

ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΓΟΝΕΩΝ ΣΕ ΜΑΖΙΚΗ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΠΙΛΟΓΗΣ.

Μπαταργιάς Κων/νος², Κοτούλας Γεώργιος¹, Μαγουλάς Αντώνιος¹ και Ζούρος Ελευθέριος^{1,2}.

¹ Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας Κρήτης

² Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Βιολογικό Τμήμα

ABSTRACT

Batargias C., Kotoulas Y., Magoulas A. and Zouros E. Use of microsatellite DNA for the identification of parenthood in a mass-spawning breeding program. Preliminary results on selection.

We have developed assays for the detection of microsatellite variation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L). Microsatellites are now recognized as the most promising type of genetic markers. The usefulness of these markers can be recognized for a variety of applications and particularly for mass-spawning breeding programs. In order to demonstrate the feasibility of the "common tank" approach, thirty-three adult gilthead sea bream were put together for mass-spawning. The four microsatellite loci developed revealed very high levels of heterozygosity, averaging at 95% across loci. The gametic contribution of each brooder to the next generation was highly uneven. The statistical analysis revealed differences among male brooders in both ages but only in the late age among females. Maximum likelihood analysis was applied for the estimation of heritabilities which varied between 0.25-0.40 for body weight.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι κλασικές μέθοδοι επιλογής έχουν σαν σκοπό την παραγωγή βελτιωμένων στελεχών ως προς ένα ποσοτικό, κυρίως, χαρακτηριστικό όπως η αύξηση. Η προσδοκώμενη βελτίωση μπορεί να απαιτεί αρκετό χρόνο αλλά πολλές φορές είναι σημαντική. Οι Hershberger *et al.* (1990) δουλεύοντας με σολομό παρατήρησαν μια αύξηση του μέσου βάρους κατά 60% μετά από 4 γενιές. Ανάλογα αποτελέσματα είχαν οι Kincaid *et al.* (1977) (in Hershberger *et al.*, 1990) παρατηρώντας μια αύξηση της τάξης του 30% σε τρεις γενιές, για την ιριδιζούσα πέστροφα.

Στα κλασικά προγράμματα γενετικής βελτίωσης κάποια άτομα του ενός φύλου διασταυρώνονται με ένα ή περισσότερα άτομα του άλλου φύλου, σχηματίζοντας όμως πάντα διακριτά ζευγάρια. Οι απόγονοι κάθε μιας διασταύρωσης εκτρέφονται σε διαφορετικές δεξαμενές και όταν φτάνουν το επιθυμητό μέγεθος, ένας μεγάλος αριθμός απογόνων κάθε διασταύρωσης εξετάζεται ως προς το επιθυμητό χαρακτηριστικό (π.χ. το βάρος). Από τα αποτελέσματα γίνονται εκτιμήσεις τόσο της κληρονομιμότητας (heritability) του χαρακτηριστικού όσο και της αναπαραγωγικής αξίας (breeding value) των γεννητόρων. Για να γίνουν, όμως, τέτοιου είδους εκτιμήσεις χρειάζεται να εξεταστεί ένας σχετικά μεγάλος αριθμός διασταυρώσεων με αποτέλεσμα τα πειράματα αυτά να είναι αρκετά δαπανηρά έως αδύνατα, κυρίως λόγω των υπερόγκων αναγκών σε χώρους. Ομως, ακόμη και αν αγνοηθεί το κόστος, υπάρχουν είδη, όπως η τσιπούρα, στα οποία ανάλογες διασταυρώσεις είναι αδύνατες λόγω της βιολογίας του είδους.

Η ανάπτυξη των τεχνικών στον τομέα της μοριακής γενετικής και η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) έδωσε μια καινούργια ώθηση στον τομέα του σχεδιασμού πειραμάτων επιλογής εφόσον μπορούμε πλέον να αναγνωρίσουμε αναδρομικά τους γονείς κάθε ατόμου ακόμη και αν αυτό το άτομο αποτελεί μέρος ενός μεγάλου πληθυσμού.

Η επιτυχία των προγραμμάτων βελτίωσης στα σαλμονοειδή (κυρίως στο σολομό) αποτελεί απτή απόδειξη της δυνατότητας εφαρμογής τέτοιων προγραμμάτων στις ιχθυοκαλλιέργειες. Παρόλα αυτά, πολύ λίγες προσπάθειες επιλογής έχουν γίνει σε άλλα είδη. Ο λόγος είναι αφενός μεν το κόστος που προαναφέρθηκε αλλά και η "μικρή ταχύτητα" επιλογής.

Η ανακάλυψη της τεχνικής της "γενετικής σήμανσης" έχει αλλάξει ριζικά τον τρόπο σχεδιασμού πειραμάτων επιλογής. Η δυνατότητα αναγνώρισης του "γενετικού αποτυπώματος" ενός ατόμου και της αναγνώρισης, μέσω αυτού, των γονέων του με αρκετά μεγάλη βεβαιότητα μας δίνει πλέον την δυνατότητα: α) πειραματισμού κάτω από συνθήκες μαζικής ωτοκίας και γονιμοποίησης και β) εκτροφής των απογόνων σε κοινές δεξαμενές. Έτσι, μπορούμε να αυξήσουμε την στατιστική δύναμη των αποτελεσμάτων μας εφόσον μπορούμε αφενός να αυξήσουμε το μέγεθος του δείγματος και αφετέρου να εξαλείψουμε μεγάλο μέρος της περιβαλλοντικής διακύμανσης που δημιουργούσαν οι διαφορετικές δεξαμενές.

Η τσιπούρα αποτελεί, μαζί με το λαβράκι, τα κατεξοχήν καλλιεργούμενα είδη στην περιοχή της Μεσογείου. Πρόκειται για είδος μεγάλης οικονομικής αξίας τόσο για την αλιεία όσο και για τις ιχθυοκαλλιέργειες. Τα τελευταία 15 χρόνια έχουν συσσωρευθεί πολλές πληροφορίες όσο αφορά την τεχνογνωσία καλλιέργειας και τη βιολογία του είδους σε συνθήκες εντατικής εκτροφής. Όμως, αυτή η ανάπτυξη δεν είναι ανάλογη στον τομέα της γενετικής. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η προσπάθεια χρήσης των μοριακών σημαντών αφενός μεν για την αναδρομική αναγνώριση των γονέων και αφετέρου για την πρώτη επιλογή βελτιωμένων στελεχών τσιπούρας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το απόθεμα γεννητόρων τσιπούρας που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από 32 μη συγγενικά άτομα (από άγριο πληθυσμό) και βρίσκεται στις εγκαταστάσεις του Ι.Θ.Α.ΒΙ.Κ.. Το απόθεμα αυτό συστάθηκε για μαζική ωοστοκία τον Οκτώβριο του 1991. Κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας, που για την τσιπούρα διαρκεί περίπου 3 μήνες, τα αυγά συλλέγονταν σε ειδικές δεξαμενές συλλογής και απομακρύνονταν κάθε ημέρα. Για τους σκοπούς του πειράματος, τα αυγά μιας και μόνο ημέρας συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε δεξαμενή των 500 λίτρων με διαρκή ελαφρύ αερισμό μέχρι την εκκόλαψη. Τα άτομα αυτά εκτράφηκαν σε κοινή δεξαμενή μέχρι την ηλικία των 6 μηνών (θα αναφέρεται στο εξής σαν ηλικία 1) οπότε και αφαιρέθηκε, ζυγίστηκε ατομικά και καταψύχθηκε ένα τυχαίο δείγμα 150 ατόμων. Ένα άλλο τυχαίο δείγμα αφέθηκε να φτάσει την ηλικία των 10 μηνών (ηλικία 2) οπότε και ζυγίστηκε ατομικά και καταψύχθηκε. Προς το τέλος της περιόδου ωοστοκίας οι γεννήτορες μαρκαρίστηκαν με ηλεκτρονική μάρκα (ενδοπεριτοναϊκά) και προσδιορίστηκε το φύλο (η τσιπούρα είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος) με έλεγχο για παρουσία-απουσία σπέρματος. Επίσης, έγινε αιμοληψία από την ουραία αρτηρία και το αίμα τοποθετήθηκε ατομικά σε μικροσωλήνες φυγοκέντρου με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση.

Η εξαγωγή του DNA έγινε από κατεψυγμένο ιστό ή από αίμα (διατηρημένο σε 70-90% αιθανόλη) με τη μέθοδο της πρωτεΐνωσης-K (Sambrook *et al.*, 1989). Για την ανάπτυξη των μικροδορυφορικών μοριακών σημαντών (microsatellite molecular markers) κατασκευάστηκε μια γενομική βιβλιοθήκη χρησιμοποιώντας ενθέματα μεγέθους 300-800 ζευγών βάσεων, τα οποία παρήχθησαν μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα αναγνώρισης 4 βάσεων. Τα ενθέματα αυτά κλωνοποιήθηκαν και αφού αναγνώσθηκε η αλληλουχία τους και από τα δυο άκρα (Sanger *et al.*, 1977) έγινε σχεδιασμός των εκκινητών (primer) χρησιμοποιώντας την αλληλουχία των βάσεων που υπήρχε εκατέρωθεν του μικροδορυφορικού DNA. Στη συνέχεια αυτοί οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος κάθε ενός ατόμου μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν σε αποδιατάσσον πήκτωμα ακρυλαμίδης (6%) και ο χαρακτηρισμός τους έγινε με τη βοήθεια ενός εσωτερικού δείκτη μεγέθους που αντιστοιχούσε σε αλληλόμορφα γονικής προέλευσης (Batargias & Zouros, 1993; Magoulas *et al.* 1994).

Σε περίπου 50-100 μg από το ολικό DNA έγινε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα HaeIII, RsaI και HincII (BRL). Μετά από ηλεκτροφόρηση σε οριζόντιο πήκτωμα αραρόξης χαμηλού σημείου τήξης, απομονώθηκε ένα εύρος θραυσμάτων DNA 300-800 ζευγών βάσεων (bp). Αυτά στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pUC18 και χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων στελέχους της *E. coli* (DH5a). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε υπόστρωμα άγαρ, με επιλεκτικό παράγοντα αμιπικιλίνη. Οι αποικίες που σχηματίστηκαν μεταφέρθηκαν σε νάυλον μεμβράνη και υβριδοποιήθηκαν με ραδιενεργά σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο πολυ(dG-dT)₂₀ (Sambrook *et al.*, 1989). Οι αποικίες που αντέδρασαν θετικά μεταφέρθηκαν σε υγρό μέσο καλλιέργειας όπου και αφέθηκαν να μεγαλώσουν. Το πλασμιδιακό DNA κάθε μιας από αυτές εξήχθη και αναγνώσθηκε η αλληλουχία των βάσεων του κλωνοποιημένου θραύσματος και από τα δύο άκρα (Sanger *et al.*, 1977). Μετά την εξακρίβωση της περιοχής του μικροδορυφορικού DNA (microsatellite DNA), έγινε σχεδιασμός των εκκινητών (primer) χρησιμοποιώντας την αλληλουχία των βάσεων που υπήρχε εκατέρωθεν του μικροδορυφορικού DNA.

Ένας από τους δύο εκκινητές σημαίνονταν ραδιενεργά και χρησιμοποιείτο για τον πολλαπλασιασμό της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος κάθε ενός ατόμου μέσω της κλασικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Μετά τις αντιδράσεις γινόταν ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε κάθετο πήκτωμα ακρυλαμίδης υψηλής αναλυτικής ικανότητας (PAGE) για 2-4 ώρες, ανάλογα με το μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης. Το πήκτωμα ξηραίνονταν και εκτίθετο σε φιλμ ακτίνων X. Η διαδικασία της γονοτύπισης ολοκληρώνονταν με την αναγνώριση των αλληλομόρφων που γινόταν με την ανάγνωσή τους απέναντι σε ένα εσωτερικό marker....

Για την αναδρομική αναγνώριση των γονέων κατασκευάστηκε ένα πρόγραμμα χρησιμοποιώντας τις macro-συναρτήσεις του πακέτου Microsoft Excel για Windows. Για τον υπολογισμό της μέγιστης πιθανοφάνειας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα VARCOMP από το πακέτο SAS 6.1

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έχουν σχεδιαστεί 4 ζεύγη εκκινητών με τους κωδικούς pSAGT1, pSAGT26, pSAGT32 και pSAGT41b, τα οποία είναι πολυμορφικά. Για τους τέσσερις τύπους ανιχνεύονται 22, 16, 13 και 18 αλληλόμορφα αντίστοιχα. Η μέση ετεροζυγωτία υπολογίστηκε, για όλους τους τύπους, στο 95%.

Από τους 32 γεννήτορες, που αποτελούσαν το απόθεμα, οι 10 από αυτούς δεν έδωσαν κανέναν απόγονο ενώ 22 βρέθηκαν να συνεισφέρουν, στην επόμενη γενιά, με έναν ή και περισσότερους απογόνους (**Πίνακας 1**). Η συνεισφορά των τελευταίων ήταν πολύ άνιση. Ο στατιστικός έλεγχος χ^2 για τους 9 θηλυκούς (177,6, df=8, $p < 0.0001$) και τους 13 αρσενικούς (270,1, df=12, $p < 0.0001$) γεννήτορες έδωσε αποτελέσματα που απέρριπταν χωρίς καμμία αμφιβολία την αρχική υπόθεση της ίσης γαμετικής συνεισφοράς.

Από τους 22 γεννήτορες που συνεισέφεραν στην επόμενη γενιά δημιουργήθηκαν 47 οικογένειες, οι οποίες μπορεί να αναλυθούν ως εξής: 39 οικογένειες για την ηλικία 1 και 34 οικογένειες για την ηλικία 2. Σ' αυτές εκτιμήθηκε η γονική επίδραση στο ρυθμό αύξησης των απογόνων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές και μη παραμετρικές προσεγγίσεις. Με τις μη παραμετρικές μεθόδους θελήσαμε να ερευνήσουμε αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των γεννητόρων, όσον αφορά στα βάρη των απογόνων τους. Επιλέχθηκαν τέτοιες μέθοδοι εξαιτίας της φύσης των δεδομένων (άνισος αριθμός απογόνων/οικογένεια και μη τήρηση της προϋπόθεσης της κανονικής κατανομής των δεδομένων). Με την παραμετρική (μέγιστης πιθανοφάνειας- maximum likelihood) θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε τα πιο πάνω αποτελέσματα και για τη μη παραμετρική μέθοδο, υπολογίστηκε μια τιμή για κάθε γεννήτορα, στην οποία δόθηκε το όνομα "αναπαραγωγική τιμή". Αυτή υπολογίστηκε σαν η μέση τιμή...???? Θα μπει να έχουμε μια αδρή εκτίμηση του ποσοστού της προσθετικής γενετικής διασποράς στο απόθεμα των γεννητόρων μας.

Για την ανίχνευση των στατιστικών διαφορών, ανάμεσα στους αρσενικούς ή θηλυκούς γονείς για κάθε ηλικία, αφαιρέθηκαν οι οικογένειες με ένα απόγονο και εφαρμόστηκε η μη παραμετρική μέθοδος Kruskal-Wallis (Zar, 1984). Ο έλεγχος έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αρσενικών γεννητόρων και για τις δυο ηλικίες. Για την ηλικία 1 σχηματίστηκαν τρεις ομάδες γεννητόρων, που αποτελούνταν η πρώτη από τους γεννήτορες #17, 7, 15 και 24, η δεύτερη από τους #7, 15, 24, και 20 και η τρίτη από όλους τους γεννήτορες εκτός των #17 και 7 (**Εικόνα 1A**). Για την ηλικία 2 οι ομάδες αποτελούνταν η πρώτη από τους #7, 15, 20, 17, και 24, η δεύτερη από τους 15, 20, 17, 24, 10 και 32 και η τρίτη από όλους εκτός των #7 και 15. Για τους θηλυκούς γονείς δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για την ηλικία 1 ενώ για την ηλικία 2 ο γεννήτορας #30 δίνει βαρύτερους απογόνους. Στη συνέχεια υπολογίστηκε μια τιμή για κάθε γονέα, στην οποία δόθηκε το όνομα "αναπαραγωγική τιμή" και η οποία αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο των αποκλίσεων των ατομικών βαρών των απογόνων ενός γονέα από τον μέσο βάρος των απογόνων του

άλλου γονέα δηλ.
$$\frac{\sum_{i=1}^n (\text{βαρος απογονου} - \text{μεσο βαρος απογονων του αλλου γονεα})}{n}$$
, όπου n το σύνολο των απογόνων κάθε γονέα

(**Εικόνα 1B**). Η διευρεύνηση της συσχέτισης της κατάταξης των γεννητόρων στις δυο ηλικίες έγινε τόσο με τον συντελεστή

Πίνακας 1. Αριθμός απογόνων ανά οικογένεια στο συνολικό δείγμα.

M \ F	2	4	12	18	26	28	29	30	31	Σύνολο
7	7		2	5	25		5	27	1	72
9	1			1						2
10	7	1		3	8		4	1	6	30
11	19									19
15	31	1	1	5				14		52
17	1		8	2			5		4	20
19	2						1		1	4
20	11						3		6	20
21				1						1
22			1				3			4
24					12		5		3	20
25							2			2
32	3		4	6	4	1		19	13	50
Σύνολο	82	2	16	23	49	1	28	61	34	296

συσχέτισης της κατάταξης του Kendall (τ) όσο και με τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson (r). Για τους αρσενικούς γεννήτορες και οι δυο συντελεστές ήταν στατιστικά σημαντικοί (0,57, $p=0,0478$ και 0,77, $p=0,0247$, αντίστοιχα) ενώ αντίθετα για τους θηλυκούς δεν υπήρχε καμία συσχέτιση.

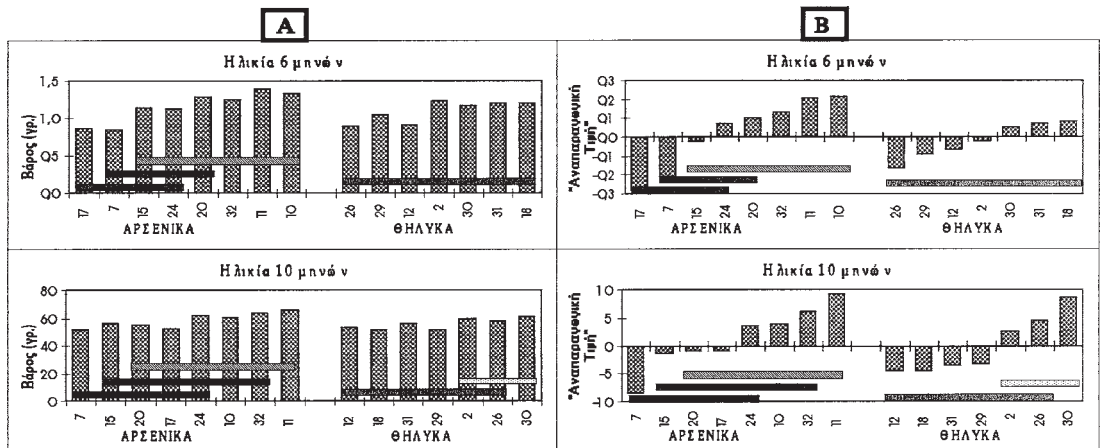
Η εκτίμηση της κληρονομησιμότητας, με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (Hemmerle & Hartley, 1973), για τους αρσενικούς γεννήτορες ήταν 0,25 για την ηλικία των 6 μηνών και 0,4 για αυτά των 10 μηνών. Οι εκτιμήσεις της κληρονομησιμότητας για τα θηλυκά ήταν 0 και 0,36, αντίστοιχα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανακάλυψη της τεχνικής της “γενετικής σήμανσης” και των μοριακών σημάτων έχει αλλάξει ριζικά τον τρόπο σχεδιασμού πειραμάτων επιλογής. Η δυνατότητα αναγνώρισης του “γενετικού αποτυπώματος” (genetic fingerprinting) ενός ατόμου και της αναδρομικής αναγνώρισης των γονέων του με αρκετά μεγάλη βεβαιότητα μας δίνει πλέον τη δυνατότητα: α) πειραματισμού κάτω από συνθήκες μαζικής ωτοκίας και β) εκτροφής των απογόνων σε κοινές δεξαμενές. Έτσι, η στατιστική δύναμη των αποτελεσμάτων μας μπορεί να αυξηθεί σημαντικά εφόσον μπορούμε αφενός να αυξήσουμε το μέγεθος του δείγματος και αφετέρου να εξαλείψουμε μεγάλο μέρος της περιβαλλοντικής διακύμανσης που δημιουργούσαν τα διαφορετικά περιβάλλοντα εκτροφής (διαφορετικές δεξαμενές) (Gjerde & Gjedrem, 1984).

Οι 4 γενετικοί τύποι που εξετάστηκαν έδειξαν να είναι από τους πιο πολυμορφικούς τύπους που έχουν βρεθεί. Η μέση ετεροζυγωτία για όλους τους τύπους ήταν 95%. Σαν συνέπεια ο συνδυασμένος γονότυπος του κάθε γεννήτορα ήταν μοναδικός. Η συνεισφορά των γεννητόρων στην επόμενη γενιά είναι εξαιρετικά άνιση. Αυτό μπορεί να ειπωθεί από διάφορες πλευρές όπως ότι: α) για οποιονδήποτε λόγο κάποιοι από τους γεννήτορες δεν συνεισέφεραν στη συγκεκριμένη ημέρα ωτοκίας, β) μεταξύ αυτών που συνεισέφεραν, η συνεισφορά είναι πολύ άνιση και γ) η ένωση των γαμετών μπορεί να είναι μη-τυχαία (π.χ. ασυμβατότητα γαμετών).

Η στατιστική ανάλυση της γονικής επίδρασης στο ρυθμό αύξησης έδειξε ότι υπάρχουν εμφανείς στατιστικές διαφορές ανάμεσα στους αρσενικούς γεννήτορες. Οι συντελεστές συσχέτισης από την άλλη μεριά υποδηλώνουν ότι αυτή η διαφορά δεν είναι τυχαία αλλά η κατάταξη που δημιουργείται στις δυο ηλικίες είναι σταθερή καταδεικνύοντας γεννήτορες με μικρή και μεγάλη επίδραση στο ρυθμό αύξησης των απογόνων τους. Από την άλλη πλευρά η επίδραση των θηλυκών φαίνεται ότι είναι αμελητέα. Η εκτίμηση της μέγιστης πιθανοφάνειας για τις συνιστώσες της διακύμανσης επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της μη παραμετρικής ανάλυσης. Οι εκτιμήσεις για την προσθετική γενετική διασπορά κυμάνθηκαν μεταξύ 25-40%, γεγονός που δηλώνει ότι υπάρχει σημαντικό γενετικό υπόβαθρο πάνω στο οποίο μπορεί να εφαρμοστεί επιλογή. Παρόλα αυτά, η έλλειψη του εκτίμησης του τυπικού σφάλματος μας κάνει επιφυλακτικούς όσον αφορά τη διατύπωση ισχυρών συμπερασμάτων. Πάντως, οι γενικές τάσεις συμφωνούν απόλυτα με τα αποτελέσματα άλλων μελετών



Εικόνα 1. Α. Σχηματική παράσταση των μέσων βαρών των απογόνων κάθε γεννήτορα. Οι γεννήτορες έχουν τοποθετηθεί κατά αύξουσα σειρά “αναπαραγωγικών τιμών”.

Β. Σχηματική παράσταση των “αναπαραγωγικών τιμών” κάθε γεννήτορα

Οι οριζόντιες γραμμοσειρασμένες περιοχές αντιστοιχούν στις στατιστικά διαφορετικές ομάδες που δημιουργήθηκαν μετά την ανάλυση (βλ. Αποτελέσματα)

επιλογής σε διάφορα είδη αλλά και ειδικότερα στα ψάρια. Γενικά, οι εκτιμήσεις κληρονομησιμότητας είναι: α) πιο αξιόπιστες όταν βασίζονται στους αρσενικούς γεννήτορες από ότι στους θηλυκούς και β) οι εκτιμήσεις κληρονομησιμότητας βασισμένες σε απογόνους μεγαλύτερης ηλικίας είναι μεγαλύτερες από αυτές που γίνονται σε μικρή ηλικία (Kinghorn, 1983; Falconer, 1981; Nilsson, 1990).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- BATARGIAS C. and E. ZOUROS (1993). Development and the potential applications of highly polymorphic microsatellite and cDNA nuclear markers in gilthead seabream, *Sparus aurata*, In: Fourth Congress of the European Society for the Evolutionary Biology, *Evolution* 93, 22-28 August, Montpellier, France.
- FALCONER, D. S. (1981). Introduction to Quantitative Genetics, 2nd edition. Longman Inc., New York, NY and London, 365 pp.
- GJERDE, B. and GJEDREM, T. (1984): Estimates of phenotypic and genetic parameters for carcass traits in atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*, 36, 97-110.
- HEMMERLE and HARTLEY (1973). Computing ML estimates for the mixed AOV model using the W-transformation. *Tecnometrics* 15: 819-831.
- HERSHBERGER, W.K., MYERS, J.M., IWAMOTO, R.N., MCAULEY, W.C. and SAXTON, A.M. (1990): Genetic changes in the growth of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in marine net-pens produced by ten years of selection. *Aquaculture* 85 (1-4), 215-221 (special issue).
- KINGHORN, B. (1983). A review of quantitative genetics in fish breeding. *Aquaculture* 57: 37-55
- MAGOULAS A., C. BATARGIAS, K. SOFRONIDIS, G. KOTOULAS and E. ZOUROS (1994). The use of DNA markers for rapid identification of genetically superior parents in mass-crosses of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, In: *Methods et Techniques pour l'Amelioration Genetique en Aquaculture*, Bordeaux Aquaculture 94, European Aquaculture Society, Special Publication No 24.
- NILSSON, J. (1990). Heritability estimates of growth-related traits in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 84: 211-217.
- SAIKI, R.K., D.H. GELFAND, S. STOFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS, and H.A. ELRICH (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, and T. MANIATIS (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANGER, F., S. NICKLEN and A.R. COULSON (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- ZAR J. H. (1984). *Biostatistical analysis*, 2nd edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. pp 199-201.