

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η πληθυσμιακή γενετική δομή του μπακαλιάρου *Merluccius merluccius* στην Μεσόγειο Θάλασσα»

**ΜΠΑΤΣΟΥΛΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΠΟΛΑΤΙΔΗΣ ΠΑΥΛΟΣ**

ΒΟΛΟΣ 2024

**«Η πληθυσμιακή γενετική δομή του μπακαλιάρου *Merluccius merluccius* στην
Μεσόγειο Θάλασσα»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) **Γεώργιος Γκάφας:** Αναπληρωτής Καθηγητής, Μοριακή Βιολογία της Διατήρησης Θαλάσσιων Θηλαστικών και Ιχθυοαποθεμάτων, 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, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος.***

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

Αφιερώνεται στις οικογένειές μας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση και υλοποίηση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Ευχαριστούμε θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της πτυχιακής μας κύριο Γεώργιο Γκάφα για την πολύτιμη βοήθειά του και την καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια συγγραφής της εργασίας μας. Επίσης οφείλουμε ένα τεράστιο ευχαριστώ στην κυρία Ιωάννα Σαραντοπούλου για την βοήθεια της κατά το εργαστηριακό μέρος του πειράματός μας αλλά και στον κύριο Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για τα δείγματα που μας παρείχε και χρησιμοποιήσαμε για την συγκεκριμένη εργασία. Τέλος ευχαριστούμε τις οικογένειες μας και τους φίλους μας που ήταν δίπλα μας στηρίζοντάς μας σε όλη την διάρκεια των σπουδών μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία είναι μία μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής του είδους *Merluccius merluccius* σε διάφορες χώρες της Μεσογείου. Σκοπός είναι να εξαχθούν συμπεράσματα για την πληθυσμιακή κατάταξη και να συγκριθούν τα διαθέσιμα δεδομένα. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με τράτα βυθού στον Τωρωναίο κόλπο. Έπειτα αποσπάστηκε γενετικό υλικό από 20 άτομα. Το τμήμα DNA μιτοχondριακού γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI), ενισχύθηκε με PCR και ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση. Από την βάση δεδομένων της GenBank ανακτήθηκαν αλληλουχίες από πληθυσμούς της Γαλλίας, της Τουρκίας, της Μάλτας, της Ιταλίας, της Ισπανίας και της Πορτογαλίας. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αλληλουχιών με τα προγράμματα Aliview, MEGA, Arlequin και popArt. Έπειτα, τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum likelihood). Τα αποτελέσματα δείχνουν σχετικά χαμηλή διαφοροποίηση ανάμεσα στους Μεσογειακούς πληθυσμούς. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην ικανότητα των μπακαλιάρων να ξεπερνούν ωκεανογραφικά εμπόδια, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την μεγάλη μεταναστευτική τους ροή και την υψηλή ομομιξία.

Λέξεις κλειδιά: *Merluccius merluccius*, πληθυσμιακή γενετική, γονίδιο COI, γενετική διαφοροποίηση, Τωρωναίος Κόλπος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Βιοποικιλότητα των Γαδόμορφων (Gadiformes) ανά τον κόσμο	1
1.2. Είδη των Gadiformes στην Μεσόγειο	3
1.3. Πληθυσμιακές μελέτες των ειδών της Μεσογείου	4
1.4. Πληθυσμιακές μελέτες για το είδος <i>Merluccius merluccius</i>	6
1.5 Μιτοχονδριακοί γενετικοί δείκτες και κυτοχρωμική οξειδάση (CO1).....	9
1.5.1 Μιτοχονδριακοί γενετικοί δείκτες	9
1.5.2 Υπομονάδα 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI)	11
1.6 Σκοπός της Έρευνας και Υποθέσεις.....	16
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	17
2.2.Ηλεκτροφόρηση DNA.....	18
2.3.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	20
2.4.Ηλεκτροφόρηση Αποτελεσμάτων PCR.....	20
2.5.Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων	21
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1.Ηλεκτροφόρηση PCR.....	23
3.2.Φυλογενετικό Δέντρο	25
3.3.Στατιστική Ανάλυση	26
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	28
4.1 Ανάλυση Αποτελεσμάτων	28
4.2 Η κατανομή του πληθυσμού στην Ανατολική Μεσόγειο	29
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36
ABSTRACT	37

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βιοποικιλότητα των Γαδόμορφων (Gadiformes) ανά τον κόσμο

Οι Gadiformes κατανέμονται σε όλους τους ωκεανούς και τα γλυκά νερά της Βόρειας Αμερικής και της Ευρασίας από τους βυθούς των βαθέων υδάτων μέχρι τα έως τα παράκτια ύδατα καθώς και σε ποτάμια και λίμνες. Η βιογεωγραφία της συγκεκριμένης τάξης των Ακτινοπτερυγίων έχει συζητηθεί αρκετά καθώς ο Svetovidov (1948) μας έδωσε την πρώτη υπόθεση για την βιογεωγραφία των Gadidae η οποία ήταν άκρως πειστική αφού ο ίδιος βασίστηκε στις γεωλογικές και κλιματικές αλλαγές, τον τόπο και τον χρόνο των απολιθωμάτων και άλλες πληροφορίες από υπάρχοντα είδη.

Ο Howes (1991b) αργότερα ερεύνησε σε βάθος την βιογεωγραφία των Gadidae βασιζόμενος στις σχέσεις μεταξύ τους ξεχωρίζοντας 6 διαφορετικά μοτίβα μεταξύ τους ενώ συμπέρανε πως αυτά τα μοτίβα δημιούργησαν μια πλειομορφική σφαιρική κατανομή των γαδόμορφων η οποία διαταράχθηκε από τον σχηματισμό του Ατλαντικού Ωκεανού που αποτέλεσε παράγοντα για την εξέλιξη των υπεργαδόμορφων μέσα από συμβάντα όπως τροποποίηση της υφαλοκρηπίδας αλλά και κλιματική αλλαγή. Επιπλέον συμπέρανε πως η φυλογενετική τάση μεταξύ των γαδόμορφων φαίνεται να υπήρχε από τα ωκεάνια προς τα ενδιαιτήματα της υφαλοκρηπίδας παρά από το αντίστροφο που μέχρι τότε ήταν κοινώς αποδεκτό.

Σύμφωνα με τον Howes τα πρότυπα κατανομής για τα γαδόμορφα μπορούν να συνοψιστούν στα εξής: 1) Ο Ατλαντικός Ωκεανός είναι κοινός για όλες τις οικογένειες με εξαίρεση τις Euclichthyidae και Muraenolepididae με τον Βόρειο Ατλαντικό να είναι το σημείο διανομής τους 2) Η διπολικότητα που αφορά τον Ατλαντικό

εμφανίζεται στα Gadidae Merlucciidae, Macruronidae και Macrouridae 3) Οι οικογένειες όπως οι Melanonidae και Macrouridae, εμφανίζονται στον Ινδικό Ωκεανό 4) Οικογένειες όπως οι Merlucciidae και Gadidae εμφανίζονται στον Ειρηνικό Ωκεανό 5) Οι οικογένειες Steindachneriidae (Καραϊβική), Euclichthyidae (στα ανοιχτά της Νότιας Αυστραλίας και της Νέας Ζηλανδίας), Ranicipitidae (βόρειες ευρωπαϊκές ακτές) και Muraenolepididae (Νότιος Ωκεανός) είναι ενδημικά, τέλος 6) υπάρχει περιφερειακή παγκόσμια κατανομή μέσω του Ατλαντικού και του Ινδικού Ωκεανού ενώ ο Ειρηνικός Ωκεανός είναι κοινός για τις Melanonidae, Macrouridae, Moridae, Macruronidae και Bregmacerotidae.

Ενώ τα Gadidae απαντώνται στον Ατλαντικό, Νότιο Ωκεανό καθώς και στους Βόρειο και Νότιο Ειρηνικό Ωκεανό εκλείπουν από τα ανοιχτά του Ειρηνικού και της Μέσης Αμερικής (e.g., Svetovidov, 1948 ; Cohen et al., 1990; Howes, 1991 b). Ανάμεσα στην τάξη των Gadiformes οι οικογένειες Gaidropsarinae, Phycinae και Gadinae εμφανίζουν μια διπολικότητα ως προς την κατανομή τους. Από την άλλη πλευρά στον Βόρειο Ειρηνικό έχουν εισέλθει μέσω του Βερίγγειου πορθμού κατά την γεωλογική εποχή που δημιουργήθηκε και αργότερα επανεκτιμήθηκε από τους Marincovich και Gladenkov (1999) ότι ξεκίνησε περίπου 7,4 εκατομμύρια χρόνια ενώ ολοκληρώθηκε στα 5,5-4,8 εκατομμύρια χρόνια από σήμερα. Η Οικογένεια Phycinae ενδέχεται να έχει διασκορπιστεί από τον Βόρειο στον Νότιο Ατλαντικό.

Εν κατακλείδι, οι υποοικογένειες των Gadidae εκτός από τις Phycinae χαρακτηρίζονται από φυλογενετική διασπορά από τον Βόρειο Ατλαντικό έως τον Αρκτικό Ωκεανό. Τέλος, οι Gadidae εισήλθαν στον Βόρειο Ειρηνικό μόνο μέσω του Βερίγγειου Πορθμού.

1.2. Είδη των Gadiformes στην Μεσόγειο

Ο Cohen, 1990 καταγράφει και αναφέρει βιβλιογραφικά αλλά και γεωγραφικά διάφορα είδη και γένη μπακαλιάρου στην Μεσόγειο Θάλασσα. Από το γένος *Gadiculus* ο μπακαλιάρος *Gadiculus argenteus* απαντάται στην δυτική και βόρεια έκταση ενώ απουσιάζει από την ανατολική. Αντίθετα από το γένος *Gaidropsarus* ο *Gaidropsarus biscayensis* εμφανίζεται στην κεντρική ή βόρειο- δυτική και ανατολική Μεσόγειο, ενώ το *Gaidropsarus mediterraneus* μπορεί να εντοπιστεί σε όλες τις ακτές της, συμπεριλαμβανομένης και την Μαύρη Θάλασσαν. Ωστόσο, το *Gaidropsarus vulgaris* έχει παρατηρηθεί μόνο στην βόρεια και δυτική Μεσόγειο. Το γένος *Merlangius* με το *Merlangius merlangus* να καταγράφεται στην Μαύρη θάλασσα και το χειμώνα μέχρι άνοιξη στις κοντινές βόρειες ανατολικές ακτές της Μεσογείου ενώ πολύ σπάνια μερικά άτομα στα δυτικά της. Το *Micromesistius poutassou* από το γένος *Micromesistius* είναι ένα εμπορικά διαδεδομένο ψάρι που υπάρχει στις δυτικές ακτές της Μεσογείου μέχρι την δυτική Ελλάδα, όπως και το *Molva Molva* μέχρι τις ακτές της Ιταλίας, ενώ το *Molva dypterygia* εμφανίζεται και στην δυτική αλλά και στην ανατολική Μεσόγειο. Τα *Phycis blennoides* και *Phycis phycis* υπάρχουν σε όλη τη Μεσόγειο. Από το γένος *Trisopterus* σε όλη την λεκάνη έχει μελετηθεί το *Trisopterus minutus* και το *Trisopterus luscus* μόνο στην δυτική. Τα *Coelorinchus coelorhincus*, *Coryphaenoides guentheri* μόνο στην δυτικό κομμάτι ενώ τα *Hymenocephalus italicus*, *Nezumia aequalis*, *Nezumia sclerorhynchus*, *Trachyrincus scabrus*, *Merluccius merluccius* και *Gadella maraldi* υπάρχουν σε όλη τη Μεσόγειο. Τέλος, το *Lepidion lepidion*, *Mora moro* και *Physiculus dalwigkii* μόνο στις δυτικές χώρες της Μεσογειακής λεκάνης (Cohen, 1990).

1.3. Πληθυσμιακές μελέτες των ειδών της Μεσογείου

Αξίζει να σημειωθούν κάποιες σημαντικές πληθυσμιακές μελέτες για ορισμένα είδη των Gadiformes ανά την Μεσόγειο ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε μετέπειτα τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας. Για το είδος *Gadela maraldi* σύμφωνα με τον Aksiray (1997), εμφανίστηκαν πληθυσμοί του είδους στις θάλασσες της Τουρκίας αλλά όχι στην Μαύρη Θάλασσα, χωρίς όμως να υπάρχουν πληροφορίες για το βάθος και τον τόπο στον οποίο οι πληθυσμοί αυτοί έχουν βρεθεί. Σε εκτεταμένη μελέτη για ψάρια της βαθιάς θάλασσας στην περιοχή του Αιγαίου δεν βρέθηκε καμία καταγραφή του *G. maraldi* από τις θάλασσες της Τουρκίας (Kaya, 1993). Επιπλέον οι Mater και Meric σε μελέτη τους το 1996 για την καταγραφή των ψαριών των θαλασσών της Τουρκίας δεν ανέφεραν για το συγκεκριμένο είδος και τέλος ο Papaconstantinou (1990), δήλωσε πως το *G. maraldi* είναι σπάνιο είδος σε όλο το Αιγαίο Πέλαγος πράγμα που επιβεβαιώθηκε όταν μετά από τριετή έρευνα βρέθηκαν μόνο δύο δείγματα.

Για το είδος *Merlangius merlangus* οι Salcioglu A. et al., (2020) παρουσιάζουν την ύπαρξη δύο γενεαλογικών γραμμών μεταξύ των δειγμάτων της Ανατολικής Μεσογείου (*M. m. euxinus*) με εκείνων του Ατλαντικού Ωκεανού (*M. m. merlangus*). Οι γενετικοί δείκτες όμως δεν ήταν επαρκείς για να υποστηρίξουν έναν ενδεχόμενο διαχωρισμό μεταξύ των δύο υποειδών, δεδομένου πως τα φυλογενετικά δέντρα των επιμέρους δεικτών δεν κατάφεραν να τα διαχωρίσουν σαν αμοιβαία μονοφυλία. Επιπλέον τα δείγματα του *M. m. euxinus* από το Βόρειο Αιγαίο και την Μαύρη Θάλασσα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως ξεχωριστά αποθέματα καθώς παρουσιάστηκε περιορισμένη γονιδιακή ροή στις θάλασσες της Τουρκίας. Για αυτόν τον λόγο σημαντικό κρίνεται να γίνουν παραπάνω δειγματοληψίες στην Ανατολική Μεσόγειο και τον Ατλαντικό για τον πιο ακριβή καθορισμό των περιοχών κατανομής του κάθε υποείδους. Οι αναλύσεις των

γονιδιακών ροών μεταξύ των θέσεων δειγματοληψίας είναι πολύ σημαντικές για την αποκάλυψη της γονιδιακής ροής ανάμεσα στις θέσεις δειγματοληψίας για την σωστή διαχείριση των αποθεμάτων στα συγκεκριμένα ύδατα.

Για το είδος *Phycis blennoides* η έρευνα των Alioua, Zakia, et al. (2020) έδειξε πως από την βιομάζα του μεγαλύτερου ατόμου της δειγματοληψίας υπήρξε ξεχωριστό μοτίβο κατανομής για τα ενήλικα άτομα σε σύγκριση με τα νεότερα άτομα καθώς τα πρώτα βρίσκονταν σε βαθύτερα ύδατα ενώ τα μεταγενέστερα σε μικρότερα βάθη. Αυτή η κατανομή ήταν γνωστή και από παλαιότερες έρευνες πράγμα που υποδηλώνει οντογενής μετανάστευση με τα μεγαλύτερα σε ηλικία άτομα να μετακινούνται σε μεγαλύτερα βάθη. Αναφέρεται συγκεκριμένα πως στο στενό της Σικελίας το είδος *P. blennoides* παρατηρήθηκε μεταξύ των 200 και 400 μέτρων (Fiorentino et al., 2003b) ενώ τα περισσότερα άτομα εμφανίστηκαν σε βάθη 300 με 500 μέτρα με την πυκνότερη καταγραφή βιομάζας μεταξύ 600 και 800 μέτρων. Αντιθέτως οι Massutí et al. (1996) κατέγραψαν μέγιστη πυκνότητα σε βάθη μεταξύ 200 με 400 μέτρων στην Βόρεια Μεσόγειο. Επειδή όμως στην Μεσόγειο επικρατούν oligοτροφικές συνθήκες η πυκνότητα, η βιομάζα και το μέσο βάρος των ψαριών εμφάνισε μεγαλύτερες τιμές στην Ιβηρική θάλασσα σε σχέση με το δυτικό και ανατολικό Ιόνιο Πέλαγος ομοίως και στην Αλγερία.

Για το *Phycis phycis* οι Vieira, Ana Rita, et al. (2016), κατέληξαν στο συμπέρασμα πως το συγκεκριμένο είδος παρουσιάζει έναν πάνμικτο πληθυσμό στον Βορειοανατολικό Ατλαντικό και την Μεσόγειο Θάλασσα καθώς οι διάφορες παραλλαγές στο σωματότυπο και η ανάλυση ωτολίθων έδειξαν την πιθανή ύπαρξη τριών διαφορετικών πληθυσμών στον Βορειοανατολικό Ατλαντικό Ωκεανό. Η απουσία μιας συγκεκριμένης γενετικής δομής και οι διαφορές στην δομή των ατόμων του είδους δεν είναι αντιφατικοί εφόσον

για την εκπόνηση της έρευνας αυτής χρησιμοποιήθηκαν ουδέτεροι γενετικοί δείκτες. Η ύπαρξη μοναδικών απλότυπων στον ΒΑ Ατλαντικό Ωκεανό και την Μεσόγειο δείχνει περιορισμένη γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών. Γίνεται μια αναφορά για πιθανή γονιδιακή ροή μεταξύ γεωγραφικά διαχωρισμένων πληθυσμών κατά το στάδιο της προνύμφης. Τέλος η έρευνα αυτή μας πληροφορεί ότι κατά μήκος της εξάπλωσής του το *P. phycis* παρουσιάζει τουλάχιστον τρία αποθέματα στην ηπειρωτική Πορτογαλία, τις Αζόρες και την Μαδέρα, στον Νότιο ΒΑ Ατλαντικό και δύο γονοτυπικά αποθέματα μεταξύ ΒΑ Ατλαντικού και Μεσογείου και πως μια πιθανή εξάντληση των προαναφερθέντων αποθεμάτων ίσως να μην μπορεί να ισοσταθμιστεί με μια ενδεχόμενη μετανάστευση από άλλους με ρυθμό τέτοιον ώστε να εξασφαλίζεται η βιωσιμότητα των πόρων.

1.4. Πληθυσμιακές μελέτες για το είδος *Merluccius merluccius*

Σε πληθυσμιακή μελέτη *Merluccius merluccius* (Cimmaruta et al., 2005) βρέθηκε με χρήση αλληλόζυμων στα γονίδια *Gapdh* και *Gpi-2* ότι οι μπακαλιάροι είναι παρόμοιοι γενετικά στα τροπικά νερά της Μεσογείου και διαφοροποιούνται αρκετά απότομα προς τα νερά της Αλμερίας.

Σε άλλη έρευνα (Lundy et al., 1999), δείγματα μπακαλιάρου από την Αδριατική θάλασσα και τις ακτές της Τυνησίας με χρήση μικροδορυφόρων DNA δεν έδειξαν σημαντική ετερογένεια στους γενότυπους δηλαδή δεν υπήρχαν διαφορετικοί υποπληθυσμοί στις περιοχές αυτές.

Σε 5 διαφορετικές ακτές της Σικελίας μελετήθηκαν 420 άτομα με πρωτεΐνες στα πολυμορφικά γονίδια *ADH**, *PGI-1**, *PGI-2** και *SOD-1** (Lo Brutto et al., 1998). Για το γονίδιο *PGI-1** δεν ίσχυε η αρχή του Hardy-Weinberg και μέσω F-test τα

βρέθηκε υψηλή ετεροζυγωτία στο *SOD-1**, ενώ για το *PGI-2** μόνο μια περιοχή δειγμάτων εμφάνιζε διαφορετικές συχνότητες αλληλομόρφων. Με αυτούς τους μοριακούς δείκτες τα δείγματα φάνηκαν να είναι ομοιογενή. Τα γενετικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με μεταγενέστερη έρευνα στα ίδια σημεία με στατιστικά Weir & Cockerham, χωρίς δηλαδή να σημειώνουν σημαντική ετερογένεια οι πληθυσμοί παρά μόνο στο *PGP* γονίδιο (Levi et al., 2004).

Σημαντική διαφοροποίηση εμφανίστηκε σε πληθυσμούς έρευνας για την Ανατολική, Δυτική και Κεντρική Μεσόγειο με χρήση μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) ως γενετικό δείκτη. Η διαφοροποίηση των αλληλομόρφων ερμηνεύτηκε στην προσαρμοστικότητα των μπακαλιάρων, στις ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες και στις ανθρωπογενείς παρεμβάσεις σε κάθε μία από αυτές τις περιοχές της Μεσογείου (Milano et al., 2014).

Σε ακτές της Ισπανίας και Αλγερίας οι πληθυσμοί με μελέτη αλληλομόρφων των γονιδίων *GAPDH-1**, *GPI-1**, *GPI-2**, *GR-2** και *SOD** και με τεστ Hardy–Weinberg δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές των αλληλομόρφων στους διαφορετικούς πληθυσμούς (Roldán et al., 1998).

Σε πληθυσμιακή μελέτη μπακαλιάρου αναλύθηκαν 370 ιχθύες από την Μεσογειακή λεκάνη και 50 από τον Ατλαντικό ωκεανό ώστε να προσδιοριστούν τυχόν γενετικές διαφοροποιήσεις (Lo Brutto et al., 2004). Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 5 πολυμορφικές πρωτεΐνες (*ADH**, *PGI-1**, *PGI-2**, *PGM** and *SOD-1**) και μαζί με τον απλότυπο από ανάλυση PCR στο μιτοχονδριακό DNA, βρέθηκε ότι εμφάνιζαν υψηλή ετεροζυγωτία μεταξύ τους στις διαφορετικές λεκάνες, με τον απλότυπο να μην εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση. Τα δείγματα στην Μεσόγειο ήταν γενετικά

ομογενή μεταξύ τους και σημαντικά ετερογενή με τα δείγματα του Ατλαντικού, σημειώνοντας έτσι μια διαφοροποίηση της γενετικής ροής στη διώρυγα του Γιβραλτάρ και στην Πορτογαλία όπως και σε άλλες μελέτες (IMSIRIDOU and TRIANTAPHYLLIDIS, 2001; Milano et al., 2014; Roldán et al., 1998). Παρομοίως σε άλλη έρευνα στις ίδιες περιοχές (Tanner et al., 2014) μικροδορυφόροι DNA και οτόλιθοι χρησιμοποιήθηκαν και απέδειξαν ότι υπάρχει υψηλή γενετική ροή και διαφορά μεταξύ των πληθυσμών των διαφορετικών περιοχών που χωρίζονται από τη διώρυγα του Γιβραλτάρ στην οποία οι Μπακαλιάροι εμφάνιζαν την μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα με τα Μεσογειακά ψάρια.

1.5 Μιτοχονδριακοί γενετικοί δείκτες και κυτοχρωμική οξειδάση (CO1)

1.5.1 Μιτοχονδριακοί γενετικοί δείκτες

Οι μιτοχονδριακοί γενετικοί δείκτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στις μελέτες της μοριακής οικολογίας, αλλά πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή καθώς έχουν μειονεκτήματα:

1) Κάθε μιτοχόνδριο συμπεριφέρεται ως μια μονάδα και το DNA του σαν ένας γενετικός τύπος. Με δεδομένα ενός γενετικού τύπου μπορούμε να ιχνηλατήσουμε την γενετική ιστορία του, που μπορεί, είτε να συμφωνεί, είτε όχι, με την εξελικτική ιστορία του υπό εξέταση είδους. Στα μιτοχονδριακά DNA αυτό είναι ακόμα πιο εμφανές, διότι έχουν μειωμένο ενεργό πληθυσμιακό μέγεθος σε σχέση με το πυρηνικό DNA, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να εξαφανιστούν απλότυποι. Η εξαφάνιση απλοτύπων μπορεί (Galtier et al., 2009) να οδηγήσει τους ερευνητές σε υπεραπλούστευση της πληθυσμιακής ιστορίας ή σε υποεκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας (Ballard & Whitlock 2004).

2) Πολλές φορές, οι μιτοχονδριακοί γενετικοί δείκτες δεν αντιπροσωπεύουν ολόκληρο τον πληθυσμό.

3) Τα μιτοχονδριακά ψευδογονίδια ή numts (nuclear copies of mtDNA sequences) είναι αντίγραφα του mtDNA, τα οποία μεταφέρονται στο πυρηνικό γονιδίωμα και συνεχίζουν (ως μη λειτουργικά) να υφίστανται, ανεξάρτητα από το mtDNA. Αυτά τα γονίδια δημιουργούν πρόβλημα κατά τη διαδικασία της PCR, εάν οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών έχουν συντηρηθεί και στο ψευδογονίδιο. Αν συμβαίνει αυτό, τότε κατά την PCR μπορεί να πολλαπλασιαστεί και το ψευδογονίδιο ή μόνο αυτό, αντί του επιθυμητού μιτοχονδριακού γονιδίου.

4) Τα μιτοχονδριακά γονίδια δεν είναι αυστηρά ουδέτερα. Ακόμα κι αν χρησιμοποιηθεί ένας μιτοχονδριακός δείκτης, ο οποίος δεν παρέχει κάποιο επιλεκτικό πλεονέκτημα, ο δείκτης αυτός δεν θεωρείται ουδέτερος (Meiklejohn et al., 2007), για το λόγο ότι δεν υπάρχει ανασυνδυασμός στο μιτοχονδριακό DNA.

5) Τα μιτοχόνδρια, ως ημιαυτόνομα οργανίδια, διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν κάποιες υπομονάδες ενζύμων, ενώ οι υπόλοιπες κωδικοποιούνται από τον πυρήνα. Έτσι, αν υπάρχει επιλογή σε ένα πυρηνικό γονίδιο που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, τότε αυτή θα επηρεάσει άμεσα και την επιλογή των μιτοχονδρίων.

Πίνακας 1. Πλεονεκτήματα μιτοχονδριακών γενετικών δεικτών.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Μικρό μέγεθος στις περισσότερες περιπτώσεις <20.000 bp: Ευκολία σχολιασμού.
Η αναλογία των αντιγράφων προς το πυρηνικό γονιδίωμα είναι υψηλή. Ευκολία απομόνωσης και χειρισμού: Επιτρέπεται η απομόνωση από νεκρούς ιστούς.
Πρωτεϊνικά και ριβοσωμικά γονίδια + περιοχή πλούσια σε AT: Αυξημένο εύρος εξελικτικών ρυθμών.
Μητρικά κληρονομικά: Κλωνική και απλή γενετική.
Ne ¼ των πυρηνικών γονιδίων: Πηγαίνει στη σταθεροποίηση πιο γρήγορα.
Η σειρά γονιδίων προσδιορίζεται εύκολα: Είναι δυνατή η φυλογενετική σειρά γονιδίων.
Μη ανασυνδυαστικό: Κλωνική και απλή γενετική.
Υψηλό ποσοστό μετάλλαξης: Η ταχεία αλλαγή επιτρέπει την εξέταση στενά συγγενών οργανισμών.

Πίνακας 2. Μειονεκτήματα μιτοχονδριακών γενετικών δεικτών.

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Μερικές φορές ετεροπλασματικό: Καταστρέφει το πλεονέκτημα της κλωνοποίησης.
Εισαγωγές στο πυρηνικό γονιδίωμα: Τα nuMts προκαλούν προβλήματα οριζόντιας εξέλιξης.
Συχνά εμφανίζονται διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος: Επειδή το mtDNA είναι κλωνικό αυτό προκαλεί.
Φυλογενετική ασυμφωνία μεταξύ τους: Προβλήματα ερμηνείας.

1.5.2 Υπομονάδα 1 της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI)

Είναι ευρέως γνωστό πως εκτός από το πυρηνικό DNA, οι μελέτες που γίνονται στο DNA κυτταρικών οργανιδίων όπως μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες χρίζουν υψηλής σημασίας. Η ανάλυση συγκεκριμένων θραυσμάτων mtDNA είναι η βάση μίας ολόκληρης επιστήμης που ονομάζεται molecular barcoding η οποία έχει να κάνει με την ταυτοποίηση ειδών με βάση διαφορές στην αλληλουχία των νουκλειδίων. Το MtDNA αποτελεί την φθηνότερη λύση όταν πρόκειται για την γενετική εξερεύνηση ενός είδους γενικά στην φύση (Galtier et al., 2009). Λόγω της μητρικής γενεαλογίας εμφανής αλληλουχίες MtDNA μπορούν να συνυπάρχουν σε ένα ζυγωτό πράγμα που εμποδίζει τον αποτελεσματικό ανασυνδιασμό. Αυτή η έλλειψη γενετικής ανταλλαγής υπονοεί πως το MtDNA ενός είδους μπορεί να αναπαρασταθεί από ένα μοναδικό δέντρο το οποίο έχει την ικανότητα να εντοπίσει την προέλευση καθώς και τις γεωγραφικές κινήσεις των μητρικών γενεαλογιών (Avise et al., 1987). Η στόχευση του MtDNA είναι ο φθηνότερος τρόπος για να έχουμε μία εικόνα κάποιου είδους που δεν έχει αναγνωριστεί ακόμη αφού αντιπροσωπεύει μια εύκολη μέθοδο (Galtier et al., 2009). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα εφόσον αντιπροσωπεύει ένα πολύ μικρό μέρος των πληροφοριών των ευκαριωτικών κυττάρων μπορεί να παρουσιάσει σοβαρούς περιορισμούς αν θέλουμε να το χρησιμοποιήσουμε. Ωστόσο, τα συμπεράσματα που εξάγονται δεν ισχύουν πάντα κι συγκεκριμένα για πιο περιπλοκά γονιδιώματα (Saccone et al., 1999). Το MtDNA μπορεί πολύ εύκολα να ενισχυθεί από μία ποικιλία taxa και εφόσον είναι απλοειδές δεν χρειάζεται να γίνει κλωνοποίηση για να λάβουμε μια συγκεκριμένη αλληλουχία (Hurst and Jiggins, 2005).

Το μιτοχονδριακό DNA όταν πρόκειται για φυλογενετικές αναλύσεις είναι ένας αξιόπιστος μοριακός δείκτης. Συγκεκριμένες αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιλέγονται για την μελέτη διαειδικών παραλλαγών, ενώ η περιοχή ελέγχου είναι μια αξιόπιστη πηγή πληροφοριών για ενδοειδική παραλλαγή (Galtier et al., 2009). Σε φυλογενετικές μελέτες δύο γονίδια αποδείχθηκαν τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα. Λόγος γίνεται για τα Cytb και την Κυτοχρωμική οξειδάση 1 (COI). Έρευνα σχετικά με την αναδόμηση των φυλογενειών αποκάλυψε πως το γονίδιο Cyt-b αναδομούσε με μεγαλύτερη ακρίβεια την φυλογένεση και τις γνωστές σχέσεις των ειδών αυτής της ομάδας σε επίπεδα Super Order, Order, Family σε γενικά επίπεδα σε σχέση με το γονίδιο COI (Tobe et al., 2010). Η χρησιμότητα του mtDNA στην μοριακή οικολογία επιβεβαιώνεται από την ταυτοποίηση ενός θραύσματος γονιδίου COI σαν σημείο αναφοράς στην οποία βασίζεται η μοριακή ταξινόμηση και η ταυτοποίηση των ειδών (Hebert et al., 2003). Αξίζει να σημειωθεί πως μπορεί να υπάρξει μια απλούστευση της ταξινόμησης καθώς το γονίδιο COI υπάρχει πιθανότητα να μην εμφανίζει επαρκείς διαφορές για την διάκριση μεμονωμένων ειδών (Kowalczyk et al., 2021).

Στις αναλύσεις ταυτοποίησης τα θραύσματα που κωδικοποιούν τα γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας (Cyt-b και COI) είναι πολύ σημαντικά όσον αφορά την ομοιότητα μεταξύ ειδών αλλά εμφανίζουν κι ταυτόχρονο υψηλή διαειδική διακύμανση (Kowalczyk et al., 2021). Την τελευταία δεκαετία, τα μιτοχονδριακά γονίδια για το Cyt-b και την Co-1 έχουν χρησιμοποιηθεί συχνότερα για ταξινομική και φυλογενετική ανάλυση σε επίπεδο είδους-οικογένειας. Αυτά τα γονίδια αποδείχθηκαν πλεονεκτικά σε σχέση με άλλα γονίδια για την εκτίμηση της απόκλισης στα ταξινομικά είδη μέχρι το επίπεδο οικογένειας σε πολλές ομάδες ζώων (Kartavtsev

and Lee, 2006). Σύμφωνα με την έρευνα των Avise and Walker το 1999 με βάση τους λόγους της ενδοειδικής απόκλισης όσων αφορά τα μιτοχονδριακά γονίδια που έγινε σε 256 σπονδυλωτά τα οποία αναπαράγονται σεξουαλικά, αποκαλύφθηκε πως το 56% από αυτά σχημάτιζαν διακριτές ενδοειδικές μητρικές γραμμές οι οποίες απαντώνται σε συγκεκριμένα γεωγραφικά διαμερίσματα

Η χρήση της γραμμικής κωδικοποίησης του DNA (barcoding) για την διάκριση των διαφόρων ειδών χρησιμοποιώντας το γονίδιο υπομονάδας 1 της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO1) παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τον Hebert και τους συνεργάτες του (Hebert et al., 2003).

Το γονίδιο CO1 είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και λειτουργεί ως βασικό ένζυμο για την μεταφορά ηλεκτρονίων. Όταν πρόκειται για ευκαρυωτικούς αερόβιους οργανισμούς η πρωτεΐνη αυτή έχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο. Επιπλέον αποτελείται από πολλές υπομονάδες και η καταλυτική υπομονάδα 1 οξειδάσης του κυτοχρώματος c κωδικοποιείται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Strüder-Kypke and Lynn, 2010).

Το γονίδιο CO1 επιλεγεται συνήθως λόγω του σημαντικού ρόλου που έχει για τον μεταβολισμό αλλά και επειδή συναντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Επιπλέον σαν μιτοχονδριακό γονίδιο εμφανίζει γρηγορότερους εξελικτικούς ρυθμούς σε σχέση με τα κωδικοποιημένα γονίδια του πυρήνα και έτσι προτιμάται για την διάκριση μεταξύ στενά σχετιζόμενων εξελικτικά οργανισμών. (Hebert et al., 2003). Το COI, ωστόσο, είναι ένα από τα πιο διατηρημένα γονίδια που τοκωδικοποιούν τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες σε ζώα (Mueller, 2006) και έτσι

εμφανίζει καλύτερο φυλογενετικό σήμα, με πολύ λίγους διπλασιασμούς, χωρίς εσώνιο και πολύ μικρές διαγονιδιακές περιοχές (Gissi et al., 2008).

Το μιτοχονδριακό DNA λόγω της εξαιρετικής μεταβλητότητάς του στους φυσικούς πληθυσμούς και του αυξημένου ρυθμού μετάλλαξης του μπορεί να δημιουργήσει κάποιες ενδείξεις για την ιστορία ενός φυσικού πληθυσμού σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Τα μόνα τεχνικά ζητήματα που σχετίζονται με τον δείκτη προκύπτουν από αθέμιτη ενίσχυση μιτοχονδριακών γονιδίων που έχουν εισαχθεί στο πυρηνικό γονιδίωμα σε ορισμένα είδη όπως αναφέρουν οι Galtier et al. σε έρευνά τους το 2009.

Ο Hebert et al., το 2003 παρουσίασαν ένα προφίλ 100 ακολουθίες οι οποίες η κάθε μια προερχόνταν από διαφορετική οικογένεια που κατατασσόνταν στα συγκεκριμένα φύλα: Annelida, Arthropoda, Chordata, Echinodermata, Mollusca, Nematoda and Plathelminthes.

Για την ανάλυση του γονιδίου CO1 χρειάζονται περιορισμένα τμήματα του γονιδίου. Περιορισμένα τμήματα όμως είναι πιθανό να αποφέρουν και σφάλματα στην έρευνα και επειδή περισσότερα δεδομένα γενικά βελτιώνουν την ακρίβεια της ανάλυσης συνήθως χρειάζονται περισσότεροι δείκτες για μία σωστή ανάλυση (Rubinoff and Holland, 2005). Επιπλέον, η οριζόντια μεταφορά γονιδίων, η εισβολή και η παρουσία ψευδογονιδίων μπορούν συνήθως να επηρεάσουν τις αναλύσεις που βασίζονται στο mtDNA, με αποτέλεσμα παραφυλιστικές και πολυφυλετικές σχέσεις (Funk and Omland, 2003).

Οι οξειδωτικές διεργασίες που γίνονται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου καθώς και η έλλειψη μηχανισμών επιδιόρθωσης πολλές φορές οδηγούν σε

μεταλλάξεις στο mtDNA. Οι αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν στοιχεία της αναπνευστικής αλυσίδας όπως το Cytb και CO1 ποικίλουν μεταξύ των ειδών λόγω των πολλών μεταλλάξεων (Blaxter, 2003; Linacre and Lee, 2016; Kumar et al., 2019).

Η γραμμική κωδικοποίηση DNA με βάση το COI αντιμετωπίζει μερικές φορές προβλήματα: (1) σε ορισμένα είδη, όπως Porifera, Anthozoa, μύκητες, φυτά, η περιοχή Folmer παρουσιάζει μικρή ανάλυση σε επίπεδο είδους, έτσι ώστε άλλες περιοχές COI όπως το I3-M11 ή άλλα γονίδια όπως καθώς το πυρηνικό ριβοσωμικό ITS έχει προταθεί για σκοπούς γραμμωτού κωδικοποίησης και (2) η εμφάνιση πυρηνικών αντιγράφων του γονιδίου COI (τα λεγόμενα «numts») μπορεί να προκαλέσει σύγχυση στα αποτελέσματα γραμμικής κωδικοποίησης του DNA και μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση της ταξινομικής ποικιλομορφίας (Derycke et al., 2010). Επίσης, δεν υπάρχουν ακόμη πολλοί γενικοί εκκινητές COI PCR για την υπομονάδα I της οξειδάσης του μιτοχονδριακού κυτοχρώματος c (Geller et al., 2013).

Πλέον, για τις φυλογενετικές αναλύσεις και τη μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής χρησιμοποιείται ευρέως το γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (COI). Αυτό διότι:

1. Εντοπίζεται στο mtDNA.
2. Εμφανίζει τόσο εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές, όσο και ευμεταύλητες.
3. Είναι χρήσιμο για την εύρεση διαφορών εντός ενός πληθυσμού ενός είδους (Chevaldonne et.al., 2006). Η ποικιλότητα, δε, των νουκλεοτιδίων αποτελεί καλό δείκτη για τη πρώτη αξιολόγηση της κατάστασης των πληθυσμών, ιδίως όταν η απογραφή είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί (Petit-Marty, 2020).

4. Στον τομέα της οικολογίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της βιοποικιλότητας σε μία περιοχή με τη τεχνική eDNA (Deagle et al., 2014).

5. Η αλληλουχία του έχει καταχωρηθεί για πολλά είδη, πράγμα που το κάνει ιδανικό τόσο για ενδοπληθυσμιακές όσο και για μεταξύ πληθυσμών συγκρίσεις (Deagle et al., 2014).

6. Οι πρόσφατες εξελίξεις στα πρωτόκολλα προσδιορισμού αλληλουχίας DNA συνηγορούν υπέρ της χρήσης του, ιδίως για μελέτη μεταζώων (Andujar et al., 2018).

7. Υπάρχουν πλεονεκτήματα σχετικά με τη μείωση του θορύβου (Andujar et al., 2018), που αναφέρεται στο επίπεδο διακύμανσης της γονιδιακής έκφρασης ακόμη και όταν δύο οργανισμοί μοιράζονται κοινές γενετικές πληροφορίες και περιβαλλοντικές συνθήκες (Raser et al., 2005).

1.6 Σκοπός της Έρευνας και Υποθέσεις

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η πληθυσμιακή γενετική ανάλυση για το είδος *Merluccius merluccius* βασιζόμενοι στο γονίδιο COI καθώς και να γίνει έλεγχος για τυχόν γενετική διαφοροποίηση των ατόμων των υδάτων της Βορείου Ελλάδας με άλλους πληθυσμούς ανά την Μεσόγειο. Η υπόθεσή μας είναι ότι, στην Ελλάδα ο Ευρωπαϊκός μπακαλιάρος ευνοεί την γενετική ποικιλότητα. Αντιθέτως, στην δυτική Μεσόγειο και τον Ατλαντικό Ωκεανό, η γενετική ποικιλομορφία είναι σχετικά χαμηλή.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Εξαγωγή DNA

Τα δείγματα που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία συλλέχθηκαν από τον Τορωναίο κόλπο (Βόρειο Αιγαίο) μέσω πειραματικής αλιείας με τράτα βυθού. Μετά από την μεταφορά τους στο Εργαστήριο Ιχθυολογίας-Υδροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Αρχικά απομονώθηκε γενετικό υλικό από 10 άτομα. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το mini kit DNA - extraction invitrogen by thermo fisher scientific ακολουθώντας το αντίστοιχο πρωτόκολλο.

Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένο νυστέρι και λαβίδα για την αφαίρεση 10 mg ιστού από τα δείγματα. Τοποθετήθηκε ο ιστός σε αποστειρωμένο Eppendorf και προστέθηκαν 180 μl digestion buffer, έτσι ώστε να γίνει εξαγωγή του γενετικού υλικού από τον πυρήνα. Στη συνέχεια, για την μετουσίωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν 20 μl πρωτεϊνάσης K περιεκτικότητας 20 mg/ml. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους $55-60^{\circ}\text{C}$ για 18 ώρες για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και την απελευθέρωση του γενετικού υλικού.

Μετά το πέρας της επώασης, ακολούθησε vortex και επώαση σε υδατόλουτρο με απιονισμένο νερό για περίπου 2 ώρες. Μετά από 15 λεπτά έγινε φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 14.000 στροφές (rpm). Με τη χρήση πιπέτας 200 μl , έγινε λήψη του υπερκείμενου διαλύματος, μεταφορά σε νέα αποστειρωμένα Eppendorf, προσθήκη 20 μl

RNAση A, και τα δείγματα αφέθηκαν στο πάγκο για 2 λεπτά. Ακολούθησε vortex και προσθήκη 200 μl binding buffer και 200 μl αλκοόλης.

Για τον καθαρισμό του DNA χρησιμοποιήθηκαν 640 μl από το κάθε δείγμα, τα οποία μεταφέρθηκαν σε column tubes και έγινε φυγοκέντρηση, στις 10.000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά. Απορρίφθηκε το collection tube, η στήλη μεταφέρθηκε σε καινούργια και πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα 2 φορές με:

1. Προσθήκη 500 μl washing buffer 1, φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 10.000 στροφές, και απόρριψη του collection tube.
2. Προσθήκη 500 μl washing buffer 2, φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 14.000 στροφές, και απόρριψη του collection tube.

Τέλος, για την έκλουση του DNA, αφαιρέθηκε η στήλη του column tube μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα Eppendorf και προστέθηκαν 50 μl elution buffer και τα δείγματα αφέθηκαν στο πάγκο για 5 λεπτά. Πραγματοποιήθηκε μια τελευταία φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά. Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν έγινε ηλεκτροφόρηση για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της εξαγωγής του DNA.

2.2. Ηλεκτροφόρηση DNA

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε αгарόζη σε στερεά μορφή για να παρασκευαστεί 0,8% κ.ο διάλυμα αгарόζης σε TBE Buffer. Ζυγίστηκαν 0,8 gr αгарόζης σε ζυγό ακριβείας, και αναμείχθηκαν με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE, σε κωνική φιάλη. Το μίγμα θερμάνθηκε με τη χρήση φούρνου μικροκυμάτων με στόχο την ομογενοποίηση του. Το μίγμα αφέθηκε κάτω από τρεχούμενο νερό, για να μειωθεί η θερμοκρασία του.

Αφού η θερμοκρασία του διαλύματος μειώθηκε, προστέθηκαν 4 μl βρωμιούχο αιθίδιο, έτσι ώστε όταν το DNA εκτεθεί σε ακτίνες UV, να φθορίσει και να είναι ορατό στη πηκτή. Έγινε ανακίνηση έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως το βρωμιούχο αιθίδιο και το μίγμα τοποθετήθηκε προσεκτικά στο εκμαγείο, για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν οι οπές/πηγαδάκια στις οποίες θα φορτωθεί το DNA. Η πηκτή αφέθηκε να πήξει και ακολούθως αφαιρέθηκε το χτενάκι προσεκτικά. Εν συνεχεία, η γέλη τοποθετήθηκε μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Με την τεχνική by pipetting αναμείχθηκαν 5 μl από κάθε δείγμα με 2 μl loading buffer, με χρωστική Blue-bromophenol (Invitrogen) και γλυκερόλη. Η χρωστική είναι απαραίτητη καθώς βοηθάει τη φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια αλλά λειτουργεί και σαν σήμανση των δειγμάτων. Επιπλέον, η γλυκερόλη, αυξάνει την πυκνότητα του μοριακού υλικού, το οποίο κατακάθεται στον πυθμένα του πηγαδιού της ηλεκτροφόρησης. Στο πρώτο πηγάδι φορτώθηκε ο μάρτυρας, ο οποίος αποτελούνταν από 1 μl DNA ladder με κομμάτια DNA γνωστού μοριακού βάρους 1 Kb και 1 μl χρωστικής Blue-bromophenol. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό πηγαδάκι της πηκτής, με τη βοήθεια μιας μικροπιπέτας, συνολικής ποσότητας 7 μl σε κάθε πηγάδι. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή με παροχή τάσης 104 Volt για περίπου 20-30 λεπτά. Τέλος, το πήκτωμα αφαιρέθηκε από τη συσκευή και τοποθετήθηκε κάτω από υπεριώδες φως, και φωτογραφήθηκε με τη χρήση DNR, MiniBisBio-ImagingSystems.

2.3.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Τα υπό μελέτη δείγματα, αναλύθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (BIOER Life Touch) για την ενίσχυση του τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου COI. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Gradient PCR, όπου αρχικά έγινε έλεγχος εύρους θερμοκρασιών (48 έως 58 C°), για την επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών. Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για να τοποθετηθούν τα δείγματα ήταν: 48°C, 48,6°C, 50,6°C, 52°C, 55,1°C, 58°C.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε αποτελείται από 30 κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 95°C για 15 λεπτά (αρχική αποδιάταξη), και για 30 κύκλους: 95°C για 1 λεπτό (αποδιάταξη), 50°C για 45 δευτερόλεπτα (υβριδοποίηση εκκινητή), 72°C για 1 λεπτό (επιμήκυνση).

Για την πραγματοποίηση της PCR, χρησιμοποιήθηκαν Eppendorf των 200 μl, και από κάθε δείγμα που μελετήθηκε, προστέθηκαν 1 μl DNA, και μίγμα (mastermix) των παρακάτω αντιδραστηρίων: 5 μl Go Taq Polymerase, 1,5 μl Primer Forward, 1,5 μl Primer Reverse και 11 μl PCR water. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας που περιείχε το μίγμα των αντιδραστηρίων χωρίς DNA, για να διαπιστωθεί εάν υπήρχε επιμόλυνση.

2.4.Ηλεκτροφόρηση Αποτελεσμάτων PCR

Η αποτελεσματικότητα της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση των 10 δειγμάτων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% κ.ο με TBE σε pH 8. Ζυγίστηκαν και αναμείχθηκαν 0,72 gr αγαρόζης σε 60 ml TBE buffer. Η προετοιμασία της πηκτής αλλά και της συσκευής έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως στην ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του

απομονωμένου DNA. Στα πηγαδάκια φορτώθηκαν τα δείγματα που είχαν προκύψει από την τεχνική της PCR. Σε κάθε πηγάδι χρησιμοποιήθηκε συνολικός όγκος 10 μl, 8 μl από το προϊόν της PCR και 2 μl loading buffer. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε, 1 μl DNA ladder 100 bp, και 2 μl loading buffer. Τέλος τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, παρατηρήθηκαν κάτω από υπεριώδες φως, και φωτογραφήθηκαν με τη χρήση DNR, MiniBisBio-ImagingSystems.

2.5. Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Blast, της βάσης δεδομένων GenBank για να ανακτηθούν αλληλουχίες του *Merluccius Merluccius* από άλλες χώρες της Μεσογείου. Συγκεκριμένα, μετά από φιλτράρισμα του γονιδίου COI στη βάση δεδομένων, ανακτήθηκαν 8 αλληλουχίες από πληθυσμούς της Γαλλίας, 4 από πληθυσμούς της Ιταλίας, 4 από πληθυσμούς της Μάλτας, 10 από πληθυσμούς της Πορτογαλίας, 3 από πληθυσμούς της Ισπανίας και 10 από πληθυσμούς της Τουρκίας, για τη σύγκριση και συσχέτιση με τον αρχικό αριθμό δειγμάτων (Πίνακας 2.1).

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η επίλυση των φυλογενετικών σχέσεων, έγινε με τη χρήση των προγραμμάτων MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11, και Arlequin.

Με το πρόγραμμα MEGA, οπτικοποιήθηκαν οι αλληλουχίες της ανάλυσης PCR των δειγμάτων και κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum likelihood) με 10.000 επαναλήψεις bootstrap. Με τη χρήση της μέγιστης πιθανοφάνειας, αναζητήθηκε το φυλογενετικό δέντρο με τη μεγαλύτερη εξελικτική πιθανότητα. Η πιθανοφάνεια κάθε φορά υπολογίσθηκε ως συνάρτηση της τοπολογίας του δέντρου και του μήκους των βραχιόνων του.

Με το πρόγραμμα Arlequin, έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων όπου πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της γενετικής διακύμανσης μεταξύ πληθυσμών (F_{ST}), και της τιμής σημαντικότητας (p-value).

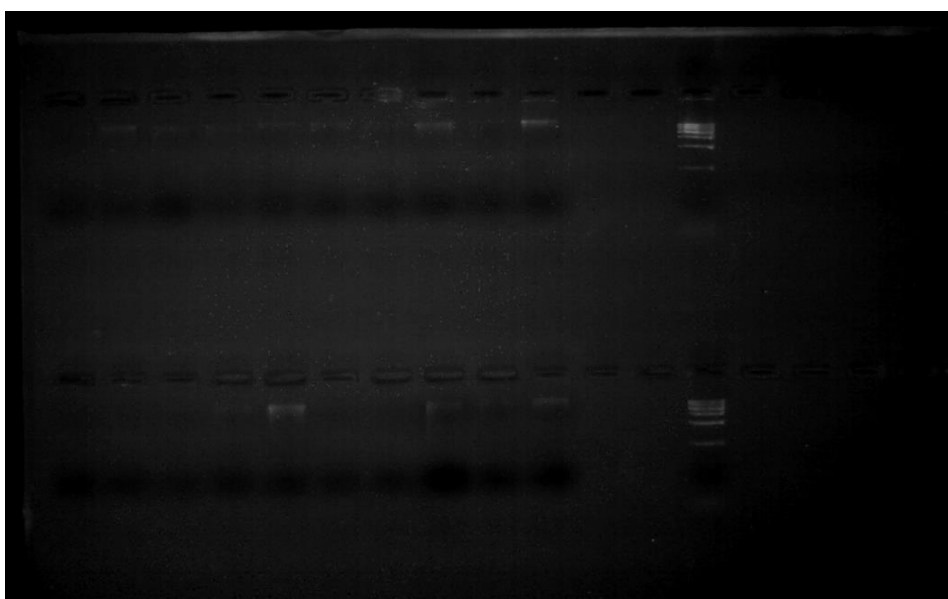
Πίνακας 3. Γεωγραφικές συντεταγμένες περιοχών μελέτης.

Περιοχή Δειγματοληψίας	Γεωγραφικές Συντεταγμένες
Ελλάδα	39.0742° N 21.8243° E
Γαλλία	46.2276° N 2.2137° E
Ισπανία	40.4637° N 3.7492° W
Πορτογαλία	38.736946° N -9.142685° E
Ιταλία	41.8719° N 12.5674° E
Μάλτα	35.917973° N 14.409943° E
Τουρκία	38.9637° N 35.2433° E

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

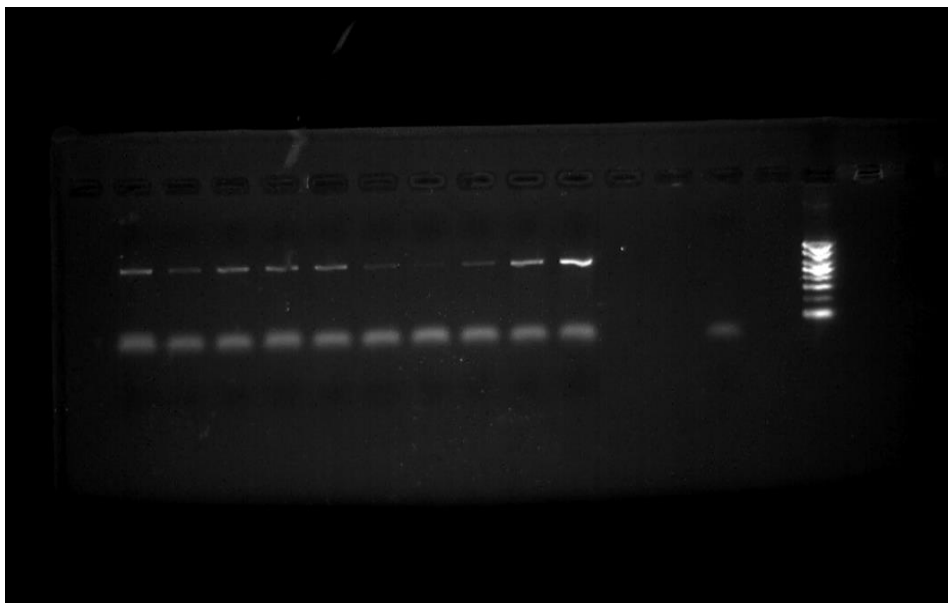
3.1. Ηλεκτροφόρηση PCR

Στη παρακάτω εικόνα 3.1 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση απομόνωσης DNA. Διακρίνεται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων εξαγωγής DNA *M. merluccius* και ο μάρτυρας (Ladder) 1 kb που χρησιμοποιήθηκε δυο φορές για τη σύγκριση των δυο σειρών δειγμάτων.



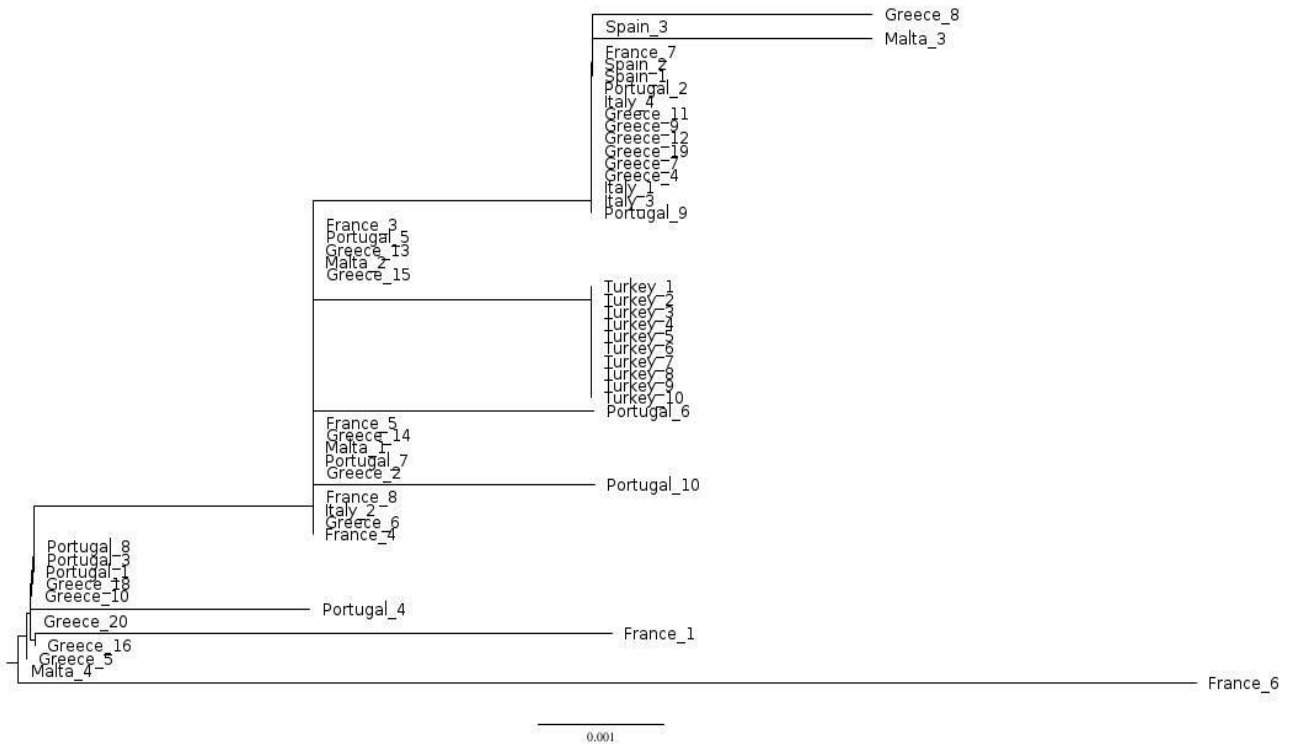
Εικόνα 3.1. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης απομόνωσης DNA.

Στην εικόνα 3.2 διαφαίνονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της PCR. Στις διαδρομές 2-10, διακρίνονται τα προϊόντα της PCR από τα δείγματα DNA τα οποία απομονώθηκαν στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια του πειράματος, στη διαδρομή 13 φαίνεται ο αρνητικός μάρτυρας, ενώ στη διαδρομή 15 βρίσκεται ο DNA Ladder με μοριακό μέγεθος 100 KB.



Εικόνα 3.2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης διαδικασίας PCR.

3.2. Φυλογενετικό Δέντρο



Εικόνα 3.3: Φυλογενετικό δέντρο

Με τη χρήση του προγράμματος MEGA, δημιουργήθηκε το φυλογενετικό δέντρο που φαίνεται στην Εικόνα 3.3, με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας. Οι ακμές αποτελούν τις ταξινομικές βαθμίδες που συγκρίνονται, οι κόμβοι τα χρονικά σημεία ύπαρξης κοινού προγόνου και τα μήκη των βραχιόνων συμβολίζουν τον χρόνο που έχει επέλθει.

Το συγκεκριμένο δέντρο δημιουργήθηκε, από τη σύγκριση των αλληλουχιών που βρέθηκαν μέσω του Blast και των αλληλουχιών που συλλέχθηκαν από τον Τορωναίο κόλπο, και παρατηρούμε ότι αποτελείται από δύο κλάδους. Το πιο γενετικά διαφοροποιημένο άτομο φαίνεται να ανήκει σε πληθυσμό της Γαλλίας (France_ 6). Παρατηρούμε επίσης, ότι όλοι οι πληθυσμοί εκτός της Γαλλίας_6, έχουν κοινό πρόγονο.

3.3. Στατιστική Ανάλυση

Πίνακας 4. Ανά ζεύγη διακύμανση πληθυσμών (Population pairwise F_{ST} s).

	Γαλλία	Ελλάδα	Ιταλία	Μάλτα	Πορτογαλία	Ισπανία	Τουρκία
Γαλλία	0.00000						
Ελλάδα	0.03414	0.00000					
Ιταλία	0.10609	0.05078	0.00000				
Μάλτα	-0.11670	-0.07753	0.11111	0.00000			
Πορτογαλία	-0.03288	-0.00626	0.18143	-0.10648	0.00000		
Ισπανία	0.21098	0.20686	-0.09091	0.32075	0.31726	0.00000	
Τουρκία	0.52715	0.63686	0.92495	0.74948	0.60819	1.00000	0.00000

Πίνακας 5. F_{ST} p-values (αριθμός μεταθέσεων: 110).

	Γαλλία	Ελλάδα	Ιταλία	Μάλτα	Πορτογαλία	Ισπανία	Τουρκία
Γαλλία	*						
Ελλάδα	0.25225+- 0.0556	*					
Ιταλία	0.19820+- 0.0485	0.27027+- 0.0489	*				
Μάλτα	0.97297+- 0.0125	0.66667+- 0.0511	0.43243+- 0.0539	*			
Πορτογαλία	0.72072+- 0.0359	0.42342+- 0.0576	0.08108+- 0.0286	0.90090+- 0.0333	*		
Ισπανία	0.05405+- 0.0148	0.24324+- 0.0451	0.99099+- 0.0030	0.11712+- 0.0273	0.04505+- 0.0203	*	
Τουρκία	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	*

Στους πίνακες 4 και 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης του προγράμματος Arlequin, με τις τιμές F_{ST} και p-value για τους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Το F_{ST} ανά ζεύγη μετρά τη δομή του πληθυσμού, ως μέτρο της διαφοροποίησης λόγω γενετικής δομής. Οι τιμές του Πίνακα 4 κυμαίνονται από 0.03414 έως 1.00000. Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν ομοιογένεια του δείγματος, και η τιμή 1 μεταξύ των πληθυσμών της Τουρκίας και της Ισπανίας, οφείλεται στην ύπαρξη

μοναδικής αλληλουχίας και δεν αποτελεί στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα. Σημαντικές τιμές εντοπίζονται μεταξύ των πληθυσμών Τουρκίας και Γαλλίας (0.527), Τουρκίας και Ελλάδας (0.636), Τουρκίας και Ιταλίας (0.924), Ισπανίας και Μάλτας (0.320), Τουρκίας και Μάλτας (0.749), Ισπανίας και Πορτογαλίας (0.317), Τουρκίας και Πορτογαλίας (0.608).

Στον πίνακα 5, αναφέρεται η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Με έντονη γραφή σημειώνεται η τιμή των πληθυσμών που έχουν στατιστικώς σημαντική γενετική διαφοροποίηση (Πορτογαλία-Ισπανία και η Τουρκία με όλους τους πληθυσμούς). Οι υπόλοιπες τιμές p-value είναι μεγαλύτερες από 0.05 και επομένως είναι στατιστικά μη σημαντικές.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Παρατηρώντας τα δεδομένα, φαίνεται ότι οι περισσότεροι πληθυσμοί δεν παρουσιάζουν, σε γενικές γραμμές, σημαντική διαφοροποίηση. Αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου της ομοιογένειας των πληθυσμών *Merluccius merluccius* στη Μεσόγειο (Lundy et al., 1999). Το φυλογενετικό δέντρο που σχηματίστηκε με το πρόγραμμα MEGA (Εικόνα 3.3), δείχνει πως τα περισσότερα δείγματα έχουν κοινό πρόγονο και χωρίζονται σε δύο κλάδους. Επίσης, επιβεβαιώνει την ομοιογένεια στους περισσότερους πληθυσμούς.

Ο πίνακας 4 περιέχει τα αποτελέσματα της στατιστικής σύγκρισης που έγινε με το πρόγραμμα Arlequin. Συγκεκριμένα, περιέχει τον δείκτη F_{ST} . Ο δείκτης αυτός αντιπροσωπεύει τη διακύμανση της συχνότητας των αλληλόμορφων ανάμεσα στους πληθυσμούς. Παίρνει τιμές από το 0 έως το 1 και όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή του, τόσο πιο σημαντική θεωρείται η διαφοροποίηση των πληθυσμών (Frankham et al., 2002).

Ο πίνακας 5 δείχνει το p-value, ή την στατιστική σημαντικότητα του δείκτη F_{ST} . Οι τιμές του p-value θεωρούνται στατιστικά σημαντικές όταν είναι μικρότερες από 0,05. Αυτό σημαίνει πως όλες οι τιμές εκτός από τις Τούρκικες και αυτή της Ισπανίας-Πορτογαλίας δεν έχουν στατιστικά σημαντική γενετική διαφοροποίηση. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες ή στην μικρή δειγματοληψία.

Η γενετική διαφοροποίηση στον Ισπανικό πληθυσμό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι το Γιβραλτάρ χωρίζει τους Μεσογειακούς πληθυσμούς από τους Ατλαντικούς (Lundy et al., 1999). Ακόμα και αυτό, όμως, φαίνεται να έχει αμφισβητηθεί. Το 2005 οι Cimmaruta et al κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο διαχωρισμός μάλλον

γίνεται στη θάλασσα του Αλμποράν και όχι στο Γιβραλτάρ. Εν πάση περιπτώσει, οι έρευνες πάνω στους Μεσογειακούς πληθυσμούς μπακαλιάρου είναι πολύ περιορισμένες.

Η χαμηλή διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς ήταν αναμενόμενη. Οι μπακαλιάροι είναι πολύ ικανοί κολυμβητές και μπορούν να ξεπεράσουν ωκεανογραφικά εμπόδια που θα τους περιόριζαν σε μία μικρή περιοχή (Lo Brutto et al, 1998). Οι Levi et al. (2004) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι υποπληθυσμοί του πορθμού της Σικελίας δεν είχαν γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους, γεγονός που επιβεβαιώνει περισσότερο την ομοιογένεια ανάμεσα στους Μεσογειακούς πληθυσμούς.

4.2 Η κατανομή του πληθυσμού στην Ανατολική Μεσόγειο

Όπως είναι γνωστό τα παράκτια ενδιαιτήματα των ψαριών αποτελούν ένα συνδυασμό περιβαλλοντικών παραγόντων που εξηγούν την κατανομή τους με την παρουσία τους να συνδέεται με τις κατάλληλες συνθήκες και την πυκνότητα αυτών (Koubbi et al., 2006). Στην περίπτωση του είδους που μελετήθηκε όταν άτομα του συνυπάρχουν με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την σχέση της μεταξύ κατανομής του πληθυσμού και των παραμέτρων αυτών.

Οι Yalcin et al (2016) παρατήρησαν πως ο πληθυσμός του *Merluccius merluccius* στον κόλπο της Σμύρνης είναι κατανεμημένος με περισσότερα άτομα να εμφανίζονται στις μεταβατικές ζώνες διαφορετικών υδάτων παρά στα στρωματοποιημένα τμήματα των υδάτων σε μία περιοχή.

Πρώτα άτομα του πληθυσμού του *Merluccius merluccius* καταγράφηκαν στο βόρειο τμήμα της νήσου Uzunada. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στο υδρολογικό καθεστώς που παρατηρήθηκε εκεί ή στις αντικυκλωνικές δίνες.

Αυτές οι δίνες επηρεάζουν την ροή του νερού και θεωρούνται υπεύθυνες για την αυξημένη διαθεσιμότητα τροφής καθώς εμπλουτίζουν το νερό με πολλά θρεπτικά συστατικά καθ' όλη την διάρκεια του έτους. Από την άλλη οι άνεμοι από νότια εμποδίζουν την εισροή νερών από το Αιγαίο στον κόλπο και αναπόφευκτη είναι οι ανοδικές συνθήκες κοντά στην ανατολική πλευρά του νησιού (Sayin et al., 2006).

Ο εμπλουτισμός με θρεπτικά συστατικά έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία φυτοπλαγκτού και την μετέπειτα ανάπτυξη ζωοπλαγκτού που αποτελεί πηγή τροφής για τα ψάρια. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική προσέγγιση για την πληθυσμιακή κατανομή του *Merluccius merluccius* ο οποίος παρουσίασε υψηλές συγκεντρώσεις από την ανατολική ακτή του νησιού μέχρι και το κέντρο του κόλπου της Σμύρνης.

Συνεπώς, η χωροχρονική κατανομή του είδους στην Ευρώπη παρουσιάζει κατάλληλες περιβαλλοντικές ιδιότητες. Γι' αυτό κρίνεται απαραίτητο να θεσπιστεί μία διαδικασία κατά την οποία να αναγνωρίζεται το απόθεμα του είδους *Merluccius* σαν ένα πολύτιμο εργαλείο για την διαχείριση της εθνικής αλιείας. Η αλιευτική αρχή θα πρέπει να πραγματοποιήσει επιστημονικές προετοιμασίες για την εφαρμογή μέτρων διαχείρισης, συμπεριλαμβανομένης της προστασίας των ανηλίκων ατόμων, της απαγόρευσης αλιείας στην περιοχή σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους και των μεγαλύτερων μεγεθών διχτύων τράτας για αυτό το απόθεμα. Οι κανονισμοί για την αλιευτική περιοχή (επιτρεπόμενη/απαγορευμένη) και τον χρόνο αλιείας (επιτρεπόμενη/απαγορευμένη) θα πρέπει να επανασχεδιαστούν με βάση αυτές τις πληροφορίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alioua, Zakia, et al. "Population structure, reproduction and exploitation of the greater forkbeard *Phycis blennoides* (Brünnich, 1768) from the Algerian basin." *Aquatic Living Resources* 33 (2020): 20.
- Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489–522.
- Awise, J.C., Walker, D., 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 992–995.
- Blaxter, M., 2003. Counting angels with DNA. *Nature* 421, 122–123.
- Campo, Daniel, et al. "Molecular organization and evolution of 5S rDNA in the genus *Merluccius* and their phylogenetic implications." *Journal of molecular evolution* 68 (2009): 208-216.
- Choen, D. M., et al. "Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes)." *An Annotated and Illustrated Catalogue of Cods, Hakes, Grenadiers and Other Gadiform Fishes Known to Date. FAO Species Catalogue* (1990): 442.
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., Moens, T., 2010. Exploring the Use of Cytochrome Oxidase c Subunit 1 (COI) for DNA Barcoding of Free-Living Marine Nematodes. *PLOS ONE* 5, e13716.
- Desalle, R., Schierwater, B., Hadrys, H., 2017. MtDNA: The small workhorse of evolutionary studies. *Front. Biosci. Landmark* 22, 873–887.
- Cimmaruta, R., P. Bondanelli, and G. Nascetti. "Genetic structure and environmental heterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*)." *Molecular ecology* 14.8 (2005): 2577-2591.
- Endo, Hiromitsu. "Phylogeny of the order gadiformes (Teleostei, Paracanthopterygii)." *Memoirs of the graduate school of fisheries sciences, Hokkaido University* 49.2 (2002): 75-149.
- Fiorentino, F., et al. "Spatio-temporal distribution of recruits (0 group) of *Merluccius merluccius* and *Phycis blennoides* (Pisces, Gadiformes) in the Strait of Sicily (Central Mediterranean)." *Migrations and Dispersal of Marine Organisms: Proceedings of the 37th European Marine Biology Symposium held in Reykjavík, Iceland, 5–9 August 2002*. Springer Netherlands, 2003.

- Frankham, Richard, David A. Briscoe, and Jonathan D. Ballou. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press, 2002.
- Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 397–423.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G.D.D., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 18, 4541–4550
- Geller, J., Meyer, C., Parker, M., Hawk, H., 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 851–861.
- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G., 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101, 301–320.
- Gordon, John DM. "Deep-water fish and fisheries in the northeastern Atlantic and Mediterranean: an overview of the EC FAIR Deep Fisheries Project." *ICES CM* (1998): 10-14.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 313–321
- Hebert, Ratnasingham, S., De Waard, J., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species (2003) *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, pp. S96-S99.
- Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M., 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 272, 1525–1534.
- IMSIRIDOU, Anastasia, and Costas TRIANTAPHYLLIDIS. "*Merluccius merluccius* (Gadidae) populations." *Biologia, Bratislava* 56.5 (2001): 545-547.
- Kabasakal, Hakan. "Confirmation of the presence of *Gadella maraldi* (Risso, 1810) in the seas of Turkey." *Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, Croatia* 80 (1998): 1-8.
- Kartavtsev, Y.P., Lee, J.-S., 2006. Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase 1 genes at the population, species, and genus levels. *Russ. J. Genet.* 42, 341–362
- Koubbi, P., Loots, C., Cotonnec, G., Harlay, X., Grioche, A., Vaz, S., Martin, C., Walkey, M., and Carpentier, A., 2006. Spatial patterns and GIS habitat modelling of *Solea solea*, *Pleuronectes flesus* and *Limanda limanda* fish larvae in the eastern English Channel during the spring. *Scientia Marina*, 70S2: 147-157.
- Kowalczyk, M., Staniszewski, A., Kamińska, K., Domaradzki, P., Horecka, B., 2021. Advantages, Possibilities, and Limitations of Mitochondrial DNA Analysis in Molecular Identification. *Folia Biol. (Praha)* 69, 101–111.

- Kriwet, Jürgen, and Thomas Hecht. "A review of early gadiform evolution and diversification: first record of a rattail fish skull (Gadiformes, Macrouridae) from the Eocene of Antarctica, with otoliths preserved in situ." *Naturwissenschaften* 95 (2008): 899-907.
- Kumar, V., Chandra, K., Kundu, S., Tyagi, K., Amin Laskar, B., Singha, D., Chakraborty, R., Pakrashi, A., 2019. Utility of mitochondrial DNA in wildlife forensic science: reliable identification of confiscated materials from Eastern India. *Mitochondrial DNA Part B* 4, 583–588.
- Levi, Dino, et al. "Genetic and morphometric variations of Mediterranean hake, *Merluccius merluccius*, in the Strait of Sicily (Central Mediterranean): implications for stock assessment of shared resources." *Italian Journal of Zoology* 71.2 (2004): 165-170.
- Linacre, A., Lee, J.C.-I., 2016. Species determination: the role and use of the cytochrome b gene. *Forensic DNA Typing Protoc.* 287–296.
- Lloris, Domingo, Jesús Matallanas, and Pere Antoni Oliver Reus. *Hakes of the World (Family Merlucciidae): an annotated and illustrated catalogue of hake species known to date*. Vol. 125. Food & Agriculture Org., 2005.
- Lo Brutto, S., Arculeo, M., Mauro, A., Scalisi, M., Cammarata, M., Parrinello, N., 1998. Allozymic variation in Mediterranean hake *Merluccius merluccius* (Gadidae). *Ital. J. Zool.* 65, 49–52
- Lo Brutto, S., M. Arculeo, and N. Parrinello. "Congruence in genetic markers used to describe Mediterranean and Atlantic populations of European hake (*Merluccius merluccius* L. 1758)." *Journal of Applied Ichthyology* 20.2 (2004): 81-86.
- Lundy, Caroline J., et al. "Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish." *Molecular Ecology* 8.11 (1999): 1889-1898
- Mattiangeli, Valeria, et al. "Eastern and western poor cod (*Trisopterus minutus capelanus*) populations in the Mediterranean Sea: evidence from allozyme and minisatellite loci." *Marine Ecology* 24.4 (2003): 247-258
- Milano, Ilaria, et al. "Outlier SNP markers reveal fine-scale genetic structuring across European hake populations (*Merluccius merluccius*)." *Molecular ecology* 23.1 (2014): 118-135.
- Mueller, R.L., 2006. Evolutionary rates, divergence dates, and the performance of mitochondrial genes in Bayesian phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 55, 289–300.
- Relini, Lidia Orsi, et al. "Distribution of the Mediterranean hake populations (*Merluccius merluccius smiridus* Rafinesque, 1810)(Osteichthyes: Gadiformes) based on six years monitoring by trawl-surveys: some implications for management." *Scientia Marina* 66.S2 (2002): 21-38.

- Roldán, María Inés, et al. "Population genetic structure of European hake, *Merluccius merluccius*." *Heredity* 81.3 (1998): 327-334.
- Rubinoff, D., Holland, B.S., 2005. Between Two Extremes: Mitochondrial DNA is neither the Panacea nor the Nemesis of Phylogenetic and Taxonomic Inference. *Syst. Biol.* 54, 952–961
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., Reyes, A., 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–209.
- Şalcıoğlu, Asli, et al. "Phylogeography and population dynamics of the Eastern Mediterranean whiting (*Merlangius merlangus*) from the Black Sea, the Turkish Straits System, and the North Aegean Sea." *Fisheries research* 229 (2020): 105614
- Sayin, E., Pazi I., and Eronat, C., 2006. Investigation of water masses in Izmir Bay, western Turkey, *Turkish Journal of Earth Sciences*, 15: 343-372
- Silva-Segundo, Claudia A., et al. "Clarifying the taxonomic status of *Merluccius* spp. in the northeastern Pacific: a combined morphological and molecular approach." *Reviews in fish biology and fisheries* 21 (2011): 259-282.
- Šoljan, Tonko. *Fishes of the Adriatic:(Ribe Jadrana)*. Vol. 1. NOLIT Publishing House, 1963.
- Strüder-Kypke, M.C., Lynn, D.H., 2010. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. *Syst. Biodivers.* 8, 131–148.
- Tanner, Susanne E., et al. "Integrating microsatellite DNA markers and otolith geochemistry to assess population structure of European hake (*Merluccius merluccius*)."
Estuarine, Coastal and Shelf Science 142 (2014): 68-75.
- Tobe, S.S., Kitchener, A.C., Linacre, A.M.T., 2010. Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. *PLoS ONE* 5, e14156.
- Uzer, Uğur, Bayram Öztürk, and T. Yıldız. "Age composition, growth, and mortality of European hake *Merluccius merluccius* (Actinopterygii: Gadiformes: Merlucciidae) from the northern Aegean Sea, Turkey." *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 49.2 (2019): 109-117.
- Vieira, Ana Rita, et al. "Genetic and morphological variation of the forkbeard, *Phycis phycis* (Pisces, Phycidae): evidence of panmixia and recent population expansion along its distribution area." *PLoS One* 11.12 (2016): e0167045.
- Wuillez, Mathieu, et al. "Indices for capturing spatial patterns and their evolution in time, with application to European hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay." *ICES Journal of Marine Science* 64.3 (2007): 537-550.

Yalcin, Esin, and Rasit Gurbet. "Environmental influences on the spatio-temporal distribution of European Hake (*Merluccius merluccius*) in Izmir Bay, Aegean Sea." (2016)

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γεωργίου, Κωνσταντίνος. *Μελέτη της βιολογίας και αλιείας του μπακαλιάρου (Merluccius merluccius) στον Παγασητικό κόλπο*. BS thesis. 2009.
- Ζαχαρίας, Μιλτιάδης Γ. *Μελέτη της βιολογίας και πληθυσμιακά χαρακτηριστικά του μπακαλιάρου (Merluccius merluccius) στον Παγασητικό κόλπο*. MS thesis. 2012.
- Σαρρή, Κωνσταντίνα. *Έλεγχος της καταλληλότητας του γονιδίου 16S rRNA ως παγκόσμιου μοριακού δείκτη για την ταυτοποίηση ζωικών ειδών*. BS thesis. 2011.
- Σωτηρακόπουλος Π. ,2015. Φυλογενετική προσέγγιση αντιπροσώπων της ελληνικής αραχνοπανίδας με ανάλυση τμήματος του μιτοχondριακού γονιδιώματος (DNA Barcoding) (master Thesis).
- Τσοτουλίδης, Π.Κ., 2023. Πληθυσμιακή γενετική ανάλυση του δημόσπογγου *Alysina Aerophoba*. Nardo 1833 στην Μεσόγειο βάση του COI γονιδίου (bachelorThesis).

ABSTRACT

The present thesis is a study on the population genetics of the European hake (*Merluccius merluccius*) from different Mediterranean countries. The aim was to draw conclusions on the population classification and to compare the available data. Sampling was conducted via experimental trawling in Toroneos Gulf. Then, genetic material was isolated from 20 fish. The mitochondrial DNA portion of the cytochrome oxidase (COI) subunit I gene was amplified by PCR and tested by electrophoresis. Through the Genbank database, sequences were retrieved from populations present in France, Turkey, Malta, Italy, Spain and Portugal. Sequence processing was achieved with the use of the Aliview, MEGA, Arlequin and popArt software. The results further visualized with a Maximum Likelihood phylogenetic tree. Results exhibited relatively low diversity among the Mediterranean populations. This fact could be attributed to the hake's ability to bypass oceanographic obstacles which in turn results in their large gene flow and high inbreeding.

Key words: *Merluccius merluccius*, population genetics, COI gene, genetic differentiation, Toroneos Gulf