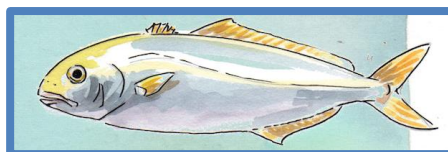


**Ειδικές Δράσεις «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»  
ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068**



**Παραδοτέο**

<b>Αριθμός Παραδοτέου:</b>	1.3.1	<b>Μήνας Παράδοσης ΤΠΕ:</b>	6
<b>Τίτλος Παραδοτέου</b>	Γενετική ταυτοποίηση γεννητόρων και υπολογισμός πληθυσμιακών παραμέτρων		
<b>Ενότητα Εργασίας (ΕΕ):</b>	1	<b>Συντονιστής ΕΕ:</b>	ΙΘΑΒΒΥΚ
<b>Τίτλος ΕΕ:</b>	Διαχείριση γεννητόρων και αναπαραγωγή		
<b>Αριθμός Εργασίας:</b>	1.3	<b>Υπεύθυνος Παραδοτέου:</b>	ΙΘΑΒΒΥΚ
<b>Τίτλος εργασίας:</b>	Γενετικός προσδιορισμός της συμμετοχής των γεννητόρων στην αναπαραγωγική διαδικασία		
<b>Εταίροι:</b>	ΙΘΑΒΒΥΚ	ΑΡΓΟ	
<b>Κατάσταση:</b>	Ολοκληρωμένο	<b>Μήνας παράδοσης:</b>	6
.....			

**Υπεύθυνος ερευνητής για το παραδοτέο:** Τσιγγερόπουλος, Κ. (ΙΘΑΒΒΥΚ)

**Συνεργαζόμενοι ερευνητές από Εταίρους:** Ραυτόπουλος Α. (ΑΡΓΟ)

**Σύντομη περιγραφή (ΤΠΕ):**

Η έκθεση περιλαμβάνει την περιγραφή των βασικών παραμέτρων πληθυσμιακής γενετικής (πλήθος αλληλομόρφων, δεικτών ετεροζυγωτίας και συντελεστών ενδογαμίας) ώστε να περιγραφεί η γενετική κατάσταση των πληθυσμών με βάση τους μικροδορυφορικούς δείκτες και να προσδιοριστεί η μιτοχονδριακή απλο-ομάδα στην οποία ανήκουν οι γεννήτορες.



## Εισαγωγή

Το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) είναι ένα ψάρι της οικογένειας των Καραγκιδών (Carangidae). Η γεωγραφική κατανομή του είδους χαρακτηρίζεται ως παγκόσμια με διακυμάνσεις στα γεωγραφικά πλάτη. Έχει παρατηρηθεί στον Ινδικό και στον δυτικό Ειρηνικό, στη Νότιο Αφρική, στον Περσικό κόλπο, στη Νότια Ιαπωνία και νότια μέχρι την Νέα Καληδονία και τη Μικρονησία. Στον δυτικό Ατλαντικό έχει βρεθεί από τη Νέα Σκωτία του Καναδά μέχρι τη Βραζιλία, με παρουσία τόσο στον Κόλπο του Μεξικού όσο και στην Καραϊβική. Στον Ανατολικό Ατλαντικό, έχει παρουσία από τις Βρετανικές Ακτές μέχρι το Μαρόκο και τη Μεσόγειο.

Το γένος *Seriola* θεωρείται ιδιαίτερος σημαντικό για την ιχθυοκαλλιέργεια και αποτελεί προϊόν καλλιέργειας σε πολλές διαφορετικές χώρες. Τα διάφορα είδη του γένους που εκτρέφονται είναι το *Seriola lalandi* στην Ιαπωνία και την Αυστραλία, το *Seriola rivoliana* στις ΗΠΑ, το *Seriola mazatlana* στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική, το *Seriola quinqueradiata* στην Ιαπωνία καθώς και το *Seriola dumerili* στην Ιαπωνία, στην Μεσόγειο και στο Βιετνάμ. Η ανάγκη ποικιλότητας και διαφοροποίησης της ιχθυοκαλλιέργειας οδήγησε σε αυτή την εκτεταμένη καλλιέργεια του γένους αυτού σε διάφορες χώρες.

Ειδικότερα, το μαγιάτικο θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά είδη για την διαφοροποίηση της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας γεγονός που διαφαίνεται και από τις πολυάριθμες έρευνες που έχουν γίνει για την εκτροφή, την αναπαραγωγή, την ωογένεση, την οντογένεση, την ανάπτυξη και την θνησιμότητα τις δύο προηγούμενες δεκαετίες και οι οποίες συνεχίζονται μέχρι σήμερα (Κολιός, 2017). Τα παραπάνω αντικατοπτρίζουν τη σημασία και τη μεγάλη δυναμική του μαγιάτικου για την ποικιλότητα και τη διαφοροποίηση της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας. Μαζί με άλλα είδη αναμένεται να βοηθήσουν τη βιομηχανία να αναπτυχθεί και να παράγει προϊόντα στο μικρότερο δυνατό χρόνο με το μικρότερο δυνατό κόστος και στο μέγιστο δυνατό μέγεθος. Όλα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την Μεσογειακή και όχι μόνο ιχθυοκαλλιέργεια προκειμένου να ανταπεξέλθει στην ολοένα αυξανόμενη ζήτηση τροφής και πρωτεΐνης από τη θάλασσα και τους υδρόβιους οργανισμούς.

Η παρούσα εργασία στοχεύει στην μελέτη της γενετικής σύστασης του πληθυσμού του μαγιάτικου της εταιρείας Ιχθυοκαλλιέργειες Αργοσαρωνικού Α.Ε. (ΑΡΓΟ) μέσω πυρηνικών και μιτοχονδριακών γενετικών δεικτών με σκοπό να διερευνηθεί η ύπαρξη της απαιτούμενης γενετικής ποικιλότητας για την έναρξη προγραμμάτων γενετικής επιλογής. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα συγκριθούν με τα αντίστοιχα συμπεράσματα μιας προγενέστερης έρευνας πάνω στο ίδιο είδος, η οποία είχε επικεντρωθεί κυρίως στον ανατολικό Ατλαντικό και τη δυτική Μεσόγειο (Šegvić-Bubić et al.2016).

## Υλικά και Μέθοδοι

1. Συλλογή Δειγμάτων: Με σκοπό τη μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής δομής του μαγιάτικου, συλλέχθηκε κομμάτι ιστού πτερυγίου από ψάρια-γεννήτορες της εταιρίας ΑΡΓΟ. Στη συνέχεια, το κομμάτι ιστού αποθηκεύτηκε σε καθαρή αιθανόλη για να διατηρηθεί για μοριακές αναλύσεις. Συνολικά, συλλέχθηκαν 30 δείγματα γεννητόρων.
2. Εξαγωγή και ποσοτικοποίηση του DNA: Η εξαγωγή DNA από τους ιστούς των δειγμάτων έγινε ακολουθώντας ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με τη χρήση αλάτων. Το αποτέλεσμα της διεργασίας αυτής ήταν η απόκτηση καθαρού διαλύματος DNA σε τελικό όγκο 100 μl για καθένα από τα δείγματα. Στη συνέχεια, έγινε ποσοτικοποίηση του DNA σε κάθε δείγμα με τη μέτρηση της συγκέντρωσής του με φασματοφωτόμετρο Nanodrop 1000 (Thermo Fischer Scientific). Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης είναι απαραίτητη προκειμένου να πραγματοποιηθεί επιτυχώς η διαδικασία της PCR (Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) με την χρήση όσο το δυνατό ομοίων συγκεντρώσεων DNA για τα δείγματα. Εμπειρικά, προσδιορίστηκε πως συγκέντρωση 10-100 ng/μl DNA είναι σε ικανοποιητικό επίπεδο για να χρησιμοποιηθεί αρχικά στις αντιδράσεις PCR. Στα δείγματα των όποιων η συγκέντρωση ήταν υψηλότερη από 100 ng/ml πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις με σκοπό την προσαρμογή τους στα κατάλληλα όρια (~20 ng/μl).
3. Πολλαπλασιασμός μικροδορυφορικών δεικτών και γονοτύπηση δειγμάτων: Για τον πολλαπλασιασμό των μικροδορυφορικών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν 13 μικροδορυφορικοί δείκτες (Πίνακας 1) και ο



πολλαπλασιασμός όλων των μικροδορυφορικών δεικτών έγινε σε μια μόνο αντίδραση multiplex χρησιμοποιώντας το QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kit (100) (QIAGEN), με τον ένα από τους δύο εκκινητές να είναι σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**.

Ο τελικός όγκος αντίδρασης ήταν 9 µl και περιείχε 4,5 µl ρυθμιστικού διαλύματος Multiplex 2x, 0,5 µl διαλύματος Q, 3,0 µl του μίγματος των 26 εκκινητών (σε συγκέντρωση 10nM), και 1,0 µl DNA (περ. 20 ng/µl). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματη συσκευή ή κυκλοποιητή PCR (T100™ Biorad Thermal Cycler) σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα φάσεων και θερμοκρασιών: προεπώαση στους 95°C για 15', στη συνέχεια 35 κύκλοι αποδιάταξης (denaturation) στους 94°C για 30", σύνδεσης (annealing) στους 59°C για 90" και επιμήκυνσης (extension) στους 72°C για 60", και τέλος μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 600".

**Πίνακας 1:** Χαρακτηριστικά των μικροδορυφορικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

AA	Name	GenBank Accession Nb	Dye	Forward Primer sequence (5'–3')	Reverse Primer sequence (5'–3')	Repeat sequence
1	Sdu10	DQ468090	HEX	CCAAGTCCTCCTGCTACTACCAT	CCTTGTGGATGACCTGTTTG	(GAA)18
2	Sdu21	DQ468095	Atto-550	CTCAGGACAATGTTGGTAG	GCTAACAAGTTCACGACAT	(GATA)25
3	Sdu22	DQ468096	Atto-565	CATTCTCCAAGTATGTGACCTC	GCTCTATGCGAATACCTCCA	(GAA)21
4	Sdu29	DQ883568	FAM	CCTTGCCATACCGATGCCAG	GACTGCTCTGCCTGCTGTTG	(GA)14
5	Sdu31	DQ883569	FAM	CACATTTGGACGGATTCTTC	GCTGTTATCTCCAGTGCT	(CA)14
6	Sdu32	DQ883570	Atto-550	CCTGTGAGAGCATTGGTAT	GTGCTGTCTCTCTGTGCAT	(CA)17
7	Sdu34	DQ883572	Atto-565	CCTTGTGTTGTATCTGCTGTAA	GGAATAAACCTCGTCTGTCA	(GA)20
8	Sdu36	DQ883573	HEX	CTGTTATGAAGCAGTGAAGAGG	GGACCATCCTGCTCTGACA	(GA)23
9	Sdu37	DQ883574	Atto-565	CCTCTAATGGACTTCAGCG	GGTTATTTGAGAGCCGTC	(CA)16
10	Sdu39	DQ883575	FAM	AGTGGCTTCTGCTGCTGT	CGTGTGCGTGCTGTAAA	(CA)16
11	Sdu40	DQ883576	Atto-550	CGATGCTTCAACTCCGACACAC	CCATCCTTCATCAGCAACAACATCC	(CA)17
12	Sdu41	DQ883577	HEX	AGCGTGGACAGTTTATGG	GTCTGTTTACTGGTCGCA	(CA)18
13	Sdu46	DQ883580	FAM	GCAGTGTGAGCCATACATTAC	CTACAGGACAAAAGCCATT	(GA)30

4. Γονοτύπηση μικροδορυφορικών δεικτών: τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε αυτόματο αλληλουχητή ABI 3700 (Applied Biosystems), μετά από κατάλληλη αραιώση του κάθε προϊόντος. Ως πρότυπο μεγέθους χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα Genescan 500-LIZ (Applied Biosystems). Το μέγεθος των αλληλομόρφων εκτιμήθηκε με το πρόγραμμα STRand 2.4.110 (<http://www.vgl.ucdavis.edu/STRand>, Toonen & Hughes 2001).

5. Βασικές στατιστικές αναλύσεις: Ο υπολογισμός των βασικών στατιστικών αναλύσεων για τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας και της γενετικής δομής έγινε με το πρόγραμμα GENETIX v.405.2 (Belkhir et al. 2004). Υπολογίστηκαν η συχνότητα του κάθε αλληλομόρφου σε κάθε γενετικό τόπο, ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων στον πληθυσμό, και οι δείκτες ετεροζυγωτίας. Επίσης προσδιορίστηκε ο δείκτης Fis που αποτελεί τον συντελεστή ενδογαμίας και περιγράφει την απόκλιση της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας από την αναμενόμενη εντός ενός υποπληθυσμού ως αποτέλεσμα της μη τυχαίας διασταύρωσης των ατόμων.

6. Πολλαπλασιασμός και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) με την Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR): Για να πολλαπλασιαστεί η περιοχή ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε η PCR με τη χρήση του ζεύγους των εκκινητών SerCR\_H (5' - CGATTTCTGTCCCT GACCAT - 3') και SerCR\_L (5' - CCTACCCCTAGCTCCCAAAG - 3') σύμφωνα με τους Šegvić-Bubić et al. (2016) που το χρησιμοποίησαν για τον πολλαπλασιασμό της συγκεκριμένης περιοχής μεγέθους περίπου 418 ζευγών βάσεων (base pairs, bp).

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης PCR ήταν 12 µl και περιείχαν 2,4 µl ρυθμιστικού διαλύματος Taq 5x, 0,3 µl διαλύματος ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης (5u/µL), 0,25 µl του κάθε εκκινητή (σε συγκέντρωση 10 nM), 1,2 µl διαλύματος MgCl (25mM), και 0,3 µl διαλύματος dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dCTP σε συγκέντρωση 10 mM). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή PCR (T100™ Biorad Thermal Cycler)



σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα φάσεων και θερμοκρασιών: προεπώαση στους 95°C για 60", στη συνέχεια 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 50", σύνδεσης στους 48°C για 50" και επιμήκυνσης στους 72°C για 60", και τέλος μια τελική επιμήκυνση στους 72°C για 300".

Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε το μήκος της αλληλουχίας των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτές (gels) αγαρόζης 1,5% μέσω της σύγκρισης με τον DNA marker pUC 19 / Taq I γνωστής συγκέντρωσης και γνωστού μήκους.

7. Αντίδραση αλληλούχισης (sequencing): Μετά την επαλήθευση του μήκους της αλληλουχίας, τα προϊόντα της PCR χρησιμοποιήθηκαν σε ένα πρωτόκολλο καθαρισμού με τη χρήση της μεθόδου κατακρήμνισης με αιθανόλη (ethanol/sodium acetate precipitation), και στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου Nanodrop 1000 (Thermo Fischer Scientific). Ακολούθησε η αντίδραση αλληλούχισης χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Big Dye terminator v3.1 (Applied Biosystems) σε τελικό όγκο 10 μl με 1,5 μl Big Dye buffer 5x, 1,0 μl Big Dye v3.1, 0,5 μl του εκκινητή (10 μM) και περ. 35 ng/μl DNA, σε θερμικό κυκλοποιητή (T100™ Biorad Thermal) σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα φάσεων και θερμοκρασιών: προεπώαση στους 96°C για 60", και 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 96°C για 10", σύνδεσης στους 50°C για 15" και επιμήκυνσης στους 60°C για 240".

Μετά την αντίδραση αλληλούχισης, τα προϊόντα της αντίδρασης καθαρίστηκαν εκ νέου με το παραπάνω πρωτόκολλο καθαρισμού (κατακρήμνισης με αιθανόλη), και ακολούθησε ξήρανση και συντήρησή τους στους -20 °C και τελικά διάλυση τους σε 10,0 μl φορμαμίδιο υψηλής καθαρότητας (HiDi Formamide). Λίγο πριν τα δείγματα χρησιμοποιηθούν, αποδιατάχθηκαν με θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά και απότομη ψύξη και ηλεκτροφορήθηκαν στον αυτόματο αλληλουχική αλληλουχιών sequencer ABI 3700 (Applied Biosystems).

8. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης της περιοχής ελέγχου του mtDNA: Η επεξεργασία και η εκτίμηση της ποιότητας των χρωματογραφήματων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA v.7 (Kumar et al., 2015). Συνολικά, τα 30 χρωματογραφήματα συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες της έρευνας των Šegvić-Bubić et al. 2016 για την απόδοσή τους σε απλότυπους τύπου A και B.

Οι αλληλουχίες αυτές στοιχίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA v.7 και στη συνέχεια, κατασκευάστηκε το φυλόγραμμα των φυλο-ομάδων μεταξύ των σχέσεων και των αποστάσεων των διαφορετικών απλοτύπων με την επιλογή Neighbor Joining του MEGA. Η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου έγινε χρησιμοποιώντας τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις, δηλαδή με ίσα σταθμά απόστασης για όλες τις μεταλλαγές, σταθμά μεταπτώσεων/μεταστροφών 1:1 και παράμετρο  $\epsilon=0$ . Οι παραπάνω αλληλουχίες κοπήκαν σε τμήμα μήκους 393 ζευγών βάσεων που αφορούσε την D-Loop. Η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου έγινε αφότου υπολογίστηκαν οι τιμές μέγιστης πιθανοφάνειας για 24 διαφορετικά μοντέλα κατασκευής φυλογενετικού δέντρου Neighbor-joining και βρέθηκε πως το καταλληλότερο μοντέλο ήταν το Tamura 92+ G με bootstrap = 10000.

## **Αποτελέσματα και Συζήτηση**

1. Μικροδορυφορικοί Δείκτες: Από την ανάλυση του συνόλου των 30 δειγμάτων για τους 13 μικροδορυφορικούς τόπους, βρέθηκε υψηλό ποσοστό πολυμορφισμού μέσα στο πληθυσμό του μαγιάτικου της ΑΡΓΟ. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των αλληλομόρφων παρουσίασε διακύμανση από 4 (στον τόπο sdu41) μέχρι 20 (στους τόπους sdu21 & sdu32). Στο σύνολο βρέθηκαν 118 αλληλομόρφοι με τον μέσο αριθμό αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο να είναι 9,08. Ο αριθμός και το εύρος των αλληλομόρφων σε κάθε γενετικό τόπο στον πληθυσμό παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2**. Στους **Πίνακες του Παραρτήματος** παρουσιάζονται οι συχνότητες εμφάνισης των αλληλομόρφων με ποσοστά σε κάθε γενετικό τόπο ανά πληθυσμό. Στον πληθυσμό αυτό παρατηρείται μια μικρή μείωση της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας ( $H_o$ ) σε σχέση με την αναμενόμενη ( $H_e$ ) αλλά γενικά οι τιμές θεωρούνται πολύ καλές για όλους τους γενετικούς τόπους με εξαίρεση ίσως τον τόπο sdu41. Η τιμή Fis που όπως είπαμε αποτελεί τον συντελεστή ενδογαμίας και περιγράφει την απόκλιση της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας (0,677) από την αναμενόμενη (0,706) εντός ενός υπο-πληθυσμού υπολογίστηκε σε 0,0583 και υποδεικνύει μικρή γενετική συσχέτιση μεταξύ των ατόμων. Αυτό επιβεβαιώθηκε κι από ένα τεστ Hardy-Weinberg για ετεροζυγωτική ανεπάρκεια (heterozygote deficiency) με το λογισμικό ML-Relate (Kalinowski et al., 2006) που χρησιμοποιεί τυχαιοποίηση Monte Carlo που περιγράφεται από τους Guo & Thompson (1992) και το στατιστικό τεστ 'U' όπως περιγράφεται από τους Rousset & Raymond (1995). Για την ερμηνεία, εάν η τιμή  $p$  που αναφέρεται στον Πίνακα 2 είναι χαμηλή ( $<0,05$ ), μπορούμε να



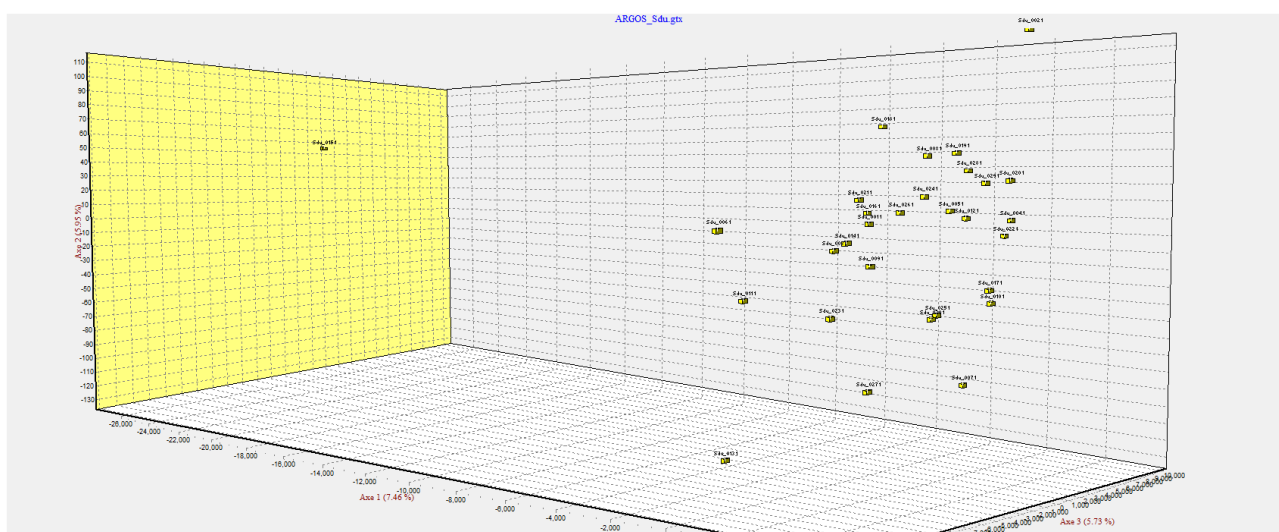


συμπεράνουμε ότι υπάρχει ετεροζυγωτική ανεπάρκεια, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα μηδενικά αλληλόμορφα μπορεί να προκαλέσουν τέτοιες ελλείψεις, αλλά υπάρχουν και άλλες πιθανές εξηγήσεις.

**Πίνακας 2:** Χαρακτηριστικά των μικροδορυφορικών δεικτών στον πληθυσμό που αναλύθηκε, με τον αριθμό (N) και το εύρος (Size Range) των αλληλομόρφων σε κάθε γενετικό τόπο στον πληθυσμό καθώς και τις τιμές παρατηρούμενης ( $H_o$ ) και αναμενόμενης ( $H_e$ ) ετεροζυγωτίας.

Msat	N	Size Range	He/Ho	P Value
Sdu10	9	297–339	0,800/0,733	0,1418
Sdu21	20	279–383	0,928/0,933	0,3108
Sdu22	6	318–348	0,699/0,600	0,1042
Sdu29	7	311–339	0,783/0,800	0,6415
Sdu31	5	082–098	0,624/0,600	0,4421
Sdu32	20	103–179	0,902/0,867	0,0932
Sdu34	6	086–102	0,695/0,700	0,0408
Sdu36	6	200–214	0,756/0,733	0,3971
Sdu37	10	168–298	0,648/0,633	0,4901
Sdu39	10	144–184	0,723/0,800	0,8373
Sdu40	7	205–249	0,599/0,567	0,1895
Sdu41	4	096–128	0,336/0,233	0,0283
Sdu46	8	211–247	0,686/0,600	0,0604
M.O.	9,08		0,706/0,677	

Επίσης, με το λογισμικό GENETIX έγινε η παραγοντική ανάλυση των αντιστοιχήσεων (FCA, factorial correspondence analysis) βασισμένη στους γονότυπους των 30 γεννητόρων για τους 13 μικροδορυφορικούς τόπους. Η μεγαλύτερη απόκλιση οφείλεται στα άτομα 02, 13 και 15 (**Γράφημα 1**).



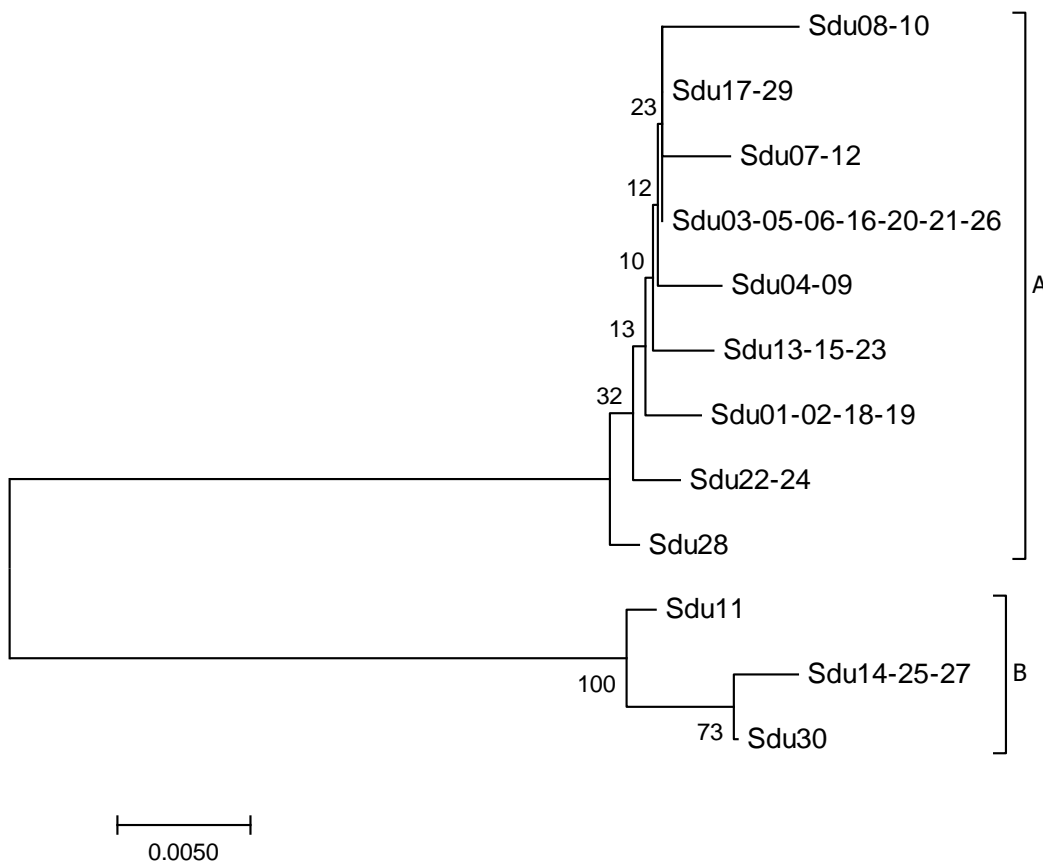
**Γράφημα 1.** FCA (factorial correspondence analysis) με βάση τους γονότυπους των 30 γεννητόρων.



Τέλος, χρησιμοποιώντας το λογισμικό ML-Relate (Kalinowski et al., 2006) είχαμε την αναφορά που δείχνει τη σχέση μεταξύ κάθε ζεύγους ατόμων που έχει τη μεγαλύτερη πιθανότητα μεταξύ των τεσσάρων ακόλουθων σχέσεων: μη-σχετικά άτομα ( $U = \text{Unrelated}$ ), ετεροθαλή ( $HS = \text{Half Sibs}$ ), ομοθαλή ( $FS = \text{Full Sibs}$ ), και γονιού-απογόνου ( $PO = \text{Parent / Offspring}$ ). Τα αποτελέσματα δείχνουν πως για περίπου το 7,5% των συνδυασμών κάποιοι γεννήτορες θα μπορούσαν να είναι ετεροθαλή αδέρφια δηλαδή να μοιράζονται τον ένα από τους δύο γονείς (**Παράρτημα 1**).

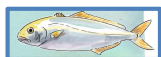
2. Μιτοχονδριακό DNA & Απλότυποι: Προσδιορίστηκε ένα τμήμα 393 ζευγών της μιτοχονδριακής περιοχής D-Loop. Το τμήμα προσδιορίστηκε και στα 30 δείγματα της εταιρίας. Οι 30 αλληλουχίες του μαγιάτικου αντιπροσώπευαν 12 μοναδικούς απλότυπους (**Παράρτημα 2**). Σύμφωνα με την εργασία των Šegvić-Bubić et al. (2016), οι 9 από τους 12 απλότυπους είναι του μιτοχονδριακού τύπου "A" και εντοπίζονται σε 25 γεννήτορες (14 θηλυκά και 11 αρσενικά μαγιάτικα) ενώ οι άλλοι 3 είναι του λιγότερου συχνού μιτοχονδριακού τύπου "B" και εντοπίζονται σε 5 μόλις γεννήτορες (1 θηλυκό και 4 αρσενικά μαγιάτικα) (**Γράφημα 2**).

Οι εκτιμήσεις της μέσης εξελικτικής απόκλισης ανάμεσα σε ζεύγη απλοτύπων εντός των δύο ομάδων, κατέδειξε πως ο αριθμός των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων υπολογίζοντας τον μέσο όρο όλων των ζευγών απλοτύπων σε κάθε ομάδα είναι ίσος με 0,005 σε κάθε ομάδα (A και B). Επιπλέον, η εξελικτική απόκλιση των δύο ομάδων είναι ίση με 0,053. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το μοντέλο Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004).



**Γράφημα 2.** Η εξελικτική ιστορία συνήχθη με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987).

Εμφανίζεται το βέλτιστο δέντρο με το άθροισμα του μήκους των κλάδων να είναι 0,07270341. Το ποσοστό των αναπαραγόμενων δέντρων στα οποία οι σχετικοί απλότυποι ομαδοποιήθηκαν μαζί στη δοκιμή bootstrap (1000 επαναλήψεις) εμφανίζεται δίπλα στους κλάδους (Felsenstein, 1985). Το δέντρο σχεδιάστηκε σε κλίμακα, με μήκη κλάδων στις ίδιες μονάδες με εκείνα των εξελικτικών αποστάσεων που χρησιμοποιούνται



για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004) και είναι στις μονάδες του αριθμού των αντικαταστάσεων νουκλεοτιδίων ανά θέση. Η ανάλυση περιελάμβανε 12 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες/ απλότυπους. Όλες οι θέσεις που περιέχουν κενά και ελλείποντα δεδομένα εξαλείφθηκαν. Υπήρχαν συνολικά 393 θέσεις στο τελικό σύνολο δεδομένων. Οι εξελικτικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο MEGA7 (Kumar et al., 2015).

**Διαφοροποιήσεις από ΤΠΕ:** Καμία διαφοροποίηση

### Βιβλιογραφία

- Belkhir, K., B.P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F., 1996. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Guo, SW., & Thompson, EA 1992 Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Kalinowski, ST, Wagner, AP., Taper, ML 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579.
- Κολιός, Ε. 2017. Γενετική δομή πληθυσμών μαγιάτικου *Seriola dumerili* Risso, 1810 (Perciformes, Carangidae) στην Μεσόγειο θάλασσα και στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό. Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Rousset, F & Raymond, M 1995 Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140:1413-1419
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Šegvić-Bubić, T., Marrone, F., Grubišić, L., Izquierdo-Gomez, D., Katavić, I., Arculeo, M., Lo Brutto, S., 2016. Two seas, two lineages: How genetic diversity is structured in Atlantic and Mediterranean greater amberjack *Seriola dumerili* Risso, 1810 (Perciformes, Carangidae). *Fisheries Research* 179, 271-279.
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Toonen, R.J., Hughes, S., 2001. Increased throughput for fragment analysis on an ABI Prism® 377 automated sequencer using a membrane comb and STRand software. *BioTechniques* 31, 1320-1324.



ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS



GALAXIDI  
Marine Farm S.A.



ARGOSARONIKOS  
FISHFARMS S.A.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Ταμείο  
Περιφερειακής Ανάπτυξης

ΕΠΑνΕΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

ΕΣΠΑ  
2014-2020  
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη





**Ειδικές Δράσεις «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»  
ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068**

**Παράρτημα 2:** Απλότυποι και Φυλο-ομάδα στα 30 δείγματα της εταιρίας που αναλύθηκαν.

AA	Φύλο	Φυλο-Ομάδα	Απλότυπος
Sdu_ARGO_AMBER_01	F	A	6
Sdu_ARGO_AMBER_02	M	A	6
Sdu_ARGO_AMBER_03	F	A	8
Sdu_ARGO_AMBER_04	F	A	7
Sdu_ARGO_AMBER_05	M	A	8
Sdu_ARGO_AMBER_06	M	A	8
Sdu_ARGO_AMBER_07	F	A	2
Sdu_ARGO_AMBER_08	F	A	4
Sdu_ARGO_AMBER_09	F	A	7
Sdu_ARGO_AMBER_10	M	A	4
Sdu_ARGO_AMBER_11	M	B	12
Sdu_ARGO_AMBER_12	M	A	2
Sdu_ARGO_AMBER_13	F	A	3
Sdu_ARGO_AMBER_14	F	B	10
Sdu_ARGO_AMBER_15	F	A	3
Sdu_ARGO_AMBER_16	M	A	8
Sdu_ARGO_AMBER_17	F	A	9
Sdu_ARGO_AMBER_18	M	A	6
Sdu_ARGO_AMBER_19	F	A	6
Sdu_ARGO_AMBER_20	M	A	8
Sdu_ARGO_AMBER_21	F	A	8
Sdu_ARGO_AMBER_22	M	A	5
Sdu_ARGO_AMBER_23	M	A	3
Sdu_ARGO_AMBER_24	F	A	5
Sdu_ARGO_AMBER_25	M	B	10
Sdu_ARGO_AMBER_26	M	A	8
Sdu_ARGO_AMBER_27	M	B	10
Sdu_ARGO_AMBER_28	F	A	1
Sdu_ARGO_AMBER_29	F	A	9
Sdu_ARGO_AMBER_30	M	B	11



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



Τμήμα Βιολογίας



GALAXIDI  
Marine Farm S.A.



ARGOSARONIKOS  
FISHFARMS S.A.



**Ευρωπαϊκή Ένωση**  
Ευρωπαϊκό Ταμείο  
Περιφερειακής Ανάπτυξης

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη