

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΑΓΡΙΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ (*Salmo trutta* L.) ΤΟΥ ΤΡΙΠΟΤΑΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΡΑΠΙΤΣΑΣ**

*Δασκαλάκης Α.Ε., Αποστολίδης Α.Π.\**

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Γεωπονική Σχολή, Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Εργαστήριο Ιχθυοκομίας-Αλιείας, Λεωφόρος Γεωργικής Σχολής, Θεσσαλονίκη

**Περίληψη**

Οι πληθυσμοί άγριας πέστροφας της Ελλάδας παρουσιάζουν σημαντική γενετική διαφοροποίηση ακόμη και μεταξύ γειτονικών περιοχών ή περιοχών που ανήκουν στο ίδιο ποτάμιο σύστημα. Στην εργασία αυτή εξετάστηκε η γενετική σύσταση των πληθυσμών πέστροφας της Αράπιτσας και του Τριπόταμου Ημαθίας. Με βάση προηγούμενες εργασίες οι πληθυσμοί αυτοί εμφανίζουν σημαντική γενετική διαφοροποίηση σε σχέση με τους άλλους ελληνικούς πληθυσμούς πέστροφας χωρίς όμως μέχρι σήμερα να έχει γίνει απευθείας σύγκρισή τους ώστε να διαπιστωθεί η μεταξύ τους γενετική συγγένεια. Αναλύθηκε ο πολυμορφισμός του πυρηνικού και του μιτοχονδριακού (mt) DNA σε 20 άτομα πέστροφας από κάθε πληθυσμό. Η εξέταση του πυρηνικού DNA πραγματοποιήθηκε σε 11 μικροδορυφορικούς τόπους ενώ του mtDNA με τη σύγκριση των προτύπων των πέσεων σε δύο τμήματά του (PCR-RFLP analysis) και τη σύγκριση της αλληλουχίας ενός τμήματος 300 βάσεων της D-loop. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ορθολογική διαχείριση και προστασία των αποθεμάτων των δύο πληθυσμών καθίσταται άμεση και ουσιώδης ανάγκη.

**Λέξεις κλειδιά:** *Salmo trutta*, *Αράπιτσα*, *Τριπόταμος*.

\*Συγγραφέας επικοινωνίας: Αποστολίδης Απόστολος ([apaposto@agro.auth.gr](mailto:apaposto@agro.auth.gr))

**STUDY OF THE GENETIC STRUCTURE AND DIFFERENTIATION BETWEEN BROWN TROUT POPULATIONS (*Salmo trutta* L.) FROM TRIPOTAMOS AND ARAPITSA**

*Daskalakis A.E., Apostolidis A.P.\**

Aristotle University of Thessaloniki, Faculty of Agriculture, Department of Animal Production, Laboratory of Ichthyology & Fisheries, Leoforos Georgikis Scholis, Thessaloniki, Greece

**Abstract**

The brown trout populations of Greece show considerable genetic differentiation which is evident even among populations living in neighbor localities, or in the same river system. Previous studies revealed that the trout populations of Arapitsa and Tripotamos tributaries present considerable genetic differentiation when compared with other Greek populations. However, the relationships between each other are neither clear, nor well established. This study aimed at the examination and comparison of the genetic structure of these two neighbor populations. The genetic variation was examined using nuclear and mitochondrial DNA markers in 20 individuals from each population. Analyses of nuclear DNA were performed through screening of individuals at 11 microsatellite loci while those of mtDNA using both PCR-RFLP and sequencing comparisons. The results suggest that conservation strategies should be urgently developed to protect the genetic integrity of each population.

**Keywords:** *Salmo trutta*, *Arapitsa*, *Tripotamos*

\*Corresponding author: Apostolidis Apostolos ([apaposto@agro.auth.gr](mailto:apaposto@agro.auth.gr))

## 1. Εισαγωγή

Οι πληθυσμοί άγριας πέστροφας της Ευρώπης παρουσιάζουν εκτεταμένη γενετική και μορφολογική διαφοροποίηση (Kottelat and Freyhof 2007). Αυτή είναι ιδιαίτερα εμφανής στους Ελληνικούς πληθυσμούς πέστροφας όπου ακόμη και γειτονικοί γεωγραφικά πληθυσμοί ή πληθυσμοί που ζουν σε διαφορετικούς παραπόταμους του ίδιου όμως ποτάμιου συστήματος χαρακτηρίζονται από σημαντική γενετική ετερογένεια. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι από τις πέντε κύριες φυλογενετικές ομάδες που αποκάλυψε η ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) σε δείγματα πέστροφας από όλη την έκταση εξάπλωσης του είδους (Ευρασία) οι τέσσερις (AD, MA, ME, DA) απαντώνται στην Ελλάδα (Bernatchez 2001).

Με βάση αποτελέσματα προηγούμενων γενετικών ερευνών (Apostolidis *et al.* 2008, Apostolidis *et al.* subm.) οι πληθυσμοί πέστροφας του Τριπόταμου (Βέροιας) και της Αράπιτσας (Νάουσας) διαφοροποιούνται σημαντικά από τους υπόλοιπους ελληνικούς πληθυσμούς πέστροφας. Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα δεν είχε διερευνηθεί η έκταση της μεταξύ τους γενετικής διαφοροποίησης. Έτσι, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η σύγκριση της γενετικής σύστασης των δύο αυτών πληθυσμών με τη βοήθεια μοριακών δεικτών του πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

Συνολικά αναλύθηκαν 45 άτομα πέστροφας από τους ποταμούς Αράπιτσα (22 άτομα) και Τριπόταμος (23 άτομα). Η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε από το μυϊκό ιστό, ή από τα πτερυγία, σύμφωνα με την μέθοδο CTAB-Πρωτεϊνάση K (Hillis *et al.* 1996).

Η ανάλυση του πυρηνικού DNA περιλάμβανε τη διερεύνηση του πολυμορφισμού σε 11 μικροδορυφορικούς τόπους (Str15, Str60, Str543, Str59-1, Str54-1, Str BS131, Ssa103, Str100, Ssad58, SsaD190, SSsp2213). Στις περιπτώσεις εκείνες που το πρότυπο των ατόμων του ενός πληθυσμού ήταν ήδη γνωστό σε ένα τόπο, η ενίσχυση με PCR αφορούσε τα άτομα του έτερου πληθυσμού με προσθήκη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων του πρώτου πληθυσμού, έτσι ώστε να είναι δυνατή η απευθείας σύγκριση των αλληλομόρφων όλων των γενετικών τόπων στο σύνολο των ατόμων. Μετά την ενίσχυση με PCR γινόταν ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτές πολυακρυλαμίδης 12% και χρώση με AgNO<sub>3</sub>.

Η ανάλυση του mtDNA περιλάμβανε τόσο τη σύγκριση της αλληλουχίας των βάσεων (sequencing) ενός τμήματος 300 βάσεων του βρόχου εκτόπισης (D-Loop) όσο και την ανάλυση των πολυμορφικών θέσεων πέψης με ένζυμα περιορισμού (PCR-RFLPs). Η σύγκριση των αλληλουχιών έγινε με βάση προηγούμενες εργασίες (Apostolidis *et al.* 1997, Apostolidis *et al.* subm.), ενώ η PCR-RFLP μέθοδος περιλάμβανε τον πολλαπλασιασμό σε κάθε άτομο δύο τμημάτων του mtDNA, μήκους 2000 και 2300 bp (που περιλαμβάνουν τα γονίδια ND-1 και ND-3,4, αντίστοιχα) και εν συνεχεία τις πέψεις του κάθε τμήματος με 5 ένζυμα περιορισμού (*HinfI*, *HaeIII*, *HapII*, *XhoI*, *TaqI*).

Λεπτομέρειες σχετικά με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (μικροδορυφορικούς και μιτοχονδριακούς), τις συνθήκες κάθε PCR αντίδρασης, καθώς και τα πρωτόκολλα των τεχνικών ηλεκτροφόρησης-χρώσης είναι διαθέσιμες από τον συγγραφέα επικοινωνίας.

### 3. Αποτελέσματα

Η διερεύνηση του πολυμορφισμού των δύο πληθυσμών με τους μικροδορυφορικούς δείκτες αποκάλυψε ότι τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ομόζυγα, με κοινά αλληλόμορφα, σε 8 από τους 11 γενετικούς τόπους. Διαφοροποίηση παρουσιάστηκε στους εκκινητές Str-543 και Ssad-58 στους οποίους όλα τα άτομα από τον πληθυσμό της Αράπιτσας ήταν ομόζυγα ενώ αυτά του Τριπόταμου ήταν πολυμορφικά με 2 και 4 αλληλόμορφα αντίστοιχα, και στον εκκινητή SSsp2213 όπου, αντίστροφα, πολυμορφισμός με 3 αλληλόμορφα βρέθηκε μόνο στα άτομα της Αράπιτσας. Οι δοκιμές ακριβείας (exact tests) που ακολούθησαν έδειξαν ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων και στους τρεις πολυμορφικούς τόπους διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο πληθυσμών. Αξίζει να αναφερθεί ότι πολλά από τα κοινά αλληλόμορφα των δύο πληθυσμών είναι μοναδικά δηλ. δεν έχουν βρεθεί σε άλλους ελληνικούς πληθυσμούς πέστροφας.

Χαμηλά επίπεδα ετεροζυγωτίας αποκάλυψε και η εξέταση του πολυμορφισμού του mtDNA. Έτσι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης με την PCR-RFLP τεχνική όλα τα άτομα και των δύο πληθυσμών που εξετάστηκαν βρέθηκαν ομόζυγα εμφανίζοντας παράλληλα τον ίδιο απλότυπο. Διαφοροποίηση βρέθηκε μόνο κατά τη σύγκριση των αλληλουχιών της D-loop όπου ενώ τα άτομα της Αράπιτσας που εξετάστηκαν είχαν ένα μόνο απλότυπο (Apostolidis *et al.* subm.) στα άτομα του Τριπόταμου παρατηρήθηκε και δεύτερος απλότυπος (Apostolidis *et al.* 1997).

### 4. Συζήτηση

Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρείχαν σημαντική πληροφόρηση για τη γενετική σύσταση των πληθυσμών πέστροφας της Αράπιτσας και του Τριπόταμου. Η πιο σημαντική ίσως αποκάλυψη ήταν τα ιδιαίτερα χαμηλά ή μηδενικά επίπεδα ετεροζυγωτίας που παρατηρήθηκαν και στους δύο πληθυσμούς. Ακόμη, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν τη στενή φυλογενετική σχέση μεταξύ των δύο πληθυσμών που όπως φαίνεται διαφοροποιούνται σημαντικά από τους υπόλοιπους ελληνικούς πληθυσμούς πέστροφας. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και των δύο πληθυσμών (π.χ. πολύ μικροί σε μέγεθος, περιορισμένο εύρος διαβίωσης) υποδηλώνουν ότι ο κίνδυνος εξαφάνισής τους είναι πολύ μεγάλος και συνεπώς καθιστούν αναγκαία την άμεση λήψη διαχειριστικών μέτρων για την προστασία τους. Τα όποια μέτρα εφαρμοστούν στους δύο πληθυσμούς πρέπει να λαμβάνουν υπ’ όψιν τη σημαντική διαφοροποίηση στις συχνότητες των αλληλομόρφων που παρατηρήθηκε σε 3 από τους 11 μικροδορυφορικούς τόπους που εξετάστηκαν και να περιλαμβάνουν τη διατήρηση και αποκατάσταση των φυσικών τους ενδιαιτημάτων, με την ταυτόχρονη αποτροπή εισαγωγών άλλων ξενικών ή οικολογικά ισοδύναμων ειδών, όπως είναι η Αμερικάνικη πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*).

### Βιβλιογραφία

Apostolidis A.P., Triantaphyllidis C., Kouvatsi A., Economidis P.S. (1997) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology*, 6: 531-542.

- Apostolidis A.P., Madeira M.J., Hansen M.M., Machordom A. (2008) Genetic structure and demographic history of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from the southern Balkans. *Freshwater Biology*, 53: 1555-1566.
- Apostolidis A.P., Stoumboudi M.Th., Kalogianni E., Cote G., Bernatchez L. (2011) Genetic divergence among native trout populations from Southern Balkans based on mitochondrial DNA and microsatellite variation. (subm.)
- Bernatchez L. (2001) The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55(2): 351-379.
- Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (1996) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates: Sunderland.
- Kottelat M., Freyhof, J. (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany, Publications Kottelat.