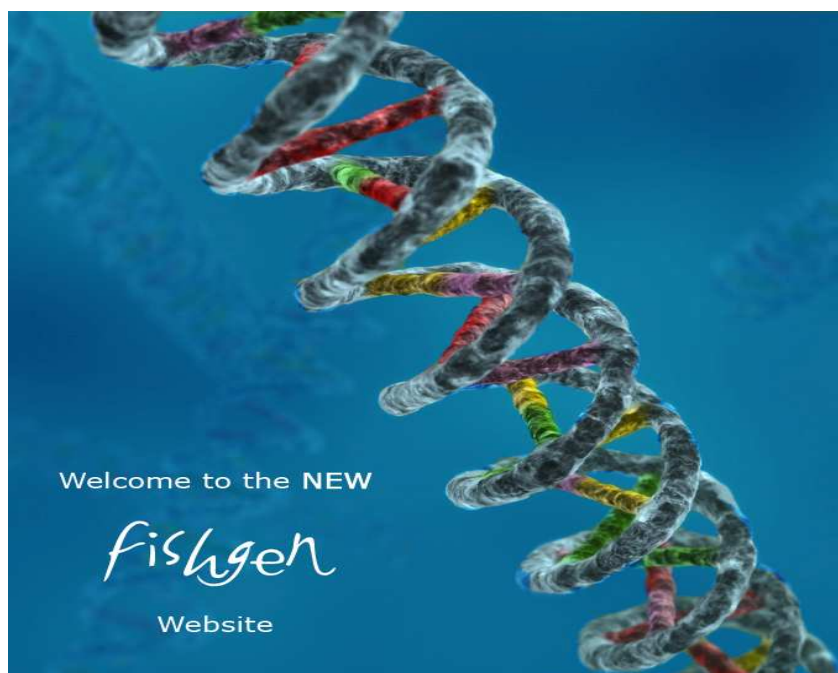


ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ -  
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ν. ΜΟΥΔΑΝΙΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ ΣΤΕΛΛΑ-ΣΥΛΒΑΝΑ

## ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ - ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΠΟ ΜΕΛΕΤΕΣ ΨΑΡΙΩΝ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΕΑ ΜΟΥΔΑΝΙΑ 2007

## **ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

- 1. Ιμσιρίδου Αναστασία (Επίκουρος Καθηγήτρια)**
- 2. Μίνος Γεώργιος (Επίκουρος Καθηγητής)**
- 3. Σκούφας Γεώργιος (Καθηγητής Εφαρμογών)**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	5
1.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	5
1.2. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ .....	6
1.3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΕΑΣ ΒΑΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	12
1.4. FISHGEN.....	13
1.5. FISHTRACE .....	14
1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΚΑΙ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ....	17
2.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΑΝΑΦΟΡΩΝ .....	19
2.3. ΕΞΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	19
2.4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ.....	20
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	46
6. SUMMARY .....	47
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	48

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό κέντρο της Ευρωπαϊκής Κοινότητας Joint Research Centre (Ispra – Ιταλία), κατά την περίοδο Ιούλιος 2005 – Ιανουάριος 2006. Η εργασία έγινε στα πλαίσια του προγράμματος FISHREG που πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Προστασίας και Ασφάλειας του Πολίτη (IPSC), και ειδικότερα στη μονάδα Agrifish.

Για το θέμα της εργασίας, τις απαραίτητες διορθώσεις καθώς και την ευκαιρία που μου δόθηκε να εργαστώ στην Ιταλία, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου κ. Αναστασία Ιμσιρίδου.

Για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την περίοδο εκπόνησης της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Νανά Κούρτη για την κατάλληλη επίβλεψη, τον κ. Philippe Carreau για το τεχνικό μέρος της εργασίας, καθώς και τον κ. Κωνσταντίνο Φούντο για τη συμπαράσταση και τις ιδέες που μου παρείχε.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Το ψάρι είναι μία από τις βασικές πηγές θρεπτικών, και οι αλιευτικές δραστηριότητες είναι σχεδόν τόσο παλιές όσο το ανθρώπινο είδος. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας οδήγησε στη βιομηχανοποιημένη αλιεία και στην υπερεκμετάλλευση πολλών ειδών, μερικά από τα οποία βρίσκονται στα όρια της εξαφάνισης. Η προστασία των πληθυσμών πολλών ειδών ψαριών έγινε ο πρωταρχικός στόχος στην αλιευτική πολιτική των αναπτυγμένων χωρών. Νέα επιστημονικά εργαλεία, βασισμένα στη γενετική και μοριακή βιολογία μπορούν να βοηθήσουν στην αναγνώριση των πληθυσμών που κινδυνεύουν.

Η τεχνολογική πρόοδος στη μοριακή βιολογία βοήθησε στην ανάπτυξη ποικιλίας γενετικών δεικτών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διαχείριση ειδών και πληθυσμών όπως π.χ. allozymes, RAPDs, VNTRs (minisatellites or microsatellites), RFLPs κλπ. Μερικές από τις εφαρμογές της χρήσης των δεικτών αυτών στη γενετική ανάλυση των ψαριών είναι: 1) ο προσδιορισμός των αποθεμάτων 2) η γενετική ταυτοποίηση πληθυσμών 3) η ανάλυση μεικτών αποθεμάτων 4) η γενετική μελέτη καλλιεργούμενων ειδών.

Μία από τις βασικές εξελίξεις στον τομέα της Γενετικής η οποία βοήθησε στην ανάπτυξη πλήθους γενετικών τεχνικών, υπήρξε η ανακάλυψη της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος αυτή ανακαλύφθηκε το 1983 και βασίζεται στη χρήση μιας θερμοσταθερής πολυμεράσης. Η μέθοδος συνίσταται στην ενζυματική ενίσχυση μιας ακολουθίας DNA με τη βοήθεια της πολυμεράσης και μικρών μονόκλωνων νουλεοτιδικών ακολουθιών, τους εκκινητές. Κάθε αντίδραση PCR αποτελείται από τρία στάδια: α) το στάδιο της αποδιάταξης όπου πραγματοποιείται η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA με αποτέλεσμα την λήψη δύο μονόκλωνων αλυσίδων DNA β) το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών όπου κάθε εκκινητής συνδέεται στη μονόκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί γ) το στάδιο της επιμήκυνσης των αλυσίδων DNA στους 72<sup>0</sup>C, όπου ξεκινάει η δράση της πολυμεράσης και εκτελείται η αντιγραφή του DNA. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται περίπου 30 φορές και κάθε φορά διπλασιάζεται το προϊόν του προηγούμενου κύκλου. Η τεχνική αυτή βοηθά τους επιστήμονες να μελετήσουν ακολουθίες DNA, ακόμα και εάν ένα πολύ μικρό κομμάτι ιστού είναι διαθέσιμο.

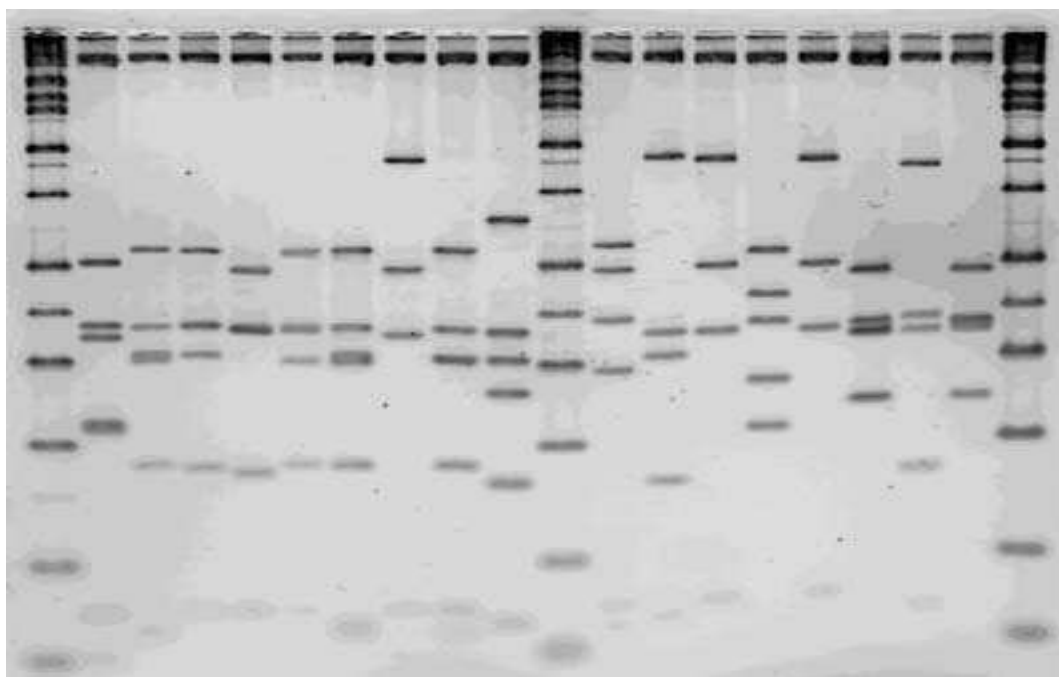
Επίσης η ανάπτυξη της μεθοδολογίας PCR, μειώνει κατά πολύ το χρόνο που χρειάζεται για τη λήψη τόσο μεγάλου αριθμού αντιγράφων DNA.

## 1.2. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

Οι κύριες γενετικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στη γενετική ανάλυση των ιχθυοαποθεμάτων είναι οι ακόλουθες:

### 1. Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται τόσο για την ανίχνευση πολυμορφισμού μέσα σε πληθυσμούς του ίδιου είδους, όσο και για τη διάκριση διαφορετικών ειδών. Κάθε αλληλουχία DNA περιλαμβάνει κάποιες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, οι οποίες αποτελούν θέσεις αναγνώρισης μιας ομάδας ειδικών ενζύμων που ονομάζονται ένζυμα περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά είναι ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν τις συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο DNA, και διασπών και τους δύο φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στην περιοχή αναγνώρισης. Ανάλογα με τον τρόπο κοπής δημιουργούν τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα. Οι αλλαγές στον αριθμό και το μέγεθος των θραυσμάτων (πολυμορφισμοί) προέρχονται κυρίως από αντικαταστάσεις μέσα στις θέσεις κοπής, από αναδιατάξεις ακολουθιών και από προσθήκες ή ελλείμματα. Το αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων είναι η δημιουργία ή η απώλεια θέσεων κοπής. Τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης. Η ανάγνωση της πηκτής αгарόζης γίνεται κυρίως με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (260 nm) (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** Περιοριστικό πρότυπο που προκύπτει μετά από μία ανάλυση RFLP

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την αναγνώριση διαφορετικών πληθυσμών ψαριών μέσα σε ένα είδος ή για τη διάκριση διαφορετικών ειδών. Τα κύρια στάδια μιας ανάλυσης RFLP είναι τα παρακάτω:

- Επιλογή της ακολουθίας του DNA που θα αναλυθεί
- Εξαγωγή DNA
- Πέψη του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού
- Διαχωρισμός των θραυσμάτων σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης
- Χρώση της πηκτής
- Ανάγνωση των αποτελεσμάτων

## **2. Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών (Allozyme analysis)**

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία από τις κύριες τεχνικές διαχωρισμού μορίων. Η μέθοδος βασίζεται στο διαφορετικό ηλεκτρικό φορτίο των πρωτεϊνών, και κατά συνέπεια στη διαφορετική κίνηση των μορίων τους σε ένα ηλεκτρικό πεδίο σταθερής

τάσης. Τα **ισοένζυμα** είναι πολλαπλές μοριακές μορφές ενός συγκεκριμένου ενζύμου που ανιχνεύονται είτε σε ένα άτομο, είτε σε διαφορετικά άτομα ενός είδους. Οι διαφορετικές πρωτεΐνες που αποτελούν μια ομάδα ισοενζύμων, έχουν παρόμοιες αλλά όχι απαραίτητα ακριβώς όμοιες ιδιότητες. Τα **αλλοένζυμα** είναι παρόμοιες μορφές του ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα (γονίδια) του ίδιου γονιδιακού τύπου.

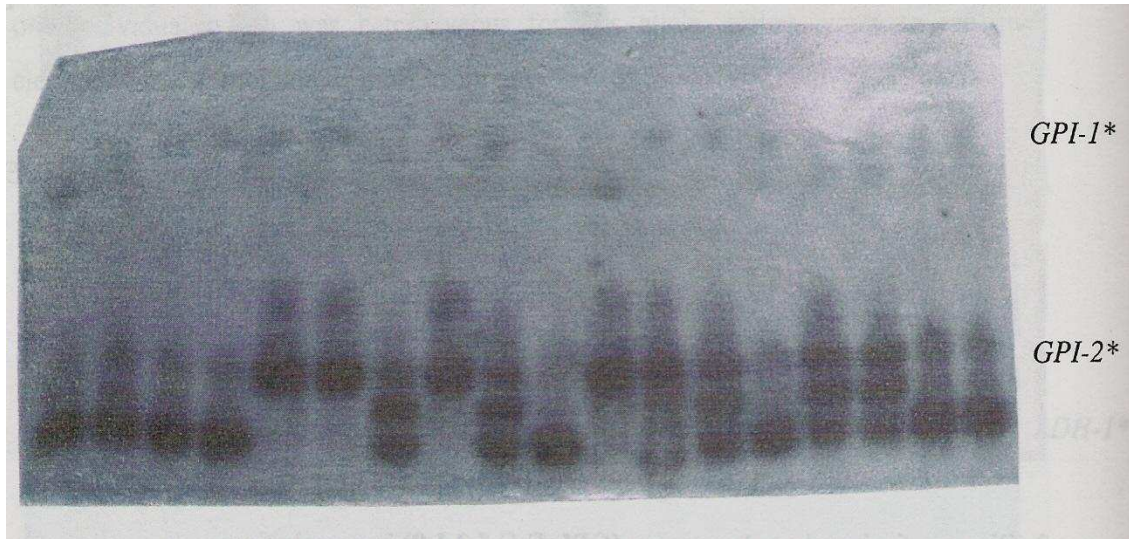
Οι δύο βασικές παραδοχές που γίνονται σε όλες τις αλλοενζυμικές μελέτες είναι οι εξής:

- α) Αλλαγές στην κινητικότητα των πρωτεϊνών σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, αντανακλούν αλλαγές στις κωδικοποιούσες ακολουθίες DNA αυτών των πρωτεϊνών
- β) Όλα τα αλληλόμορφα σε ένα γονιδιακό τόπο είναι συνυπερέχοντα, δηλαδή εκφράζονται. Οι μεταλλάξεις στο DNA μπορούν να μεταβάλλουν το σχήμα, το φορτίο, την καταλυτική δραστηριότητα αλλά και τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση φιλοδοξεί να ανιχνεύσει τις περισσότερες από αυτές τις αλλαγές (αν και αυτό είναι σχετικά δύσκολο με ένα μόνο σύστημα ηλεκτροφόρησης).

Για να αναλυθεί ένα αλλοένζυμο γίνεται χρήση ενός μικρού τμήματος ιστού, το οποίο ομογενοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά από το στάδιο αυτό απελευθερώνονται οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, και το υπερκείμενο διάλυμα φορτώνεται στην πηκτή για τη πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε πηκτή: α) αγαρόζης β) ακρυλαμίδης γ) αμύλου, ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που αναλύονται. Η πιο κοινή μέθοδος είναι η ηλεκτοφόρηση σε πηκτή αμύλου. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί χρώση της πηκτής, και τα διαφορετικά αλληλόμορφα αποτυπώνονται σαν ζώνες στην πηκτή (Εικόνα 2).

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά χρήσιμη γιατί απαιτεί μικρές ποσότητες υλικού, είναι γρήγορη και ακριβής. Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι ανιχνεύονται μόνο εκείνες οι μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε αλλαγή του φορτίου της πρωτεΐνης. Κύριες εφαρμογές της μεθόδου αυτής είναι: 1) η διαλεύκανση φυλογενετικών σχέσεων 2) η καταγραφή της γενετικής ποικιλότητας φυσικών πληθυσμών 3) η εύρεση διαγνωστικών πολυμορφικών δεικτών για τη διάκριση πληθυσμών διαφορετικής προέλευσης 4) η εξακρίβωση του υβριδισμού μεταξύ δύο ειδών





**Εικόνα 2.** Ηλεκτροφορητικό πρότυπο για το ένζυμο ισομεράση της φωσφογλυκόζης

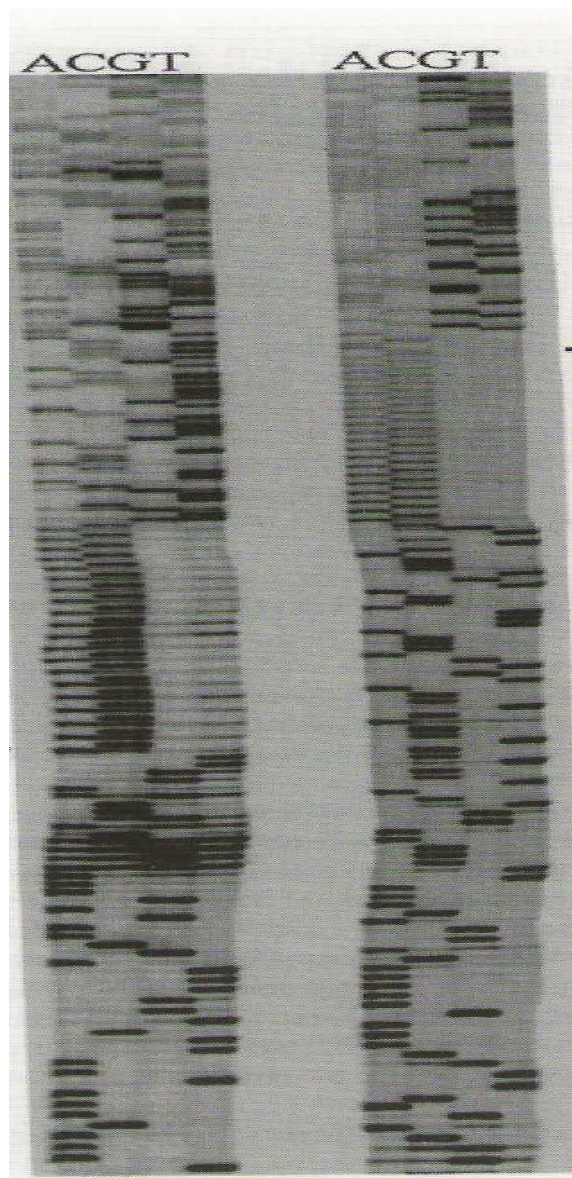
### **3. Ανάλυση πρωτοδιάταξης (Sequencing analysis)**

Η πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση πρωτοδιάταξης είναι η διδεοξυ-μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας, η οποία ανακαλύφθηκε από τον Frederick Sanger το 1979. Σε αυτή τη διαδικασία, ένας εκκινητής χρησιμοποιείται για την έναρξη της αντιγραφής μιας νέας αλυσίδας DNA. Ένα τμήμα DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα, ένα ολιγονουκλεοτίδιο ως εκκινητής, μία πολυμεράση για την αντιγραφή της αλυσίδας, 4 τροποποιημένα νουκλεοτίδια ddATP, ddTTP, ddCTP ddGTP και τέλος ένα ραδιενεργά σημασμένο νουκλεοτίδιο ( $^{35}\text{S}$ -sulphur-labeled dATP), το οποίο χρησιμεύει στην ανάγνωση της πηκτής με τη χρήση της αυτοραδιογραφίας.

Αφού ξεκινήσει η αντιγραφή του τμήματος του DNA, στη διαδικασία ενσωματώνονται τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια τα οποία είναι απαλλαγμένα από την ομάδα 3'-OH, οπότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σύνδεση με το επόμενο νουκλεοτίδιο και η επιμήκυνση της αλυσίδας σταματάει. Έτσι η σύνθεση του DNA θα τερματίζεται σε κάθε σημείο που ενσωματώνεται το τροποποιημένο νουκλεοτίδιο (ddNTP), και συνεπώς εκεί υπάρχει η αντίστοιχη βάση στο DNA (Εικόνα 3).

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε 4 σωλήνες, με την προσθήκη των διαφορετικών τροποποιημένων νουκλεοτιδίων ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP σε κάθε έναν από αυτούς. Με τη βοήθεια των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων σε συνδυασμό με τα κανονικά νουκλεοτίδια, γίνεται τερματισμός του πολυμερισμού στα

σημεία που βρίσκονται οι αντίστοιχες βάσεις. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, τα προϊόντα από τους 4 σωλήνες φορτώνονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης. Αφού μονιμοποιηθεί η πηκτή, ακολουθεί η ανάγνωση του προτύπου με τη μέθοδο της αυτοραδιογραφίας (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης για ανάλυση πρωτοδιάταξης

Η μέθοδος της ανάλυσης πρωτοδιάταξης αποτελεί την πιο άμεση μέθοδο ανίχνευσης πολυμορφισμών μέσα σε ένα πληθυσμό ψαριών, μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών σε ένα είδος, ή μεταξύ διαφορετικών ειδών.

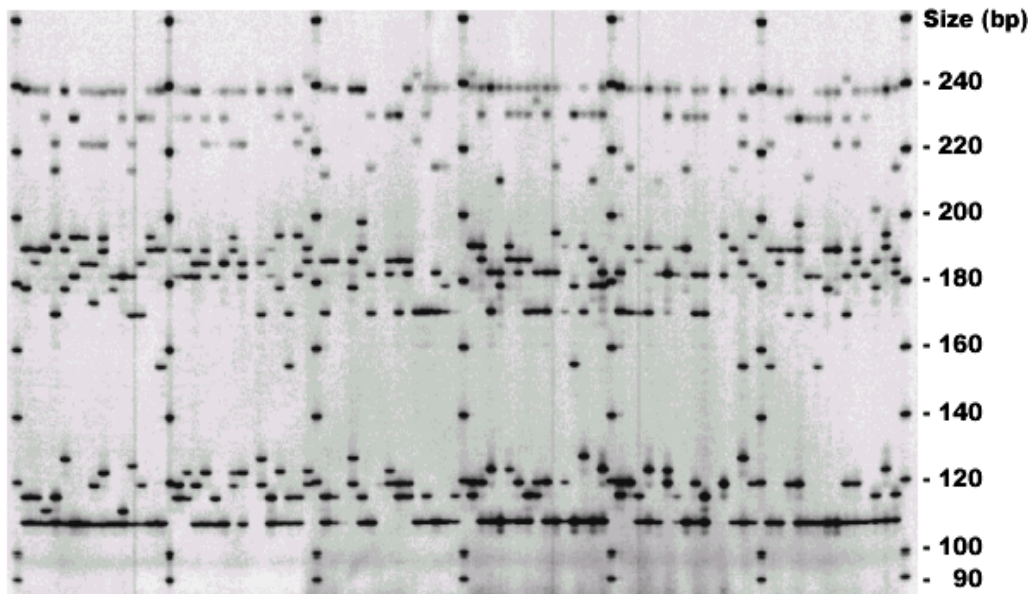
#### **4. Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite analysis)**

Η μέθοδος βασίζεται στην ανάλυση ακολουθιών του πυρηνικού DNA, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό τυχαίων επαναλήψεων και είναι γνωστές ως μικροδορυφορικό DNA. Το μικροδορυφορικό DNA αποτελείται από μονάδες 1-6 νουκλεοτιδίων, οι οποίες επαναλαμβάνονται έως και 100 φορές σε ένα τόπο. Το συνολικό τους μήκος δε ξεπερνά τα 300 νουκλεοτίδια και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό πολυμορφισμού.

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες – εξαιτίας του υψηλού βαθμού πολυμορφισμού που τους χαρακτηρίζει – μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ διαφορετικών ειδών, μεταξύ πληθυσμών ενός είδους καθώς και μεταξύ ατόμων ενός πληθυσμού. Τα διαφορετικά αλληλόμορφα σε ένα μικροδορυφορικό τόπο διαφέρουν στον αριθμό των τυχαίων επαναλήψεων των μονάδων νουκλεοτιδίων, και έτσι μπορούν να διαχωριστούν σε μία πηκτή πολυακρυλαμίδης σύμφωνα με το μέγεθός τους.

Τα βασικά βήματα για μία ανάλυση δορυφορικού DNA είναι τα εξής:

- Επιλογή του δορυφορικού τόπου που θα αναλυθεί.
- Ενίσχυση με την μέθοδο της PCR και χρήση κατάλληλων εκκινητών
- Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων
- Χρώση της πηκτής
- Ανάγνωση του προτύπου και διαχωρισμός των διαφορετικών αλληλομόρφων σε κάθε τόπο (Εικ. 4).



**Εικόνα 4.** Ανάλυση μικροδορυφορικού τόπου σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

### 1.3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΕΑΣ ΒΑΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα τεχνολογικά επιτεύγματα στη μοριακή βιολογία, βιοχημεία και γενετική, οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας πλειάδας γενετικών δεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να απαντήσουν ερωτήσεις σχετικά με τη διάκριση, διαχείριση και διατήρηση των ιχθυοαποθεμάτων. Ένας μεγάλος αριθμός από επιστημονικές εργασίες, σχετικές με τις εφαρμογές των γενετικών δεικτών στους ιχθυοπληθυσμούς, έχουν δημοσιευτεί. Ένας αυξανόμενος αριθμός από επιστημονικά δεδομένα που παρέχουν υποδείξεις για τη διαχείριση των ιχθυοαποθεμάτων, είναι διαθέσιμα.

Πολλά από αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι καταχωρημένα στα διάφορα εργαστήρια, όπου γίνονται οι αντίστοιχες αναλύσεις. Αυτό οδηγεί σε δυσκολίες στην πρόσβαση αυτών των δεδομένων από εξωτερικούς παράγοντες, καθώς επίσης και στον κίνδυνο απώλειας κάποιων στοιχείων με το πέρασμα του χρόνου. Έτσι δημιουργείται αναπόφευκτα η ανάγκη συγκέντρωσης και οργάνωσης όλης αυτής της πληροφορίας σε μία βάση δεδομένων, η οποία θα είναι προσβάσιμη σε ερευνητές, μοριακούς βιολόγους καθώς και σε όλη την επιστημονική κοινότητα.

Η βάση δεδομένων **FishTrace** σχεδιάστηκε σε συνεργασία με πολλά ευρωπαϊκά εργαστήρια, έτσι ώστε όλες οι πληροφορίες από τις γενετικές αναλύσεις να μπορέσουν να μεταφερθούν σε μια βάση δεδομένων προσβάσιμη μέσω του διαδικτύου. Βασικός στόχος της ιστοσελίδας FishTrace είναι να απαρτιστεί από



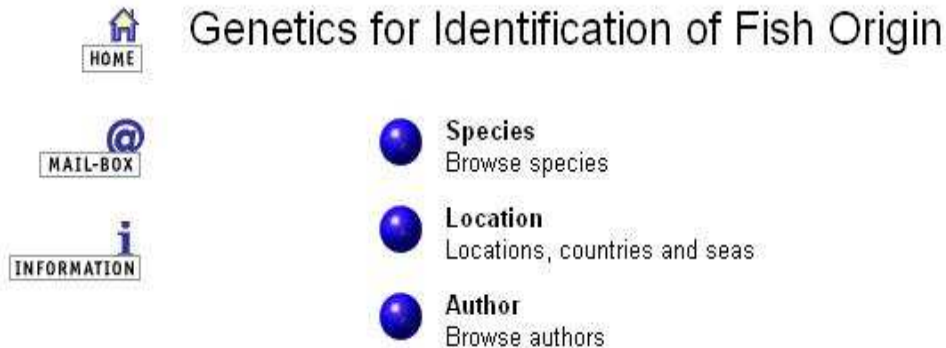
δεδομένα που αφορούν σύγχρονες μεθοδολογίες γενετικής, και εφαρμογές αυτών στη διάκριση και διαχείριση των ιχθυοπληθυσμών.

#### 1.4. FISHGEN

Η Fishgen (<http://fishgen.jrc.it>) είναι μια βάση δεδομένων η οποία περιέχει δεδομένα από γενετικές μελέτες σε έντεκα είδη ψαριών: *Clupea harengus*, *Diplodus sargus*, *Esox lucius*, *Gadus morhua*, *Leuciscus cephalus*, *Merlangius merlangus*, *Merluccius merluccius*, *Oncorhynchus keta*, *Oncorhynchus tshawytscha*, *Salmo salar*, *Salmo trutta* (Imsiridou et al., 2003). Περιέχει στοιχεία τα οποία αφορούν διαφορετικές τεχνικές και μεθοδολογίες οι οποίες εφαρμόζονται σήμερα στη γενετική των ψαριών: α) δεδομένα πρωτεϊνικής ανάλυσης β) δεδομένα πολυμορφισμού μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) γ) δεδομένα ανάλυσης πρωτοδιάταξης δ) δεδομένα ανάλυσης μικροδορυφορικού DNA. Στην Εικόνα 5 φαίνεται η κεντρική σελίδα της Fishgen με τα τρία διαφορετικά παράθυρα χρήσης.

Κύριος στόχος αυτής της δουλειάς ήταν η δημιουργία μιας πρωτότυπης βάσης, έτσι ώστε να δοθεί στους ερευνητές και στις αρμόδιες αρχές η δυνατότητα χρήσης της ως μια πηγή πληροφοριών για τη γενετική διάκριση ιχθυοαποθεμάτων. Επιπλέον, η βάση επιτρέπει στους ερευνητές οι οποίοι εργάζονται για την ταυτοποίηση της προέλευσης ενός πληθυσμού ψαριών, να έχουν γρήγορη και αποτελεσματική πρόσβαση στην πληροφορία που αφορά τα υλικά, τις μεθόδους και τα αποτελέσματα της μελέτης για τα είδη που τους ενδιαφέρουν.

Τα δεδομένα για τη Fishgen συλλέχθηκαν μόνο από βιβλιογραφικές πηγές. **Όλα τα υπάρχοντα δεδομένα αυτής της βάσης για τα έντεκα είδη ψαριών, μεταφέρθηκαν στη καινούργια βάση δεδομένων που ονομάζεται FishTrace.**



European Commission, Joint Research Center  
Institute for Systems, Informatics and Safety & Environment Institute  
Please report any problem to the [Webmaster](#)

**Εικόνα 5.** Η αρχική σελίδα της Fishgen

### 1.5. FISHTRACE

Η FishTrace είναι ένας γενετικός κατάλογος που αφορά πάνω από 200 εμπορικά είδη ψαριών. Ο κύριος στόχος δημιουργίας αυτής της βάσης δεδομένων ήταν να δημιουργηθεί ένας γενετικός κατάλογος από αντιπροσωπευτικά ευρωπαϊκά ευρύαλα είδη ψαριών, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της προέλευσης πληθυσμών ψαριών και αλιευτικών προϊόντων. Γενετικές και αλλά ταξινομικές πληροφορίες είναι συγκεντρωμένες σε μια διαδικτυακή βάση δεδομένων. Άλλοι αντικειμενικοί στόχοι της δουλειάς αυτής είναι:

- Να καθιερωθεί μια δημόσια προσιτή βάση δεδομένων, η οποία συλλέγει τη νέα πληροφορία που παράγεται στο διαδίκτυο
- Να χρησιμοποιηθεί η βιολογική πληροφορία σαν ένας εναλλακτικός τρόπος ελέγχου της προέλευσης πληθυσμών ψαριών

- Να χρησιμοποιηθεί η συγκεντρωμένη πληροφορία έτσι ώστε να προσφέρει βοήθεια στις ευρωπαϊκές αρχές σχετικά με τα ιχθυοαποθέματα, την ανιχνευσιμότητα των αλιευτικών προϊόντων και την προστασία του περιβάλλοντος

Όλα τα δεδομένα της Fishgen μεταφέρθηκαν στη νέα βάση FishTrace. Η επιπλέον γενετική πληροφορία που περιέχει η FishTrace προέρχεται από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου για το κυτόχρωμα β (cytochrome b - 1141bp) του μιτοχονδριακού DNA, καθώς και από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του πυρηνικού γονιδίου για τη ροδοψίνη (rhodopsin - 514bp). Η συλλογή των πληθυσμών λαμβάνει χώρα σε όλη την έκταση της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Έως και σήμερα, 2.700 άτομα από 400 διαφορετικά είδη έχουν αλιευτεί. Πολλά ευρωπαϊκά εργαστήρια έχουν αναλάβει την ταξινομική και τη γενετική ανάλυση των δειγμάτων αυτών. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων εισάγονται στη βάση δεδομένων του Joint Research Centre (Ιταλία), μέσω της ιστοσελίδας της FishTrace.

The image shows the homepage of the FishTrace database. At the top, it reads "Genetic Catalogue, Biological Reference Collections" and "Online Database of European Marine Fishes". Below this, there is a search section with two input fields: "By scientific name" and "By common name (ex: *Bigeye tuna*)". The "MOLECULAR IDENTIFICATION TOOLS" section includes "BLAST", "RFLP", and "TREE". The "MORPHOLOGICAL TOOL" section features a diagram of a fish's body with labels for "Anal Fin", "Dorsal Fin", "Caudal Region", "Trunk Region", and "Head Region".

Εικόνα 6. Η αρχική σελίδα της FishTrace

## 1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας δουλειάς συνίσταται στα παρακάτω:

- Οργάνωση και σχεδιασμός ιστοσελίδων για την εισαγωγή των δεδομένων στη FishTrace
- Μεταφορά γενετικών δεδομένων για **11 είδη ψαριών**, από την υπάρχουσα βάση δεδομένων Fishgen στη νέα βάση FishTrace
- Συλλογή βιβλιογραφίας και εξαγωγή αντίστοιχων δεδομένων για **13 νέα είδη ψαριών**
- Εισαγωγή γενετικής πληροφορίας στη νέα βάση FishTrace, για επιπλέον 13 εμπορικά είδη ψαριών



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΚΑΙ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Αρχικά έγινε η επιλογή των τεχνικών και μεθοδολογιών, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη γενετική ταυτοποίηση διαφορετικών πληθυσμών ψαριών. Οι τεχνικές αυτές είναι οι ακόλουθες: Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP), ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing analysis), ηλεκτοφορητική ανάλυση πρωτεϊνών (allozyme analysis) και ανάλυση μικροδορυφορικού DNA (microsatellite analysis). Από την κάθε μεθοδολογία επιλέχθηκαν τα στοιχεία εκείνα που είναι απαραίτητα: α) για τη γενετική ταυτοποίηση ενός πληθυσμού ψαριών β) για την ακριβή επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας από έναν ερευνητή. Παρακάτω δίνονται τα επιλεγμένα στοιχεία της βάσης δεδομένων για την κάθε γενετική τεχνική. Η επεξήγηση των στοιχείων ακολουθεί στην ενότητα 2.4

#### ➤ **RFLP**

- Sample size
- DNA extraction
- Statistics
- Diversity
- Segment
- PCR conditions
- Method
- Primers
- Total enzymes
- Restriction enzymes
- Fragment pattern

#### ➤ **Allozyme**

- Statistics

- Enzymes
- Elect. Buffer
- Loci
- Tissue
- Sample size
- Hexp
- Allele
- Frequency

### ➤ **Sequencing**

- Sample size
- DNA extraction
- DNA Segment
- PCR conditions
- PCR Primers
- Amplified size
- DNA purification
- Sequencing primers
- Sequencing size
- Method
- Symbol
- DNA sequence
- Frequency
- Statistics

### ➤ **Microsatellite**

- Total loci
- DNA extraction
- Method
- Mean number of alleles
- Mean H observed

- Mean H expected
- Locus
- PCR conditions
- Sample size
- Repeat composition
- Primers
- Number of alleles
- Hobserved
- Hexpected
- Alleles
- Frequency

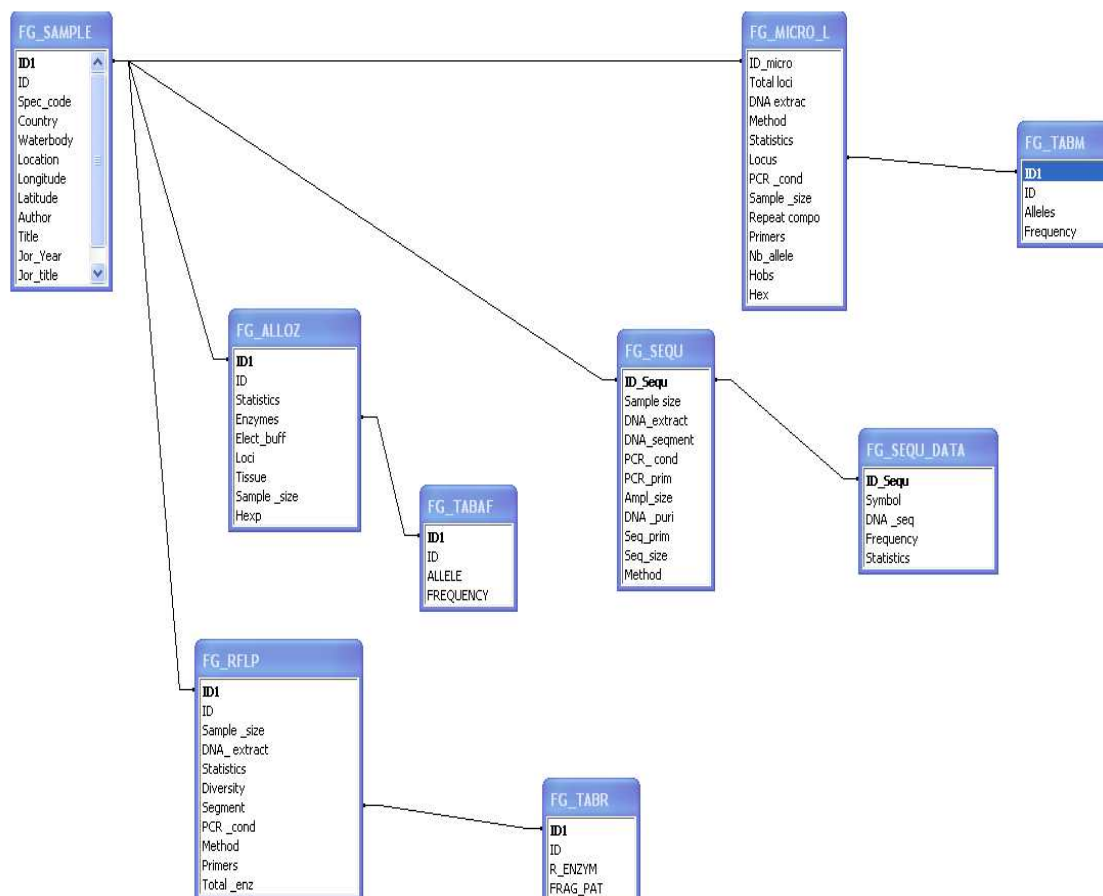
## **2.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΑΝΑΦΟΡΩΝ**

Αναζητήθηκαν οι κατάλληλες επιστημονικές εργασίες οι οποίες αναφέρονται σε εμπορικά είδη ιχθύων, και περιέχουν τα παραπάνω δεδομένα. Η έρευνα έγινε με τη βοήθεια του διαδικτύου (μηχανές αναζήτησης, σελίδες όπως η [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) κλπ). Τα κριτήρια με τα οποία έγινε η επιλογή των εργασιών ήταν τα εξής: α) να αναφέρονται σε μία από τις τέσσερις γενετικές τεχνικές β) να περιέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό των προαναφερόμενων δεδομένων γ) να αφορούν κυρίως εμπορεύσιμα είδη δ) τα δεδομένα τους να αναφέρονται στην διάκριση πληθυσμών στο ίδιο είδος.

## **2.3. ΕΞΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Αφού συλλέχθηκαν όλες οι εργασίες (για 13 νέα είδη ψαριών) που πληρούσαν τα προαναφερόμενα κριτήρια, έγινε εξαγωγή των απαραίτητων δεδομένων. Η εξαγωγή πραγματοποιήθηκε μετά από μελέτη όλων των εργασιών, καθώς και συμβολή άλλων εργασιών των οποίων δεδομένα δε χρησιμοποιήθηκαν. Στη συνέχεια έγινε εκτίμηση του όγκου των δεδομένων και σχεδιάστηκε με τη χρήση του πακέτου Microsoft Office Access 2003, η αλληλουχία των πινάκων που οδήγησαν στη τελική μορφή της ιστοσελίδας (Εικ. 7). Η σελίδα αυτή θα πρέπει να είναι εύκολη στη χρήση, τα

δεδομένα πρέπει να είναι τοποθετημένα σε μία συγκεκριμένη σειρά, ακολουθώντας τη σειρά της πειραματικής μεθοδολογίας στην οποία αναφέρονται.



**Εικόνα 7.** Σύνδεση των πινάκων με τη χρήση του πακέτου Microsoft Office Access 2003

#### 2.4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ

Μετά τη συλλογή των δεδομένων, δημιουργήθηκε μια ιστοσελίδα που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή των στοιχείων στη βάση δεδομένων FishTrace. (<http://infoweb.jrc.it/FG2trace/>) (Εικ. 8). Η σελίδα αυτή περιέχει πέντε κύριες επιλογές με αρκετές υποενοότητες.



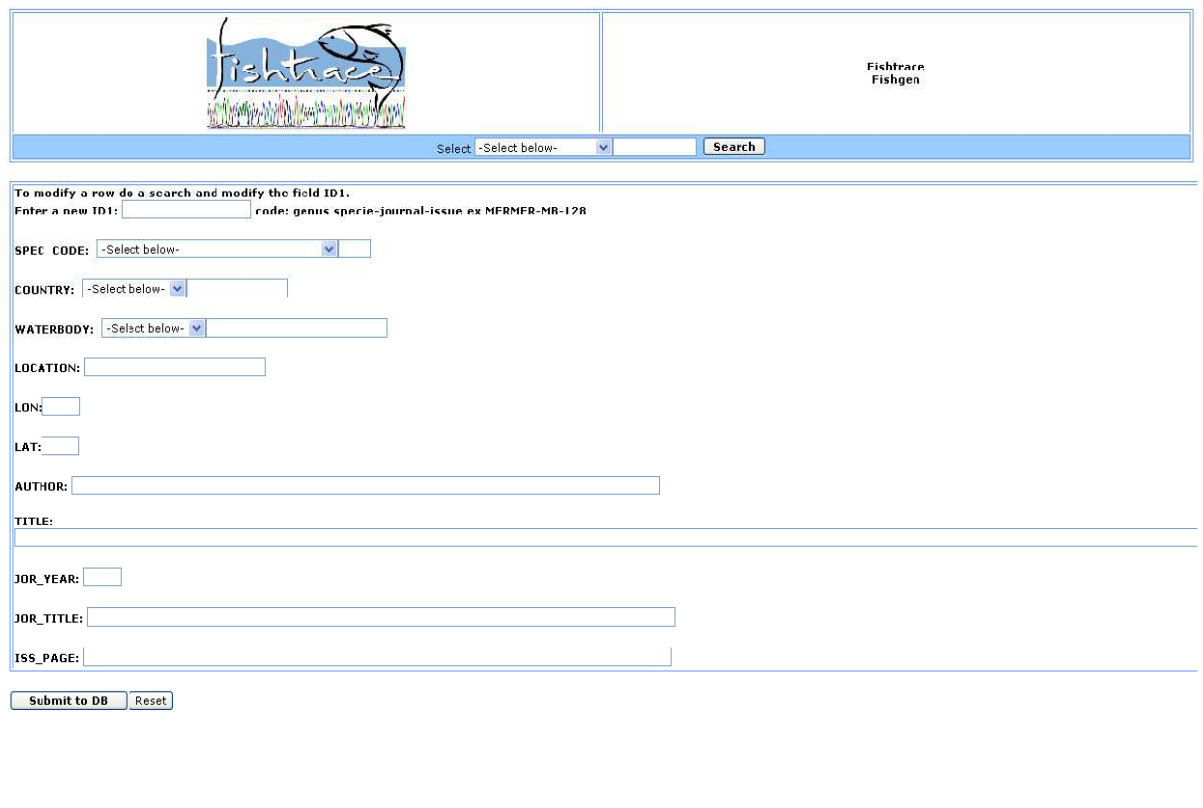
**Εικόνα 8.** Η κύρια ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων (<http://infoweb.jrc.it/FG2trace/>)

Αρχικά υπάρχει η κύρια επιλογή (Main Table) με δύο υποενότητες: a) Sample data b) Delete sample data. Η πρώτη υποενότητα περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 9):

- **ID code:** Περιέχει ένα μοναδικό κωδικό που δημιουργήθηκε για την εύκολη εισαγωγή και εύρεση δεδομένων στην σελίδα.
- **Species code:** περιέχει το επιστημονικό όνομα κάθε είδους καθώς και ένα κωδικό αριθμό για αυτό.
- **Country:** περιέχει τη χώρα στην οποία αλιεύθηκε το κάθε είδος.
- **Waterbody:** περιέχει τον τύπο του υδάτινου οικοσυστήματος (θάλασσα, λίμνη, ποτάμι) στο οποίο αλιεύθηκε το κάθε είδος.
- **Location:** αναφέρεται στην ακριβή περιοχή δειγματοληψίας για το κάθε είδος.

- **Longitude - latitude:** περιέχει το γεωγραφικό μήκος και το γεωγραφικό πλάτος της κάθε περιοχής δειγματοληψίας.
- **Author:** περιέχει το όνομα ή τα ονόματα των συγγραφέων που έγραψαν την επιστημονική εργασία, από την οποία εξήχθησαν τα δεδομένα.
- **Title:** περιέχει τον τίτλο της επιστημονικής εργασίας.
- **Journal year:** αναφέρεται στο έτος στο οποίο δημοσιεύτηκε η εργασία.
- **Journal title:** αναφέρεται στον τίτλο του περιοδικού όπου δημοσιεύτηκε η εργασία.
- **Issue-Pages:** αναφέρεται στο τεύχος του περιοδικού όπου δημοσιεύτηκε η εργασία καθώς και τον ακριβή αριθμό των σελίδων που αυτή καταλαμβάνει.

Η δεύτερη υποενότητα δημιουργήθηκε για τη διαγραφή των λανθασμένων στοιχείων που ενδέχεται να εισαχθούν στην ιστοσελίδα.



The screenshot shows the Fishbase website interface. At the top, there is a logo for Fishbase and the text 'Fishbase Fishgen'. Below the logo is a search bar with a dropdown menu and a 'Search' button. The main content area is titled 'To modify a row do a search and modify the field ID1.' and contains a form with the following fields:

- Enter a new ID1:  code: genus specie-journal-issue ex MFRMER-MR-12R
- SPEC CODE:  -Select below-
- COUNTRY:  -Select below-
- WATERBODY:  -Select below-
- LOCATION:
- LON:
- LAT:
- AUTHOR:
- TITLE:
- JOR\_YEAR:
- JOR\_TITLE:
- ISS\_PAGE:

At the bottom of the form, there are two buttons: 'Submit to DB' and 'Reset'.

**Εικόνα 9.** Η υποενότητα Sample data

Η δεύτερη βασική επιλογή είναι η RFLPs information και αποτελείται από δύο υποενότητες α) RFLP data β) Restriction enzyme & fragment pattern data. Η υποενότητα RFLP data περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 10):

- **ID RFLP:** Περιέχει ένα μοναδικό κωδικό που δημιουργήθηκε για την εύκολη εισαγωγή και εύρεση δεδομένων στη σελίδα.
- **Sample size:** Ορίζεται ως ο αριθμός των ατόμων που εξετάστηκαν σε κάθε πληθυσμό.
- **DNA extraction:** Περιέχει τον τύπο του DNA (μιτοχονδριακό ή γενωματικό) που χρησιμοποιήθηκε καθώς και τον ιστό από τον οποίο έγινε η εξαγωγή DNA.
- **Statistics:** Περιέχει τους απλότυπους που βρέθηκαν σε κάθε πληθυσμό καθώς και τις συχνότητές τους.
- **Diversity:** Δίνει τις τιμές της απλοτυπικής ποικιλότητας και της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας σε κάθε πληθυσμό.
- **Segment:** Είναι το τμήμα του μιτοχονδριακού DNA που έχει ενισχυθεί με τη μέθοδο της PCR και στη συνέχεια έχει κοπεί με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού.
- **PCR conditions:** Περιγράφει τις συνθήκες PCR με τις οποίες έγινε η ενίσχυση του τμήματος του μιτοχονδριακού DNA. Κάθε αντίδραση PCR περιέχει το στάδιο της αποδιάταξης, το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών και το στάδιο επιμήκυνσης της αλυσίδας.
- **Method:** Αναφέρεται στο είδος της ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των θραυσμάτων του DNA.
- **Primers:** Οι εκκινητές είναι μικρές μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες που συνδέονται στην ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, εφ' όσον είναι συμπληρωματικές με τα δύο αντίθετα άκρα αυτής. Το πεδίο αυτό δίνει τις ακολουθίες των εκκινητών.
- **Total enzymes:** Αναφέρεται στο συνολικό αριθμό των ενζύμων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο κάθε τμήματος mtDNA.

Select FG\_SAMPLE ID:

ID\_RFLP:  ID FG\_SAMPLE + a number

SAMPLE\_SIZE:

DNA\_EXTRACT:

STATISTICS:

DIVERSITY:

SEGMENT:

PCR\_COND:

METHOD:

PRIMERS:

TOTAL\_ENZY:

**Εικόνα 10.** Η υποενοότητα RFLP data

Η υποενοότητα Restriction enzyme & fragment pattern data περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 11):

- **Restriction enzymes:** Περιέχει τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει η πέψη του κάθε τμήματος του mtDNA.
- **Fragment pattern:** Περιγράφει τα περιοριστικά πρότυπα που προκύπτουν μετά από την πέψη κάθε τμήματος mtDNA με ένα ένζυμο περιορισμού. Κάθε πρότυπο συμβολίζεται με ένα κεφαλαίο γράμμα και περιέχει τα διαφορετικά θραύσματα DNA (σε ζεύγη βάσεων), που προκύπτουν μετά από την πέψη.



The screenshot shows the 'Fishtrace' web application interface. At the top left is the 'fishtrace' logo. To the right, the text reads 'Fishtrace Fishgen table restr enzyme and Frag pattern data entry'. Below this is a search bar with a dropdown menu labeled 'Select ID -Select below-' and a 'Search' button. The main form area contains several input fields: 'ID:' with a text box, 'Select FG\_RFLP ID' with a dropdown menu, 'R\_ENZYM:' with a large text area, and 'FRAG\_PAT:' with another large text area. At the bottom of the form are two buttons: 'Submit to DB' and 'Reset'.

**Εικόνα 11.** Η υποενότητα Restriction enzyme & fragment pattern data

Η τρίτη βασική επιλογή είναι Allozyme information με τις εξής υποενότητες: α) allozyme data β) allele frequency data. Η υποενότητα allozyme data περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 12):

- **Statistics:** Περιέχει το συνολικό αριθμό των γονιδιακών τόπων που εξετάστηκαν για κάθε πληθυσμό, την παρατηρούμενη (H observed) και την αναμενόμενη (H expected) ετεροζυγωτία στον πληθυσμό, καθώς και το ποσοστό των πολυμορφικών γονιδιακών τόπων (Polymorphic loci) στον πληθυσμό.
- **Enzymes:** Περιέχει το ένζυμο, την συντομογραφία του καθώς και τον αριθμό EC που του αντιστοιχεί.
- **Elect. Buffer:** Περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό του ενζύμου.
- **Loci:** Δίνει τους γονιδιακούς τόπους που εντοπίστηκαν για το συγκεκριμένο ένζυμο, σε κάθε ιστό.
- **Tissue:** Είναι ο ιστός που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση, και στον οποίο εκφράζεται ο συγκεκριμένος γονιδιακός τόπος.
- **Sample size:** Είναι ο συνολικός αριθμός των ατόμων που εξετάστηκαν για κάθε γονιδιακό τόπο.

- **Hexp**: Δίνει την τιμή της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας σε ένα γονιδιακό τόπο. Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία σε ένα τόπο γονιδιακό δίνεται από την εξίσωση:  $h = 2N(1 - \sum x_i^2) / (2N - 1)$  όπου  $x_i$  είναι η συχνότητα του αλληλόμορφου  $i$ ,  $N$  είναι τα άτομα του πληθυσμού που εξετάστηκαν για αυτό το γονιδιακό τόπο και  $\sum$  είναι το σύνολο όλων των αλληλόμορφων στο γονιδιακό τόπο.

**Εικόνα 12.** Η υποενότητα allozyme data

Η υποενότητα allele frequency data περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 13):

- **Allele**: Το πεδίο αυτό δίνει τα διαφορετικά αλληλόμορφα που βρέθηκαν σε κάθε γονιδιακό τόπο. Τα αλληλόμορφα περιγράφονται με αριθμούς, οι οποίοι δηλώνουν τη διαφορετική κινητικότητα τους στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Το πιο κοινό αλληλόμορφο περιγράφεται με τον αριθμό 100.
- **Frequency**: Περιέχει τη συχνότητα του κάθε αλληλομόρφου, η οποία δίνεται από την εξίσωση  $x_i = (2H_o + H_e) / 2N$ , όπου  $H_o$  είναι ο αριθμός των ομοζυγωτικών ατόμων,  $H_e$  είναι ο αριθμός των ετεροζυγωτικών ατόμων και  $N$  είναι το πληθυσμιακό δείγμα.

The image shows a web interface for 'Fishtrace'. At the top left is a logo featuring a fish and a DNA bar chart with the word 'fishtrace' written across it. To the right of the logo, the text reads 'Fishtrace Fishgen table allele Frequency data entry'. Below the logo and title is a search bar with a dropdown menu labeled 'Select FG\_ALLOZ ID -Select below-' and a 'Search' button. Below the search bar is a larger form area containing another dropdown menu for 'Select FG\_ALLOZ ID -Select below-', a text input field for 'Create or view ID:', a text input field for 'ALLELE:', and a text input field for 'FREQUENCY:'. At the bottom of the form are two buttons: 'Submit to DB' and 'Reset'.

**Εικόνα 13.** Η υποενότητα allele frequency data

Η τέταρτη βασική επιλογή είναι Sequencing information με τις εξής υποενότητες:  
 α) sequencing β) sequencing data. Η υποενότητα sequencing περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 14):

- **Sample size:** Είναι ο συνολικός αριθμός των ατόμων που εξετάστηκαν για το συγκεκριμένο πληθυσμό.
- **DNA extraction:** περιέχει τον τύπο του DNA (μιτοχονδριακό ή γενωματικό) που χρησιμοποιήθηκε καθώς και τον ιστό από τον οποίο έγινε η εξαγωγή DNA.
- **DNA Segment:** Είναι το τμήμα του μιτοχονδριακού DNA που έχει ενισχυθεί με την μέθοδο της PCR και στη συνέχεια αναλύθηκε με τη μέθοδο της πρωτοδιάταξης.
- **PCR conditions:** Περιγράφει τις συνθήκες PCR με τις οποίες έγινε η ενίσχυση του τμήματος του μιτοχονδριακού DNA. Κάθε αντίδραση PCR περιέχει το στάδιο της αποδιάταξης, το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών και το στάδιο επιμήκυνσης της αλυσίδας.

- **PCR Primers:** Οι εκκινητές είναι μικρές μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες που συνδέονται στην ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, εφ' όσον είναι συμπληρωματικές με τα δύο αντίθετα άκρα αυτής. Το πεδίο αυτό δίνει τις ακολουθίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση PCR.
- **Amplified size:** Είναι το μέγεθος σε ζεύγη βάσεων, του τμήματος που έχει ενισχυθεί με την αντίδραση PCR.
- **DNA purification:** Το πεδίο αυτό δίνει τη μέθοδο με την οποία γίνεται ο καθαρισμός του προϊόντος PCR.
- **Sequencing primers:** Αναφέρεται στους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση πρωτοδιάταξης του ενισχυμένου προϊόντος (ολόκληρου ή τμήματος αυτού). Ο διαχωρισμός από τους εκκινητές της PCR γίνεται γιατί ορισμένες φορές χρησιμοποιούνται άλλοι εσωτερικοί εκκινητές, για την ανάλυση τμήματος του ενισχυμένου προϊόντος PCR.
- **Sequencing size:** Είναι το μέγεθος σε ζεύγη βάσεων, του τμήματος που έχει αναλυθεί με τη τεχνική της πρωτοδιάταξης.
- **Method:** Περιέχει το kit εμπορίου που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση πρωτοδιάταξης, καθώς επίσης και τον τύπο της πηκτής πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε για τον ηλεκτοφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων πρωτοδιάταξης.

Select FG\_SAMPLE ID:

ID\_SEQU:  ID FG\_SAMPLE + a number

Total number of individuals tested for this location  
 SAMPLE\_SIZE:

Tissue from which the DNA has been extracted and the DNA type  
 DNA\_EXTRACT:

Parts of the mitochondrial DNA that have been amplified with the PCR and sequenced  
 DNA\_SEGMENT:

Refer to specific mtDNA segment  
 PCR\_COND:

Primer H: short, synthetic piece of RNA that exactly matches and flanks the heavy strand of mtDNA part, to be amplified.  
 Primer L: short, synthetic piece of RNA that exactly matches and flanks the light strand of mtDNA part, to be amplified  
 PCR\_PRIM:

Amplified size of the segment  
 AMPL\_SIZE:

Method used for purifying the PCR product  
 DNA\_PURIFICATION:

Primer H: is the primer used for sequencing a part of the heavy strand of the PCR product.  
 Primer L: is the primer used for sequencing a part of the light strand of the PCR product  
 SEQ\_PRIM:

Size in basepairs of the segment sequenced  
 SEQ\_SIZE:

Includes the sequencing kit  
 KMETHOD:

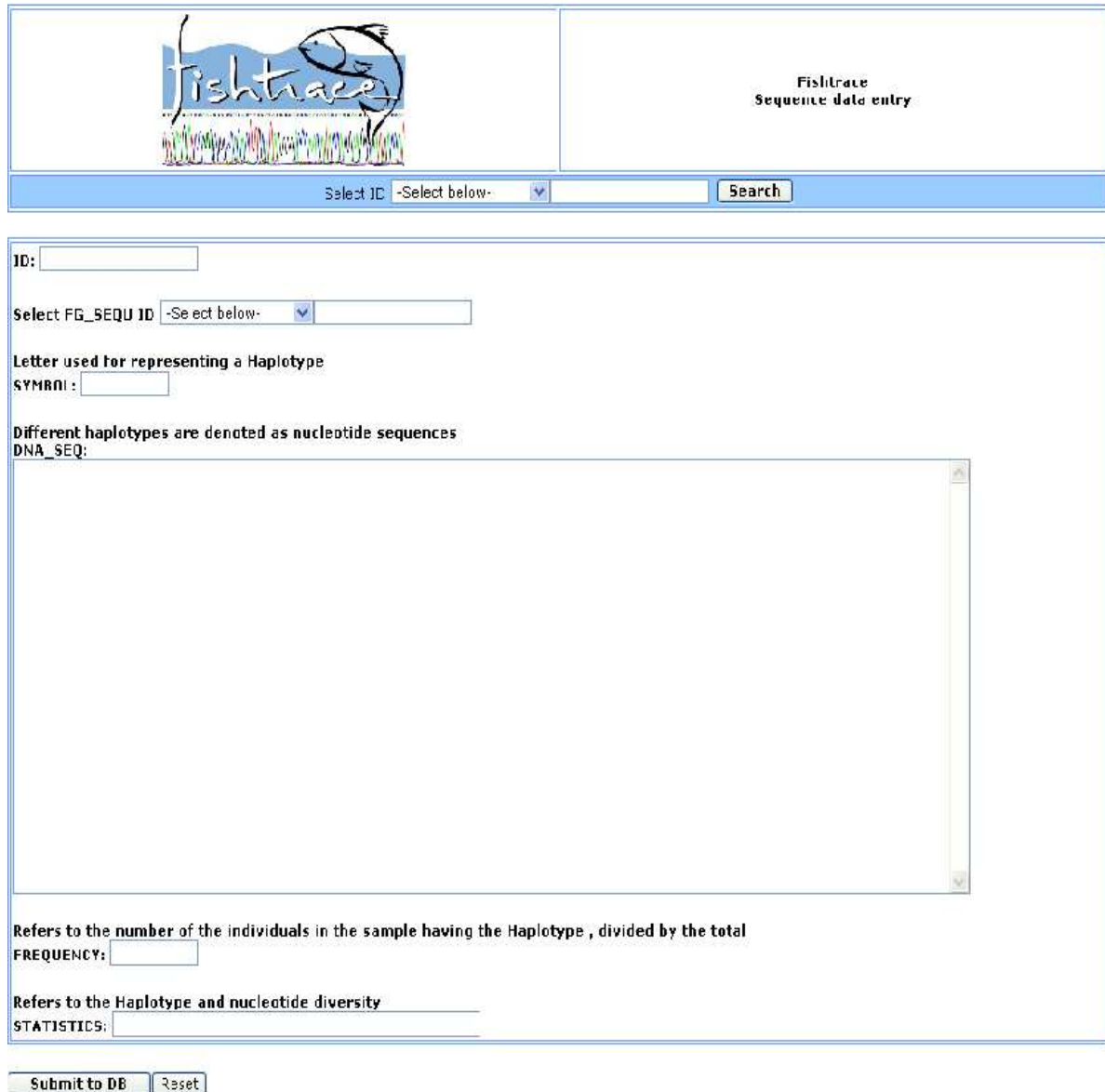
#### Εικόνα 14. Η υποενότητα sequencing

Η υποενότητα sequencing data περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 15):

- **Symbol:** Είναι ένα γράμμα που δηλώνει τον κάθε απλότυπο.
- **DNA sequence:** Οι διαφορετικοί απλότυποι παρουσιάζονται ως νουκλεοτιδικές ακολουθίες.
- **Frequency:** Το πεδίο αυτό δίνει τη συχνότητα του κάθε απλοτύπου μέσα στον πληθυσμό (αριθμός των ατόμων σε ένα πληθυσμό που παρουσιάζουν τον

συγκεκριμένο απλότυπο, διαιρούμενο με το συνολικό αριθμό ατόμων του πληθυσμού).

ο **Statistics**: Δίνει τις τιμές της απλοτυπικής ποικιλότητας και της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας σε κάθε πληθυσμό.

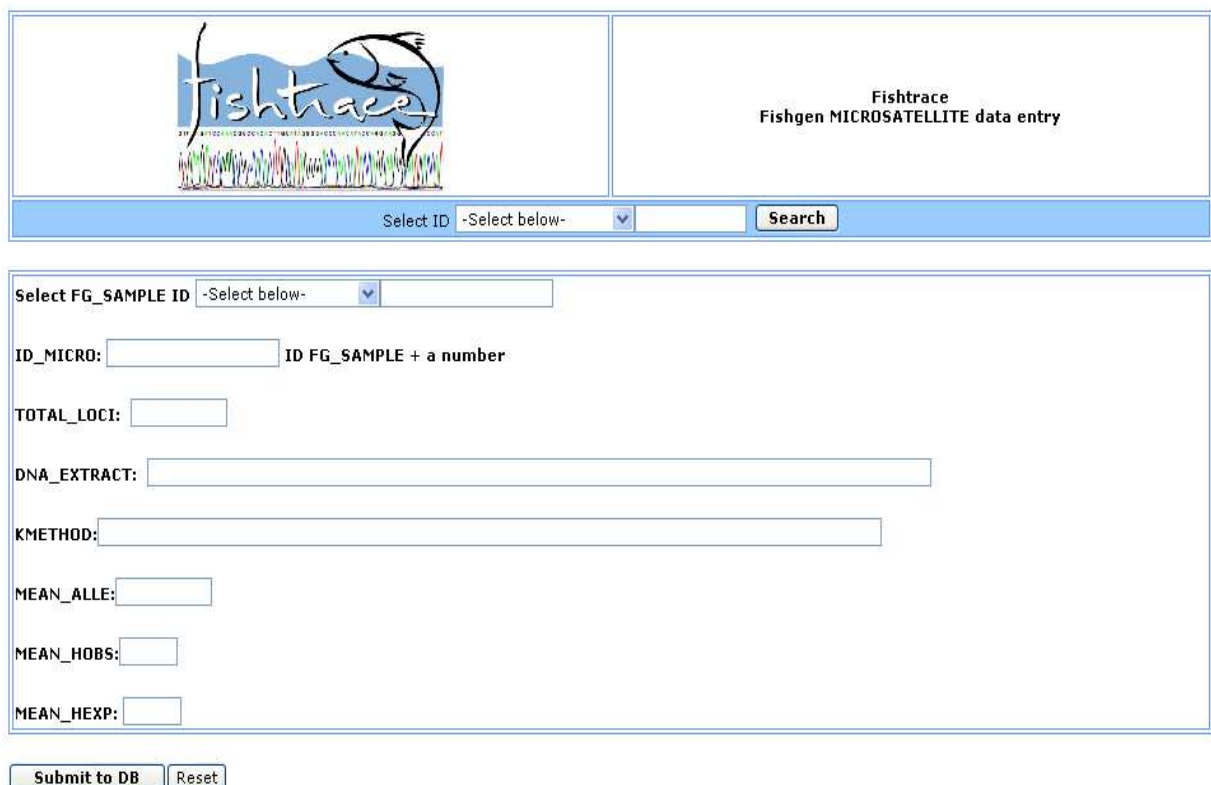


The screenshot shows the Fishtrace web interface. At the top left is the Fishtrace logo, which includes a fish and a bar chart. To the right of the logo is the text "Fishtrace Sequence data entry". Below the logo is a search bar with a dropdown menu labeled "Select ID" and a "Search" button. The main content area contains several input fields and labels: "ID:" followed by a text box; "Select FG\_SEQU ID" followed by a dropdown menu; "Letter used for representing a Haplotype" followed by a text box labeled "SYMBOL"; "Different haplotypes are denoted as nucleotide sequences" followed by a text box labeled "DNA\_SEQ"; "Refers to the number of the individuals in the sample having the Haplotype, divided by the total" followed by a text box labeled "FREQUENCY"; and "Refers to the Haplotype and nucleotide diversity" followed by a text box labeled "STATISTICS". At the bottom of the form are two buttons: "Submit to DB" and "Reset".

**Εικόνα 15.** Η υποενότητα sequencing data

Η τελευταία βασική επιλογή είναι Microsatellite information με τις εξής υποενότητες: α) Microsatellite sample data β) Microsatellite loci γ) Microsatellite allele frequency. Η υποενότητα Microsatellite sample data περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 16):

- **Total loci:** Είναι ο συνολικός αριθμός των μικροδορυφορικών τόπων που απομονώθηκαν στον πληθυσμό.
- **DNA extraction:** Περιέχει τον ιστό από τον οποίο έγινε εξαγωγή DNA.
- **Method:** Αναφέρεται στο είδος της πηκτής ηλεκτροφόρισης που χρησιμοποιήθηκε για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των αλληλομόρφων. Περιέχει ακόμα τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάγνωση των προϊόντων της αντίδρασης PCR, στην πηκτική ηλεκτοφόρησης.
- **Mean number of alleles:** Είναι ο μέσος όρος όλων των αλληλομόρφων, για όλους τους μικροδορυφορικούς τόπους που εξετάστηκαν στον πληθυσμό.
- **Mean H observed:** Αναφέρεται στην μέση τιμή όλων των τιμών της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας (Hobs), οι οποίες υπολογίστηκαν για κάθε μικροδορυφορικό τόπο μέσα στον πληθυσμό.
- **Mean H expected:** Αναφέρεται στην μέση τιμή όλων των τιμών της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (Hexp), οι οποίες υπολογίστηκαν για κάθε μικροδορυφορικό τόπο μέσα στον πληθυσμό.



The screenshot shows the Fishtrace web interface. At the top left is the Fishtrace logo, which features a fish and a DNA microarray. To the right of the logo, the text reads "Fishtrace Fishgen MICROSATELLITE data entry". Below the logo is a search bar with a dropdown menu labeled "Select ID" and a "Search" button. The main form area contains several input fields: "Select FG\_SAMPLE ID" (dropdown), "ID\_MICRO:" (text input), "TOTAL\_LOCI:" (text input), "DNA\_EXTRACT:" (text input), "KMETHOD:" (text input), "MEAN\_ALLE:" (text input), "MEAN\_HOBS:" (text input), and "MEAN\_HEXP:" (text input). At the bottom of the form are two buttons: "Submit to DB" and "Reset".

**Εικόνα 16.** Η υποενότητα Microsatellite sample data

Η υποενότητα Microsatellite loci data περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 17):

- **Locus:** Το πεδίο αυτό δίνει το σύμβολο του μικροδορυφορικού τόπου.
- **PCR conditions:** Περιγράφει τις συνθήκες PCR με τις οποίες έγινε η ενίσχυση του μικροδορυφορικού τόπου. Κάθε αντίδραση PCR περιέχει το στάδιο της αποδιάταξης, το στάδιο της σύνδεσης των εκκινητών και το στάδιο επιμήκυνσης της αλυσίδας.
- **Sample size:** Είναι ο συνολικός αριθμός των ατόμων που εξετάστηκαν για ένα συγκεκριμένο μικροδορυφορικό τόπο.
- **Repeat composition:** Το πεδίο αυτό περιγράφει το μικροδορυφορικό τόπο. Δίνει τον αριθμό και τη σύσταση των επαναλαμβανόμενων μονάδων νουκλεοτιδίων, οι οποίες συνιστούν ένα μικροδορυφορικό τόπο.
- **Primers:** Το πεδίο αυτό δίνει τις ακολουθίες ενός ζεύγους εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με την αντίδραση PCR, ενός μικροδορυφορικού τόπου.
- **Number of alleles:** Είναι ο συνολικός αριθμός αλληλομόρφων που βρέθηκαν σε κάθε μικροδορυφορικό τόπο.
- **Hobserved:** Δίνει την τιμή της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας σε ένα μικροδορυφορικό τόπο. Αναφέρεται στον αριθμό των ετερόζυγων ατόμων για ένα τόπο, διαιρούμενο με τον συνολικό αριθμό των ατόμων που εξετάστηκαν σε αυτό τον τόπο.
- **Hexpected:** Δίνει την τιμή της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας σε ένα μικροδορυφορικό τόπο. Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία σε ένα μικροδορυφορικό τόπο δίνεται από την εξίσωση:  $h = n(1 - \sum x_i^2) / n - 1$  όπου  $x_i$  είναι η συχνότητα του αλληλόμορφου  $i$ ,  $n$  είναι τα άτομα του πληθυσμού που εξετάστηκαν για αυτό το μικροδορυφορικό τόπο και  $\sum$  είναι το σύνολο όλων των αλληλομόρφων στο μικροδορυφορικό τόπο



**Εικόνα 17.** Η υποενότητα Microsatellite loci data

Η υποενότητα Microsatellite allele frequency data περιέχει τις εξής πληροφορίες (Εικ. 18):

- **Alleles:** Το πεδίο αυτό δηλώνει τα αλληλόμορφα που βρέθηκαν σε κάθε τόπο.
- **Frequency:** Το πεδίο αυτό δίνει τη συχνότητα του κάθε αλληλομόρφου.

**Εικόνα 18.** Η υποενότητα Microsatellite allele frequency data

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με τη βοήθεια των παραπάνω σελίδων έγινε μεταφορά των δεδομένων για τα 11 είδη ψαριών, από τη αρχική βάση Fishgen στη νέα βάση FishTrace. Επίσης, μετά τη συλλογή της βιβλιογραφίας και την εξαγωγή δεδομένων για 13 νέα είδη ψαριών, έγινε αντίστοιχη εισαγωγή τους στην ιστοσελίδα FishTrace. Συνεπώς, η ιστοσελίδα FishTrace περιέχει δεδομένα από 23 εμπορικά είδη ιχθύων (11 από τη Fishgen και 13 νέα είδη), που συλλέχθηκαν από περιοχές στην Ευρώπη, Αμερική και Καναδά (Πίνακες 1, 2).

**Πίνακας 1.** Κατάλογος ειδών με επιστημονική και κοινή ονομασία (Κανονισμός ΕΚ 2004) και οι αντίστοιχες γενετικές τεχνικές για κάθε είδος, για τις οποίες υπάρχουν στοιχεία στην ιστοσελίδα FishTrace

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ALOZYME S	RFLP	SEQUENCING	MICROSATELLITE
1. <i>Clupea harengus</i>	Ρέγγα		x		
2. <i>Dicentrarchus labrax</i>	Λαβράκι	x			x
3. <i>Diplodus sargus sargus</i>	Σαργός	x			
4. <i>Esox lucius</i>	Λιμάντα				x
5. <i>Gadus morhua</i>	Γάδος			x	
6. <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	Κιτρινοζαγκέτα		x		
7. <i>Leuciscus cephalus</i>	Κέφαλος	x	x		
8. <i>Merlangius merlangus</i>	Νταούκι του Ατλαντικού				x
9. <i>Merluccius merluccius</i>	Μπακαλιάρος	x	x		x
10. <i>Mugil cephalus</i>	Κέφαλος	x	x		
11. <i>Mullus barbatus</i>	Κουτσομούρα	x			x
12. <i>Mullus surmuletus</i>	Μπαρμπούνι	x	x		
13. <i>Oncorhynchus keta</i>	Πέστροφα		x		
14. <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Πέστροφα		x		
15. <i>Platichthys flesus</i>	Γλώσσα Χωματίδα		x		

16. <i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Υπόγλωσσα της Γροιλανδίας				x
17. <i>Salmo salar</i>	Σολομός			x	x
18. <i>Salmo trutta</i>	Πέστροφα	x	x	x	x
19. <i>Scophthalmus maximus</i>	Ρόμβος/Καλκάνι		x		
20. <i>Solea senegalensis</i>	Γλώσσα Σενεγάλης	x	x		
21. <i>Solea solea</i>	Γλώσσα	x			
22. <i>Solea vulgaris</i>	Γλώσσα		x		
23. <i>Sparus aurata</i>	Τσιπούρα				x
24. <i>Thunnus thynnus</i>	Τόνος	x			x

**Πίνακας 2.** Οι περιοχές δειγματοληψίας για τα είδη που έχουν αποθηκευτεί στην ιστοσελίδα

A/A	ΧΩΡΑ	ΥΛΑΤΙΝΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ
1	Albania	Europe - Inland waters	Ohrid lake
2	Armenia	Asia - Inland waters	Arpa River
3	Austria	Europe - Inland waters	Gurk river
4	Bosnia and Herzegovina	Europe - Inland waters	Neretva river
5	Canada	America, North - Inland waters	Ashuapmushuan river
6	Canada	America, North - Inland waters	Conne river
7	Canada	America, North - Inland waters	Fishing Branch
8	Canada	America, North - Inland waters	Gold river
9	Canada	America, North - Inland waters	Grey river
10	Canada	America, North - Inland waters	Metabetchouane river
11	Canada	America, North - Inland waters	Minto
12	Canada	America, North - Inland waters	Pelly
13	Canada	America, North - Inland waters	Philip river
14	Canada	America, North - Inland waters	Quasiemsca river
15	Canada	America, North - Inland waters	Riviere aux Saumons river

17	Canada	America, North - Inland waters	Stewiacke river
18	Canada	America, North - Inland waters	Takhini
19	Canada	America, North - Inland waters	Vancouver Island
20	Canada	Atlantic, Northwest	Conception bay
21	Canada	Atlantic, Northwest	Fogo Island (3K)
22	Canada	Atlantic, Northwest	Northern Grand Banks (3L)
23	Canada	Atlantic, Northwest	Pt. Escuminac
24	Canada	Atlantic, Northwest	St. John's (3L), Flatrock
25	Canada	Atlantic, Northwest	Trinity bay (3L), Chance Cove
26	Canada	Atlantic, Northwest	Trinity bay (3L), Random Island
27	Canada	Atlantic, Northwest	Trinity Ledge
28	Canada	Not specified	Gambo Pond
29	Canada	Not specified	Grand Codroy
30	Canada	Not specified	Indian bay pond
31	Canada	Not specified	LaHave
32	Canada	Not specified	Valley field
33	Czech Republic	Europe - Inland waters	Vlata river
34	Denmark	Europe - Inland waters	Bisballe river
35	Denmark	Europe - Inland waters	Brandstrup river
36	Denmark	Europe - Inland waters	Dollerrup Kilde v. river
37	Denmark	Europe - Inland waters	Dollerrup Møllebæk river
38	Denmark	Europe - Inland waters	Dollerrup river
39	Denmark	Europe - Inland waters	Dynlands river, Bornholm
40	Denmark	Europe - Inland waters	Gjelbæk river
41	Denmark	Europe - Inland waters	Kapeldal river
42	Denmark	Europe - Inland waters	Krobæk river
43	Denmark	Europe - Inland waters	Tejn river, Bornholm
44	Denmark	Europe - Inland waters	Tjærbæk river
45	Denmark	Europe - Inland waters	Vellens river, Bornholm
46	France	Europe - Inland waters	Bresle river
47	France	Europe - Inland waters	Doubs river
48	France	Europe - Inland waters	Dranse river
49	France	Europe - Inland waters	Elorn river
50	France	Europe - Inland waters	Garonne river
51	France	Europe - Inland waters	Redon river
52	France	Europe - Inland waters	Rhone river
53	France	Europe - Inland waters	Taravo river
54	France	Europe - Inland waters	Tes river

55	France	Europe - Inland waters	Vecchio river
56	France	Mediterranean and Black Sea	Banyuls
57	France	Mediterranean and Black Sea	Marseille
58	Georgia	Asia - Inland waters	Kodori River
59	Germany	Europe - Inland waters	Eulenbach river
60	Greece	Europe - Inland waters	Acheloos 1 river
61	Greece	Europe - Inland waters	Acheloos 2 river
62	Greece	Europe - Inland waters	Aggitis river
63	Greece	Europe - Inland waters	Alfios river
64	Greece	Europe - Inland waters	Aliakmonas 1 river
65	Greece	Europe - Inland waters	Aliakmonas 2 river (Kokkinia-Grevena)
66	Greece	Europe - Inland waters	Aliakmonas 3 river (Canal 66-Naoussa)
67	Greece	Europe - Inland waters	Ardas river
68	Greece	Europe - Inland waters	Axios 1 river
69	Greece	Europe - Inland waters	Axios 2 river (Goumenissa)
70	Greece	Europe - Inland waters	Elassonitikos river
71	Greece	Europe - Inland waters	Evinos river
72	Greece	Europe - Inland waters	Filliouris river
73	Greece	Europe - Inland waters	Havrias river
74	Greece	Europe - Inland waters	Komcatos river
75	Greece	Europe - Inland waters	Mornos river
76	Greece	Europe - Inland waters	Nestos river
77	Greece	Europe - Inland waters	Prespa lake
78	Greece	Europe - Inland waters	Thyamis river
79	Greece	Europe - Inland waters	Tripotamos river
80	Greece	Europe - Inland waters	Venetikos river
81	Greece	Europe - Inland waters	Voidomatis river
82	Greece	Europe - Inland waters	Vosvozis river
83	Greece	Mediterranean and Black Sea	Ierissos
84	Ireland	Atlantic, Northeast	Irish Sea
85	Ireland	Europe - Inland waters	Corrib River
86	Ireland	Europe - Inland waters	Keenagh river
87	Ireland	Europe - Inland waters	Owentogher river
88	Ireland	Not specified	Mayo
89	Italy	Europe - Inland waters	Chisone river
90	Italy	Europe - Inland waters	Garda lake
91	Italy	Europe - Inland waters	Pellice river
92	Italy	Europe - Inland waters	Toce river
93	Italy	Mediterranean and Black Sea	Elba
94	Italy	Mediterranean and Black Sea	Livorno
95	Kazakhstan	Asia - Inland waters	Sardamiana River

96	Kazakhstan	Asia - Inland waters	Sofidaron
97	Netherlands	Atlantic, Northeast	North Sea south station
98	Norway	Europe - Inland waters	Bogstad lake
99	Norway	Europe - Inland waters	Borgensfjord
100	Norway	Europe - Inland waters	Medja river
101	Not specified	North Western Atlantic	Flatrock
102	Not specified	North Western Atlantic	Grey Island Shelf (3K)
103	Not specified	North Western Atlantic	Gull Island
104	Not specified	North Western Atlantic	Ile aux Morts (3Pn)
105	Poland	Europe - Inland waters	Splupsk
106	Poland	Europe - Inland waters	Swibno
107	Portugal	Mediterranean and Black Sea	Faro
108	Russian Federation	Europe - Inland waters	Svyatoe Lake
109	Russian Federation	Europe - Inland waters	Terek River
110	Russian Federation	Europe - Inland waters	Triasheno Lake
111	Russian Federation	Europe - Inland waters	Vorob'yev
112	Spain	Atlantic, Northeast	Donostia
113	Spain	Atlantic, Northeast	Isla Cristina
114	Spain	Europe - Inland waters	Artesiaga River
115	Spain	Mediterranean and Black Sea	Blanes
116	Spain	Mediterranean and Black Sea	Gandia
117	Spain	Mediterranean and Black Sea	Palamos
118	Spain	Mediterranean and Black Sea	Puerto de la Selva
119	Spain	Mediterranean and Black Sea	San Carlos de la Rapita
120	Sweden	Atlantic, Northeast	Baltic sea
121	Sweden	Europe - Inland waters	Dalalven river
122	Switzerland	Europe - Inland waters	Aubonne river
123	Switzerland	Europe - Inland waters	Saar river
124	Ukraine	Europe - Inland waters	Crimea
125	United Kingdom	Atlantic, Northeast	North Sea north station
126	United Kingdom	Europe - Inland waters	Dee river
127	United Kingdom	Europe - Inland waters	Lussa river
128	United Kingdom	Europe - Inland waters	Tummel river
129	United Kingdom	Europe - Inland waters	Tweed river
130	United Kingdom	Not specified	Uist
131	United States of America	America, North - Inland waters	Andreafsky
132	United States of America	America, North - Inland waters	Anvik
133	United States of America	America, North - Inland waters	Chandalar
134	United States of America	America, North - Inland waters	Chulinak

135	United States of America	America, North - Inland waters	Elmo Lake
136	United States of America	America, North - Inland waters	Escanaba Lake
137	United States of America	America, North - Inland waters	Julia Lake
138	United States of America	America, North - Inland waters	Kenai
139	United States of America	America, North - Inland waters	Scott
140	United States of America	America, North - Inland waters	Sheenjek
141	United States of America	America, North - Inland waters	Washington
142	United States of America	America, North - Inland waters	Willamette
143	United States of America	America, North - Inland waters	Young Lake
144	United States of America	America, North - Inland waters	Yuba
145	United States of America	Atlantic, Northwest	Jeffries Ledge
146	Yugoslavia	Europe - Inland waters	Bohing lake
147	Yugoslavia	Europe - Inland waters	Ohrid lake

Τα στοιχεία τα οποία αποθηκεύτηκαν στη βάση δεδομένων αποσπάστηκαν από 42 επιστημονικές εργασίες (βλέπε Βιβλιογραφία). Για ορισμένα είδη συλλέχθηκαν στοιχεία και για τις 4 γενετικές μεθοδολογίες όπως π.χ. το είδος *Salmo trutta*, ενώ για κάποια άλλα είδη όπως π.χ. *Merluccius merluccius*, *Salmo salar* συλλέχθηκαν στοιχεία από λιγότερες τεχνικές (Πίνακας 1).

Για τη μέθοδο του Πολυμορφισμού Μήκους Περιοριστικών Θραυσμάτων (RFLP) αποθηκεύτηκαν στοιχεία από μελέτες 6 τμημάτων του μιτοχονδριακού DNA (ND 1, ND 3, ND 4, ND 5, ND 6, Cytochrome b, D-loop, 12S rRNA, 16S rRNA), από 132 περιοχές δειγματοληψίας και αντιστοιχούν σε 13 είδη ψαριών. Για τη μέθοδο της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης πρωτεϊνών (allozyme analysis) αποθηκεύτηκαν στοιχεία από 20 ενζυμικά συστήματα και αντιστοιχούν σε 11 είδη ψαριών. Για την μέθοδο της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing analysis) αποθηκεύτηκαν 140 διαφορετικές αλληλουχίες DNA από 3 είδη ψαριών: *Gadus morhua*, *Salmo salar* και *Salmo trutta*. Τέλος, για τη μέθοδο της ανάλυσης μικροδορυφορικού DNA (microsatellite analysis), συλλέχθηκαν στοιχεία για 322 γονιδιακούς τόπους οι οποίοι καλύπτουν 10 είδη ψαριών (Πίνακας 1).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κάλυψη της ιστοσελίδας FishTrace με τις απαραίτητες γενετικές πληροφορίες από έγκυρες βιβλιογραφικές πηγές, καθώς και η μεταφορά των δεδομένων από την Fishgen. Τα δεδομένα απαρτίζουν τέσσερις γενετικές μεθόδους και η παράθεσή τους έχει ως σκοπό την ακριβή επανάληψη των πειραμάτων από τους επιστήμονες, για την τελική σύγκριση των αποτελεσμάτων τους με τα αρχικά δεδομένα.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο Joint Research Centre (Ιταλία) στα πλαίσια του προγράμματος FISHREG, κατά την περίοδο Ιούλιος 2005 - Ιανουάριος 2006. Ένας από τους βασικούς στόχους του προγράμματος, είναι η δημιουργία μιας ιστοσελίδας που θα περιέχει γενικές πληροφορίες σχετικές με διάφορα εμπορικά είδη ιχθύων ([www.fishtrace.com](http://www.fishtrace.com)). Κομμάτι της ιστοσελίδας στο οποίο αναφέρεται η εργασία, αφορά γενετικές πληροφορίες ιχθύων.

Για τη δημιουργία της σελίδας απαιτήθηκε ο συνδυασμός δύο βασικών επιστημών, της Βιολογίας και της Πληροφορικής. Η συνεργασία βασίζεται στο γεγονός ότι η ίδια η ζωή αποτελεί μια τεχνολογία πληροφοριών. Ο όγκος των σημερινών δεδομένων που παράγονται στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας και πρέπει να αναλυθούν και να επεξεργαστούν, καθιστά απαραίτητη τη συνεργασία με την επιστήμη της Πληροφορικής. Ο επιστημονικός χώρος της ένωσης αυτών των πεδίων, ονομάζεται διεθνώς Βιοπληροφορική.

Η Βιοπληροφορική είναι δύσκολο να οριστεί και να απαριθμηθούν οι τομείς που καλύπτει, καθώς το αντικείμενο της Βιολογίας είναι εξαιρετικά ευρύ. Ένας βασικός τομέας της είναι η χρήση των υπολογιστών για την τέλεση πειραμάτων και την εξαγωγή αποτελεσμάτων από αυτά. Ένας άλλος τομέας της είναι η παρουσίαση των δομών διάφορων βιολογικών μακρομορίων. Ένας άλλος μεγάλος τομέας της που παρουσιάζεται και στην παρούσα δουλειά, είναι οι βάσεις δεδομένων. Με την αποκωδικοποίηση του DNA του ανθρώπου αλλά και πολλών άλλων οργανισμών, δημιουργήθηκαν μεγάλες βάσεις δεδομένων για την καταγραφή τους. Οι τρεις μεγάλες βάσεις δεδομένων που αφορούν το DNA είναι: Genbank, EMBL, DDBJ. Η FishTrace (εμπεριέχοντας τα δεδομένα της Fishgen), είναι η μοναδική βάση δεδομένων η οποία περιέχει νουκλεοτιδικές πληροφορίες για διαφορετικά είδη ψαριών.



Στον τομέα της Βιολογίας ανήκει το μεγαλύτερο μέρος της παρούσας εργασίας. Στον τομέα της Πληροφορικής ανήκουν τα ακόλουθα στάδια: δημιουργία βάσης δεδομένων, σύστημα διαχείρισης βάσης δεδομένων, ανάλυση και επεξεργασία δεδομένων καθώς και η πρόσβαση και χρήση της. Τα δυο βασικά προγράμματα που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία βάσεων δεδομένων είναι SQL και ACCESS.

Κατά τη δημιουργία της FishTrace αποφασίστηκε η μεταφορά των δεδομένων από τη Fishgen στο τμήμα που αφορά τις γενετικές πληροφορίες, καθώς και η πλήρωσή της με νέα δεδομένα από νέα εμπορικά είδη ιχθύων. Στην υπάρχουσα σελίδα της Fishgen υπήρχαν δεδομένα για 11 είδη ψαριών, και από τις τέσσερις επιλεγμένες γενετικές τεχνικές. Τα δεδομένα αυτά απομονώθηκαν από τη σελίδα, τυπώθηκαν, και μετά από κατάλληλη επεξεργασία τροποποιήθηκαν σύμφωνα με την μορφή της νέας σελίδας της FishTrace.

Στη συνέχεια έγινε επιλογή νέων εμπορικών ειδών ιχθύων που δεν υπήρχαν στη Fishgen. Αφού επιλέχθηκαν αρκετά είδη άρχισε η αναζήτηση βιβλιογραφικών εργασιών που αναφέρονταν στα είδη αυτά, και περιείχαν δεδομένα για τις τέσσερις γενετικές τεχνικές που είχαν επιλεγθεί. Τελικά έγινε συλλογή δεδομένων για 13 νέα είδη ψαριών. Από κάθε τεχνική έγινε συλλογή διαφορετικού αριθμού δεδομένων. Τα δεδομένα αυτά τροποποιήθηκαν για την καλύτερη παράθεση τους στη σελίδα.

Μετά την εξαγωγή στοιχείων από τη Fishgen και από τις νέες επιστημονικές εργασίες, έγινε εκτίμηση του όγκου των δεδομένων και άρχισε ο σχεδιασμός των τελικών πινάκων. Η δομή μιας βάσης ξεκινάει από τους πίνακές της. Ο σχεδιασμός των πινάκων έγινε με τη χρήση της Microsoft Access, και με βάση τη μορφή που είχαν οι πίνακες στην αρχική σελίδα της Fishgen. Τα απαραίτητα βήματα για το σχεδιασμό μιας βάσης δεδομένων είναι τα εξής: α) καθορισμός του σκοπού που θα εξυπηρετεί η βάση δεδομένων β) εύρεση και οργάνωση των απαιτούμενων πληροφοριών γ) χωρισμός των πληροφοριών σε πίνακες δ) καθορισμός πρωτευόντων κλειδιών δ) δημιουργία σχέσεων πινάκων και ε) βελτίωση της σχεδίασης. Ο σωστός σχεδιασμός είναι απαραίτητος γιατί βοηθά την υποστήριξη και εξασφαλίζει την ακρίβεια και την ακεραιότητα των πληροφοριών.

Βασική αρχή για το σχεδιασμό των πινάκων ήταν η τοποθέτηση των δεδομένων σε μία λογική σειρά, όσον αφορά την πειραματική διαδικασία. Οι πληροφορίες χωρίστηκαν σε πίνακες για να ελαττωθούν τα πλεονάζοντα δεδομένα, και δόθηκαν οι απαραίτητες πληροφορίες για να συνδεθούν τα δεδομένα στους πίνακες. Αρχικά τοποθετήθηκαν τα δεδομένα που αφορούν γενικές πληροφορίες

όπως ένας μοναδικός κωδικός για κάθε είδος που εισάγεται, η χώρα από την οποία αλιεύθηκε το είδος, η ακριβής περιοχή δειγματοληψίας καθώς και το γεωγραφικό μήκος και πλάτος της. Επίσης, στοιχεία για τον συγγραφέα και για το περιοδικό όπου είχε δημοσιευθεί η εργασία από την οποία εξήχθησαν τα δεδομένα. Στον αρχικό πίνακα με τις βασικές πληροφορίες, συνδέονται τέσσερις ακόμη πίνακες που περιέχουν πληροφορίες από τις γενετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν. Οι πίνακες συνδέονται με τον αρχικό πίνακα, μέσω των κωδικών για τα είδη.

Η αρχική σελίδα που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή των δεδομένων, η οποία δημιουργήθηκε από τον Philippe Carreau, κάλυπτε απόλυτα τις ανάγκες της κάθε τεχνικής ξεχωριστά. Μέχρι τη στιγμή της συγγραφής της συγκεκριμένης εργασίας, η τελική ιστοσελίδα της FishTrace που αφορά το κομμάτι των γενετικών πληροφοριών είναι υπό κατασκευή. Η σελίδα προορίζεται να είναι πολύ εύκολη στη χρήση, με γρήγορα και εγγυημένα αποτελέσματα.

Η επιτακτική ανάγκη της διατήρησης των ιχθυοπληθυσμών, είναι ένας από τους βασικούς λόγους ύπαρξης της ιστοσελίδας. Τη τελευταία δεκαετία η υπεραλίευση σε συνδυασμό με τις παράνομες αλιευτικές δραστηριότητες σε όλο τον κόσμο, έχει οδηγήσει στη δραματική μείωση των πληθυσμών των κυριότερων εμπορικών ιχθύων. Πολλές επιστημονικές έρευνες πραγματοποιούνται για τη μείωση του φαινομένου, καθώς και για την παρουσίαση των μελλοντικών αποτελεσμάτων του. Επίσης, οι αρμόδιες αρχές παγκοσμίως σε συνεργασία με επιστήμονες και οικολογικές οργανώσεις εργάζονται προς την κατεύθυνση προστασίας των ιχθυοαποθεμάτων. Παρόλα τα δραστικά μέτρα που λαμβάνονται κατά καιρούς, η παράνομη αλιεία ανθίζει. Η αποτελεσματική διαχείριση της αλιείας και των ιχθυοαποθεμάτων, διευκολύνεται από τις τεχνικές διάκρισης των πληθυσμών.

Στη διαχείριση των πληθυσμών και στην αναγνώριση ειδών έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν πολλοί δείκτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η χρήση μορφομετρικών παραμέτρων, αναλύσεων πτερυγίων, καθώς και δείκτες σωματικής και γοναδικής ανάπτυξης. Βασικό μειονέκτημα των δεικτών αυτών είναι ότι είναι άμεσα συνδεδεμένοι με το περιβάλλον διαβίωσης, και είναι περισσότερο φαινοτυπικοί και όχι γενοτυπικοί δείκτες. Στη δεκαετία του '70 αναπτύχθηκε η χρήση γενετικών δεικτών στον τομέα της αλιείας και της γενετικής ιχθύων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν αλλοένζυμα και ακολούθησε η χρήση μιτοχονδριακού DNA. Τα τελευταία χρόνια ξεκίνησε η χρήση μικροδορυφορικού DNA, στον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων πληθυσμών μέσα στο ίδιο είδος.

Πολλές τεχνικές βασίζονται στους δείκτες αυτούς, τέσσερις από τις οποίες παραθέτονται στη παρούσα εργασία. Οι γενετικές αυτές τεχνικές παρόλο που έχουν κοινό στόχο το διαχωρισμό των ειδών με βάση το DNA, διαφέρουν σημαντικά στο τρόπο εφαρμογής τους καθώς και στην αποτελεσματικότητά τους. Σαν βασική αρχή στις τρεις από τις τέσσερις τεχνικές, είναι η χρήση DNA από δείγματα ιστών διαφορετικών ειδών ιχθύων. Καθοριστικό ρόλο επίσης έχει η χρήση της PCR. Στη περίπτωση της ηλεκτροφοριστικής ανάλυσης πρωτεϊνών, η ανίχνευση των μεταλλάξεων είναι έμμεση και περιορίζεται σε αυτές που οδηγούν σε αλλαγή του φορτίου της πρωτεΐνης. Η πιο άμεση μέθοδος ανίχνευσης πολυμορφισμού είναι η ανάλυση πρωτοδιάταξης γιατί παρέχει απευθείας ανάγνωση της ακολουθίας του DNA.

Χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι τέσσερις τεχνικές καθώς κάποιες νεότερες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί, δεν παρουσιάζουν πληθώρα επιστημονικών εργασιών αναφορικά με τον τομέα της γενετικής ιχθύων. Παρόλο το γεγονός αυτό, οι νεότερες γενετικές τεχνικές παρουσιάζουν ακρίβεια και έγκυρα αποτελέσματα. Στις μεθόδους αυτές ανήκουν: α) η μέθοδος της ανάλυσης αλληλουχιών με μεταβλητό αριθμό τυχαίων επαναλήψεων (VNTRs), η οποία πέρα από τις αναλύσεις του μικροδορυφορικού DNA περιέχει και αναλύσεις μιτιδορυφορικού DNA β) η μέθοδος ανάλυσης τυχαίων ενισχυμένων πολυμορφικών τμημάτων (RAPDs), η οποία βασίζεται στη τυχαία ενίσχυση με την αντίδραση PCR τμημάτων του πυρηνικού γενώματος. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει δυο βασικά μειονεκτήματα: είναι αρκετά ευαίσθητη και τα προϊόντα της PCR δεν είναι πάντα επαναλήψιμα. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες χαρτογράφησης και για τη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων γ) η μέθοδος ανάλυσης ενισχυμένων πολυμορφικών θραυσμάτων (AFLPs), η οποία είναι μια αξιόπιστη και αυστηρή τεχνική που χρησιμοποιείται σε μελέτες βιοποικιλότητας, γενοτυπικές αναλύσεις ατόμων, απομόνωση γονιδίων και κατασκευή γενετικών χαρτών.

Αρχικά η πρώτη απόπειρα δημιουργίας μιας ιστοσελίδας που συλλέγει όλες τις γενετικές πληροφορίες για μεγάλο αριθμό εμπορικών ειδών, ήταν η Fishgen (<http://fishgen.jrc.it>). Κύριος στόχος της δημιουργίας αυτής της βάσης δεδομένων ήταν να συλλεχθούν όλες οι γενετικές πληροφορίες σχετικές με το διαχωρισμό και την αναγνώριση πληθυσμών, σε ένα διαδουκτιακό τόπο. Αυτό θα βοηθήσει τους επιστήμονες να πραγματοποιήσουν σύγκριση και ταυτοποίηση των δεδομένων τους με τα ήδη υπάρχοντα στην ιστοσελίδα. Με τη χρήση των δεδομένων της σελίδας θα

μπορεί να γίνεται αναγνώριση της προέλευσης ενός πληθυσμού ψαριών ή ενός αποθέματος, από ένα μόνο μικρό δείγμα. Δηλαδή οι επιστήμονες θα είναι σε θέση με μια DNA ανάλυση ενός δείγματος, να γνωρίζουν την ακριβή τοποθεσία σύλληψης.

Αρχικά γίνεται η επιλογή του είδους που θα αναλυθεί (π.χ. πέστροφα), και ακολουθεί αναζήτηση υπαρχόντων δεδομένων στη σελίδα. Θα πρέπει να υπάρχει ένα εργαστηριακό δείγμα πέστροφας, τουλάχιστον πέντε ατόμων. Για το δείγμα αυτό ο ερευνητής έχει μια πληροφορία για τη γενικότερη περιοχή δειγματοληψίας (π.χ. Νορμανδία), αλλά επιθυμεί να γνωρίζει την ακριβή θέση σύλληψης. Ο ερευνητής ανατρέχει στο συγκεκριμένο είδος στη βάση δεδομένων, και παίρνει πληροφορία για όλες τις γενετικές αναλύσεις που έχουν γίνει στη γενικότερη περιοχή δειγματοληψίας (Νορμανδία). Στη συνέχεια επιλέγει μια γενετική μεθοδολογία (κατά προτίμηση τεχνική DNA), η οποία έχει εφαρμοστεί για έναν πληθυσμό πέστροφας από την περιοχή της Νορμανδίας. Στο εργαστήριο επαναλαμβάνει την τεχνική, ακολουθώντας τα στάδια όπως περιγράφονται στη βάση δεδομένων. Αφού ολοκληρωθεί η γενετική τεχνική γίνεται εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Στη συνέχεια, γίνεται σύγκριση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων με τα δεδομένα της ιστοσελίδας. Εάν τα αποτελέσματα του ερευνητή συμφωνούν με κάποια από αυτά που έχουν καταχωρηθεί στη βάση για έναν πληθυσμό πέστροφας, τότε ίσως το δείγμα του να προέρχεται από την ίδια περιοχή. Πρέπει να σημειωθεί το γεγονός ότι μόνο ο συνδυασμένος έλεγχος με αποτελέσματα από διάφορες τεχνικές, θα επιτρέψει στον ερευνητή να είναι αρκετά σίγουρος για την προέλευση του δείγματος. Συνεπώς, πρέπει να γίνει ανάλυση του δείγματος με όλες τις δυνατές τεχνικές για τις οποίες υπάρχουν δεδομένα στη σελίδα. Για αυτό το λόγο η σελίδα περιέχει πληθώρα διαφορετικών γενετικών στοιχείων. Το γεγονός αυτό μπορεί να βοηθήσει τις αρμόδιες αρχές στον έλεγχο της παράνομης αλιείας και στη διατήρηση πολλών ιχθυοπληθυσμών.

Οι επιστήμονες που ήδη έχουν πραγματοποιήσει αναλύσεις, μπορούν να αναζητήσουν στη σελίδα όλα τα υπάρχοντα δεδομένα που αναφέρονται στη περιοχή μελέτης τους και να προβούν σε ταυτοποίηση των δεδομένων. Στους χρήστες της σελίδας μπορεί να συγκαταλεγεί ένα μεγάλο εύρος ανθρώπων. Το μεγαλύτερο ποσοστό θα αποτελείται από βιολόγους (γενετιστές και μη), οι οποίοι ασχολούνται με τον τομέα της ιχθυολογίας. Επίσης είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για φοιτητές που ασχολούνται με αντιστοίχους τομείς. Οι αρμόδιοι φορείς που ελέγχουν την αλιεία

μπορούν να βρουν πολύ χρήσιμα δεδομένα. Τέλος, οποιοσδήποτε αναζητεί πληροφορίες για διάφορα είδη ψαριών, θα μπορεί να ανατρέξει στην ιστοσελίδα.

Τα γενετικά δεδομένα μπορούν να συγκριθούν με αντίστοιχα από παρόμοιες έρευνες και να βοηθήσουν στη ταυτοποίηση της προέλευσης ενός πληθυσμού ψαριών. Πέρα από την ύπαρξη των δεδομένων για την εκάστοτε χρήση, δίνεται η δυνατότητα σε επιστήμονες που έχουν πραγματοποιήσει κάποια σχετική έρευνα να καταχωρήσουν τα δεδομένα τους στην ιστοσελίδα.

Τα 24 είδη ιχθύων για τα οποία παρατίθενται δεδομένα στην ιστοσελίδα FishTrace, καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα των ειδών που αλιεύονται εκτενώς και παρουσιάζουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον. Καλύπτουν επίσης μεγάλο αριθμό ειδών που καλλιεργούνται και καταναλώνονται σε όλη την Ευρώπη και γενικά σε όλο τον κόσμο. Από τα 24 είδη, μόνο τα δεδομένα για την πέστροφα (*Salmo trutta*) καλύπτουν και τις τέσσερις γενετικές τεχνικές, ενώ τα στοιχεία για τον μπακαλιάρο της Μεσογείου (*Merluccius merluccius*) καλύπτουν τρεις από τις τέσσερις τεχνικές.

Είναι στόχος των αρμόδιων αρχών, να ελέγχουν από πού έχουν αλιευθεί τα ψάρια που βρίσκονται στη αγορά. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να βοηθήσουν τους επιστήμονες και τις αρμόδιες αρχές στη ταυτοποίηση των ειδών και τον διαχωρισμό των πληθυσμών, ώστε να προβούν στην πάταξη της παράνομης αλιείας και στη διατήρηση των ιχθυοαποθεμάτων. Η εισαγωγή δεδομένων στην ιστοσελίδα πρέπει να συνεχιστεί έως ότου το μεγαλύτερο μέρος των εμπορικών ειδών ιχθύων να καλυφθεί. Θα ήταν επίσης χρήσιμο να συμπληρωθεί με καινούργιες γενετικές τεχνικές.

## 5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας οδήγησε στη βιομηχανοποιημένη αλιεία και στην υπερεκμετάλλευση πολλών ειδών, μερικά από τα οποία βρίσκονται στα όρια της εξαφάνισης. Νέα επιστημονικά εργαλεία, βασισμένα στη γενετική και μοριακή βιολογία μπορούν να βοηθήσουν στην αναγνώριση των πληθυσμών που κινδυνεύουν.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κάλυψη της ιστοσελίδας FishTrace με τις απαραίτητες γενετικές πληροφορίες από έγκυρες βιβλιογραφικές πηγές, καθώς και η μεταφορά των δεδομένων από τη Fishgen. Τα δεδομένα απαρτίζουν τέσσερις γενετικές μεθόδους: ανάλυση μικροδορυφορικού DNA (microsatellite analysis), ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing analysis), ηλεκτοφορητική ανάλυση πρωτεϊνών (allozyme analysis), πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP). Η παράθεσή τους έχει ως σκοπό την ακριβή επανάληψη των μεθόδων από τους επιστήμονες, για την τελική σύγκριση των αποτελεσμάτων τους με τα αρχικά δεδομένα.

Τα 24 είδη ιχθύων για τα οποία παρατίθενται τα δεδομένα στην ιστοσελίδα, καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα των ειδών που αλιεύονται εκτενώς και παρουσιάζουν μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον. Είναι στόχος των αρμόδιων αρχών το να βρίσκουν από πού έχουν αλιευθεί τα ψάρια που βρίσκονται στη αγορά. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να βοηθήσουν τους επιστήμονες και τις αρμόδιες αρχές στη ταυτοποίηση των ειδών και τον διαχωρισμό των πληθυσμών, ώστε να προβούν στην πάταξη της παράνομης αλιείας και στην διατήρηση των ιχθυοποθεμάτων.

## 6. SUMMARY

Fish is a prime source of nutrition and fishing activities are almost as old as the human kind. The current advancements in technology have led in industrial fishery and in overexploitation of many stocks, some of which are close to collapse. Protecting fish populations has become the primary aim of the fisheries policies of the developed world. New scientific tools based on molecular biology, should help to identify those populations under threat.

Technological advances in molecular biology, have led to the development of a variety of genetic markers that can be used to address questions relevant to the management and conservation of fish species and populations. Many types of genetic markers exist such as nuclear markers (allozymes, random amplified polymorphic DNA - RAPDs, variable number of tandem repeat loci - VNTRs: minisatellite, microsatellite) and mitochondrial DNA markers (cytb, D-loop etc.). Some of the applications of genetic markers in fish biology are stock identification, mixed stock analysis, fate of cultured fish after stocking. One of the main applications of molecular markers related to conservation of commercially exploited fishes is to aid in the development of guidelines, enabling sustainable harvesting of populations.

During the six months (July-January) of my traineeship, data for 13 new commercial species from 40 scientific papers were extracted and put into a single database, JRC's FishTrace database. Furthermore, the existing data for 11 species from several scientific papers had been transferred from Fishgen to FishTrace. These data were collected with the application of four genetic techniques: RFLP, allozyme electrophoresis, sequencing and microsatellite.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 7.1. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✚ Ιμσιρίδου, Α. (2003). Γενετική Μηχανική και Βιοτεχνολογία. ΑΤΕΙ Θεσ/κης - Παράρτημα Ν. Μουδανιών.
- ✚ Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1581/2004 της Επιτροπής της 27ης Αυγούστου 2004 σχετικά με την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ.1639/2001 για τον καθορισμό των στοιχειωδών και εκτεταμένων κοινοτικών προγραμμάτων για τη συλλογή δεδομένων στον τομέα της αλιείας και για τη θέσπιση των λεπτομερειών εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1543/2000 του Συμβουλίου. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 10.9.04 L 289/6.
- ✚ Μίντζας, Α. (2004). Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιολογίας. Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Πάτρα.

### 7.2. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✚ Allegrucci, G., Fortunato, C. and Sbordoni, V. (1997). Genetic structure and allozyme variation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* and *D.punctatus*) in the Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* **128**, 347-358.
- ✚ Apostolidis, A. P., Karakousis, Y. and Triantaphyllidis, C. (1996). Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Salmo trutta* L. (brown trout) populations as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Heredity* **77**, 608-618
- ✚ Apostolidis, A. P., Triantaphyllidis, C., Kouvatsi, A. and Economidis, P. S. (1997). Mitochondrial DNA sequencing variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Mo. Ecol.* **6**, 531-542
- ✚ Beaumont, A. R and Hoare, K. (2003). Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. School of Ocean Sciences-University of Wales, Bangor, UK, Blackwell Science Ltd.
- ✚ Bernatchez, L., Guyomard, R. and Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and



morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Mol. Ecol.* **1**, 161-173.

- ✚ Bernatchez, L. and Osinov, A. (1995). Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Mol. Ecol.* **4**, 285-297.
- ✚ Brutto, S., Arculeo, M. and Parrinello, N. (2004). Congruence in genetic markers used to describe Mediterranean and Atlantic populations of European hake (*Merluccius merluccius* L. 1758). *J. Appl. Ichthyol.* **20** (2), 81–86.
- ✚ Cabral, H., Castro, N., Linhares, D. and Alexandrino, P. (2003). Genetic differentiation among *Solea solea* (L., 1758) and *Solea senegalensis* Kaup, 1858, (Pisces: Pleuronectiformes) in several estuarine systems of the Portuguese coast. *Sci. Mar.* **67**, 43-52.
- ✚ Carr, S. M. and Marshall, D. H. (1991). Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 48-52.
- ✚ Carr S. M., Snellen, A. J., Howse, K. A. and Wroblewski, J. S. (1995). Mitochondrial DNA sequence variation and genetic stock structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from bay and offshore locations on the Newfoundland continental shelf. *Mol. Ecol.* **4**, 79-88.
- ✚ Carlosson, J., McDownell, J. R., Pindaro, D., Jeanette, E. and Sandra, B. (2004). Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Mol. Ecol.* **13** (11), 3345–3356.
- ✚ Caroline, J., Lundy, K., Paloma, M., Ciro, R., Richard, S. M. and Godfrey, M. H. (1999). Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish. *Mol. Ecol.* **8** (11), 1889–1898.
- ✚ Caroline, J., Lundy, K., Ciro, R. and Godfrey, M. H. (2000). Temporal and spatial genetic variation in spawning grounds of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay. *Mol. Ecol.* **9** (12), 2067–2079.

- ✚ Castilho, R. and McAndrew, B. J. (1998). Microsatellite polymorphisms in wild populations of European seabass: Preliminary results CIHEAM-IAMZ, pp. 265-272: 2 ill. 3 tables. 10 ref. (Cahiers Options Méditerranéennes; v. 34)
- ✚ Castilho, R. and McAndrew, B. J. (1998). Population structure of seabass in Portugal: evidence from allozymes . *J. Fish Biol.* **53** (5), 1038–1049.
- ✚ Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Fernandez, A., Asensio, L., Hernandez, P. and Martin, R. (2000). Genetic differentiation between sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglosoides*) by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 29-32.
- ✚ Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Tsigenopoulos, C. S., Law, A. S., Bartley, N., Bertotto, D., Libertini, A., Kotoulas, G., Haley, C. S. and Volckaert, F. A. M. (2004). Development and linkage relationships for new Microsatellite markers of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Animal Gen.* **35** (1), 53–57.
- ✚ Comesana, A. S. and Abella, S. (2003). Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 752-759.
- ✚ Cronin, M. A, Spearman, W. J., Wilmot, R. L., Patton, J. C. and Bickham, J. W. (1993). Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Can. J Fish. Aquat. Sci.* **50**, 708-715.
- ✚ Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D. and Guyomard, R. (1993). (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity.* **71**, 488-496.
- ✚ González-Wangüemert, M., Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C. and García-Charton, J. A. (2004). Genetic differentiation of *Diplodus sargus* (Pisces: Sparidae) populations in the south-west Mediterranean. *Biol. Linn. Soc.* **82** (2), 249–261.

- ✚ Hansen, M. M. and Loeschcke, V. (1996). Genetic differentiation among Danish brown trout populations, as detected by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *J. Fish Biol.* **48**, 422-436.
- ✚ Imsiridou, A., Karakousis, Y. and Triantaphyllidis, C. (1997). Genetic polymorphism and differentiation among chub, *Leuciscus cephalus* L. (Pisces, Cyprinidae) populations of Greece. *Biochem. Syst. Ecol.* **25**, 537-546.
- ✚ Imsiridou, A., Apostolidis, A., Durand, J. D., Briolay, J., Bouvet, Y. and Triantaphyllidis, C. (1998). Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek chub *Leuciscus cephalus* L. (Pisces, Cyprinidae) populations as revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Biochem. Syst. Ecol.* **26**, 415-429.
- ✚ Imsiridou, A. and Zaldivar, J. M. (1999). Methodology and Formats for Genetic Identification of Fish species. Technical note No I.99.16. Joint Research Centre, Ispra, Italy.
- ✚ Imsiridou, A., Hardy, H., Maudling, N., Amoutzias, G. and Zaldivar, J. M. (2003). Web Database of Molecular Genetic Data from Fish Stocks. *J. Heredity.* **94**:265-267.
- ✚ Jirme, M., Lemaire, C., Verrez-Bagnis, V. and Etienne, M. (2003). Direct sequencing method for species identification of canned sardines and sardine-type products. *J. Agri. Food Chem.* **51 (25)**, 7326 –7332.
- ✚ Kornfield, I. and Bogdanowicz, S. M. (1987). Differentiation of mitochondrial DNA in Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Fish. Bull.* **85**, 121-128.
- ✚ Kourti, N., Statkus, R., Bautista, J. and Krey G. (2004). A Review of fish Genetics Implications on Fisheries Management. Technical note No I.04.35. Joint Research Centre, Ispra, Italy.
- ✚ Kourti N. and Carreau P. (2005). Genetics and Fisheries.
- ✚ Launey, S., Krieg, F., Haffray, P., Bruant, J. S, Vannier, A. and Guyomard, R. (2003). Twelve new microsatellite markers for gilted seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Mol. Ecol. Notes* **3 (3)**, 457–459.

- ✚ Lenfant, P. and Planes, S. (1996). Genetic differentiation of white sea bream within the Lion's Gulf and the Ligurian Sea (Mediterranean Sea). *J. Fish Biol.* **49**, 613-621.
- ✚ Miller, L. M and Kapuscinski, A. R. (1996). Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in northern pike. *Trans. Am. Fish. Soc.* **125**, 971-977.
- ✚ McConnell, S. K. J., O'Reilly, P., Hamilton, L., Wright, J. M. and Bentzen, P. (1985). Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**, 1863-1872.
- ✚ McVeigh, H. P., Bartlett, S. E. and Davidson, W. S. (1991). Polymerase chain reaction/direct sequence analysis of the cytochrome *b* gene in *Salmo salar*. *Aquaculture* **95**, 225-233.
- ✚ Borsa, P. (2002). Allozyme, mitochondrial-DNA, and morphometric variability indicate cryptic species of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Biol. J. Linnean Soc.* **75** (2), 261–269.
- ✚ Porta, J. and Alvarez, M. C. (2004). Development and characterization of microsatellites from Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Mol. Ecol.* **4** (2), 277–279.
- ✚ Richardson, B. J., Baverstock, P. R. and Adams, M. (1986). Allozyme Electrophoresis - A handbook for animal systematic and populations studies. Academic press INC.
- ✚ Rossi, A. R., Capula, M., Crosetti, D., Sola, L. and Campton, D. E. (1998). Allozyme variation in global populations of striped mullet, *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae). *Mar. Biol.* **131** (1), 203-212.
- ✚ Ruzzante, D. E., Taggart, C. T., Cook, D. and Goddard, S. V. (1997). Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua*) off Newfoundland: a test, and evidence of temporal stability. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**, 2700-2708.
- ✚ Ruzzante, D. E., Taggart, C. T., Doyle, R. W. and Cook, D. (2001). Stability in the historical pattern of genetic structure of Newfoundland cod (*Gadus morhua*) despite the catastrophic decline in population size from 1964 to 1994. *Conserv. Gen.* **2** (3), 257-269.

- ✚ Tinti, F., Di Nunno, C., Guarniero, I., Talenti, M., Tommasini, S., Fabbri, E. and Piccinetti, C. (2002). Mitochondrial DNA sequence variation suggests the lack of genetic heterogeneity in the Adriatic and Ionian stocks of *Sardina pilchardus*. *Mar. Biotech.* **4** (2), 163-172.