

**השפעת החקלאות הימית על השונות הגנטית של אוכלוסיית טבעיות - דגי
דניס בים התיכון ובים סוף כמודל.**

**The influence of mariculture on the genetic diversity of
populations in nature – Seabream fish in the Mediterranean
and the Red sea as a model.**

מגישים:

ד"ר ירון טיקוצ'ינסקי, ביה"ס למדעי הים, המרכז האקדמי רופין, מכמורת.
פרופ' יוני זוהר, המכון לביוטכנולוגיה ימית, אוניברסיטת מרילנד, בולטימור.
ד"ר דני גולני, המחלקה לאבולוציה, סיסטמטיקה ואקולוגיה, האוניברסיטה העברית, ירושלים.
מרינה פרילינג, ביה"ס למדעי הים, המרכז האקדמי רופין, מכמורת.

יוני 2012

תוכן העיניינים

<u>עמוד</u>	<u>סעיף</u>
3	תקציר
4	מבוא
8	שיטות ומהלך עבודה
12	תוצאות
20	דיון ומסקנות
23	מקורות
28	תקציב

תקציר

דג הדניס (*Sparus aurata*) הינו מין סאב-טרופי הנפוץ בים התיכון. הדניס מצוי הן במי הים והן במים מליחים כגון לגונות השוכנות בסמוך לחוף ושפכי נהרות, בעיקר בשלבים הראשונים של מחזור חייו. כיום קיים גידול של דניסים כמעט בכל ארצות הים התיכון. עשרות מדגרות דניסים בעלות גרעין הרבייה משלהן פזורות בים התיכון. במדינת ישראל אין פיקוח ואין מדיניות ברורה של הרכב האוכלוסיות המשמשות לגידולי החקלאות הימית (חק"י). אחד האיומים המשמעותיים על האוכלוסיה הטבעית של דגי הדניס הינו בריחה של דגים רבים מחוות הדגים אל הטבע והפרת האיזון הגנטי של אוכלוסיית הבר. כתוצאה מהתהליך המכונה extinction vortex effect פוטנציאל ההישרדות של האוכלוסיה אמור לקטון מאוד. מחקר מקיף של אוכלוסיית דגי הסלמון האטלנטי הטבעית הראה כי הם סובלים מירידה בכשירות ופוריות כתוצאה מאינטראקציה עם דגי סלמון שברחו מחוות גידול חקלאיות וכי קיים חשש להכחדה פוטנציאלית. בדניסים עדיין לא הוכחה השפעת החקלאות הימית על פוריות האוכלוסיה הטבעית. מחקר אוכלוסיות דניסים ביוון הצביע על הבדלים בעושר האללים בין דוגמאות טבעיות לדוגמאות שמקורן בחקלאות.

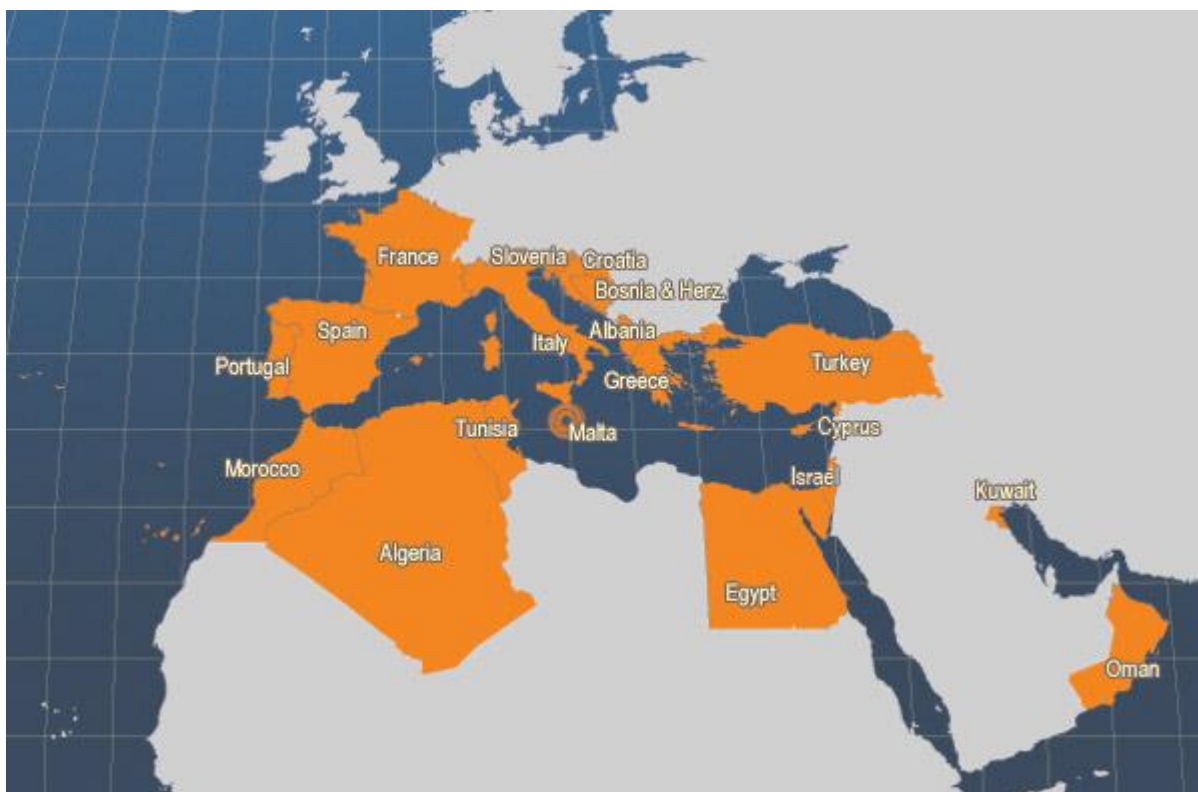
במחקר הנוכחי אספנו דגימות דגי דניס מגידולים חקלאיים ומהטבע. הפקנו DNA וניתחנו את השונות הגנטית באמצעות סמני DNA מיטוכונדריאלי ורצפים חוזרים. אנו מביאים כאן את תוצאות מחקרנו המשווה את אוכלוסיית הבר של דגי הדניס בחופי מדינת ישראל לאוכלוסית הדגים שבחקלאות הימית.

האוכלוסיה הטבעית של דגי דניס בחופי מדינת ישראל התדלדלה עד לכמויות אפסיות. לא ברור אם הדיג המואץ או זליגה של אוכלוסיית החק"י הם אשר הביאו למצב זה. במחקרנו הוכחנו עד כמה חיוני לדעת את ההרכב הגנטי של גידול חק"י כלשהו ואת הרכב האוכלוסיה הטבעית אותה הוא עלול לדלל. אנו ממליצים על יישום מדיניות זו בפיקוח על גידולי החקלאות הימית.

מבוא

דג הדניס (*Sparus aurata*) הינו מין סאב-טרופי הנפוץ בים התיכון וכן בחוף המזרחי של האוקיינוס האטלנטי- מברייטניה ומיצרי גיברלטר ועד רפובליקת קייפ – ורדה, בסמוך לאיים הקנאריים (Froese & Pauly, 2006). לעיתים נדירות ניתן למצוא אותו גם בים השחור. הדניס מצוי הן במי הים והן במים מליחים כגון לגונות השוכנות בסמוך לחוף ושפכי נהרות, בעיקר בשלבים הראשונים של מחזור חייו, הודות ליכולתו להיות בתנאים סביבתיים משתנים כגון טווח רחב של מליחות וטמפרטורת בית הגידול (FAO, 2006).

הודות ליעול תכניות השבחה, התקדמות טכנולוגיות חקלאות בכלובים והנדסה גנטית, ייצור הדניסים גדל מאוד, וכיום זהו החשוב ביותר בים התיכון (Sola et al., 2007). פרט ללוב ולסוריה, קיים גידול של דניסים בכל ארצות הים התיכון (תמונה מס' 1). חקלאות דגי הדניס הינה אקסטנסיבית בלגונות, או אינטנסיבית במיכלים וכלובי דגים, כשאר מרבית התוצרת מקורה בחקלאות אינטנסיבית (Gordin, 2003).

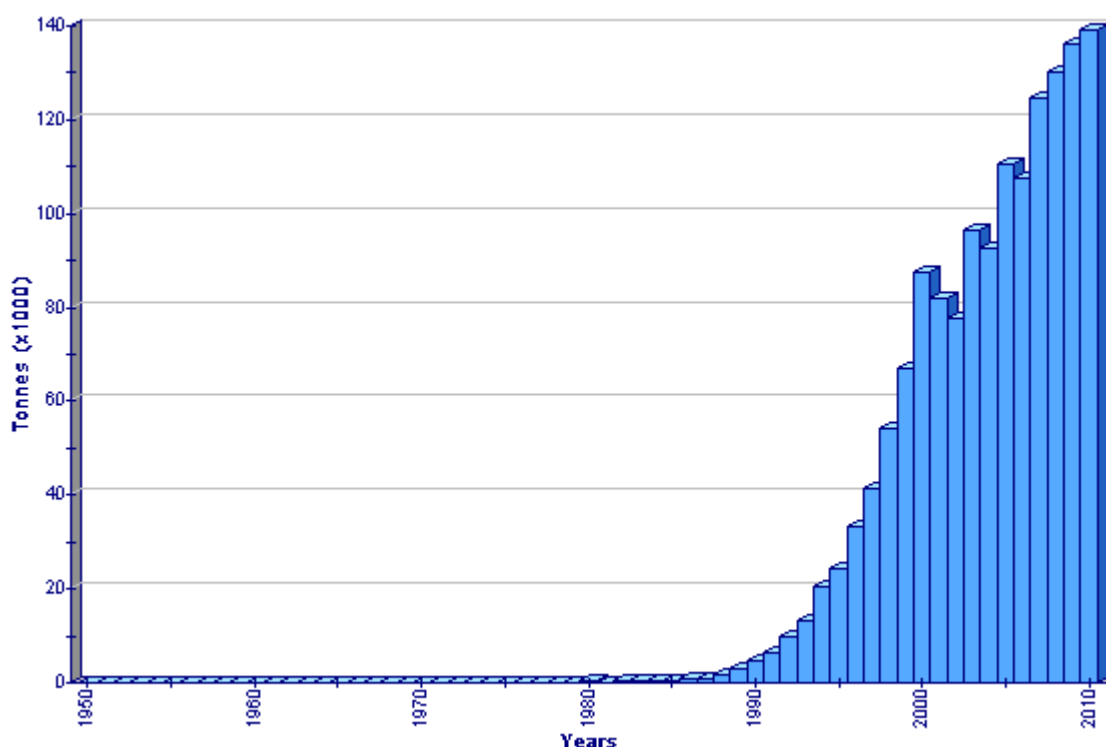


תמונה מס' 1. Main producer countries of *S. aurata* (FAO Fishery Statistics, 2006).

עד שנות ה-70, חקלאות אקסטנסיבית מסורתית של דג הדניס התבצעה בלגונות חופיות של הים התיכון וכן בבריכות מים מליחים/מלוחים, בעיקר בחלקו הצפוני של הים האדריאטי, באיטליה ובמצרים. מערכות אקסטנסיביות אלו לגידול דגים היו כעין מלכודות דגים טבעיות, אשר מנצלות את ההגירה הטרופית הטבעית של דגים צעירים מהים. חידוש המלאי בדרך כלל נעשה על ידי

דייג דגיגונים או דגים צעירים, אשר נאספו על ידי דייגים מומחים. עד לתום שנות ה-70, הירידה בזמינות של להקות דגיגים טבעיות, והעלייה בביקוש בחקלאות אינטנסיבית, הגבירה את הפיתוח של טכניקות השריית ביוץ, אשר עד סוף שנות ה-80 איפשרו ביסוס של תוכנית ייצור המושתתת על כמות אמינה ומתוכננת של דגיגונים (Dimitriou, 2000). חלקאות אקסטנסיבית עודנה קיימת באזורים מסוימים באופן מסורתי, אך השפעתה על השוק קטנה מאוד.

ב-2005 הייצור העולמי של הדניס היה 8914 טון מגידול בשבי ו-90995 טון מחקלאות ימית בלבד, כאשר יוון הייתה יצרנית הגדולה ביותר (37394 טון) ואחריה טורקיה (20435 טון), ספרד (13848 טון) ואיטליה (5845 טון) (FAO, 2006).



תמונה מס' 2. Global aquaculture production of Sparus aurata (FAO Fishery Statistics, 2006).

בתחילת שנות ה-90, עשרים מדגרות דניסים פעלו בים התיכון בעוד כיום פזורות 65 מדגרות בקרואטיה, קפריסין, צרפת, יוון, איטליה, מרוקו, פורטוגל, ספרד, טוניסיה וישראל (Sola et al., 2007). לרוב, לכל מדגרה בשבי יש את גרעין הרבייה שלה, המורכב מדגים בקבוצות גיל שונות וממקורות שונים – מגידול טבעי או חקלאי. בישראל פעלו שלוש מדגרות, אחת באילת (ערדג) ושתיים נוספות לחופי הים התיכון אשר מייצרות סך הכל 12 מיליון דגיגים ודגיגונים. למרות זאת, הביקוש עולה על הייצור ולכן כשני מיליון דגיגים מיובאים ממדגרות ביוון וקפריסין (Sola et al., 2007).

במדינת ישראל אין פיקוח ואין מדיניות ברורה של הרכב האוכלוסיות המשמשות לגידולי החקלאות הימית. באופן כללי מספר האוכלוסיות המייסדות את מאגר הדגיגים מושפע מאילוצים כלכליים של היצרן, ולפיכך השונות הגנטית של אוכלוסיית הדגיגים היא מוגבלת, מה שמקטין את יכולתה לעמוד בשינויים סביבתיים ומחלות (Alarcón et al., 2004).

אחד האיומים המשמעותיים על האוכלוסיה הטבעית של דגי הדניס הינו בריחה של דגים רבים מחוות הדגים אל הטבע והפרת האיזון הגנטי של אוכלוסיית הבר (Grigorakis et al., 2011). שינויים אלו מעוררים דאגה מפוטנציאל ההישרדות של האוכלוסיה הטבעית המקומית בעיקר כתוצאה מהתהליך המכונה extinction vortex effect (Gilpin and Soule, 1986). מחקר מקיף של אוכלוסיית דגי הסלמון האטלנטי הטבעית הראה כי הם סובלים מירידה בכשירות ופוריות כתוצאה מאינטראקציה עם דגי סלמון שברחו מחוות גידול חקלאיות וכי קיים חשש להכחדה פוטנציאלית (McGinnity et al., 2003). כמו כן, הוכח הצורך במניעת מעבר הגנים מהגידולים החקלאיים אל האוכלוסיות הטבעיות, במיוחד אם הן אינן גדולות ויציבות דיין, וכמובן אם הם בסכנת הכחדה (Fraser et al., 2010). החוקרים הצליחו להראות גם ירידה בתועלת הכלכלית של הדיג ככל שהאוכלוסיה הטבעית מצטמצמת (Liu et al., 2012).

בדניסים עדיין לא הוכחה השפעת החקלאות הימית על פוריות האוכלוסיה הטבעית, אך המספרים מדברים בעד עצמם. מעדויות דייגים מסתמן מצב עגום לגבי מספרם של דגי הדניס שבטבע. במהלך שנת מחקר (2011/2) הצלחנו להשיג מספר נמוך של פרטים מן הטבע (n=15). במפרץ אילת החלו בגידול ניסיוני של דגי דניס עוד בשנות ה-70. משנת 1995 פעלו שתי חברות מסחריות במפרץ אילת ("ערדג" ו "דג-סוף") אשר ייצרו כאלף טון דגים בשנה. בשנת 2008 פונו כלובי הדגים מאילת. דגי הדניס לא היו מהשוכנים הטבעיים במפרץ אילת, אך בשנים עברו תועדו להקות של דגי דניס שמקורן בזליגה מכלובי הדגים. להקות אלו נתמעטו מאז שנת 2008, ובשנת המחקר הנוכחית לא נמצאו כלל באזור אילת. זוהי אולי עדות לכך שאוכלוסית הדגים הזו לא יכולה לשרוד מחוץ לתנאי החקלאות הימית.

מחקרי אוכלוסיות של דג הדניס נערכו על ידי אנאליזות של מערכות גן-אנזים (Cervelli et al., 1985; Palma et al., 2001) ועל ידי AFLP (Alarcón et al., 2004; Ben Slimen et al., 2004) Miggianno et al., 2005). עם זאת מרבית מחקרי השונות הגנטית בדגים נעשים בעזרת ריצוף של ה DNA המיטוכונדריאלי (Cheng et al., 2011). שיתוף פעולה בין לאומי במסגרת ה Fish Barcode of Life Initiative הביא לקבלת מאגר רצפים של כרבע מ 31,000 מיני הדגים הידועים כיום (Becker et al., 2011). כמו בבעלי חיים אחרים, גם בדגים מבוססת טביעת האצבע הגנטית של מיני דגים על הגן Cytochrome Oxidase (CO I) (Kochzius et al., 2010). ניתן בעזרת טביעת אצבע זו למצוא מינים מוסוויים ואף מינים חדשים (Tikochinski et al., 2012). במחקרי שונות גנטית באוכלוסיות של מיני דגים, לרבות דניסים, נעשה שימוש ברצף מאזור הבקרה

של ה DNA המיטוכונדריאלי (D-Loop) (Funkenstein et al., 1990; Magoulas et al., 1995; Alarcón et al., 2004; Sola et al., 2007; Triantafyllidis, 2007; Hamasaki et al., 2010). זהו האזור היחיד ב DNA המיטוכונדריאלי שאינו מכיל גן כלשהו, ולכן יכולות להשמר בו מוטציות שאינן משפיעות על השרידות, אבל יכולות להצביע על מרחק גנטי בין פרטים באוכלוסייה.

מקור נוסף לשונות שאנו משתמשים בה על מנת להעריך קרבה גנטית הינם רצפים חוזרים. ישנם כ 25 אתרים ידועים בגנום דגי הדניס (Dermitzakis et al., 1998; Batargias et al., 1999; Launey et al., 2003; Brown et al., 2005) אשר שימשו כסמנים מולקולאריים במספר מחקרים (Alarcón et al., 2004; De Innocentiis et al., 2004). מחקרים כגון אלו הינם בעלי חשיבות הודות לשימוש בדגים ממקורות גאוגרפיים שונים של גידול חקלאי, פעולה אשר יכולה להוביל לשינוי בתדירויות אללים והכנסה של אללים לא טבעיים לתוך האוכלוסייה המקומית, כתוצאה מבריחה של דגים מהכלובים, תוך אי ידיעת ההשלכות על כשירותה ושרידותה של אוכלוסיית הבר (Karaiskou et Al., 2009; An et Al., 2010).

מחקר אוכלוסיות דניסים ביוון הצביע על הבדלים בין דוגמאות טבעיות לדוגמאות שמקורן בחקלאות בעושר האללים. החוקרים הבינו את החשיבות של תוכניות רבייה בחוות גידול, על מנת להמנע מהכלאה עצמית ומיזעור הנזק הסביבתי הנגרם כתוצאה מבריחה מכלובי דגים בחקלאות הימית (Loukovitis, 2012).

במחקר הנוכחי אספנו דגי דניס מגידולים חקלאיים, מהטבע ומדגימות היסטוריות. הפקנו DNA וניתחנו את השונות הגנטית באמצעות סמני DNA מיטוכונדריאלי ורצפים חוזרים. מאחר והדגימות ההיסטוריות שומרו שנים רבות בפורמלין, לא הצלחנו לקבל תוצאות מספקות לגבי ההרכב הגנטי שלהן. אנו מביאים כאן את תוצאות מחקרנו המשווה את אוכלוסיית הבר של דגי הדניס בחופי מדינת ישראל לאוכלוסית הדגים שבחקלאות הימית.

שיטות עבודה

השיטות בהן השתמשנו עבור מחקר זה, ושאפשרו לנו לבחון את הרכב ה-DNA של הדגים הינן שיטות מולקולריות אשר התחילו בהפקת ה-DNA מרקמת הדג, הגברת מקטע ה-DNA הרצוי ולבסוף ריצוף שלו או הערכת האורך במקרה שהשונות הייתה במספר החזרות בלבד.

הגברת המקטע הרצוי

הגברת המקטע בו אנו מעוניינים לחפש שונות נעשה בשיטת PCR (Polymerase Chain Reaction). תיחום האזור המבוקש על ידי שני תחלים המאפשרים לאנזים Taq-polymerase לסנטז את הרצף התחום, על ידי מספר רב של מחזורים מתקבלת כמות רבה של תוצר. לשם ביצוע הראקציה יש צורך בתכנון הפריימרים התוחמים את האזור הרצוי, והגעה לתנאים מיטביים של זמן וטמפרטורה, כתלות באורך המקטע והפריימרים, והרכבם (Mullis et al. 1986). לאחר מכן ניתן לרצף את תוצרי ה-PCR ולנתח את התוצאות.

מהלך העבודה

איסוף דגימות

נאספו 54 דגים, 15 דגים שנתפסו לאורך חופי ישראל מחיפה בצפון ועד אשדוד בדרום, חלקם נמסרו על ידי דייגים, חלקם נתפסו ונמסרו מהפלגות לצורכי סקרי דיג של אוניברסיטת תל אביב, וחלקם נפלטו לחוף. 39 דגים נאספו ממדגים וכלובי דגים במעגן מיכאל, כלובי אשדוד וחברת ערדג. בנוסף, נתקבלו דגים מאוספים היסטוריים משנות ה-50 עד שנות ה-70 אשר שומרו בפורמלין מאוניברסיטת תל אביב והאוניברסיטה העברית.

הפקת DNA

DNA מדגים טריים הופק בעזרת ערכת "Accuprep© genomic DNA extraction kit" ונשמר ב-20°C עד לשימוש. DNA מהדגים המשומרים הופק בשיטות שונות: ערכה להפקת DNA מפורמלין "QIAamp© DNA FFPE Tissue". בנוסף, לפי פרוטוקול שנמצא מהספרות (Coura et al. 2005), תהליך הכולל שורה של השריות ב Xylene ולאחר מכן שורה של שטיפות.

תכנון פריימרים (תחלים)

פריימרים עבור קצה 5' של ה-DNA המיטוכונדריאלי תוכננו בתכנת [Integrated DNA Technologies](#) (IdtDNA), בהתבסס על רצף ה-D loop המצוי בספרות (GeneBank). אורך המקטע הנבדק היה כ-900 בסיסים.

לאחר ריצוף של מס' דגימות, תוכננו פריימרים למקטעים קצרים יותר, בעלי מוטציות, באורך של כ-300 בסיסים עבור דגימות משומרות בפורמלין.

בסך הכל תוכננו 14 פריימרים עבור ה reverse 7 ו forward 7 D loop. (ראה טבלה)

SaD5-1 f	ATCATGCCATATCCGTATGTCA
SaD5-2 f	CTCTGATATCATGCCATATCCGT
SaD5-3 f	TCATGCCATATCCGTATGTCA
SaD5-4 f	TAGGCTGACAATGCATTAGTAGCTCA
SaD5-5 f	AAGCCAAATGTCGGAGGTTAAATTCC
SaD953 r	GCAATTCATATGATAAAGTCTTTATATTACTCAGC
SaD1023 r	GGGCGTATATTAGGCTTTTAGGAGT
SaD5-1 r	AGA GGT GCT GGT ACT TGG TAT A
SaD5-2 r	TCGGTTCCTTACTGCAATCGTAA
SaD5-3 r	GTAGGTTGGTCGGTTCCTTACTG
SaD459 r	CTGTGTGCTAGTTAATAATTGAAGTTGTG
SaD484 r	CCTAGCTTGGTAGGTGAATTCAG
SaD726 f	TCTGGTTCCTATTTCAAGGCCAT
SaD764 f	CCCTAACTTCTATCGAGCTTGCTT

ארבעת הפריימרים התחתונים בטבלה תוכננו עבור דגימות הפורמלין, כך שיתפסו מקטעים קצרים.

מתוך 25 מקטעי החזרות ב DNA הגנומי הידועים בגנום הדניס, נבחרו 11 האזורים אשר דווחו כבעלי וריאביליות גבוהה,

והוזמנו הפריימרים המתאימים. (ראה טבלה)

אתר בגנום	T _a	רצף הפריימר	מקור ספרותי
Sau E97	49°C	F: ACA TTC ATG TGT AAA ATC GG R: TTGGAAGAACAGAAATCTAATG	Karaiskou et al. 2009
Sau NINRA	52°C	F: TGTTGGAGCTTGTTGGTACAC R: GAGCTGTAAACCGCTCAGG	Karaiskou et al. 2009
SaG T26	52°C	F: GCC TCT CAA CCG TAT GTA G R: TGG TGA TAT TTA TGC ATC TAG	Wu et al. 1999
Sau L47	51°C	F: ACAGTACCCCACTGTCTCC R: CCATATCATTACACTGTGGC	Karaiskou et al. 2009
Sau E82	51°C	F: ATT GGG TGG CAG TTT AGT AGG R: CAC TGC GAT GAG TGA CCC	Karaiskou et al. 2009
Sau D69INRA	58°C	F: CGT TGA TCC CTG AGA AGC R: AAT ACA CGG AGA GCC ACT G	Sophielauney et al. 2003
Sau L41INRA	55°C	F: AACAGTTTGTGATTATTCATCG R: CACGTCTAACCTGTGATTAGC	Sophielauney et al. 2003
Sau G46INRA	60°C	F: GTGAACACCTGCCAGACG R: GCATCGAGGTCAAGTACCTG	Sophielauney et al. 2003
Sau H94INRA	55°C	F: GTCTGAATGTTCCCATAGCTC R: GCCACAGCTGTAACCTCACTC	Sophielauney et al. 2003
SaG T32	52°C	F: GAG CAG ACA CCA GTG CAT G R: GAT AAT GGC CAA AAG TCA CTG	Wu et al. 1999
SaG T41a	54°C	F: TCA AAG ACA GAT GGA GCT GG R: GTC ACA TCA GTC TGC ACT TG	Wu et al. 1999

Ta- טמפרטורת האנלינג של כל זוג פריימרים.

רצפי החזרות אינם אחידים וקבועים בכל אתר ולעיתים מופרעים על ידי רצף קצר ללא חזרות. החזרות ברובן בנויות משני בסיסים, אך יש גם משלושה ויותר וישנם אתרים המכילים יותר מרצף חזרות אחד. עקב הקושי הרב שבריצוף מקטעים מרובי חזרות, הוחלט לבחון רק את האורך הכולל שתחום בין הפריימרים, השוני באורך נובע ישירות ממספרי החזרות של כל דגימה. הפריימרים הרלוונטים הוזמנו כאשר קצה 5' מסומן בסמן פלורסנטי. אורכי הרצפים נעו בין 150 לכ-230 בסיסים.

PCR

בוצעו ניסיונות כיוול ראקציה עבור כל שילובי הפריימרים האפשריים. לאחר הגעה לתנאים מיטביים וריצוף, נבחר שילוב הפריימרים המיטבי (SaD5-2 f+ SaD953 r) המאפשר קבלת תוצרים באיכות טובה וריצופם, וכן כיסוי כל המוטציות שנמצאו. אורך המקטע שרוצף בסופו של דבר עבור כל הדוגמאות היה 708 בסיסים. כל ראקציות ה PCR בוצעו בנפח של 25µl, שהכילו 1µM מכל פריימר (R+F); 1X בופר PCR, 200µM dNTPs ; 1 יחידה של

Super-Therm DNA Polymerase (JMR Holdings, London); 50µgr DNA ; והשלמת הנפח עם DDW. תנאי הראקציה המיטביים שנקבעו עבור ה DNA המיטוכונדריאלי היו התכה ב 94°C למשך 4 דקות, 32 מחזורים של: (94°C 30 שניות, 54°C 30 שניות, 72°C 30 שניות), לבסוף 72°C למשך 3 דקות. עבור ה DNA הגנומי התנאים נבדלו רק בטמפרטורת האנלינג אשר הייתה שונה בין כל זוג פריימרים כמתואר בטבלה עבור דגימות המשומרות בפורמלין, הוגדל ריכוז הפריימרים, האנזים וה DNA, לפי 2 מהראקציה הרגילה, והוגדל מס' מחזורי ה PCR ל 45.

בכל ראקצית PCR הוכנסה גם ביקורת שלילית אשר הכילה מים במקום DNA בסיום ראקצית ה PCR התוצרים הורצו באלקטרופורזה על ג'ל אגרוז 1.5%, נצבעו Gel red למשך חצי שעה וצולמו על מנת לוודא קבלת תוצר איכותי באורך המתאים ועל מנת לשלול זיהום.

ריצוף וניתוח תוצאות

התוצרים שהתקבלו מה D-loop נשלחו לריצוף בחברת Macrogen בקוריאה, לאחר קבלת הרצפים בוצעה עבודה ביואינפורמטית בתכנת Bioedit, להשוואת הרצפים, מציאת המוטציות ובניית עץ פילוגנטי להערכת השונות באוכלוסיית הדגים שנבדקה.

תוצרי ה-STR אינם ניתנים לריצוף, לכן הוגברו בפריימרים פלורוסנטים, נשלחו להערכת אורך המקטע על ידי כימות הסיגנל הפלורוסנטי בחברת Hy-Labs. לאחר ניתוח השונות באורכי המקטעים, כמות האללים שנמצאה ותפוצתם באוכלוסיות, נבנו גרפים המתארים את תפוצת האללים השונים באוכלוסיה.

תוצאות

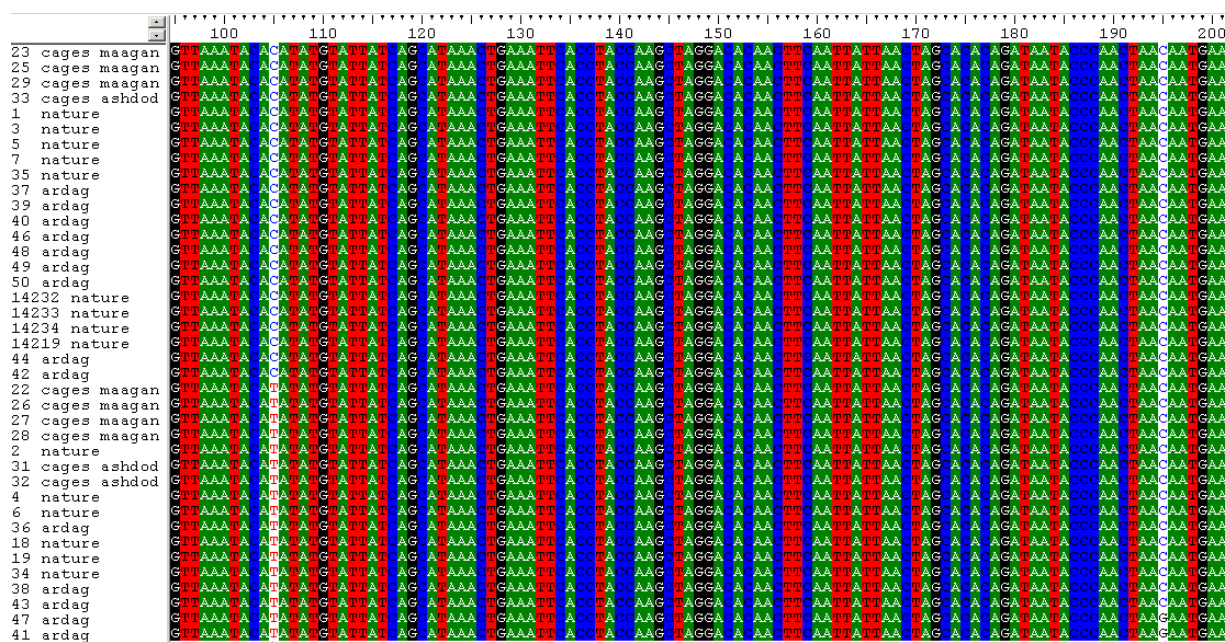
הנתונים שהתקבלו מבדיקת ה DNA המיטוכונדריאלי והגנטי נותחו לקביעת השונות הגנטית בכל אוכלוסיה (טבע חק"י), וכן לשם השוואה בין אוכלוסית הטבע לחק"י.

תוצאות DNA מיטוכונדריאלי

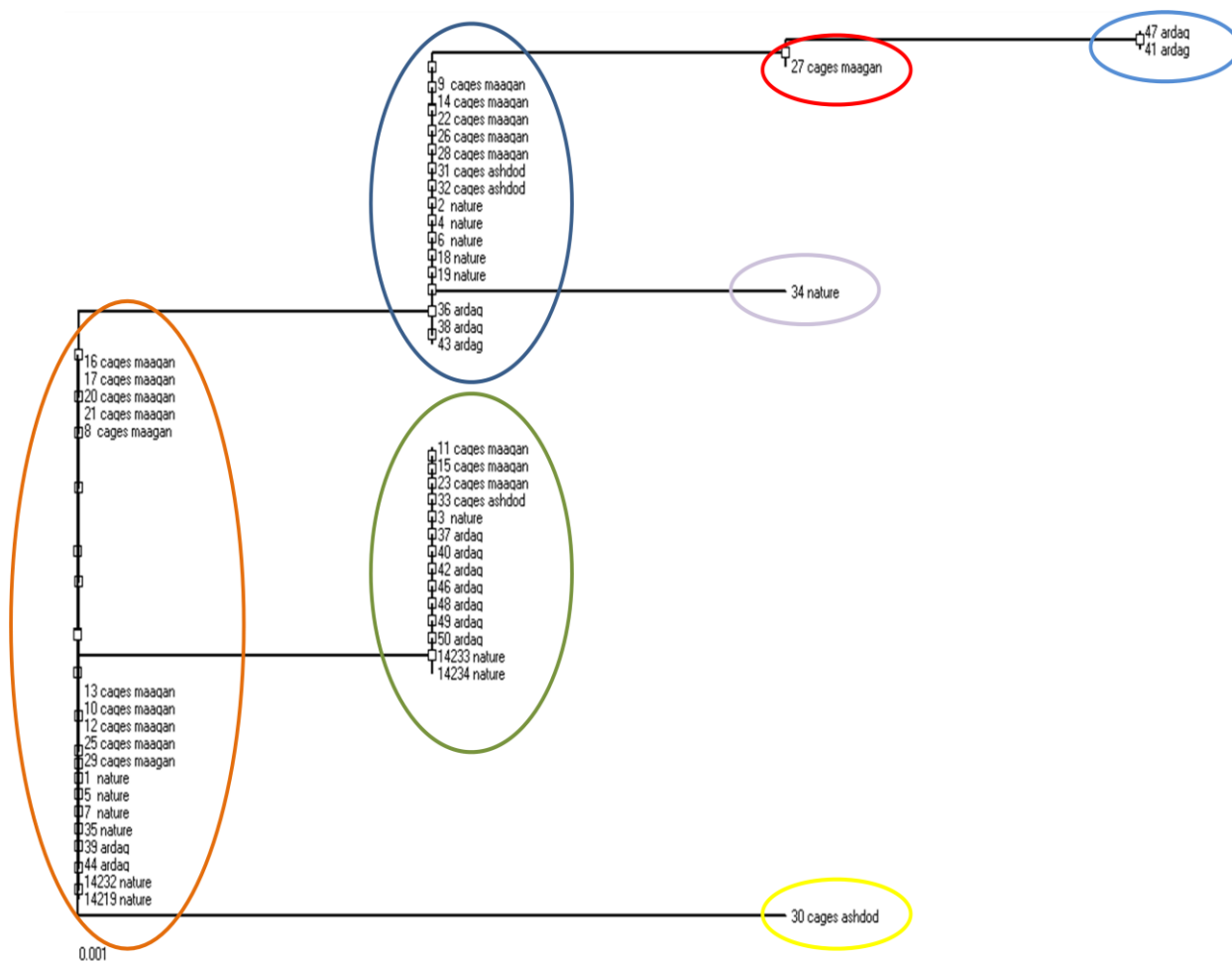
תמונה 3: חלק ממקטע של 708 בסיסים מרצף ה- D-loop לאחר ביצוע ClustalW alignment בעזרת תוכנת Bio-Edit.

בתמונה 3 ניתן לראות 2 מוטציות נקודתיות, האחת (עמדה 105) נפוצה והשנייה (עמדה 195) נדירה יותר, ומופיעה רק בשני פרטים מ "ערדג".

בעזרת תוכנת Bio-Edit הוכן עץ פילוגנטי המוצג בתמונה 4.



תמונה 4: עץ פילוגנטי המציג את השונות שנמצאה ב D-loop.



התפצלות ההפלוטיפים השונים של ה DNA המיטוכונדריאלי של דגים מהחק"י ומהטבע מוצגת בתמונה 2. אין הפרדה ברורה בין ההפלוטיפים של שתי האוכלוסיות, והפרטים מופיעים על העץ באופן מעורב. מבין 7 הפלוטיפים שהוגדרו, 3 הם נפוצים מאוד וכוללים דגים משתי האוכלוסיות. בנוסף נמצאו גם 4 הפלוטיפים נדירים יותר, 3 של דגים מהחק"י ורק דג אחד עם האפלוטיפ ייחודי מהטבע.

תוצאות DNA גנומי (STR)

השתמשנו בפריימרים להגברת 11 אתרים על פני הגנום. לא כל ריאקציות ה-PCR איפשרו ניתוח מדוייק עבור כל הדגימות. להמשך האנליזה השתמשנו לכן רק באתרים עבורם היו לנו מעל 25 דגימות אינפורמטיביות.

תמונה 5: פרוט אתרי ה-STR שנבדקו, מספר הדגימות שנבדקו, טווח אורכי מקטעי ה-PCR, כמה אללים נמצאו בכל אתר וכמה דוגמאות הראו הומוזיגוטיות.

הומוזיגוטים		אללים				תוצרי PCR			דגימות	STR
חק"י	טבע	משותפים	חק"י	טבע	כללי	ההפרש	הארוך	הקצר		
9	4	7	11	10	14	25	191	166	38	SaU E97
13	5	5	7	8	10	12	164	152	35	SaU NINRA
3	0	7	15	8	16	41	260	219	25	SaG T26
4	4	6	10	8	12	20	139	119	30	SaU L47
2	1	4	11	6	13	30	181	151	33	SaU E82
1	0	8	16	12	20	49	200	151	27	SaU D69INRA
2	0	5	19	10	24	71	235	164	31	SaU L41INRA
2	4	8	16	15	23	55	204	149	32	SaU H94INRA
6	0	8	18	15	25	94	194	100	33	SaG T41a
						17	193	176	15	*SaU G46INRA
						36	188	152	7	*SaG T32
42	18	58	123	92	157					

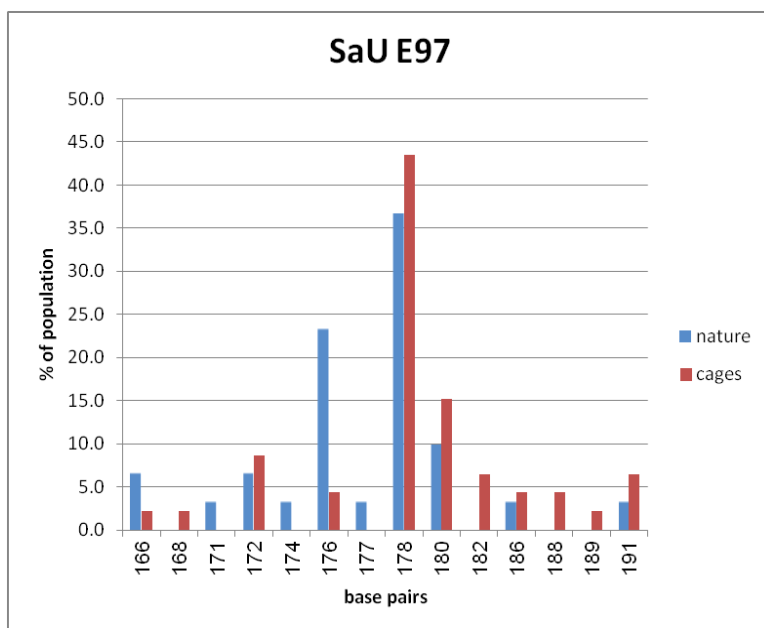
סה"כ

*אתרים SaU G46INRA ו-SaG T32 לא נותחו עקב גודל מדגם קטן.

בכל אחד משבעת סמני ה-STR שנותחו נמצאו אללים רבים (10-25). מבין 157 אללים שנמצאו סך הכל בכל האתרים, נמצאו 123 באוכלוסית החק"י לעומת 92 בלבד באוכלוסיה הטבעית. מרבית האללים מהאוכלוסיה הטבעית (58 במספר) נמצאו גם באוכלוסית החק"י. עבור כל אחד מהסמנים (גרפים 1-9) ניתן לראות בדרך כלל אלל אחד נפוץ הרבה יותר מהשאר (15-45%). האללים הנפוצים מרכיבים 39% מאוכלוסית החק"י ו 32% מהאוכלוסיה הטבעית. הומוזיגוטיות של אללים נמצאה ב 18 מקרים בפרטים מן הטבע לעומת 42 מקרים בפרטים מאוכלוסית החק"י.

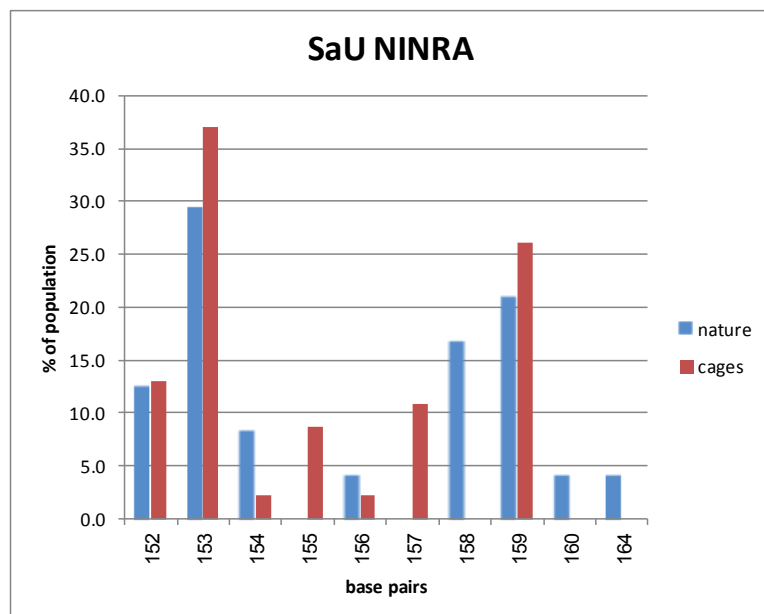
גרפים 1-9: הגרפים מתארים את שכיחות האללים של כל STR באוכלוסיית דגי הטבע לעומת דגי החק"י (כלובים).

SaU E97				
size	nature	cages	% nature	% cages
166	2	1	6.7	2.2
168		1	0.0	2.2
171	1		3.3	0.0
172	2	4	6.7	8.7
174	1		3.3	0.0
176	7	2	23.3	4.3
177	1		3.3	0.0
178	11	20	36.7	43.5
180	3	7	10.0	15.2
182		3	0.0	6.5
186	1	2	3.3	4.3
188		2	0.0	4.3
189		1	0.0	2.2
191	1	3	3.3	6.5
total	30	46	100.0	100.0



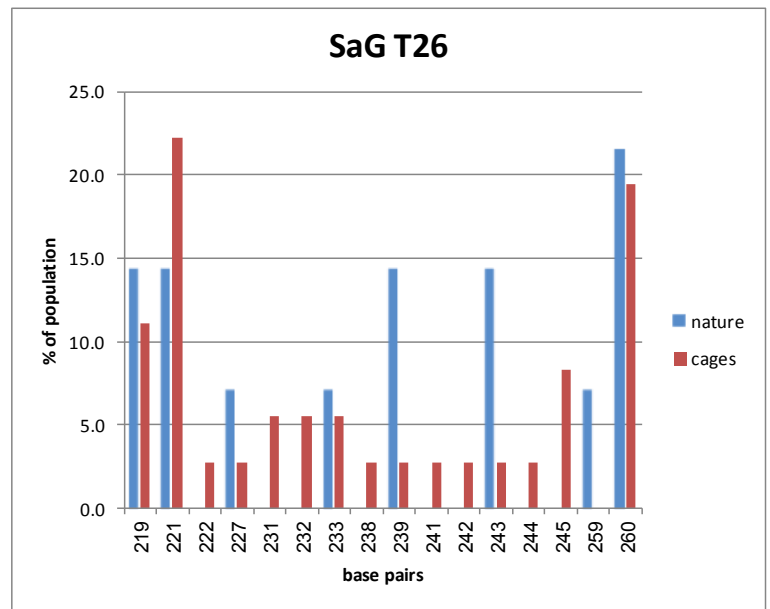
גרף 1. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא הנפוץ ביותר בחק"י.

SaU NINRA				
size	nature	cages	% nature	% cages
152	3	6	12.5	13.0
153	7	17	29.2	37.0
154	2	1	8.3	2.2
155		4	0.0	8.7
156	1	1	4.2	2.2
157		5	0.0	10.9
158	4		16.7	0.0
159	5	12	20.8	26.1
160	1		4.2	0.0
164	1		4.2	0.0
total	24	46	100.0	100.0



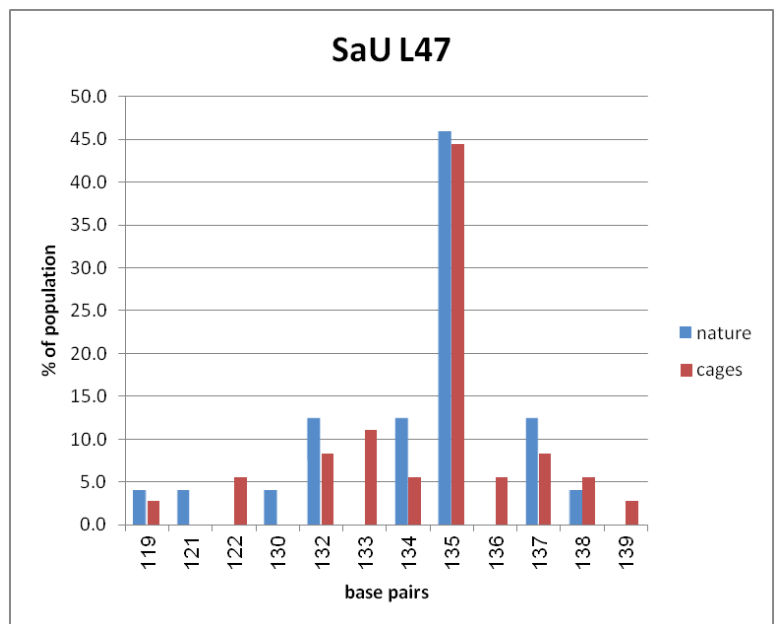
גרף 2. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא הנפוץ ביותר בחק"י.

SaG T26				
size	nature	cages	% nature	% cages
219	2	4	14.3	11.1
221	2	8	14.3	22.2
222		1	0.0	2.8
227	1	1	7.1	2.8
231		2	0.0	5.6
232		2	0.0	5.6
233	1	2	7.1	5.6
238		1	0.0	2.8
239	2	1	14.3	2.8
241		1	0.0	2.8
242		1	0.0	2.8
243	2	1	14.3	2.8
244		1	0.0	2.8
245		3	0.0	8.3
259	1		7.1	0.0
260	3	7	21.4	19.4
total	14	36	100.0	100.0



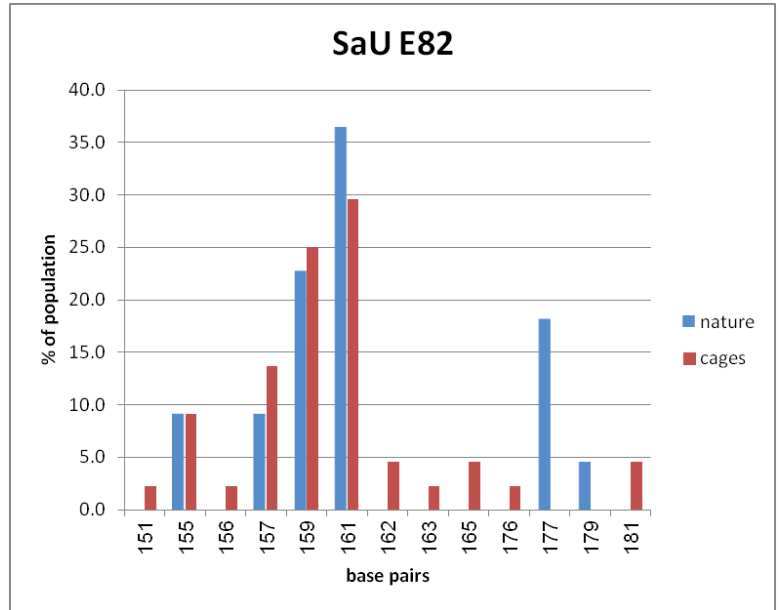
גרף 3. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא השני הנפוץ ביותר בחק"י.

SaU L47				
size	nature	cages	% nature	% cages
119	1	1	4.2	2.8
121	1		4.2	0.0
122		2	0.0	5.6
130	1		4.2	0.0
132	3	3	12.5	8.3
133		4	0.0	11.1
134	3	2	12.5	5.6
135	11	16	45.8	44.4
136		2	0.0	5.6
137	3	3	12.5	8.3
138	1	2	4.2	5.6
139		1	0.0	2.8
total	24	36	100.0	100.0



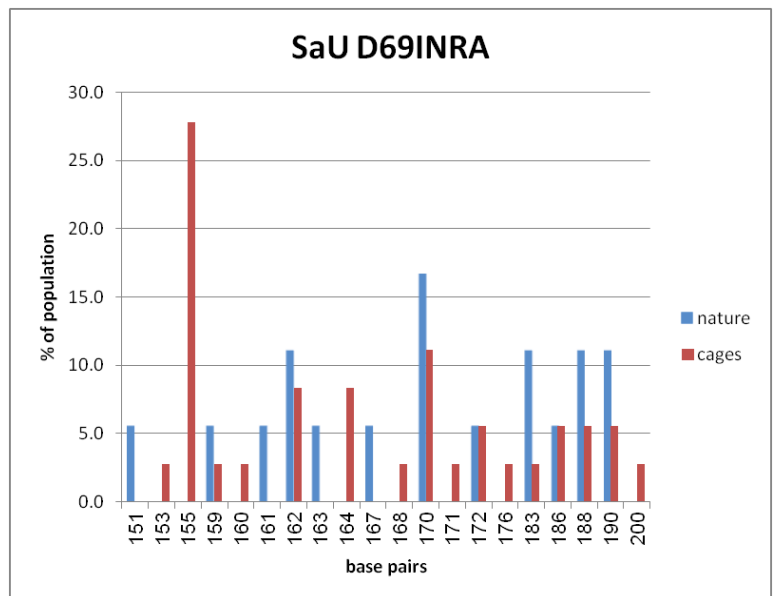
גרף 4. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא הנפוץ ביותר בחק"י.

SaU E82				
size	nature	cages	% nature	% cages
151		1	0.0	2.3
155	2	4	9.1	9.1
156		1	0.0	2.3
157	2	6	9.1	13.6
159	5	11	22.7	25.0
161	8	13	36.4	29.5
162		2	0.0	4.5
163		1	0.0	2.3
165		2	0.0	4.5
176		1	0.0	2.3
177	4		18.2	0.0
179	1		4.5	0.0
181		2	0.0	4.5
total	22	44	100.0	100.0



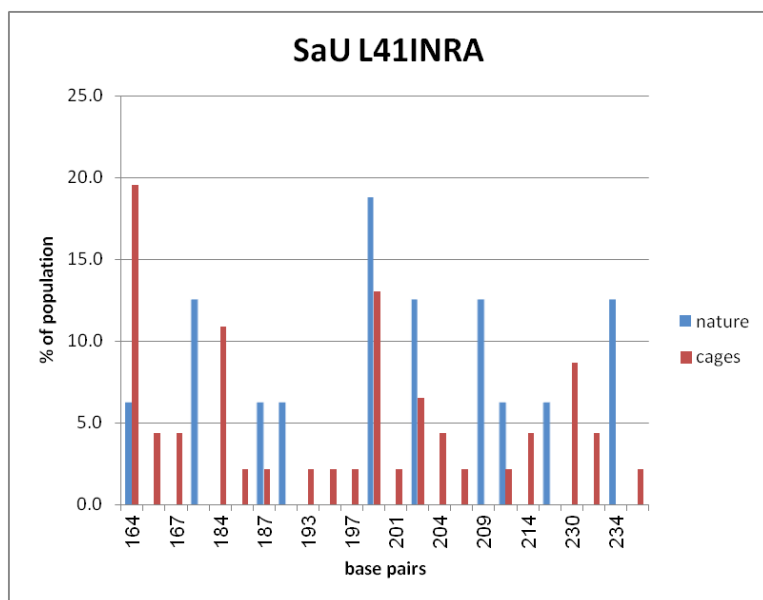
גרף 5. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא הנפוץ ביותר בחק"י.

SaU D69INRA				
size	nature	cages	% nature	% cages
151	1		5.6	0.0
153		1	0.0	2.8
155		10	0.0	27.8
159	1	1	5.6	2.8
160		1	0.0	2.8
161	1		5.6	0.0
162	2	3	11.1	8.3
163	1		5.6	0.0
164		3	0.0	8.3
167	1		5.6	0.0
168		1	0.0	2.8
170	3	4	16.7	11.1
171		1	0.0	2.8
172	1	2	5.6	5.6
176		1	0.0	2.8
183	2	1	11.1	2.8
186	1	2	5.6	5.6
188	2	2	11.1	5.6
190	2	2	11.1	5.6
200		1	0.0	2.8
total	18	36	100.0	100.0



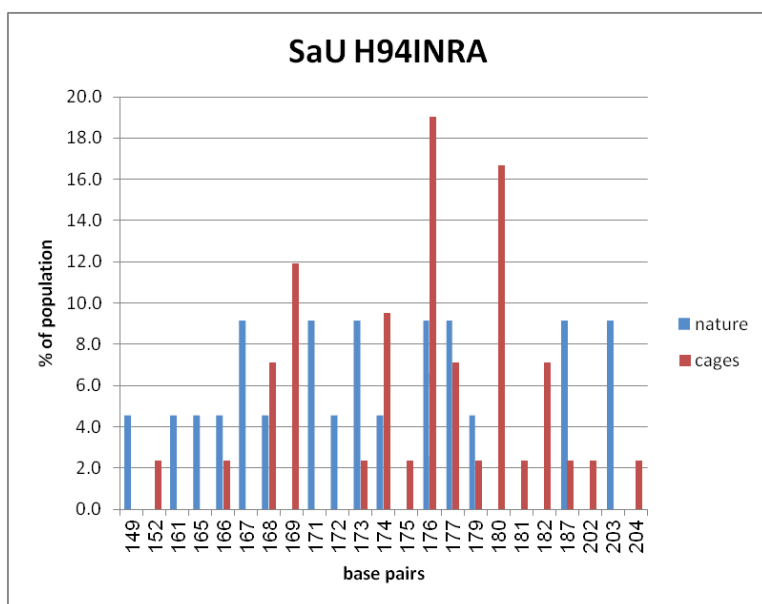
גרף 6. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא השני הנפוץ ביותר בחק"י.

SaU L41INRA				
size	nature	cages	% nature	% cages
164	1	9	6.3	19.6
165		2	0.0	4.3
167		2	0.0	4.3
181	2		12.5	0.0
184		5	0.0	10.9
185		1	0.0	2.2
187	1	1	6.3	2.2
191	1		6.3	0.0
193		1	0.0	2.2
194		1	0.0	2.2
197		1	0.0	2.2
199	3	6	18.8	13.0
201		1	0.0	2.2
203	2	3	12.5	6.5
204		2	0.0	4.3
208		1	0.0	2.2
209	2		12.5	0.0
212	1	1	6.3	2.2
214		2	0.0	4.3
223	1		6.3	0.0
230		4	0.0	8.7
233		2	0.0	4.3
234	2		12.5	0.0
235		1	0.0	2.2
total	16	46	100.0	100.0



גרף 7. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא השני הנפוץ ביותר בחק"י.

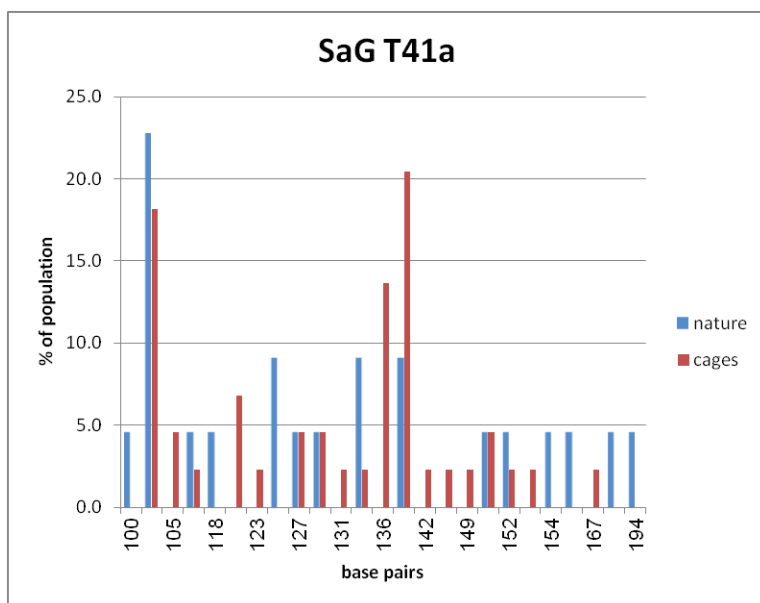
SaU H94INRA				
size	nature	cages	% nature	% cages
149	1		4.5	0.0
152		1	0.0	2.4
161	1		4.5	0.0
165	1		4.5	0.0
166	1	1	4.5	2.4
167	2		9.1	0.0
168	1	3	4.5	7.1
169		5	0.0	11.9
171	2		9.1	0.0
172	1		4.5	0.0
173	2	1	9.1	2.4
174	1	4	4.5	9.5
175		1	0.0	2.4
176	2	8	9.1	19.0
177	2	3	9.1	7.1
179	1	1	4.5	2.4
180		7	0.0	16.7
181		1	0.0	2.4
182		3	0.0	7.1
187	2	1	9.1	2.4
202		1	0.0	2.4
203	2		9.1	0.0
204		1	0.0	2.4
total	22	42	100.0	100.0



גרף 8. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא הנפוץ

ביותר בחק"י.

SaG T41a				
size	nature	cages	% nature	% cages
100	1		4.5	0.0
101	5	8	22.7	18.2
105		2	0.0	4.5
107	1	1	4.5	2.3
118	1		4.5	0.0
121		3	0.0	6.8
123		1	0.0	2.3
126	2		9.1	0.0
127	1	2	4.5	4.5
130	1	2	4.5	4.5
131		1	0.0	2.3
135	2	1	9.1	2.3
136		6	0.0	13.6
138	2	9	9.1	20.5
142		1	0.0	2.3
144		1	0.0	2.3
149		1	0.0	2.3
150	1	2	4.5	4.5
152	1	1	4.5	2.3
153		1	0.0	2.3
154	1		4.5	0.0
166	1		4.5	0.0
167		1	0.0	2.3
178	1		4.5	0.0
194	1		4.5	0.0
total	22	44	100.0	100.0



גרף 9. האלל הנפוץ ביותר בטבע (מודגש) הוא השני הנפוץ ביותר בחק"י.

בכל הגרפים מודגש האלל הנפוץ באוכלוסיה הטבעית. בחמישה מתשעת הסמנים זהו אותו אלל הנפוץ ביותר גם באוכלוסית החק"י (מודגש בצהוב). בארבעת הסמנים האחרים האלל הנפוץ באוכלוסיה הטבעית הוא האלל השני בתדירותו באוכלוסית החק"י (מודגש בכתום).

דיון ומסקנות

מטרת מחקר זה הינה בדיקת ההרכב הגנטי של אוכלוסיות שונות של דגי דניס לאורך חופי ארצנו והשוואתו להרכב הגנטי של דגי דניס שנדגמו לאורך השנים וכן לדגים בחקלאות הימית. השוואה זו תאפשר להעריך את מידת ההשתנות של השונות הגנטית באוכלוסיות הטבעיות הסובלות מפלישת פרטים שמקורם בחקלאות הימית שסביבם.

חקלאות ימית של דגי הדניס בים התיכון החלה לפני עשרות שנים, אך עדיין נעשו מעט מאוד מחקרים להערכת המצב הגנטי של אוכלוסיות טבעיות ובחקלאות (Brown et al. 2005). בארץ לא נערך מחקר כזה על אף הדיון המתמשך בנושא השפעת החקלאות הימית על הטבע. כמו כן, מעט מחקרים הצליחו להראות השפעה של הכלובים על מצב השונות הגנטית בטבע. אוכלוסיות הבר מהוות את המקור החשוב והעיקרי למאגר הגנטי בשבי. אחד החששות העיקריים בחקלאות הימית של מיני דגים הוא השפעת השונות הגנטית של הדגים בכלובים על הצלחת גידולם בשבי והיותם מסחריים. עם זאת, כמעט ולא מתנהל מעקב ותחזוקה של גרעיני רבייה עם תקנות ונהלים מסודרים עבור שמירה על שונות גנטית. יתרה מכך, הרבה חוות אינן מחזיקות גרעין רבייה ורוכשות דגים מספק חיצוני.

עקב היותם של הדניסים הרמפרודיטים פרוטאנדרים, יכול המגדל להשתמש באותו דג כמרבח זכר ולאחר מכן גם כנקבה, כלומר להקטין עוד יותר את המגוון הגנטי של דורות ההמשך. עובדה זו, יחד עם ההערכה הנמוכה של מספר המייסדים מהטבע, עלול להוביל לזיווגי קרובים ודיכוי השונות הגנטית (Alarcon et al. 2004).

לצערנו לא נחלנו הצלחה בבחינת ההרכב הגנטי של האוכלוסיה ההיסטורית של דגי חופי ישראל. באוספי האוניברסיטה העברית ואוניברסיטת ת"א נשמר מספר קטן של דגים (בין השנים 1950 ועד 1990) שאינם יכולים לאפשר להתייחס אליהם כאל מספר אוכלוסיות ולבדוק השתנות הרכב האוכלוסיה לאורך זמן. גם ניסיון להסתכל על כל הדגימות כאוכלוסיה אחת לא צלח עקב מצבם הירוד של הדגים המשומרים. הצלחנו להפיק DNA באיכות גרועה (מקטעים קצרים של עשרות בסיסים בלבד) ולהגביר בעזרת PCR רק חלק קטן מהמקטעים ששימשו אותנו לאנליזה, וזאת רק משלושה דגים משומרים, אשר הגיעו מאותו מקור. לא מצאנו כל מידע חדש שיכול לשפוך אור על הרכב האוכלוסיה בשנים עברו.

התמקדנו לכן בהשוואה של שתי אוכלוסיות מרכזיות: האחת טבעית - דגים שניצודו בים הפתוח והשניה מן החקלאות הימית - דגים מכלובים ולהקות רבייה של חברת "ערדג".

בכל התוצאות שהתקבלו ניכר הצורך בהגדלת המדגם. יש כאמור קושי גדול במציאת דגים מן הטבע. לעיתים, לאחר סערה גדולה, יש מספרים גדולים של דגי דניס בים ואף קל לדוג אותם. הם מייצגים כמובן ארוע של בריחה מן הכלובים ולכן אין לדגום

אותם ולהסיק מהם על האוכלוסיה הטבעית. יש קושי להבדיל בין דגים מן הטבע לדגי כלובים שברחו, ונעשו מחקרים על השוני המורפולוגי ביניהם שיסייע בזיהוי (Arechavala-Lopez et al. 2011). המחקר הנוכחי שהחל בתמיכת "נקודת חן", יימשך בשנים הקרובות וכך נוכל להגדיל את המדגם ולקבל תמונה מדוייקת יותר על דגי הדניס החיים בטבע באזור חופי מדינת ישראל. ניתוח ההרכב הגנטי של האוכלוסיות בהסתכלות על ה DNA המיטוכונדריאלי (תמונה 2) מראה 7 הפלוטיפים שונים. האוכלוסיה הטבעית מתחלקת ל 4 הפלוטיפים. 3 מהם נפוצים מאוד וכוללים גם דגים מאוכלוסית החק"י. רק דג אחד מהטבע היה בעל האפלוטיפ ייחודי. הפלוטיפ טבעי זה רחוק רק במוטציה אחת מאחד משלושת הפלוטיפים הנפוצים. לשם השוואה ניתן היה למצוא באוכלוסיית החק"י שלושה הפלוטיפים שאינם נפוצים. יש להדגיש שמדגם החק"י היה גדול ממדגם האוכלוסיה הטבעית, אך בכל מקרה אין עדות לכך שהאוכלוסיה הטבעית מגוונת יותר.

סמני ה STR הם אינפורמטיביים מאוד. בכל אחד משבעת הסמנים שנותרו נמצאו אללים רבים (10-25). התמונה הכללית מראה שונות רבה וזה אולי סימן מעודד לגבי הרכב האוכלוסיה, זו שבטבע, ובמיוחד זו שבחק"י. בהשוואה בין האוכלוסיה הטבעית לבין זו המשמשת לחקלאות הימית המצב מעודד פחות. מבין 157 אללים שנמצאו סך הכל בכל האתרים, נמצאו 123 באוכלוסית החק"י לעומת 92 בלבד באוכלוסיה הטבעית. מרבית האללים מהאוכלוסיה הטבעית (58 במספר) נמצאו גם באוכלוסית החק"י. בבחינת התפצלות האללים עבור כל אחד מהסמנים (גרפים 1-9) ניתן לראות בדרך כלל אלל אחד נפוץ הרבה יותר מהשאר (-15 45%). האללים הנפוצים מרכיבים 39% מאוכלוסית החק"י ו 32% מהאוכלוסיה הטבעית. הומוזיגוטיות של אללים נמצאה ב 18 מתוך 96 מקרים (18.75%) בפרטים מן הטבע לעומת 42 מתוך 188 מקרים (22.34%) בפרטים מאוכלוסית החק"י. זה אינו הבדל מובהק ואינו מעיד על שרידות גבוהה יותר של הטרוזיגוטים בטבע. שיעור ההומוזיגוטים בשתי האוכלוסיות תואם את ההומוזיגוטיות המצופה לאור שכיחות האללים.

האנליזה שלנו מתבססת על שינויים (מוטציות) איטיים יותר המתבטאים במוטציות של החלפת בסיסים ושינויים שקורים בתדירות רבה יותר באתרי רצפים חוזרים המועדים למוטציות של שינוי במספר החזרות. שילוב של שתי השיטות מראה לנו שאין הבדל משמעותי בין שתי האוכלוסיות. הן דומות בהרכבן הגנטי, ואי אפשר לקבוע באם פרט מסויים שייך באופן מובהק לאוכלוסית הטבע או חק"י על פי הסמנים הגנטיים שנבדקו. האוכלוסיה הטבעית היא בעלת שונות נמוכה מעט יותר, אך המדגם קטן יותר. הגדלתו, עם המאמץ הכרוך בכך, תביא לביסוס תוצאות מחקר זה.

לסיכום נראה לנו שהתוצאה המשמעותית ביותר אינה נובעת מהאנליזה הגנטית אלא מן הקושי להשיג את הנתונים. נכון לשנת 2012, כמעט ואין אוכלוסיה טבעית של דגי דניס בחופי מדינת ישראל. דגי דניס שניצודים בכמויות של יותר מפרטים בודדים מקורם בתקלות שהביאו לבריחתם מן הכלובים. הם גם מתנהגים כדגי שבי ולא מנסים כלל להתחמק מהדייגים. אין בידינו הוכחה

שהכחדות האוכלוסיה מקורה בזליגת המאגר הגנטי מהחקלאות הימית או כתוצאה מהדייג המופרז באזורנו. לאור העלמות הדגים מהטבע באילת לאחר הוצאת הכלובים, אנו יכולים לשער כי דגי החק"י אינם שורדים היטב בטבע. אמנם מפרץ אילת איננו סביבתם הטבעית, אבל גם בים התיכון על אף בריחה מהכלובים דגי הדניס אינם מצליחים לבסס אוכלוסיה לאורך חופי הארץ. בדגי הדניס נראה שקיימת שונות באוכלוסית החק"י, אך אין לנו מידע על הקשר בינה לבין האוכלוסיה הטבעית שהייתה כאן. אנו ממליצים לכן ללמוד ממקרה גידול דגי הדניס ולפקח על הרכב גנטי של אוכלוסיות גידולים חקלאיים ימיים כשסיכויי הזליגה שלהם לים הפתוח הם גבוהים.

מקורות

- Alarcón, J. A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E. & Alvarez, M. C. (2004). Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230, 65–80.
- An, H.S., Hong, S.W., Lee, J.U., Park, J.Y., & Kim, K.K. (2010). Genetic diversity of wild and farmed black sea bream populations in Jeju. *Animal Cells and Systems* 3:37–44
- Arechavala-Lopez, P., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J.T., Sfakianakis, D.G. & Somarakis, S. (2011). Morphological differences between wild and farmed Mediterranean fish. *Hydrobiologia* DOI 10.1007/s10750-011-0886-y
- Batargias, C., Dermitzakis, E., Magoulas, A. & Zouros, E. (1999). Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead sea bream, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758). *Molecular Ecology* 8, 897–899.
- Becker, S., Hanner, R. & Steinke D. (2011). Five years FISH-BOL: Brief status report. *Mitochondrial DNA*. 22 Suppl 1: 3–9.
- Ben Slimen, H., Guerbej, H., Ben Othmen, A., Ould Brahim, I., Blel, H., Chatti, N., El Abed, A. & Said, K. (2004). Genetic differentiation between populations of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) along the Tunisian coast. *Cybium* 28, 45–50.
- Brown, R. C., Tsalavouta, M., Terzoglou, V., Magoulas, A. & McAndrew, B. J. (2005). Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the *Sparidae* family. *Molecular Ecology Notes* 5, 605–607.
- Brown, R.C., Woolliams, J.A. & McAndrew B.J. (2005). Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 247, pp. 219–225

Cervelli, M., Comparini, A., Fava, G. & Rodinò, E. (1985). Prime ricerche di genetic biochimica applicate all'acquacoltura di orata (*Sparus auratus* L.). *Oebalia* XI, 49–58.

Cheng, Y., Jin, X., Shi G., Wang, R. & Xu T. (2011). Genetic diversity and population structure of *miiuy croaker* populations in East China Sea revealed by the mitochondrial DNA control region sequence. *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 4–6, 718–724

Coura, R., Prolla, J.C., Meurer, L., Ashton-Prolla, P. (2006). An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 58: 894–895

De Innocentiis, S., Lesti, A., Livi, S., Rossi, A. R., Crosetti, D. & Sola, L. (2004). Microsatellite markers reveal population structure in gilthead sea bream *Sparus auratus* from the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Fisheries Science* 70, 852–859.

Dermitzakis, E. T., Clark, A. G., Batargias, C., Magoulas, A. & Zouros, E. (1998). Negative covariance suggests mutation bias in a two-locus microsatellite system in the fish *Sparus aurata*. *Genetics* 150, 1567–1575.

Dimitriou, E. (2000). Results of interntional or sporadic releases of euryhaline fish species in costal biotopes, Research and Technology Forum, Zappio, pp 49-54.

FAO 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme, by F. Colloca and S. Cerasi, in: *Sparus aurata*, Cultured Aquatic Species Information Programme. *Food and Agriculture Organization* of the United Nations [online], available at: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en Updated 17 May 2005.

Fraser, D.J., Houde, A.S., Debes, P.V., O'Reilly, P.T., Eddington, J.D., Hutchings, J.A. (2010). Consequences of farmed-wild hybridization across divergent wild populations and multiple traits in salmon. *Ecol Appl* 20: 935–953

Froese, R. and Pauly, D., 2006. Fish base [online], available at: www.fishbase.org Updated November 2010.

Funkenstein, B., Cavari, B., Stadie, T. & Davidovtch, E. (1990). Restriction site polymorphism of mitochondrial DNA of the gilthead sea bream (*Sparus auratus*) broodstock in Eilat, Israel. *Aquaculture* 89, 217–223.

Gilpin, M.E. and Soulé, M.E., (1986). Minimum viable populations: processes of species extinction. In: Conservation biology: the science of scarcity and diversity, Soulé, M.E. ed. pp 19-34. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.

Gordin, H., (2003). Mariculture in Israel. *Bamidgeh - The Israeli Journal of Aquaculture (IJA)* 55: 219-221.

Grigorakis, K., Rigos, G., (2011). Aquaculture effects on environmental and public welfare—The case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere* 855:899–919.

Hamasaki K, Toriya S, Shishidou H, Sugaya T, Kitada S. (2010) Genetic effects of hatchery fish on wild populations in red sea bream *Pagrus major* (*Perciformes, Sparidae*) inferred from a partial sequence of mitochondrial DNA. *J. Fish Biol.* 77(9):2123-36

Karaiskou N, Triantafyllidis A, Katsares V, Abatzopoulos TJ, Triantaphyllidis C. (2009) Microsatellite variability of wild and farmed populations of *Sparus aurata*. *J Fish Biol.* 74(8):1816-25.

Kochzius, M., Seidel, C., Antoniou, A., Botla, S.K., Campo, D., et al. (2010) Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *PLoS One* 5: Article No: e12620

Launey, S., Krieg, F., Haffray, P., Bruant, J.-S., Vannier, A. & Guyomard, R. (2003). Twelve new microsatellite markers for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): characterization, polymorphism and linkage. *Molecular Ecology Notes* 3, 457–459.

Liu, Y., Diserud, O.H., Hindar, K. & Skonhøft A. (2012) An ecological–economic model on the effects of interactions between escaped farmed and wild salmon (*Salmo salar*). *Fish & Fisheries*.

Loukovitis, D., Sarropoulou, E., Vogiatzi, E., Tsigenopoulos, C.S., Kotoulas, G., Magoulas, A. & Chatziplis D. (2012) Genetic variation in farmed populations of the gilthead sea bream *Sparus aurata* in Greece using microsatellite DNA markers. *Aquaculture Research*, 43, 239–246

Magoulas, A., Sophronides, K., Patarnello, T., Hatzilaris, E. & Zouros, E. (1995). Mitochondrial DNA variation in an experimental stock of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mol. Mar. Biol. Biotec.* 4, 110–116.

McGinnity, P., Prodöhl, P., Ferguson, A., Hynes, R., Maoiléidigh, N., Baker, N., Cotter, D., O'Hea, B., Cooke, D., Rogan, G., Taggart, J. and Cross, T., (2003). Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon *Proc R Soc B*, 270: 2443-2450.

Miggiano, E., De Innocentiis, S., Ungaro, A., Sola, L. & Crosetti, D. (2005). AFLP and microsatellites as genetic tags to identify cultured gilthead seabream escapees: data from a simulated floating cage breaking event. *Aquaculture International* 13, 137–146.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273.

Palma, J., Alarcon, J. A., Alvarez, C., Zouros, E., Magoulas, A. & Andrade, J. P. (2001). Developmental stability and genetic heterozygosity in wild and cultured stocks of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Marine Biology Association U.K.* 81, 283–288.

Sola, L., Moretti, A., Crosetti, D., Karaiskou, N., Magoulas, A., Rossi, A.R., Rye, M., Triantafyllidis, A. and Tsigenopoulos, C.S., (2007). Gilthead seabream - *Sparus aurata*, Genimpact: Evaluation of genetic

impact of aquaculture activities on native populations [online], available at:

[http://genimpact.imr.no/ data/page/7650/gilthead seabream.pdf](http://genimpact.imr.no/data/page/7650/gilthead_seabream.pdf)

Tikochinski Y, Shainin I, Hyams Y, Motro U, Golani D. (2012) Genetic evidence for cryptic species in the Whiting, *Sillago sihama* and insights on its colonization of the Mediterranean Sea. Accepted by *Marine Biol Res*.

Triantafyllidis, A. (2007). Aquaculture escapes: new DNA based monitoring analyses and application on sea bass and sea bream. In *Impact of Mariculture on Coastal Ecosystems*. (Briand, F. ed.) pp 22–67 Monaco: CIESM.

תקציב

34518

סיכום מחקר: השפעת החקלאות הימית על השונות הגנטית - דגי דניס בים התיכון ובים סוף כמודל

<u>חסר/עודף</u>	<u>הערכה ב-\$</u>	<u>דוח בש"ח</u>	<u>תקציב ב-\$</u>	<u>הסעיף</u>
126	9,874	37,519.41	10,000	משכורת
990	1,160	4,408.00	2,150	ציוד וחמרים
-1,379	8,779	33,360.30	7,400	שרות פעילות
	1,950		1,950	תקורה שונות
-263	21,763	75,287.71	21,500	סה"כ