



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Πληθυσμιακή γενετική του είδους *Anguilla anguilla* στη Μεσόγειο
Θάλασσα»**

Παπακυριαζή Μαρία

Σιάκα Μαρία-Ελίζα

ΒΟΛΟΣ 2023

**«Πληθυσμιακή γενετική του είδους *Anguilla anguilla* στη Μεσόγειο
Θάλασσα»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Γεώργιος Γκάφας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.

2) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, *Μέλος*.

3) Δημήτριος Κλαουδάτος, Επίκουρος Καθηγητής, Αλιεία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

Στους ανθρώπους μας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμές μας ευχαριστίες σε όσους συνέβαλαν στο να φέρουμε σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική εργασία.

Ιδιαίτερος θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Γεώργιο Γκάφα για την πολύτιμη βοήθεια του και την διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά την διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, αποτελούμενη από τους Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και Δημήτριο Κλαουδάτο.

Ακόμη θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά την κα Ιωάννα Σαραντοπούλου, μέλος ΕΤΕ, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της σε όλο το πειραματικό στάδιο της δεδομένης έρευνας.

Τέλος, ευχαριστούμε θερμά την οικογένειά και τους φίλους μας για την αμέριστη συμπαράσταση που επέδειξαν κατά τη διάρκεια εκτέλεσης του πειράματος και της συγγραφής της εργασίας, καθώς και για την κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια μελέτη για τη πληθυσμιακή γενετική του είδους *Anguilla anguilla* στη Μεσόγειο θάλασσα μέσω της απομόνωσης τμήματος της υπομονάδας κυτοχρωμικής c οξειδάσης (COI). Πραγματοποιήθηκε η απομόνωση DNA από 10 δείγματα του είδους *A. anguilla* από το Ιόνιο πέλαγος. Μετά την απομόνωση του DNA έγινε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια, η αντιγραφή του γενετικού υλικού μέσω της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR με τη χρήση του εκκινητή Universal COI Primer. Έπειτα, ακολούθησε η τεχνική του DNA barcoding. Πραγματοποιήθηκαν στατιστικές αναλύσεις, χρησιμοποιώντας τις 10 αυτές αλληλουχίες από το Ιόνιο και επιπλέον δείγματα αλληλουχιών του είδους, τα οποία βρέθηκαν από ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες από την βάση δεδομένων.ncbi. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες που εξετάστηκαν συλλέχθηκαν από την Αίγυπτο, το Βόρειο Αιγαίο, τη Τουρκία, την Ιταλία, την Πορτογαλία, την Αγγλία, τη Σουηδία, τη Τσεχία και τη Γερμανία. Οι 47 από τους 55 απλότυπους που χρησιμοποιήθηκαν είναι μοναδικοί, είτε για έναν ολόκληρο πληθυσμό, είτε για κάποια άτομα εντός του πληθυσμού. Κάτι τέτοιο είναι ενδεικτικό της μεγάλης ποικιλότητας μεταξύ των ατόμων μέσα στον ίδιο τον πληθυσμό. Ακόμη, ομαδοποιήθηκαν οι υπό μελέτη πληθυσμοί σε 3 γενετικά γκρουπ ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση. Επιπλέον, έγινε Ανάλυση μοριακής Διακύμανσης (AMOVA) και βρέθηκε ότι το ποσοστό της μοριακής παραλλακτικότητας εντός των πληθυσμών ήταν υψηλότερο (66,06%) από αυτό μεταξύ των πληθυσμών (43,07%). Ο συντελεστής F_{ST} ήταν ίσος με 0.33944 ($F_{ST} > 0.25$) ενώ η τιμή p-value ήταν ίση με $0.00000+/-0.00000$ (p-value<0,001), επομένως υπάρχει σημαντική γενετική διαφοροποίηση. Στη συνέχεια, η μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση εντοπίστηκε μεταξύ των πληθυσμών του Ιονίου πελάγους και της Τουρκίας καθώς εκεί εμφανίστηκε

η υψηλότερη τιμή του δείκτη F_{ST} (0.86672). Η διαφοροποίηση, όσον αφορά το γονίδιο COI, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι επικρατούν διαφορετικά ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά στις διαφορετικές τοποθεσίες. Συγκριτικά με άλλες έρευνες, θα περίμενε κανείς μια χαμηλή γενετική ποικιλότητα μεταξύ των πληθυσμών του ευρωπαϊκού χελιού, αντιθέτως τα αποτελέσματα δείχνουν υψηλή διακύμανση μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών.

Λέξεις κλειδιά: *Anguilla Anguilla*, Μεσόγειος θάλασσα, πληθυσμιακή γενετική, MtDNA, γονίδιο COI

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Συστηματική ταξινόμηση	2
1.2 Γεωγραφική εξάπλωση	2
1.3 Μορφολογία Ευρωπαϊκού χελιού.....	4
1.4 Βιολογικός Κύκλος-Οικολογία χελιού	5
1.5 Βιότοπος.....	10
1.6 Διατροφή	11
1.7 Ιστορικά στοιχεία εξέλιξης.....	12
1.8 Κατάσταση αποθέματος του Ευρωπαϊκού χελιού.....	13
1.9 Μεσόγειος Θάλασσα.....	13
1.10 Πληθυσμιακή γενετική και Μοριακοί δείκτες	14
1.11 Γονίδιο COI	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 Λήψη Δειγμάτων.....	21
2.2 Απομόνωση DNA.....	22
2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA	27
2.4 PCR.....	29
2.4.1 Primer.....	29
2.4.2. Master Mix.....	30
2.4.3 PCR Gradient.....	30
2.5 Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων	32
2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
3.1 Ηλεκτροφόρηση	35
3.2 Κατανομή απλότυπων ανά γεωγραφική περιοχή.....	37
3.3 Στατιστική ανάλυση	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51
5.1 Ελληνική.....	51
5.2 Ξενόγλωσση.....	51
5.3 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία.....	59
6. ABSTRACT	61
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα χέλια αποτελούν τελεόστεους ιχθύες οι οποίοι ανήκουν στην τάξη Anguilliformes και στην οικογένεια Anguillidae. Η τάξη Anguilliformes αποτελείται από 20 οικογένειες, 147 γένη και 820 είδη (Nelson, 2006; Johnson et al., 2011). Στην τελευταία αναθεώρηση το γένος χωρίστηκε σε 16 είδη (Ege, 1939; Castle and Williamson, 1974; Watanabe et al., 2004; 2009a; 2013; 2014b) ενώ τρία από αυτά χωρίστηκαν περαιτέρω σε 2 υποείδη (Ege, 1939).

Πίνακας 1.1 Σύγκριση ταξινόμησης του Ege (1939) με την τελευταία ταξινόμηση από τους Castle and Williamson (1974), Watanabe (2003) και Watanabe et al (2004; 2005; 2009a; 2013; 2014a,b) για το γένος *Anguilla*.

Ege (1939)	Τελευταία ταξινόμηση
<i>A. celebesensis</i>	<i>A. celebesensis</i>
<i>A. interioris</i>	<i>A. interioris</i>
<i>A. ancestralis</i>	<i>A. megastoma</i>
<i>A. megastoma</i>	<i>A. bengalensis bengalensis</i>
<i>A. nebulosa nebulosa</i>	<i>A. bengalensis labiata</i>
<i>A. nebulosa labiata</i>	<i>A. marmorata</i>
<i>A. marmorata</i>	<i>A. reinhardtii</i>
<i>A. reinhardtii</i>	<i>A. borneensis</i>
<i>A. borneensis</i>	<i>A. japonica</i>
<i>A. japonica</i>	<i>A. rostrata</i>
<i>A. rostrata</i>	<i>A. anguilla</i>
<i>A. anguilla</i>	<i>A. dieffenbachii</i>
<i>A. dieffenbachii</i>	<i>A. mossambica</i>
<i>A. mossambica</i>	<i>A. luzonensis</i>
<i>A. bicolor pacifica</i>	<i>A. bicolor pacifica</i>
<i>A. bicolor bicolor</i>	<i>A. bicolor bicolor</i>
<i>A. obscura</i>	<i>A. obscura</i>
<i>A. australis australis</i>	<i>A. australis australis</i>
<i>A. australis schmidtii</i>	<i>A. australis schmidtii</i>

1.1 Συστηματική ταξινόμηση

Σύμφωνα με τον L. S. Berg (1940) η ταξινόμηση του ευρωπαϊκού χελιού είναι η ακόλουθη:

Υπέρκλαση: Osteichthyes
Κλάση: Actinopterygii
Υπόκλαση: Teleostei
Υπέρταξη: Neopterygii
Τάξη: Anguilliformes
Υπόταξη: Anguilloidei
Οικογένεια: Anguillidae
Γένος: <i>Anguilla</i>
Είδος: <i>Anguilla anguilla</i>



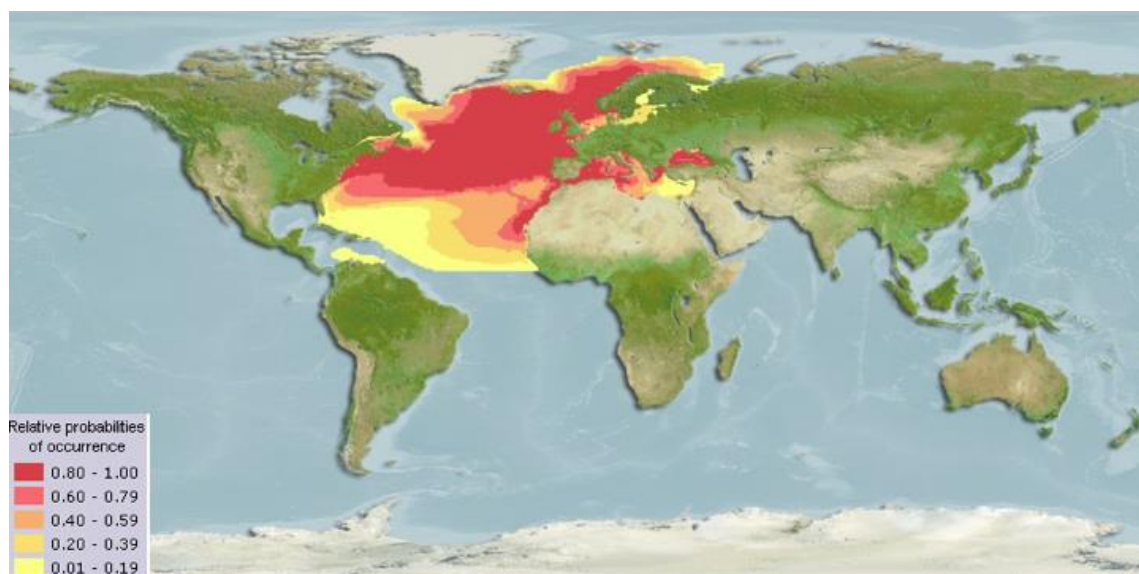
Εικόνα 1.1 Το είδος *Anguilla anguilla* (Πηγή: <https://nat.is/european-eel-orelver/anguilla-anguilla>)

1.2 Γεωγραφική εξάπλωση

Τα περισσότερα είδη απαντώνται και αναπαράγονται κυρίως σε τροπικούς ωκεανούς. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι το *A. anguilla* (Linnaeus 1758) (ευρωπαϊκό χέλι), το *A. rostrata* (Lesueur 1817) (αμερικάνικο χέλι), το *A. japonica* (Temminck and Schlegel 1847) (ιαπωνικό χέλι) και το *A. marmorata* (Quoy and Gaimard 1824). Όλα τα παραπάνω κάνουν ωκεάνιες μεταναστεύσεις σε διάφορες κλίμακες από εκατοντάδες έως χιλιάδες χιλιόμετρα (Arai, 2014). Το *A. anguilla* και το *A. rostrata* μεταναστεύουν από 2.000-8.000 km στη Θάλασσα των Σαργασών για ωοτοκία (Schmidt, 1922; Miller et al., 2019), ενώ το *A. japonica* περίπου 2.000-4.000 km (Tsukamoto, 1992).

Το *A. anguilla* εξαπλώνεται κατά μήκος των Βόρειων Ατλαντικών ακτών, των θαλασσών της βόρειας Ευρώπης και της Μεσογείου και συγκεκριμένα από τη Σκανδιναβία έως τη βόρεια Αφρική και από τις Αζόρες έως την ανατολική Μεσόγειο και τη διώρυγα του Σουέζ. Τα Κανάρια νησιά αποτελούν το νοτιότερο άκρο στο οποίο έχουν βρεθεί πληθυσμοί, ενώ οι Βόρειες ακτές της Ευρώπης αποτελούν το βορειότερο όριο στο οποίο παρατηρήθηκε εξάπλωση του Ευρωπαϊκού χελιού (Dekker, 2002). Η μεγάλη διασπορά του *A. anguilla* σε όλο τον κόσμο ξεκινάει με την μετανάστευση των λεπτοκέφαλων. Αυτοί μεταφέρονται μέσω του Ατλαντικού επιφανειακού ρεύματος, το οποίο στη συνέχεια γίνεται το Βόρειο Ατλαντικό ρεύμα, από τη θάλασσα των Σαργασών έως την Ισλανδία και τη Νότια Μεσόγειο. Μέσω του στενού του Γιβραλτάρ οι λεπτοκέφαλοι εισβάλλουν στις ακτές της Ισπανίας, της Γαλλίας, της Ελλάδας, της Ιταλίας και της Βόρειας Αφρικής και τελικά φτάνουν στη Μαύρη Θάλασσα (Psinha and Jones, 1975). Η γεωγραφική εξάπλωση των χελιών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υποτροπική κυκλοφορία των ωκεανών. Οι υδρολογικές αυτές συνθήκες σχετίζονται με την εμφάνιση των χελιών και εξηγεί γιατί τα χέλια απαντώνται κυρίως στις ακτές Ευρασίας, Αυστραλίας, Αφρικής και Β. Αμερικής, ενώ απουσιάζουν από τη Δυτική ακτή της Νότιας Αμερικής όπου δεν υπάρχουν ζεστά ρεύματα. Το *A. Anguilla* απαντάται στη Μεσόγειο εξαιτίας του ρεύματος του κόλπου (Gulf Stream) και του ρεύματος του Β. Ατλαντικού (North Atlantic Drift). Σε περιοχές όπου δεν υπάρχουν τέτοια ρεύματα όπως στις δυτικές ακτές της Β. και Ν. Αμερικής δεν υπάρχουν χέλια. Ωστόσο δεν είναι γνωστό γιατί δεν υπάρχουν χέλια στις ακτές της Ν. Αμερικής, παρά την ύπαρξη του θερμού Ρεύματος της Βραζιλίας (Brazil Current) (Aoyama and Tsukamoto, 1997). Το χέλι στην Ελλάδα βρίσκεται στα εσωτερικά νερά από την Κρήτη μέχρι τη Μακεδονία και τη Θράκη, καθώς και σε άλλες πολλές θαλάσσιες περιοχές (Νεοφύτου, 2015).

Με βάση τα γεωγραφικά τους ενδιαίτηματα, μπορούν να χωριστούν σε τροπικά και εύκρατα χέλια (Tesch, 1997). Προς το παρόν, τα περισσότερα κατανέμονται σε τροπικές περιοχές ενώ τα 6 βρίσκονται σε εύκρατες περιοχές (Ege 1939; Castle and Williamson 1974; Watanabe et al., 2004; 2009; 2013; 2014a, b; Arai, 2016).



Εικόνα 1.2 Χάρτης γεωγραφικής εξάπλωσης του είδους *Anguilla anguilla*, Data sources: [GBIF](http://www.fishbase.org/) [OBIS](http://www.aquamaps.org/) (<http://www.fishbase.org/>, [aquamaps.org](http://www.aquamaps.org/))

1.3 Μορφολογία Ευρωπαϊκού χελιού

Το σώμα του Ευρωπαϊκού χελιού είναι επίμηκες, κυλινδρικό και λεπτό με οφιοειδές σχήμα. Αποτελείται από περίπου 115 σπονδύλους και καλύπτεται από μικρά, κυκλοειδή και ελλειπτικού σχήματος λέπια, τα οποία είναι βυθισμένα στο δέρμα. (Tesch, 2003; McCleave, 2003). Λόγω των μικρών λεπιών που διαθέτει, το χέλι μπορεί να αναπνέει εκτός από τα βράγχια και με τη βοήθεια των πόρων του δέρματος. Το δέρμα τους είναι γλοιώδες και ανθεκτικό. Η ύπαρξη βλέννας είναι απαραίτητη για την προστασία από αφυδάτωση, ενώ ταυτόχρονα προστατεύει το χέλι από διάφορα παράσιτα και παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα κοιλιακά πτερύγια απουσιάζουν και

ενώ το εδρικό και το ραχιαίο πτερύγιο ενώνονται και δημιουργούν το ουραίο. Τα θωρακικά πτερύγια είναι μικρά και στρογγυλεμένα ενώ η πλευρική γραμμή είναι πολύ ευδιάκριτη. Η κάτω γνάθος προεξέχει καθώς είναι μεγαλύτερη από την άνω. Διαθέτει λεπτά δόντια τα οποία βρίσκονται στις σιαγόνες και είναι μικρά με αμβλεία επιφάνεια. Τα μάτια έχουν στρογγυλό σχήμα και αρχικά είναι μικρά στα νεαρά κιτρινόχελα, ενώ παρατηρούνται μεγαλύτερα στα ασημόχελα. Παρόλο που τα χέλια έχουν σχετικά περιορισμένες οπτικές και ακουστικές ικανότητες, έχουν αναπτύξει εξαιρετικά την αίσθηση της όσφρησης. Η όσφρηση τους έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι το χέλι χρησιμοποιεί την όσφρηση, όχι μόνο για τον εντοπισμό τροφής, αλλά και για να εντοπίσει διαφορετικές τοποθεσίες (Tesch, 2003).

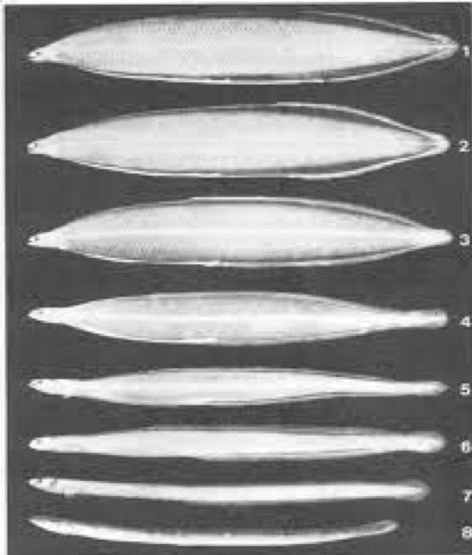
Τα χέλια έχουν σχετικά μεγάλη διάρκεια ζωής. Συνήθως ζουν 20-25 χρόνια, με τα θηλυκά να ζουν περισσότερο από τα αρσενικά. Οι διαφορές της ηλικίας ανάμεσα στα δύο φύλα πιθανόν να καθορίζονται από γεωγραφικές κλιματολογικές διακυμάνσεις. Εάν για κάποιο λόγο παρεμποδιστεί η μετανάστευση, τα χέλια μπορούν να ζήσουν πολλά χρόνια, έως και 85 ετών (Deelder, 1984; Tesch, 2003). Το μήκος τους κυμαίνεται στα 60-80 cm με κάποιες εξαιρέσεις όπου έχουν βρεθεί χέλια με μήκος 2 m (Tesch, 2003). Ενδεικτικά, αναφέρουμε ότι το μέσο μήκος του ασημόχελου είναι 62,3 cm για τα θηλυκά είναι, ενώ αντίστοιχα για τα αρσενικά είναι 40,6 cm (Vollestad, 1992), καθώς δεν έχει καταγραφεί αρσενικό πάνω από 55cm (Νεοφύτου, 2015). Τα θηλυκά φτάνουν μέχρι 6kg βάρος, ενώ τα αρσενικά είναι πάντα μικρότερα (Kastelein, 1983).

1.4 Βιολογικός Κύκλος-Οικολογία χελιού

Το *A. anguilla* είναι μεταναστευτικό είδος και ο κύκλος ζωής του είναι αρκετά πολύπλοκος. Τα πελαγικά αυγά είναι διάφανα και έχουν διάμετρο περίπου 1-1,2 mm

(Boetius & Boetius, 1980; Deelder, 1984; McCleave, 2003). Το πρώτο νυμφικό στάδιο ονομάζεται προλεπτοκέφαλος (preleptocephalus) που αργότερα μεταμορφώνεται σε λεπτοκέφαλο (leptocephalus) και αποκτά μια φυλλοειδή διάπλαση. Μια κοιλότητα με ζελατίνα καταλαμβάνει μεγάλο μέρος του σώματος των λεπτοκέφαλων προκειμένου να επιπλέουν και να μένουν στα επιφανειακά στρώματα του νερού, η οποία εξαφανίζεται κατά τη μεταμόρφωση (Bartels, 1922, αναφέρεται από Deelder, 1984). Οι ιχθυονύμφες μεταφέρονται με το ρεύμα του κόλπου (Gulf Stream) και το ρεύμα του Β. Ατλαντικού (North Atlantic Current) στις ακτές της Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής. Ο Schmidt (1992) ισχυρίζεται ότι το ταξίδι διαρκεί 3-4 έτη ενώ άλλοι ερευνητές περιορίζουν το διάστημα σε 14-16 μήνες (Wang & Tzeng 2000) ή ακόμα και σε ένα έτος (Lecomte-Finiger 1992).

Όταν φτάσουν στις παράκτιες περιοχές, οι λεπτοκέφαλοι μεταμορφώνονται σε γυαλόχελα (glass eel). Το ταξίδι δια μέσου της ηπειρωτικής κρηπίδας θεωρείται ως περίοδος «λιμοκτονίας» κατά την οποία τα γυαλόχελα επιβιώνουν από τα ενεργειακά τους αποθέματα (Boetius & Boetius, 1989). Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από διάφανο και κυλινδρικό σώμα με μήκος 5-7 cm και βάρος περίπου 0,35g. Κατά τη διαδικασία της μεταμόρφωσης οι ιχθυονύμφες μειώνονται σε μέγεθος και διασπάται η ζελατινώδης ουσία η οποία αντικαθίστανται από μύες και οστά (Kawakami et al., 1999; Pheiler, 1999). Στο στάδιο αυτό, μέσω των παλιρροικών ρευμάτων, εισέρχονται από τη θάλασσα στα γλυκά νερά και συγκεκριμένα στις εκβολές των ποταμών.



Εικόνα 1.3 Αναπτυξιακά στάδια χελιού από λεπτοκέφαλο έως γυαλόχελο (Πηγή: Tesch, 2003).

Στάδιο 1: Λεπτοκέφαλος

Στάδιο 2-6: Μεταμόρφωση ιχθυονύμφης σε ενήλικο

Στάδιο 7: Αρχικά στάδια ανάπτυξης του γυαλόχελου

Στάδιο 8: Χέλι στην έναρξη του χρωματισμού



Εικόνα 1.4 Γυαλόχελα (Πηγή: European Eel Foundation, freshwaterblog.net)

Κατά τη παραμονή τους στα γλυκά νερά, τα γυαλόχελα αυξάνουν την ποσότητα της τροφής τους, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση χρωστικών, οι οποίες εξαπλώνονται σε όλο τους το σώμα. Έτσι το δέρμα τους παίρνει ένα πιο σκούρο χρώμα και μετατρέπονται στο στάδιο elvers (ανοδικά χέλια). Τα elvers εισέρχονται στα εσωτερικά

ή μεταβατικά ύδατα και εξελίσσονται σε κιτρινόχελα (yellow eels). Σε αυτό το στάδιο φαίνεται και η διαφοροποίηση του φύλου (Dekker, 2002).

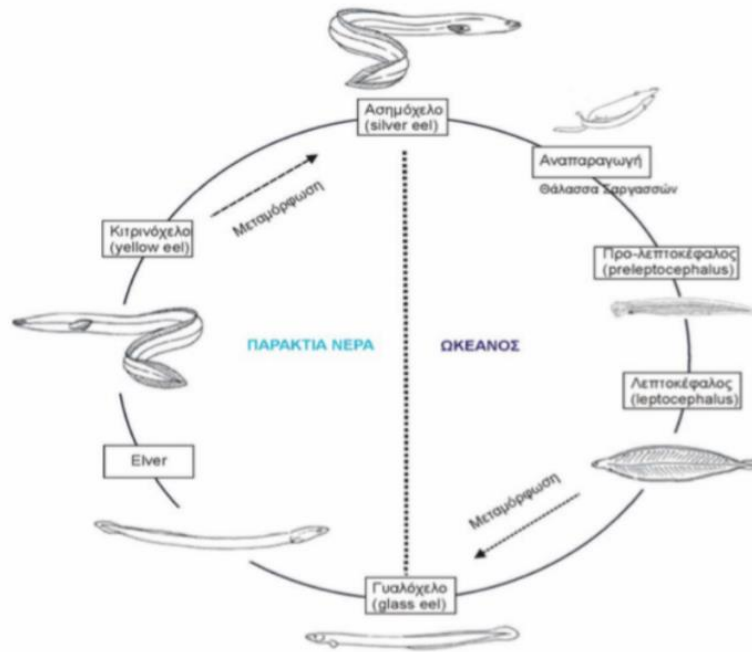
Μετά από 3-6 χρόνια, πριν ξεκινήσει η διαδικασία της μετανάστευσης, τα χέλια σταματάνε να τρέφονται και αλλάζουν χρωματισμό (Tesch, 2003). Το χρώμα γίνεται πιο σκούρο στη ράχη και ασημί και γυαλιστερό στη κοιλιακή περιοχή. Σε αυτό το στάδιο η διάμετρος των οφθαλμών τους αυξάνεται σε μέγεθος και τα κεφάλια τους γίνονται πιο πεπλατυσμένα. Η μορφή που προκύπτει ονομάζεται ασημόχελο (silver eel) και είναι αυτά που θα μεταναστεύσουν στη θάλασσα όπου θα ωριμάσουν γεννητικά και στη συνέχεια θα κατευθυνθούν στις περιοχές φωτοκίας. Το στάδιο του ασημόχελου διαρκεί 2-15 χρόνια στα αρσενικά και 4-20 έτη στα θηλυκά (Tesch, 2003). Η σεξουαλική ωρίμανση του χελιού, στη φάση του ασημόχελου, καθορίζει την συνολική διάρκεια της ζωής του ατόμου. Επέρχεται νωρίτερα στα αρσενικά από ότι στα θηλυκά και συγκεκριμένα, κατά την αρχή της μετανάστευσης, εκτιμάται ότι τα αρσενικά ασημόχελα είναι 1 έως 3 χρόνια νεότερα από τα θηλυκά (Deelder, 1984; Tesch, 2003). Η σεξουαλική ωρίμανση επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το φύλο και το ρυθμό ανάπτυξης τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζονται έντονα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσής τους σε ασημόχελα, ο πεπτικός σωλήνας ατροφεί και οι γονάδες ωριμάζουν. Αφού δεν καταναλώνουν τροφή κατά τη διάρκεια της μετανάστευσής, πρέπει οπωσδήποτε να διαθέτουν αποθέματα ενέργειας για την ανάπτυξη των γονάδων (Boetius and Boetius, 1980). Το Φθινόπωρο, εξαιτίας της μείωσης της θερμοκρασίας και των υψηλών ροών των υδάτων, κινούνται καθοδικά και αρχίζουν την μετανάστευση για αναπαραγωγή. (Acou et al., 2003).



Εικόνα 1.5 Σύγκριση κεφαλιών του κιτρινόγελου και του ασημόγελου.

<https://www.eelregulations.co.uk/cont-007.php>

Τα χέλια εγκαταλείπουν τις ακτές της Ευρώπης Σεπτέμβριο-Οκτώβριο. Μεταναστεύουν και ωοτοκούν στη θάλασσα των Σαργασών, η οποία βρίσκεται κοντά στο τρίγωνο των Βερμούδων, στον δυτικό Ατλαντικό ωκεανό. Οι ερευνητές οδηγήθηκαν σε αυτό το συμπέρασμα επειδή σε εκείνη την περιοχή βρέθηκαν οι μικρότερες ιχθυονύμφες (Schmidt, 1922), όμως μέχρι και σήμερα αυτή η υπόθεση δεν έχει επιβεβαιωθεί. Το ταξίδι μέχρι τη θάλασσα των Σαργασών διαρκεί από 17 έως 18 μήνες και τα χέλια διανύουν 20-40 km τη μέρα. (Νεοφύτου, 2015). Κατά τη διάρκεια την διαδρομής δεν τρέφονται και για αυτό οι γεννήτορες αναπαράγονται μια φορά και πεθαίνουν λόγω εξάντλησης. Ωοτοκούν σε απόσταση 4000-7000 km από τις ακτές της Ευρώπης. Η ωοτοκία του Ευρωπαϊκού χελιού λαμβάνει χώρα σε βάθος 200-500 m κατά τους χειμερινούς μήνες, μέχρι τις αρχές της άνοιξης και σε θερμοκρασίες μεταξύ 17-20 °C (Schmidt, 1922). Αντίθετα, άλλοι ερευνητές θεωρούν ότι η ωοτοκία διαρκεί όλο το χρόνο με κύρια περίοδο μεταξύ Απριλίου και Ιουλίου (Guerault et al., 1992; Desaunay et al., 1993a). Αφού εισέλθουν στη θάλασσα των Σαργασών η παρακολούθησή τους είναι αδύνατη λόγω των πολύ μεγάλων βαθών που κινούνται. Τα νέα ιχθύδια θα εκκολαφθούν μετά από 1-2 μήνες και εμφανίζονται σε απόσταση 100-300m από την επιφάνεια.



Εικόνα 1.6 Στάδια κύκλου ζωής *A. Anguilla* (Πηγή: Σπυριδούλα Ζομπόλα, Πάτρα, Νοέμβριος 2008).

1.5 Βιότοπος

Τα χέλια είναι ευρύαλα είδη, δηλαδή αντέχουν σε μεγάλες μεταβολές της αλατότητας, επομένως συναντώνται τόσο σε γλυκά όσο και σε αλμυρά νερά. Προτιμούν τις πιο υψηλές θερμοκρασίες και ζουν μέχρι τα 1.000m. Ακολουθούν καταδρομικά πρότυπα μετανάστευσης μεταξύ των εσωτερικών και των παράκτιων υδάτων. Η επιβίωση τους πραγματοποιείται στα γλυκά νερά αλλά μεταναστεύουν στο θαλασσινό νερό για ωοτοκία (McDowall, 1988). Ζουν σε μεγάλο εύρος βιοτόπων όπως σε γλυκά, μεταβατικά ή θαλασσινά νερά. Μπορούν να μείνουν πολλές ώρες εκτός νερού και έχουν την ικανότητα να ζουν για κάποιο χρονικό διάστημα σε νερά με μέτρια ρύπανση. Βρίσκονται και σε σχισμές βράχων ή σκάβουν λαγούμια σε μαλακά υποστρώματα καθώς παρουσιάζουν έντονη νυκτόβια δραστηριότητα. Τα μεγαλύτερα χέλια

προτιμούν τους μαλακούς και αμμώδης πυθμένες, ενώ τα νεαρά ζουν σε μικρά ρεύματα, μέσα στην υδρόβια βλάστηση ή κάτω από πέτρες (Νεοφύτου, 2015).

1.6 Διατροφή

Τα χέλια είναι σαρκοφάγα, αρπακτικά ψάρια και τρέφονται με όλα τα είδη των υδρόβιων ζώων. Η διατροφή τους αλλάζει κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής και εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης, το μέγεθος, τον βιότοπο και την διαθεσιμότητα της τροφής. Κυρίως τρέφονται με έντομα σαλιγκάρια, βατράχια, σκώληκες, υδρόβια πτηνά, μικρά τρωκτικά, ζωοπλαγκτό, μαλάκια και μαλακόστρακα.

Το *A. anguilla* ανάλογα με τον τύπο της διατροφής τους, διακρίνεται σε χέλι με μυτερό κεφάλι (narrow headed) και σε χέλι με πλατύ κεφάλι (broad headed) (Deelder, 1984; Tesch, 2003). Τα χέλια με μυτερό κεφάλι τρέφονται με μικρά και μαλακά θηράματα όπως αμφίποδα και χειρονομίδες, ενώ αυτά με πλατύ κεφάλι καταναλώνουν μεγάλους και σκληρούς οργανισμούς όπως μαλάκια και ψάρια (Proman and Reynolds. 2000).

Γενικά τα χέλια αποτελούν βασικό κρίκο της τροφικής αλυσίδας καθώς αποτελούν μεγάλο ποσοστό της ιχθυοβιομάζας και τροφή για θηρευτές όπως βίδρες, κορμοράνους και ερωδιούς. Ως μεταναστευτικά είδη συμμετέχουν στη ροή οργανικού υλικού μεταξύ θαλασσινών και εσωτερικών νερών.



Εικόνα 1.7. A) χέλι με πλατύ κεφάλι (broad headed), B) χέλι με μυτερό κεφάλι (narrow headed) (Πηγή: homepages.see.leeds.ac.uk).

1.7 Ιστορικά στοιχεία εξέλιξης

Τα Anguilliformes εμφανίστηκαν σαν απολιθώματα περίπου πριν από 113-119 εκατομμύρια χρόνια πριν (Patterson, 1993; Belouse et al., 2003). Ανακαλύφθηκε το απολιθωμένο χέλι *Protoanguilla palau*, του οποίου η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι είναι μια από τις πιο κοντινές μορφές προγονικών χελιών (Johnson et al., 2011). Η ιστορία εξέλιξης του χρονολογείται από τη Τριαδική εποχή και υποδηλώνει πως η ύπαρξη του πρέπει να ξεκίνησε περίπου 200-250 εκατομμύρια χρόνια πριν.

Τα χέλια του γένους *Anguilla*, με βάση το αρχείο των απολιθωμάτων, φαίνεται ότι εμφανίστηκαν στη Ευρώπη κατά τον Ηώκαινο, δηλαδή περίπου 50-55 εκατομμύρια χρόνια πριν (Patterson, 1993). Όλα δείχνουν πως ο ινδοειρηνικός ωκεανός αποτελεί την αρχική τοποθεσία της ειδογένεσης των χελιών. Μια μοριακή φυλογενετική μελέτη αποκάλυψε ότι το γένος *Anguilla* προέρχεται από θαλάσσια αγκυλόμορφα είδη βαθέων ωκεανών (Inoue et al., 2010). Έρευνες αποκάλυψαν πως τα τροπικά χέλια είναι πιο στενά συνδεδεμένα με την προγονική τους μορφή από ότι τα εύκρατα. Συγκεκριμένα τα είδη *A. borneensis* και *A. mossambica* θεωρούνται ως τα πιο κοντινά στη προγονική

τους μορφή (Aoyama et al., 2001; Lin et al., 2001; Minegishi et al., 2005; Teng et al., 2009; Tseng, 2016; Zan; et al., 2020).

1.8 Κατάσταση αποθέματος του Ευρωπαϊκού χελιού

Το είδος *A. Anguilla* ανήκει στα είδη που κατατάσσονται στην κόκκινη κατηγορία όσον αφορά τη βιωσιμότητα του. Έχει ταξινομηθεί ως σοβαρά απειλούμενο είδος στον κόκκινο κατάλογο της Διεθνούς Ένωσης για τη Διατήρηση της Φύσης και των Φυσικών Πόρων (IUCN).

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν τους πληθυσμούς των χελιών. Μερικοί από αυτούς είναι:

- Ρύπανση, υποβάθμιση ή ακόμη και απώλεια των φυσικών τους ενδιαιτημάτων
- Υπεραλίευση σε όλα τα στάδια εξέλιξης του (γυαλόχελου, κιτρινόχελου, ασημόχελου) κυρίως στο στάδιο του γυαλόχελου.
- Ύπαρξη εμποδίων, όπως είναι τα υδροηλεκτρικά φράγματα, κατά τη μετανάστευσή τους στο στάδιο του elver (ανάδρομη) και του ασημόχελου (κατάδρομη).
- Κλιματική αλλαγή. Φυσικές αλλαγές στην κυκλοφορία των ωκεάνιων ρευμάτων) κατά τη διαδικασία μεταφοράς των λεπτοκέφαλων.
- Ασθένειες και παράσιτα όπως το *Anguillicola crassus*.

1.9 Μεσόγειος Θάλασσα

Η Μεσόγειος είναι ένα θαλάσσιο ενδιαίτημα με μεγάλη οικολογική σημασία καθώς διαθέτει θαλάσσια και παράκτια σημεία βιοποικιλότητας (hot spot). Παρόλο που αποτελεί λιγότερο από το 1% της παγκόσμιας επιφάνειας των ωκεανών, είναι μια από

τις πλουσιότερες θάλασσες όσον αφορά την ποικιλία των οργανισμών, αφού φιλοξενεί το 20% της παγκόσμιας θαλάσσιας βιοποικιλότητας με υψηλά επίπεδα ενδημισμού. Πριν από τον σχηματισμό της Μεσογείου οι θαλάσσιοι οργανισμοί βρίσκονταν σε μεγάλη αλληλεπίδραση μεταξύ τους αφού δεν υπήρχαν γεωγραφικά όρια. Σήμερα, αποτελεί περιοχή εισόδου ειδών από τον Ινδο-Ειρηνικό ωκεανό (Λεσσεψιανοί μετανάστες), μέσω της δώρυγας του Σουέζ, προσβάλλοντας έτσι τους οικοτόπους και τις κοινότητες των ήδη υπαρχόντων οργανισμών της περιοχής. Τα ιστορικά περιβαλλοντικά γεγονότα και οι προσαρμογές των ειδών συνέβαλαν σημαντικά στην εξέλιξή τους και στη διαμόρφωση της βιοποικιλότητας της Μεσογείου καθώς και στην γενετική δομή των πληθυσμών (Hsü et al., 1977; Harzhauser et al., 2002; Lambeck et al., 2002; Duggen et al., 2003; Domingues et al., 2005; Patarnello et al., 2007).

1.10 Πληθυσμιακή γενετική και Μοριακοί δείκτες

Η πληθυσμιακή γενετική είναι το επιστημονικό πεδίο που εξετάζει τη γενετική ποικιλομορφία. Κύριος στόχος της είναι η αποκρυπτογράφηση των χωρικών και χρονικών συνιστωσών της δομής των πληθυσμών. Ακόμη βοηθάει στην περιγραφή της εξέλιξης των ειδών και οδηγεί σε συμπεράσματα αναφορικά με τη προέλευση και τη κατανομή τους, με γνώμονα τη διατήρηση της βιοποικιλότητας. Η μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής αντιμετωπίζει δύο βασικές δυσκολίες. Η πρώτη είναι η τυχαιότητα των γενετικών διαδικασιών ενώ η δεύτερη είναι η πολύπλοκη ιστορία των μεταβαλλόμενων ταξών (Knowles and Maddison, 2002; Knowles, 2004). Ωστόσο, μετά την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων και γενετικών δεικτών, η μελέτη γεωγραφικής ποικιλότητας καθίσταται ευκολότερη. Μοριακός ή γενετικός δείκτης είναι μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA με γνωστή θέση πάνω στο χρωμόσωμα, ο

οποίος είναι πολύ χρήσιμος στη γενετική ανάλυση και στην ταυτοποίηση ατόμων σε έναν πληθυσμό. Ο Watanabe et al. (2005) ανακάλυψε πως τα μοριακά γενετικά χαρακτηριστικά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την κατανόηση της ταξινόμησης του γένους *Anguilla*. Μελετήθηκε η υπομονάδα 16S του ριβοσομικού RNA (16S rRNA) για την ταξινόμηση και την ταυτοποίηση των ειδών (Ayoma et al., 2000b). Ακόμη πραγματοποιήθηκε και ανάλυση των αλληλουχιών της περιοχής που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (COI) (Arai and Wong, 2016). Με την περαιτέρω μελέτη των τεχνικών αυτών θα γίνει δυνατή η ταυτοποίηση με τη χρήση γενετικών χαρακτηριστικών, ανεξαρτήτως του σταδίου ανάπτυξης.

1.11 Γονίδιο COI

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια τα οποία προέρχονται από ελεύθερα προκαριωτικά κύτταρα που εισέβαλαν σε άλλα ευκαρυωτικά και τελικά αφομοιώθηκαν. Πιο αναλυτικά, τα οργανίδια αυτά βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όλων των αερόβιων ευκαρυωτικών κυττάρων και συμβάλλουν κατά ένα μεγάλο βαθμό στην κυτταρική αναπνοή (Russell, 2009). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (mtDNA) είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο που συνήθως περιέχει 16 έως 20 χιλιάδες ζεύγη βάσεων (Brown, 1983; Moritz et al., 1987). Βρίσκεται σε πολλά αντίγραφα στα μιτοχόνδρια και απομονώνεται ευκολότερα από το πυρηνικό DNA. Παράλληλα, είναι απλοειδές μόριο, το οποίο στα ζωικά κύτταρα κληρονομείται αποκλειστικά από το θηλυκό. Έτσι, οι απόγονοι κληρονομούν μόνο έναν mtDNA γενότυπο, γεγονός που βοήθησε στη δημιουργία φυλογενετικών δέντρων, λόγω απουσίας του ανασυνδιασμού. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκε στις αρχικές μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας καθώς και στην ταξινομική και εξελικτική μελέτη των διαφόρων οργανισμών. Ο βασικός ρόλος του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού ήταν να κωδικοποιεί ένα συγκεκριμένο αριθμό RNA

και πρωτεϊνών, αποσκοπώντας στον σχηματισμό ενός λειτουργικού μιτοχονδρίου. Το mtDNA συνεπώς, αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την μελέτη των γενετικών σχέσεων μεταξύ πληθυσμών και ατόμων λόγω της εύκολης απομόνωσής του, της απουσίας ανασυνδυασμού κατά την αντιγραφή του σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA, του μεγάλου αριθμού αντιγράφων, της συντήρησης αλληλουχίας και των διαφορετικών ρυθμών εξέλιξης των διαφορετικών τμημάτων του μορίου.

Προκειμένου να γίνει φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιείται μελέτη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τρεις υπομονάδες (COI,COII,COIII) της κυτοχρωμικής c οξειδάσης, συγκεκριμένα μέσω μιας τεχνικής που ονομάζεται DNA barcoding, όπου συγκρίνει τμήματα του mtDNA της υπομονάδας I του COI, άγνωστων ταξινομικών δειγμάτων. Το ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναπνευστική αλυσίδα των αερόβιων οργανισμών, καθώς θεωρείται βασικό ένζυμο για τον αναερόβιο μεταβολισμό και συμμετέχει στην παραγωγή ATP.

Σε ένα τυπικό μόριο mtDNA ζωικής προέλευσης, τα γονίδια χωρίζονται σε 4 κατηγορίες:

- γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (13 τέτοια γονίδια)
- γονίδια που κωδικοποιούν το ριβοσωμικό RNA (2)
- γονίδια που κωδικοποιούν tRNA (22)
- περιοχή ελέγχου (D-loop), η οποία αποτελεί μια μη κωδική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του DNA καθώς και τη μεταγραφή του RNA (Avisé et al., 1987)

Τα γονίδια του μιτοχονδρίου που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε συνδυασμό με τις υπομονάδες ενζύμων αποτελούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου και προμηθεύουν το καταλυτικό κέντρο με ηλεκτρόνια (Berg et al., 2013). Τα συγκεκριμένα αυτά γονίδια

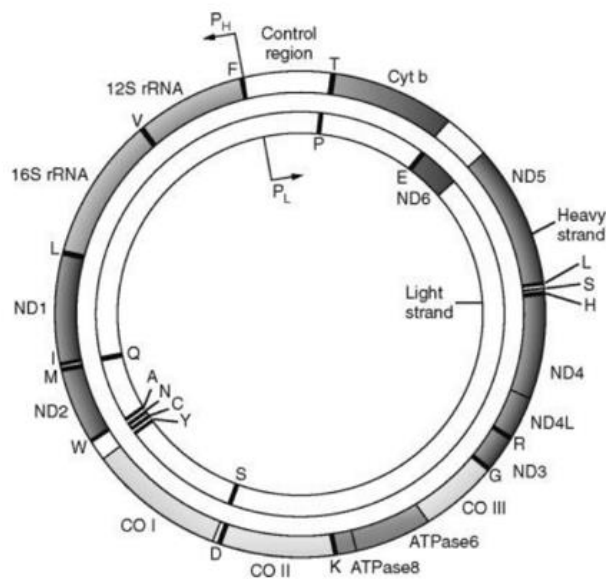
αποτελούνται από επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6), μια άλλη υπομονάδα του κυτοχρώματος b, δυο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP και τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, III) (Moritz et al., 1987).

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται όλο και πιο συχνά για την μελέτη συγγενών αγνώστων οργανισμών και ταυτοποίησής τους. Η υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης είναι ένα ταχέως εξελισσόμενο γονίδιο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, που αποτελεί έναν πολύ καλό μοριακό δείκτη, ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες γενετικής διαφοροποίησης και εύρεσης φυλογεωγραφικών προτύπων τόσο σε ενδοειδικό επίπεδο όσο και μεταξύ συγγενικών ειδών (Ros and Breeuwer, 2007; Lewis et al., 2005; Avise, 2000; Maslov et al., 1999). Η χρήση του COI είναι εξαιρετικά διαδεδομένη και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά είδη θηλαστικών, ιχθύων (Gkafas et al., 2015), φυτών (Kress et al., 2005), νηματωδών (Sofie Derycke et al., 2010) καθώς και σε βακτήρια και μύκητες (Lebonah et al., 2014).

Πλεονεκτήματα χρήσης του γονιδίου COI:

- i. Ο αριθμός των αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) στα κύτταρα υπερβαίνει κατά ένα σημαντικό βαθμό τα αντίγραφα του πυρηνικού DNA.
- ii. Το mtDNA έχει μελετηθεί και χαρακτηριστεί πολύ περισσότερο από το πυρηνικό (Hagelberg, 1994).
- iii. Το mtDNA είναι απλοειδές και σε συνδυασμό με την απουσία ανασυνδυασμού δεν παρατηρούνται διαφοροποιήσεις, εκτός και αν σημειωθούν μεταλλάξεις (Hagelberg, 1994; Birky, 2001).

- iv. Καθώς το mtDNA κληρονομείται μητρικά, κάθε άτομο έχει πανομοιότυπο μιτοχονδριακό DNA με το αντιστοιχο της μητέρας του (εξάιρεση αποτελούν οι πιθανες μεταλλάξεις).
- v. Το mtDNA εξελίσσεται με 5 εως 10 φορές πιο γρήγορους ρυθμούς από το πυρηνικό DNA (Wilson et al., 1985| Meyer, 1993).
- vi. Λόγω της απλής γενετικής του δομής, η επεξεργασία του στο εργαστήριο καθίσταται ιδιαίτερα εύκολη και σε αυτό συμβάλλει το μικρό του μέγεθος
- vii. Η περιοχή της αλληλούχησης του γονιδίου COI είναι απλή και δεν δημιουργούνται κενά.



Εικόνα 1.8 Παράδειγμα γονιδιώματος μιτοχονδρίου.

Σκοπός

Σκοπός της προκειμένης εργασίας ήταν να γίνει η πληθυσμιακή ανάλυση της γενετικής του είδους *A. anguilla* στη Μεσόγειο Θάλασσα έτσι ώστε να επιτευχθεί η κατανόηση των παραγόντων της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των ατόμων. Σύμφωνα με την

βιβλιογραφία, η κατανομή του ευρωπαϊκού χελιού περιορίζεται σε περιοχές θερμών ρευμάτων και λόγω της παγκόσμιας μετανάστευσης για αναπαραγωγή σε συγκεκριμένο σημείο θα περίμενε κανείς γενετική ομοιογένεια των πληθυσμών.

Οπότε, η παρούσα εργασία θα αναλύσει:

- α) εάν υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων περιοχών
- β) κατά πόσο το ευρωπαϊκό χέλι είναι πανμικτικό είδος
- γ) εάν μπορούν να συσχετιστούν τα ωκεανογραφικά στοιχεία με τη γενετική δομή των πληθυσμών στη Μεσόγειο θάλασσα και στον Ατλαντικό.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη συγκεκριμένη επιστημονική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 10 χέλια του είδους *Anguilla anguilla*, τα οποία αλιεύθηκαν από το Ιόνιο πέλαγος. Όλα τα δείγματα ήταν αποθηκευμένα στους -20°C μέχρι την διεξαγωγή της έρευνας. Στις αναλύσεις συμπεριελήφθησαν και αλληλουχίες της περιοχής COI, οι οποίες υπήρχαν ήδη στη βάση δεδομένων *ncbi*. (GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Ημερομηνία τελευταίας πρόσβασης: 30 Αυγούστου 2023). Οι αλληλουχίες απομονώθηκαν από 9 διαφορετικές χώρες και συγκεκριμένα από την Αίγυπτο, την Αγγλία, την Γερμανία, την Σουηδία, την Τουρκία, την Ιταλία, την Τσεχία, την Πορτογαλία και από το Β. Αιγαίο.



Εικόνα 2.1 Περιοχή δειγματοληψίας (google maps)

2.1 Λήψη Δειγμάτων

Το πειραματικό μέρος την διατριβής πραγματοποιήθηκε την περίοδο Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου 2022. Η έναρξη του πειράματος έγινε στις 10/11/2022 στο Εργαστήριο Γενετικής του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν όλοι οι κανόνες ορθής εργαστηριακής πρακτικής. Στη συγκεκριμένη επιστημονική έρευνα τα δείγματα συλλέχθηκαν από 10 άτομα του είδους *Anguilla anguilla*.

Για την λήψη των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Τσιμπίδα
- Νυστέρι
- Αλκοόλη
- Απεσταγμένο νερό
- Αναπτήρας
- Τρυβλίο Petri
- Eppendorf tubes

Αφού τα χέλια ξεπαγώσουν αφαιρείται ένα μακρόστενο τμήμα από τη σάρκα του κάθε ατόμου καθώς και ένα πολύ μικρότερο που θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση του DNA. Στο τέλος της διαδικασίας τα χέλια τοποθετούνται σε ειδικά αριθμημένα σακουλάκια και επιστρέφονται στην κατάψυξη. Όλα τα εργαλεία αποστειρώνονται με τη χρήση απιονισμένου νερού, αλκοόλης (OH) και φωτιάς, κατά τη διάρκεια της λήψης των δειγμάτων.

Σε κάθε ένα από τα χέλια αντιστοιχούν 2 σειρές δειγματοληψίας ιστού, για να γίνει έλεγχος και επιλογής της καταλληλότερης ποιότητας ιστού, σύμφωνα με την ποιότητα και ποσότητα του εξαγμένου DNA.

Τα πρώτα 10 αριθμήθηκαν ως 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ενώ τα επόμενα 10 ως 2I₁, 2I₂, 2I₃, 2I₄, 2I₅, 2I₆, 2I₇, 2I₈, 2I₉, 2I₁₀.

- Στα δείγματα 1,2,3...10 τοποθετήθηκε ένα πολύ μικρό κομμάτι από τη σάρκα τους, το οποίο τεμαχίστηκε με το νυστέρι σε μικρότερα κομμάτια πάνω σε τρυβλίο Petri ώστε να επιτευχθεί η λύση του ιστού και να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή του DNA.
- Στα δείγματα 2I₁, 2I₂, 2I₃ ... 2I₁₀ τοποθετήθηκαν μεγαλύτερα κομμάτια από την σάρκα των χελιών.

2.2 Απομόνωση DNA

Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του γενετικού υλικού:

- Ψαλίδι
- Νυστέρι
- Λαβίδα
- Eppendorf tubes(1,5ml)
- Falcon tubes(15ml)
- Ζυγός ακριβείας
- Πιπέτες (2-20μl, 20-200μl, 100-1000μl)
- Ρύγχη (tips)

Η απομόνωση του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας μια τροποποιημένη μέθοδο (Exadactylos, 1997), της κλασσικής φαινόλης/χλωροφορμίου (Miler et al., 1988).

Ρόλος αντιδραστηρίων

Tris-HCl: βάση με υψηλό pH (10-11). Αποσκοπεί στη μείωση του pH του διαλύματος στο 7-8 (ιδανική τιμή pH). Το pH>7 απαιτείται ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδατική φάση λόγω του αρνητικού φορτίου.

NaCl: λόγω διαφορετικής όσμωσης προκαλείται διάσπαση του DNA και συγκεκριμένα διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών όπου μέσα σε αυτές υπάρχουν ελεύθερες ρίζες κατιόντων Ca, Mg.

EDTA: Δεσμεύει τα κατιόντα Ca και Mg και σπάει τις κυτταρικές μεμβράνες.

SDS: ιονικό απορρυπαντικό το οποίο διασπά την πυρηνική μεμβράνη. Όταν έρχεται σε επαφή με το νερό δημιουργείται ένα μυκίλιο. Στο υδρόφοβο τμήμα κολλάνε τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, ενώ στο υδρόφιλο τμήμα κολλάει το νερό.

Πρωτεϊνάση-K: Αντιδρά με τα ελεύθερα ένζυμα τα οποία λειτουργούν ως άμυνα του οργανισμού. Έτσι επιτυγχάνεται η λύση του DNA μέσω της μετουσίωσης των ιστονών. (αποθήκευση στους -20°C)

Φαινόλη: αποδιατακτικός παράγοντας. Δεσμεύει το EDTA, το SDS και τις αποδομημένες πρωτεΐνες εκτός από το DNA

Χλωροφόρμιο/ισομυλική αλκοόλη (24:1) : Το χλωροφόρμιο είναι οργανικός πτητικός παράγοντας ο οποίος προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών και βοηθά στην απομάκρυνση της φαινόλης.

Τα βήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Μικρά κομμάτια ιστού $\approx 0,01\text{g}$ τοποθετούνται σε αποστειρωμένα Eppendorf με σήμανση 1, 2, 3, 4...10
2. Μέσα στα Eppendorf προστέθηκαν:

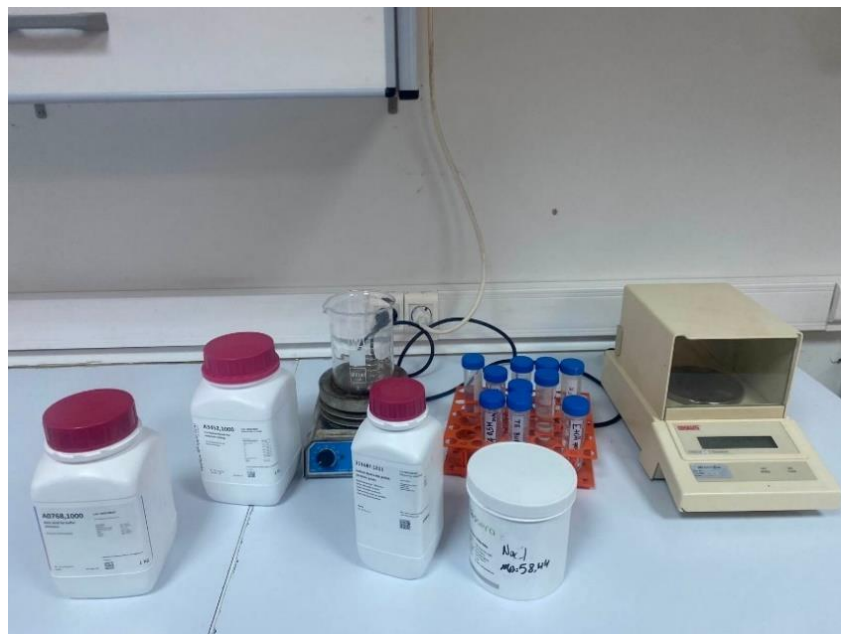
- 500 μl TNE Buffer (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA). Το TNE παρασκευάστηκε στο εργαστήριο
 - 80μl SDS περιεκτικότητας 10% v/v
 - 10μl Πρωτεϊνάση K (ProteinaseK) συγκέντρωσης 20mg/ml
3. Τα Eppendorf τοποθετήθηκαν για επώαση στο υδατόλουτρο στους 60°C για όλο το βράδυ για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες και να διασπαστεί ο ιστός.
 4. Προσθήκη 300μl φαινόλης
 5. 300μl χλωροφόρμιο/ισομυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1
 6. Ανάδευση για 10 λεπτά
 7. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές το λεπτό στους 4°C για να γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων.
 8. Λήφθηκε η υπερκείμενη φάση, τοποθετήθηκε σε νέα Eppendorf και προστέθηκαν 600μl χλωροφορμίου-ισομυλικής αλκοόλης (24:1).
 9. Ανάδευση για 10 λεπτά
 10. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές
 11. Με το τέλος της φυγοκέντρησης λήφθηκε ξανά η υπερκείμενη φάση (περίπου 500μL και τοποθετήθηκε σε νέα Eppendorf
 12. Προστέθηκαν 1000 μl EtOH 100% και 15μl οξικό νάτριο 3M
 13. Κατάψυξη στους -20 °C για 30 λεπτά
 14. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές
 15. Αφαιρέθηκε η περίσσεια αλκοόλης
 16. Προστέθηκαν 200 μL παγωμένης αιθανόλης 70%
 17. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές
 18. Αφαίρεση περίσσειας αιθανόλης

19. Τα Eppendorf τοποθετούνται σε κλίβανο (θερμομπλοκ) με ανοιχτό καπάκι
ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.

20. Τέλος προστέθηκαν 50μL TE buffer



Εικόνα 2.2 Στιγμιότυπο από την τοποθέτηση των δειγμάτων στην φυγόκεντρο



Εικόνα 2.3 Στιγμιότυπο κατά την παρασκευή TNE Buffer.



Εικόνα 2.4 Υδατόλουτρο στους 60 °C.



Εικόνα 2.5 Kapa Biosystems Kit



Εικόνα 2.6 Τοποθέτηση των Eppendorf σε κλίβανο (θερμομπλοκ) για την εξάτμιση της αιθανόλης.

2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Για να γίνει η ανίχνευση της ποιότητας και της ποσότητας του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκε η κλασσική μέθοδος της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE buffer (Tris-HCl, Boric acid, EDTA).

Τα βήματα είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 0,8g αγαρόζης σε κωνική φιάλη (ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας)
2. Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάστηκε με τη προσθήκη 100 mL διαλύματος TBE συγκέντρωσης 1X.
3. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως και να ομογενοποιηθεί
4. Αφού πέσει η θερμοκρασία του διαλύματος προστέθηκαν 3μL βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide) και γίνεται ανάδευση του διαλύματος.
5. Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση του διαλύματος και απλώνεται στο εκμαγείο (πλάκα ηλεκτροφόρησης) με τα χτενάκια ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων (πηγαδάκια).
6. Αφού κρυώσει το διάλυμα και πήξει η αγαρόζη, αφαιρούνται προσεχτικά τα χτενάκια σχηματίζοντας έτσι τα πηγάδια στα οποία φορτώνονται τα δείγματα.
7. Στο κάθε πηγάδι τοποθετείται περίπου 5 μL DNA και 1μl το μπλε της βρομοφαινόλης (bromophenol blue).
8. Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται σε παροχή τάσης για 30 λεπτά
9. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε φωτογραφική μηχανή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και γίνεται λήψη της εικόνας του πηκτώματος.



Εικόνα 2.7 Ζυγός ακριβείας.



Εικόνα 2.8 Στιγμιότυπο από τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 2.9 Στιγμιότυπο από τη λήψη των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης μέσω της φωτογραφικής μηχανής υπεριώδους ακτινοβολίας UV.

2.4 PCR

2.4.1 Primer

Στη συγκεκριμένη μελέτη ο εκκινητής (primer) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Universal COI Primer (Folmer et al., 1994).



Universal COI Primer

F: 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'

R: 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'

Εικόνα 2.10 Universal COI Primer (Forward & Reverse)

2.4.2. Master Mix

Για τη πραγματοποίηση της PCR δημιουργήθηκε ένα MasterMix. Για την κατασκευή του mastermix χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια με τις παρακάτω συγκεντρώσεις πολλαπλασιασμένες επί τον αριθμό των δειγμάτων.

Πίνακας 2.2 Υπολογισμός συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων για την παρασκευή MasterMix.

Buffer	5μl x12
MgCl ₂	2μl x12
dNTP's	0,2 μl x12
TaqPI	0,2 μl x12
H ₂ O	8,6 μl x12
Primer F (Forward)	1,5 μl x12
Primer R (Reverse)	1,5 μl x12

Σε κάθε ένα από τα 10 Eppendorf προστέθηκε 1 μl DNA καθώς και 19μl μίγματος των παρακάτω αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιήθηκαν 2 τυφλά τα οποία είναι αριθμημένα ως I₁₁ και I₁₂, τα οποία περιέχουν μόνο 19μl του μίγματος χωρίς DNA ώστε να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις.

2.4.3 PCR Gradient

Για τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας για τον primer έγινε χρήση PCR διαβαθμισμένης θερμοκρασίας (Gradient PCR). Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν από τους 48-60°C.

Συγκεκριμένα, η κατανομή της θερμοκρασίας στις θέσεις της PCR ήταν:

Πίνακας 2.1 Θέσεις κατανομής της θερμοκρασίας στην PCR.

Θέσεις	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Θερμοκρασία (°C)	48	48,2	48,9	50,1	51,6	53,6	55,9	58	59,6	60,9	61,6	62

Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν:

- 48°C (θέση 1)
- 50,1°C (θέση 4)
- 59,6 °C (θέση 9)
- 60,9 °C (θέση 10)

Τα στάδια ήταν τα εξής:

1. 95°C για 15 min
2. 95°C 40 s
3. 48°C 30 s
4. 72°C για ενα 30 s
5. επανάληψη 2, 3, 4 x30 φορές
6. 72 °C για 15 min
7. 10 °C για να διατηρηθούν



Εικόνα 2.11 Θερμικός κυκλοποιητής Bioer Gene Explorer

2.5 Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης TBE 1,2%

1. Μέτρηση 100ml TBE σε ογκομετρικό σωλήνα.
2. Ζύγισμα αγαρόζης σε ζυγό ακριβείας 1,2 g agarose.
3. Ανάδευση και διάλυση της αγαρόζης στον ογκομετρικό σωλήνα.
4. Θέρμανση στον φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά μέχρι το μίγμα να γίνει διαυγές.
5. Προσθήκη 5μl βρωμιούχου αιθιδίου στα 100ml.
6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
7. Ψυγείο μέχρι να στερεοποιηθεί.
8. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα που προέκυψαν από τη PCR.
Χρησιμοποιήθηκαν 8μl από το τελικό προϊόν της PCR και 2 μl χρωστική bromophenol blue.
9. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε 1μl ladder 100bp.
10. Τοποθέτηση του gel στο μπάνιο ηλεκτροφόρησης.
11. Παρατήρηση των αποτελεσμάτων κάτω από την λάμπα UV.

Τα προϊόντα της PCR στάλθηκαν σε μια ειδική εταιρία για προσδιορισμό της Αλληλουχίας.

2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Fabox

Το Fabox είναι μια συλλογή απλών και εύχρηστων υπηρεσιών που επιτρέπουν σε βιολόγους και ερευνητές να εκτελούν διεργασίες που σχετίζονται με δεδομένα αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό διευκολύνει στην εξαγωγή, επεξεργασία και αντικατάσταση αλληλουχιών καθώς και στη σύνδεση ή τη διαίρεση συνόλων δεδομένων. (<https://users-birc.au.dk/palle/php/fabox/>)

Ali view

Η στοίχιση αποσκοπεί στον προσδιορισμό των ομόλογων θέσεων των αλληλουχιών. Βάση αυτών των διαφορών υπολογίζονται οι εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη αλληλουχιών. Συνεπώς, η στοίχιση των αλληλουχιών είναι μια διαδικασία ζωτικής σημασίας για την εύρεση των πραγματικών φυλογενετικών σχέσεων των υπό εξέταση ταξινομικών μονάδων (Gatesy et al., 1993; Collins et al., 1994a; Wheeler et al., 1995; Baker & DeSalle, 1997; Simmons and Ochoterenam, 2000).

Η στοίχιση των αλληλουχιών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη για τα άτομα του είδους *A. Anguilla* πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Ali view (www.github.com/AliView). Είναι ένα πρόγραμμα προβολής, επεξεργασίας και ευθυγράμμισης για μεγάλα σύνολα δεδομένων και είναι ίσως ένα από τα πιο γρήγορα και εύκολα στη χρήση. Χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να γίνει η ευθυγράμμιση και η στοίχιση των αλληλουχιών. Γίνεται ο υπολογισμός της αντιστοιχίας των ομοιοτήτων και των διαφορών μεταξύ αλληλουχιών. Χρησιμοποιώντας το κριτήριο ομοιότητας, οι αλληλουχίες που βρέθηκαν από το ncbi αντιστοιχήθηκαν ώστε να γίνει η καταγραφή

γονιδίων με ομοιότητα 97-100%. Εξαιρέθηκε ένα μέρος του αρχικού και τελικού τμήματος εξαιτίας του διαφορετικού μήκους των τμημάτων. Αυτό οφείλεται στα διαφορετικά σημεία έναρξης και λήξης κατά τη διαδικασία της αλληλούχισης. Το τελικό σύνολο των στοιχισμένων νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στις περαιτέρω αναλύσεις μειώθηκε από τις 98 αλληλουχίες στις 55.

Arlequin

Προκειμένου να διερευνηθεί η ενδοπληθυσμιακή και η διαπληθυσμιακή ποικιλότητα των υπό μελέτη πληθυσμών, πραγματοποιήθηκε Ανάλυση της Μοριακής Διακύμανσης AMOVA-Analysis of Molecular Variance με τη χρήση του προγράμματος Arlequin v 3.5.2.2. Με αυτό το πρόγραμμα έγινε έλεγχος των πληθυσμιακών αποκλίσεων του είδους.

Η τιμή F_{ST} είναι δείκτης γενετικής παραλλακτικότητας και υποδηλώνει το επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης εντός του πληθυσμού, ανά ζεύγη και ορίζεται ως η μείωση στην ετερωζυγωτία σε έναν υποπληθυσμό λόγω μη τυχαίας διασταύρωσης σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (Gonzalez- Candelas and Palacios, 1995).

(<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>)

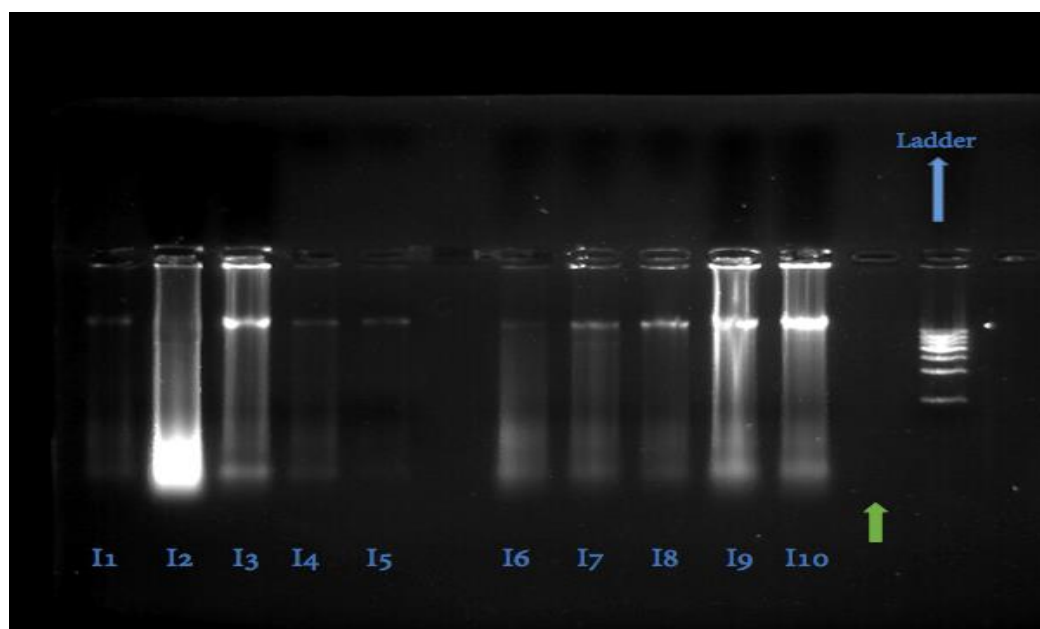
Pop art

Με το πρόγραμμα pop art σχεδιάστηκαν η πίτες οι οποίες οπτικοποιούν την ομαδοποίηση των απλότυπων στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές.

(<https://popart.maths.otago.ac.nz/>)

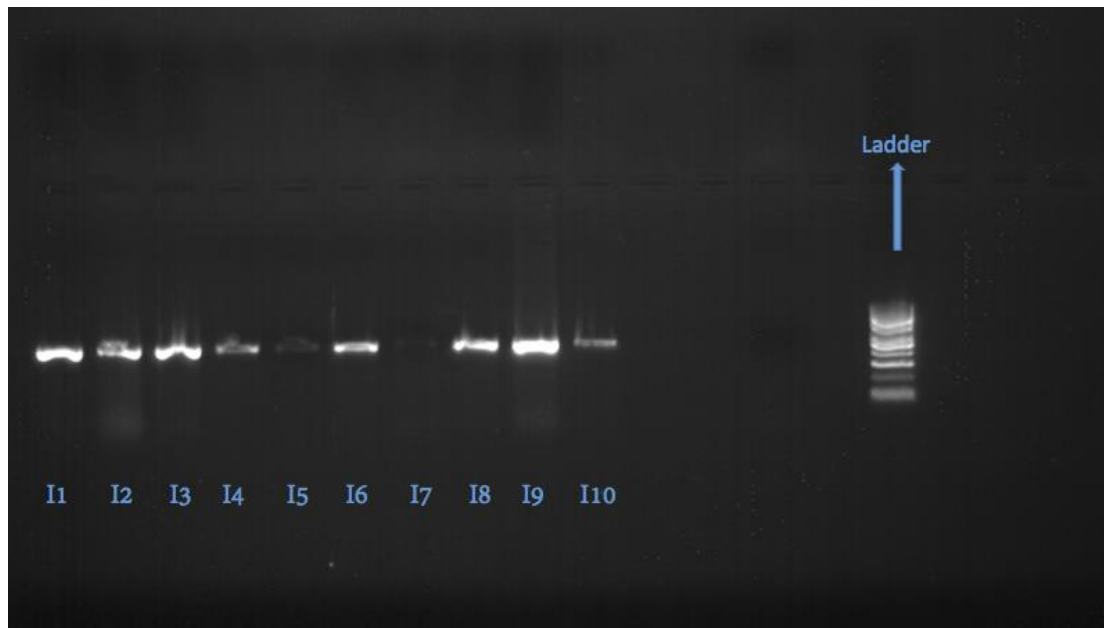
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ηλεκτροφόρηση



Εικόνα 3.1 Απομόνωση DNA (DNA extraction).

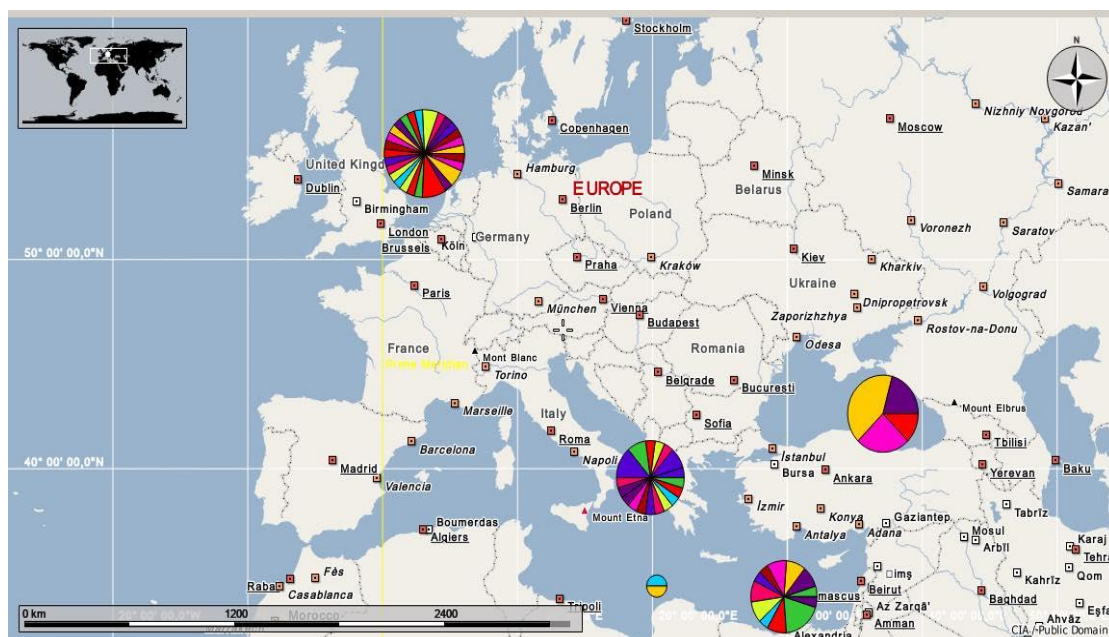
Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται η απεικόνιση των αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης μετά την εξαγωγή DNA μέσω της κάμερα UV. Το DNA που απομονώθηκε ήταν αρκετά ικανοποιητικό τόσο ποιοτικά και όσο και ποσοτικά. Πάνω στην φωτογραφία αναγράφονται τα δείγματα I1-I10 τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Με μπλε βέλος υποδεικνύεται ο ladder, με μοριακό βάρος 100Kb, ενώ με πράσινο το τυφλό δείγμα. Σε αυτήν την εικόνα, οι ζώνες ίσως δεν ήταν έντονες εξαιτίας του κατακερματισμού του DNA. Το δεύτερο πρωτόκολλο που ακολούθησε έδωσε τα καλύτερα και πιο σταθερά αποτελέσματα.



Εικόνα 3.2 Αποτέλεσμα της PCR

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε PCR, με την οποία πολλαπλασιάστηκε τμήμα της υπομονάδας κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Στην εικόνα φαίνεται το αποτέλεσμα της PCR μετά από gel ηλεκτροφόρησης μέσω της κάμερας UV. Αναγράφονται στις διαδρομές 1 έως 10 τα προϊόντα της PCR από τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν. Το μπλε βέλος στην 15η διαδρομή υποδεικνύει τον ladder. Η χρήση των “universal primers” απλοποιεί κατά πολύ την εφαρμογή της τεχνικής της PCR. Βρέθηκε ότι τελικά, η βέλτιστη θερμοκρασία για τον universal COI primer είναι στους 60°C. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση DNA (sequencing) των προϊόντων της PCR όλων των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη.

3.2 Κατανομή απλότυπων ανά γεωγραφική περιοχή



Εικόνα 3.3 Διανομή των δειγμάτων *Anguilla anguilla* στη Μεσόγειο θάλασσα.

Με την χρήση του προγράμματος popART σχεδιάστηκαν οι πίτες οι οποίες δείχνουν την ομαδοποίηση των απλότυπων στις γεωγραφικές περιοχές από τις οποίες προέρχονται. Όπως φαίνεται στην εικόνα, στη Βόρεια Ευρώπη η ομαδοποίηση είναι μικρή, καθώς από την πίτα φαίνεται πως υπάρχει μεγάλη γενετική ποικιλότητα εξαιτίας του αριθμού των απλότυπων. Επίσης, στο Ιόνιο πέλαγος όπως και στην ΝότιοΑνατολική Μεσόγειο, η γενετική ποικιλομορφία είναι πολύ μεγάλη. Αντιθέτως στην Ανατολική Ευρώπη και στη Νότια Μεσόγειο φαίνεται να υπάρχει σχετική ομοιογένεια των απλοτύπων. Πιο αναλυτικά, στον παρακάτω πίνακα φαίνονται απλότυποι και ο αριθμός ατόμων ανά απλότυπο.

Πίνακας 3.1 Απλότυποι, αριθμός ατόμων ανά απλότυπο και πληθυσμός προέλευσης των ατόμων του είδους *A. anguilla*.

Απλότυπος	Γ. Μήκος	Γ. Πλάτος	Περιοχή προέλευσης	Αριθμός ατόμων N/απλότυπο
Seq_1	55.332738,	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	1
Seq_2	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1
Seq_3	54.663417	38.993636	Τσεχία	1
Seq_4	54.663417	38.993636	Τσεχία	1
Seq_5	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	2
Seq_6	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1
Seq_7	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_8	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	1
Seq_9	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	1
Seq_10	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	1
Seq_11	40.125057	24.701876	Βόρειο Αιγαίο	1
Seq_12	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_13	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	1
Seq_14	41.332372	10.809981	Ιταλία	5
Seq_14	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_15	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_15	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	2
Seq_16	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	2
Seq_17	36.504803	34.961465	Τουρκία	5
Seq_18	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_19	54.420260	6.863096	Γερμανία	2
Seq_20	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	1
Seq_21	36.504803	34.961465	Τουρκία	10
Seq_22	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_23	40.125057	24.701876	Βόρειο Αιγαίο	1
Seq_24	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	2
Seq_25	33.63.139733	20.319205	Πορτογαλία	1
Seq_26	36.504803	34.961465	Τουρκία	6
Seq_27	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο βασίλειο	1
Seq_28	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο βασίλειο	1
Seq_29	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο βασίλειο	1
Seq_30	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_31	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_32	54.663417	38.993636	Τσεχία	2
Seq_33	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	1
Seq_34	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	1
Seq_35	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	1
Seq_36	54.663417	38.993636	Τσεχία	1
Seq_36	40.125057	24.701876	Βόρειο Αιγαίο	2
Seq_36	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_37	40.125057	24.701876	Βόρειο Αιγαίο	1

Seq_37	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	2
Seq_38	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	1
Seq_39	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_40	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_41	33.63.139733	20.319205	Πορτογαλία	1
Seq_42	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	2
Seq_42	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	1
Seq_43	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_44	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	1
Seq_45	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_46	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	2
Seq_46	40.125057	24.701876	Βόρειο Αιγαίο	1
Seq_46	36.504803	34.961465	Τουρκία	3
Seq_46	55.332738	-0.166609	Ηνωμένο Βασίλειο	2
Seq_47	54.420260	6.863096	Γερμανία	1
Seq_48	33.023660	29.746837	Αίγυπτο	4
Seq_49	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1
Seq_50	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1
Seq_51	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1
Seq_52	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1
Seq_53	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1
Seq_54	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1
Seq_55	38.993636	19.713254	Ιόνιο	1

Ο απλότυπος που εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι το Seq_21 ο οποίος εμφανίζεται 10 φορές στην Τουρκία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο απλότυπος Seq_46 ο οποίος εμφανίζεται σε 8 άτομα από 4 διαφορετικούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, 1 άτομο από Βόρειο Αιγαίο, 3 άτομα από Τουρκία, 2 άτομα από Ηνωμένο Βασίλειο και 1 άτομο από Γερμανία. Επίσης αξίζει να αναφερθούν οι απλότυποι:

Seq_14: ο οποίος εμφανίζεται σε 6 άτομα από 2 διαφορετικούς πληθυσμούς. Περιλαμβάνει 5 άτομα από Ιταλία και 1 άτομο από Γερμανία

Seq_15: 3 άτομα από 2 διαφορετικούς πληθυσμούς (1 άτομο από Γερμανία και 2 από Αίγυπτο).

Seq_36: 4 άτομα από 3 διαφορετικούς πληθυσμούς. (1 Τσεχία, 2 Βόρειο Αιγαίο, 1 Γερμανία).

Seq_37: 3 άτομα από 2 διαφορετικούς πληθυσμούς (2 άτομα Αίγυπτο, 1 Βόρειο Αιγαίο).

Και Seq_42: 3 άτομα από 2 διαφορετικούς πληθυσμούς (2 άτομα Αίγυπτο, 1 Ηνωμένο Βασίλειο).

Αξίζει να σημειωθεί ότι 47 από τους 55 απλοτύπους είναι μοναδικοί είτε για έναν ολόκληρο πληθυσμό είτε μοναδικοί για κάποια άτομα ενός πληθυσμού.

3.3 Στατιστική ανάλυση

Πίνακας 3.2 Ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA). (FST = διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών).

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation (%)	Fixation Indices	P-value
Among groups	2	100.922	-2.30189 Va	-9.76	FCT:- 0.09756	0.84066±0.01032
Among population	7	772.533	10.31102Vb	43.70	FSC:0.39816	<0.001
Within groups						
Within populations	88	1371.545	15.58574 Vc	66.06	FST:0.33944	<0.001
Total	97	2245.000	23.59486			

Η παραλλακτικότητα ανάμεσα στις περιοχές που μελετήθηκαν, μεταξύ των πληθυσμών και μεταξύ των πληθυσμών μέσα σε κάθε περιοχή υπολογίστηκε από την στατιστική ανάλυση AMOVA.

Στον παραπάνω πίνακα, ο οποίος δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Arlequin, παρουσιάζονται τα ποσοστά παραλλακτικότητας και φαίνεται ο βαθμός γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών.

Παρατηρήθηκε ότι μόνο το 43.70% της συνολικής γενετικής ποικιλότητας οφείλονταν σε διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, ενώ το σημαντικότερο ποσοστό 66.06%

οφείλονταν σε διαφορές ενδοπληθυσμιακά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο δείκτης FST είναι ίσος με 0,3394, με $p\text{-value} < 0,001$, άρα υπάρχει γενετική διαφοροποίηση.

Πίνακας 3.3 Population pairwise FSTs.

	EGYPT	IONIO	NORTH AEGEAN	TURKEY	ITALY	PORTUG AL	UK	SWEDEN	CZECH REPUBLIC
IONIO	0.35850								
NORTHAEGEAN	0.29835	0.78548							
TURKEY	0.48668	0.86672	0.40639						
ITALY	0.24478	0.75985	0.10700	0.49514					
PORTUGAL	-0.06165	0.68930	-0.38462	0.41946	0.27273				
UK	0.20347	0.44427	0.06140	0.31722	0.01041	-0.58422			
SWEDEN	0.18220	0.73681	0.16587	0.55165	0.46043	-1.00000	-0.09743		
CZECH REPUBLIC	0.30787	0.75952	0.20551	0.60171	0.19228	-0.21277	0.11455	0.18374	
GERMANY	0.25918	0.56168	-0.06088	0.16469	-0.14098	-0.81998	0.01524	-0.21445	0.00787

Η παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών ανά ζεύγη μελετήθηκε με την ανάλυση του δείκτη FST, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.3. Η μεγαλύτερη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών της Τουρκίας και του Ιονίου, καθώς εμφανίστηκαν υψηλές τιμές FST (0.86672), ενώ η μικρότερη γενετική παραλλακτικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ της Τσεχίας και την Γερμανίας (0.00787). Αρνητικές τιμές εμφανίζονται μεταξύ της Πορτογαλίας και των περιοχών της Αιγύπτου (-0.06165), του Βόρειου Αιγαίου (-0.38462), της Αγγλίας (-0.58422), της Σουηδίας (-1.00000), της Τσεχίας (-0.21277), της Γερμανίας (-0.81998), μεταξύ της Αγγλίας με την Σουηδία (-0.09743), μεταξύ της Ιταλίας και της Γερμανίας (-0.14098) και τέλος μεταξύ της Σουηδίας και Γερμανίας (-0.21445).

Άλλες στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών παρουσιάζουν οι περιοχές του Ιονίου με το Βόρειο Αιγαίο (0.78548), του Ιονίου με την Ιταλία (0.75985) και του Ιονίου με την Τσεχία (0.75952).

Πίνακας 3.4 FST p-values

	EGYPT	IONIO	N.AGEAN	TURKEY	ITALY	PORTUGAL	UK	SWEDEN	CZECH REPUBLIC
Ionio	<0.001								
NORTH AEGEAN	<0.05	<0.001							
TURKEY	<0.001	<0.001	<0.001						
ITALY	ns	<0.001	ns	<0.001					
PORTUGAL	ns	ns	ns	ns	ns				
UK	<0.001	<0.001	ns	<0.001	ns	ns			
SWEDEN	ns	<0.05	<0.05	<0.05	ns	ns	ns		
CZECH REPUBLIC	<0.01	<0.001	<0.05	<0.001	ns	ns	<0.05	<0.05	
GERMANY	<0.01	<0.001	ns	<0.001	ns	ns	ns	ns	ns

Significance Level $\alpha=0.05$

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη επιστημονική έρευνα αποτελεί αντικείμενο μελέτης της πληθυσμιακής γενετικής του Ευρωπαϊκού χελιού στη Μεσόγειο θάλασσα με τη χρήση και την απομόνωση της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (COI). Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η γενετική ποικιλομορφία και δομή του είδους μεταξύ 10 διαφορετικών πληθυσμών. Η γενετική δομή του Ευρωπαϊκού χελιού *A. anguilla* έχει αναλυθεί διεξοδικά σε πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο, η ερμηνεία των παραγόντων που καθορίζουν την χωροχρονική γενετική δομή είναι δύσκολη λόγω του πολύπλοκου κύκλου ζωής αυτού του είδους. Οι γενετικοί μοριακοί δείκτες έχουν εξελιχθεί σε ισχυρά εργαλεία για την ανάλυση των γενετικών σχέσεων και της γενετικής ποικιλομορφίας. Η χρήση δεδομένων που εξάγονται από αυτούς τους δείκτες, γίνεται όλο και πιο ευρεία στις έρευνες που ασχολούνται με τις υδατοκαλλιέργειες (Davis and Hetzel, 2000; Liu and Cordes, 2004).

Σε αυτήν την μελέτη πραγματοποιήθηκε η απομόνωση της αλληλουχίας της περιοχής που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) από 10 δείγματα του είδους *A. anguilla* τα οποία λήφθηκαν στον ελλαδικό χώρο και συγκεκριμένα στο Ιόνιο πέλαγος. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες γονιδίων από την παγκόσμια βάση δεδομένων.ncbi, οι οποίες προέρχονται από διάφορες χώρες της Μεσογείου. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες που εξετάστηκαν βρέθηκαν από την Αίγυπτο, το Βόρειο Αιγαίο, τη Τουρκία, την Ιταλία, την Πορτογαλία, την Αγγλία, τη Σουηδία, τη Τσεχία και τη Γερμανία. Μετά την απομόνωση του γενετικού υλικού από τμήματα του μυϊκού ιστού πραγματοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης του DNA και στη συνέχεια η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR με τη χρήση του εκκινητή Universal COI Primer. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και το απομονωμένο DNA ήταν καλής

ποιότητας. Ακολούθησε η τεχνική του DNA barcoding, η οποία περιλαμβάνει την σύγκριση ενός τμήματος του μιτοχονδριακού DNA, της υπομονάδας κυτοχρωμικής c οξειδάσης (COI) από ταξινομικά άγνωστα δείγματα με μια βιβλιοθήκη ήδη γνωστών γονιδιωμάτων.

Πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των υπό μελέτη πληθυσμών ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση. Οι πληθυσμοί του είδους ομαδοποιούνται σε 3 γενετικά γκρουπ. Το πρώτο γκρουπ περιλαμβάνει δείγματα από Αίγυπτο, Ιόνιο, Βόρειο Αιγαίο και Τουρκία, το δεύτερο από Ιταλία και Πορτογαλία ενώ το τελευταίο από Αγγλία, Σουηδία, Τσεχία, Γερμανία.

Στον χάρτη της εικόνας 3.3, φαίνεται πως η μικρότερη ομαδοποίηση των απλότυπων και επομένως η μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα εμφανίζεται στη Βόρεια Ευρώπη ενώ η μεγαλύτερη ομοιογένεια στη Νότια Μεσόγειο και στη συνέχεια στην Ανατολική Ευρώπη. Πιο συγκεκριμένα, στον πίνακα 3.1 φαίνεται ότι 47 από τους 55 απλότυπους που χρησιμοποιήθηκαν είναι μοναδικοί, είτε για έναν ολόκληρο πληθυσμό, είτε μοναδικοί για κάποια άτομα ενός πληθυσμού. Κάτι τέτοιο, είναι ενδεικτικό της μεγάλης ποικιλότητας μεταξύ των ατόμων ακόμα και μέσα στον ίδιο τον πληθυσμό. Ο απλότυπος seq_21 είναι αυτός ο οποίος εμφάνισε τη μεγαλύτερη συχνότητα και εμφανίστηκε 10 φορές στην Τουρκία. Και άλλοι απλότυποι έδειξαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς εμφανίζονται σε άτομα από διαφορετικούς πληθυσμούς όπως ο seq_46, ο οποίος εμφανίστηκε σε 8 άτομα από 4 διαφορετικούς πληθυσμούς. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι ίσως υπάρχει κάποια ομοιογένεια στην κατανομή του είδους.

Τα αποτελέσματα της AMOVA όπου πραγματοποιήθηκε η γενετική ανάλυση, έδειξαν ότι το ποσοστό της μοριακής παραλλακτικότητας εντός των πληθυσμών ήταν υψηλότερο (66,06%) από αυτό μεταξύ των πληθυσμών (43,07%). Όσο μεγαλύτερο

είναι το ποσοστό παραλλακτικότητας τόσο περισσότερο διαφέρουν γενετικά οι πληθυσμοί μεταξύ τους. Για την εξαγωγή των συμπερασμάτων σχετικά με την δυναμική των πληθυσμών έλαβε χώρα η εκτίμηση της στατιστικής παραμέτρου F_{ST} . Ο βαθμός γενετικής διαφοροποίησης πληθυσμών αναφέρεται στη διαφοροποίηση της γενετικής τους συγκρότησης και εκφράζεται μέσω αυτού του δείκτη. Η παράμετρος F_{ST} αποσκοπεί στην εκτίμηση της αλληλομορφικής ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών σε σχέση με τη συνολική. Το εύρος των τιμών που μπορεί να λάβει κυμαίνεται μεταξύ του 0 και του 1. Οι τιμές $F_{ST} < 0.05$ δείχνουν αμελητέα γενετική διαφοροποίηση. Τιμή $F_{ST} > 0.15$, θεωρείται σημαντική για την διαφοροποίηση των πληθυσμών (Frankham et al., 2002), καθώς και τιμές μεγαλύτερες από 0.25 υποδηλώνουν πολύ σημαντική διαφοροποίηση στη γενετική συγκρότηση των πληθυσμών (Dorak, 2014). Στη δική μας περίπτωση, ο συντελεστής αυτός ήταν ίσος με 0.33944 ($F_{ST} > 0.25$) ενώ η τιμή p-value είναι < 0.001 . Επομένως, με βάση τα αποτελέσματα της AMOVA, υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στις συχνότητες των αλληλόμορφων μεταξύ των πληθυσμών και υπάρχει μεγάλος βαθμός ανομοιότητας μεταξύ των ατόμων εντός των πληθυσμών.

Επιπλέον έγινε F_{ST} ανάλυση ανά ζεύγη πληθυσμών, η οποία μας αποκάλυψε σημαντική παραλλακτικότητα μεταξύ τους, καθώς εμφανίστηκαν υψηλές τιμές. Στον πίνακα 3.3 εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ της κεντρικής και Ανατολικής Μεσογείου και συγκεκριμένα μεταξύ των πληθυσμών του Ιονίου πελάγους και της Τουρκίας, όσον αφορά το είδος *A. anguilla* και το γονίδιο COI, καθώς εκεί εμφανίστηκε η υψηλότερη τιμή του δείκτη F_{ST} (0.86672). Η μικρότερη τιμή του δείκτη και συνεπώς η μικρότερη γενετική παραλλακτικότητα παρατηρήθηκε μεταξύ της Τσεχίας και της Γερμανίας (0.00787). Όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης ανάμεσα σε δύο περιοχές, τόσο πιο μεγάλη είναι η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ

των πληθυσμών των περιοχών αυτών. Ο εντοπισμός σημαντικών διαφορών στον δείκτη F_{ST} ανά ζεύγη μεταξύ ορισμένων τοποθεσιών υποδηλώνει σχετική απόκλιση από την πανμιξία, αν και είναι πιθανό αυτό το να συνδέεται με τα χαμηλά μεγέθη δειγμάτων σε αυτές τις τοποθεσίες.

Παρόμοια μεθοδολογία (με χρήση μοριακών δεικτών) ακολούθησαν πολλές μελέτες για βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων τους. Σε επιστημονική μελέτη συγκρίθηκαν 500 δείγματα γυαλόχελων, τα οποία συλλέχθηκαν από τον Βισκαϊκό Κόλπο του Βόρειου Ατλαντικού ωκεανού και από τη Δυτική Μεσόγειο, κατά την περίοδο 2001-2003 (Pujolar et al., 2007). Η πληθυσμιακή γενετική έγινε με τη χρήση 10 αλλοενζύμων και 6 μικρο-δορυφόρων τόπων. Παρατηρήθηκε μια σημαντική γενετική διαφοροποίηση χωρίς να υπάρχει χρονική ομαδοποίηση των δειγμάτων. Η συνολική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων στους μικρο-δορυφορικούς τόπους ήταν χαμηλή αλλά εξαιρετικά σημαντική ($F_{ST}=0,003$, $p<0,001$). Τα αποτελέσματα αυτά προκύπτουν από την υψηλή διακύμανση της αναπαραγωγικής επιτυχίας σε διαφορετικές περιόδους ωοτοκίας.

Σε άλλη έρευνα συγκρίθηκαν 1210 ώριμα χέλια γνωστής ηλικίας από τη Μεσόγειο Θάλασσα και τη Βόρεια Ευρώπη (Ιταλία και Βαλτική θάλασσα) με τη χρήση 6 μικροδορυφορικών δεικτών (Palm et al., 2009). Παρά τα μεγάλα μεγέθη των δειγμάτων που αναλύθηκαν δεν παρατηρήθηκε κανένα σημάδι γενετικής διαφοροποίησης ($F_{ST} = -0,00003$, $P=0,61$). Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που βασίζονταν κυρίως σε δείγματα γυαλοχέλων, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική χρονική συνιστώσα γενετικής παραλλαγής. Τα αποτελέσματά υποδηλώνουν ότι το ευρωπαϊκό χέλι θα μπορούσε να θεωρηθεί πανμικτικό είδος, δηλαδή ότι όλα τα ώριμα άτομα ζευγαρώνουν τυχαία ακριβώς στον ίδιο τόπο και χρόνο, κάτι που συμφωνεί με προηγούμενα ευρήματα των Dannewitz et al. (2005) και Pujolar et al. (2007). Επίσης

αναφέρεται, πως είναι πιθανό το σημερινό επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των χελιών από τη βόρεια και τη νότια Ευρώπη να είναι χαμηλότερο από παλιότερα ως αποτέλεσμα μετατοπίσεων γυαλόχελων από τη δυτική Ευρώπη (Βισκαϊκός Κόλπος και Νότια Αγγλία) σε χώρες γύρω από τη Βαλτική Θάλασσα.

Το ερώτημα εάν το είδος αποτελείται από έναν ενιαίο πανμικτικό πληθυσμό έχει μεγάλη σημασία όσον αφορά τη διατήρηση και τη διαχείριση του Ευρωπαϊκού χελιού. Η επίλυση του ερωτήματος αυτού, έχει γίνει ακόμη πιο σημαντική λόγω της δραστηκής μείωσης των ειδών. Η στρατολόγηση έχει μειωθεί σε <5% κυρίως λόγω της υπερεκμετάλλευσης και της καταστροφής των οικοτόπων (van Ginneken and Maes, 2005; Astrom and Dekker, 2007) Ωστόσο, παραμένει ακόμα αβέβαιο εάν το είδος θα πρέπει να χαρακτηρίζεται ως πανμικτικό ή εάν αποτελείται από ανεξάρτητους πληθυσμούς.

Έχουν διεξαχθεί διάφορες μοριακές μελέτες χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τύπους γενετικών δεικτών. Αρχικά, το μιτοχονδριακό DNA παρείχε μια περιορισμένη εικόνα για τη γεωγραφική κατανομή και τη γενετική μεταβλητότητα του είδους και υποστήριξε την εικόνα μιας ενιαίας κοινής γονιδιακής δεξαμενής (Lintas et al., 1998). Το *A. anguilla* θα περίμενε κανείς να αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα πανμιξίας, λόγω της ωοτοκίας στη θάλασσα των Σαργασών και της υπερωκεάνιας μετανάστευσης. Την υπόθεση αυτή επιβεβαίωσαν πολλές μελέτες, οι οποίες χρησιμοποίησαν αλλοένζυμα και μιτοχονδριακό DNA, αφού δεν κατάφεραν να απορρίψουν την πανμιξία (Aviset al., 1998; van Ginneken and Maes, 2005). Αντιθέτως, τα αποτελέσματα που προέκυψαν στη συγκεκριμένη μελέτη δείχνουν υψηλή διακύμανση μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχουν διαφορές κατά την ηπειρωτική κατανομή του ευρωπαϊκού χελιού.

Η θεωρία ενός πανμικτικού πληθυσμού, η οποία βασίζεται σε ωκεανογραφικά (Sinclair, 1988; Tesch, 2003) και γενετικά χαρακτηριστικά, αμφισβητήθηκε από τρεις μελέτες (Daemen et al., 2001; Wirth and Bernatchez, 2001; Maes and Volckaert, 2002). Οι Wirth και Bernatchez (2001), με τη χρήση επτά μικροδορυφόρων, ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν μια χαμηλή αλλά σημαντική γενετική διαφοροποίηση ($F_{ST}=0.0017$; $P=0.0014$), παρέχοντας έτσι στοιχεία κατά της πανμιξίας. Ανίχνευσαν μια σχέση μεταξύ γενετικής και γεωγραφικής απόστασης (IBD), υποδηλώνοντας ένα χωροχρονικό διαχωρισμό των πληθυσμών. Ακόμη, υποστήριξαν ότι τα ωκεάνια ρεύματα προκαλούν διαφορετική και τυχαία κατανομή των προνυμφών με αποτέλεσμα την παρατήρηση γενετικής διαφοροποίησης. (Kettle and Haines, 2006).

Ακόμη, οι Miguel Baltazar-Soares et al. (2016) διερευνώντας την κατανομή της γενετικής διακύμανσης μέσω μικροδορυφόρων, παρατήρησε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των «ασημόχελων» και «γυαλόχελων». Αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν υψηλότερη γενετική διακύμανση μεταξύ των χρονικών παρά των χωρικών διαμερισμάτων του *A. anguilla* (Dannewitz et al., 2005) δηλαδή ότι η γενετική διαφοροποίηση εξαρτάται πιο πολύ από τον χρόνο παρά από τον γεωγραφικό χώρο. Επιβεβαίωσε επίσης, την υπόθεση ότι κάθε ομάδα αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή γενιά. Επομένως, αποκλείει παράγοντες που μπορεί να σχετίζονται με επικαλυπτόμενες γενιές (Cornuet and Luikart, 1996; Waples and Do, 2010).

Οπότε, ένα από τα κύρια συμπεράσματα σχεδόν όλων αυτών των μελετών είναι ότι η χρονική ανάλυση των πληθυσμών είναι πιο σημαντική καθώς δεν υπάρχει σημαντική χωρική γενετική δομή (Dannewitz et al., 2005; Pujolar et al., 2006, 2007, 2009; Palm et al., 2009). Οι Pujolar et al. (2009) καταλήγουν ότι αυτό είναι πιθανή συνέπεια της μεταναστευτικής συμπεριφοράς του ευρωπαϊκού χελιού. Σε κάθε

ωοτοκία η γονική συνεισφορά είναι περιορισμένη, γεγονός που οδηγεί σε ισχυρή γενετική διακύμανση λόγω του περιορισμένου πραγματικού μεγέθους του πληθυσμού. Όπως αναφέρθηκε η πληθυσμιακή γενετική μελέτη έγινε με τη χρήση μιτοχονδριακού DNA, και συγκεκριμένα με το γονίδιο COI. Η ύπαρξη γενετική διαφοροποίησης όσον αφορά το συγκεκριμένο γονίδιο, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι επικρατούν διαφορετικά ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά στις διαφορετικές τοποθεσίες. Εφόσον τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια που συμμετέχουν στη κυτταρική αναπνοή, είναι πιθανό να χρειάζεται η παραγωγή διαφορετικής τριφωσφορικής αδενοσίνης, ανάλογα το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το άτομο.

Γενικά, η χωρική διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι ωκεάνιες συνθήκες, η γεωμορφολογία του πυθμένα της θάλασσας καθώς και άλλες κλιματολογικές και γεωλογικές διεργασίες, επηρεάζουν σημαντικά τη γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών. Όπως ήδη αναφέρθηκε, σε αυτήν την μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ περιοχών της κεντρικής και της Ανατολικής Μεσογείου. Παρόλο που η Μεσόγειος αποτελεί μια ενιαία θαλάσσια λεκάνη, παρατηρούνται μεγάλες διαφοροποιήσεις ανάμεσα στο ανατολικό και στο δυτικό μέρος της. Η ανατολική Μεσόγειος είναι πιο βαθιά και πιο ολιγοτροφική από τη δυτική, λόγω των διαφορετικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών που επικρατούν (Donavaro et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, η ανατολική πλευρά φιλοξενεί πολύ μικρότερο αριθμό ειδών από τη δυτική, καθώς η αυξημένη αλατότητα και θερμοκρασία της ανατολικής Μεσογείου αποτρέπουν την επιλογή εγκατάστασης πολλών οργανισμών που προέρχονται από τα Ατλαντικά νερά. Ακόμη το επιφανειακό νερό που εισέρχεται από τον Ατλαντικό στη Μεσόγειο μέσω του στενού του Γιβραλτάρ, είναι αρκετά φτωχό σε θρεπτικά. Επίσης μεγάλες διαφορές φαίνονται και στην κάθετη κατανομή των ειδών, δηλαδή μεταξύ βορρά και νότου.

Με βάση όλα τα προαναφερθέντα στοιχεία, η μελέτη της πληθυσμιακής κατανομής των χελιών είναι αρκετά απαιτητική, λόγω της μεγάλης γεωγραφικής εξάπλωσης του είδους. Ταξινομούνται πλέον ως σοβαρά απειλούμενο είδος, επομένως είναι ιδιαίτερης σημασίας η συνεχής έρευνα με την επιλογή διαφορετικών δεικτών και την χρήση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, για την κατανόηση της γενετικής σχέσης μεταξύ των πληθυσμών και κατ' επέκταση τη διαχείριση και τη διατήρηση του αποθέματος.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Ελληνική

Γκολομάζου Ε. (2002), Μελέτη της βιολογίας του Ευρωπαϊκού χελιού *Anguilla anguilla* L. στη λιμνοθάλασσα τη Ροδιάς του Αμβρακικού Κόλπου, διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρίπογλου Α. Κωνσταντίνο (2008), Σύγχρονη Εκτροφή του Ευρωπαϊκού χελιού (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758), Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαντζανή Ελευθερία Νίκη (2014) Ανίχνευση μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά tRNA σε ασθενείς με Σαρκοείδωση και Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση, Πτυχιακή εργασία

Νεοφύτου Χ. (2015). Βιολογία χθύων και Θαλάσσιων Θηλαστικών. Σελ.53-57, Θεσσαλονίκη, UNIVERSITY STUDIO PRESS

Νίκη Ι. Ζερβού (2006), Εισβολές Ιχθύων στη Μεσόγειο: Η Υπόθεση του Κενού Οικολογικού Θώκου, Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, (σελ 34-37)

Σπυριδούλα Ζόμπολα (2008), Δυναμική της μετανάστευσης των νεαρών σταδίων του χελιού (*Anguilla anguilla*, L. 1758) στα εσωτερικά νερά της δυτικής Ελλάδας και η αλιευτική του εκμετάλλευση, διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών

Σπύρου Γεωργία (2017), Πειράματα συμπεριφοράς στο ευρωπαϊκό χέλι *Anguilla anguilla* σε μικρά ενυδρεία, Διπλωματική εργασία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

5.2 Ξενόγλωσση

Acou, A., Boury, P., Laffaille, P., Crivelli, A.-J. & Feunteun, E. 2005. Towards a standardized characterization of the potentially migrating silver European eel (*Anguilla anguilla*, L.). *Archiv für Hydrobiologie* 164: 237–255.

- Adomas Ragauskas, Dalius Butkauskas (2013), The formation of the population genetic structure of the European eel *Anguilla anguilla* (L.): a short review
- Alessandro Cresci (2020), A comprehensive hypothesis on the migration of European glass eels (*Anguilla anguilla*)
- Als T. D Handen, M.M Maes G. E. Castonguay M, Riemann L, AarestrupK, Bernatchez L. (2011) All roads lead to home panmixia of European eel in the Sargasso Sea. *Molecular Ecology* 20(7), 1333-1346
- Aoyama J., Tsukamoto K., 1997. Evolution of the Freshwater Eels. *Naturwissenschaften*, 84: 17-21.
- Arai, T., Abdul Kadir, S.R., Chino, N., 2016. Year-round spawning by a tropical catadromous eel *Anguilla bicolor bicolor*.
- Arai, T.; Otake, T.; Jellyman, D. J.; Tsukamoto, K. 1999: Differences in the early life history of the Australasian shortfinned eel, *Anguilla australis* from Australia and New Zealand, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology* 135: 381-389.
- Astrom M. & Dekker, W. (2007). When will the eel recover? A full life-cycle model. *ICES Journal of Marine Science*, 64(7), 1491-1498.
- A James Kettle and Keith Haines (2006) How does the European eel (*Anguilla Anguilla*) retain its population structure during its larval migration across the North Atlantic Ocean?
- Boetius 1. and Boetius J. (1980) Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1, 1-28.

- Boldrin A, Miserocchi S, Rabitti S, Turchetto MM, Balboni V, Socal G (2002) Particulate matter in the southern Adriatic and Ionian Sea: characterisation and downward fluxes. *J Mar Syst* 33-34:389–410
- C. Moritz, T. E. Dowling and W. M Brown (1987) Evolution of animal mitochondrial dna: relevance for population biology and systemics
- C.W. Birky Jr (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models
- Cornuet, J. M., and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001–2014.
- Daemen E, Cross T, Ollevier F, Volckaert F.A.M. Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers. *Mar. Biol.* 2001;139:755–764
- Danovaro, R. et al. 1999. Benthic response to particulate fluxes indifferent trophic environments: a comparison between theGulf of Lions-Catalan Sea (western Mediterranean) and theCretan sea (eastern Mediterranean)
- Davis, G. P. & Hetzel D. J. S. (2000). Integrationnd molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in awuaculture species. *Aquaculture Research*, 31(1), 3-10
- Dannewitz J, Maes GE, Johansson L, Wickstrom H, Volckaert FAM, Jarvi T (2005), Panmixia in the European eel: a matter of time. *Proc Biol Sci* 272: 1129–1137.
- Deelder C.L., 1984. Synopsis Of Biological Data on the eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). FAO Fisheries Synopsis No. 80, Revision 1.

- Desaunay, Y.; Guerault, D. 1997: Seasonal and longterm changes in biometrics of eel larvae: a possible relationship between recruitment variation and North Atlantic ecosystem productivity. *Journal of Fish Biology* 51 (Supplement A): 317-339.
- Emilius Aalto, Fabrizio Capoccioni, Juan Terradez Mas, Marcello Schiavina, Chiara Leone, Giulio De Leo, and Eleonora Ciccotti (2016), Quantifying 60 years of declining European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) fishery yields in Mediterranean coastal lagoons
- Erika Hagelberg, Mark G. Thomas, Charles E Cook Jr, Andrei V. Sher, Gennady F Baryshnikov & Adrian M. Lister (1994) DNA from ancient mammoth bones
- Erik D. Enbody, Mats E. Pettersson, C. Grace Sprehn, Stefan Palm, Håkan Wickström, and Leif Andersson (2020), Ecological adaptation in European eels is based on phenotypic plasticity
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gkafas G. A (2016). Genetic Diversity and Structure of *Cymodocea nodosa* meadows in the Aegean Sea, Eastern Mediterranean. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14(1), 145-160.
- Gregory E. Maes and Filip A. M. Volckaert (2007), Challenges for genetic research in European eel management
- Guerault, D.; Lecomte-Finiger, R.; Desaunay, Y.; Biegianti-Risbourg, S.; Beillois, P.; Grellier, P. 1992: Glass eel arrivals in the Vilaine estuary (Northern Bay of Biscay) in 1990: demographic features and early life history. *Irish Fisheries Investigation Series A* 36: 5-14.

- Haro A.J., Krueger W. H., 1988. Pigmentation, size, and migration of elvers (*Anguilla rostrata* (Lesueur)) in a costal Rhode Island stream. *Canadian Journal of Zoology*, 66: 2528-2533
- Inoue, J.G., Miya, M., Miller, M.J., Sado, T., Hanel, R., Hatooka, K., Aoyama, J., Minegishi, Y., Nishida, M., Tsukamoto, K., 2010. Deep-ocean origin of the freshwater eels. *Biol. Lett.* 6, 363–366.
- J. M. Pujolar, G. E. Maes, and F. A. M. Volckaert (2007), Genetic and morphometric heterogeneity among recruits of the European Eel, *Anguilla Anguilla*
- J. M. Provan, J. D. Reynolds (2000) Differences in head shape of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.)
- JosÃ Martin Pujolar , Daniele Bevacqua , Marco Andrello , Fabrizio Capoccioni , Eleonora Ciccotti , Giulio A. De Leo , Lorenzo Zane (2011), Genetic patchiness in European eel adults evidenced by molecular genetics and population dynamics modelling
- Johnson, G.D., Ida, H., Sakaue, J., Sado, T., Asahida, T., Miya, M., 2011. A ‘living fossil’ eel (*Anguilliformes: Protoanguillidae, fam. nov.*) from an undersea cave in Palau. *Proc Roy Soc B: Biol. Sci.* 10, 1–10.
- Kastelein, P., 1983. Survival and growth of eels (*A. anguilla*, L.) reared on an expanded granulated diet. *Aquaculture*, 30: 155-172
- Khaled Mohammed-Geba, Sobhy El-Sayed Hassab El-Nabi, Marwa Said El-Desoky (2016), Development of cytochrome-c-oxidase 1 specific primers for genetic discrimination of the European eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758).
- Lin, Y.S., Poh, Y.P., Tzeng, C.S., 2001. A phylogeny of freshwater eels inferred from mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20, 252–261.

Liu, Z.J. and Cordes, F.J. (2004) DNA marker technology and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238, 1-37.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>

LL. Knowles, WP Maddison (2002) Statistical phylogeography

Maes G.E, Volckaert F.A.M. Clinal genetic variation and isolation by distance in the European eel *Anguilla anguilla* (L.) *Biol. J. Linn. Soc.* 2002;77:509–521

Marco Andrello, Daniele Bevacqua, Gregory E. Maes and Giulio A. De Leo (2010), An integrated genetic-demographic model to unravel the origin of genetic structure in European eel (*Anguilla anguilla* L.)

McDowall R M (1988) *Diadromy in fishes*. Croom Helm, London

Mei-Chen Tseg, Overview and current trends in studies on the evolution and phylogeny of *Anguilla*

Meyer, J. P., Allen, N. J., & Smith, C. A. (1993). Commitment to organizations and occupations: Extension and test of a three-component conceptualization. *Journal of Applied Psychology*, 78(4), 538–551.

Miguel Baltazar-Soares, Arne Biastoch, Chris Harrod, Reinhold Hanel, Lasse Marohn, Enno Prigge, Derek Evans, Kenneth Bodles, Erik Behrens, Claus W. Boning, and Christophe Eizaguirre (2014), Recruitment Collapse and Population Structure of the European Eel Shaped by Local Ocean Current Dynamics

Miguel Baltazar-Soares, Seraina E. Bracamonte, Till Bayer, Frederic J.J, Chain, Reinhold Hanel, Chris Harrod and Christophe Eizaguirre (2016) Evaluating the adaptive potential of the European eel: is the immunogenetic status recovering?

Miguel Baltazar- Soares, Christophe Eizaquirre (2016) Does asymmetric gene flow among matriline maintain the evolutionary potential of the European eel?

Minegishi, Y., Aoyama, J., Inoue, J.G., Miya, M., Nishida, M., Tsukamoto, K., 2005.

- Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34, 134–146.
- Patterson, C., 1993. Osteichthyes: teleostei. In: Benton, M.J. (Ed.), *The Fossil Record 2*. Chapman and Hall Press, London, pp. 621–656.
- Pfeiler, E., Toyoda, H., Williams, M.D., Nieman, R.A., 2002. Identification, structural analysis and function of hyaluronan in developing fish larvae (leptocephali). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 132, 443–451
- Robert C Sinclair (1988) Mood, categorization breadth, and performance appraisal: The effects of order of information acquisition and affective state on halo, accuracy, information retrieval, and evaluations, Laurentian University
- S. A. Miller, D. D. Dykes and H.F. Polesky (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
- Schmidt J (1923) The breeding places of the eel. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Series B: Biological Sciences*, 211, 179–208.
- S Palm, J Dannewitz, T Prestegaard and H Wickstrom (2009), Panmixia in European eel revisited: no genetic difference between maturing adults from southern and northern Europe
- Takaomi Arai (2020), Ecology and evolution of migration in the freshwater eels of the genus *Anguilla* Schrank, 1798
- Takaomi Arai (2016) *Biology and Ecology of Anguillid eels*
- Tesch, F.W. (Thorpe, J.E., ed.), 2003. *The eel*, 5th ed. Blackwell Science, Oxford, England. 408 pp.
- Tesch F.W., 2003. *The Eel*. In: Thorpe, J.E. (Ed.), third ed. Blackwell Publishing, London, 336pp.
- Thomas D.Als, Michael M.Hansen, Gregory E.Maes, Martin Castonguay, Lasse

- Riemann, Kim Aarestrup, Peter Munk, Henrik Sparholt, Reinhold Hanel, Louis Bernatchez (2011), All roads lead to home: panmixia of European eel in the Sargasso Sea
- Tseng, H.Y., Lin, Y.S., Tzeng, C.S., 2009. A new *Anguilla* species and a Reanalysis of the phylogeny of freshwater eels. *Zool. Stud.* 48, 808–822
- Tseng, M.C., 2016. Overview and current trends in studies on the evolution and phylogeny of *Anguilla*. In: Arai, T. (Ed.), *Biology and Ecology of Anguillid Eels*. CRC Press, Boca Raton, pp. 21–35.
- Tsukamoto K. A. Umezawa and T. Ozawa (1992) Age and growth of *Anguilla japonica* leptocephali collected in western North Pacific in July 1990. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58(3):457-459.
- Tsukamoto, K., and Aoyama, J. (1998). Evolution of the freshwater eels of the genus *Anguilla*: A probable scenario. *Environ. Biol. Fish.* 52: 139–148.
- van Ginneken V.J.T., Maes G.E., 2005. The european eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifestyle, evolution and reproduction: a literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15: 367-398
- Waples, R. S., and O. Gaggiotti. 2006. INVITED REVIEW: what is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol. Ecol.* 15: 1419–1439.
- Watanabe, S., Aoyama, J., Tsukamoto, K., 2004. Reexamination of Ege's (1939) use of taxonomic characters of the genus *Anguilla*. *Bull. Mar. Sci.* 74, 337–351.
- Watanabe, S., Aoyama, J., Tsukamoto, K., 2009. A new species of freshwater eel, *Anguilla luzonensis* (Teleostei: Anguillidae) from Luzon Island of the Philippines. *Fish. Sci.* 75, 387–392.
- Watanabe, S., Aoyama, J., Hagihara, S., Ai, B., Azanza, R.V., Tsukamoto, K., 2013.

- Anguilla huangi* Teng, Lin, and Tzeng, 2009, is a junior synonym of *Anguilla luzonensis* Watanabe, Aoyama, and Tsukamoto, 2009. *Fish. Sci.* 79, 375–383.
- Watanabe, S., Aoyama, J., Tsukamoto, K., 2014a. On the Identities of *Anguilla borneensis*, *A. malgumora*, and *Muraena malgumora*. *Copeia* 568–576, 2014.
- Watanabe, S., Miller, M.J., Aoyama, J., Tsukamoto, K., 2014b. Evaluation of the population structure of *Anguilla bicolor* and *A. bengalensis* using total number of vertebrae and consideration of the subspecies concept for the genus *Anguilla*. *Ecol. Freshw. Fish* 23, 77–85.
- Wand C.H. and W. N Tzeng. “The Timing of Metamorphosis and Growth Rates of American and European Eel *Lpetocephali*” (2000) *Fisheries Research*, vol. 46, no. 1-3, pp. 191-205
- Wilson, R. P.; Poe, W. E., 1985. Apparent digestible protein and energy coefficients of common feed ingredients for channel catfish. *Progressive Fish-Culturist*, 47: 154–158.
- Wirth T, Bernatchez L. Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature*. 2001;409:1037–1040.
- Y Kawakami a, N Mochioka a, R Kimura b, A Nakazono a(1999) Seasonal changes of the RNA/DNA ratio, size and lipid contents and immigration adaptability of Japanese glass-eels, *Anguilla japonica*, collected in northern Kyushu, Japan

5.3 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

<https://www.fishbase.se/search.php>

<https://greece.inaturalist.org/taxa/49221-Anguilla>

<https://virtual-amvrakikos.gr/biodiversity/efropaiko-cheli-anguilla-anguilla/>

<https://archipelago.gr/fishforlife/evropaikou-cheliou/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

www.github.com/AliView

6. ABSTRACT

The present work is a study on the population genetics of the *Anguilla anguilla* in the Mediterranean Sea by isolating part of the cytochrome c oxidase (COI) subunit. DNA was isolated from 10 samples of *A. anguilla* from the Ionian Sea. After DNA extraction, the electrophoresis technique was performed followed by replication of the genetic material by polymerase chain reaction (PCR) method using the Universal COI Primer. This was followed by the DNA barcoding technique. Statistical analyses were carried out by using these 10 Ionian sequences and additionally more *A. anguilla* sequences, which were found from previously deposited sequences on ncbi database. The examined sequences were collected from Egypt, the Northern Aegean, Turkey, Italy, Portugal, England, Sweden, the Czech Republic, and Germany. 47 of the 55 haplotypes used are unique, either to an entire population or to some individuals within the population. This is indicative of the high diversity among individuals within the population itself. Furthermore, the populations under study were grouped into 3 genetic groups according to their geographical origin. In addition, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed, and it was found that the rate of molecular variation within populations was higher (66.06%) than that among populations (43.07%). The F_{ST} coefficient was equal to 0.33944 ($F_{ST} > 0.25$) and the p-value was highly significant ($p < 0.001$), indicating a significant genetic variation. Next, the greatest genetic differentiation was found between the Ionian Sea and Turkey populations as the highest F_{ST} value (0.86672) was observed. The differentiation, as far as the COI gene is concerned, can be attributed to the fact that different oceanographic characteristics prevail in the different locations. Compared to other studies, one would expect a low genetic variation between European eel populations, but instead the results show a high variation between geographical areas.

Key words: *Anguilla anguilla*, Mediterranean Sea, population genetics, MtDNA, COI gene

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αλληλουχίες δειγμάτων *A. anguilla* από το Ιόνιο

>IONIO-1

GKAGTATTCGTTAWGTATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTGCC
ATTAATAAWCGGCGCCCCASACATASCATTCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGA
CTTTTACCCCATCATTCTTCTACTACTAGCCTCCTCKGGAGTAKAGGCCGGASCTGG
TACARGCKGAACTGKATATCCACCCCTGGCTGGAAACTTASCCCACGCCGGGCATCT
GTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGGGCCAT
TAACTTTATTACTACAATCATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
CTCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGCCAGT
CCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAAACGTAAATACG

>IONIO-2

CTGGTAGTTATTATGCTAATGCCWGTAAATAATTGKAKGATTTGSCAACTGACTTGTGC
CATTAMTAAACGGCSCCCTTSACATTCCATTCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTG
ACTTTTACCCCATCATTCTTCTACTACTTTCCTCCTCGGGAGTATARGCCGGASCTG
GTCCGAGCGGAACTGGATATCCACCCCTGCCTGGAAACTTCCCCACRCCGGGGAAT
CTGTTGACCTGACAATTTTCTCWCTCCACCTTGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGGGC
CATTAACTTTATTACTACAATCATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
ACTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGCC
AGTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAAACCT

>IONIO-3

CGKAGTAATTTTCATTAWGTATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGT
GCCATTAATAAWCGGCSCCCASACATASCATTCCCCGAATAAATAATATAAGCTTC
KGACTTTTACCCCATCATTCTTCTACTACTAGCCTCCTCTGGAGTAGAGGCCGGAG
CTGGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCTGGAAACTTASCCCACGCCGGGC
ATCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGGG
CCATTAACCTTTATTACTACAATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
AACTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGC
CAGTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAATCTAAATACGA

>IONIO-4

CKAKGATTTTCGTTAWGTATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTGC
CATTAAATAATCGGCGCCCCAGACATAGCATTCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTG
ACTTTTACCCCATCATTCTTCTACTACTAGCCTCCTCTGGAGTAGAGGCCGGAGCT
GGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCTGGAAACTTASCCCACGCCGGGCAT
CTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGGGC
ATTAACCTTTATTACTACAATCATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
CTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGCCA
GTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAAACGAAATACGAA

>IONIO-5

CKAGKAATTTTCGTTAWGTATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTG
CCATTAATAATCGGCGCCCCAGACATAGCATTCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCT
GACTTTTACCCCATCATTCTTCTACTACTAGCCTCCTCTGGAGTAKAGGCCGGAGC
TGGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCTGGAAACTTAKCCCACGCCGGGC
ATCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATCAATTCTAGGGG
CCATTAACCTTTATTACTACAATCATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
AACTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGC
CAGTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAATCTAAATACGAT

>IONIO-6

CGTGAKATTTTCGTTAWGTATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTG
CCATTAATAATCGGCGCCCCAGACATAGCATTCCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCT
GACTTTTACCCCATCATTTCTTCTACTACTAGCCTCCTCTGGAGTAGAGGCCGGAGC
TGGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCTGGAAACTTASCCACGCCGGGGCA
TCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTATCAATTCTAGGGGC
CATTAACTTTATTACTACAATTATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
ACTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGCC
AGTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAATCGAAATACGA

>IONIO-7

CKAGGAGTTCATTAWGTATGCCWGKAATAATTGKAGGATTTGGCAACTGACTTGTGC
CATTAMTAATCGGCGCCCCASACATASCATTCCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCGG
ACTTTTACCCCATCATTTCTTCTACTACTAKCCTCCTCKGGAGTAKAGGCCGGASCTG
GTMCRRGCTGAACTGKATATCCWCCCTGGCTGGAAACTTAYCCCACGCCGGGGCAT
CTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTATCAATTCTAGGGGCC
ATTAACCTTTATTACTACAATCATTAAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
CTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTACCA
GTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAAACGAAATACGAGATGAW
TATTAGACGMATGTTGATTTGTGTCCTCCGCCAACCTGATTAATAAATGGTATGCAATT
GCAAAAACAAATGTGTTKTGAATTCKCCACRTGGCTTTRTGAGCTGGTKACRTTGTS
CTGTGGTTCCTGTAYCTAGATAATGATGTGACCAGCGTTTTGTGGATCAGGTGCAAAA
GAARGGGGGCCAGGGGTAGTYAAGC

>IONIO-8

GKRRKTATTTTCGTTAWGTATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTGC
CATTAAATAATCGGCGCCCCAGACATAGCATTCCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTG
ACTTTTACCCCATCATTTCTTCTACTACTAGCCTCCTCTGGAGTAGAGGCCGGAGCT
GGTACAGGCKGAACTGTATATCCACCCCTGGCTGGAAACTTAKCCCACGCCGGGGCA
TCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTATCAATTCTAGGGGC
CATTAACTTTATTACTACAATCATTAAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
ACTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGCC
AGTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAAACGTA

>IONIO-9

CKKGGGGATTTTCGTTAWGTATGCCWGKAATAATTGKAKGATTTGGCAACTGACTTGT
GCCATTAMTAATCGGCGCCCCASACATASCATTCCCCCGAATAAATAATATAAGCTTC
TGACTTTTACCCCATCATTTCTTCTACTACTAKCCTCCTCTGGAGTAKARGCCGGASC
TGGTACARGCTGAACTGKATATCCWCCCTGGCTGGAAACTTASCCACGCCGGGGC
ATCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTATCAATTCTAGGGG
CCATTAACCTTTATTACTACAATCATTAAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCA
AACTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGC
CAGTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAAACGWAAATACGA

>IONIO-10

GTAGGRITTCGTTAWGTAATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTG
CCATTAATAAWCGGCGCCCCASACATASCATTCCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCK
GACTTTTACCCCATCATTTCTTCTACTACTAKCCTCCTCKGGAGTAKAGGCCGGASCT
GGTACARGCKGAACTGKATATCCACCCCTGGCTGGAAACTTASCCACGCCGGGGCA
TCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTATCAATTCTAGGGGC
CATTAACTTTATTACTACAATCATTAAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA
ACTCCCCTGTTTGTATGAGCTGTATTAGTAACCGCCGTTTTGCTACTCCTCTCCCTGCC
AGTCCTAGCCGCAGGCATTACAATACTTCTGACTGACCGAAACCTAAATACGA