

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

<<ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ>>

<< Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του ευρωπαϊκού χελιού, *Anquilla anguilla*, στο Ιόνιο και Αιγαίο πέλαγος με τη χρήση της υπομονάδας I του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) – Popylation genetic structure of the european eel, *Anquilla anguilla*, in the Ionian and Aegean Sea using the cytochrome oxidase subunit I gene (COI)>>

Μάριος Κορτέσης Κατσάνος

ΒΟΛΟΣ 2024

<< Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του ευρωπαϊκού χελιού, *Anguilla anguilla*, στο Ιόνιο και Αιγαίο πέλαγος με τη χρήση της υπομονάδας I του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) – Popylation genetic structure of the european eel, *Anguilla anguilla*, in the Ionian and Aegean Sea using the cytochrome oxidase subunit I gene (COI)>>

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) **Γκάφας Γεώργιος** : Αναπληρωτής Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2) **Εξαδάκτυλος Αθανάσιος** : Καθηγητής (Ph.D.), Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3) **Νεοφύτου Νικόλαος** : Αναπληρωτής Καθηγητής – Υδατοκαλλιέργειες και Περιβάλλον, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Ευχαριστίες!

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα πρόσωπα που βοήθησαν στην διεκπεραίωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Πρώτα από όλους τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Γεώργιο Γκάφα για την συνεργασία , τις συμβουλές, την καθοδήγησή του και τις παρεμβάσεις του όπου αυτές κρίθηκαν απαραίτητες. Επίσης ευχαριστώ θερμά την κυρία Σαραντοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια της και τη συνεργασία μας κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους της εργασίας. Ακόμα θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κύριο Εξαδάκτυλο και τον κύριο Νεοφύτου για τα σχόλια και τις χρήσιμες συμβουλές και προτροπές τους. Τέλος , την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη συνεχή στήριξή τους και την βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής και των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μελέτη πληθυσμιακής γενετικής του είδους *Anguilla anguilla*. Σκοπός της είναι η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη διάκριση των πληθυσμών του Αιγαίου και του Ιονίου, σύμφωνα και με την επεξεργασία στατιστικών δεδομένων. Τα χέλια είναι σαρκοφάγα είδη που διαβιούν σε όλους τους τύπους νερών. Γενικότερα το χέλι αποτελεί μυστηριώδες είδος, με την αναπαραγωγή του να αποτελεί ένα μικρό μυστήριο. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν διατηρούνταν στην κατάψυξη του εργαστηρίου Ιχθυολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από τον ιστό 16 χελιών (10 από Ιόνιο, 6 από Αιγαίο). Το πείραμα εκτελέστηκε με τη χρήση ενός μιτοχονδριακού γονιδίου, της κυττοχρωμικής οξειδάσης (COI). Εκτελέστηκε ακόμη pcr και ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων. Έγινε επεξεργασία των αλληλουχιών με τα προγράμματα Aliview, Fabox, Arlequin, Diyabc. Βρέθηκαν 5 διαφορετικοί απλότυποι, εκ των οποίων κανείς δεν ήταν κοινός για τους 2 πληθυσμούς. Για τη σύγκριση των πληθυσμών υπολογίστηκαν οι δείκτες Fst και p-value. Τα αποτελέσματα βρέθηκαν στατιστικά πολύ σημαντικά, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει γενετικός διαχωρισμός μεταξύ των πληθυσμών του Ιονίου και του Αιγαίου Πελάγους.

Λέξεις κλειδιά : *Anguilla anguilla*, πληθυσμιακή γενετική, γονίδιο COI, γενετική διαφοροποίηση, Ιόνιο και Αιγαίο Πέλαγος

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Γενικές πληροφορίες για τα χέλια	1
1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του χελιού και της οικογένειας Anguilliformes	3
1.1.3. Συστηματική ταξινόμηση των χελιών	3
1.2 Το είδος <i>Anguilla anguilla</i>	4
1.3 Το γονίδιο COI	6
1.4 Υπόθεση εργασίας (έρευνας).....	8
1.5 Θάλασσες δειγματοληψίας	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	11
2.1 Επιλογή δειγμάτων	11
2.2 Εξαγωγή γενετικού υλικού.....	11
2.3 Ηλεκτροφόρηση	14
2.4 Η διαδικασία της PCR.....	15
2.5 Στατιστική ανάλυση δεδομένων	18
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
3.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης.....	19
3.2 Απλότυποι και στατιστικές αναλύσεις.....	21
3.2.1 Προσδιορισμός απλοτύπων.....	21
3.2.2 Στατιστικές αναλύσεις με το πρόγραμμα Arlequin	24
3.2.3 Σενάρια με το πρόγραμμα Diyabc	25
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	34
4.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων	34
4.2 Οι πληθυσμοί <i>A. anguilla</i> του Ιονίου και του Αιγαίου Πελάγους.....	36
4.3 Διαχειριστικά μέτρα στο Ιόνιο και το Αιγαίο Πέλαγος	39
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41
Ελληνική βιβλιογραφία.....	41
Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	41
Ηλεκτρονική βιβλιογραφία	44
ABSTRACT	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικές πληροφορίες για τα χέλια

Τα χέλια ανήκουν στο γένος *Anguilla*, που ανήκει στην οικογένεια *Anguillidae*, τάξη *Anguilliformes* και εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον ως προς τη βιοποικιλότητά του. Το γένος *Anguilla* περιλαμβάνει 19 είδη και τα ονόματά τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα σε συνδυασμό με την γεωγραφική κατανομή τους.

<i>Anguilla anguilla</i>	Ευρώπη, Βόρεια Αφρική
<i>Anguilla australis</i>	Αυστραλία, Νησιά Όκλαντ, Νέα Ζηλανδία
<i>Anguilla bengalensis</i>	Ινδικός Ωκεανός
<i>Anguilla bicolor</i>	Φιλιππίνες
<i>Anguilla borneensis</i>	Βόρνεο
<i>Anguilla celebesensis</i>	Φιλιππίνες, Δυτική Γουινέα
<i>Anguilla dieffenbachii</i>	Αυστραλία, Νησιά Όκλαντ, Νέα Ζηλανδία
<i>Anguilla interioris</i>	Ανατολική Νέα Γουινέα
<i>Anguilla japonica</i>	Κίνα, Ιαπωνία
<i>Anguilla labiata</i>	Νότια Αφρική
<i>Anguilla luzonensis</i>	Φιλιππίνες
<i>Anguilla marmorata</i>	Ινδικός Ωκεανός, Νότια Νέα Γουινέα, Νέα Καληδονία

Anguilla megastoma	Νέα Καληδονία, Ανατολική Πολυνησία, Νησιά Φίτζι, Ταϊτή
Anguilla nebulosa	Ινδικός Ωκεανός, Ινδία. Μπούρμα
Anguilla obscura	Αυστραλία, Νέα Γουινέα
Anguilla pacifica	Ανατολικός Ειρηνικός
Anguilla reinhardtii	Αυστραλία, Νέα Καληδονία
Anguilla rostrata	Βόρεια Αμερική

Το χέλι γενικότερα αποτελεί ένα μυστηριώδες πλάσμα, το οποίο έχει απασχολήσει αρκετούς επιστήμονες με το πέρασμα των χρόνων και αποτελεί ακόμη και σήμερα αντικείμενο μελέτης και διαρκούς αναζήτησης. Ο πρώτος που μελέτησε τα χέλια ήταν ο Αριστοτέλης, προσπαθώντας να εξηγήσει το ανεξήγητο της συμπεριφοράς τους. Μάλιστα ο ίδιος δήλωνε ότι τα χέλια είναι τα <<σκουλήκια της Γης>> τα οποία αναδύονται χωρίς να είναι αναγκαία η γονιμοποίησή τους.

Μετά ο Γιόχανς Σμίντ, ένας δανός βιολόγος, είχε σημαντική συνεισφορά στην κατανόηση του κύκλου ζωής των χελιών. Ήταν ο πρώτος που παρουσίασε τη θάλασσα των Σαργασών ως τον τόπο αναπαραγωγής τους.

Ο Κατσούμι Τσουκαμότο, ένας Ιάπωνας ερευνητής, μελέτησε εκτενώς τις μεταναστευτικές συνήθειες των χελιών. Συγκεκριμένα μελέτησε τη συμπεριφορά φωτοκίας των ιαπωνικών χελιών και τα μεταναστευτικά τους πρότυπα.

Ένα άλλος βρετανός ερευνητής, ο Ντέιβιντ Ράιτον, μέσω ηλεκτρονικών σημάτων μελέτησε τις κινήσεις των χελιών προς τον Ατλαντικό Ωκεανό.

Η Άννα Γκέρντ Μαρκ, μία σουηδή οικολόγος, πραγματοποίησε μελέτες για την οικολογία του ευρωπαϊκού χελιού, τη μετανάστευσή του και τις αναπαραγωγικές

συνήθειες του. Αξιόλογοι ερευνητές επίσης αποτέλεσαν και οι Στίβεν Σάμερφελτ και ο Ρεμί Αμεζάν που μελέτησαν τη γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών των χελιών.

1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του χελιού και της οικογένειας Anguilliformes

Τα χέλια ανήκουν στην τάξη Anguilliformes, που περιλαμβάνει 20 οικογένειες, 147 γένη και 820 είδη (Nelson, 2006; Johnson et al., 2011). Στην πλειονότητά τους δεν εμφανίζουν λέπια και οι βραγχιακές σχισμές είναι συνήθως πολύ μικρές. Τα χέλια έχουν επίμηκες σώμα με μήκος από 5 εκατοστά έως 4 μέτρα. Γενικά δεν έχουν πνευλικά πτερύγια, ενώ αρκετά δεν έχουν και θωρακικά πτερύγια. Τα περισσότερα είδη των οικογενειών ζουν σε θερμά θαλάσσια νερά και μερικά σε βαθιές θάλασσες. Στην οικογένεια Anguillidae περιλαμβάνονται 18 είδη, εκ των οποίων μόνο τα 4 έχουν εμπορική σημασία. Στον ευρωπαϊκό χώρο βρίσκεται το είδος *Anguilla anguilla*.

1.1.3. Συστηματική ταξινόμηση των χελιών

Ο L.S. Berg όρισε την εξής συστηματική ταξινόμηση για το χέλι

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

1.2 Το είδος *Anguilla anguilla*

Το *Anguilla anguilla* είναι το μόνο είδος από τα χελόμορφα που διαβεί στα γλυκά νερά. Το σώμα τους έχει οφιοειδές σχήμα με πάρα πολύ γλοιώδες δέρμα, μέσα στο οποίο είναι βυθισμένα μικρά και ελλειπτικού σχήματος λέπια (Tesch, 2003; McCleave, 2003). Το ζεύγος των κυκλικών πλευρικών πτερυγίων βοηθά στη μακροσκοπική αναγνώριση του είδους. Έχει συνεχόμενα ραχιαίο, εδρικό και ουραίο πτερύγιο, ενώ λείπουν τα κοιλιακά. Έχει πολύ μικρές βραγχιακές σχισμές που βρίσκονται ακριβώς μπροστά από την βάση των πλευρικών πτερυγίων.

Τα θηλυκά χέλια μεγαλώνουν μέχρι τα 160 εκατοστά και φτάνουν σε βάρος τα 6 κιλά. Τα αρσενικά από την άλλη δεν υπάρχει κάποιο που να ξεπερνά τα 55 εκατοστά μήκος, τουλάχιστον από όσα έχουν καταγραφεί. Η θερμοκρασία και η ποσότητα της τροφής ρυθμίζουν την πορεία ανάπτυξής τους. Η διάρκεια ζωής τους υπολογίζεται από 20 ως 25 χρόνια περίπου.

Ο χρωματισμός των χελιών διαφέρει ανάλογα με το στάδιο αναπαραγωγικής ωριμότητας. Πριν την αποκτήσουν εμφανίζουν κίτρινο χρώμα στις πλευρές, ενώ από τα 4 – 10 έτη αλλάζουν τον χρωματισμό τους και αποκτούν αργυρό χρώμα στην κοιλιά και σκούρο γκριζοπράσινο στη ραχιαία περιοχή.

Αναφορικά με τον βιότοπο των χελιών, ζουν σε κάθε τύπο νερού, σε μεγάλες λίμνες, ποτάμια, μικρούς υδατοφράχτες και έλη. Συνήθως εντοπίζονται κάτω από πέτρες, ανάμεσα από την υδρόβια βλάστηση, τα μικρά σε ηλικία και μέγεθος χέλια. Τα μεγαλύτερα δείχνουν προτίμηση στους μαλακούς αμμώδεις πυθμένες. Τα χέλια αντέχουν έως και 1000 μέτρα υπερθαλάσσιο ύψος, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες

επιβιώνουν παθητικά, για αυτό και στις περιοχές με ακραία χαμηλές θερμοκρασίες κρύβονται μέσα στη λάσπη και κάτω από πέτρες, μακριά από πάγο.

Το χέλι είναι σαρκοφάγο ψάρι και μπορεί να τραφεί με διάφορα είδη υδρόβιων ζώων, ανεξαρτήτως μεγέθους, ζωντανά ή νεκρά. Την κύρια τροφή αποτελούν έντομα, σαλιγκάρια, βατράχια, σκώληκες, μικρά τρωκτικά, υδρόβια πτηνά και ιχθύδια.

Για αρκετά χρόνια η αναπαραγωγή των χελιών αποτελούσε ένα μυστήριο χωρίς λύση. Υπήρχε η πεποίθηση από κάποιους επιστήμονες πως οι λάρβες των χελιών προέρχονταν από ένα άλλο είδος, το *Leptocephalus brevirostris*. Το μυστήριο εν μέρη λύθηκε όταν ο Schmidt, το 1920, διαπίστωσε πως όσο απομακρύνεται από τις ευρωπαϊκές ακτές τόσο περισσότερες λάρβες εντόπιζε. Πιο συγκεκριμένα, στη θάλασσα των Σαργασσών βρέθηκαν οι περισσότερες και πιο μικρές λάρβες, γεγονός που συνετέλεσε για να θεωρηθεί η περιοχή ως ο τόπος αναπαραγωγής των χελιών (Schmidt, 1922; Miller et al., 2019). Σε αυτό το μέρος αναπαράγονται όχι μόνο τα χέλια της Ευρώπης αλλά και της Βορείου Αμερικής.

Βιότοπο των χελιών στην Ευρώπη αποτελούν οι περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο, τη Μαύρη θάλασσα, τη Σκανδιναβία και τη Γροιλανδία. Στην Ελλάδα υπάρχουν δύο μεγάλοι πληθυσμοί, οι οποίοι απασχολούν και την εργασία, στο Ιόνιο και το Αιγαίο Πέλαγος.



Εικόνα 1. Χέλι, Anguilla anguilla

1.3 Το γονίδιο COI

Το γονίδιο COI (Cytochrome Oxidase 1), αλλιώς γνωστό και ως mtDNA COI, είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη. Είναι μέρος του κυτταρικού χρωμοσώματος, που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, τα ενεργειακά κέντρα των κυττάρων. Το COI είναι σημαντικό στον τομέα της μοριακής βιολογίας και της ταξινόμησης οργανισμών. Συχνά χρησιμοποιείται στο DNA barcoding, μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την ταξινόμηση ειδών βάσει συγκεκριμένων περιοχών του DNA. Στην περίπτωση του COI, αυτή η περιοχή του DNA χρησιμοποιείται για να αναγνωρίσει και να διαχωρίσει είδη με βάση τις γενετικές τους διαφορές. Ειδικότερα, στην ταξινομία των ζώων, το COI χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των σχέσεων μεταξύ διαφόρων ειδών και υποειδών.

Εκτός από το DNA barcoding το COI βοηθάει και :

- A. Στην ταξινόμηση και τον προσδιορισμό των ειδών, με βάση τις γενετικές τους διαφορές. Αυτό βοηθάει την αναγνώριση, όταν αυτή δεν υλοποιείται με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

- B. Στην οικολογία κοινοτήτων, δηλαδή την ποικιλία των ειδών σε διάφορα οικοσυστήματα και την παρακολούθηση της αλλαγής τους στο πέρασμα των χρόνων.
- C. Στη διακριτική διαγνωστική, δηλαδή τον προσδιορισμό των γενετικών διαφορών μεταξύ συγγενικών ειδών.

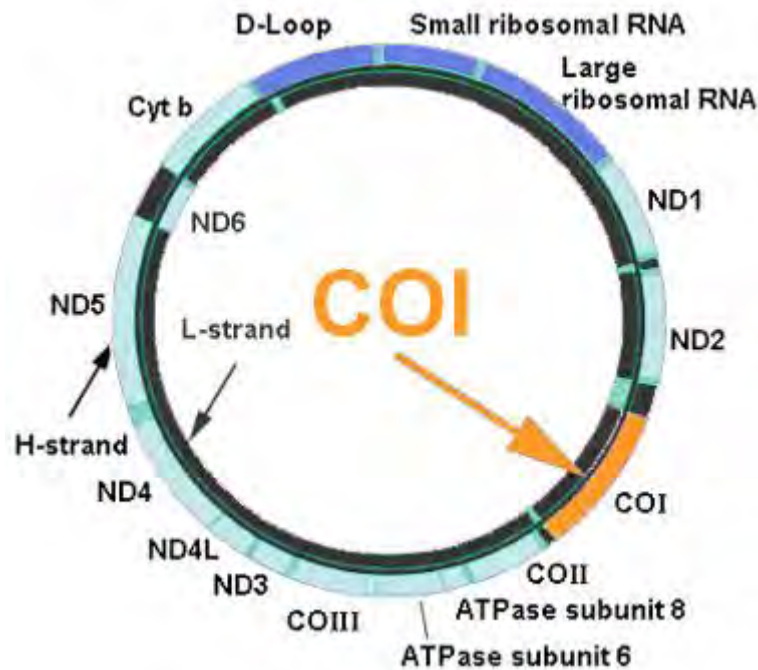
Το COI διαφέρει από τα άλλα γονίδια εξαιτίας του ειδικού ρόλου που διαδραματίζει στον οργανισμό και την επίδρασή του σε συγκεκριμένους τομείς της βιολογίας. Αν και όλα τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή RNA που εκτελούν λειτουργίες στον οργανισμό, τα διάφορα γονίδια έχουν διαφορετικές λειτουργίες και συνεισφορές. Παρακάτω παραθέτονται ορισμένα από τα στοιχεία που κάνουν το COI να ξεχωρίζει.

- ❖ Το COI εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό DNA, που διαφέρει από τον πυρηνικό γενετικό κώδικα. Επίσης το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται από τη μητέρα.
- ❖ Συμμετέχει ευρέως στην τεχνική του DNA barcoding για τον προσδιορισμό και την ταξινόμηση των ειδών.
- ❖ Συμβάλλει στη γενετική διαφοροποίηση, βοηθάει δηλαδή εν μέρη στη μελέτη των σχέσεων μεταξύ των διαφόρων ειδών.

Το DNA barcoding βασίζεται στην αλληλουχία ενός τμήματος του γονιδίου COI του μιτοχονδριακού DNA, που βοηθάει στο διαχωρισμό των ειδών και στην αντιστοίχιση των ατόμων σε είδη.

Χαρακτηριστικά του COI είναι ότι κωδικοποιεί πρωτεΐνες, άρα έχει ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, δεν έχει κωδικόνια λήξης και ιντρόνια στην ευθυγράμμιση που διαταράσσουν τη μετάφραση της αλληλουχίας DNA σε αμινοξέα. Για την εξαγωγή

συμπερασμάτων φυλογένεσης γίνεται χρήση θραυσμάτων αυτού του γονιδίου, αφού δεν υπάρχει κάποια άλλη γενετική περιοχή που να εντοπίζεται σε τόσες ταξινομικά επαληθευμένες βάσεις.



Εικόνα 2. Η θέση του γονιδίου της COI στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα

1.4 Υπόθεση εργασίας (έρευνας)

Σκοπός της εργασίας αποτελεί η πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του είδους *Anguilla anguilla* με βάση το μιτοχονδριακό γονίδιο της COI πρωτίστως, και κατ'επέκταση τον έλεγχο διαφοροποίησης των πληθυσμών μεταξύ του Αιγαίου και του Ιονίου Πελάγους. Πιο συγκεκριμένα διερευνάται η ύπαρξη << σχέσης >> μεταξύ των 2 πληθυσμών του Αιγαίου και του Ιονίου και το αν αυτοί διαχωρίστηκαν και πότε. Πρέπει να βρεθεί αν υπήρξε ποτέ κοινή συνύπαρξη των 2 πληθυσμών ή από την ύπαρξη ποιανού προέκυψε η δημιουργία του άλλου. Οι στατιστικές αναλύσεις των λογισμικών και των εφαρμογών, θα βοηθήσουν στην εξαγωγή συμπερασμάτων. Έτσι

αρχικά γίνεται μια έρευνα σχετικά με την ύπαρξη γενετικού διαχωρισμού και εν συνεχεία γίνεται σύγκριση του αποτελέσματος και των δειγμάτων με τα “ευρήματα” άλλων ερευνών.

Το Αιγαίο Πέλαγος με έκταση 240000 τετραγωνικά χιλιόμετρα και βάθος 2249 μέτρα (σύμφωνα με το Διεθνές Υδρογραφικό Δίκτυο), φιλοξενεί ένα τεράστιο πλήθος οργανισμών και αποτελεί ένα φυσικό υδάτινο οικοσύστημα. Το Ιόνιο Πέλαγος έχει έκταση 160000 τετραγωνικά χιλιόμετρα και παρόμοιο βάθος με αυτό του Αιγαίου. Το χέλι που εντοπίζεται τόσο στις ανοικτές θάλασσες όσο και στα γλυκά νερά, ήρθε σε επαφή και επιχείρησε να επιβιώσει και να ανταγωνιστεί με πολλά είδη.

Το ευρωπαϊκό χέλι σαν είδος κατανέμεται σε διάφορες υδάτινες εκτάσεις στην Ευρώπη. Στον Ατλαντικό Ωκεανό, από τη Σκωτία ως τη Νορβηγία, στα παράκτια της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Τουρκία) και σε πολλά εσωτερικά ύδατα. Αυτές οι θάλασσες δείχνουν μια προτίμηση του *A. anguilla* ως προς τα θερμά ρεύματα. Σε συνδυασμό με την παγκόσμια μαζική μετανάστευση για αναπαραγωγή, το χέλι θα μπορούσε να εμφανίζει γενετική ομοιογένεια μεταξύ των πληθυσμών του.

Υπάρχουν όμως και παράγοντες που δείχνουν μείωση των πληθυσμών σε πολλές περιοχές. Τέτοιοι παράγοντες είναι η απώλεια και η ρύπανση του φυσικού περιβάλλοντος, η υπεραλίευση και άλλα. Για αυτό η εργασία αυτή πραγματεύεται το αν το ευρωπαϊκό χέλι παρουσιάζει γενετική ποικιλομορφία, εάν υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών στο Ιόνιο και το Αιγαίο και αν τα αποτελέσματα αυτά ταυτίζονται με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών και τέλος αν μπορεί το χέλι να θεωρηθεί πανμικτικό είδος.

1.5 Θάλασσες δειγματοληψίας

Το Ιόνιο Πέλαγος βρίσκεται δυτικά της Ελλάδας, περιλαμβάνεται στη Μεσόγειο και αποτελεί μια από τις περισσότερο σεισμογενείς περιοχές του κόσμου καθώς βρίσκεται σε σημείο όπου συγκλίνουν 3 τεκτονικές πλάκες. Αποτελεί μια oligοτροφική θάλασσα, όπως όλες οι υποθάλασσες που ανήκουν στη Μεσόγειο, όμως διαθέτει μεγάλη πανίδα σε σχέση με τα κλιματικά δεδομένα της περιοχής και έτσι η αλιεία της περιοχής είναι αρκετά ανεπτυγμένη.

Το Αιγαίο Πέλαγος αποτελεί τμήμα της Ανατολικής λεκάνης της Μεσογείου, έχει έκταση 240000 τετραγωνικά χιλιόμετρα και μέγιστο βάθος 4710 μέτρα. Το Αιγαίο Πέλαγος διαθέτει μεγάλη ιστορία και αποτελεί σημαντικό προπύργιο για τη διαμόρφωση της ιστορίας της αρχαίας Ελλάδας,



Εικόνα 3. Ιόνιο και Αιγαίο Πέλαγος, περιοχές δειγματοληψίας

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Επιλογή δειγμάτων

Το είδος που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί το *Anguilla anguilla*. Τα χέλια του συγκεκριμένου είδους προέρχονταν από το Αιγαίο και το Ιόνιο Πέλαγος και τα δείγματα που είχαν συλλεχθεί διατηρούνταν σε ιδανικές συνθήκες στο εργαστήριο του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

Πίνακας 1. Προέλευση και αριθμός δειγμάτων

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΑΙΓΑΙΟ	5
ΙΟΝΙΟ	10

2.2 Εξαγωγή γενετικού υλικού

Αφού επιλέχθηκαν ορισμένα δείγματα από το μέρος όπου διατηρούνταν στο εργαστήριο, χρησιμοποιήθηκε λαβίδα και νυστέρι για την εξαγωγή γενετικού υλικού από τη σάρκα των δειγμάτων. Να σημειωθεί πως τα παραπάνω εργαλεία ήταν πλήρως αποστειρωμένα, όπως και η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε κάτω από συνθήκες αποστείρωσης. Ο ιστός που απομονώθηκε τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε αποστειρωμένο επίσης Eppendorf, όπου συμπληρώθηκαν τα απαραίτητα συστατικά για τη διατήρηση των ιστών καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας.

Το πρωτόκολλο της εξαγωγής DNA που ακολουθήθηκε αποτελείται από τα εξής βήματα :

- ο Εξαγωγή και τοποθέτηση 1 mg ιστού σε αποστειρωμένο Eppendorf με τη χρήση λαβίδας και νυστεριού.
- ο Προσθήκη 500 μ L TNE Buffer (100Mm NaCl , 10 Mm Tris-HCl, 1Mm EDTA). Τα συστατικά αυτού του διαλύματος βοηθάν στην διατήρηση σταθερού pH και προστατεύουν από τη δράση ενζύμων που αποσυνδέουν τα πολυπυρηνικά ιόντα. Το TNE Buffer δημιουργεί συνθήκες ιδανικές για την εξαγωγή και τη στήριξη του DNA καθώς βοηθάει και αργότερα στην ηλεκτροφόρηση με αγαρόζη.
- ο Προσθήκη 100 μ l Tris-HCl συγκέντρωσης 1M
- ο Προσθήκη 80 μ l 10% SDS, που αποτελεί ανιονικό απορρυπαντικό και αντιμικροβιακό. Το SDS διαλύει και αποδυναμώνει τη δομή των πρωτεϊνών, ώστε να έχουν σχεδόν ομοιογενή φόρμα κατά μήκος τους.
- ο Προσθήκη 10 μ l 20mg/ml PrK, ένα πολύ ισχυρό πρωτεασικό ένζυμο με τη δυνατότητα να διασπά πρωτεΐνες.
- ο Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για επώαση για 16 ώρες περίπου (όλο το βράδυ) σε θερμοκρασία 59,6 βαθμών Κελσίου. Αυτό το βήμα στοχεύει στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών των κυττάρων και την απελευθέρωση του DNA.
- ο Το πρωί γίνεται προσθήκη 300 μ l φαινόλης και 300 μ l ισοαμυλικής αλκοόλης (vol 24:1) και γίνεται ανάδευση με το χέρι κάνοντας περιστροφικές, αργές και σταθερές κινήσεις, για 10 λεπτά.
- ο Γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων (12000) για 10 λεπτά στους 4 βαθμούς Κελσίου.

- ο Αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό στη συνέχεια και προστίθεται ξανά 600 μl ισοαμυλικής αλκοόλης. Ανάδευση πάλι με το χέρι, αργά και περιστροφικά για 10 λεπτά.
- ο Επανάληψη της φυγοκέντρωσης κάτω από τις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω.
- ο Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού και εν συνεχεία προσθήκη 1000 μl αιθανόλης 100% και 15μl οξικού νατρίου συγκέντρωσης 3 M.
- ο Τα Eppendorfs τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20 βαθμούς Κελσίου για 30 λεπτά και μετά πραγματοποιείται φυγοκέντρωση με τις ίδιες συνθήκες που προαναφέρθηκαν.
- ο Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού και προσθήκη 200 μl αιθανόλης 70% (παγωμένη) και ξανά φυγοκέντρωση αλλά για διάρκεια 5 λεπτών.
- ο Επανάληψη του παραπάνω βήματος.
- ο Αφαίρεση της περίσσειας αιθανόλης και αφυδάτωση πελέτας σε κλίβανο για 30 με 35 λεπτά. Για να λειτουργήσει αποτελεσματικά η PCR θα πρέπει να μην υπάρχει ίχνος αιθανόλης στο φιαλίδιο.
- ο Προσθήκη 50 μl TE Buffer (10 Mm Tris-HCl, 1Mm EDTA, απιονισμένο νερό) στα Eppendorf με το DNA.

Όλη η διαδικασία ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε διάλυμα αγαρόζης 0,8 % w/v σε TBE, τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε υπεριώδες φως UV, μετά από φωτογράφιση του πηκτώματος. Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με την ίδια διαδικασία με πήκτωμα αγαρόζης 1,2% w/v σε TBE.

2.3 Ηλεκτροφόρηση

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκινάει με την κατασκευή του πηκτώματος. Για αυτό χρειάστηκε να τοποθετηθούν σε μια κωνική φιάλη (με μεγάλη ανθεκτικότητα σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες) 0,8 gr αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος TBE. Η κωνική φιάλη τοποθετείται στη συνέχεια στο φούρνο μικροκυμάτων του εργαστηρίου, για 3 λεπτά στους 90 βαθμούς Κελσίου, μέχρι το διάλυμα να έχει γίνει διαυγές. Με προστατευτικό θερμοανθεκτικό γάντι η φιάλη τοποθετείται κάτω από τρεχούμενο νερό για να πέσει η θερμοκρασία στους 50 βαθμούς Κελσίου. Μετά προστίθενται 4 μl φορμιδίου, που φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως για να μπορέσουν να απεικονιστούν οι ζώνες φθορισμού πάνω στο πήκτωμα της αγαρόζης.

Σε ένα εκμαγείο τοποθετείται το πήκτωμα αγαρόζης με προσοχή, έτσι ώστε να μην σχηματιστούν φυσαλίδες και μετά τοποθετείται η << χτένα>> για να σχηματιστούν οι οπές στις οποίες θα τοποθετηθεί το DNA. Έμεινε στο ψυγείο για λίγη ώρα έτσι ώστε να επιτευχθεί σταθεροποίηση και μετά αφαιρέθηκε η <<χτένα>> και το εκμαγείο τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Ακόμα, γίνεται προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TBE μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα.

Σε κάθε οπή φορτώθηκε με πιπέτα ποσότητα 6 μl : 4 μl DNA και 2 μl διαλύματος φόρτωσης χρωστικής μπλε βρωμοφενόλης (by pipetting, blue-bromophenol). Το διάλυμα φόρτωσης βοηθάει στο χρωματισμό των δειγμάτων και στη φόρτωσή τους στο πήκτωμα αγαρόζης. Αφού ολοκληρώθηκε η φόρτωση των 15 δειγμάτων, στο τέλος τοποθετήθηκε ο μάρτυρας (Ladder), ποσότητας 1 μl αναμεμειγμένο με διάλυμα φόρτωσης ποσότητας 2 μl. Για την ηλεκτροφόρηση είναι απαραίτητο να υπάρχει ομοιόμορφο πεδίο τάσης. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν

και παρουσιάστηκαν μέσω παρατήρησης της πηκτής κάτω από υπεριώδης λάμπα και φωτογράφιση μέσω της συσκευής DNR, MiniBisBio-ImagingSystems.



Εικόνα 4. Συσκευή φωτογράφισης των δειγμάτων

2.4 Η διαδικασία της PCR

Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση του μιτοχονδριακού γονιδίου COI. Το πρωτόκολλο PCR που εφαρμόστηκε αποτελείται από 30 κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης με τις παρακάτω συνθήκες:

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 ένα 30 s, 5). επανάληψη 2, 3, 4 x30 φορές, 6). 72 °C για 15 min , 7). 10 °C για να διατηρηθούν

Το PCR master mix που χρησιμοποιήθηκε είχε τα παρακάτω συστατικά και τις αντίστοιχες ποσότητες. Οι ποσότητες που προστέθηκαν πολλαπλασιάστηκαν επί τον αριθμό των δειγμάτων (16 δείγματα -> 15 DNA και ένα τυφλό).

Πίνακας 2. Συστατικά PCR Master mix

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Όγκος ανά δείγμα(μl)
DNA		
PCR Wat	9	144
Taq	8	128
Primers F1 & R1	16	20

Στα 15 Eppendorf προστέθηκε από 1 μl DNA, από το κάθε δείγμα, στο κάθε ένα και από 19 μl του μίγματος PCR Master mix. Στο τελευταίο Eppendorf, το 16ο δεν προστέθηκε ποσότητα DNA παρά μόνο 19 μl του PCR Master mix.

Για να ελεγχθούν τα αποτελέσματα της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των 16 δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης 1,2 % στη συγκεκριμένη περίπτωση. Η προετοιμασία και η περεταίρω διαδικασία είναι παρόμοια με την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων από την εξαγωγή του DNA.

Ακολούθησε το φόρτωμα στα πηγάδια. Οι αντίστοιχες ποσότητες ήταν 8 μl τελικού προϊόντος και 2 μl διαλύματος φόρτωσης. Άρα συνολικά στο κάθε πηγάδι θα έπρεπε να υπάρχει μια ποσότητα 10 μl από το κάθε δείγμα σε συνδυασμό με το διάλυμα φόρτωσης.



Εικόνα 5. Συσκευή και διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Αφού τελείωσε η ηλεκτροφόρηση το πηκτωμα μεταφέρθηκε για παρατήρηση σε UV και φωτογράφιση. Να σημειωθεί πως πραγματοποιήθηκε και 2^η φορά ηλεκτροφόρηση, που θα αναλυθεί παρακάτω.

2.5 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Αφού ολοκληρώθηκαν οι πειραματικές διαδικασίες, η συνέχεια του πειράματος έγινε στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου μέσω διαφόρων λογισμικών πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση των όσων βρέθηκαν μέσω της υλοποίησης του εργαστηριακού πρωτοκόλλου. Τα προγράμματα που βοήθησαν στην ανάλυση και επεξεργασία αλληλουχιών καθώς και στον έλεγχο της σχέσης μεταξύ των 2 πληθυσμών ήταν τα εξής : Aliview, Fabox, Arlequin, Diyabc.

Το Aliview είναι ένα πολύ γρήγορο πρόγραμμα παρατήρησης και επεξεργασίας αλληλουχιών. Βοηθάει στην εύκολη προβολή, συγχώνευση, αντιστοίχιση και γενικότερα επεξεργασία των αλληλουχιών του DNA των δειγμάτων.

Με το πρόγραμμα Fabox έγινε προσδιορισμός νέων και διαφορετικών απλοτύπων των πληθυσμών του είδους που εξετάζεται. Τα αποτελέσματά του χρησιμοποιήθηκαν για περεταίρω στατιστικές αναλύσεις.

Με τη χρήση του προγράμματος Arlequin, επιτυγχάνεται η ανάλυση δεδομένων πληθυσμιακής γενετικής και διαθέτει ένα σύνολο στατιστικών τεστ για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη γενετική των πληθυσμών και άλλα χαρακτηριστικά τους. Με αυτό το πρόγραμμα υπολογίστηκε η τιμή του δείκτη F_{st} , ένας δείκτης διακύμανσης μεταξύ των πληθυσμών. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Tajima's D , που στοχεύει στη διάκριση μεταξύ των απλοτύπων του DNA και αυτών που εξελίσσονται υπό μια τυχαία διαδικασία.

Μέσω της χρήσης του προγράμματος Diyabc δημιουργήθηκαν κάποια σενάρια σχετικά με το πότε διαχωρίστηκαν οι 2 πληθυσμοί που μελετώνται. Τα σενάρια ήταν 3 και το κάθε ένα περιλάμβανε μια διαφορετική εκδοχή για το πως ξεκίνησαν οι 2 πληθυσμοί πριν διαχωριστούν.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

Αφού πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή του DNA, ακολούθησε η φωτογράφιση του πηκτώματος και η παρατήρηση με την UV. Στην Εικόνα 3 απεικονίζονται τα ανεπιτυχή αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης που πραγματοποιήθηκε την 1^η φορά.

Το εργαστηριακό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, αρχικά δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση και αμέσως με την UV, δεν παρατηρήθηκε κάποιο αποτέλεσμα.



Εικόνα 6. 1η ηλεκτροφόρηση

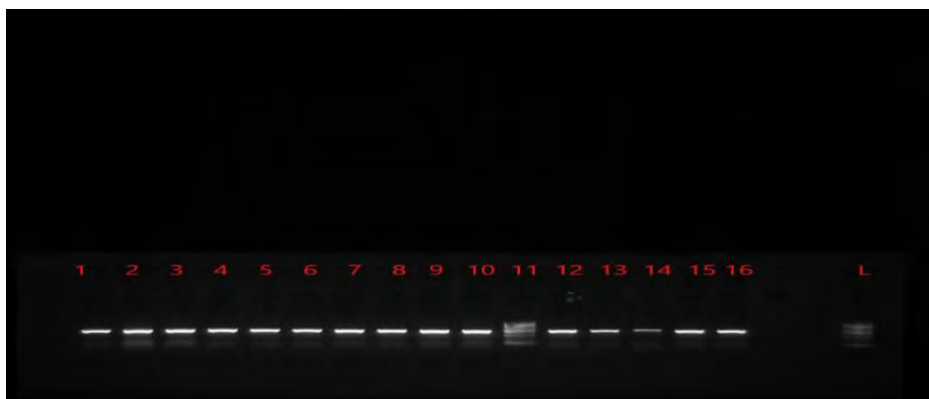
Στην παραπάνω φωτογραφία απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, μετά την εξαγωγή, τον καθαρισμό και την PCR που διενεργήθηκε στα δείγματα. Όπως φαίνεται μοιάζει να μην υπάρχει κάποια ποσότητα DNA, σε κανένα από τα δείγματα. Το τελευταίο στην άκρη δεξιά, είναι το << τυφλό >>, που έτσι και αλλιώς δεν περιέχει κάποια ποσότητα DNA.

Προφανώς έχει συμβεί κάποιο λάθος σε κάποιο στάδιο της διαδικασίας για αυτό και δεν υπήρξε κάποιο αποτέλεσμα.

Αν το λάθος οφείλεται

- στην ηλεκτροφόρηση, τότε μπορεί αυτό να είναι συνδεδεμένο με την κακή ποιότητα του DNA. Δηλαδή σε περίπτωση που δεν έχει καθαριστεί σωστά το DNA ή έχει υποστεί κάποια ζημιά, τότε δε γίνεται σωστά η ηλεκτροφόρηση.
- Στη μη επαρκή ύπαρξη ποσότητας DNA, για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ομαλά και αποτελεσματικά η ηλεκτροφόρηση.
- Σε άλλες παραμέτρους (ένταση ηλεκτρικού πεδίου, διάρκεια παλμού, κτλ.). Αυτό το σενάριο είναι λογικά απίθανο καθώς όλες οι παράμετροι ήταν ελεγμένοι και ρυθμισμένοι σύμφωνα με τις απαιτήσεις του είδους που μελετάται.

Στη συνέχεια και αφού πραγματοποιήθηκε ξανά η διαδικασία καθαρισμού του DNA, αλλά από το σημείο που προστίθεται το PCR Master Mix, επιτεύχθηκαν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Στην Εικόνα 4 απεικονίζεται η 2^η ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιήθηκε με σκοπό να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα για τα 16 δείγματα της έρευνας (15 δείγματα DNA, ένας τυφλός μάρτυρας).



Εικόνα 7. 2η ηλεκτροφόρηση

Η PCR είχε αποτέλεσμα αυτή τη φορά. Απεικονίζεται πολύ καθαρά το DNA των 15 δειγμάτων που από ότι φαίνεται λόγω της διαφάνειας του αποτελέσματος είναι και καλής ποιότητας και μεγάλης ποσότητας. Το δείγμα 14 είναι το ίδιο με το 16 στη φωτογραφία, απλά φορτώθηκε 2 φορές στην οπή του πηκτώματος, υπό το φόβο ότι δεν έγινε σωστά η φόρτωση και πιθανότατα το δείγμα να μην εμφάνιζε κάποιο ίχνος γενετικού υλικού.

Με το τέλος της PCR, ξεκίνησαν να διενεργούνται οι στατιστικές αναλύσεις μέσω των λογισμικών στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

3.2 Απλότυποι και στατιστικές αναλύσεις

3.2.1 Προσδιορισμός απλοτύπων

Πρώτα μέσω του προγράμματος Fabox έγινε προσδιορισμός των 5 κοινών απλότυπων των πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκαν για μετέπειτα στατιστικές αναλύσεις. Όπως θα επεξηγηθεί και παρακάτω και οι 2 πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν κανένα κοινό απλότυπο. Οι πληθυσμοί του Ιονίου παρουσιάζει 2 διαφορετικούς απλότυπους που δεν απαντώνται στους πληθυσμούς του Αιγαίου, ενώ οι πληθυσμοί του Αιγαίου έχουν 3 διαφορετικούς απλότυπους που επίσης δεν απαντώνται

αντίστοιχα στους πληθυσμούς του Ιονίου. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι 5 διαφορετικοί απλότυποι.

Πίνακας 3. Οι 5 απλότυποι των 2 πληθυσμών

ΑΡΙΘΜΟ Σ ΑΠΛΟΤΥ ΠΟΥ	ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ
1	ATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTGCCATTAATAA TCGGCGCCCCAGACATAGCAT TCCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGACTTTTACCCCCATCATTCTT CTACTACTAGCCTCCTCTGG AGTAGAGGCCGGAGCTGGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCT GGAAACTTAGCCACGCCGGG GCATCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATC AATTCTAGGGGCCATTAAC TTATTACTACAATCATTAAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCA AACTCCCCTGTTTGTATGAGC TGTATTAGTAACCGCCGTTTGTGCTACTCCTCTCCCTGCCAGTCCTAGCCG CAGGCATTACAATACTTCTG ACTGACCGAATC
2	ATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTGCCATTAATAA TCGGCGCCCCAGACATAGCAT TCCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGACTTTTACCCCCATCATTCTT CTACTACTAGCCTCCTCTGG AGTAGAGGCCGGAGCTGGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCT GGAAACTTAGCCACGCCGGG GCATCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATC AATTCTAGGGGCCATTAAC TTATTACTACAATCATTAAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCA AACTCCCCTGTTTGTATGAGC TGTATTAGTAACCGCCGTTTGTGCTACTCCTCTCCCTGCCAGTCCTAGCCG CAGGCATTACAATACTTCTG ACTGACCGAAAC
3	ATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTGCCATTAATAA TCGGCGCCCCAGACATAGCAT TCCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGACTTTTACCCCCATCATTCTT CTACTACTAGCCTCCTCTGG AGTAGAGGCCGGAGCTGGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCT GGAAACTTAGCCACGCCGGG GCATCTGTTGACCTGACAATTTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATC AATTCTAGGGGCCATTAAC TTATTACTACAATTATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA ACTCCCCTGTTTGTATGAGC TGTATTAGTAACCGCCGTTTGTGCTACTCCTCTCCCTGCCAGTCCTAGCCG CAGGCATTACAATACTTCTG

	ACTGACCGAATC
4	ATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTGCCATTAATAA TCGGCGCCCCAGACATAGCAT TCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGACTTTTACCCCCATCATTCTT CTACTACTAGCCTCCTCTGG AGTAGAGGCCGGAGCTGGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCT GGAAACTTAGCCACGCGGG GCATCTGTTGACCTGACAATTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATC AATTCTAGGGGCCATTAAT TTATTACTACAATTATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA ACTCCCCTGTTTGTATGAGC TGTATTAGTAACCGCCGTTTGTCTACTCCTCTCCCTGCCAGTCCTAGCCG CAGGCATTACAATACTTCTG ACTGACCGAAAC
5	ATGCCAGTAATAATTGGAGGATTTGGCAACTGACTTGTGCCATTAATAA TCGGCGCCCCAGACATAGCAT TCCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGACTTTTACCCCCATCATTCTT CTACTACTAGCCTCCTCTGG AGTAGAGGCCGGAGCTGGTACAGGCTGAACTGTATATCCACCCCTGGCT GGAAACTTAGCCACGCGGG GCATCTGTTGACCTGACAATTTCTCACTCCACCTTGCAGGTATTTTCATC AATTCTAGGGGCCATTAAT TTATTACTACAATTATTAACATGAAACCGCCTGCAATTACACAGTACCAA ACTCCCCTGTTTGTATGAGC TGTATTAGTAACCGCCGTTTGTCTACTCCTCTCCCTGCCAGTCCTAGCCG CAGGCATTACAATACTTCTG ACTGACCGAAAT

Οι 5 διαφορετικοί απλότυποι, όπως θα παρουσιαστεί και στον επόμενο πίνακα, δεν εντοπίζονται ταυτόχρονα και στους 2 πληθυσμούς. Αυτό αποτελεί μια ένδειξη της διαφοροποίησης των 2 πληθυσμών.

Πίνακας 4. Αντιστοίχιση απλοτύπων με πληθυσμούς.

ΑΠΛΟΤΥΠΟΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΤΟΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ
1	2I1 2I2

	2I3
2	2I4 2I5 2I6 2I7 2I8 2I9 2I10
3	A9
4	B4 C8
5	C9 C10

Τα δείγματα από 2I1 έως και 2I10 αποτελούν δείγματα που προέρχονται από το Ιόνιο Πέλαγος. Τα δείγματα A9, B4, C8, C9 και C10 αποτελούν δείγματα που προέρχονται από το Αιγαίο Πέλαγος.

3.2.2 Στατιστικές αναλύσεις με το πρόγραμμα Arlequin

Με τη χρήση του προγράμματος Arlequin, υπολογίστηκε ο δείκτης F_{st} και η τιμή p -value. Το F_{ST} ανά ζεύγη μετρά τη δομή του πληθυσμού, ως μέτρο της διαφοροποίησης λόγω γενετικής δομής. Έτσι σχηματίστηκαν οι παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5. Ανα ζεύγη διακύμανση πληθυσμών (Population pairwise Fst)

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	ΙΟΝΙΟ	ΑΙΓΑΙΟ
ΙΟΝΙΟ	0.00000	
ΑΙΓΑΙΟ	0.59176	0.00000

Η μελέτη του p-value βοηθάει στην εύρεση μίας πιθανούς στατιστικής σημαντικής διαφοράς. Στον πίνακα φαίνεται πως οι 2 πληθυσμοί Αιγαίο – Ιόνιο έχουν p-value μικρότερο του 0,05, συνεπώς εμφανίζουν στατιστική σημαντική διαφορά.

Πίνακας 6. Fst p-values

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	ΙΟΝΙΟ	ΑΙΓΑΙΟ
ΙΟΝΙΟ	*	*
ΑΙΓΑΙΟ	0.00000 +/- 0.00000	*

3.2.3 Σενάρια με το πρόγραμμα Diyabc

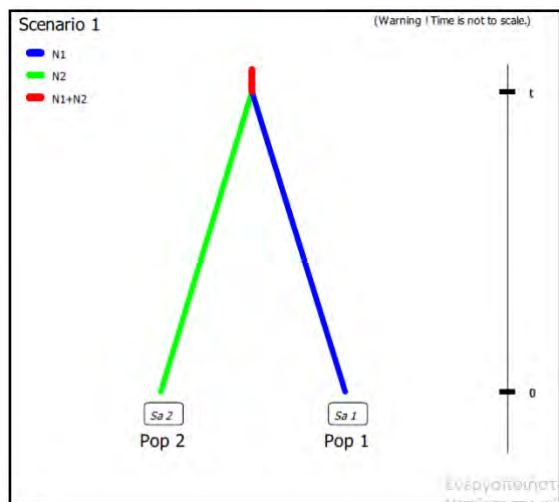
Με τη χρήση του λογισμικού DIYABC δημιουργήθηκαν κάποια σενάρια, με σκοπό την εύρεση του κατάλληλου, δηλαδή αυτού του σεναρίου που περιγράφει καλύτερα την κατάσταση του πληθυσμού. Είναι σενάρια που σχετίζονται με το πως προήλθαν οι 2 πληθυσμοί του Ιονίου και του Αιγαίου Πελάγους. Παρακάτω απεικονίζονται τα 3 διαφορετικά σενάρια.

Γενικότερα με τη χρήση του παραπάνω λογισμικού, διενεργήθηκαν 3 τεστ. Τα τεστ αυτά, είχαν ως σκοπό την εύρεση του καταλληλότερου σεναρίου σχετικά με το πως προήλθαν οι 2 πληθυσμοί του χελιού. Για το κάθε σενάριο, τέθηκε όριο αναφορικά με το χρόνο, δηλαδή τη διάρκεια στο πέρασμα των χρόνων, όπου η εφαρμογή με βάση τον προγραμματισμό του κάθε σεναρίου, έκανε έρευνα για το πότε

και αν έγινε διαχωρισμός του πληθυσμού. Και αυτό πάντα με βάση το όριο του χρόνου.

Ταυτόχρονα με τα σενάρια πραγματοποιήθηκε ανάλυση pca. Αποτελεί μια στατιστική μέθοδο, που εντοπίζει τις σημαντικότερες πληροφορίες από ένα σύνολο δεδομένων. Στην ουσία βοηθάει στην αποτύπωση της πληροφορίας από ένα σύνολο πληροφοριών.

1. ΤΕΣΤ 1



N1 N2
0 sample 1
0 sample 2
t merge 1 2
T varNe N1 + N2

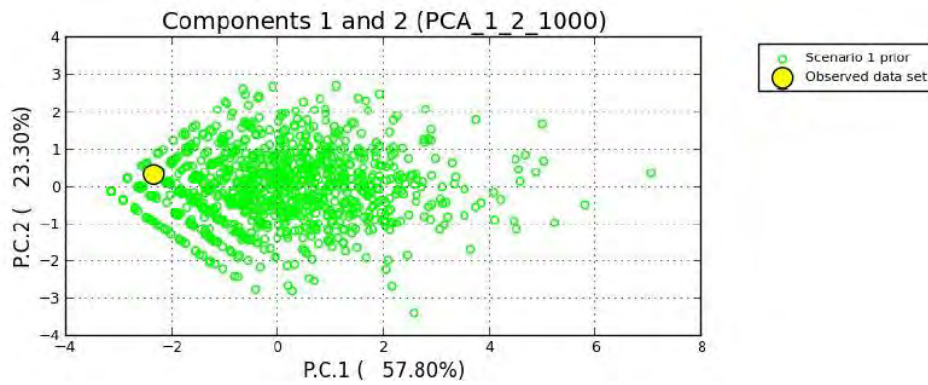
Εικόνα 8. Δέντρο αναπαράστασης του διαχωρισμού των 2 πληθυσμών

Το 1^ο τεστ, ξεκινάει με την υπόθεση ότι στην αρχή υπήρξε ένας κοινός πληθυσμός, ο οποίος διαχωρίστηκε στην πορεία του χρόνου στον πληθυσμό του Αιγαίου και στον πληθυσμό του Ιονίου. Τα όρια των παραμέτρων ορίστηκαν ως εξής:

$$10.0 < N1 < 1000000.0$$

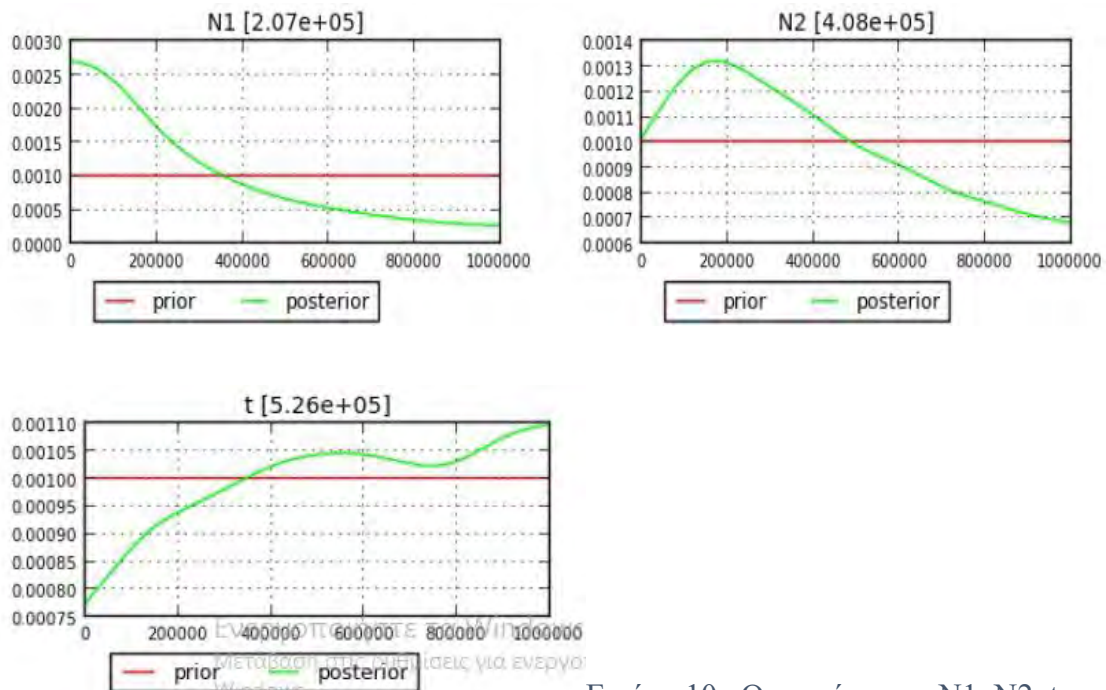
$$10.0 < N2 < 1000000.0$$

$$10.0 < t < 1000000.0$$



Εικόνα 9. PCA 1ου σεναρίου

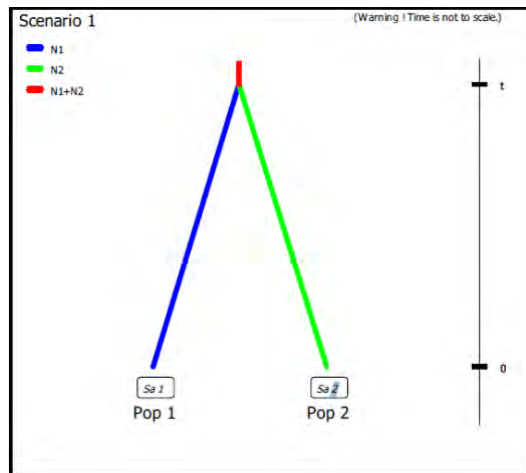
Από την ανάλυση pca του 1^{ου} τεστ, φαίνεται πως τα αποτελέσματα συνάδουν με τα όρια που έχουν τεθεί. Δηλαδή τα αποτελέσματα του τεστ είναι εντός ορίων.



Εικόνα 10 . Οι παράμετροι N1, N2, t

Σύμφωνα με τα posteriors των παραμέτρων, που αναφέρονται στην πιθανότητα ενός γεγονότος, τα όρια που είχαν οριστεί για το χρόνο, φαίνεται πως δεν καλύπτουν τη χρονική διάρκεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός του πληθυσμού. Για αυτό κρίνεται απαραίτητη η ανάγκη για διενέργεια 2^{ου} τεστ.

2. ΤΕΣΤ 2



N1 N2
0 sample 1
0 sample 2
T merge 1 2
T varNe N1 + N2

Εικόνα 11. Δέντρο αναπαράστασης διαχωρισμού 2ου σεναρίου

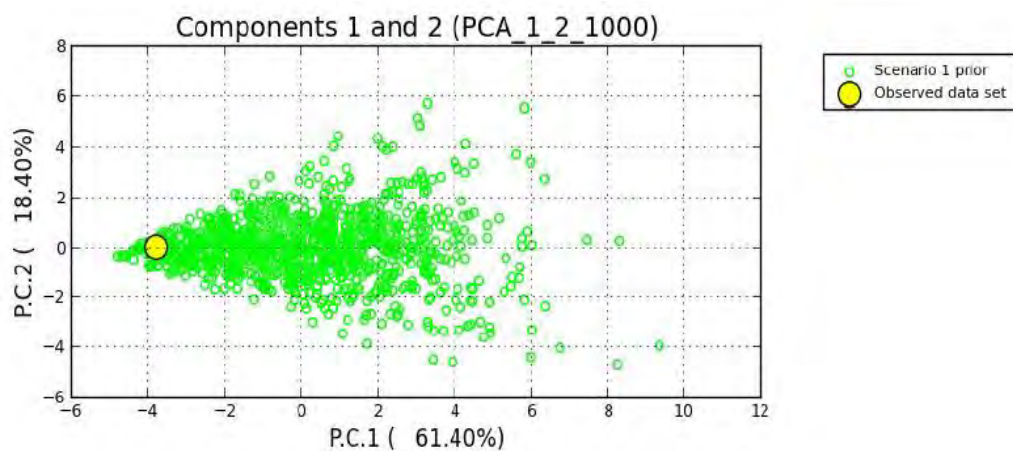
Το τεστ 2 έχει παρόμοια υπόθεση με το 1^ο, με διαφορά μόνο στα όρια της παραμέτρου t . Τα όρια για το 2^ο σενάριο ήταν τα εξής :

$$10.0 < N1 < 1000000.0$$

$$10.0 < N2 < 1000000.0$$

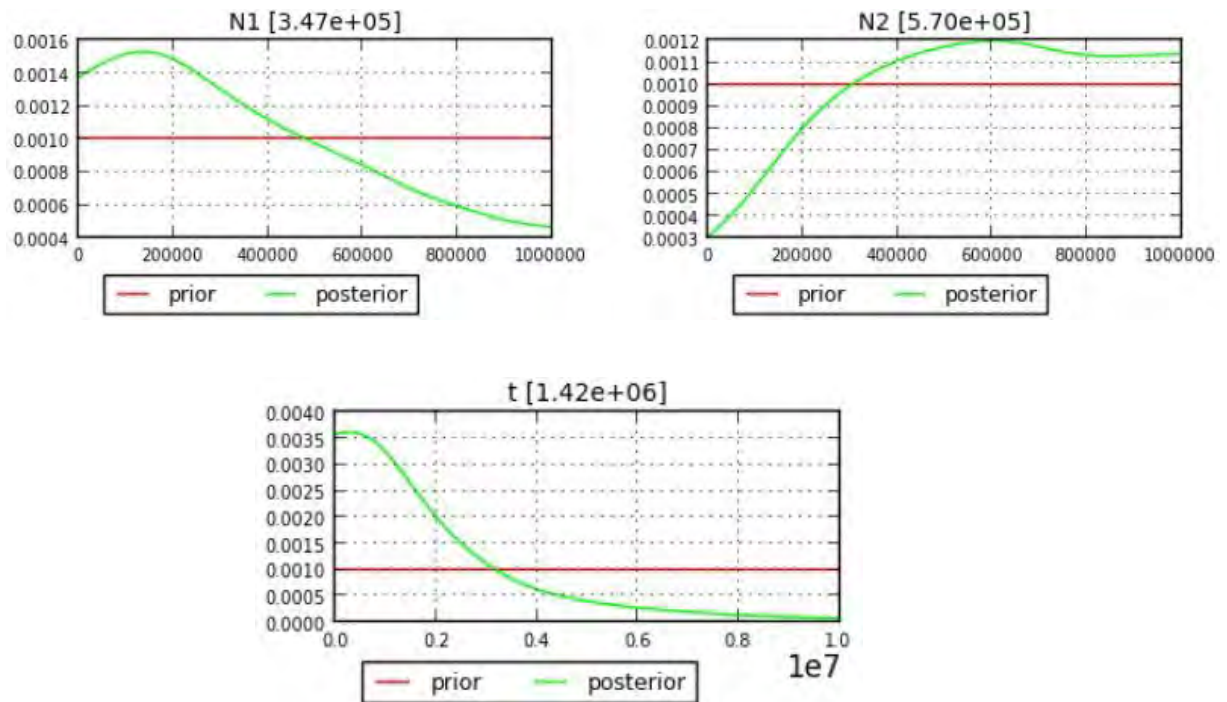
$$10.0 < t < 10000000.0$$

Στο συγκεκριμένο σενάριο είναι φανερό πως έχει αυξηθεί η παράμετρος του χρόνου. Έχει διευρυνθεί έτσι το πλαίσιο του χρόνου στο οποίο γίνεται αναζήτηση για το πότε μπορεί να πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του πληθυσμού του χελιού.



Εικόνα 12. PCA 2ου σεναρίου

Η παραπάνω εικόνα που παρουσιάζει την ανάλυση pca του 2^{ου} τεστ, παρουσιάζει το παρακάτω αποτέλεσμα. Το αποτέλεσμα δείχνει πως οι τιμές του τεστ συμπίπτουν με τα όρια που τέθηκαν, καθώς όπως παρουσιάζει και η pca τα αποτελέσματα κυμαίνονται εντός των τιμών των ορίων. Αρκεί βέβαια να γίνει και συσχέτιση και με τα posteriors.

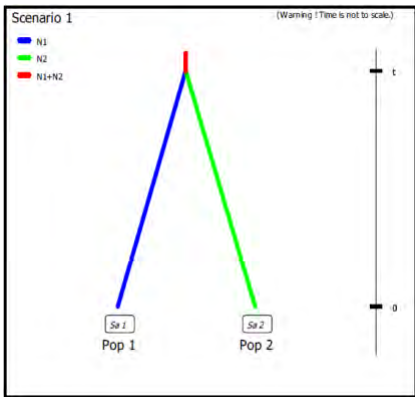


Εικόνα 13. Posteriors N1, N2, t

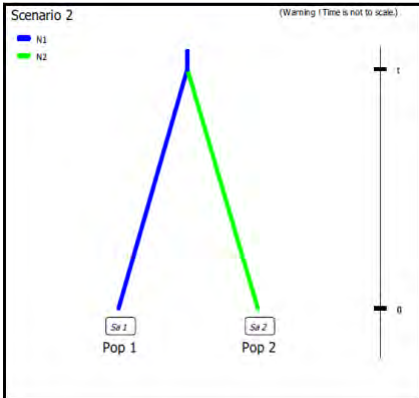
Τα posteriors του 2^{ου} τεστ δείχνουν κανονικές κατανομές. Οι παράμετροι N1 και t σχηματίζουν καμπύλες που σχετίζονται με το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η καμπύλη του N2 παραπέμπει σε κανονική κατανομή αλλά δεν παρουσιάζει ξεκάθαρο αποτέλεσμα. Για αυτό και κρίθηκε απαραίτητη η διενέργεια και 3^{ου} τεστ για την εύρεση πιο ξεκάθαρου αποτελέσματος, όσον αφορά την προέλευση των 2 πληθυσμών.

3. ΤΕΣΤ 3

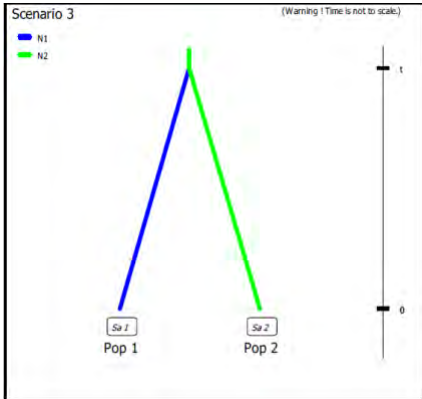
Το 3^ο τεστ αποτελείται από 3 διαφορετικά σενάρια.



N1 N2
0 sample 1
0 sample 2
t merge 1 2
t varNe N1 N2



N1 N2
0 sample 1
0 sample 2
t merge 1 2



N1 N2
0 sample 1
0 sample 2
t merge 2 1

Εικόνα 14. Τα σενάρια του 3ου τεστ

Το 1^ο σενάριο του 3^{ου} τεστ είναι παρόμοιο με αυτό των 2 παραπάνω τεστ, απλά έχουν τεθεί διαφορετικά όρια για την κάθε μία παράμετρο.

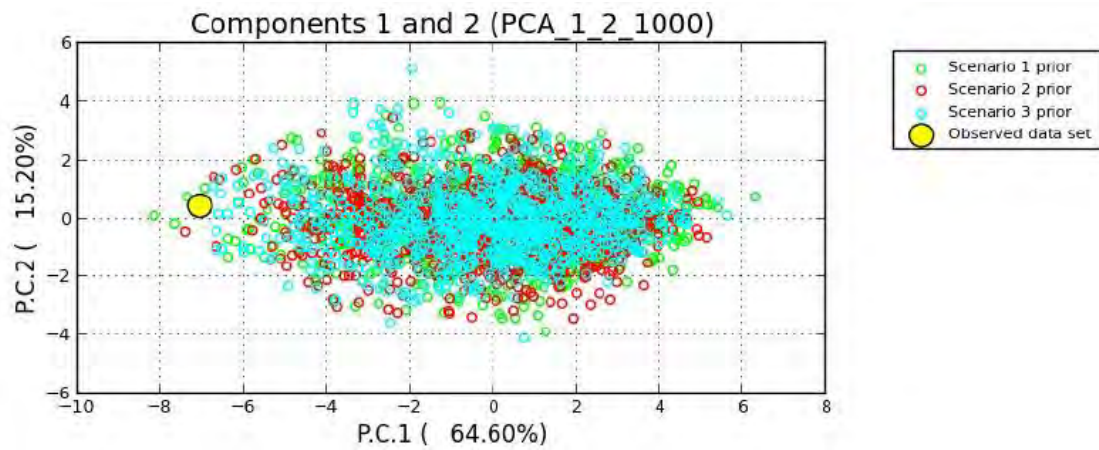
$$10.0 < N1 < 100000000$$

$$10.0 < N2 < 100000000$$

$$10.0 < t < 100000000$$

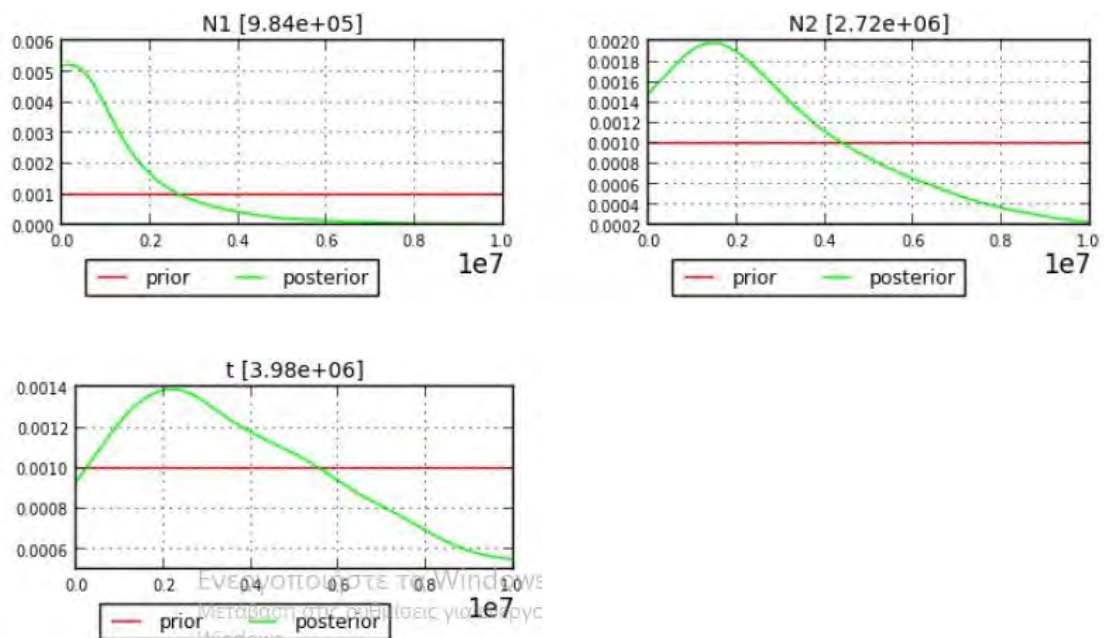
Το 2^ο σενάριο παρουσιάζει την υπόθεση πως πρώτα υπήρχε μόνο ο πληθυσμός N1, που στη συγκεκριμένη περίπτωση αυτός αντιστοιχεί στον πληθυσμό των χελιών του Ιονίου Πελάγους. Από τον N1 προέκυψαν 2 πληθυσμοί. Ο ένας εξακολουθεί να είναι ο N1, αλλά προέκυψε και ένας νέος πληθυσμός ο N2, που σύμφωνα με τις υποθέσεις του πειράματος που πραγματεύεται η εργασία, αντιστοιχεί στον πληθυσμό του Αιγαίου Πελάγους. Οι τιμές των ορίων των παραμέτρων είναι οι ίδιες με του πρώτου σεναρίου στο τεστ 3.

Το 3^ο σενάριο παρουσιάζει μια υπόθεση παρόμοια με αυτή του 2^{ου} σεναρίου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το σενάριο ξεκινά με κοινό πληθυσμό τον N2 (πληθυσμός Αιγαίου Πελάγους) από τον οποίο έγινε ο διαχωρισμός σε N2 και στον N1 που προέκυψε μετά και αντιστοιχεί στον πληθυσμό του Ιονίου Πελάγους. Οι τιμές των ορίων των παραμέτρων είναι οι ίδιες με τις τιμές του 1^ο σεναρίου στο τεστ 3.



Εικόνα 15. PCA 3ου τεστ

Αν παρατηρηθεί το αποτέλεσμα της pca, φαίνεται πως τα παρατηρούμενα δεδομένα απέχουν λίγο από το σύνολο των δεδομένων των άλλων σεναρίων. Ωστόσο προσεγγίζει ένα μέρος των δεδομένων, δε βρίσκεται όμως στο σύνολο όλων των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 16. N1, N2, t posteriors 3ου τεστ

Όπως μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό, το συμπέρασμα που εξάγεται από τα posteriors, του συγκεκριμένου τεστ, είναι πως και οι 3 παράμετροι ($N1$, $N1$, t), παρουσιάζουν κανονική κατανομή.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

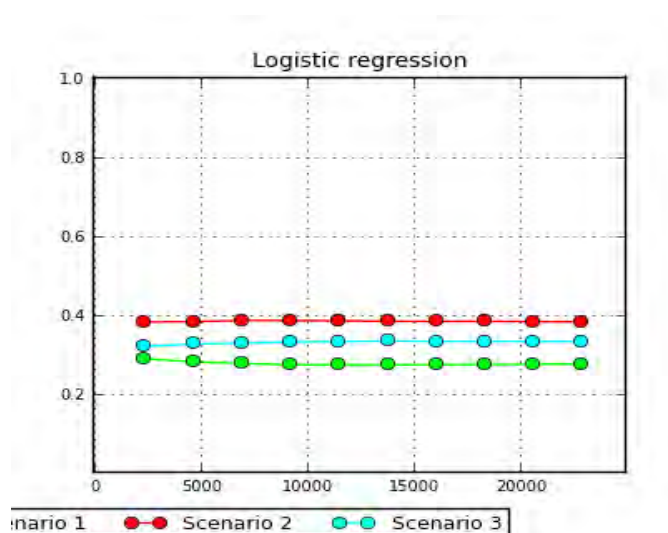
4.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Μετά από την ανάλυση των δεδομένων και σύμφωνα με τα αποτελέσματα των υπολογισμών που πραγματοποιήθηκαν, προέκυψαν ορισμένα συμπεράσματα. Αξίζει να σημειωθεί και να τονισθεί ο μικρός αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, μόλις 16 σε αριθμό εκ των οποίων τα 10 προέρχονταν από το Ιόνιο Πέλαγος και τα υπόλοιπα 6 από το Αιγαίο.

Τα γενετικά δεδομένα της εργασίας βασίστηκαν στο σύστημα NCBI, μετά από αναζήτηση στη βάση δεδομένων του γονιδίου COI. Επιπλέον η εφαρμογή Fabox παρουσίασε 5 διαφορετικούς απλότυπους. Σύμφωνα με τον Πίνακα 4, οι πρώτοι δύο απλότυποι εντοπίζονται στους πληθυσμούς του *A. anguilla* του Ιονίου Πελάγους, ενώ οι άλλοι τρεις στους πληθυσμούς που βρίσκονται στο Αιγαίο Πέλαγος. Αυτό αποτελεί ένα στοιχείο πάνω στο οποίο μπορεί να στηριχτεί η άποψη πως οι 2 πληθυσμοί έχουν διαχωριστεί γενετικά. Το ότι εμφανίζουν μοναδικούς απλότυπους, σημαίνει ότι οι δύο πληθυσμοί έχουν γενετικά διαφορετικές αλληλουχίες DNA σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Αυτή είναι και μία από τις αιτίες που καθορίζουν τη γενετική ποικιλότητα και την εξέλιξη των πληθυσμών. Η ύπαρξη ξεχωριστών απλοτύπων, δηλώνει επίσης την ανεξάρτητη εξέλιξη των δύο αυτών πληθυσμών για ένα χρονικό διάστημα ή την περιορισμένη μεταξύ τους ανταλλαγή γονιδίων.

Με τη χρήση του προγράμματος DIYABC διενεργήθηκαν 3 διαφορετικά τεστ, που το κάθε ένα παρουσίαζε και αντιπροσώπευε διαφορετικά σενάρια. Η αδυναμία αντιστοίχισης των ορίων των παραμέτρων με τα αποτελέσματα και τα posteriors, οδηγούσε κάθε φορά σε καινούργιο τεστ. Το 3^ο τεστ που διενεργήθηκε ήταν αυτό που εμφάνισε αποτελέσματα που συμβάδιζαν με τα όρια που είχαν τεθεί για τις

παραμέτρους και έτσι, στις τιμές αυτές βασίστηκε το αποτέλεσμα. Επίσης έγινε ανάλυση για το ποιο σενάριο συγκεντρώνει τις περισσότερες πιθανότητες να ισχύει από τα τρία.



Εικόνα 17. Πιθανότητες για την ισχύ των 3 σεναρίων του τεστ 3

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, το σενάριο 2 του τεστ 3 συγκεντρώνει τη μεγαλύτερη πιθανότητα να ισχύει με ποσοστό 40% . Ακολουθεί το σενάριο 3 με ποσοστό περίπου λίγο μεγαλύτερο από 30% και το σενάριο 1 τελευταίο με ποσοστό κοντά στο 30%. Το σενάριο 2 υποστηρίζει πως στην αρχή υπήρχε ένας κοινός πληθυσμός που εμφάνιζε τα χαρακτηριστικά του *A. anguilla* του πληθυσμού του Ιονίου Πελάγους. Με την πάροδο των χρόνων έγινε διαχωρισμός αυτού του πληθυσμού και δημιουργήθηκε ένας νέος πληθυσμός *A. anguilla* του Αιγαίου Πελάγους. Δηλαδή αυτό δείχνει ότι ένα κομμάτι του πληθυσμού διαχωρίστηκε και δημιουργήθηκε έτσι ένας νέος πληθυσμός που έχει διαφοροποιηθεί σε ορισμένα χαρακτηριστικά του από τον αρχικό αλλά μπορεί να διατηρεί ορισμένα κοινά.

Συνέχεια έχει η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, που εξήχθησαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Arlequin. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι τιμές του F_{st} ενώ στον Πίνακα 6 οι τιμές του p -value. Για τον δείκτη F_{st} ισχύει ότι παίρνει τιμές από 0 – 1. Τι σημαίνουν οι τιμές του F_{st} ; Εάν έχει μικρή τιμή τότε οι συχνότητες των αλληλομόρφων εντός κάθε πληθυσμού είναι παρόμοιες, και εάν είναι μεγάλη, σημαίνει ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων είναι διαφορετικές σε ποσοστό που υποδεικνύει το αποτέλεσμα του δείκτη. Το F_{st} στη συγκεκριμένη περίπτωση ισούται με 0.59176, σχετικά μεγάλο. Επομένως αυτό σημαίνει πως οι συχνότητες των αλληλομόρφων είναι διαφορετικές, ένα ακόμα δείγμα πως οι δύο πληθυσμοί διαφέρουν. Το p -value επίσης είναι περίπου ίσο με 0, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αποτυπώνονται στον Πίνακα 6, που σημαίνει πως στατιστικά είναι πολύ σημαντικό, άρα υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

4.2 Οι πληθυσμοί *A. anguilla* του Ιονίου και του Αιγαίου Πελάγους

Το *A. anguilla*, γνωστό και ως ευρωπαϊκό χέλι, συναντάται πέρα από το Ιόνιο και το Αιγαίο Πέλαγος και σε άλλες θάλασσες, όπως τα ύδατα του Ατλαντικού, τη Βόρεια Θάλασσα, τη Μεσόγειο και τη Μαύρη. Γενικότερα αυτά τα ψάρια πραγματοποιούν μεγάλα ταξίδια τεραστίων αποστάσεων για την αναπαραγωγή τους. Αποχωρίζονται τα θαλάσσια οικοσυστήματα και καταλήγουν σε ποτάμια ή λίμνες όπου αναπαράγονται. Τα μικρά χέλια, εν συνεχεία επιστρέφουν στη θάλασσα για τη συνέχεια της ζωής τους. Όλες αυτές οι μεταναστεύσεις σε διαφορετικά ύδατα αποτελούν στάδια στη ζωή του χελιού.

Αυτά τα στάδια είναι αρκετά και πολύπλοκα και με βάση ορισμένους παράγοντες καθορίζεται η διάρκεια της γενιάς του χελιού. Τέτοιοι παράγοντες είναι : οι συνθήκες περιβάλλοντος, η θέση αναπαραγωγής, οι θαλάσσιες και ενδοποταμιακές

διαδρομές και άλλοι βιολογικοί παράγοντες. Συμπερασματικά το είδος *A. anguilla* μπορεί να επιβιώσει στη θάλασσα για πολλά έτη, επιστρέφοντας στα εσωτερικά ύδατα για αναπαραγωγή. Ενδεικτικά, μια γενιά διαρκεί κατά μέσο όρο από 10 έως και 20 έτη, ενώ σε μερικές περιπτώσεις έχουν βρεθεί και παραπάνω έτη ζωής, ανάλογα με τις συνθήκες και τους παράγοντες που επηρεάζουν τη ζωή τους. Βέβαια αυτό είναι κάτι πολύ γενικευμένο και η διάρκεια ζωής ποικίλει αναλόγως τον τόπο και τις συνθήκες ζωής.

Το 3^ο τεστ του Diyabc , σε συνδυασμό με τις πιθανότητες των σενάρια του, είχε το εξής αποτέλεσμα. Ο πληθυσμός του Ιονίου, εμφανίζεται ως ένας κοινός αρχικός πληθυσμός. Στο πέραςμα των χρόνων και μετά από πολλές γενεές χελιών, ο παραπάνω πληθυσμός διαχωρίστηκε. Εκτός του ήδη υπάρχοντος, δημιουργήθηκε ένας νέος, αυτός του Αιγαίου. Προφανώς η αιτία είναι ότι το χέλι είναι ένα μεταναστευτικό είδος και η μετάβαση από τον έναν τόπο στον άλλο προκάλεσε αυτό το γενετικό διαχωρισμό. Διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και ο ανταγωνισμός με τα υπόλοιπα είδη ανάγκασε τον πληθυσμό του χελιού να προσαρμοστεί για να επιβιώσει.

Γενικότερα το χέλι, όπως προαναφέρθηκε αποτελεί ένα μυστηριώδες είδος με πολλές άγνωστες πτυχές. Πραγματοποιούνται συνεχώς πολλές έρευνες για την κατανόηση του κύκλου ζωής, της αναπαραγωγής του και άλλα γενετικά χαρακτηριστικά. Η διάκριση του πληθυσμού του Ιονίου Πελάγους έδωσε έναν ακόμη νέο πληθυσμό και αυτό αποτέλεσε μια εξελικτική διαδικασία μέσω της οποίας δημιουργήθηκε ένα νέο βιολογικό είδος από ένα μοναδικό πατρικό. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές, επιβεβαιώνεται το παραπάνω πόρισμα. Ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες που να ενισχύουν το αποτέλεσμα του γενετικού διαχωρισμού του χελιού του Ιονίου Πελάγους με το χέλι του Αιγαίου Πελάγους. Είναι σημαντική η

αναφορά παρόμοιων μελετών για το χέλι που παρουσιάζουν γενετική διαφοροποίηση και σε άλλες περιοχές, όπου και εντοπίζονται. Ο Rojular και οι συνεργάτες μελέτησαν γυαλόχελα από τον Βискаϊκό Κόλπο του Βορείου Ατλαντικού ωκεανού και από τη Δυτική Μεσόγειο και εντόπισαν γενετική διαφοροποίηση. Και αυτοί χρησιμοποίησαν παρόμοιους μοριακούς δείκτες για την έρευνά τους. Αντίθετα ο Palm σε άλλη έρευνα στην Ιταλία και τη Βαλτική Θάλασσα, τα στατιστικά της δεδομένα υποδηλώνουν πως δεν υπάρχει γενετική διαφοροποίηση

Τα στατιστικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις τιμές του δείκτη F_{st} και του p -value, στην παρούσα διπλωματική εργασία, απέδειξαν ότι οι δύο πληθυσμοί διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Αξίζει να προστεθεί και η ύπαρξη μοναδικών απλοτύπων για τον κάθε πληθυσμό, για την εξαγωγή του συμπεράσματος πως υπάρχει γενετικός διαχωρισμός μεταξύ των πληθυσμών του Ιονίου και του Αιγαίου Πελάγους του είδους *Anguilla anguilla*.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν, μπορούν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι το χέλι δεν μπορεί να θεωρηθεί πανμικτικό είδος. Πανμικτικό είδος σημαίνει ότι τα γενετικά ώριμα άτομα ζευγαρώνουν τυχαία ακριβώς στον ίδιο τόπο και χρόνο. Όλα τα χέλια συμπεριλαμβάνοντας και το ευρωπαϊκό χέλι, είναι γνωστό ότι αναπαράγονται σε συγκεκριμένο μέρος μέσω μετανάστευσης και επιστρέφουν τα νεαρά στον τόπο των γονέων τους. Μερικοί ακόμη μελετητές (Daemen et al. 2001; Wirth and Bernatchez, 2001; Maes and Volckaert, 2002) που είχαν την άποψη ότι τα ωκεάνια ρεύματα είναι αυτά που προκαλούν διαφορετική και τυχαία κατανομή των προνυμφών με αποτέλεσμα την εμφάνιση γενετικής διαφοροποίησης (Kettle and Haines, 2006).

4.3 Διαχειριστικά μέτρα στο Ιόνιο και το Αιγαίο Πέλαγος

Τα αποτελέσματα της έρευνας αποκάλυψαν διαφοροποίηση του *A. anguilla* μεταξύ των πληθυσμών του Ιονίου και του Αιγαίου Πελάγους. Η προστασία του είδους μεταξύ των δύο αυτών περιοχών απαιτεί συντονισμένη δράση και διαχείριση, λαμβάνοντας υπόψιν τη γενετική διαφοροποίηση.

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα διαχειριστικά μέτρα που θα μπορούσαν να εφαρμοσθούν. Αρχικά η επιτήρηση και η διεξαγωγή εκτεταμένης έρευνας για τη γενετική διαφοροποίηση του είδους, θα βοηθήσει στην κατανόηση της κατάστασης και στον καθορισμό κατάλληλων δράσεων στις συγκεκριμένες περιοχές. Βαθμιαία η απόκτηση γνώσης και η εποπτεία των περιοχών, καθιστά αναγκαία την εκπαίδευση και ευαισθητοποίηση των ντόπιων κοινοτήτων. Χρειάζεται να γνωρίσουν τη σημασία της διατήρησης της γενετικής ποικιλομορφίας, για να υποστηρίξουν και οι ίδιες οι κοινότητες τα προστατευτικά μέτρα.

Ένα ακόμη μέτρο, αποτελεί η δημιουργία περιοχών προστασίας σε κρίσιμους και σημαντικούς βιότοπους. Αυτό θα βοηθούσε στη διατήρηση γονιδίων και της γενετικής ποικιλομορφίας. Ακόμα επιβάλλεται η διαχείριση της αλιείας, μέσω της εφαρμογής κανόνων και μέτρων. Η εφαρμογή περιοριστικών μέτρων στην αλιεία, σε περιοχές με υψηλή γενετική διαφοροποίηση, μπορεί να βοηθήσει στη διατήρηση τοπικών πληθυσμών. Επίσης απαιτείται συνεργασία των γειτονικών χωρών και συμμετοχή οργανώσεων για την προστασία του είδους και τη διασφάλιση της βιωσιμότητάς του.

Όλα τα παραπάνω μέτρα αποσκοπούν στην προστασία του είδους και τη διατήρηση της γενετικής του ποικιλομορφίας μεταξύ Ιονίου και Αιγαίου Πελάγους. Ιδανικά κρίνεται απαραίτητο στο μέλλον να πραγματοποιηθεί εκ νέου δειγματοληψία

και έλεγχος για την μελέτη της διαφοροποίησης και το αν καθίσταται εφικτή η βιωσιμότητα, για να εξετασθεί και αν τα διαχειριστικά μέτρα είναι επιτυχή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

- 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων, Διαχείριση Υδάτινων Οικοσυστημάτων Νέες Προκλήσεις και Προοπτικές
- Γκολομάζου Ε. (2002), Μελέτη της βιολογίας του Ευρωπαϊκού χελιού *Anguilla anguilla* L. στη λιμνοθάλασσά 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
- Νεοφύτου Χ. (2015). Βιολογία Ιχθύων και Θαλάσσιων Θηλαστικών. Σελ.53-57, Θεσσαλονίκη, UNIVERSITY STUDIO PRESS
- 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

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- 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*
- Astrom M. & Dekker, W. (2007). When will the eel recover? A full life-cycle model. *ICES Journal of Marine Science*, 64(7), 1491-1498.
- Boetius I. 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 the Gulf of Lions-Catalan Sea (western Mediterranean) and the Cretan sea (eastern Mediterranean)

- Davis, G. P. & Hetzel D. J. S. (2000). Integration of molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture 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.
- 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
- Haro A.J., Krueger W. H., 1988. Pigmentation, size, and migration of elvers (*Anguilla rostrata* (Lesueur)) in a coastal Rhode Island stream. *Canadian Journal of Zoology*, 66: 2528-2533
- 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. Proman, J. D. Reynolds (2000) Differences in head shape of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.)
- 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.

- Mei-Chen Tseg, Overview and current trends in studies on the evolution and phylogeny of *Anguilla*
- 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
- Patterson, C., 1993. Osteichthyes: teleostei. In: Benton, M.J. (Ed.), The Fossil Record 2. Chapman and Hall Press, London, pp. 621–656.
- S. A. Miller, D. D. Dykes and H.F. Polesky (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
- 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
- Tsukamoto, K., and Aoyama, J. (1998). Evolution of the freshwater eels of the genus *Anguilla*: A probable scenario. *Environ. Biol. Fish.* 52: 139–148.
- 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.

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

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

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

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

www.github.com/Aliview

[Age determination of *anguilla anguilla* \(l\) and related species \(fao.org\)](#)

ABSTRACT

This study researches the population genetics of *Anguilla anguilla*. The purpose is to draw conclusions for the discrimination of the populations of the Aegean and Ionian Sea, in accordance with the processing of statistical data. Eels are carnivorous fish that live in all types of water. In general, eel is a mysterious species, with its reproduction being a bit of a mystery. The samples used, were kept in the freezer of the ichthyology laboratory of the university of Thessaly at the Department of Agriculture, Ichthyology and Aquatic environment. DNA was isolated from the tissue of 16 eels (10 from the Ionian, 6 from the Aegean) The experiment was performed using a mitochondrial gene, cytochrome oxidase i. PCR and electrophoresis of the results were also performed. The DNA sequences were edited with the programs Aliview, Fabox, Arlequin, Diyabc. 5 new different haplotypes were found, none of which were common to the 2 populations. For the comparison of the populations, the Fst index p-value were calculated. The results were found statistically very significant, a fact that leads to the conclusion that there is a genetic differentiation between Ionian and Aegean population.

Key words : *Anguilla anguilla*, population genetics, gene COI, genetic differentiation, Ionian and Aegean Sea