. Το επόμενο βήμα ήταν η ενίσχυση του γονιδίου 5S rDNA με τη μέθοδο της PCR και ο έλεγχος των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης. Τα διαφορετικά προϊόντα PCR τα φωτογραφίσαμε ώστε να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Το γονίδιο 5S rDNA αποδείχθηκε ένας άριστος μάρτυρας λόγω της γρήγορης, και επιτυχημένης ενίσχυσης και στα τρία είδη. Η αξιοπιστία της μεθόδου οφείλεται στη σταθερότητα των αποτελεσμάτων. Το αποτύπωμα των ατόμων του είδους *M. cephalus* αποτελούνταν από δύο ζώνες μεγέθους 220 ζευγών βάσεων και 440 ζευγών βάσεων. Τα άτομα του είδους *L. ramada* έδωσαν μόνο μια ζώνη μεγέθους 220 ζευγών βάσεων ενώ τα άτομα του είδους *L. haematocheilus* έδωσαν τρεις ζώνες μεγέθους 280 ζευγών βάσεων, 600 ζευγών βάσεων και 620 ζευγών βάσεων. Επομένως, τα τρία είδη μπορούν να διακριθούν με μία απλή αντίδραση PCR του γονιδίου 5S rDNA, εφόσον παρουσιάζουν ένα μοναδικό πρότυπο στη πηκτή αγαρόζης.

7. SUMMARY

This work deals with the identification among three species of the Mugilidae family, with the help of genetic engineering. The species in which the genetic identification was carried out are: *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), *Liza ramada* (Risso, 1826) and *Liza haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845).

The specimens were fished from the Thermaikos Gulf and the Visthonida lagoon, in different time periods. At first, the systematic classification of the specimens has been made on the basis of bones and immediately afterwards we passed to the procedure of transfer of the specimens in the laboratory, in deep freeze conditions. After that, the removal of muscular tissue from the dorsal areas of the specimens, the extraction of DNA, and the control of DNA in agarose gel were carried out. The next step was the amplification of the 5S rDNA gene with the PCR reaction and the check of the PCR products in agarose gel electrophoresis. The different PCR products were photographed in order to compare the results.

The 5S rDNA gene was proved to be a perfect marker because of the fast and successful amplification in all three species. The pattern of species *M. cephalus* consists of two bands sized 220 base pairs and 440 base pairs. The species *L. ramada* gave only one band sized 220 base pairs, whereas the species *L. haematocheilus* revealed three bands sized 280 base pairs, 600 base pairs and 620 base pairs. Consequently, the three species can be distinguished with a simple PCR reaction of the 5S rDNA gene, since they present a unique pattern in the agarose gel.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

- Δούκα, Σ. (2007). Διάκριση διαφορετικών ειδών γόνου κεφαλοειδών με τη χρήση πυρηνικών δεικτών. Πτυχιακή εργασία, σελ. 46, Νέα Μουδανιά.
- Καραίσκου, Ν. (2004). Γενετική ταυτοποίηση και φυλογενετικές σχέσεις τριών ειδών του γένους *Trachurus*. Διδακτορική διατριβή, σελ. 193, Θεσσαλονίκη.
- Μίνος, Γ. (2004). Σημειώσεις Βιολογίας και Συστηματικής ιχθύων, τεύχος δεύτερο, Α. Τ. Ε. Ι. Θεσσαλονίκης, Τ.Α.Υ.

Ξενόγλωσση

- Abdel'-Malek, S.A. (1981). Some data on the distribution and biology of commercial fish in Lake Quarun, Egypt. *Vopr. Ikhtiol.* **21(4)**: 616-622.
- Almeida, P.R. (1996). Estuarine movement patterns of adult thin-lipped grey mullet, *Liza ramada* (Risso) (Pisces, Mugilidae), observed by ultrasonic tracking. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* **202**: 137 – 150.
- Almeida, P.R., Moreira, F., Costa, J.L., Assis, C.A and Costa, M.J. (1993). The feeding strategies of *Liza ramada* (Risso, 1826) in fresh and brackish water in River Tagus, Portugal. *Fish Biol.* **42**: 95-107.
- Andrews, A.T. (1998). Electrophoric methods. In *Analytical methods of food authentication*, (ed. P.R. Ashurst and M.J. Dennis), pp. 204–239. Blackie Academic and Professional, Thomson Science, London.
- Aranishi, F. (2005a). Rapid PCR-RFLP method for discrimination of imported and domestic mackerel. *Mar. Biot.* **7**: 571-575.

- Aranishi, F. (2005b). PCR-RFLP analysis of nuclear nontranscribed spacer for mackerel species identification. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 508-511.
- Ardizzone, G.D., Cataubella, S. and Rossi, R. (1988). Management of coastal lagoon fisheries and aquaculture in Italy. *FAO Fisheries Technical Paper* **293**: 1-103.
- Autem, M. and Bonhomme, F. (1980). Elements de systématique biochimique chez les mugillidés de Méditerranée. *Biochem. Sys. Ecol.* **8**: 305.
- Bartlett, S.E. and Davidson, W.S. (1992). FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Bio Techniques* **12**: 408-411.
- Bauchot, M.L. (1987). Mugilidae. In *Fiches FAO d'Identification des Espèces pour les Besoins de la Pêche. (Révision 1). Méditerranée et Mer Noire. Zone de Pêche* 37. Vol. II. (ed. M.L. Bauchot and M. Schneider), Vertebres: 1190-1194. FAO, Rome.
- Ben-Tuvia, A. (1986). Mugilidae. In *Fishes of North - Eastern Atlantic and the Mediterranean*. Vol III (ed. P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese), pp. 1197 – 1204. Unesco, Paris.
- Caldara, F., Bargelloni, L., Ostellari, L., Penzo, E., Colombo, L. and Patarnello, T. (1996). Molecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: evidence of a differential rate of evolution at the intrafamily level. *Mol. Phyl. Evol.* **6** (3): 416 -424.
- Cataudella, S., Civitelli, M.V. and Cappana, E. (1974). Chromosome complement of the Mediterranean mullets (Pisces, Perciformes). *Caryologia* **27**: 93-105.
- Cardona, L. (1996). Microalgae selection by mullet (*Mugil cephalus* and *Liza ramada*) in Israeli semi-intensive fish ponds. *Bamidgeh* **48** (3): 165 – 173.

- Cardona, L. and Castello, F. (1994). Relative importance of plankton and benthos as food sources for *Mugil cephalus* and *Liza ramada* in Israeli semi-intensive fish ponds. *Bamidgeh* **46 (4)**: 197-202.
- Carrera, E., García, T., Céspedes, A., González, I., Fernández, A., Hernández, P.E. and Martín, R. (1999). PCR-RFLP of mitochondrial cytochrome oxidase gene: a simple method for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Sci. Food Agric.* **79**: 1654-1658.
- Cambrony, M. (1984). Identification et périodicité du recrutement des juvéniles de Mugilidae dans les étangs littoraux du Languedoc – Roussillon. *Vie Milieu* **34**: 221-227.
- Céspedes A., García T., Carrera E., González I., Fernández A., Hernández P.E. and Martín R. (1999). Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 1046-1050.
- Chang, Y.J. and Hur, J.W. (1999). Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearing water. *Korean Fish. Soc.* **32(3)**: 310-316.
- Changeux, T. and Zylberblat, M. (1993). Analysis of fishing gear fishery statistics in the Rhône River basin: Part one: Study of the catch. *Bull. Franc. Pech. Piscicult.* **330**: 271-294.
- Claridge, P.N. and Potter, I.C. (1985). Distribution, abundance and size composition of mullet populations in the Severn Estuary and Bristol Channel. *Mar. Biol. Ass. U.K.* **65**: 325 – 335.
- De Silva, S.S. (1980). Biology of juvenile grey mullet: a short review. *Aquaculture* **19**: 21-36.

- Demirkalp, F.P. (1992). The reproduction biology of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), *Stizostedion lucioperca* (Linnaeus, 1758) in Bafra lakes (Balıkgölu-Uzungöl). *Turk. J. Zool.* **16(3)**: 311-322.
- Drake, P., Arias, A.M. and Gallego, L. (1984). Biología de los Mugilidos (Osteichthyes, Mugilidae) en los esteros de la salinas de San Fernando (Cádiz). III. Hábitos alimentarios y su relación con la morfometría del aparato digestivo. *Inv. Pesq.* **48(2)**: 337-367.
- Ergene, S. (1999). Reproduction properties of *Mugil cephalus* L., 1758 live in Akgöl-Paradeniz lagoon, Silifke. *Turk. J. Zool.* **23(2)**: 64-646.
- FAO, 2006. Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. *FISH - STAT Plus: Universal software for fishery statistical time series [database on the internet]. Version 2.3.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1996 - 2000. Available from: ftp://ftp.fao.org/FI/stat/windows/fishplus/fst_plus.zip
- Ferguson, A., Taggart, J.B., Prodohl, P.A., McMeel, O., Thomson, C., Stone, C., McGinnitty, P. and Hynes, R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. Fish Biol.* **47**: 103-106.
- Gandolfi, G., Zerunian, S., Torricelli, P. and Marconato, A. (1991): I Pesci delle acque interne Italiane. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, pp. 617.
- Gornung, E., Cordisco, C.A., Rossi, A.R., Innocentiis, De S., Crosetti, D. and Sola, L. (2001). Chromosomal evolution in Mugilidae: karyotype characterization of *Liza saliens* and comparative localization of major and minor ribosomal genes in six Mediterranean mullets. *Mar. Biol.* **139**: 55-60.

- Grupcheva, G. (1993). *Trichodina tredafilovi*, new species and *Trichodina puytoraci* Lom, 1962 (Ciliata: Unceolariidae) from freshwater fishes in Bulgaria. *Acta Protozool.* **32 (1)**: 63 – 66.
- Guillard, J. and Colon, B. (1998). Hydroacoustic estimation of the number of fish passing through Beaucaira – Vallabregues lock (Rhône). *Bull. Franc. Peche Piscicult.* **348**: 79 – 90.
- Harrison, I.J. (2003). Mugilidae. In *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes*. (ed. K. Carepentier). Western Central Atlantic. FAO, Rome.
- Harrison, I.J. and Howes, G.J. (1991). The pharigobranchial organ of mugilid fishes; its structure, variability, ontogeny, possible function and taxonomic utility. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool)* **57**: 111.
- Hickling, C.F. (1970). A contribution to the natural history of the English grey mullets (Pisces, Mugilidae). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **50**: 609-633.
- Hotos, G.N. and Vlahos, N. (1998). Salinity tolerance of *Mugil cephalus* and *Chelon labrosus* (Pisces: Mugilidae) fry in experimental conditions. *J. Aquac.* **167(3-4)**: 329-338.
- Huang, C.S., Weng, C.F. and Lee, S.C. (2001). Distinguishing two types of gray mullet, *Mugil cephalus* L. (Mugiliformes: Mugilidae), by using glucose-6-phosphate isomerase (GPI) allozymes with special reference to enzyme activities. *J. Comp. Phys. B.* **171**: 387-394.
- Imsiridou, A., Minos, G., Katsares, V., Karaiskou, N. and Tsiora, A. (2007). Genetic identification and phylogenetic inferences in different Mugilidae species using 5S rDNA markers. *Aquac. Res.* **38**: 1370-1379.

- Karaiskou, N., Triantafyllidis, A. and Triantaphyllidis, C. (2003). Discrimination of three *Trachurus* species using both mitochondrial and nuclear based DNA approaches. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 4935-4940.
- Kazansky, B.N. and Starushenko, L.I. (1980). Acclimatization of the mullet (*Mugil so-iuy*) in the Black Sea. *Biologia Morya (Vladivostok)* **6**: 46-50.
- Kaya, M., Mater, S. and Korkut, A.Y. (1998). A new grey mullet species “*Mugil so-iuy* Basilewsky” (Teleostei: Mugilidae) from the Aegean coast of Turkey. *Turk. J. Zool.* **22**(4): 303-306.
- Keith, P. and Allardi, J. (2002). *Atlas des poissons d’eau douce de France*. Patrimoines Natures. **47**: pp. 387
- Klossa-Killia, E., Papatropoulos, V., Killias, G. and Alahiotis, S. (2002). Authentication of Messologi (Greece) roe using PCR-RFLP analysis of 16S rRNA mtDNA segment. *Food Control* **13**: 169-172.
- Koutrakis, E.M. and Economidis, P.S. (2000). First record in the Mediterranean (North Aegean Sea, Greece) of the Pacific mullet *Mugil so-iuy* Basilewsky, 1855 (Mugilidae). *Cybium* **24**(3): 299-302.
- Komoya, H., Hasegawa, M. and Takemura, S. (1986). Differentiation of oocyte - and somatic-type 5S rRNAs in animals. *J. Biochem.* **100**: 369 – 374.
- Linder, C.R., Moore, L.A. and Jackson, R.B.A. (2000). Universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *J. Mol. Ecol.* **9**: 1549-1559.
- Long, E.O. and David, I.D. (1980). Repeated gene in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 727-764.

- Mackie, I.M., Pryde, S.E., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Pérez-Martins, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M. and Rehbein, H. (1999). Challenges in the identification of species of canned fish. *Food Sci. Technol.* **10**: 9–14.
- Martins, C. and Galetti, P.M. (2001a). Origination 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. and Galetti, P.M. (2001b). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fish? *Genetica* **111**: 439 – 446.
- Martins, C., Wasko, A.P., Oliveira, C., Porto-Foresti, F., Parise-Maltempi, P.P., Wright, J.M. and Foresti, F. (2002). Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes chromosome loci. *Cytogenet. Genome Res.* **98**: 78-75.
- Mao, J., Appel, B., Schaack, J., Yamada, H. and Soll, D. (1982). The 5S rRNA genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acids Res.* **10**: 487-500.
- Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki, P. and Wilson, A.C. (1990). Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* **347**: 550.
- Minos, G., Katselis, G., Ondrias, I. and Harrison, I.J. (2002). Use of melanophore patterns on the ventral side of the head to identify fry of grey mullets (Teleostei: Mugilidae). *Isr. J. Aquacult-Bamid.* **54(1)**: 12-26.
- Murgia, R., Tola, G., Archer, S.N., Vallegra, S. and Hirano, J. (2001). Genetic identification of grey mullet species (Mugilidae) by analysis of mitochondrial DNA sequence: application to identify the origin of processed ovary products (Bottarga). *Mar. Biot.* **21**: 119-126.

- Nash, C.E. and Shehadeh, Z.H. (1980). Review of the breeding and propagation techniques for grey mullet, *Mugil cephalus*. *Studies Review* **3**: 87.
- Nelson, J.S. (1994). *Fishes of the World*. Wiley, New York.
- Papastotiropoulos, V., Klossa – Killia, E., Killias, G. and Alahiotis, S. (2001). Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) using allozyme data. *Biochem. Genet.* **39 (5/6)**: 155-168.
- Papastotiropoulos, V., Klossa–Killia, E., Killias, G. and Alahiotis, S. (2002). Genetic divergence and phylogenetic relationships in grey mullets (Teleostei: Mugilidae) based on PCR-RFLP analysis of mtDNA segments. *Biochem. Genet.* **40(3/4)**: 71-86.
- Paternello, T., Bargelloni, L., Caldara, F. and Colombo, L. (1994). Cytochrome b and 16S rRNA sequence variation in the *Salmo trutta* (Salmonidae, Teleostei) species complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* **3**: 69.
- Pendas, A.M., Moran, P., Freije, J.L. and Garcia-Vazquez, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rRNA. *Cytogenet. Genome Res.* **67**: 31-36.
- Pendas, A.M., Moran, P., Martinez, J.L. and Garcia-Vazquez, E. (1995). Application of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout and in Atlantic salmon by brown trout hybrid identification. *Mol. Ecol.* **4**: 275-276.
- Reay, P.J. and Cornell, V. (1988). Identification of grey mullet (Teleostei: Mugilidae) juveniles from British waters. *J. Fish Biol.* **32**: 95-99.
- Reay, P.J. (1992). *Mugil cephalus* L. A first British record and a further 5° N. *Fish. Biol.* **40**: 311-313.

- Rizzotti, M. (1993). Fish hemoglobins: The family Mugilidae (Perciformes). *Trends Comp. Biochem. Physiol.* **1**: 385.
- Rodriguez, M.A., Garcia, T., Gonzalez, I., Asensio, L., Fernandez, A., Lobo, E., Hernandez, P.E. and Martin, R. (2001). Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*) foie gras by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5S rDNA gene. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2717 – 2721.
- Rossi, A.R., Crosetti, D., Gornung, E. and Sola, L. (1996). Cytogenetic analysis of global populations of *Mugil cephalus* (stripped mullet) by different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Heredity* **76**: 77-82.
- Rossi, A.R., Gornung, E. and Crosetti, D. (1997). Cytogenetic analysis of *Liza ramada* (Pisces, Perciformes) by different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Heredity* **79**: 83-87.
- Rossi, A.R., Capula, M., Crosetti, D., Campton, D.E. and Sola, L. (1998). Genetic divergence and phylogenetic inferences in five species of Mugilidae (Pisces: Perciformes). *Mar. Biol.* **131**: 213-218.
- Rossi, A.R., Gornung, E., Crosetti, D., De Innocentiis, S. and Sola, L. (2000). Cytogenetic analysis of *Oedalechilus labeo* (Pisces: Mugilidae), with a report of NOR variability. *Mar. Biol.* **136**: 159-162.
- Rossi, A.R., Ungaro, A., De Innocentiis, S., Crosseti, D. and Sola, L. (2004). Phylogenetic analysis of mediterranean mugilids by allozymes and 16S mt-rRNA genes species of investigation: are the mediterranean *Liza* monophyletic? *Biochem. Genet.* **42**: 301- 315.

- Schultz, L.P. (1946). A revision of the genera of mullets, fishes of the family Mugilidae with description of three new genera. *Proc. U.S.A. Natl. Mus.* **96**: 377.
- Senou, H., Randall, J.E. and Okiyama, M. (1996). *Chelon persicus*, a new species of mullets (Perciformes: Mugilidae) from the Persian Gulf. *Bull. Kanagawa Prefecture Mus. Nat. Sci.* **25**: 71.
- Scheffel, H.J., Marciniak, M. and Schirmer, M. (1996). Larvae of the thin-lipped grey mullet *Liza ramada* (Mugillidae) in the River Weser: indication of climatic change? *Abh. Naturwiss. Verein Bremen* **43(2)**: 599-607.
- Serventi, M., Harrison, I.J., Torricelli, P. and Gandolfi, G. (1996). The use of pigmentation and morphological characters to identify Italian mullet fry. *J. Fish Biol.* **49**: 1163-1173.
- Shapiro, J. (1998). Food of the thin-lipped grey mullet (*Liza ramada*) in Lake Kinneret. *Israel J. Bamidgeh* **50(1)**: 3-11.
- Shibata, F. and Hizum, M. (2002). Evolution of 5S rDNA units and their chromosomal localization in *Allium cepa* and *Allium schoenoprasum* revealed by microdissection and FISH. *J. Theor. Appl. Genet.* **105**: 167-172.
- Starushenko, L.I. and Kazansky, A.B. (1996). Introduction of mullet haarder (*Mugil so-iuy* Basilewsky) into the Black Sea and Sea of Azov. *Stud. Rev. Gen. Fish. Council Med.* **67**: pp. 29.
- Sturmbauer, C. and Meyer, A. (1992). Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes. *Nature* **358**: 578.
- Suzuki, H., Moriwaki, K. and Sakurai, S. (1994). Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNA. *Mol. Biol. Evol.* **11**:704-710.

- Thomson, J.M. (1981). Mugilidae. In *Fiches FAO d'Identification des Espèces pour Besoins de la Pêche. Zones de Pêche 34, 47 (en partie) (Atlantique centre-est)*. (ed. W. Fischer, G. Bianchi and W.B. Scott). Ministère des Pêches et des Océans, Ottawa.
- Thomson, J.M. (1990). Mugilidae. In *Check-list of the Fishes of the Eastern Tropical Atlantic*, Vol II (ed. J.C. Quéro, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha), pp. 855–859. Unesco Paris, SEI Paris and Inict Portugal.
- Trewavas, E. (1973). Mugilidae. In *Check-list of the Fish of the North-Eastern Atlantic and of the Mediterranean*, Vol I (ed. J.C. Hureau and T. Monod), pp. 567–574. Unesco, Paris.
- Tortonese, E. (1975). *Fauna D' Italia. Osteichthyes (Pesci Ossei)*. Parte Seconda. Edizioni Calderini Bologna, pp. 11-26.
- Wasko, A.P., Martins, C., Wright, J.M. and Galetti, P.M. (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* **44**: 893-902.
- Williams, S.M. and Strobeck, C. (1985). Sister chromatid exchange and the evolution of rDNA spacer length. *J. Theor. Biol.* **116**: 625– 636.
- Zaitsev, Y.P. and Starushenko, L.I. (1997). Pilengas (*Mugil so-iuy* Basilewsky, 1855) a new industrial fish in the Black and Azovian Seas. *J. Hidrobiol. Zh.* **33(3)**: 29-37 (in Russian).
- Zismann, L. (1981). Means of identification of grey mullet fry for culture. In *Aquaculture of Grey mullets* (ed. O.H. Oren), pp. 17-63. Cambridge University Press, Cambridge