

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

**ΓΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ  
&  
ΦΟΥΝΤΟΓΛΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ**

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ  
*SPICARA* ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ  
ΔΕΙΚΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**N. ΜΟΥΔΑΝΙΑ 2009**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>2</b>
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ <i>CENTRACANTHIDAE</i> .....	2
1.2 <i>SPICARA FLEXUOSA</i> .....	3
1.3 <i>SPICARA MAENA</i> .....	4
1.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ 16S rDNA.....	7
1.5 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA.....	7
1.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	9
.....9	
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	<b>12</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>13</b>
3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ.....	13
3.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ.....	13
.....13	
3.3 ΛΗΨΗ ΙΣΤΟΥ.....	14
14	
3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΓΩΓΗ DNA.....	14
14	
3.5 ΕΞΑΓΩΓΗ DNA.....	15
.....15	
3.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΈΛΕΓΧΟ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	17
17	
3.7 ΈΛΕΓΧΟΣ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	18
18	
3.7.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1,5%.....	18
18	
3.7.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	18
18	

3.7.3	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	19
3.8	ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR.....	19
3.9	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	22
3.9.1	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	22
3.9.2	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	22
3.9.3	ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	22
3.10	ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	23
3.11	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	23
3.12	ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	25
3.13	ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ.....	25
3.14	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	25
<b>4.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>26</b>
4.1	ΕΞΑΓΩΓΗ DNA.....	26
4.2	ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR ΤΟΥ ΕΪΔΟΥΣ <i>SPICARA MAENA</i> ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΪΔΙΟ 5S rRNA.....	27
4.3	ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR ΤΟΥ ΕΪΔΟΥΣ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΪΔΙΟ 5S rRNA.....	28
4.4	ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR ΤΟΥ ΕΪΔΟΥΣ <i>SPICARA MAENA</i> ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΪΔΙΟ 16S rRNA.....	29
4.5	ΠΡΟΪΟΝΤΑ PCR ΤΟΥ ΕΪΔΟΥΣ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΪΔΙΟ 16S rRNA.....	30
4.6	ΑΚΟΛΟΥΘΪΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΪΔΪΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 14 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	31

4.7 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 15 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	33
4.8 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 16 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	35
4.9 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 17 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	37
4.10 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 18 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	39
4.11 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 19 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	41
4.12 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 24 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	43
4.13 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 25 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	45
4.14 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 31 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	47
4.15 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 32 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	49
4.16 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 33 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	51
4.17 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 34 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	53

4.18 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 35 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	55
4.19 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 36 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	57
4.20 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 37 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	59
4.21 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 38 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	61
4.22 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΤΟ ΆΤΟΜΟ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> 39 ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	63
4.23 ΑΚΟΛΟΥΘΙΕΣ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 5S rDNA ΓΙΑ ΌΛΑ ΤΑ ΆΤΟΜΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.....	65
4.24 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rDNA ΓΙΑ ΤΑ ΆΤΟΜΑ <i>SPICARA FLEXUOSA</i> ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	68
4.25 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΩΝ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rDNA ΓΙΑ ΤΑ ΆΤΟΜΑ <i>SPICARA MAENA</i> ΜΕΤΆ ΤΗΝ ΑΝΆΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (SEQUENCING).....	70
4.26 ΑΚΟΛΟΥΘΙΕΣ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rDNA ΓΙΑ ΌΛΑ ΤΑ ΆΤΟΜΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.....	72
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>79</b>
<b>6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>83</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>84</b>

<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>85</b>
-----------------------------	-----------

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Τεχνολογίας Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης έπειτα από συζήτηση και με τις υποδείξεις της Επίκουρου καθηγήτριας κ. Ιμσιρίδου Αναστασίας, την οποία θέλουμε να ευχαριστήσουμε για την πολύτιμη βοήθεια, την υπομονή και την άψογη συνεργασία μέχρι το πέρας της εργασίας μας.

Επίσης θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την καθηγήτρια κ. Τσιώρα Άννα και τον καθηγητή κ. Κατσαρέ Βασίλειο για τη βοήθεια που μας προσέφεραν κατά το εργαστηριακό μέρος, τον καθηγητή κ. Μίνο Γεώργιο για την προμήθεια των δειγμάτων και πληροφοριών όπως επίσης και τον καθηγητή κ. Φάνη Καρύδα για την συλλογή των δειγμάτων.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειές μας για την αμέριστη συμπαράστασή τους καθώς και το Διοικητικό Προσωπικό του Τμήματος, την κ. Καλογιάννη Γεωργία, την κ. Τερζούδη Ελένη, τον κ. Χαματζόγλου Παντελή και την κ. Χατζηπέτρου Γεωργία για την κατανόησή τους και τη ψυχολογική τους βοήθεια.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Γενικά χαρακτηριστικά των ειδών της οικογένειας *Centracanthidae*

Η οικογένεια *Centracanthidae* αποτελείται κυρίως από δύο γένη και 9 περίπου είδη, καθώς είναι μια μικρή οικογένεια της τάξης των οστειχθύων. Στα είδη των ψαριών της συγκεκριμένης οικογένειας παρατηρείται ενιαίο ραχιαίο πτερύγιο αποτελούμενο κυρίως από 11-13 σκληρές και 9-17 μαλακές ακτίνες, ενώ το εδρικό πτερύγιο αποτελείται από 3 σκληρές και 9-16 μαλακές ακτίνες. Έχουν προεκτεταμένη την άνω γνάθο του στόματος και το μέγιστο μήκος του σώματος δεν ξεπερνάει τα 38 εκατοστά (Nelson, 1944).

Διακρίνεται μια ομοιότητα με την οικογένεια *Sparidae* αλλά διαφέρουν στη μορφή των δοντιών και του πολύ μικρότερου στόματος, καθώς επίσης παρατηρείται μια μαύρη τετράγωνη κηλίδα στο κέντρο του πλαϊνού μέρους του σώματος (Lythgoe & Lythgoe, 1992).

Σύμφωνα με την παγκόσμια βάση δεδομένων Fishbase (<http://www.fishbase.org>), η κατάταξη της οικογένειας *Centracanthidae* έχει ως εξής:

### Γένος *Centracanthus*

- *Centracanthus cirrus* Rafinesque, 1810

### Γένος *Spicara*

- *Spicara alta*
- *Spicara australis* Regan, 1921
- *Spicara axillaris* Boulenger, 1900
- *Spicara maena* Linnaeus, 1758  
(συνώνυμο με *Spicara flexuosa* Rafinesque, 1810)
- *Spicara martinicus* Valenciennes, 1830
- *Spicara melanurus* Valenciennes, 1830
- *Spicara nigricauda* Norman, 1931
- *Spicara smaris* Linnaeus, 1758



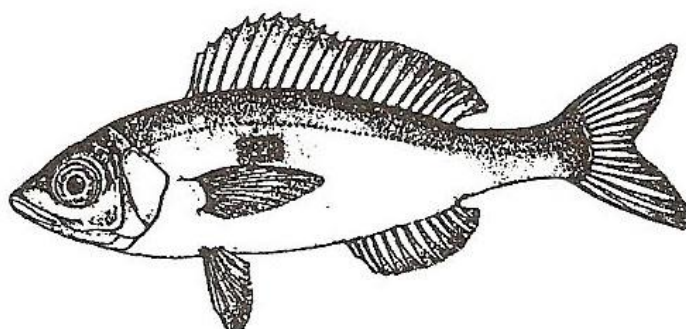
## 1.2. *Spicara flexuosa* (Rafinesque, 1810)

Το σχήμα του σώματος του είδους *S. flexuosa* (κοινή ονομασία τσέρουλα, Κασπίρης, 2000) (Εικόνα 1) είναι οβάλ και παρατηρείται ενιαίο ραχιαίο πτερύγιο, αποτελούμενο από 11 σκληρές και 11-12 μαλακές ακτίνες (D XI,11-12). Το εδρικό πτερύγιο αποτελείται από 3 σκληρές και 9-10 μαλακές ακτίνες (A III,9-10). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του είδους είναι η τετράγωνη μαύρη κηλίδα που έχει ακριβώς στο κέντρο των πλευρικών περιοχών του σώματος. Αυτή η κηλίδα βρίσκεται εκεί που τελειώνει το θωρακικό πτερύγιο και ξεκινάει το ραχιαίο πτερύγιο (Lythgoe & Lythgoe, 1992).

Το χρώμα διαφέρει ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και την περίοδο για κάθε άτομο, αλλά σε γενικές γραμμές το χρώμα που παρατηρείται συχνά είναι γαλάζιο με γκρι αποχρώσεις στην άνω πλευρά του σώματος, ενώ στην κάτω πλευρά παρατηρείται ένα ασημί χρώμα (Lythgoe & Lythgoe, 1992).

Ζουν κυρίως σε βάθη μεταξύ 70 και 130 μέτρων (Lythgoe & Lythgoe, 1992; Tserpes *et al.*, 1999), στην κατώτερη στήλη του νερού καθώς είναι βενθικοί οργανισμοί (Storelli *et al.*, 2003). Το μέγιστο μήκος που μπορούν να φτάσουν είναι 21 εκατοστά περίπου για τα αρσενικά και 18 εκατοστά για τα θηλυκά (Lythgoe & Lythgoe, 1992; Ragonese *et al.*, 2002). Στη Μεσόγειο, τα άτομα αυτού του είδους φτάνουν σε μήκος 18 εκατοστά για τα θηλυκά και 21 εκατοστά για τα αρσενικά, ενώ ζουν έως 4-5 χρόνια (Relini *et al.*, 1999). Επίσης, τα συνήθη μεγέθη που έχουν παρουσιαστεί στις Ινδικές ακτές είναι 8-21 εκατοστά (Rizkalla, 1994).

Αυτά τα είδη ψαριών αν και είναι χαμηλής εμπορικής αξίας, παίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα οικοσύστημα ως πηγή τροφής ή ως θηρευτές. Είναι γνωστά στους αλιείς της Μεσογείου και των Ινδικών ακτών. Εμφανίζονται σε αφθονία στη περιοχή της Μαύρης θάλασσας, στον Ατλαντικό Ωκεανό, στις ακτές της Πορτογαλίας, του Μαρόκου, της Αδριατικής και στα Κανάρια νησιά. Γενικά η κατανομή της εμφάνισής τους συμβαδίζει με τις ζώνες αλιείας. Ειδικότερα, τα ανώριμα άτομα εμφανίζονται σε παράκτιες περιοχές και μπορούν να σχηματίσουν κοπάδια σε αμμώδη υποστρώματα αναζητώντας τροφή (Relini *et al.*, 1999), ενώ δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις που έχουν βρεθεί και σε βραχώδη υποστρώματα (Petraakis & Stergiou, 1996).



**Εικόνα 1:** *Spicara flexuosa* (Rafinesque, 1810)

Κύριο χαρακτηριστικό του είδους είναι η παρουσία πρωτόγυνου ερμαφροδιτισμού (Relini *et al.*, 1999). Τρέφονται με μικρά βενθικά ασπόνδυλα (κατά προτίμηση καρκινοειδή), ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς και παρατηρείται μια σημαντική αύξηση κατά το στάδιο της ωρίμανσης, τους πρώτους πέντε μήνες (Ragonese *et al.*, 2002). Η αναπαραγωγική περίοδος ξεκινάει την αρχή της άνοιξης (Lythgoe & Lythgoe, 1992) και κυρίως τους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο (Ragonese *et al.*, 2002). Κατά την περίοδο της αναπαραγωγής φέρουν μπλε κηλίδες και στίγματα, στα πτερύγια και στο σώμα τους (Κασπίρης, 2000).

### 1.3. *Spicara maena* (Linnaeus, 1758)

Το σχήμα του σώματος του συγκεκριμένου είδους είναι οβάλ, ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν ομοιότητες με το είδος *S. flexuosa* (Εικόνα 2) και αναφέρονται συχνά ως συνώνυμα είδη (Lythgoe & Lythgoe, 1992). Υπάρχει μια αρχική εμφανής διαφορά, καθώς η κεφαλή του είδους *S. maena* (κοινή ονομασία μένουλα, Κασπίρης, 2000) είναι μικρότερη από το ύψος του σώματος και κατά δεύτερον τα δόντια είναι καλά ανεπτυγμένα (Κασπίρης, 2000). Η αναλογία του μήκους σώματος διαφέρει με την ηλικία και το φύλο

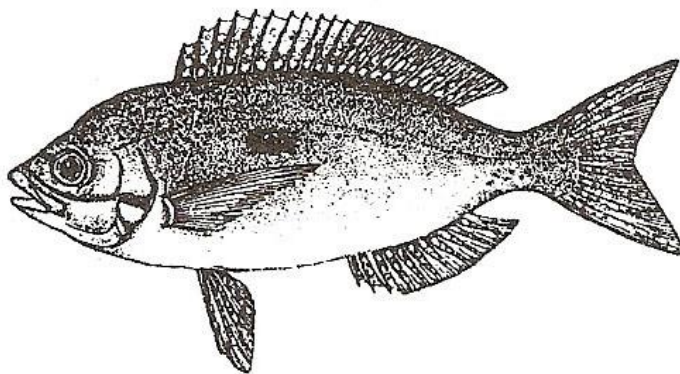
του κάθε ατόμου. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι ενιαίο και έχει 11 σκληρές και 12 μαλακές ακτίνες (D XI,12), ενώ το εδρικό πτερύγιο έχει 3 σκληρές και 10 μαλακές ακτίνες (A III,10). Επίσης τα άτομα του είδους φέρουν μια τετράγωνη μαύρη κηλίδα στις πλευρικές περιοχές του σώματος.

Το χρώμα του σώματος διαφέρει ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και την περίοδο. Στα θωρακικά πτερύγια διακρίνεται ένα καφέ-κίτρινο χρώμα, αλλά στο ουραίο, στο ραχιαίο και στο εδρικό πτερύγιο διακρίνεται ένα καφέ-μπλε χρώμα με ακανόνιστες μπλε κηλίδες. Στα ενήλικα άτομα, διακρίνεται στο μέρος της κεφαλής μια μπλε ταινία (Lythgoe & Lythgoe, 1992).

Η παγκόσμια κατανομή εμφάνισης του συγκεκριμένου είδους είναι παρόμοια με αυτήν του είδους *S. flexuosa*, καθώς χαρακτηρίζεται ως εμπορικό είδος στις ακτές της Μεσογείου, στη Μαύρη θάλασσα, στις ακτές του Ατλαντικού, στις ακτές της Αδριατικής και στις ακτές του Μαρόκου και της Πορτογαλίας (Dulčić *et al.*, 2000; Matic-Shoko *et al.*, 2004; Çiçek *et al.*, 2007).

Το είδος *S. maena* ζει σε βάθη μεταξύ 10-20 μέτρων (Lythgoe & Lythgoe, 1992) και έχει αναφερθεί ότι ζει και σε βάθη που πλησιάζουν τα 100 μέτρα (Dulčić *et al.*, 2000; Çiçek *et al.*, 2007). Ο κατάλληλος βιότοπος για το συγκεκριμένο είδος είναι το αμμώδες υπόστρωμα και τα βράχια (Miller & Loates, 1997), γιατί επηρεάζει θετικά την αναπαραγωγή και την εύρεση τροφής. Επίσης, τα λασπώδη κατώτατα σημεία της στήλης του νερού και τα λιβάδια του φανερόγαμου *Posidonia oceanica* είναι κατάλληλα σημεία διαβίωσης του συγκεκριμένου είδους (Dulčić *et al.*, 2000; Çiçek *et al.*, 2007).

Το μέγιστο μήκος που μπορεί να φτάσει, ανέρχεται στα 21 εκατοστά για τα θηλυκά και στα 24 εκατοστά για τα αρσενικά (Lythgoe & Lythgoe, 1992). Κατά τη σύλληψη των ατόμων τα μεγέθη που παρατηρούνται, κυμαίνονται από 7 έως και 24 εκατοστά και για τα δύο φύλα (Dulčić *et al.*, 2000; Karakulak *et al.*, 2006).



**Εικόνα 2:** *Spicara maena* (Linnaeus, 1758)

Η τροφή περιλαμβάνει κυρίως ασπόνδυλους βενθικούς οργανισμούς ενώ το κύριο χαρακτηριστικό του είδους είναι η παρουσία πρωτόγυνου ερμαφροδιτισμού (Dulčić *et al.*, 2000; Matic-Shoko *et al.*, 2004; Karakulak *et al.*, 2006). Κατά την περίοδο της αναπαραγωγής (Αύγουστο-Οκτώβριο), το αρσενικό σκάβει στο μαλακό υπόστρωμα έτσι ώστε να δημιουργήσει μια φωλιά για τα αυγά και έπειτα το θηλυκό εναποθέτει σε εκείνο το σημείο τα αυγά, για να γονιμοποιηθούν στη συνέχεια από το αρσενικό (Lythgoe & Lythgoe, 1992; Miller & Loates, 1997). Έχει παρατηρηθεί ότι η αναλογία φύλου του οργανισμού διαφέρει σημαντικά κατά την φθινοπωρινή περίοδο σε όλους τους τύπους βιοτόπων, συγκριτικά με άλλες περιόδους (Guidetti, 2000; Karakulak *et al.*, 2006).

Σε παγκόσμια κλίμακα οι παράκτιες περιοχές στηρίζουν την ύπαρξη σημαντικών οργανισμών σε αφθονία και βιοποικιλότητα, για τη σωστή λειτουργία ενός οικοσυστήματος (Guidetti, 2000). Για τον παραπάνω λόγο, η αλιεία του είδους *S. maena* περιορίζεται νομικά, με αποτέλεσμα την αποφυγή σύλληψης μεγάλου αριθμού ατόμων (Cabral *et al.*, 2003).

#### 1.4. Το γονίδιο 16S rDNA

Τα τελευταία χρόνια η χρήση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων, μεταξύ διαφόρων ειδών. Γενικότερα τα γονίδια για τα ριβοσωμικά RNAs (12S rRNA και 16S rRNA), είναι γονίδια που περιλαμβάνονται στο μιτοχονδριακό DNA των ζώων και είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την ανάλυση πληθυσμών, δίνοντας σημαντικές ταξινομικές πληροφορίες (Arnason *et al.*, 1991).

Οι φυλογενετικές μελέτες χρησιμοποιούν το γονίδιο 16S rRNA, σε διάφορα ταξινομικά επίπεδα και σε διαφορετικές ομάδες οργανισμών (Thollesson, 1999; Case *et al.*, 2007). Οι περισσότερες φυλογενετικές αναλύσεις για την ταυτοποίηση των ειδών βασίζονται στην ενίσχυση του γονιδίου με τη μέθοδο της PCR, και έπειτα ακολουθεί ανάλυση πρωτοδιάταξης (Apostolidis *et al.*, 2001), ή η μέθοδος του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLPs) (Shekhar *et al.*, 2005; Case *et al.*, 2007).

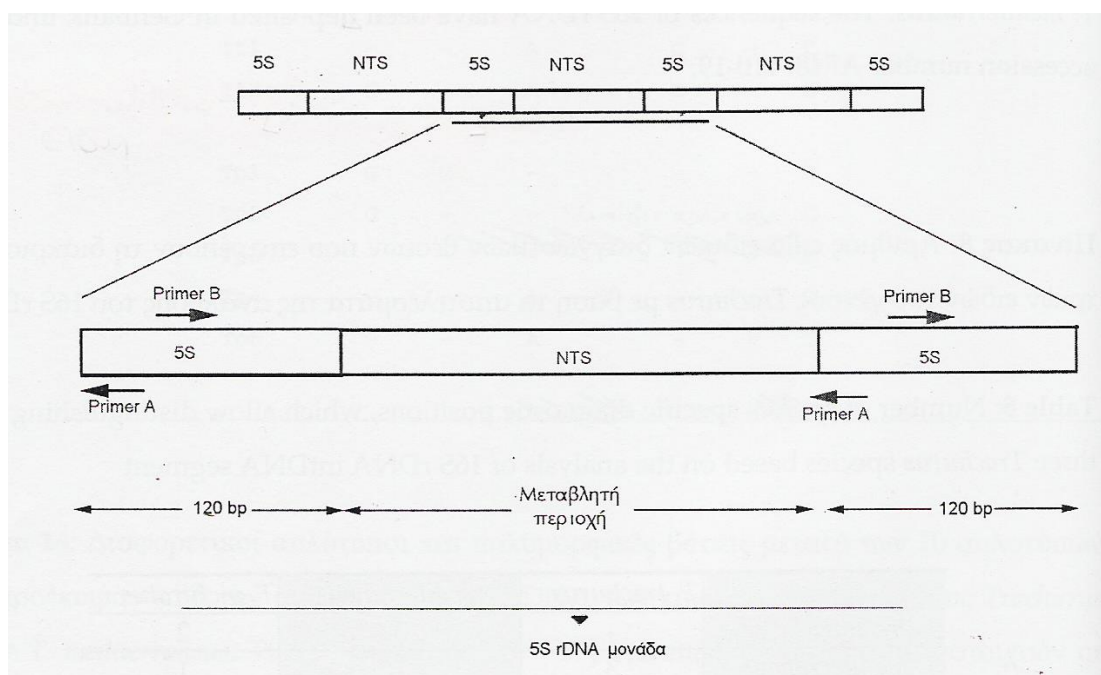
Εν κατακλείδι τα μοριακά στοιχεία παρέχουν αξιόπιστη και γρήγορη προσέγγιση για τη διάκριση ανώτερων οργανισμών (Figueras, 2000; Rastogi, 2007) καθώς και βακτηρίων (Macrae, 2000; Befring-Hovda, 2007). Το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται ως δείκτης διαχωρισμού μεταξύ συγγενικών ειδών ψαριών (Colgan, 2000), και σαφώς πρόκειται για ένα γονίδιο που παρέχει πολύτιμες ταξινομικές πληροφορίες (Darwish & Ismaiel, 2005).

#### 1.5. Η δομή του γονιδίου 5S rDNA

Το ριβόσωμα είναι μια μακρομοριακή μονάδα που είναι αρμόδια για την πρωτεϊνική βιοσύνθεση σε όλους τους οργανισμούς. Τα ριβοσώματα των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελούνται από ριβονουκλεϊκά οξέα (rRNAs) και ριβοσωμικές πρωτεΐνες (Szymanski *et al.*, 2002). Το ριβοσωμικό DNA (rDNA) αποτελείται κυρίως από δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει το rDNA που κωδικοποιεί για 18S, 5.8S και 28S rRNA και η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει το rDNA που κωδικοποιεί για το 5S rRNA. Το γονίδιο 5S δεν είναι όμοιο ως προς τη θέση του, για όλους τους

οργανισμούς. Για παράδειγμα στα αμφίβια και στα ψάρια μπορεί να βρεθεί σε διάφορα χρωμοσώματα (Martins *et al.*, 2002). Εντούτοις σε μερικούς μύκητες το γονίδιο 5S rRNA μπορεί να βρίσκεται οπουδήποτε στο γένωμα (Martins & Galetti, 2001).

Το γονίδιο 5S rRNA είναι ένα ακέραιο συστατικό της ριβοσωμικής μονάδας και βρίσκεται στα ριβοσώματα των οργανισμών, με εξαίρεση μερικών μυκήτων και ζωικών οργανισμών (Barciszewska *et al.*, 2001). Αποτελείται από μία συντηρητική κωδικοποιούσα περιοχή με 120 ζεύγη βάσεων και από μία μεταβαλλόμενη μη κωδικοποιούσα περιοχή (NTS, non-transcribed spacer), η οποία παρουσιάζει πολυμορφισμό μήκους και σημειακό πολυμορφισμό μεταξύ των ειδών (Shibata & Hizume, 2002).



**Εικόνα 3:** Η δομή του γονιδίου 5S rRNA, και οι θέσεις στις οποίες υβριδίζεται το ζεύγος εκκινήτων, για την ενίσχυση της επαναλαμβανόμενης μονάδας (Καραϊσκού, 2004).

Το μέγεθος, η δομή και η πανταχού παρουσία του 5S rRNA επέτρεψαν τη διαδοχική χρήση του στις άμεσες μοριακές μεθόδους και το έκαναν ένα ιδανικό μοριακό φυλογενετικό δείκτη. Αυτό οδήγησε στη γρήγορη συσσώρευση των στοιχείων της ακολουθίας από ποικίλους οργανισμούς, που

ανήκουν σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες (Szymanski *et al.*, 2002). Αν και το 5S rDNA έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορα σπονδυλωτά είδη, τα υπάρχοντα δεδομένα είναι συνήθως περιορισμένα για τα θηλαστικά και τα αμφίβια. Μέχρι σήμερα, λίγες αναλύσεις έχουν εφαρμοστεί στα ψάρια (Alves-Costa *et al.*, 2008). Εντούτοις ως δείκτης αξιολόγησης φυλογενετικών σχέσεων, έχει κριθεί απαραίτητος για τους θαλάσσιους οργανισμούς (Martins & Galetti 2001).

Οι περισσότερες φυλογενετικές αναλύσεις για την ταυτοποίηση των ειδών μετά την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου με τη μέθοδο της PCR, βασίζονται στη μέθοδο της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) (Karaiskou *et al.*, 2003), ή στη μέθοδο του πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLPs) (Aranishi, 2004; Aranishi, 2005). Το γεγονός ότι το συγκεκριμένο γονίδιο αποτελείται από μία συντηρητική κωδικοποιούσα περιοχή και από μία μεταβαλλόμενη μη κωδικοποιούσα περιοχή NTS, η οποία παρουσιάζει πολυμορφισμό μήκους και σημειακό πολυμορφισμό μεταξύ των ειδών, το έχει καταστήσει ιδανικό δείκτη για διάκριση διαφορετικών ειδών.

#### 1.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αναπτύχθηκε το 1985 και χρησιμοποιεί τα συστατικά της αντιγραφής του DNA για να «αντιγράψει» ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA στο δοκιμαστικό σωλήνα.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Η πολυμεράση αυτή εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, και γι' αυτό το λόγο αποκαλείται Taq πολυμεράση. Το χαρακτηριστικό της γνώρισμα είναι ότι αντέχει σε θερμοκρασίες έως 95°C. Χρησιμοποιούνται επίσης μικρές μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, οι οποίες χρησιμεύουν ως εκκινητές για την πολυμεράση. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά συνδέονται στην ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (μήτρα), εφόσον είναι συμπληρωματικά με τα δύο αντίθετα άκρα αυτής (η πολυμεράση απαιτεί απόλυτο ταίριασμα των εκκινητών με τη μήτρα, μόνο κοντά στο 3' άκρο του εκκινητή) (Ιμσιρίδου, 2004).

Η μέθοδος βασίζεται στην ενζυματική ενίσχυση μιας ακολουθίας DNA, με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών. Έτσι λοιπόν το μείγμα αντίδρασης περιέχει:

1. τη δίκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (μήτρα ή στόχος)
2. Taq DNA πολυμεράση
3. το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης (buffer)
4. ένα ζεύγος εκκινητών
5. διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση για τη σύνθεση του DNA
6. διάλυμα  $MgCl_2$  που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε ειδικές θερμικές συσκευές. Οι συσκευές αυτές έχουν ειδικές υποδοχές, όπου τοποθετούνται τα σωληνάκια με το μείγμα της αντίδρασης. Στη συνέχεια η συσκευή κλείνει, και με το ειδικό πρόγραμμα ρυθμίζουμε τους χρόνους επώασης και τις αντίστοιχες θερμοκρασίες, για κάθε αντίδραση PCR.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

### **1. Στάδιο αποδιάταξης**

Το δίκλωνο DNA (μήτρα) αποδιατάσσεται με θέρμανση στους  $95^{\circ}C$ . Έτσι προκύπτουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες DNA.

### **2. Στάδιο σύνδεσης των εκκινητών**

Ακολουθεί η σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης ακολουθίας-στόχο. Η θερμοκρασία εξαρτάται κάθε φορά από την ακολουθία των βάσεων των εκκινητών, και κυμαίνεται από  $45^{\circ}C$  -  $55^{\circ}C$ .

### **3. Στάδιο επιμήκυνσης των αλυσίδων DNA**

Το μείγμα θερμαίνεται στους  $72^{\circ}C$  και η πολυμεράση εκτελεί την αντιγραφή του DNA – στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Αυτός ο θερμοκρασιακός κύκλος των τριών σταδίων επαναλαμβάνεται 25-30 φορές, και κάθε φορά διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου. Το τελικό αποτέλεσμα κάθε αντίδρασης PCR είναι η συλλογή 34 δις αντιγράφων DNA σε δύο περίπου ώρες (Ιμσιρίδου, 2004).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου PCR είναι πολλά:



- Είναι πολύ γρήγορη, αφού επιτρέπει την παραγωγή χιλιάδων αντιγράφων DNA σε λίγες μόνο ώρες
- Χρησιμοποιεί ελάχιστες ποσότητες ιστού
- Δε θυσιάζει το ζώο, εφόσον η μέθοδος είναι αποδοτική ακόμα και με ελάχιστες ποσότητες αίματος
- Είναι εξαιρετικά ευέλικτη. Έτσι αν ο ιστός είναι σε άσχημη κατάσταση (με κάποια μακρομόρια κατεστραμμένα), η μέθοδος είναι τόσο επιλεκτική που μπορεί να ενισχύσει μόνο εκείνα τα τμήματα της επιθυμητής ακολουθίας τα οποία έχουν παραμείνει άθικτα (Ιμσιρίδου, 2004).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η διάκριση των δύο ειδών *S. maena* και *S. flexuosa*. Και τα δύο είδη παρουσιάζουν πρωτόγυνο ερμαφροδιτισμό και επίσης το είδος *S. flexuosa* παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Εξαιτίας των παραπάνω έχει δημιουργηθεί μια διχογνωμία για τη συστηματική τους.

Στην επιστημονική κοινότητα γίνεται μεγάλος λόγος για τη συστηματική τους κατάταξη, και για το εάν πρέπει να θεωρούνται σαν δύο διαφορετικά είδη της ίδιας οικογένειας ή σαν ένα είδος. Αρκετοί επιστήμονες αναφέρονται σε αυτά σαν να πρόκειται για ένα είδος για το οποίο υπάρχουν δύο ονόματα. Επίσης η διεθνής βάση δεδομένων Fishbase, περιλαμβάνει μόνο το είδος *S. maena*. Μέχρι στιγμής είναι λίγες οι έρευνες που έχουν γίνει για το διαχωρισμό τους, παρόλα αυτά οι ερευνητές που αναφέρονται στα ψάρια αυτά σαν δύο διαφορετικά είδη είναι πολλοί.

Η συστηματική τους κατάταξη είναι εξαιρετικά δύσκολη γιατί τα είδη αυτά μοιάζουν πάρα πολύ, και είναι πολύ σημαντική και για τους αλιείς και για τους επιστήμονες η διάκριση τους.

Η προσπάθεια μας για τη διάκρισή τους έγινε με τη χρήση δύο γονιδίων, του 5S rRNA και του 16S rRNA. Η ενίσχυση των γονιδίων αυτών έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), και έπειτα ακολούθησε η ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing) από την οποία πήραμε την ακολουθία των DNAs των ενισχυμένων περιοχών.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Συλλογή των ατόμων

Η συλλογή των ατόμων ήταν μια χρονοβόρα διαδικασία, διότι η παρατήρηση των ατόμων κάθε είδους γίνεται σε διαφορετική χρονική περίοδο. Έτσι συντηρήσαμε τα άτομα και τα κομμάτια του μυϊκού ιστού που αφαιρέσαμε, στη κατάψυξη.

Για το σκοπό της εργασίας χρησιμοποιήσαμε 39 άτομα από το είδος *S. flexuosa* και 41 άτομα από το είδος *S. maena*.

Τα άτομα του είδους *S. flexuosa* αλιεύθηκαν στον κόλπο του Θερμαϊκού και μεταφέρθηκαν αυθημερόν στο εργαστήριο στις 30/08/2007. Αντίστοιχα τα άτομα του είδους *S. maena*, αλιεύθηκαν στον κόλπο του Θερμαϊκού και μεταφέρθηκαν αυθημερόν στο εργαστήριο στις 18/10/2007.

Η αλιεία των ψαριών έγινε με γρι-γρι νύχτας σε βάθος 50m και η απόσταση από την ακτή ήταν 150m. Τα δίκτυα στο πάνω μέρος έφεραν πλωτήρες ενώ στο κάτω μέρος βαρίδια, το άνοιγμα ματιού ήταν 16mm. Η προμήθεια όλων των ατόμων έγινε από επαγγελματίες ψαράδες.

#### 3.2. Συστηματική ταξινόμηση των ατόμων

Η συστηματική κατάταξη των ειδών είναι:

Υπερκλάση	<u>Osteichthyes</u> (Οστειχθύες)	<u>Osteichthyes</u> (Οστειχθύες)
Κλάση	<u>Actinopterygii</u> (Ακτινοπτερύγιοι)	<u>Actinopterygii</u> (Ακτινοπτερύγιοι)
Υποκλάση	<u>Actinopterygii</u> (Ακτινοπτερύγιοι)	<u>Actinopterygii</u> (Ακτινοπτερύγιοι)
Τάξη	<u>Perciformes</u> (Περκόμορφα)	<u>Perciformes</u> (Περκόμορφα)
Υποτάξη	<u>Percoidei</u>	<u>Percoidei</u>

Οικογένεια	<u>Centracanthidae</u> (Κεντρακανθίδες)	<u>Centracanthidae</u> (Κεντρακανθίδες)
Γένος	<u>Spicara</u>	<u>Spicara</u>
Είδος	<i>Spicara flexuosa</i>	<i>Spicara maena</i>

### 3.3. Λήψη ιστού

Η λήψη του δείγματος έγινε με τεμαχισμό ορθογώνιου τμήματος μυϊκού ιστού, από την ραχιαία περιοχή. Ο ιστός ήταν απαλλαγμένος από οστά, αίμα, δέρμα και λέπια. Σε περίπτωση που δεν ήταν καθαρός, υπήρχε η πιθανότητα να επηρεαστούν τα επόμενα στάδια.

Τα εργαλεία που χρησιμοποιήσαμε ήταν λαβίδα και νυστέρι. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στο σχολαστικό καθαρισμό τους, έπειτα από τη λήψη του ιστού από κάθε άτομο. Πρώτα καθαρίζαμε τη λαβίδα και το νυστέρι με νερό της βρύσης, στη συνέχεια τα σκουπίζαμε καλά με απορροφητικό χαρτί και στο τέλος ξεπλέναμε με καθαρό οινόπνευμα. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγουμε τη μόλυνση των επόμενων δειγμάτων, από το μυϊκό ιστό των προηγούμενων ατόμων. Αμέσως, τα δείγματα τοποθετούνταν σε σωληνάκια τύπου errendorf τα οποία αριθμούνταν και στη συνέχεια τοποθετούνταν στην κατάψυξη.

### 3. 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 2X: Για τη παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 10 ml 1M Tris –HCl, pH = 8
  2. 35 ml 4M NaCl
  3. 4ml 0,5M EDTA
  4. 2gr CTAB
  5. δις-απεσταγμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 100 ml.

Στη συνέχεια αναδεύουμε με θέρμανση μέχρι η σκόνη να διαλυθεί πλήρως. Στο τέλος προσθέτουμε 100 μl μερκαπτοαιθανόλης.

- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K 10mg/ml: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 10mg πρωτεΐνάσης
  2. 1ml δις-απεσταγμένο νερό
  3. Στο τέλος αναδεύσαμε το διάλυμα για την ομογενοποίησή του.
- Διάλυμα SAVAGE (εξισορροπημένη φαινόλη – χλωροφόρμιο – ισοαμυλική αλκοόλη): Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 25ml διαλύματος εξισορροπημένης φαινόλης
  2. 25ml διαλύματος χλωροφορμίου.
- Διάλυμα αλκοόλης 70%: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 70ml απόλυτη αλκοόλη
  2. 30ml δις-απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα TE (10mM Tris-HCl pH = 7,4, 1mM EDTA pH = 8): Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 5ml διαλύματος 2M Tris-HCl pH = 7,4
  2. 2ml διαλύματος 0,5M EDTA pH = 8
  3. Τέλος, αναδεύουμε καλά ώστε να ομογενοποιηθεί και συμπληρώνουμε με δις-απεσταγμένο νερό ώστε ο όγκος του διαλύματος να φτάσει τα 1000 ml.

### 3.5. Εξαγωγή DNA

Από την αρχική ποσότητα μυϊκού ιστού που πήραμε, μεταφέρουμε μικρή ποσότητα σε νέα σωληνάκια. Στη συνέχεια τοποθετούμε σε κάθε ένα από αυτά 500 μl διαλύματος CTAB 2X, για να μπορέσουμε να επιφέρουμε την καταστροφή των λιπιδίων της πλασματικής και πυρηνικής μεμβράνης ώστε να απελευθερωθούν τα οργανίδια του κυττάρου, να καταστραφεί η πυρηνική μεμβράνη και να απελευθερωθεί το DNA. Έπειτα, σε κάθε σωλήνα προσθέτουμε 5 μl διαλύματος 10 mg/ml πρωτεΐνάσης K, η οποία καταστρέφει

σχεδόν όλες τις πρωτεΐνες των κυττάρων αλλά και τις ιστόνες του DNA. Αμέσως μετά, προθερμαίνουμε τον επωαστικό κλίβανο στους 55°C για να γίνει η επώαση των δειγμάτων, για 2 με 2½ ώρες τουλάχιστον. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα δείγματα ανακινούνται καλά κάθε μισή ώρα περίπου, ώστε να διαλυθεί πλήρως ο ιστός.

Μετά το τέλος της επώασης προσθέτουμε 500 μl 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 για 1 λεπτό, έπειτα περιστροφή των σωλήνων για 5 λεπτά και τέλος φυγοκέντρηση των σωλήνων στις 12.000 στροφές και στους 5°C για 3 λεπτά. Μετά, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέους σωλήνες errendorf και προσθέτουμε 500 μl διαλύματος χλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανάδευση των σωλήνων για ένα λεπτό, περιστροφή των σωλήνων για 5 λεπτά και φυγοκέντρησή τους στις 12.000 στροφές και στους 5°C για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάκια errendorf και προσθέτουμε 1 ml παγωμένης απόλυτης αιθανόλης για να αφυδατώσουμε το DNA. Στο σημείο αυτό είναι ορατό το DNA σε μορφή νήματος.

Σε περίπτωση που σε ορισμένα δείγματα δεν παρατηρήσουμε το DNA σε μορφή νήματος, τα φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές και στους 5°C, ώστε να γίνει ορατό το DNA εφόσον υπάρχει και να αποφύγουμε τυχόν απώλειές του κατά την αφαίρεση της απόλυτης αλκοόλης. Έπειτα αφαιρούμε προσεκτικά την απόλυτη αλκοόλη προσέχοντας να μην μας φύγει το DNA και προσθέτουμε 1ml διαλύματος αλκοόλης 70%, η οποία βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, αναδεύουμε τα δείγματα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές και στους 5°C, για να κολλήσει το DNA στα τοιχώματα των σωλήνων. Αμέσως μετά απομακρύνουμε όλη την αλκοόλη και σκουπίζουμε καλά τους σωλήνες για την ολική απομάκρυνση της αλκοόλης, χωρίς όμως να ακουμπήσουμε το DNA. Τέλος προσθέτουμε 100 μl διαλύματος TE, επιτυγχάνοντας τη διάλυση του DNA. Η συντήρηση των διαλυμάτων DNA γίνεται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C.

### 3.6. 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 5XTBE: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 54 gr Tris
  2. 27,5 gr Boric acid
  3. 20 ml διαλύματος 0,5 M EDTA, pH=8
  4. Αναδεύουμε καλά και συμπληρώνουμε με δις-απεσταγμένο νερό μέχρι να έχουμε τελικό όγκο διαλύματος 1000 ml
- Διάλυμα 1XTBE: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 200ml διαλύματος 5XTBE
  2. 800 ml δις-απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα 1% βρωμιούχου εθιδίου: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 1gr βρωμιούχου εθιδίου
  2. 100ml δις – απεσταγμένο νερό
  3. Στην συνέχεια αναδεύουμε για αρκετή ώρα μέχρι η σκόνη να διαλυθεί πλήρως. Το σκεύασμα μπαίνει σε σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο.

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
  1. 200ml διαλύματος 5XTBE
  2. 800ml δις-απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα 1% κυανού της βρωμοφαινόλης: Για την παρασκευή του διαλύματος χρειαστήκαμε
  1. 1gr κυανού της βρωμοφαινόλης
  2. 100ml δις- απεσταγμένο νερό

Το σκεύασμα αναδεύεται καλά και τοποθετείται σε σκουρόχρωμη φιάλη

### 3.7. Έλεγχος DNA σε πηκτή αγαρόζης

#### 3.7.1. Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης 1,5%

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης, αρχικά αναμιγνύουμε σε ειδική κωνική φιάλη 1,8 gr αγαρόζης υπό μορφή σκόνης με 120ml διαλύματος 1XTBE (πηκτή 1,5%). Στη συνέχεια, το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείο βρασμού. Έπειτα για να κρυώσουμε το διάλυμα, τοποθετούμε την κωνική φιάλη κάτω από συνεχή ροή νερού βρύσης και αναδεύουμε κυκλικά. Αμέσως μετά προσθέτουμε 6 μl διαλύματος 1% βρωμιούχου εθιδίου και αναδεύουμε. Μετά αδειάζουμε το διάλυμα της κωνικής φιάλης στο ειδικό πλαίσιο της πηκτής αγαρόζης, και απομακρύνουμε όλες τις φυσαλίδες που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί με την βοήθεια των tips. Στις ειδικές εγκοπές του πλαισίου τοποθετούμε δύο "χτένες" σε διαφορετικές θέσεις, οι οποίες δημιουργούν "πηγαδάκια". Για τη πήξη της αγαρόζης χρειάζονται περίπου 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού πήξει η αγαρόζη, αφαιρούνται οι χτένες προσεκτικά από τη πηκτή. Με αυτόν τον τρόπο έχουν σχηματιστεί τα πηγαδάκια μέσα στην πηκτή. Με ένα νυστέρι κόβουμε την πηκτή στην μέση και έχουμε έτσι δύο κομμάτια αγαρόζης. Το ένα κομμάτι το τυλίγουμε προσεκτικά με αλουμινόχαρτο και το διατηρούμε στο ψυγείο για την επόμενη χρήση του. Η "διάρκεια ζωής" της πηκτής αγαρόζης είναι μία εβδομάδα. Εάν περάσει η εβδομάδα και δεν έχουμε χρησιμοποιήσει το κομμάτι της αγαρόζης το πετάμε.

#### 3.7.2. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Τοποθετούμε την πηκτή αγαρόζης μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει διάλυμα 1XTBE τόσο ώστε να καλύπτονται τα πηγαδάκια της πηκτής με αυτό. Για κάθε δείγμα, αναμιγνύουμε πάνω σε ειδική επιφάνεια parafilm 5μl διαλύματος DNA με 3μl 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 στο τροφοδοτικό μηχάνημα και εφαρμόζουμε ηλεκτρικό πεδίο (130 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 45 λεπτά.

### 3.7.3. Έλεγχος της πηκτής αγαρόζης

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης 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 ηλεκτροφόρησης.

### 3.8. Ενίσχυση με τη μέθοδο PCR

Για τη διαδικασία της PCR στο γονίδιο 5S rDNA, 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).

Τα βήματα για την προετοιμασία των δειγμάτων για την PCR είναι:

1. Υπολογίζουμε πρώτα τις τελικές ποσότητες των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιήσουμε στην αντίδραση PCR
2. Παίρνουμε τα δείγματα από το ψυγείο και βάζουμε σε μικρά erpendorfs, από 1 μl DNA από το αρχικό διάλυμα κάθε ατόμου.
3. Τα υλικά που χρησιμοποιούμε ανά άτομο είναι:
  - 1μl από το διάλυμα του DNA
  - 5μl ρυθμιστικού διαλύματος Taq DNA πολυμεράσης

- 0,5μl διαλύματος 100mM MgSO<sub>4</sub>
- 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

Για να υπολογίσουμε την συνολική ποσότητα που θα χρησιμοποιήσουμε από κάθε υλικό, πολλαπλασιάζουμε την ποσότητα του κάθε υλικού (εκτός του DNA) με τον αριθμό των δειγμάτων +1 (n+1), γιατί κατά το μοίρασμα στα erpendorfs μπορεί να έχουμε απώλειες.

4. Το πρόγραμμα ενίσχυσης για την περιοχή του 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.

Τέλος, ακολουθεί μια συμπληρωματική επιμήκυνση, για επτά λεπτά στους 72°C.

Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου 5S rDNA γίνεται σε συσκευή Erpendorf. 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. Η διαδικασία αυτή για το γονίδιο 5S rDNA έγινε δύο φορές για το κάθε άτομο, ώστε στο τέλος να έχουμε 50 μl από το προϊόν PCR από το καθένα.

5. Για τη διαδικασία της PCR στο γονίδιο 16S rDNA, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές:

5'- CCGGTCTGAACTCAATCACG-3'

5'- CGCCTGTTTAACAAAAACAT.-3'

Τα βήματα για την προετοιμασία των δειγμάτων για την PCR είναι:

6. Υπολογίζουμε πρώτα τις τελικές ποσότητες των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιήσουμε στην αντίδραση PCR

7. Παίρνουμε τα δείγματα από το ψυγείο και βάζουμε σε μικρά erpendorfs από 1 μl DNA από το αρχικό διάλυμα κάθε ατόμου

8. Τα υλικά που χρησιμοποιούμε ανά άτομο είναι:

- 1μl από το διάλυμα του DNA
- 0, 2μl ρυθμιστικού διαλύματος Taq DNA πολυμεράσης
- 0,6 μl διαλύματος 100mM MgSO<sub>4</sub>
- 0,6 μl διαλύματος 10mM dNTPs
- 0,25 μl διαλύματος 100 pmoles/μl από τον εκκινητή 1
- 0,25 μl διαλύματος 100 pmoles/μl από τον εκκινητή 2
- 0,2 μl διαλύματος 5 units/μl Taq DNA πολυμεράσης
- 19,6 μl δις-απεσταγμένο νερό

Για να υπολογίσουμε την συνολική ποσότητα που θα χρησιμοποιήσουμε πολλαπλασιάζουμε την ποσότητα του κάθε υλικού (εκτός του DNA) με τον αριθμό των δειγμάτων +1 (n+1), γιατί κατά το μοίρασμα στα erpendorfs μπορεί να έχουμε απώλειες.

9. Το πρόγραμμα ενίσχυσης για την περιοχή του γονιδίου 16S rDNA που επιθυμώ να ενισχύσω έχει ως εξής:

- Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, για 3 λεπτά στους 94°C
- 50 δευτερόλεπτα στους 94°C (αποδιάταξη του δίκλωνου DNA)
- 50 δευτερόλεπτα στους 50°C (σύνδεση των εκκινητών στο DNA-στόχο)
- 50 δευτερόλεπτα στους 72°C (δράση της πολυμεράσης και επιμήκυνση των αλυσίδων DNA)

Ο θερμοκρασιακός αυτός κύκλος (αποδιάταξη - σύνδεση εκκινητών - επιμήκυνση) επαναλαμβάνεται 30 φορές.

Τέλος, ακολουθεί μια συμπληρωματική επιμήκυνση, για πέντε λεπτά στους 72°C.

Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου 16S 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 16S rDNA με το παραπάνω πρόγραμμα διαρκεί περίπου δύο ώρες. Μετά το τέλος της διαδικασίας οι σωλήνες τοποθετούνται στο ψυγείο.

### 3.9. Έλεγχος των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης

#### 3.9.1. Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης

Η διαδικασία είναι αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 3.7.1.

#### 3.9.2. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Η διαδικασία είναι αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 3.7.2. Η διαφορά είναι ότι αναμιγνύουμε πάνω σε ειδική επιφάνεια parafilm 4μl διαλύματος DNA με 1μl διαλύματος φόρτωσης (1% κυανού της βρωμοφαινόλης). 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 θέσεών τους στη πηκτή με τα θραύσματα γνωστού μήκους του μάρτυρα. Σε ένα πηγαδάκι της πηκτής λοιπόν, τοποθετούμε 5μl διαλύματος 100 bp DNA ladder συγκέντρωσης 0,5 μg/μl, το οποίο περιέχει και το διάλυμα φόρτωσης.

#### 3.9.3. Έλεγχος των προϊόντων PCR

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR γίνονται ορατά με τη χρήση της συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Εάν η αντίδραση PCR είναι επιτυχής, τα προϊόντα της θα εμφανίζονται σαν φωτεινές ζώνες διαφορετικού μεγέθους επάνω στην πηκτή αγαρόζης. Εάν η αντίδραση PCR

δεν είναι επιτυχής τότε δεν θα εμφανίζεται τίποτα στην πηκτή αγαρόζης, παρά μόνο οι ζώνες του μάρτυρα.

### 3.10. Φωτογράφιση της πηκτής και ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδέεται με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και έτσι οι πηκτές αγαρόζης 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.

### 3.11. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Το προϊόν PCR που προέκυψε από την ενίσχυση του γονιδίου 5S rDNA, εμφάνιζε στην πηκτή αγαρόζης κάποια παραπροϊόντα. Για το λόγο αυτό ήταν απαραίτητος ο καθαρισμός του πριν από την διαδικασία της ανάλυσης πρωτοδιάταξης. Ο καθαρισμός έγινε με τη βοήθεια ειδικού kit. Για το γονίδιο 16 rDNA δεν ήταν απαραίτητη αυτή η διαδικασία γιατί το προϊόν ήταν πολύ καθαρό, χωρίς επιπλέον ζώνες.

Η διαδικασία του καθαρισμού είχε ως εξής:

1. Ενώνω τα πηγαδάκια της χτένας ανά δύο. Η χτένα για το μάρτυρα παραμένει μονή
2. Παρασκευάζω πηκτή 1,5% από low melting agarose και τη βάζω στο ψυγείο για να πήξει
3. Αφού πήξει, φορτώνω 40 μl δείγματος και 5 μl loading buffer. Το φόρτωμα γίνεται στο ψυγείο.
4. Η πηκτή τρέχει για δύο ώρες στο ψυγείο σε τάση 100 volts
5. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης:
  - α) προσθέτω 42 ml αιθανόλης στο διάλυμα wash buffer
  - β) τοποθετώ ένα spin filter σε receiver tube των 2 ml
  - γ) κόβω κομματάκια αλουμινοχάρτου (τόσα όσα και τα άτομα που έχω) και τα ονομάζω
  - δ) ονομάζω και τους σωλήνες erpendorfs που θα χρησιμοποιήσω

6. Αφού τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, φορά ειδική μάσκα, παίρνω την πηκτή και πάνω στη συσκευή της υπεριώδους ακτινοβολίας προσεκτικά κόβω το κάθε κομμάτι αγαρόζης στο σημείο της απαιτούμενης ζώνης, με καινούργιο νυστέρι κάθε φορά. Βάζω την κάθε ζώνη στο αντίστοιχο αλουμινόχαρτο και τη ζυγίζω. Συνήθως πρέπει να είναι κάτω από 150 mg.
7. Την κάθε ζώνη την βάζω μέσα σ' ένα σωλήνα erpendorf που έχω ονομάσει. Προσθέτω σε κάθε σωλήνα 500 μl διαλύματος gel solubilizer S.
8. Επωάζω για 10 λεπτά στους 50°C στον κλίβανο, με συνεχή ανάδευση έτσι ώστε να λιώσει η αγαρόζη
9. Στη συνέχεια προσθέτω σε κάθε σωλήνα 250 μl διαλύματος Binding Enhancer. Ανακατεύω καλά το μείγμα με πιπετάρισμα.
10. Παίρνω 800 μl από το μείγμα και το βάζω μέσα σε κίτρινο σωληνάκι που έχει το spin filter. Κάνω φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 λεπτό. Βγάζω το spin filter και πετάω το υγρό από το σωληνάκι.
11. Ξαναβάζω το spin filter μέσα στο κίτρινο σωλήνα και προσθέτω 500 μl διαλύματος Wash buffer μέσα στο spin filter. Στη συνέχεια, φυγοκεντρώ στις 12.000 στροφές για μισό λεπτό.
12. Βγάζω το spin filter και πετάω το υγρό. Κλείνω το σωλήνα αφού πρώτα ξαναβάλω το spin filter και φυγοκεντρώ στις 12.000-14.000 στροφές για 4 λεπτά.
13. Βγάζω το spin filter και πετάω τον κίτρινο σωλήνα με το υγρό. Μεταφέρω το spin filter σε νέο receiver tuber των 1,5 ml. Έπειτα, προσθέτω 25 μl διαλύματος elution buffer στο κέντρο του spin filter. Κάνω επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρώ για 1 λεπτό στις 12.000 στροφές.
14. Βγάζω το spin filter και κρατάω το υγρό που έχει μείνει στο σωλήνα.
15. Στο τέλος έχω τόσα σωληνάκια όσα και τα άτομα. Με μια απλή ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης ελέγχουμε τι κάναμε.

Για την παρασκευή της low melting agarose χρησιμοποιούμε:

- 1,8 gr low melting αγαρόζη
- 120 ml 1XTBE

Η παρασκευή της low melting αγαρόζης γίνεται όπως και της κανονικής αγαρόζης.

### 3.12. Ανάλυση πρωτοδιάταξης (SEQUENCING)

Έχουν αναπτυχθεί δύο μέθοδοι προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA:

1. Η χημική μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA η οποία αναπτύχθηκε από τους Maxam and Gilbert.

2. Η διδεοξυ-μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας ή μέθοδος του Sanger. Ο Frederick Sanger στο Πανεπιστήμιο του Cambridge καθιέρωσε μία μέθοδο σύνθεσης του DNA (δηλαδή αντιγραφή σε δοκιμαστικό σωλήνα), η οποία βασίζεται στο τερματισμό νεοσυντιθέμενων αλυσίδων DNA σε συγκεκριμένες θέσεις.

Σήμερα η μέθοδος του Sanger είναι η πιο δημοφιλής και αυτή θα χρησιμοποιήσουμε.

### 3.13. Αποστολή των προϊόντων για ανάλυση πρωτοδιάταξης

Όλοι οι σωλήνες με τα καθαρισμένα προϊόντα PCR (5S rDNA) αλλά και αυτοί με τα ενισχυμένα προϊόντα του 16S rDNA γονιδίου, συγκεντρώθηκαν και αφού συσκευάστηκαν κατάλληλα στάλθηκαν για ανάλυση πρωτοδιάταξης. Τα αποτελέσματα μας δόθηκαν σε μία εβδομάδα περίπου.

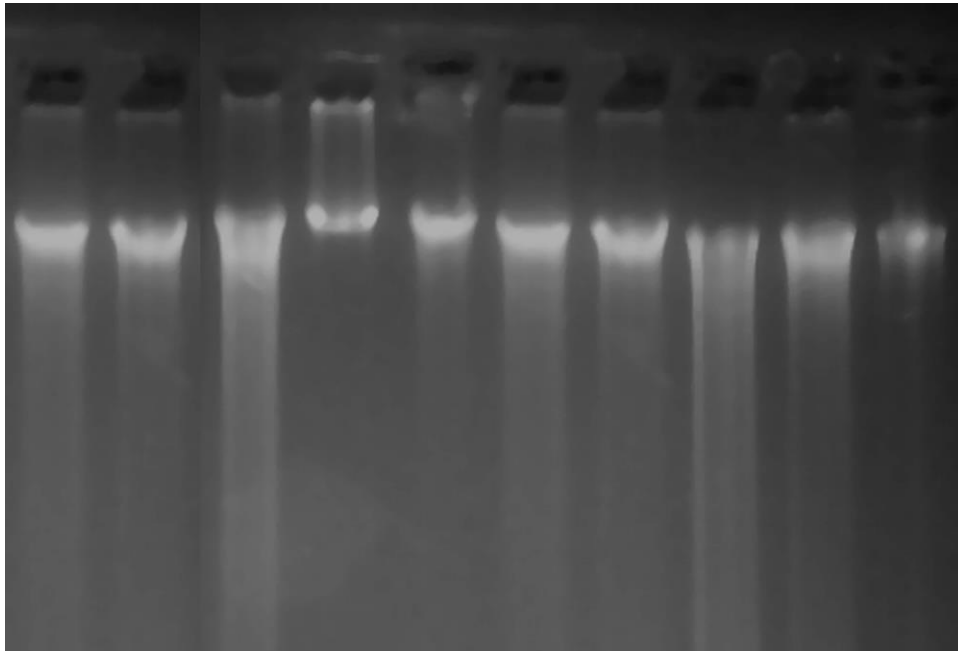
### 3.14. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες από τα δύο είδη αναλύθηκαν με τη χρήση των πακέτων Clustal X (Thompson *et al.* 1997) και BioEdit (Hall 1999) έτσι ώστε να βρεθούν οι νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των ακολουθιών.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Εξαγωγή DNA

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

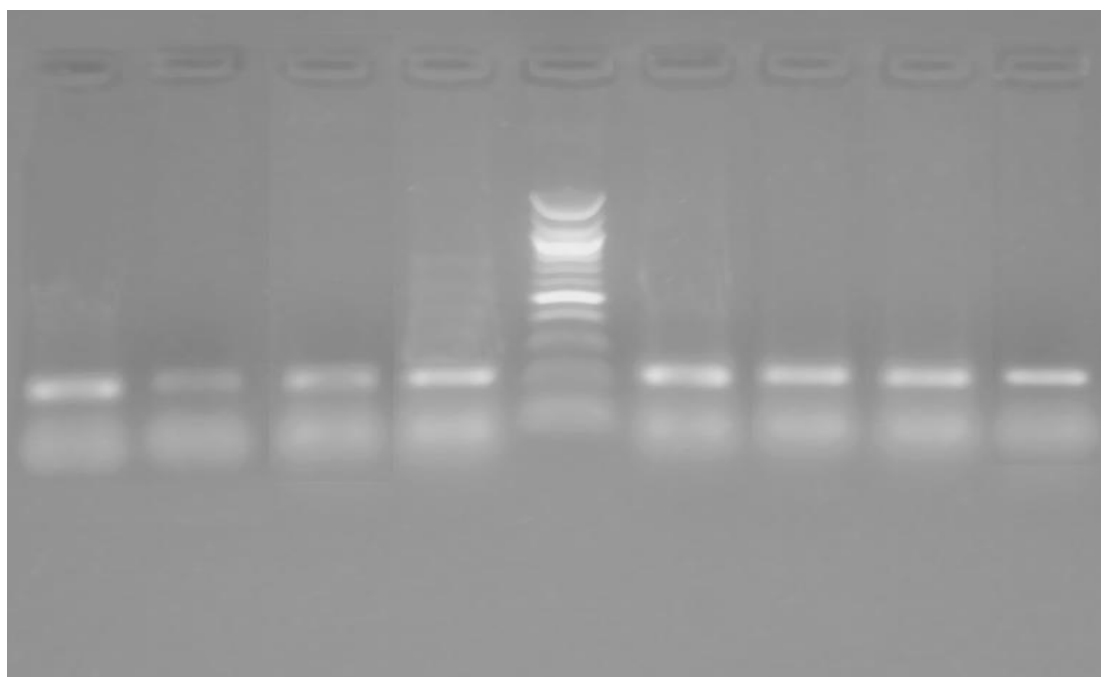


**Εικόνα 4:** Οι ζώνες DNA των δύο ειδών *S. flexuosa* και *S. maena* σε πηκτική αγαρόζη, όπως φωτογραφήθηκαν στη τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Η εμφάνιση των ζωνών αυτών αποδεικνύει την επιτυχία της εξαγωγής του DNA.



#### 4.2. Προϊόντα PCR του είδους *S. maena* για το γονίδιο 5S rRNA

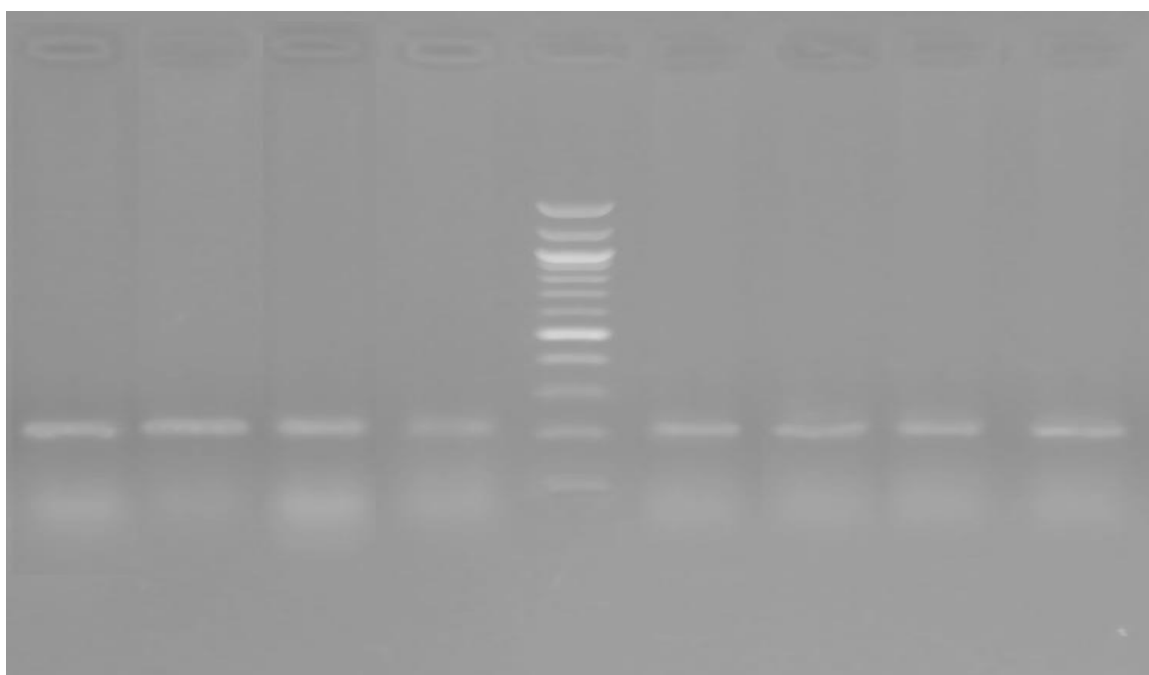
Στη συνέχεια παρουσιάζεται η φωτογραφία των προϊόντων PCR για το γονίδιο 5S rRNA, στο είδος *S. maena*. Το αποτύπωμα που αφήνουν οι ενισχυμένες περιοχές πάνω στην πηκτική αγαρόζη, είναι μια φωτεινή ζώνη. Από τη σύγκριση των ζωνών αυτών με το αποτύπωμα του μάρτυρα των 100 ζευγών βάσεων, αντιλαμβανόμαστε ότι η ζώνη αντιστοιχεί περίπου στα 200 ζεύγη βάσεων.



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

#### 4.3. Προϊόντα PCR του είδους *S. flexuosa* για το γονίδιο 5S rRNA

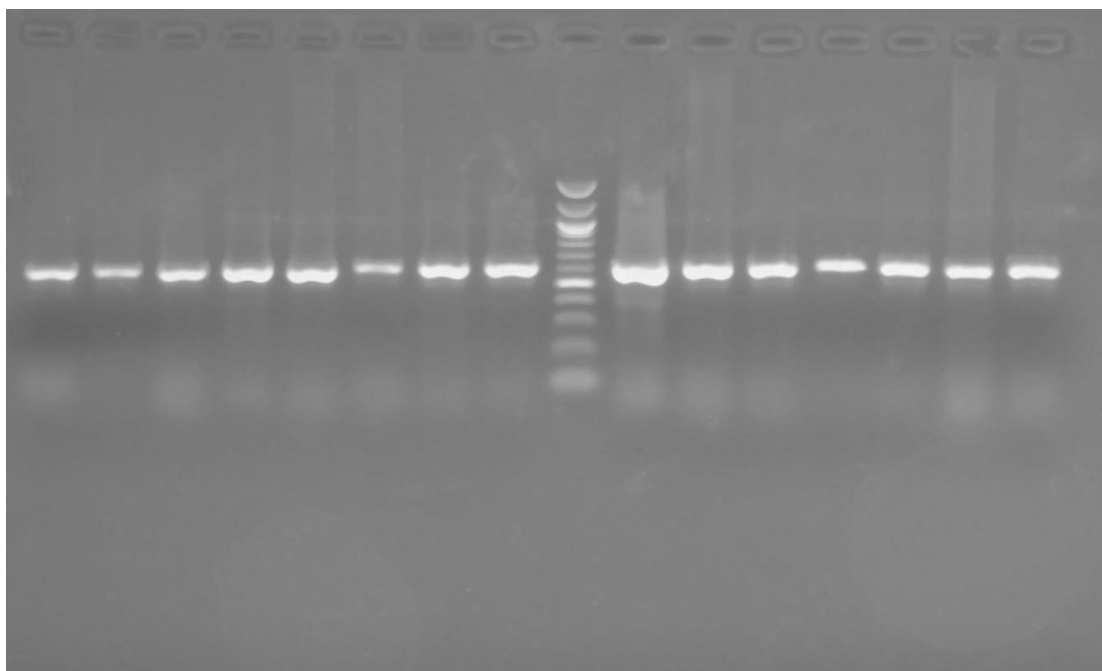
Παρομοίως και εδώ παρουσιάζεται η φωτογραφία των προϊόντων PCR για το γονίδιο 5S rRNA, στο είδος *S. flexuosa*. Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με αυτά του είδους *S. maena*. Το αποτύπωμα που αφήνουν οι ενισχυμένες περιοχές πάνω στην πηκτική αγαρόζη, είναι μια φωτεινή ζώνη. Από τη σύγκριση των ζωνών αυτών με το αποτύπωμα του μάρτυρα των 100 ζευγών βάσεων, αντιλαμβανόμαστε ότι η ζώνη αντιστοιχεί περίπου στα 200 ζεύγη βάσεων.



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

#### 4.4. Προϊόντα PCR του είδους *S. maena* για το γονίδιο 16S rRNA

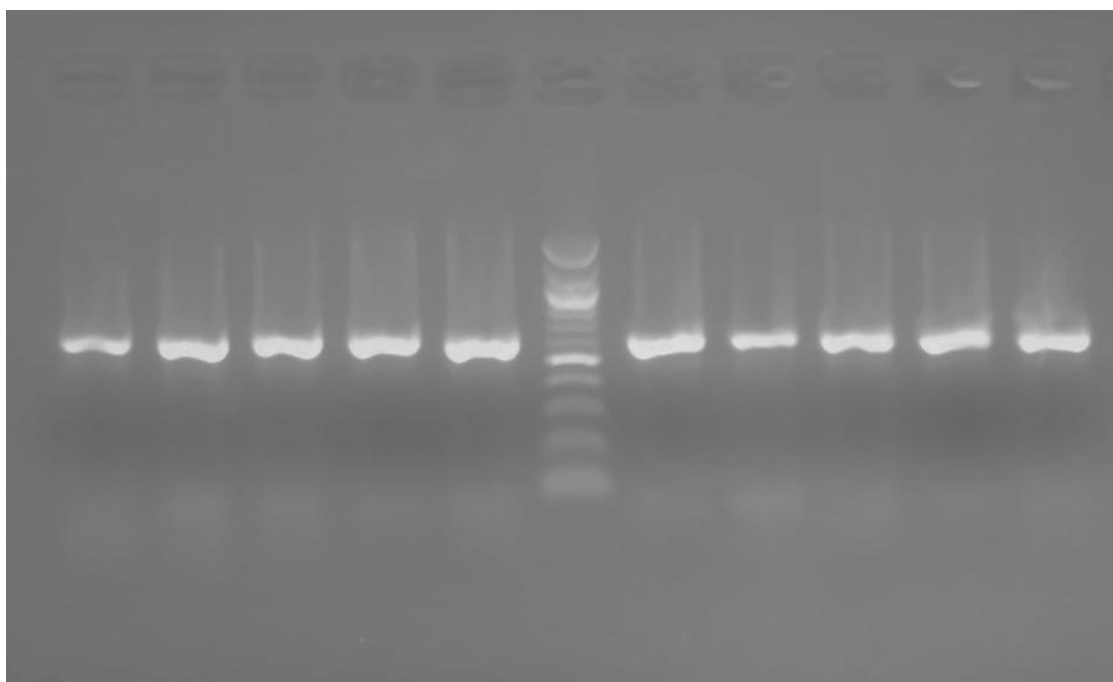
Στη συνέχεια παρουσιάζεται η φωτογραφία των προϊόντων PCR για το γονίδιο 16S rRNA, στο είδος *S. maena*. Το αποτύπωμα που αφήνουν οι ενισχυμένες περιοχές πάνω στην πηκτική αγαρόζη, είναι μια φωτεινή ζώνη. Από τη σύγκριση των ζωνών αυτών με το αποτύπωμα του μάρτυρα των 100 ζευγών βάσεων, αντιλαμβανόμαστε ότι η ζώνη αντιστοιχεί περίπου στα 600 ζεύγη βάσεων.



**Εικόνα 7:** Έλεγχος σε πηκτική αγαρόζη των προϊόντων PCR του 16S rDNA γονιδίου, για το είδος *S. maena*. Ως μάρτυρας για τον υπολογισμό του ενισχυμένου τμήματος, χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός μάρτυρας 100 bp – DNA ladder.

#### 4.5. Προϊόντα PCR του είδους *S. flexuosa* για το γονίδιο 16S rRNA

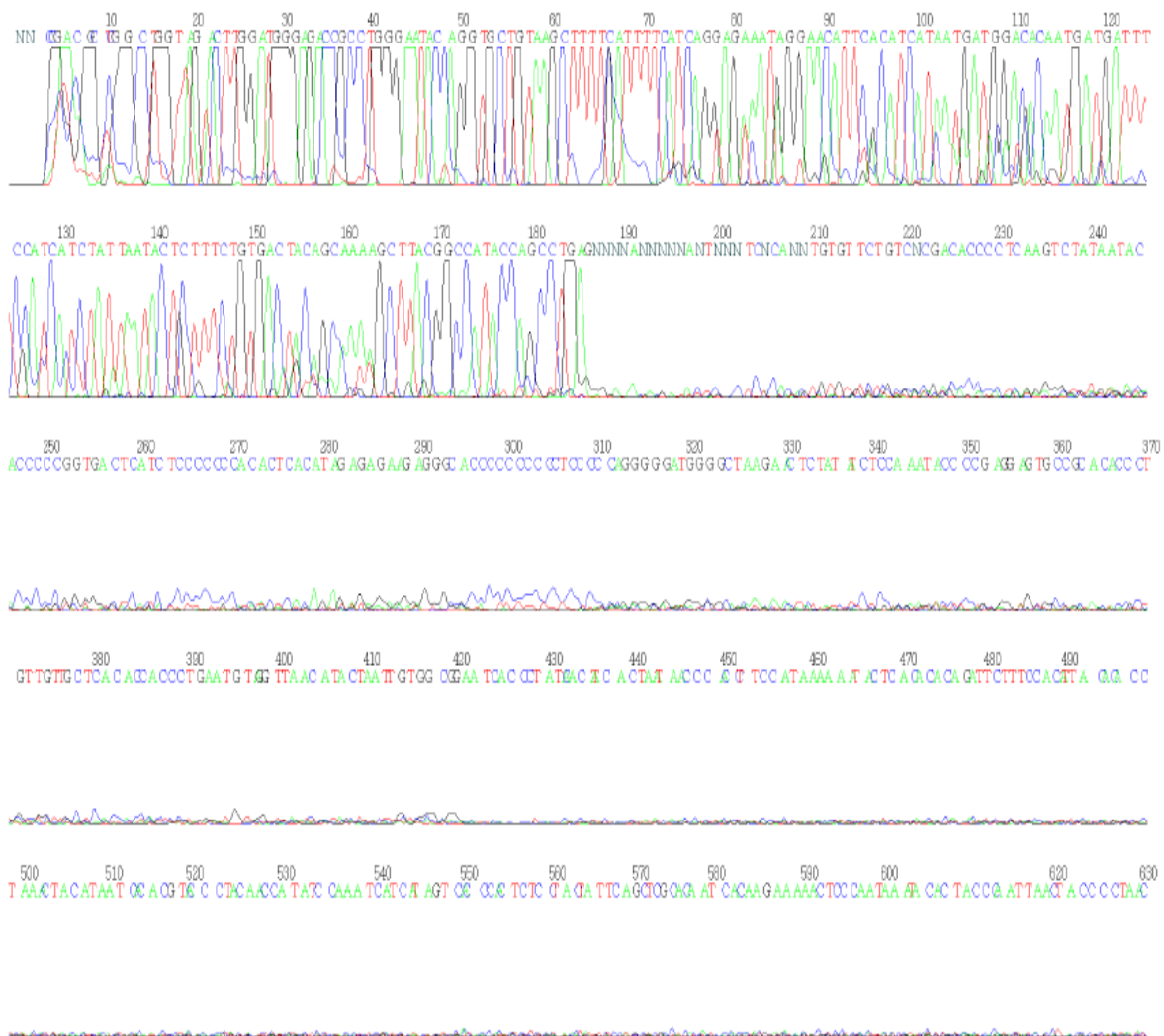
Εδώ παρουσιάζεται η φωτογραφία των προϊόντων PCR για το γονίδιο 16S rRNA, στο είδος *S. flexuosa*. Το αποτύπωμα που αφήνουν οι ενισχυμένες περιοχές πάνω στην πηκτή αγαρόζη είναι φωτεινές ζώνες, σχεδόν ίδιες με αυτές του είδους *S. maena*. Από τη σύγκριση των ζωνών αυτών με το αποτύπωμα του μάρτυρα των 100 ζευγών βάσεων, αντιλαμβανόμαστε ότι η ζώνη αντιστοιχεί περίπου στα 600 ζεύγη βάσεων.



**Εικόνα 8:** Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζη των προϊόντων PCR του 16S rDNA γονιδίου, για το είδος *S. flexuosa*. Ως μάρτυρας για τον υπολογισμό του ενισχυμένου τμήματος, χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός μάρτυρας 100 bp – DNA ladder.

#### 4.6. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 14 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 14. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 9:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 14, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

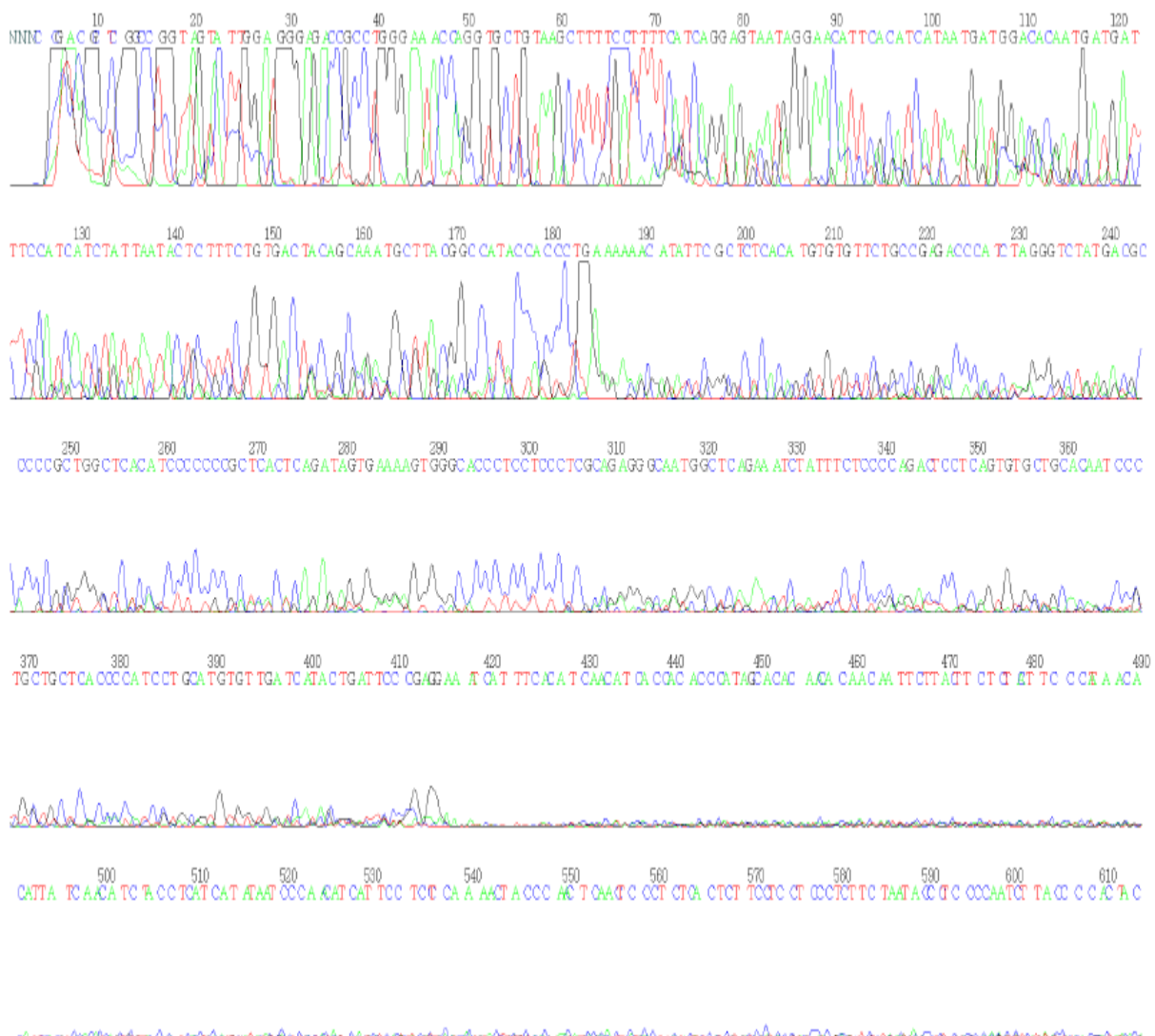
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 14, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 14**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTCGCATCATAATGATGGACA  
CAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAA  
GCTTACGGCCATACCAGCCTG

#### 4.7. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 15 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 15. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 10:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 15, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 15, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

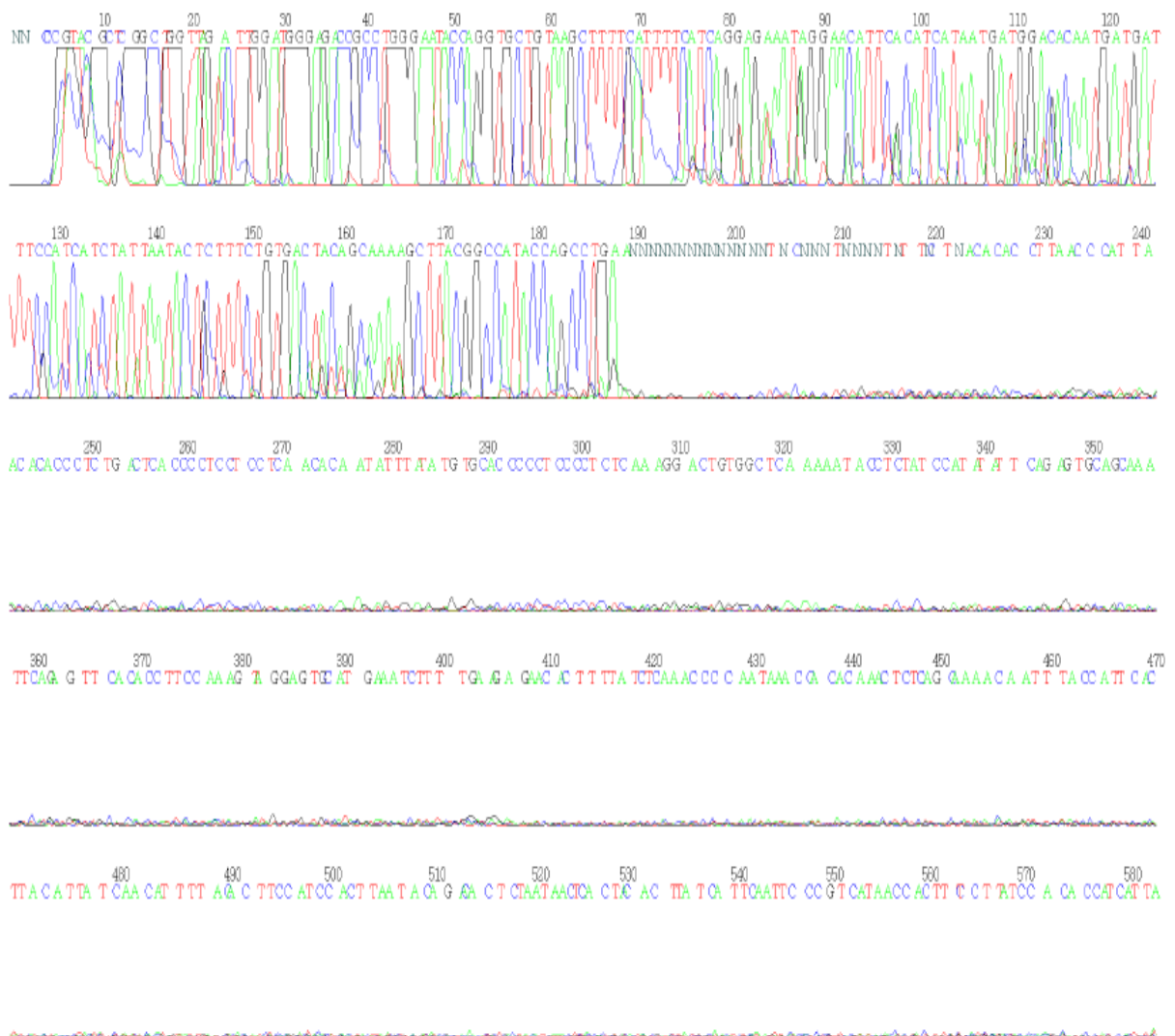
**Spicara flexuosa 15**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTCGCATCATAATGATGGACA  
CAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAA  
GCTTACGGCCATACCACCCTG



#### 4.8. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 16 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 16. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 11:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 16, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

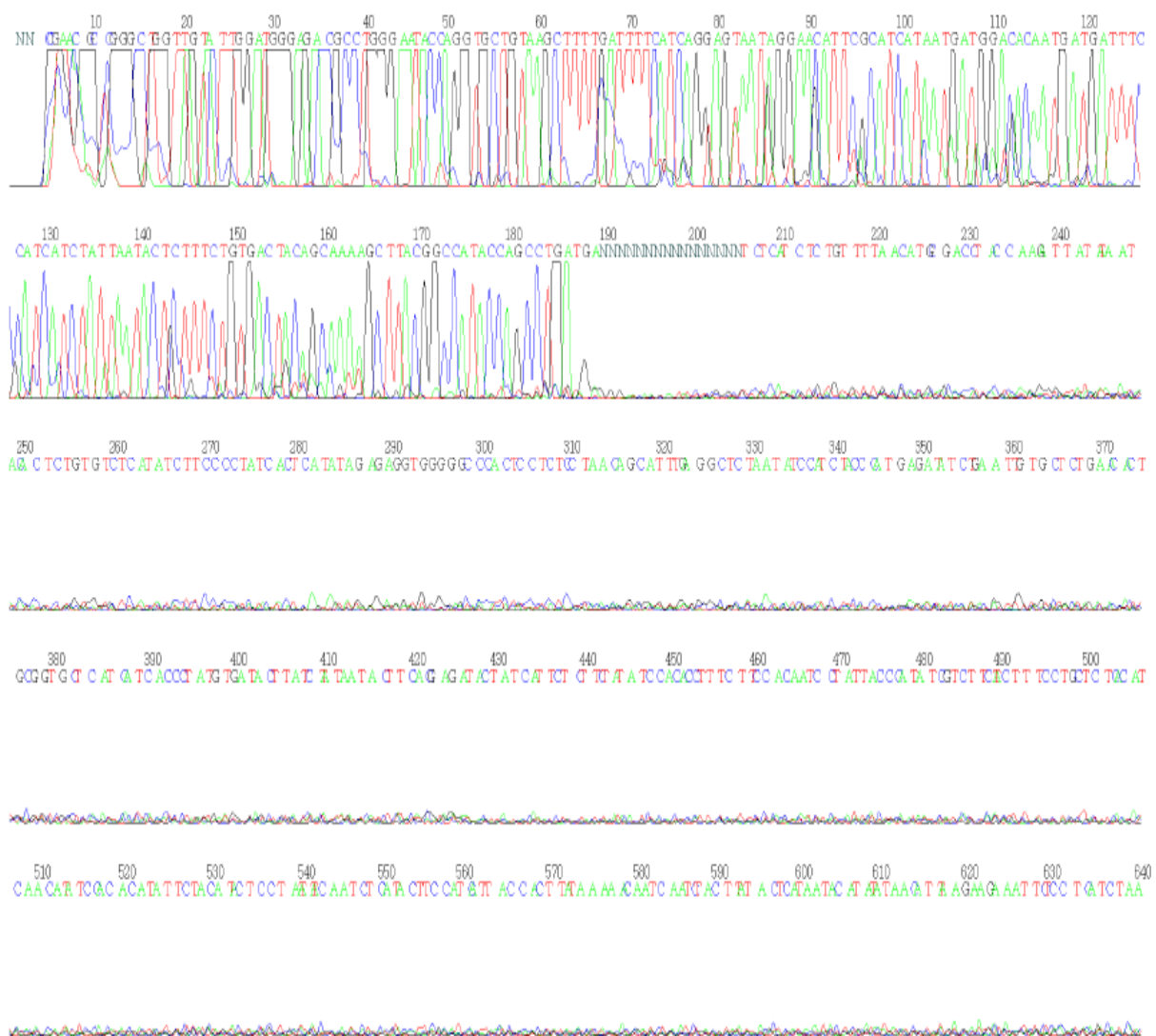
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 16, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 16**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTCGCATCATAATGATGGACA  
CAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAA  
GCTTACGGCCATACCAGCCTG

#### 4.9. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 17 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 17. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 12:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 17, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

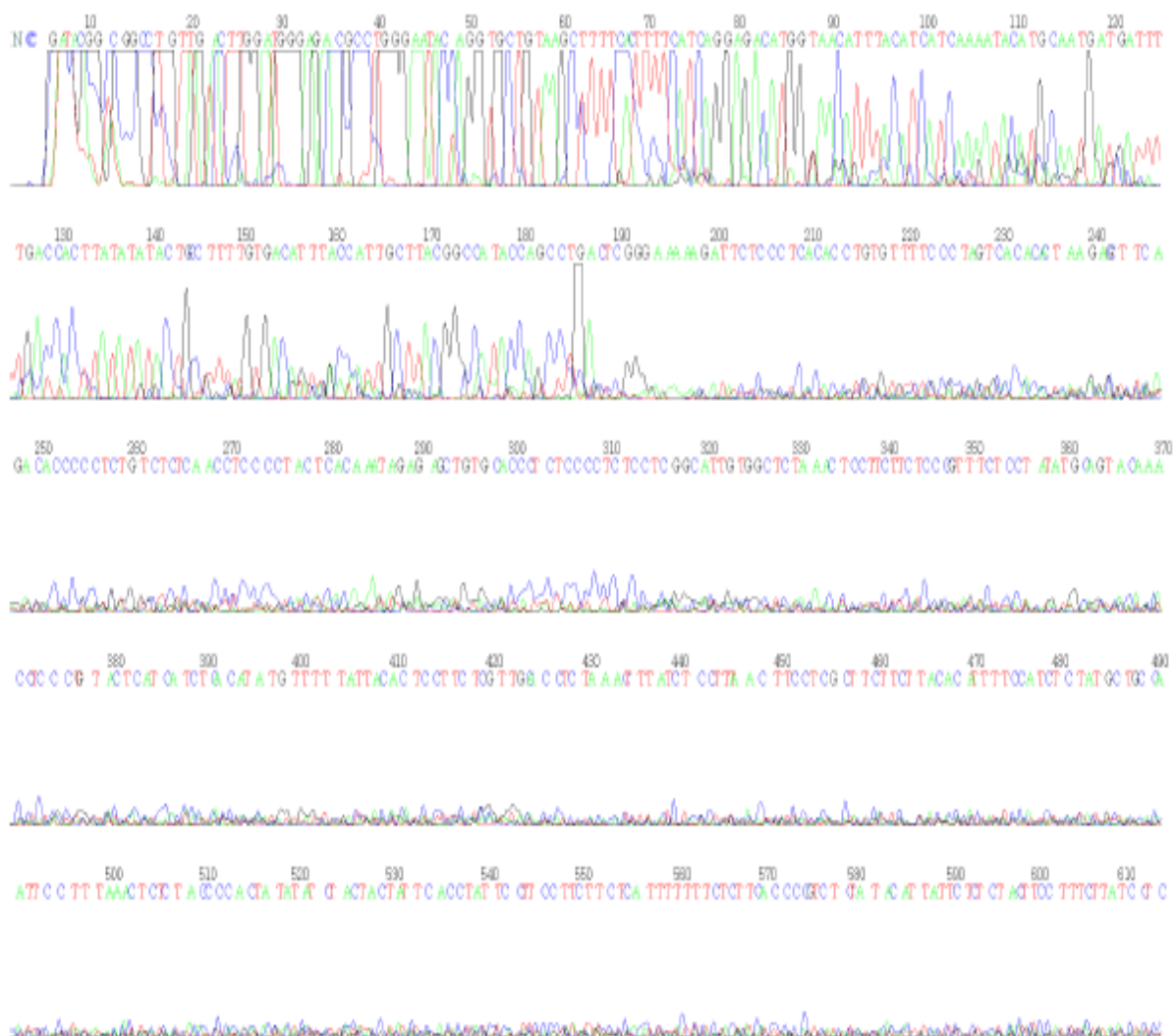
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 17, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 17**

GTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTCGCATCATAATGATGGACA  
CAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAA  
GCTTACGGCCATACCAGCCTG

#### 4.10. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 18 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 18. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 13:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 18, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

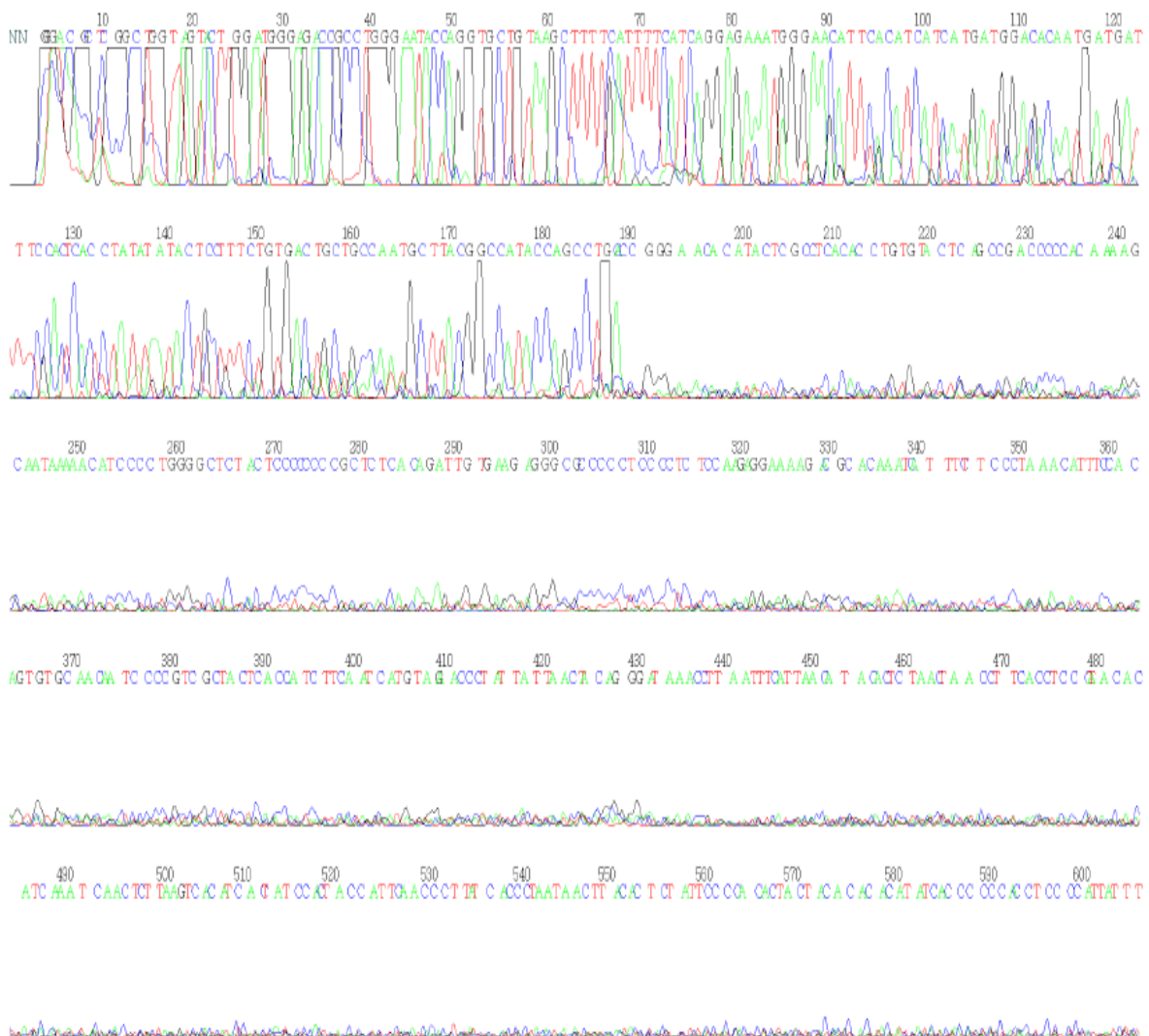
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 18, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 18**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTCATTTTCATCAGGAGACATGGGAACATTTACATCATCAAATACATGC  
AATGATGATTTTGACCACTTATTAATACTGTTTTAGTGACAGTAGCCAAAG  
CTTACGGGCATACCAGCCTG

#### 4.11. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 19 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 19. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 14:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 19, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 19, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

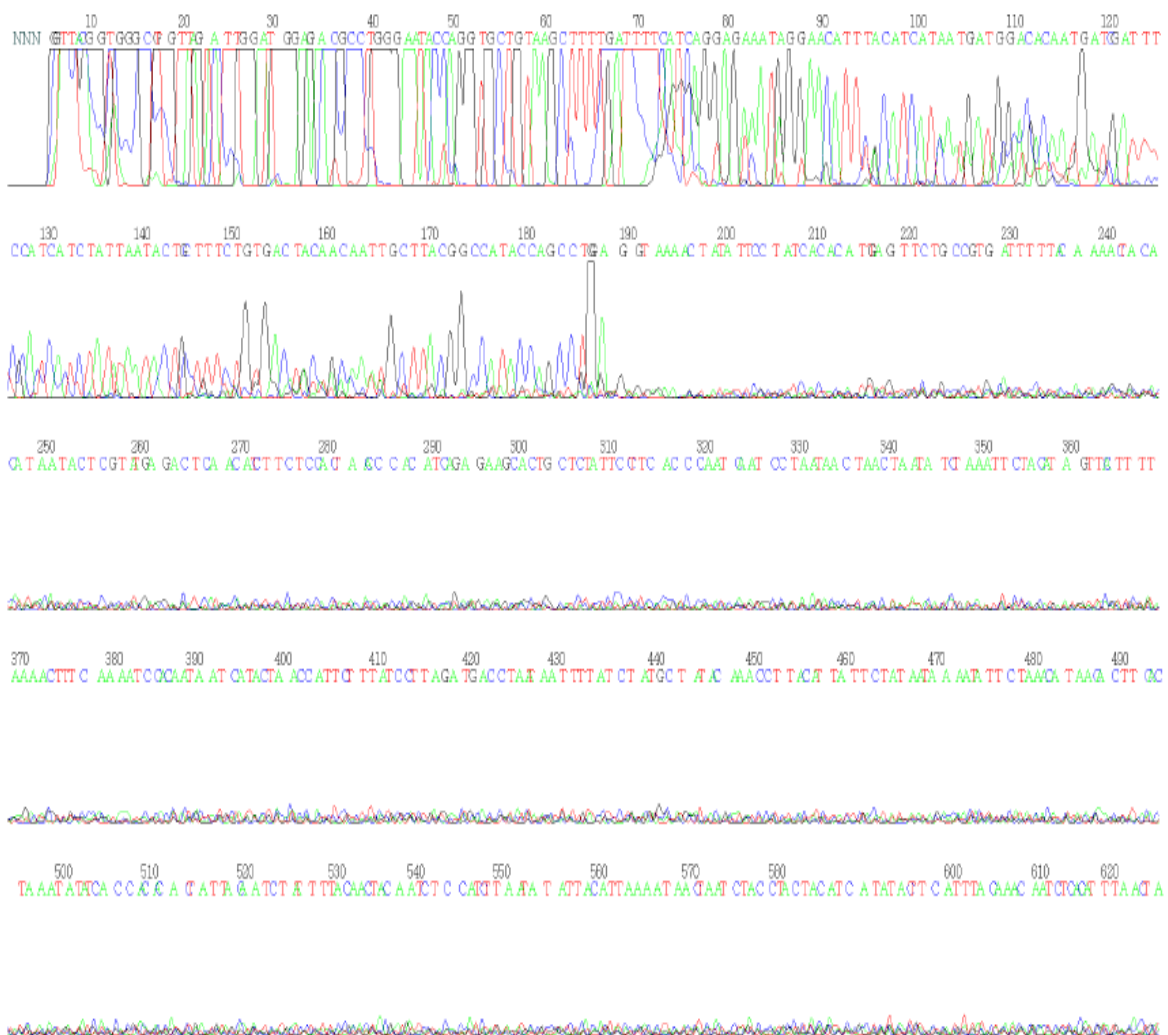
**Spicara flexuosa 19**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTCACATCATAATGATGGAGA  
CAATGATGATTTCCACCATCTATTAATACTGTTTCTGTGACTGCTGCAAAA  
GCTTACGGCCATACCAGCCTG



#### 4.12. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 24 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 24. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 15:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 24, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

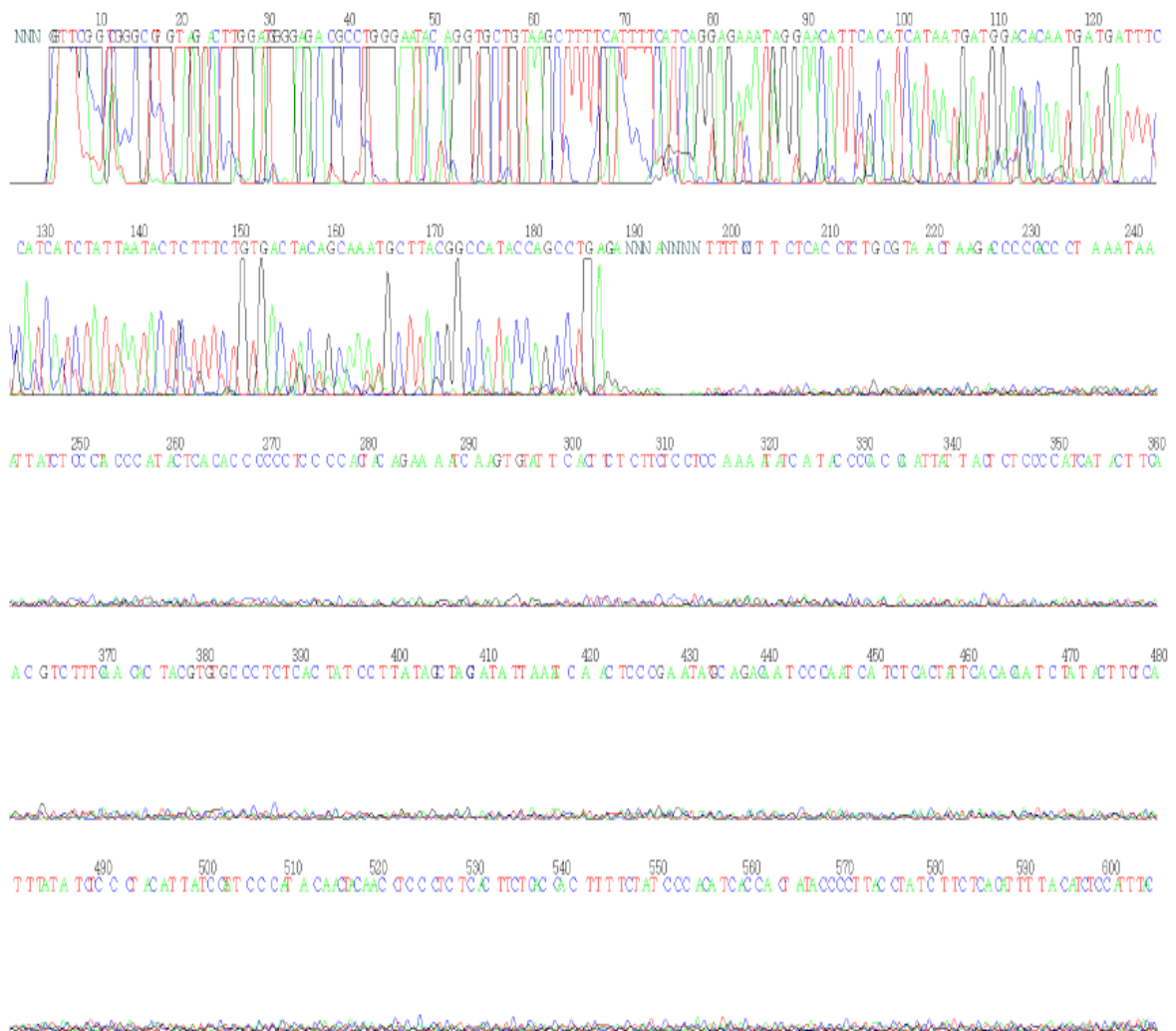
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 24, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 24**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTCGCATCATAATGATGGACA  
CAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTGTTTCTGTGACTACAGCAAAT  
GCTTACGGCCATACCAGCCTG

#### 4.13. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 25 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 25. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 16:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 25, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

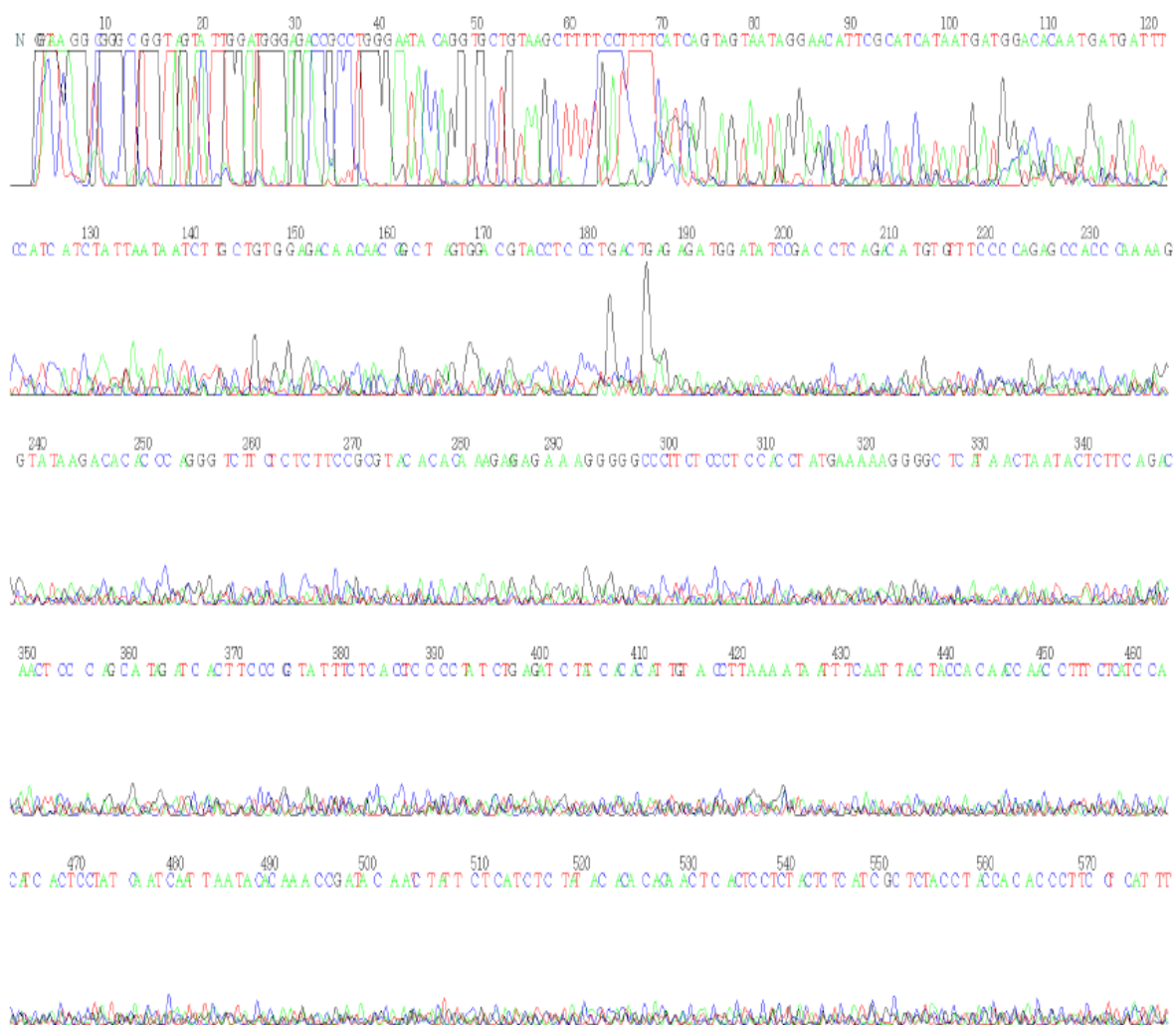
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 25, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 25**

GGTAGTACTTGGAGGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGC  
TTTTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTCGCATCATAATGATGGAC  
ACAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAA  
AGCTTACGGCCATACCAGCCTG

#### 4.14. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 31 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 31. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 17:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 31, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

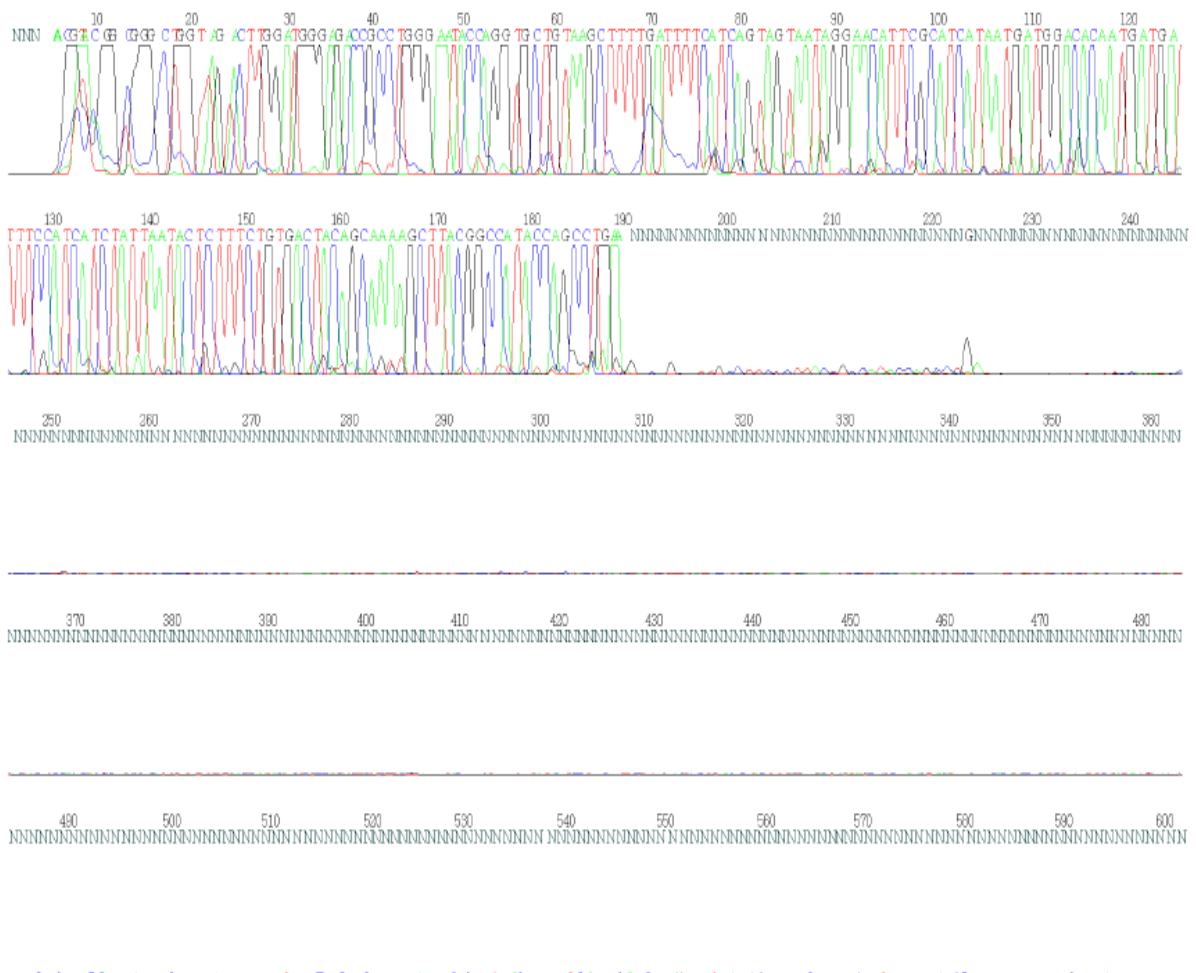
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 31, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 31**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTCCTTTTCATCAGTAGTAATAGGAACATTCGCATCATAATGATGGACAC  
AATGATGATTTCTATCCTCTATTAATACTCTTCCTGTGACTACAGCAAGAG  
CGAGTGGCCATACCTCTCCC

#### 4.15. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 32 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 32. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 18:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 32, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 32, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

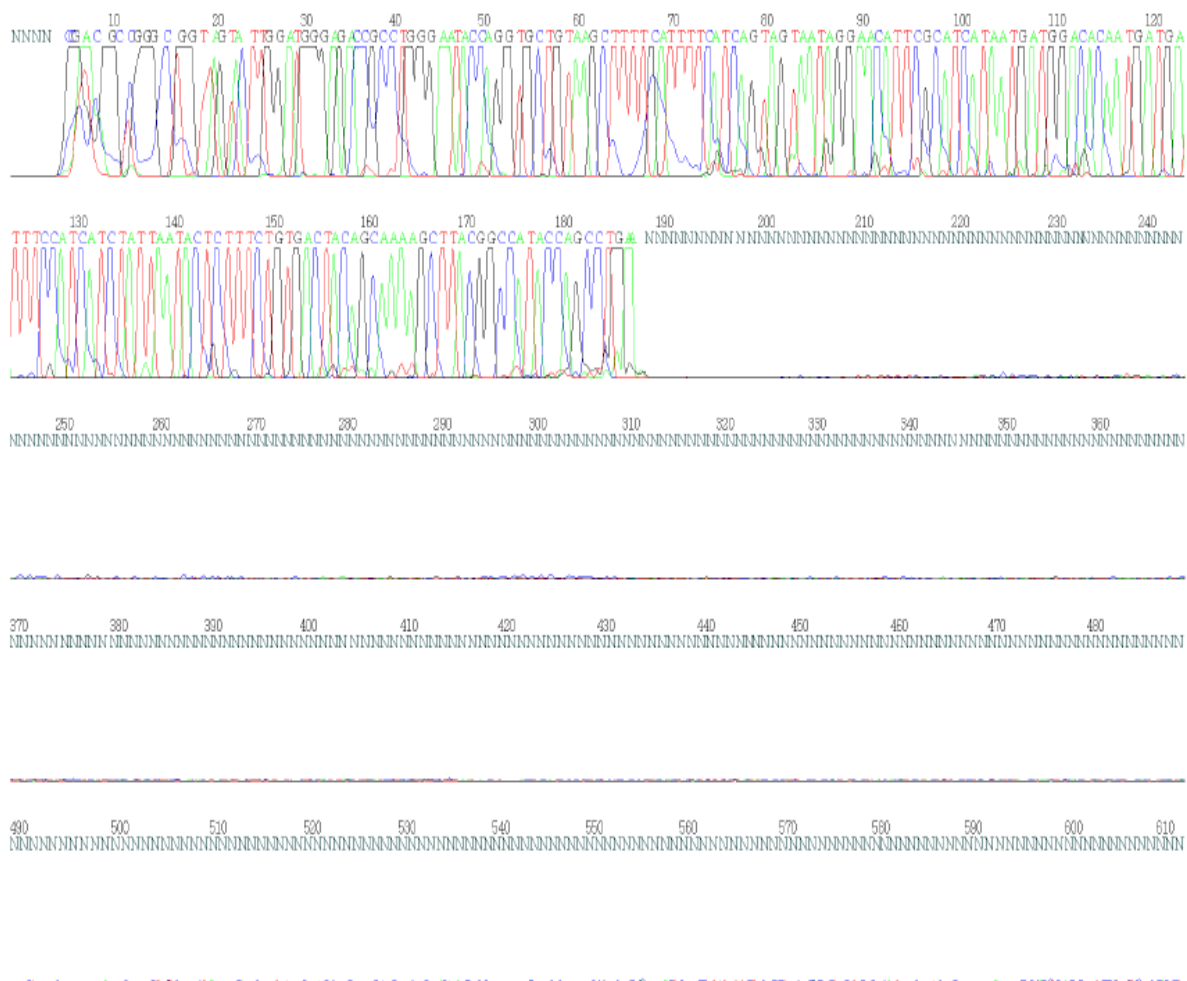
**Spicara flexuosa 32**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGTAGTAATAGGAACATTCGCATCATAATGATGGACAC  
AATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAG  
CTTACGGCCATACCAGCCTG



#### 4.16. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 33 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 33. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 19:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 33, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 33, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 33**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGTAGTAATAGGAACATTCGCATCATAATGATGGACAC  
AATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAG  
CTTACGGCCATACCAGCCTG



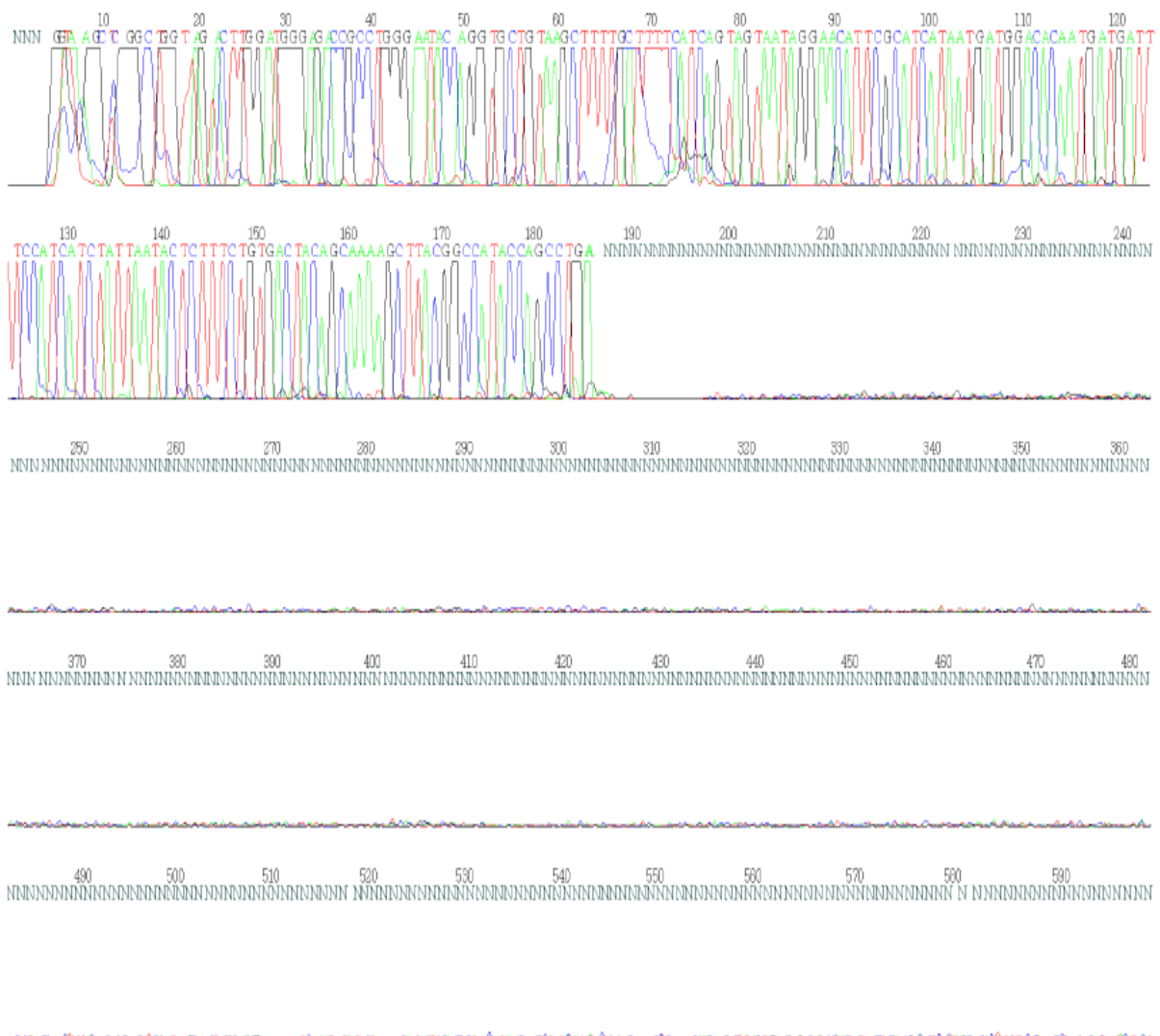
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 34, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 34**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGTAGTAATAGGAACATTCGCATCATAATGATGGACAC  
AATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAG  
CTTACGGCCATACCAGCCTG

#### 4.18. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 35 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 35. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 21:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 35, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

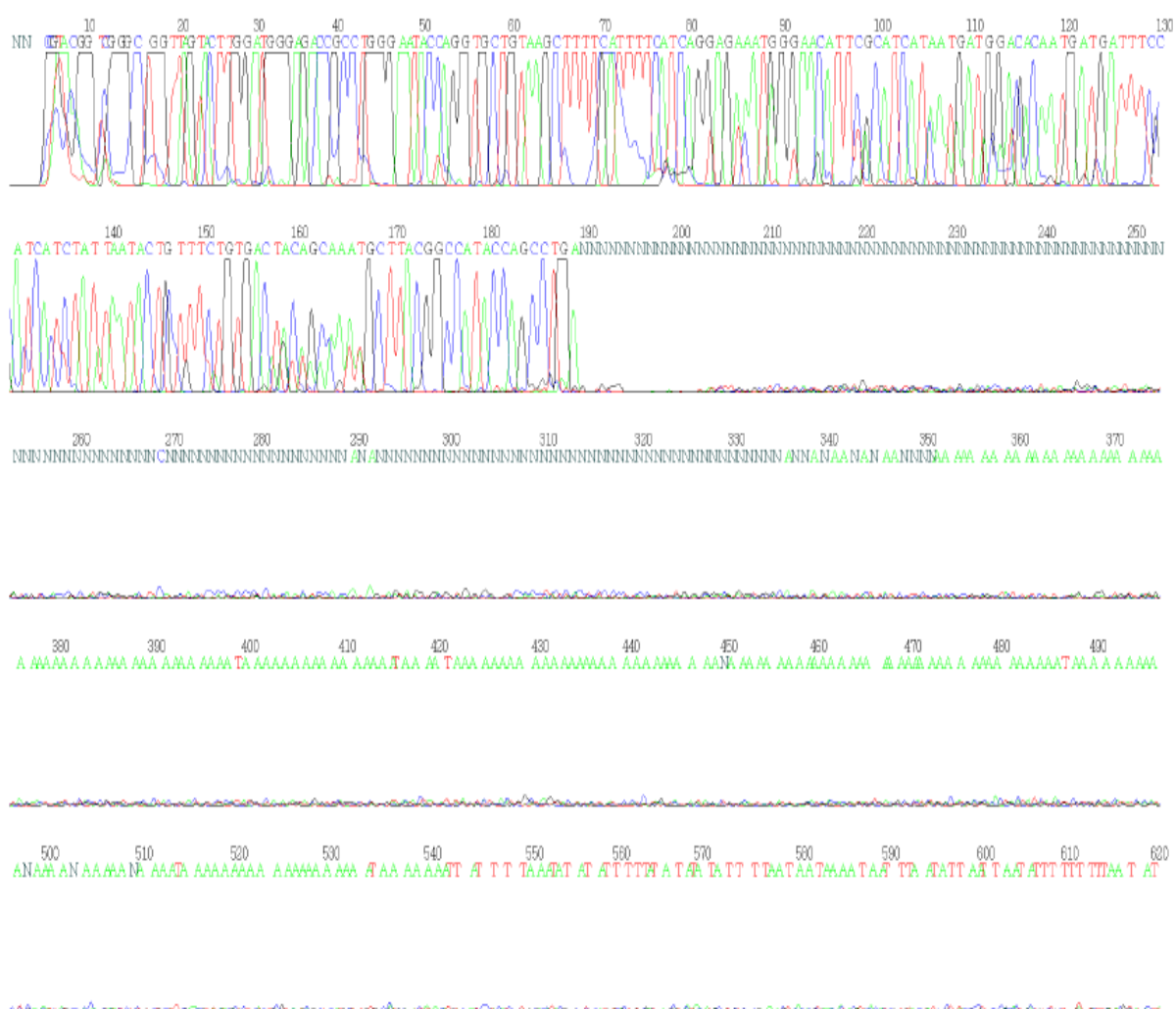
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 35, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 35**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGTAGTAATAGGAACATTCGCATCATAATGATGGACAC  
AATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAG  
CTTACGGCCATACCAGCCTG

#### 4.19. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 36 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 36. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν να διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 22:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 36, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 36, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 36**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTCGCATCATAATGATGGACA  
CAATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAA  
GCTTACGGCCATACCAGCCTG





Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 37, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 37**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGTAGTAATAGGAACATTCGCATCATAATGATGGACAC  
AATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAG  
CTTACGGCCATACCAGCCTG



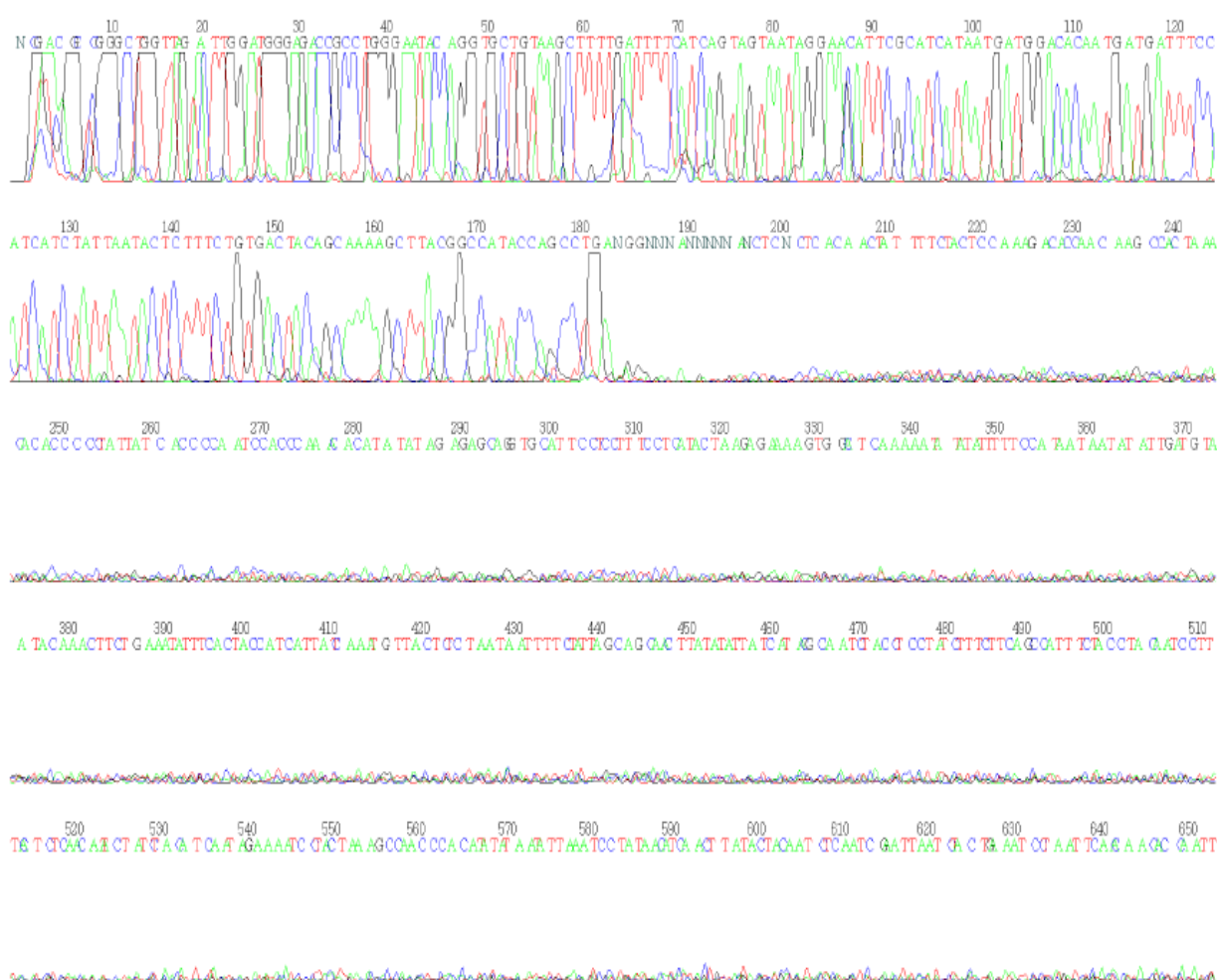
Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 38, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 38**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGTAGTAATAGGAACATTCGCATCATAATGATGGACAC  
AATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAAG  
CTTACGGCCATACCAGCCTG

#### 4.22. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 39 μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί το χρωματογράφημα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο Sf 39. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε ήταν 171 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 25:** Το χρωματογράφημα με την ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 39, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για το άτομο *S. flexuosa* 39, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara flexuosa 39**

GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCT  
TTTGATTTTCATCAGTAGTAATAGGAACATTCGCATCATAATGATGGACAC  
AATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAG  
CTTACGGCCATACCAGCCTG

4.23. Ακολουθίες βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για όλα τα άτομα που μελετήθηκαν

Παρακάτω φαίνονται οι ακολουθίες βάσεων του γονιδίου 5S rDNA για όλα τα άτομα που μελετήθηκαν, καθώς και οι νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των ατόμων. Οι τελείες δηλώνουν όμοιες βάσεις.

50

*Spicara flexuosa* 14 GGTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTT  
*Spicara flexuosa* 15 .....  
*Spicara flexuosa* 16 .....  
*Spicara flexuosa* 17 . T .....  
*Spicara flexuosa* 18 .....  
*Spicara flexuosa* 19 .....  
*Spicara flexuosa* 24 .....  
*Spicara flexuosa* 25 ..... G .....  
*Spicara flexuosa* 31 .....  
*Spicara flexuosa* 32 .....  
*Spicara flexuosa* 33 .....  
*Spicara flexuosa* 34 .....  
*Spicara flexuosa* 35 .....  
*Spicara flexuosa* 36 .....  
*Spicara flexuosa* 37 .....  
*Spicara flexuosa* 38 .....  
*Spicara flexuosa* 39 .....

100

*Spicara flexuosa* 14 TTGATTTTCATCAGGAGAAATGGGAACATTGCGATCATAATGATGGACAC  
*Spicara flexuosa* 15 .....  
*Spicara flexuosa* 16 .....  
*Spicara flexuosa* 17 .....  
*Spicara flexuosa* 18 ..C .. .C. .... TA .....C.AA .AC .TG .  
*Spicara flexuosa* 19 ..... A .....G ..  
*Spicara flexuosa* 24 .....  
*Spicara flexuosa* 25 .....  
*Spicara flexuosa* 31 .. CC..... T . T . A .....  
*Spicara flexuosa* 32 ..... T . T . A .....  
*Spicara flexuosa* 33 ..... T . T . A .....  
*Spicara flexuosa* 34 ..... T . T . A .....  
*Spicara flexuosa* 35 ..... T . T . A .....

Spicara flexuosa 36 .....  
 Spicara flexuosa 37 ..... T . T . . A . .....  
 Spicara flexuosa 38 ..... T . T . . A . .....  
 Spicara flexuosa 39 ..... T . T . . A . .....

150

Spicara flexuosa 14 AATGATGATTTCCATCATCTATTAATACTCTTTCTGTGACTACAGCAAAA  
 Spicara flexuosa 15 .....  
 Spicara flexuosa 16 .....  
 Spicara flexuosa 17 .....  
 Spicara flexuosa 18 ..... TG . C . . CT ..... G . . TA . . . . AGT . . C . .  
 Spicara flexuosa 19 ..... C . . . . . G . . . . . G . T . . . . .  
 Spicara flexuosa 24 ..... G . . . . . T  
 Spicara flexuosa 25 .....  
 Spicara flexuosa 31 ..... T . . C . . . . . C . . . . . G .  
 Spicara flexuosa 32 .....  
 Spicara flexuosa 33 .....  
 Spicara flexuosa 34 .....  
 Spicara flexuosa 35 .....  
 Spicara flexuosa 36 .....  
 Spicara flexuosa 37 .....  
 Spicara flexuosa 38 .....  
 Spicara flexuosa 39 .....

171

Spicara flexuosa 14 GCTTACGGCCATACCAGCCTG  
 Spicara flexuosa 15 ..... C . . . . .  
 Spicara flexuosa 16 .....  
 Spicara flexuosa 17 .....  
 Spicara flexuosa 18 ..... G . . . . .  
 Spicara flexuosa 19 .....  
 Spicara flexuosa 24 .....  
 Spicara flexuosa 25 .....  
 Spicara flexuosa 31 ..... GAGT . . . . . TCT . C .  
 Spicara flexuosa 32 .....  
 Spicara flexuosa 33 .....  
 Spicara flexuosa 34 .....  
 Spicara flexuosa 35 .....  
 Spicara flexuosa 36 .....  
 Spicara flexuosa 37 .....  
 Spicara flexuosa 38 .....  
 Spicara flexuosa 39 .....



Παρόλο που πρόκειται για το ίδιο είδος, βλέπουμε ότι οι ακολουθίες διαφοροποιούνται ανά άτομο.



Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 16S rDNA για τα άτομα *S. flexuosa*, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

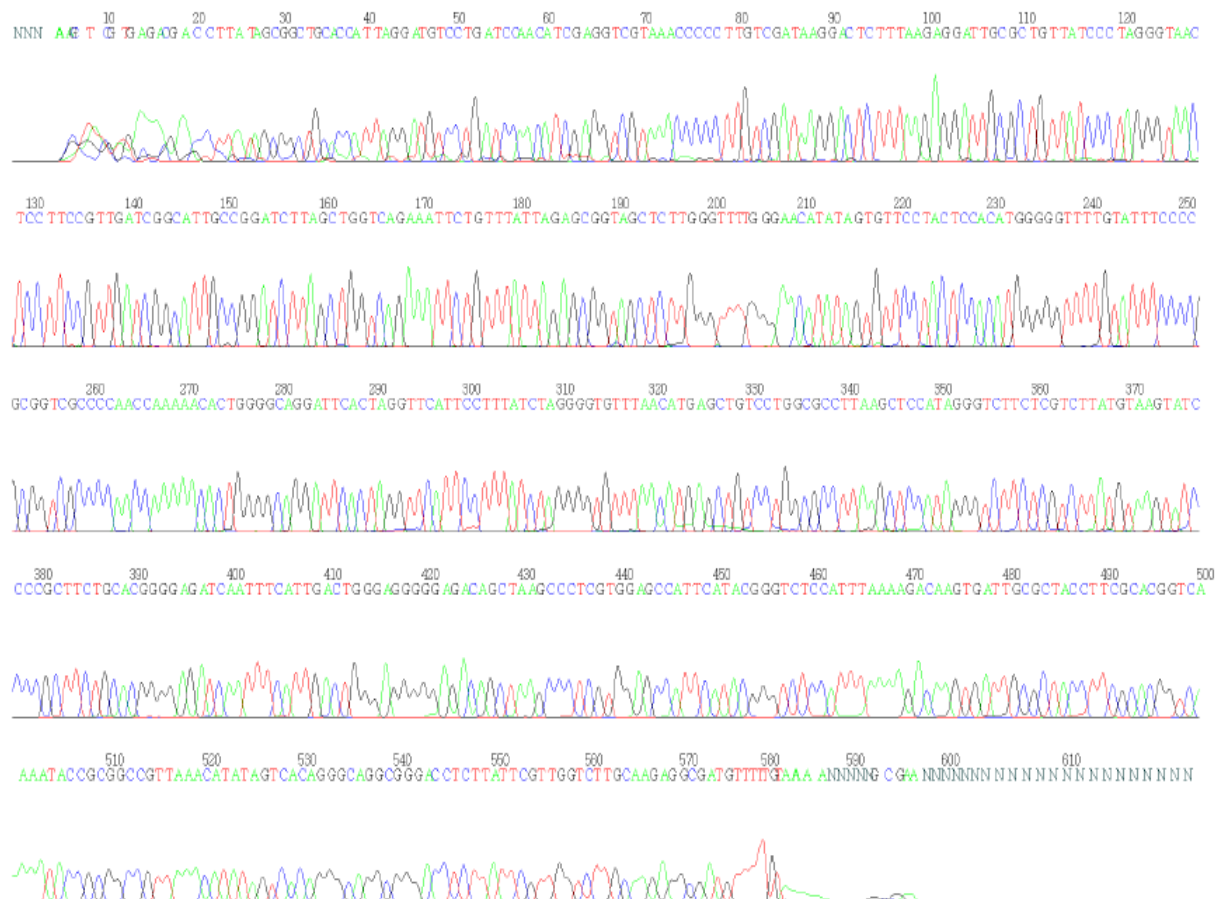
**Spicara flexuosa**

CCTTAATAGCGGCTGCACCATTAGGATGTCCTGATCCAACATCGAGGTC  
GTAAACCCCTTGTGCGATAAGGACTCTTTAAGAGGATTGCGCTGTTATCC  
CTAGGGTAACTCGTTCGGTTGATCGGCACTGCCGGATCTTAGCTGGTCA  
GAAGTTCTGTTTATTAGAGCGGTAGCTCTCGGGTTTGGGAACATGTAGT  
GTTCCCTGGTCCACATGGGGGTTTTGTATTTCCCGCGGTGCCCCAACCC  
AAAAACACTGGGGCAGGGTTCACTTGGTTCAATTCCTTTAACTAGGGGTGT  
TTAACGTGAGCTGCCCTGGCGCCTTAAGCTCCATAGGGTCTTCTCGTCT  
TATGTTATTATCCCCGCTTCTGCACGGGGAGATCAATTTCAATTGACTGGG  
AGGGGGAGACAGCTAAGCCCTCGTGGAGCCATTCATACGGGTCTCCATT  
TAAAAGACAAGTGATTGCGCTACCTTCGCACGGTCAAATACCGCGGCC  
GTTAAACATATAGTCACAGGGCAGGCGGGACCTCTTATTCATTGGTCTTG  
CAAGAGGCGATGTTTTTGGTAAA

Όλα τα άτομα του είδους *S. flexuosa* εμφάνισαν την ίδια ακολουθία βάσεων για το γονίδιο 16S rDNA.

#### 4.25. Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 16S rDNA για τα άτομα *S. maena* μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω ακολουθεί ένα από τα χρωματογραφήματα που πήραμε, μετά από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου 16S rDNA για τα άτομα *S. maena*. Η ακολουθία που καταφέραμε να διαβάσουμε σε όλα άτομα ήταν 566 ζεύγη βάσεων. Στο χρωματογράφημα φαίνεται ο τρόπος που απεικονίζονται οι ακολουθίες για να μπορέσουν διαβαστούν. Κάθε βάση δίνεται με διαφορετικό χρώμα και αντιπροσωπεύει μια κορυφή στο χρωματογράφημα.



**Εικόνα 27:** Ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 16S rDNA για τα άτομα *S. maena*, έπειτα από την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing)

Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 16S rDNA για τα άτομα *S. maena*, μετά την ανάλυση πρωτοδιάταξης

**Spicara maena**

CCTTAATAGCGGCTGCACCATTAGGATGTCCTGATCCAACATCGAGGTC  
GTAAACCCCTTGTCGATAAGGACTCTTTAAGAGGATTGCGCTGTTATCC  
CTAGGGTAACTCGTTCGTTGATCGGCACTGCCGGATCTTAGCTGGTCA  
GAAGTTCTGTTTATTAGAGCGGTAGCTCTCGGGTTTGGGAACATGTAGT  
GTTCCCTGGTCCACATGGGGGTTTTGTATTTCCCCGCGGTGCCCCAACC  
AAAAACACTGGGGCAGGGTTCACTTGGTTCATTTCCTTTAACTAGGGGTGT  
TTAACGTGAGCTGCCCTGGCGCCTTAAGCTCCATAGGGTCTTCTCGTCT  
TATGTTATTATCCCCGCTTCTGCACGGGGAGATCAATTTCAATTGACTGGG  
AGGGGGAGACAGCTAAGCCCTCGTGGAGCCATTCATACGGGTCTCCATT  
TAAAAGACAAGTGATTGCGCTACCTTCGCACGGTCAAATACCGCGGCC  
GTTAAACATATAGTCACAGGGCAGGCGGGACCTCTTATTCATTGGTCTTG  
CAAGAGGCGATGTTTTTGGTAAA

Όλα τα άτομα του είδους *S. maena* εμφάνισαν την ίδια ακολουθία βάσεων για το γονίδιο 16S rDNA.

#### 4.26. Ακολουθίες βάσεων του γονιδίου 16S rDNA για όλα τα άτομα που μελετήθηκαν

Παρακάτω φαίνεται η ακολουθία των βάσεων του γονιδίου 16S rDNA για όλα τα άτομα και των δύο ειδών, καθώς και οι νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των ατόμων. Οι τελείες δηλώνουν όμοιες βάσεις.

```
          10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
Sf1-16S-16SH CCTTAATAGCGGCTGCACCATTAGGATGTCCTGATCCAACATCGAGGTCGTAACCCCTTGTCGATAAGGACTCTTTAAGAGGATTGCGCTGTTATCCC
Sf2-16S-16SH .....
Sf3-16S-16SH .....
Sf4-16S-16SH .....
Sf5-16S-16SH .....
Sf6-16S-16SH .....
Sf7-16S-16SH .....
Sf8-16S-16SH .....
Sf9-16S-16SH .....
Sf10-16S-16SH .....
Sf11-16S-16SH .....
Sf12-16S-16SH .....
Sf13-16S-16SH .....
Sf14-16S-16SH .....
Sf15-16S-16SH .....
Sf16-16S-16SH .....
Sf17-16S-16SH .....
Sf18-16S-16SH .....
Sf19-16S-16SH .....
Sf20-16S-16SH .....
Sf21-16S-16SH .....
Sf22-16S-16SH .....
Sf23-16S-16SH .....
Sf24-16S-16SH .....
Sf25-16S-16SH .....
Sf27-16S-16SH .....
Sf28-16S-16SH .....
Sf29-16S-16SH .....
Sf30-16S-16SH .....
Sf31-16S-16SH .....
Sf32-16S-16SH .....
Sf33-16S-16SH .....
Sf34-16S-16SH .....
Sf35-16S-16SH .....
Sf36-16S-16SH .....
Sf37-16S-16SH .....
Sf38-16S-16SH .....
Sf39-16S-16SH .....
Sm50-16S-16SH .....
Sm51-16S-16SH .....
Sm52-16S-16SH .....
Sm53-16S-16SH .....
Sm54-16S-16SH .....
Sm55-16S-16SH .....
Sm56-16S-16SH .....
Sm57-16S-16SH .....
Sm58-16S-16SH .....
Sm59-16S-16SH .....
Sm60-16S-16SH .....
Sm61-16S-16SH .....
Sm62-16S-16SH .....
Sm63-16S-16SH .....
Sm64-16S-16SH .....
Sm65-16S-16SH .....
Sm66-16S-16SH .....
Sm67-16S-16SH .....
Sm68-16S-16SH .....
Sm69-16S-16SH .....
Sm70-16S-16SH .....
Sm71-16S-16SH .....
Sm72-16S-16SH .....
Sm73-16S-16SH .....
Sm74-16S-16SH .....
Sm75-16S-16SH .....
Sm76-16S-16SH .....
Sm77-16S-16SH .....
```

Sm78-16S-16SH .....  
 Sm79-16S-16SH .....  
 Sm80-16S-16SH .....  
 Sm81-16S-16SH .....  
 Sm82-16S-16SH .....  
 Sm83-16S-16SH .....  
 Sm84-16S-16SH .....  
 Sm85-16S-16SH .....  
 Sm86-16S-16SH .....  
 Sm87-16S-16SH .....  
 Sm88-16S-16SH .....  
 Sm89-16S-16SH .....  
 Sm90-16S-16SH .....

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Sf1-16S-16SH	TAGGGTAAC TCGTTC CGTTGATCGGC ACTGCCGGATCTTAGCTGGTCAGAA GTTCTGTTTATTAGAGCGGTAGCTCTCGGGTTTGGGAACATG TAGTGTT									
Sf2-16S-16SH	.....									
Sf3-16S-16SH	.....									
Sf4-16S-16SH	.....									
Sf5-16S-16SH	.....									
Sf6-16S-16SH	.....									
Sf7-16S-16SH	.....									
Sf8-16S-16SH	.....									
Sf9-16S-16SH	.....									
Sf10-16S-16SH	.....									
Sf11-16S-16SH	.....									
Sf12-16S-16SH	.....									
Sf13-16S-16SH	.....									
Sf14-16S-16SH	.....									
Sf15-16S-16SH	.....									
Sf16-16S-16SH	.....									
Sf17-16S-16SH	.....									
Sf18-16S-16SH	.....									
Sf19-16S-16SH	.....									
Sf20-16S-16SH	.....									
Sf21-16S-16SH	.....									
Sf22-16S-16SH	.....									
Sf23-16S-16SH	.....									
Sf24-16S-16SH	.....									
Sf25-16S-16SH	.....									
Sf27-16S-16SH	.....									
Sf28-16S-16SH	.....									
Sf29-16S-16SH	.....									
Sf30-16S-16SH	.....									
Sf31-16S-16SH	.....									
Sf32-16S-16SH	.....									
Sf33-16S-16SH	.....									
Sf34-16S-16SH	.....									
Sf35-16S-16SH	.....									
Sf36-16S-16SH	.....									
Sf37-16S-16SH	.....									
Sf38-16S-16SH	.....									
Sf39-16S-16SH	.....									
Sm50-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm51-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm52-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm53-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm54-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm55-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm56-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm57-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm58-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm59-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm60-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm61-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm62-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm63-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm64-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm65-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm66-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm67-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm68-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm69-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm70-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm71-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm72-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm73-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm74-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm75-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm76-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm77-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm78-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm79-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm80-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm81-16S-16SH	C		T		A			T		A
Sm82-16S-16SH	C		T		A			T		A

Sm83-16S-16SH	.....C.....T.....A.....T.....A.....
Sm84-16S-16SH	.....C.....T.....A.....T.....A.....
Sm85-16S-16SH	.....C.....T.....A.....T.....A.....
Sm86-16S-16SH	.....C.....T.....A.....T.....A.....
Sm87-16S-16SH	.....C.....T.....A.....T.....A.....
Sm88-16S-16SH	.....C.....T.....A.....T.....A.....
Sm89-16S-16SH	.....C.....T.....A.....T.....A.....
Sm90-16S-16SH	.....C.....T.....A.....T.....A.....

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Sf1-16S-16SH	CCTGGTCCACATGGGGGTTTTGTATTCCCGCGGGTCGCCCAACCAAAAAACACTGGGGCAGGGTTCACCTGGTTCATTCCTTTAACTAGGGGTGTTAA									
Sf2-16S-16SH	.....									
Sf3-16S-16SH	.....									
Sf4-16S-16SH	.....									
Sf5-16S-16SH	.....									
Sf6-16S-16SH	.....									
Sf7-16S-16SH	.....									
Sf8-16S-16SH	.....									
Sf9-16S-16SH	.....									
Sf10-16S-16SH	.....									
Sf11-16S-16SH	.....									
Sf12-16S-16SH	.....									
Sf13-16S-16SH	.....									
Sf14-16S-16SH	.....									
Sf15-16S-16SH	.....									
Sf16-16S-16SH	.....									
Sf17-16S-16SH	.....									
Sf18-16S-16SH	.....									
Sf19-16S-16SH	.....									
Sf20-16S-16SH	.....									
Sf21-16S-16SH	.....									
Sf22-16S-16SH	.....									
Sf23-16S-16SH	.....									
Sf24-16S-16SH	.....									
Sf25-16S-16SH	.....									
Sf27-16S-16SH	.....									
Sf28-16S-16SH	.....									
Sf29-16S-16SH	.....									
Sf30-16S-16SH	.....									
Sf31-16S-16SH	.....									
Sf32-16S-16SH	.....									
Sf33-16S-16SH	.....									
Sf34-16S-16SH	.....									
Sf35-16S-16SH	.....									
Sf36-16S-16SH	.....									
Sf37-16S-16SH	.....									
Sf38-16S-16SH	.....									
Sf39-16S-16SH	.....									
Sm50-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm51-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm52-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm53-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm54-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm55-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm56-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm57-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm58-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm59-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm60-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm61-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm62-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm63-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm64-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm65-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm66-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm67-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm68-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm69-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm70-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm71-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm72-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm73-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm74-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm75-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm76-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm77-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm78-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm79-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm80-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm81-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm82-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm83-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm84-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm85-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm86-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									
Sm87-16S-16SH	..AC.....A.....A.....T.....									



Sm88-16S-16SH ... AC ..... A ..... A ..... T .....  
 Sm89-16S-16SH ... AC ..... A ..... A ..... T .....  
 Sm90-16S-16SH ... AC ..... A ..... A ..... T .....

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

Sf1-16S-16SH CGTGAGCTGCCCTGGCGCCTTAAGCTCCATAGGGTCTTCTCGTCTTATGTTATTATATCCCGCTTCTGCACGGGGAGATCAATTTCAATTGACTGGGAGGGG  
 Sf2-16S-16SH .....  
 Sf3-16S-16SH .....  
 Sf4-16S-16SH .....  
 Sf5-16S-16SH .....  
 Sf6-16S-16SH .....  
 Sf7-16S-16SH .....  
 Sf8-16S-16SH .....  
 Sf9-16S-16SH .....  
 Sf10-16S-16SH .....  
 Sf11-16S-16SH .....  
 Sf12-16S-16SH .....  
 Sf13-16S-16SH .....  
 Sf14-16S-16SH .....  
 Sf15-16S-16SH .....  
 Sf16-16S-16SH .....  
 Sf17-16S-16SH .....  
 Sf18-16S-16SH .....  
 Sf19-16S-16SH .....  
 Sf20-16S-16SH .....  
 Sf21-16S-16SH .....  
 Sf22-16S-16SH .....  
 Sf23-16S-16SH .....  
 Sf24-16S-16SH .....  
 Sf25-16S-16SH .....  
 Sf27-16S-16SH .....  
 Sf28-16S-16SH .....  
 Sf29-16S-16SH .....  
 Sf30-16S-16SH .....  
 Sf31-16S-16SH .....  
 Sf32-16S-16SH .....  
 Sf33-16S-16SH .....  
 Sf34-16S-16SH .....  
 Sf35-16S-16SH .....  
 Sf36-16S-16SH .....  
 Sf37-16S-16SH .....  
 Sf38-16S-16SH .....  
 Sf39-16S-16SH .....  
 Sm50-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm51-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm52-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm53-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm54-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm55-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm56-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm57-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm58-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm59-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm60-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm61-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm62-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm63-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm64-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm65-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm66-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm67-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm68-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm69-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm70-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm71-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm72-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm73-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm74-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm75-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm76-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm77-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm78-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm79-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm80-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm81-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm82-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm83-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm84-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm85-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm86-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm87-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm88-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm89-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .  
 Sm90-16S-16SH .A. . . . . T . . . . . A . G . . . . .



Sf4-16S-16SH	.....
Sf5-16S-16SH	.....
Sf6-16S-16SH	.....
Sf7-16S-16SH	.....
Sf8-16S-16SH	.....
Sf9-16S-16SH	.....
Sf10-16S-16SH	.....
Sf11-16S-16SH	.....
Sf12-16S-16SH	.....
Sf13-16S-16SH	.....
Sf14-16S-16SH	.....
Sf15-16S-16SH	.....
Sf16-16S-16SH	.....
Sf17-16S-16SH	.....
Sf18-16S-16SH	.....
Sf19-16S-16SH	.....
Sf20-16S-16SH	.....
Sf21-16S-16SH	.....
Sf22-16S-16SH	.....
Sf23-16S-16SH	.....
Sf24-16S-16SH	.....
Sf25-16S-16SH	.....
Sf27-16S-16SH	.....
Sf28-16S-16SH	.....
Sf29-16S-16SH	.....
Sf30-16S-16SH	.....
Sf31-16S-16SH	.....
Sf32-16S-16SH	.....
Sf33-16S-16SH	.....
Sf34-16S-16SH	.....
Sf35-16S-16SH	.....
Sf36-16S-16SH	.....
Sf37-16S-16SH	.....
Sf38-16S-16SH	.....
Sf39-16S-16SH	.....
Sm50-16S-16SH	.....G.....
Sm51-16S-16SH	.....G.....
Sm52-16S-16SH	.....G.....
Sm53-16S-16SH	.....G.....
Sm54-16S-16SH	.....G.....
Sm55-16S-16SH	.....G.....
Sm56-16S-16SH	.....G.....
Sm57-16S-16SH	.....G.....
Sm58-16S-16SH	.....G.....
Sm59-16S-16SH	.....G.....
Sm60-16S-16SH	.....G.....
Sm61-16S-16SH	.....G.....
Sm62-16S-16SH	.....G.....
Sm63-16S-16SH	.....G.....
Sm64-16S-16SH	.....G.....
Sm65-16S-16SH	.....G.....
Sm66-16S-16SH	.....G.....
Sm67-16S-16SH	.....G.....
Sm68-16S-16SH	.....G.....
Sm69-16S-16SH	.....G.....
Sm70-16S-16SH	.....G.....
Sm71-16S-16SH	.....G.....
Sm72-16S-16SH	.....G.....
Sm73-16S-16SH	.....G.....
Sm74-16S-16SH	.....G.....
Sm75-16S-16SH	.....G.....
Sm76-16S-16SH	.....G.....
Sm77-16S-16SH	.....G.....
Sm78-16S-16SH	.....G.....
Sm79-16S-16SH	.....G.....
Sm80-16S-16SH	.....G.....
Sm81-16S-16SH	.....G.....
Sm82-16S-16SH	.....G.....
Sm83-16S-16SH	.....G.....
Sm84-16S-16SH	.....G.....
Sm85-16S-16SH	.....G.....
Sm86-16S-16SH	.....G.....
Sm87-16S-16SH	.....G.....
Sm88-16S-16SH	.....G.....
Sm89-16S-16SH	.....G.....
Sm90-16S-16SH	.....G.....

Και τα 39 άτομα του είδους *S. flexuosa* αποκάλυψαν έναν απλότυπο, ο οποίος είναι ο ίδιος για όλα τα άτομα του είδους. Επίσης όλα τα άτομα του είδους *S. maena* αποκάλυψαν πάλι έναν απλότυπο, που είναι ίδιος για όλα τα

άτομα του είδους. Οι δύο αυτοί απλότυποι διαφέρουν μεταξύ τους σε 15 θέσεις.

Οι θέσεις στις οποίες εντοπίζονται οι διαφορές μεταξύ των δύο απλοτύπων είναι οι παρακάτω: 112, 128, 152, 178, 193, 204, 205, 264, 271, 286, 302, 310, 351, 353 και 534.

Για το είδος *S. flexuosa* η μέση νουκλεοτιδική σύνθεση για A, C, G, T, ήταν 21.38, 24.03, 26.33 και 28.27% αντίστοιχα.

Για το είδος *S. maena* η μέση νουκλεοτιδική σύνθεση για A, C, G, T, ήταν 22.26, 23.85, 25.44 και 28.45% αντίστοιχα.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία βασίζεται στην ενίσχυση του πυρηνικού γονιδίου 5S rRNA καθώς και στην ενίσχυση του μιτοχονδριακού γονιδίου 16S rRNA με τη διαδικασία της PCR, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και τέλος ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing) 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 των συγκεκριμένων γενετικών τόπων έγινε λόγω του χαμηλού ποσοστού ενδο-ειδικού πολυμορφισμού που παρουσιάζουν και παράλληλα λόγω του υψηλού ποσοστού δια-ειδικού πολυμορφισμού. Ο συνδυασμός αυτός τους καθιστά άριστους μάρτυρες για το διαχωρισμό στενά συγγενικών ειδών.

Παρόλο που οι μορφολογικές αναλύσεις δίνουν σαφείς διαφορές μεταξύ συγγενικών ειδών, εντούτοις οι φυλογενετικές αναλύσεις αποκαλύπτουν σημαντικές γενετικές αποκλίσεις, δίνοντας αναλυτικά στοιχεία για τη διαφοροποίηση σε ταξινομικό επίπεδο (Macpherson & Machordom, 2005). Το γονίδιο 16S rRNA έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς μελετητές για τη διάκριση διαφορετικών ειδών με πάρα πολύ μεγάλη επιτυχία. Το γονίδιο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό διαφόρων ειδών διθύρων του γένους *Pecten spp.* (Saavedra & Pera, 2006) και της οικογένειας *Pectinidae* (Barucca *et al.*, 2004; Saavedra & Pera, 2004), για τον προσδιορισμό τριών ειδών δεκάποδων του γένους *Munida* (Macpherson & Machordom, 2005), καθώς επίσης για τον προσδιορισμό βακτηρίων (Barlaan *et al.*, 2005).

Επίσης, με το γονίδιο αυτό μπόρεσε να γίνει ταυτοποίηση καβουριών του γλυκού νερού της οικογένειας Sesamidae στη Τζαμάικα (Schubart & Koller, 2004), καθώς και της αστακοκαραβίδας του γένους Palinuridae στη Φλόριδα των Η.Π.Α. (Sarver *et al.*, 2000). Τέλος, το γονίδιο 16S rRNA έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό καρχαριών στο βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό (Greig *et al.*, 2005), για τον προσδιορισμό φαλινοειδών της οικογένειας Cetomimidae (Colgan *et al.*, 2000), για τον προσδιορισμό μαλακίων (Anderson, 2000), καθώς και για τον προσδιορισμό βακτηρίων

πάνω σε εκτρεφόμενο σολομό του Ατλαντικού Ωκεανού (*Salmo salar*) (Befring- Hovda, 2007).

Φυλογενετικές αναλύσεις με τη χρήση του γονιδίου 16S rRNA έχουν γίνει σε είδη της οικογένειας Pleuronectiformes (Pardo *et al.*, 2005), σε είδη της οικογένειας Mullidae (Apostolidis *et al.*, 2001), σε είδη της οικογένειας Catostomidae (Harris & Mayden, 2001), σε είδη του γένους *Epinephelus* (Craig *et al.*, 2001), καθώς και σε δέκα είδη της οικογένειας Soleidae (Infante *et al.*, 2004).

Όσον αφορά το γονίδιο 5S rRNA, αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορα είδη ψαριών. Το γονίδιο 5S rRNA είναι κατάλληλο για φυλογενετικές αναλύσεις σε θαλάσσιους οργανισμούς (Martins & Galetti 2001). Έτσι έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση διαφορετικών ειδών κεφαλοειδών της οικογένειας Mugilidae (Imsiridou *et al.*, 2007) καθώς και σε τρία είδη του γένους *Trachurus* (*T. mediterraneus*, *T. trachurus* και *T. picturatus*) (Karaiskou *et al.*, 2003). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για φυλογενετική ανάλυση σε είδη του γένους *Leporinus* (Martins & Galletti, 2001; Ferreira *et al.*, 2007), σε ψάρια του γένους *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001) και στο σολομό του Ατλαντικού Ωκεανού (Pendas *et al.*, 1994). Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί για γενετική ανάλυση ειδών του γένους *Solea* καθώς επίσης και του είδους *Reinharbitus hippoglossoides* (Cespedes *et al.*, 1999).

Στην οικογένεια Centranchidae και ειδικότερα στο γένος *Spicara* δεν έχουν γίνει αρκετές φυλογενετικές μελέτες και όσες έχουν γίνει, χρησιμοποιούν κυρίως το μιτοχονδριακό γένωμα (mtDNA) και την ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών.

Μια παλαιότερη μελέτη, που αποσκοπούσε στη γενετική διαφοροποίηση των ειδών *S. smaris* και *S. maena* της οικογένειας Centranchidae με τη χρήση πρωτεϊνικής ηλεκτροφορητικής ανάλυσης, οδήγησε στην ταυτοποίηση των δύο αυτών ειδών ως ένα είδος. Βάσει της μελέτης αυτής φάνηκε ότι πρόκειται για ένα είδος με διαφορετικά χαρακτηριστικά (Pollard & Pichot, 1971).

Οι Orell *et al.* (2002) διεξήγαγαν μια φυλογενετική μελέτη της οικογένειας Sparidae που βασίστηκε στην ακολουθία του μιτοχονδριακού γονιδίου κυτόχρωμα β (cytochrome b), και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δύο είδη της οικογένειας Centranchidae (*S. alta* and *S. maena*) περιλαμβάνονταν στην

μονοφυλετική οικογένεια Sparidae. Τα αποτελέσματά τους αυτά ενισχύθηκαν λίγο αργότερα με τη χρήση του γονιδίου 16S rRNA (Orell *et al.*, 2004). Η άποψη αυτή ενισχύθηκε επιπλέον το 2007 από μία άλλη έρευνα που βασίστηκε στην ακολουθία του μιτοχονδριακού DNA, και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει πολύ στενή σχέση μεταξύ του είδους *S. maena* και του είδους *Pagrus major* (Yamanoue *et al.*, 2007).

Σε μια φυλογενετική μελέτη που έγινε για την ταυτοποίηση τριών ειδών του γένους *Spicara* (*S. smaris*, *S. flexuosa*, *S. maena*), με τη μέθοδο της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης πρωτεϊνών σε 28 πρωτεΐνες, βρέθηκε ότι το είδος *S. smaris* είναι διαφορετικό από τα άλλα δύο. Όσον αφορά τα είδη *S. maena* και *S. flexuosa*, από τα αποτελέσματα της εργασίας βγήκε το συμπέρασμα ότι πρόκειται για το ίδιο είδος παρ' όλες τις μορφολογικές τους διαφορές, εφόσον δε βρέθηκε κανένας γενετικός τόπος ικανός να διακρίνει τα δύο είδη και η γενετική απόσταση μεταξύ τους ήταν πολύ μικρή (Arculeo *et al.*, 1996).

Μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια μελέτη πάνω στην οικογένεια Centracanthidae, με τη χρήση του πυρηνικού γονιδίου 5S rRNA.

Και τα δύο είδη (*S. maena* και *S. flexuosa*) παρουσιάζουν πρωτόγονο ερμαφροδιτισμό. Επίσης, το είδος *Spicara flexuosa* παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Εξαιτίας των παραπάνω έχει δημιουργηθεί μια διχογνωμία για τη συστηματική τους. Αρκετοί ερευνητές (Fischer *et al.*, 1981; Quéro *et al.*, 2003; Froese & Pauly 2008) θεωρούν ότι το *S. flexuosa* είναι ένα άλλο επιστημονικό όνομα για το είδος *S. maena*. Αντίθετα, πολλές ερευνητικές δουλειές (Fischer *et al.*, 1987; Costa, 1991; Lythgoe & Lythgoe, 1992; Miller & Loates, 1997; Debelius, 1997; Eschmeyer, 1998; Golani *et al.*, 2006) αναφέρονται σε αυτά ως δύο διαφορετικά είδη.

Σε αυτή την εργασία διαχωρίσαμε με επιτυχία τα δύο είδη *S. maena* και *S. flexuosa*. Με την τεχνική της PCR και έπειτα με την ανάλυση πρωτοδιάταξης μπορέσαμε να διαβάσουμε την ακολουθία των βάσεων για το γονίδιο 16S rRNA, και είδαμε ότι και τα 39 άτομα του είδους *S. flexuosa* αποκάλυψαν έναν απλότυπο, ο οποίος είναι ο ίδιος για όλα τα άτομα του είδους. Επίσης όλα τα άτομα του είδους *S. maena* αποκάλυψαν πάλι έναν απλότυπο, που είναι ίδιος για όλα τα άτομα του είδους. Οι δύο αυτοί

απλότυποι διαφέρουν μεταξύ τους σε 15 θέσεις. Αντιθέτως, με το γονίδιο 5S rRNA τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο διευκρινιστικά καθώς μπόρεσε να διαβαστεί η ακολουθία μόνο από 17 άτομα του είδους *S. flexuosa*, αλλά αν και πρόκειται για άτομα του ίδιου είδους υπάρχουν διαφορές στην ακολουθία από άτομο σε άτομο.

Η χρήση του γονιδίου 16S rRNA μας έδειξε με μεγάλη ευκολία ότι πρόκειται για δύο διαφορετικά είδη της ίδιας οικογένειας, ενώ η χρήση του γονιδίου 5S rRNA δεν μας έδωσε σαφή αποτελέσματα.

Το γονίδιο 16S rRNA αποδείχθηκε ένας άριστος μάρτυρας λόγω της γρήγορης, και επιτυχημένης ενίσχυσης και στα δύο είδη. Η αξιοπιστία της μεθόδου οφείλεται στη σταθερότητα των αποτελεσμάτων. Εντούτοις, θα μπορούσαν να γίνουν περαιτέρω μελέτες με το γονίδιο 5S rRNA.



## 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της συγκεκριμένης έρευνας αποτελεί η γενετική ταυτοποίηση δύο ειδών της οικογένειας *Centracanthidae*: *Spicara maena* και *Spicara flexuosa*.

Για την εργασία αυτή συλλέχθηκαν δείγματα από το Θερμαϊκό κόλπο της Θεσσαλονίκης σε διαφορετικές χρονικές περιόδους για το κάθε είδος.

Όλα τα δείγματα αμέσως μετά τη σύλληψή τους μεταφέρονταν στο εργαστήριο όπου και γινόταν η συστηματική τους κατάταξη βάσει της κλείδας. Έπειτα ακολουθούσε η λήψη μυϊκού ιστού από τα άτομα και μετά η συντήρηση των ατόμων αλλά και του ιστού σε κατάψυξη. Στη συνέχεια, από τα κομμάτια ιστού που είχαμε πάρει από κάθε άτομο, γινόταν η εξαγωγή DNA και ο έλεγχος του DNA σε πηκτή αγαρόζης με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Εφόσον η εξαγωγή του DNA ήταν επιτυχής προχωρούσαμε στην ενίσχυση του πυρηνικού γονιδίου 5S rRNA και του μιτοχondριακού γονιδίου 16S rRNA με τη μέθοδο της PCR. Μετά το τέλος της PCR γινόταν ο έλεγχος των προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης, και τα αποτελέσματα κάθε φορά φωτογραφίζονταν. Τέλος, ακολουθούσε η ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing).

Η ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA έγινε επιτυχώς σε όλα τα άτομα και των δύο ειδών. Ο δια-ειδικός πολυμορφισμός που παρουσιάζει το γονίδιο 16S rRNA το καθιστά έναν πολύ καλό μιτοχondριακό μάρτυρα, που παρέχει έναν εύκολο και αξιόπιστο τρόπο για την ταυτοποίηση των ειδών.

Το γονίδιο 5S rRNA δεν ενισχύθηκε με επιτυχία και στα δύο είδη. Μπόρεσαν να ενισχυθούν και να διαβαστούν μόνο 17 άτομα του είδους *S. flexuosa* και γι' αυτό θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες των ειδών αυτών με το συγκεκριμένο γονίδιο.

Με την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA αποκαλύφθηκαν δύο απλότυποι χαρακτηριστικοί για το κάθε είδος και διαφορετικοί μεταξύ τους. Οι δύο αυτοί απλότυποι διαφέρουν μεταξύ τους σε 15 νουκλεοτιδικές θέσεις. Η μελέτη του γονιδίου 16S rRNA ενισχύει την ύπαρξη δύο διαφορετικών ειδών.

Τέλος, με την ενίσχυση του γονιδίου 5S rRNA πήραμε διαφορετικές ακολουθίες ανά άτομο αν και πρόκειται για το ίδιο είδος (*S. flexuosa*).

## 7. SUMMARY

The object of this research is the genetic identification of two species of the family *Centracanthidae*: *Spicara maena* and *Spicara flexuosa*.

Samples were collected from Thermaikos gulf of Thessaloniki at different time periods for each species.

All the samples were transferred to the laboratory immediately after their collection, and there took place their systematic classification according to the basis of bones. Afterwards, we took muscle tissues from each individual and we kept the samples and the tissues in the refrigeration. Total DNA was extracted from muscle and we checked the DNA with an agarose gel electrophoresis. Polymerase Chain Reaction (PCR) was applied to amplify the nuclear gene 5S rRNA and the mitochondrial gene 16S rRNA. After the end of the PCR reaction, we checked the PCR products with an agarose gel electrophoresis. After the end of the electrophoresis the resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and photographed. At the end, a sequencing analysis for each individual was followed.

The 16S rRNA gene was amplified successfully to all the individuals of both species. The interspecific polymorphism of the 16S rRNA gene makes it a very good candidate for comparison of closely related species.

The 5S rRNA gene was not amplified successfully in both species. Only 17 individuals of the species *S. flexuosa* could be amplified with PCR and then sequenced. Further research of these species, must be done with the particular gene.

Two unique haplotypes - one for each species - were revealed after the sequencing reaction of the 16S rRNA gene. These two haplotypes were different in 15 nucleotide sites. The study of the 16S rRNA gene reinforces the fact that *Spicara maena* and *Spicara flexuosa* are two different species.

Finally, we took different haplotypes for some *S. flexuosa* individuals, after the sequencing reaction of the 5S rRNA gene.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική

- Ιμσιρίδου, Α. (2004). Σημειώσεις Γενετικής Μηχανικής και Βιοτεχνολογίας, Α.Τ.Ε.Ι., Θεσσαλονίκη, Τ.Α.Υ.
- Καραϊσκού, Ν. (2004). Γενετική ταυτοποίηση και φυλογενετικές σχέσεις τριών ειδών του γένους *Trachurus*. Διδακτορική διατριβή, σελ. 193, Θεσσαλονίκη.
- Κασπίρης, Φ. Π. (2000). Τα ψάρια της Ελλάδος (Κλείδες προσδιορισμού). Σελ. 138-141, Πάτρα.

### Ξενόγλωσση

- Alves-Costa, F. A., Martins, C., Del Campos de Matos, F., Foresti, F., Oliveira, C. and Wasko., A. P. (2008). 5S rDNA characterization in twelve Sciaenidae fish species (Teleostei, Perciformes): Depicting gene diversity and molecular markers. *Gen. Mol. Bio.* **31(1)**: 303-307.
- Anderson, F., E. (2000). Phylogeny and historical biogeography of the Loliginid Squids (Mollusca: Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* **15(2)**: 191–214.
- Apostolidis, A. P., Mamuris, Z. and Triantaphyllidis, C. (2001). Phylogenetic relationships among four species of Mullidae (Perciformes) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA genes. *Bioch. Syst. Ecol.* **29**: 901-909.
- Aranishi, F. and Okimoto, T. (2004). Engineered Xcml cassette-containing vector for PCR-based phylogenetic analyses. *J. Genet.* **83(1)**: 33-34.
- Aranishi, F. (2005a). Rapid PCR-RFLP method for discrimination of imported and domestic mackerel. *Mar. Biol.* **7**: 571-575.
- Aranishi, F. (2005b). PCR-RFLP analysis of nuclear nontranscribed spacer for mackerel species identification. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 508-51.
- Arculeo, M., Mauro, A., Scelsa, G., Lo Brutto, S., Cammarata, M. and Parrinello, N. (1996). Protein differences among the Mediterranean species of the genus *Spicara*. *J. Fish. Biol.* **49**: 1317-1322.
- Arnason, U., Gullberg, A. and Widegren, B. (1991). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the fin whale, *Balaenoptera physalus*. *J. Mol. Evol.* **33**: 566-568.

- Barciszewska, M. Z., Szymański, M., Erdmann, V. A. and Barciszewski, J. (2001). Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Bioc. Pol.* **48(1)**: 191–198.
- Barlaan, E. A., Sugimori, M., Furukawa, S. and Takeuchi, K. (2005). Electronic microarray analysis of 16S rDNA amplicons for bacterial detection. *J. Biotech.* **117**: 11-21.
- Barucca, M., Olmo, E., Schiaparelli, S. and Canapa, A. (2004). Molecular phylogeny of the family Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial 16S and 12S rRNA genes. *Mol. Phyl. Evol.* **31**: 89–95.
- Befring-Hovda, M., Lunestad, B. T., Fontanillas, R. and Rosnes, J. T. (2007). Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **272**: 581–588.
- Cabral, H., Duque, J. and Costa, M. J. (2003). Discards of the beach seine fishery in the central coast of Portugal. *Fish. Res.* **63**: 63-71.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahlloöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F. and Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *App. Envi. Micr.* p. 278–288.
- Céspedes, A., Garcia, T., González, E., 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.
- Cicek, E., Avşar, D., Yeldan, H. and Manaşirli, M. (2007). Population characteristics and growth of *Spicara maena* (Linnaeus, 1758) inhabiting in Babadillimani Bight (northeastern Mediterranean-Turkey). *Inter. J. Nat. Engin. Sci.* **1**: 15-18.
- Colgan, D. J., Zhang, C. G. and Paxton, J. R. (2000). Phylogenetic investigations of the Stephanoberyciformes and Beryciformes, particularly whalefishes (Euteleostei: Cetomimidae), based on partial 12S rDNA and 16S rDNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **17(1)**: 15–25.
- Costa, F. (1991). Atlante dei pesci dei mari italiani. Gruppo Ugo Mursia Editore S.p.A. Milano, Italy. 438 p.
- Craig, M. T., Pondella, D. J., Franck, P. C. and Hafnert, J. C. (2001). On the status of the Serranid fish genus *Epinephelus*: Evidence for paraphyly based upon 16S rDNA sequence. *Mol. Phyl. Evol.* **19(1)**: 121-130.

- Darwish, A. M. and Ismaiel, A. A. (2005). Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S–23S rDNA spacer. *Mol. Cell. Pro.* **19**: 267–274.
- Debelius, H. (1997). Mediterranean and Atlantic fish guide. IKAN Unterwasserarchiv, Frankfurt. pp. 171.
- Dulčić, J., Kraljević, M., Grbec, B. and Cetinić, P. (2000). Age, growth and mortality of blotched picarel *Spicara maena* L. (Pisces: Centranchidae) in the eastern central Adriatic. *Fish. Res.* **48**: 69-78.
- Eschmeyer, W. N. (Ed.) (1998). Catalog of fishes. Special Publication 1, California Academy of Sciences, San Francisco. Volume 1: 1-958, Volume 2: 959-1820, Volume 3: 1821-2905. [Online access (December 2008): <http://research.calacademy.org/research/lchthyology/Catalog/fishcatsearch.html>]
- Ferreira, I. A., Oliveira, C., Venere, P. C., Galetti, P. M. and Martins, C. (2007). 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Genetica* **129**: 253-257.
- Figueras, M. J., Soler, L., Chacón, M. R., Guarro, J. and Martínez-Murcia, A. J. (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **50**: 2069-2073.
- Fischer, W., Bianchi, G. and Scott, W. B. (1981). FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic; fishing area 34, 47 (in part). Canada Funds-in-Trust. Ottawa, Department of Fisheries and Oceans Canada, by arrangement with FAO, vols. 1-7.
- Fischer, W. Bauchot, M.-L. and Schneider, M. (1987). Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. (Révision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume II. Vertébrés. FAO, Rome, pp. 1031- 1036.
- Froese, R. & Pauly, D. (Eds.) (2008). FishBase. World Wide Web electronic publication. [Online access (December 2008) <http://www.fishbase.org>].
- Golani, D., Ozturk, B. and Basusta, N. (2006). Centranchidae. In: Fishes of the Eastern Mediterranean. Turkish Marine Research Foundation, Istanbul. pp.168-169.

- Greig, T. W., Moore, M. K., Woodley, C. M. and Quattro, J. M. (2005). Mitochondrial gene sequences useful for species identification of western North Atlantic Ocean sharks. *Fish. Bull.* **103**: 516–523.
- Guidetti, P. (2000). Differences among fish assemblages associated with nearshore *Posidonia oceanica* seagrass beds, rocky–algal reefs and unvegetated sand habitats in the Adriatic Sea. *Estua. Coast. Shelf Sci.* **50**: 515-529.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Ac. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Harris, P. M. and Mayden, R. L. (2001). Phylogenetic relationships of major clades of Catostomidae (Teleostei: Cyprinoformes) as inferred from mitochondrial SSU and LSU rDNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **20(2)**: 225-237.
- Imsiridou, A., Minos, G., Katsares, V., Karaïskou, N. and Tsiora, A. (2007). Genetic identification and phylogenetic inferences in different Mugilidae species using 5S rDNA markers. *Aquac. Res.* **38**: 1370-1379.
- Infante, C., Catanese, G. and Machado, M. (2004). Phylogenetic relationships among ten sole species (Soleidae, Pleuronectiformes) from the Gulf of Cadiz (Spain) based on mitochondrial DNA sequences. *Mar. Biot.* **6**: 612-624.
- Karaïskou, 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.
- Karaïskou, N., Triantafyllidis, A., Margaroni, M., Karatzas, D. and Triantaphyllidis, C. (2005). A double DNA approach for identifying *Macrorhamphosus scolopax* (Pisces, Centriscidae). *J. Mar. Sci.* **62**: 1683-1690.
- Karakulak, F. S., Erk, H. and Bilgin, B. (2006). Length–weight relationships for 47 coastal fish species from the northern Aegean Sea, Turkey. *J. Appl. Ichthyol.* **22**: 274–278.
- Lythgoe, J. and G. (1992). Fishes of the sea. The North Atlantic and Mediterranean. p. 123.
- Macpherson, E. and Machordom, A. (2005). Use of morphological and molecular data to identify three new sibling species of the genus *Munida*

- Leach, 1820 (Crustacea, Decapoda, Galatheidae) from New Caledonia. *J. Nat. Hist.* **39(11)**: 819–834.
- Macrae, A. (2000). The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Braz. J. Micr.* **31**: 77-82.
- 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 and chromosome loci. *Cytog. Gen. Res.* **98**: 78-85.
- Martins, C. and Galetti, P. M. Jr. (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish Leporinus: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Nat. Res. Coun. Can.* **44(5)**: 903-910.
- Martins, C. and Galetti, P. M. Jr. (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica* **111**: 439-446.
- Matić-Shoko, S., Kraljević, M. and Dulčić, J. (2004). Fecundity of blotched picarel, *Spicara maena* L. (Teleostei: Centranchidae), in the eastern central Adriatic Sea. *Acta Adriat.* **45(2)**: 155-162.
- Miller, P. J. and Loates, M. J. (1997). Fish of Britain and Europe. Collins pocket guide. Haper Collins Publishers, London, pp.200-201.
- Nelson, J. S. (1944). Fishes of the World. (Third edition). p. 362.
- Orrell, T. M., Carpenter, K. E., Musick, J. A. and Graves, J. E. (2002). Phylogenetic and biogeographic analysis of the Sparidae (Perciformes: Percoidei) from cytochrome b sequences. *Copeia* **3**: 618-631.
- Orrell T. M. and Carpenter K. E. (2004). A phylogeny of the fish family Sparidae (porgies) inferred from mitochondrial sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* **32(2)**: 425-434.
- Pardo, B. G., Machordom, A., Foresti, F., Porto-Foresti, F., Azevedo, M. F. C., Banon, R., Sanchez, L. and Martinez, P. (2005). Phylogenetic analysis of flatfish (Order: Pleuronectiformes) based on mitochondrial 16s rDNA sequences. *Sci. Mar.* **69(4)**: 531-543.
- Pendas, A. M., Moran, P., Freije, J. P. and Garcia-Vanquez, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cyt. Cell Genet.* **67**: 31-36.

- Petrakis, G. and Stergiou, K. I. (1996). Gill net selectivity for four fish species (*Mullus barbatus*, *Pagellus erythrinus*, *Pagellus acarne* and *Spicara flexuosa*) in Greek waters. *Fisher. Res.* **27**: 17-27.
- Perez, J., Alvarez, P., Martinez, J. L. and Garcia-Vazquez, E. (2005). Genetic identification of hake and megrim eggs in formaldehyde-fixed plankton samples. *J. Mar. Sci.* **62**: 908-914.
- Pollard, D. A. and Pichot, P. (1971). The systematic status of the Mediterranean centracanthid fishes of the genus *Spicara*, and in particular *S. chryselis* (Valenciennes), as indicated by electrophoretic studies of their eye-lens proteins. *J. Fish Biol.* **3(1)**: 59-72.
- Quero J.-C., Porché, P. and Vayne, J.-J. (2003). Guide des poisons de l'Atlantique européen. Les guides du naturaliste, Delachaux et Niestlé S.A., Lonay (Switzerland) – Paris. pp. 341-342.
- Ragonese, S., Fiorentino, F., Garofalo, G., Gristina, M., Levi, D., Gancitano, S., Giusto, G. B., Rizzo, P. and Sinacori, G. (2002). Distribution, abundance and biological features of picarel (*Spicara flexuosa*), Mediterranean (*Trachurus mediterraneus*) and Atlantic (*T. trachurus*) horse mackerel based on experimental bottom-trawl data (MEDITS, 1994–2002) in the Strait of Sicily. *MedSudMed Tech. Doc.* **5**: 100-113.
- Rastogi, G., Dharme, M. S., Walujkar, S., Kumar, A., Patole, M. S. and Shouche, Y. S. (2007). Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Sci.* **76**: 666-674.
- Relini, G., Bertrand, J. and Zamboni, A. (1999). Synthesis of knowledge of the bottom fishery resources in the central Mediterranean (Italy and Corsica). *Biol. Mar. Medit.* **6**: 868.
- Rizkalla, S. I. (1994). A comparative study on the morphometric characters of fishes belonging to family: Centracanthidae in the Egyptian Mediterranean waters. *Mar. Sci.* **7**: 255-261.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Fernández, A., Lobo, E., Hernández, P. E. and Martín, 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.



- Saavedra, C. and Peña, J. B. (2004). Phylogenetic relationships of commercial European and Australasian king scallops (*Pecten* spp.) based on partial 16S ribosomal RNA gene sequences. *Aquaculture*. **235**: 153–166.
- Saavedra, C. and Peña, J. B. (2006). Phylogenetics of American scallops (Bivalvia: Pectinidae) based on partial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Mar. Biol.* **150**: 111–119.
- Sarver, S. K., Freshwater, D. W. and Walsh, P. J. (2000). The occurrence of the provisional Brazilian subspecies of spiny lobster (*Panulirus argus westonii*) in Florida waters. *Fish. Bull.* **98**: 870-873.
- Shekhar, M. S., Gopikrishna, G. and Azad, I. S. (2005). PCR-RFLP analysis of 12S and 16S mitochondrial rRNA genes from brackishwater Finfish and Shellfish species. *Asian Fish. Sci.* **18**: 39-48.
- Shibata, F. and Hizume, M. (2002). Evolution of 5S rDNA units and their chromosomal localization in *Allium cepa* and *Allium schoenoprasum* revealed by microdissection and FISH. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 167-172.
- Shubart, C. D. and Koller, P. (2005). Genetic diversity of freshwater crabs (Brachyura: Sesamidae) from central Jamaica with description of a new species. *J. Nat. Hist.* **39(6)**: 469-481.
- Storelli, M., Giacomini-Stuffler, R., Storelli, A., D'Addabbo, R., Palermo, C. and Marcotrigiano, G., O. (2003). Survey of total mercury and methylmercury levels in edible fish from the Adriatic Sea. *Food Addit. Contam.*, **20**: 1114 – 1119.
- Szymanski, M., Barciszewska, M. Z., Erdmann, V. A. and Barciszewski, J. (2002). 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.* **30(1)**: 176-178.
- Thollesson, M. (1999). Phylogenetic analysis of Euthyneura (Gastropoda) by means of the 16S rRNA gene: use of a 'fast' gene for 'higher-level' phylogenies. *Proc. Royal. Soc. Lond. B* **266**: 75-83.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Tserpes, G., Peristeraki, P., Potamias, G. and Tsimenides, N. (1999). Species distribution in the southern Aegean Sea based on bottom-trawlsurveys. *Aquat. Liv. Resour.* **12(3)**: 167-175.

- Yamanoue, Y., Miya, M., Matsuura, K., Yagishita, N., Mabuchi, K., Sakai, H., Katoh, M. and Nishida, M. (2007). Phylogenetic position of tetraodontiform fishes within the higher teleosts: Bayesian inferences based on 44 whole mitochondrial genome sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **45(1)**: 89-101.
- Wasko, A. P., Martins, C., Wright, J. M. and Galetti, P. M. Jr. (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Nat. Res. Coun. Can.* **44(5)**: 893-902.