



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Πληθυσμιακή γενετική του είδους *Octopus vulgaris* στην Μεσόγειο»

ΓΚΟΥΓΚΑΛΗ ΡΑΦΑΕΛΛΑ

ΒΟΛΟΣ 2024

«Πληθυσμιακή γενετική του είδους *Octopus vulgaris* στην Μεσόγειο»

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

- 3) **Δημήτριος Βαφείδης**, Καθηγητής Θαλάσσιας βιοποικιλότητας του Τμήματος Γεωπονίας
Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, **Μέλος**

*Στην οικογενειά μου ,
Και ιδιαίτερα στους γονείς μου Θεόφιλο & Κορνηλία*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας αυτής, κ. Γκάφα Γεώργιο για την εμπιστοσύνη και για την καθοδήγηση που μου έδωσε κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους 1) Βαφείδη Δημήτριο και 2) Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, καθώς και στην κα.Σαραντοπούλου Ιωάννα για την στήριξη και την προμήθεια εργαστηριακού υλικού που μου παρείχε κατά την διεξαγωγή των εργαστηρίων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου και φυσικά στο αγόρι μου Κωνσταντίνο για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία γίνεται ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας πληθυσμών *Octopus vulgaris* ,στη Μεσόγειο θάλασσα με έμφαση σε δείγματα που συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό και τον Κορινθιακό κόλπο. Η δειγματοληψία έγινε με αυτόνομη κατάδυση και τη χρήση ψαροντούφεκου. Μέσω της παγκόσμιας βάσης δεδομένων NCBI έγινε ανάκτηση 77 ακόμη αλληλουχιών της περιοχής που κωδικοποιεί την υπομονάδα I του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) από δείγματα των περιοχών Ιταλίας, Ισπανίας, Τουρκίας, Σάμου και Ικαρίας. Αναλύθηκαν στο σύνολο 91 αλληλουχίες για την αξιολόγηση της γενετικής ποικιλότητας ,την δομή του πληθυσμού και τη γενετική ροή στη λεκάνη της Μεσογείου. Η ανάλυση, παρόλο την υψηλή συνδεσιμότητα και γονιδιακή ροή των πληθυσμών της Μεσογείου ,κατέδειξε γενετική διαφοροποίηση μεταξύ της Ανατολικής και Δυτικής Μεσογείου, όχι όμως μεταξύ των άλλων 2 ελληνικών (Σάμος, Ικαρία) με Σαρωνικό και Κορινθιακό.

Λέξεις-κλειδιά: *Octopus vulgaris*, πληθυσμιακή δομή, Σαρωνικός κόλπος, Κορινθιακός κόλπος ,COI, γενετική διαφοροποίηση, Μεσόγειος θάλασσα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	vii
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Βιοποικιλότητα <i>Octopus vulgaris</i>	1
1.2 Είδη <i>Octopus</i> στην Μεσόγειο.....	4
1.4 Πληθυσμιακές μελέτες στην Μεσόγειο.....	5
1.5 Το κοινό χταπόδι.....	7
1.6 Χρήση COI σε πληθυσμιακή μελέτη	8
1.7 Σκοπός.....	8
1.8 Στατιστικές υποθέσεις.....	9
2.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	11
2.1 Συλλογή δειγμάτων.....	11
2.2 Εξαγωγή γενετικού υλικού	13
2.3 Ηλεκτροφόρηση.....	15
2.4 PCR.....	18
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	21
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	23
3.1 Αποτελέσματα DNA extraction	23
3.2 Αποτελέσματα PCR & REPCR	23
3.3 Αποτελέσματα απλότυπων & μονοειδικές αλληλουχίες.....	25

3.4 Αποτελέσματα Tajima's D, Fst, AMOVA	26
3.5 Κατανομή απλοτύπων σε χάρτη	29
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
ABSTRACT.....	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38
Παράρτημα.....	43

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοποικιλότητα *Octopus vulgaris*

Στο σημερινό ταχέως εξελισσόμενο πεδίο της γενετικής , οι μελέτες με βάση τον πληθυσμό έχουν γίνει ολοένα και πιο σημαντικές σε ότι αφορά ειδικά την γενετική ποικιλομορφία και δυναμική διαφόρων ειδών. Το γένος *Octopus* είναι μέρος της οικογένειας Octopodidae στην κατηγορία Cephalopoda, μια αρκετά εξελιγμένη ομάδα μαλακίων που είναι γνωστά για το ιδιαίτερα περίπλοκο νευρικό τους σύστημα , την προσαρμοστικότητα τους και τις ιδιαίτερες συμπεριφορές τους(Albertin et al., 2015). Με περισσότερα από 300 είδη καταλαμβάνει ευρύ φάσμα θαλάσσιων ενδιαιτημάτων από ρηχά νερά έως την βαθιά θάλασσα (Norman et Finn,2001), ενώ η πλειοψηφία του γένους καταλαμβάνει την Μεσόγειο ,και έπειτα τον Ατλαντικό ωκεανό.

Το *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) , γνωστό ως το κοινό χταπόδι (*vulgaris*=κοινό στα λατινικά) είναι ένα εξαιρετικά ευφυές Κεφαλόποδο που συναντάται σε ποικίλες θάλασσες παγκοσμίως (Hermosilla et al., 2011). Κατοικεί σε βάθη 0-200 μέτρα και επιβιώνει σε διαφορετικά βενθικά συστήματα, από αμμώδεις έως και βραχώδεις περιοχές (Borges et al., 2022, S.v. Boletzky 2003). Διαθέτει ευελιξία σε παραμέτρους όπως στη θερμοκρασία του νερού από 6-33 βαθμούς Κελσίου. Από τα βασικά γνωρίσματα που το καθιστούν τόσο κοινό είναι η προσαρμοστικότητα και η αναπαραγωγική του ικανότητα. Σαν είδος μπορεί να αναπαράγεται σε σύντομες χρονικές περιόδους , ενώ φτάνει την σεξουαλική ωριμότητα μέσα στους πρώτους 3-4 μήνες. Η ικανότητα να αναπαράγει χιλιάδες αυγά σε σύντομο χρονικό διάστημα μαζί με την γεωγραφική εξάπλωση των προνυμφών μέσω των θαλάσσιων ρευμάτων επιτρέπει την ευρεία εξάπλωση και επιβίωση του είδους .

Λόγω της υψηλής οικονομικής αξίας αυτού του είδους, έχει γίνει σημαντική προσπάθεια για τη διερεύνηση του δυναμικού της υδατοκαλλιέργειας (Vaz-Pires et al., 2004). Οι κύριες προκλήσεις περιλαμβάνουν την διαβίωση (βενθικό υπόστρωμα), τη διατροφή και την εκτροφή νεογνών.

Παρά την σημασία του τόσο οικολογικά όσο και οικονομικά, υπάρχουν λίγες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την πληθυσμιακή δομή του, και γενικότερα την γενετική διαφοροποίηση του, τόσο παγκοσμίως, όσο και πιο ειδικά στην Μεσόγειο.

1.1.1 Συστηματική κατάταξη

Το κοινό χταπόδι (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797) έχει την εξής συστηματική κατάταξη:

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη κοινού χταποδιού

Φύλο	Μαλάκια (<i>Mollusca</i>)
Ομοταξία	Κεφαλόποδα (<i>Cephalopoda</i>)
Υφομοταξία	Κολοειδή (<i>Coleoidea</i>)
Τάξη	Οκτώβραχιονωτά-Οκτώποδα (<i>Octobrachiata-Octopoda</i>)
Οικογένεια	Οκτωποδίδες (<i>Octopodidae</i>)
Γένος	<i>Octopus</i>
Είδος	<i>Octopus vulgaris</i> Cuvier, 1797 (κοινό χταπόδι)

1.1.2 Ιστορική εξέλιξη

Η εξελικτική ιστορία των χταποδιών συμπεριλαμβανομένου του *Octopus vulgaris* εκτείνεται εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια πίσω. Η καταγωγή των Κεφαλόποδων διαφοροποιήθηκε από άλλα μαλάκια κατά την Κάμβρια περίοδο, περίπου 500 εκατομμύρια χρόνια πριν (Fuchs et al., 2020). Τα Κεφαλόποδα σαν ομάδα εξελίχθηκαν μέσω δραματικών μορφολογικών αλλαγών, προσαρμόζοντας σε ποικίλες οικοθέσεις. Τα πρώιμα κεφαλόποδα όπως οι αμμωνίτες και τα ναυτιλοειδή διέθεταν εξωτερικά κελύφη όπου χρησιμοποιούνταν για άνωση και προστασία, ένα χαρακτηριστικό που χάθηκε σταδιακά καθώς το είδος προσαρμόστηκε σε νέες οικολογικές προκλήσεις και περιβάλλοντα (Kröger et al., 2011).

Τα σύγχρονα χταπόδια πιστεύεται ότι προέρχονται λοιπόν από την Μεσοζωική εποχή κατά την οποία σημειώθηκαν νευρικές και μορφολογικές αλλαγές, ιδιαίτερα στην Κρητιδική περίοδο (Albertin et al., 2015). Η μετάβαση από πρόγονο με κέλυφος, σε απουσία του, παρείχε μεγάλη ευελιξία, βοηθώντας σε διαφυγή από θαλάσσια αρπακτικά και ανάπτυξη των ικανοτήτων διαφυγής τους (Kröger et al., 2011; Young et al., 1998). Ο πρωτοπόρος παλαιοντολόγος George Cuvier αναγνώρισε τον 19^ο αιώνα την εξελεγκτική σύνδεση μεταξύ των «αρχαίων» κεφαλόποδων με τα σύγχρονα χταπόδια (Cuvier, 1817). Ορισμένα απολιθώματα όπως οι βελεμνίτες πριν από 150 εκατομμύρια χρόνια κατά την Ιουρασική περίοδο εμφάνισαν εσωτερική δομή των κελυφών τους (

Εικόνα 1), δείγμα εξέλιξης της ομοταξίας (Mapes & Kröger, 2015).). Αυτή η τάση προς τη μείωση του κελύφους συνεχίστηκε με είδη όπως το *Pohlsepia mazonensis*, ένα πρώιμο χταπόδι που έζησε περίπου 296 εκατομμύρια χρόνια πριν και είχε ήδη χάσει εντελώς το εξωτερικό του κέλυφος. Η απώλεια του κελύφους έφερε σημαντικά προσαρμοστικά πλεονεκτήματα.

Απελευθερωμένα από τους εξωσκελετούς τους, τα χταπόδια έγιναν εξαιρετικά εύκαμπτα, γεγονός που τους επέτρεψε να στριμώχνονται σε στενούς χώρους και να αποφεύγουν τους θηρευτές. Σύμφωνα με τους (Lee et al., 2003) με γενετικές έρευνες που διεξήχθησαν, αποσαφήνισαν ότι τα γονίδια που ήταν υπεύθυνα για τον σχηματισμό των κελυφών στους προγόνους των χταποδιών είτε χάθηκαν εντελώς είτε επαναχρησιμοποιήθηκαν σχηματίζοντας μέρος των μαλακών σωμάτων τους.

.Η ανάπτυξη άλλων αμυντικών μηχανισμών όπως για παράδειγμα οι μελανοφόροι σάκοι και οι ικανότητες καμουφλάζ, διευκόλυνε την εξελεγκτική πρόοδο (Voight, 2012, Young et al., 1998).. (Mapes & Kröger, 2015). Αυτό, σε συνδυασμό με τις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές πιέσεις κατά τη Μεσοζωική εποχή, ιδιαίτερα στην Κρητιδική περίοδο, επέτρεψε στα χταπόδια να εξελίξουν μια σειρά από νέα χαρακτηριστικά.



Εικόνα 1: Απολίθωμα προγονικού χταποδιού *Proteroctopus ribeti* κατά τη διάρκεια της Ιουρασικής περιόδου

1.2 Είδη *Octopus* στην Μεσόγειο

Η Μεσόγειος Θάλασσα φιλοξενεί μια ποικιλία ειδών χταποδιών, πολλά από τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη δυναμική του πληθυσμού μεταξύ της ανατολικής και της δυτικής λεκάνης. Αυτές οι διακυμάνσεις συχνά οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και οι ανθρωπογενείς πιέσεις.

Το *Callistoctopus macropus* (Risso, 1826) γνωστό ως χταπόδι με λευκές κηλίδες χαρακτηρίζεται από λεπτά μακριά πλοκάμια, ενώ παράλληλα είναι νυκτόβιο είδος. Προτιμά τα παράκτια, ρηχά νερά κοντά σε αμμώδεις βυθούς. Βρίσκεται κυρίως στην Δυτική Μεσόγειο στις ακτές της Ισπανίας, ανατολικές περιοχές της Τουρκίας και της Ελλάδας, ενώ σύμφωνα με τους (Salman & Katagan, 2004) απουσιάζει στα ψυχρά νερά της Αδριατικής. Στις ανατολικές και νοτιοανατολικές περιοχές της Μεσογείου, οι πληθυσμοί τείνουν να είναι πιο αραιοί, πιθανότατα λόγω των θερμότερων νερών και της μειωμένης πολυπλοκότητας των οικοτόπων. Συναντάται πιο συχνά κατά μήκος των ακτών της Κύπρου, του Λιβάνου και του Ισραήλ. Στη έρευνα των (Bello & Ragonese 2001) δυτική Μεσόγειο, εμφανίζεται πιο συχνά στις Ισπανικές και Ιταλικές ακτές, όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι πιο ευνοϊκές.

Το *Eledone moschata* (Lamarck, 1798) Η κοινή ονομασία αυτού του είδους, μοσχομυριστό χταπόδι, προέρχεται από την χαρακτηριστική μυρωδιά που εκπέμπει όταν αφαιρεθεί από το νερό. Η μυρωδιά προέρχεται από εκκρίσεις αδένων στο δέρμα. Η λειτουργία αυτής της έκκρισης είναι άγνωστη. Είναι ένα άλλο σημαντικό είδος, αν και είναι λιγότερο εμπορικά πολύτιμο από το *O. vulgaris*. Μελέτες δείχνουν ότι *E. moschata* ακολουθεί επίσης παρόμοια τάση μεγαλύτερης αφθονίας στη δυτική Μεσόγειο. Οι Mangold και Wirz (1963) διαπίστωσαν ότι οι πληθυσμοί είναι πιο πυκνοί στα βόρεια τμήματα της δυτικής λεκάνης, όπως κατά μήκος των ακτών της Ιταλίας και της Γαλλίας, όπου η παροχή θρεπτικών ουσιών είναι ευνοϊκότερη. Στην ανατολική Μεσόγειο οι πληθυσμοί *E. moschata* είναι μειωμένοι σε αφθονία πιθανότατα λόγω λιγότερο βέλτιστων περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως οι υψηλότερες θερμοκρασίες και η χαμηλότερη πρωτογενής παραγωγικότητα.

Το *Eledone cirrhosa* (Lamarck, 1798) εμφανίζεται πιο συχνά σε βάθη μεταξύ 60 έως 120 m στην υφαλοκρηπίδα. Το είδος απαντά σε ένα ευρύ φάσμα οικοτόπων από άμμο και βραχώδεις υφάλους. Συναντάται πιο συχνά σε Σαρδηνία, Ιόνιο, Αδριατική Θάλασσα του Μαρμαρά και Μαύρη Θάλασσα. Στη δυτική Μεσόγειο, η διάρκεια ζωής φαίνεται να είναι 2

έως 3 χρόνια και περισσότερο σε ψυχρότερα νερά βορειότερα κυρίως στον ανατολικό Ατλαντικό. Μελέτες όπως (Guerra 1982) καταδεικνύουν ότι το *E. cirrhosa* είναι πιο άφθονο και επιτυγχάνει μεγαλύτερα μεγέθη στη δυτική λεκάνη, όπου η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών είναι υψηλότερη. Οι Κατσανεβάκης και Βερριόπουλος (2006) παρατήρησαν ότι οι πληθυσμοί της ανατολικής Μεσογείου, ιδιαίτερα στο Αιγαίο, είναι μικρότεροι και αναπαράγονται λιγότερο συχνά από τους δυτικούς ομολόγους τους.

1.4 Πληθυσμιακές μελέτες στην Μεσόγειο

Οι μελέτες για την διαφοροποίηση των πληθυσμών του *O. vulgaris* παραμένουν ελλιπείς ειδικά στην Μεσόγειο. Οι πληθυσμιακές έρευνες του είδους ξεκίνησαν με τους Maltagliati et al. (2002) και (Casu et al. (2002) , όπου χρησιμοποίησαν αλλοένζυμα και μικροδορυφορικούς δείκτες αντιστοίχως για να εξετάσουν πληθυσμούς κυρίως στην Δυτική και Κεντρική Μεσόγειο (Ισπανία, Αγκόνα, Νάπολη), συγκρίνοντας τα με δείγματα από την Ανατολική Μεσόγειο και τον Ατλαντικό. Και οι δύο έρευνες δεν βρήκαν στοιχεία γενετικής «απομόνωσης», ωστόσο η ανάλυση των αλλοενζύμων κατέδειξε ένα γενετικό χάσμα μεταξύ του πληθυσμού της Δυτικής λεκάνης με την Ανατολική, το οποίο δεν ανιχνεύθηκε όμως από τον μικροδορυφορικό δείκτη. Αυτή η απόκλιση ερμηνεύτηκε στις διαφορετικές αναλύσεις των δυο μεθόδων και στον περιορισμό της χρήσης ενός μικροδορυφορικού τύπου.

Περαιτέρω έρευνα στην κεντρική Μεσόγειο και ιδιαίτερα στο Στενό της Σικελίας χρησιμοποιώντας μιτοχονδριακούς δείκτες, αποκάλυψε σημαντική γενετική διαφοροποίηση σε αρκετούς πληθυσμούς *O. vulgaris* με αρκετή ποικιλομορφία, (Fadhlaoui-Zid et al., 2012(Fadhlaoui-Zid et al., 2012; Fadhlaoui-Zid et al. 2021), ενώ επίσης επισήμανε την γενετική διαφοροποίηση μεταξύ Δυτικών και Ανατολικών πληθυσμών υποδεικνύοντας το Στενό της Σικελίας ως μια μεταβατική ζώνη με περιορισμένη γονιδιακή ροή. Ομοίως, μελέτες όπως αυτές των (Ruggeri et al. 2012) τόνισε τον ρόλο του καναλιού της Σικελίας στη γενετική ανάμειξη, αποκαλύπτοντας πληθυσμούς με ενδιάμεσα γενετικά χαρακτηριστικά και από τις δύο πλευρές της Μεσογείου.

Όσον αφορά την πυκνότητα πληθυσμού, σε έρευνα του ο Mangold (1983) χρησιμοποιώντας δεδομένα από αλιευτικές δραστηριότητες κυρίως στις ακτές της Ισπανίας και της Γαλλίας στη Δυτική Μεσόγειο συνέκρινε αυτά τα δεδομένα με αντίστοιχα της Ανατολικής Μεσογείου για να καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι δυτικές περιοχές εμφάνιζαν μεγαλύτερη αφθονία του είδους. Αυτό συνδέθηκε με πιο ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες

στα Δυτικά, όπως η υψηλότερη παραγωγικότητα και οι βέλτιστες θερμοκρασίες του νερού. Οι Belcari et al. (2002) επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να βρίσκονται στην Κεντρική και Δυτική Μεσόγειο, ενώ η Ανατολική λεκάνη, ιδιαίτερα θάλασσα του Λεβάντε, παρουσίασε χαμηλότερες πυκνότητες, πιθανότατα λόγω της υψηλότερης αλατότητας και των λιγότερο ευνοϊκών συνθηκών οικοτόπου.

Αρκετά λίγες καταγραφές υπήρχαν για την κατανομή του *O. vulgaris* της θάλασσας του Λεβάντε, μια άλλη ονομασία για την Ανατολική Μεσόγειο με τα περισσότερα δεδομένα να προέρχονται από Τουρκικά και Ισραηλινά ύδατα (Adam, 1967, Ruby & Knudsen, 1972), ωστόσο σε μια πρόσφατη μελέτη των Keskin και Atar (2011) αναλύθηκε η γενετική δομή του είδους κατά μήκος της Τουρκικής ακτής με την χρήση μιτοχονδριακών δεικτών (COI) και υπέδειξε διαφορά στα δείγματα των Τουρκικών υδάτων με άλλα της Δυτικής Μεσογείου. Οι Κατσανεβάκης και Βερριόπουλος (2006) τόνισαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των χταποδιών σε μελέτη παραθαλάσσιων περιοχών του Κορινθιακού, δείχνοντας ότι τα χταπόδια στα θερμότερα νερά της ανατολικής Μεσογείου αυξάνονταν ταχύτερα αλλά είχαν μικρότερη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με εκείνα στα ψυχρότερα νερά της Δύσης.

Αυτές λοιπόν οι μελέτες δείχνουν ότι το *O. vulgaris* είναι πιο άφθονο πληθυσμιακά στη Δυτική Μεσόγειο παρά στην Ανατολική Μεσόγειο ίσως λόγω έλλειψης μελετών στην ανατολική μεριά της Μεσογείου (De Luca, 2014).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά σύγκρισης *O. vulgaris* σε Ανατολική & Δυτική Μεσόγειο Μεσόγειο σύμφωνα με Coll, M. et al. (2016); Raya, C.P., & Fernández-Núñez, M.M. (2012); Mangold, K. (1983); Lejeune, C. et al (2016)

Χαρακτηριστικό	Δυτική Μεσόγειος	Ανατολική Μεσόγειος	Χαρακτηριστικό	Δυτική Μεσόγειος	Ανατολική Μεσόγειος
Θερμοκρασία νερού	Ψυχρότερη, ειδικά κοντά στον Ατλαντικό	Θερμότερη, ιδιαίτερα στα νότια και ανατολικά	Αναπαραγωγική επιτυχία	Υψηλότερη, πιο τακτικός και συγχρονισμένος κύκλος αναπαραγωγής	Χαμηλότερη, με ασταθείς κύκλους αναπαραγωγής
Επίπεδα θρεπτικών συστατικών	Υψηλότερα, λόγω εισροής από τον Ατλαντικό μέσω του Γιβραλτάρ	Χαμηλότερα, με λιγότερη ανανέωση θρεπτικών συστατικών	Πρωτογενής παραγωγικότητα	Υψηλότερη	Χαμηλότερη
Πυκνότητα πληθυσμών	Μεγαλύτερη	Μικρότερη	Πολυπλοκότητα οικοτόπων	Πιο πολύπλοκοι οικοτόποι	Λιγότερο πολύπλοκοι

χταποδιών			(βραχώδεις ακτές, κοραλλιογενείς ύφαλοι)	οικότοποι	
Παραδείγματα ειδών με μεγαλύτερη αφθονία	<i>Octopus vulgaris</i> , <i>Eledone cirrhosa</i> , <i>Eledone moschata</i>	Πιο αραιοί πληθυσμοί των ίδιων ειδών, με μειωμένη αφθονία	Ανθρωπογενείς πιέσεις (π.χ. υπεραλίευση)	Υπάρχει αλιεία, αλλά τα νερά είναι πιο παραγωγικά	Ισχυρότερη αλιεία, μεγαλύτερη υποβάθμιση οικοτόπων
Περιβαλλοντική σταθερότητα	Σταθερότερες συνθήκες, περισσότερη τροφή	Ασταθείς συνθήκες, θ οC μεταβολές και λιγότερα θρεπτικά στοιχεία	Βιομάζα χταποδιών	Μεγαλύτερη	Μικρότερη

1.5 Το κοινό χταπόδι

Το κοινό χταπόδι, το οποίο μελετάται στην παρούσα εργασία είναι το πιο διαδεδομένο χταπόδι στην Μεσόγειο, διαθέτει 8 βραχίονες ή αλλιώς πλοκάμια και χαρακτηρίζεται από την προσαρμοστικότητά του σε ευρεία υποστρώματα. Απαντάται σε όλη την Μεσόγειο, με υψηλή πυκνότητά στην Αδριατική, τον κόλπο της Γένοβας, την Ισπανία και βρίσκεται και σε αφθονία στην Ελλάδα. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι οι πληθυσμοί είναι πυκνότεροι και αναπτύσσονται ταχύτερα στη Δυτική Μεσόγειο παρά στην Ανατολική λεκάνη. Αυτό αποδίδεται στα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά νερά του Ατλαντικού που εισέρχονται μέσω του στενού του Γιβραλτάρ, τα οποία ευνοούν πιο παραγωγικά οικοσυστήματα. Για παράδειγμα, οι Quetglas et al. (1998) ανέφεραν ότι οι πληθυσμοί κοντά στις Βαλεαρίδες Νήσους παρουσιάζουν υψηλότερη βιομάζα και ταχύτερη ανάπτυξη από τους πληθυσμούς στο Αιγαίο Πέλαγος, οι οποίοι αντιμετωπίζουν υψηλότερες θερμοκρασίες και χαμηλότερα επίπεδα θρεπτικών ουσιών.

Μέχρι προσφάτως υπήρχαν ελάχιστες πληροφορίες για την διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών σε διαφορετικές περιοχές, ωστόσο μοριακές μελέτες έχουν αποδείξει σημαντική γενετική διαφοροποίηση υποδεικνύοντας την ύπαρξη διακριτών υποειδών σε κάποιες περιοχές (Guzik et al. 2005). Μοριακές μελέτες επίσης με την χρήση γονιδιακών δεικτών, όπως η περιοχή που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COI), έχουν αποκαλύψει γενετική ποικιλότητα μεταξύ των πληθυσμών σε διάφορες περιοχές του κόσμου με έμφαση την Μεσόγειο, υποδεικνύοντας ότι οι πληθυσμοί αυτοί μπορεί να έχουν διαφορετικές εξελικτικές πορείες (Norman et al. 2014).

Σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό (IUCN), το *O. vulgaris* δεν θεωρείται προς το παρόν είδος υπό απειλή ενώ παράλληλα κατατάσσεται στη κατηγορία Μειωμένου ενδιαφέροντος λόγω της ευρείας εξάπλωσης του.

1.6 Χρήση COI σε πληθυσμιακή μελέτη

Η υπομονάδα της κυτοχρωμικής οξειδάσης I, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο MT-COI αποτελεί σημαντικό ένζυμο στον αναερόβιο μεταβολισμό και συμβάλει στην παραγωγή ATP. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αναφέρεται επίσης ως COX1, CO1 ή και COI. Τα μιτοχόνδρια προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς που εισήλθαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα συμβάλλοντας στην κυτταρική αναπνοή. Το μιτοχονδριακό DNA(mtDNA) κωδικοποιεί την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης I (CO1 ή MT-CO1) που αποτελεί μέρος του συμπλόκου IV. Αυτό το σύμπλοκο είναι το τελευταίο ένζυμο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια (Χατζηκωνσταντίνου, Δ. 2022).

Το mtDNA χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες εξέλιξης και ταξινόμησης διαφόρων οργανισμών καθώς και στην φυλογενετική ανάλυση. Μια κοινή τεχνική για την μελέτη πληθυσμών και την ταξινόμηση οργανισμών είναι το DNA barcoding. Αυτή η μέθοδος συγκρίνει δείγματα με γνωστά γονιδιώματα από βιβλιοθήκες, χρησιμοποιώντας τμήματα του μιτοχονδριακού DNA που κωδικοποιούν την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI). Το γονίδιο COI χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους οργανισμούς όπως ιχθύες, φυτά (Kress et al 2005), μαλάκια, μύκητες (Wang et al. 2005) κ.ά. Οι βασικοί λόγοι που είναι κατάλληλο για πληθυσμιακές μελέτες είναι η σταθερή δομή του γονιδιώματος, απουσία ιντρονίων κατά την αλληλούχιση και η υψηλή συχνότητα μετάλλαξης λόγω του περιορισμένου συστήματος επιδιόρθωσης.

1.7 Σκοπός

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της γενετικής δομής των πληθυσμών κοινού χταποδιού σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου με τη χρήση COI. Τα ιδιαίτερα περιβαλλοντικά γνωρίσματα κάθε περιοχής, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη αλιευτική πίεση, προάγουν στον έλεγχο κατανομής του είδους. Ο Σαρωνικός και ο Κορινθιακός κόλπος προσφέρουν κατάλληλα βενθικά περιβάλλοντα για το *Octopus vulgaris*. Ο Σαρωνικός, με τα νησιά και τις βραχονησίδες του, παρουσιάζει θερμοκρασίες από 14°C έως 26°C, ενώ τα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά νερά του ευνοούν την παρουσία

καρκινοειδών και ψαριών, βασικής τροφής για τα χταπόδια Katsanevakis και Verriopoulos, (2004); Καπίρης Κ.). Αντίστοιχα, ο ημιπερίκλειστος Κορινθιακός Κόλπος, με θερμοκρασίες 13°C έως 25°C, χαρακτηρίζεται από βαθιές πλαγιές και λιβάδια ποσειδωνίας, προσφέροντας άφθονα καταφύγια και πηγές τροφής για το είδος Koutsikopoulos et al.,(1997).

Με την ανάλυση μιτοχονδριακού γονιδίου COI, αυτή η μελέτη επιδιώκει να αξιολογήσει εάν γεωγραφικά και ωκεανογραφικά εμπόδια, συμβάλλουν στη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών στις λεκάνες της Ανατολικής και Δυτικής Μεσογείου. Οι περιοχές μελέτης αντίστοιχων δεδομένων που συμπεριλήφθηκαν είναι η Ισπανία, Ιταλία, Τουρκία, Ελλάδα. Η έρευνα στοχεύει να ποσοτικοποιήσει την ροή γονιδίων και την συνδεσιμότητα του πληθυσμού, να εντοπίσει πολυμορφισμούς, και να παρέχει πληροφορίες για την διασπορά του είδους. Σε παρόμοιες έρευνες για είδη της Μεσογείου *Zonodélfino* Georgios A. Gkafas, et al. (2017), και *Cymodocea nodosa* Ioannis Konstantinidis et al.(2022) φάνηκε διαφοροποίηση μεταξύ των περιοχών στην Μεσόγειο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι συνθήκες στις περιοχές αυτές διαφέρουν, αναμένεται να υπάρξει γενετική διαφοροποίηση.

1.8 Στατιστικές υποθέσεις

Το ερευνητικό ερώτημα που καλούμαστε να απαντήσουμε είναι εάν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών του κοινού χταποδιού:

- α) Σαρωνικού και Κορινθιακού κόλπου
- β) Ανατολικής και Δυτικής Μεσογείου

ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΘΕΣΕΩΝ

H0: Δεν υπάρχει σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών στη Δυτική και Ανατολική λεκάνη της Μεσογείου καθώς και μεταξύ των πληθυσμών του Σαρωνικού και το Κορινθιακού κόλπου.

H1: Υπάρχει σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών στη Δυτική και Ανατολική λεκάνη της Μεσογείου καθώς και μεταξύ των πληθυσμών του Σαρωνικού και το Κορινθιακού κόλπου.

Σύμφωνα με αυτό το αποτέλεσμα όπου η πιθανότητα είναι μικρότερη του επιπέδου σημαντικότητας $p < 0.005$ απορρίπτουμε την μηδενική υπόθεση **H0** και δεχόμαστε την

εναλλακτική **H1**

Σύμφωνα με αυτό το αποτέλεσμα όπου η πιθανότητα είναι μεγαλύτερη ή ίση του επιπέδου σημαντικότητας $p \geq 0.005$ απορρίπτουμε την **H1** και δεχόμαστε την μηδενική υπόθεση **H0**

2.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

2.1.1 Διαδικασία συλλογής δειγμάτων

Τα 23 δείγματα του *O.vulgaris* συλλέχθηκαν τους χειμερινούς μήνες Νοέμβριο 2023 έως και Φεβρουάριο 2024 σε διάρκεια 5 δειγματοληψιών από διαφορετικές παραθαλάσσιες περιοχές. Χρησιμοποιήθηκαν:

- Ψαροντούφεκο ως αλιευτικό εργαλείο
- Μάσκα
- Ισοθερμική καταδυτική στολή
- Βατραχοπέδιλα
- Σάκος για την συλλογή χταποδιών

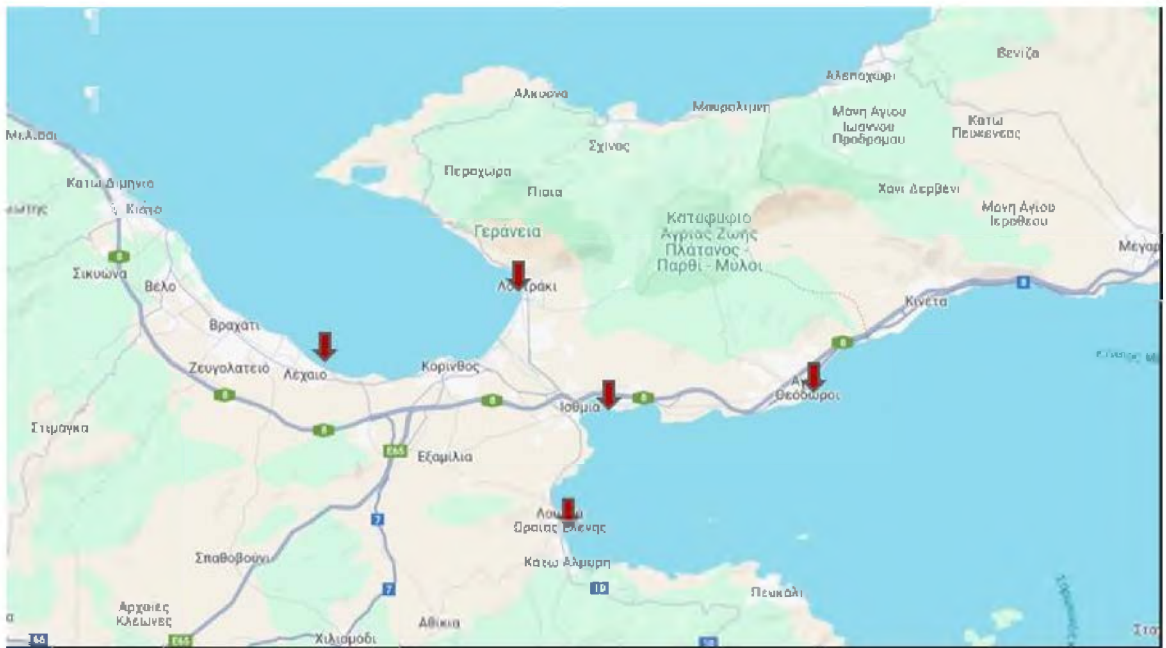
Οι καταδύσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ βάθους 2-20 μέτρων, εστιάζοντας σε βραχώδη υποστρώματα και αμμώδεις περιοχές που είναι γνωστό ότι αποτελούν πρωταρχικούς βιότοπους για τα χταπόδια.

Πίνακας 3: Περιγραφή συλλογής δειγμάτων *Octopus vulgaris*

Α/Α	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΒΑΡΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ
1	18/11/2023	200	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
2	18/11/2023	267	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
3	18/11/2023	490	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
4	18/11/2023	410	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
5	18/11/2023	471	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
6	18/11/2023	446	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
7	18/11/2023	280	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
8	18/11/2023	1460	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
9	8/12/2023	1466	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
10	8/12/2023	220	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
11	8/12/2023	351	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
12	8/12/2023	383	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
13	8/12/2023	1108	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
14	16/12/2023	465	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
15	16/12/2023	1152	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
16	20/1/2024	490	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
17	10/2/2023	610	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
18	10/2/2023	1150	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
19	10/2/2023	433	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
20	10/2/2023	494	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
21	10/2/2023	815	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
22	10/2/2023	510	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ
23	10/2/2023	1226	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ

Ο Πίνακας 2 περιγράφει την συλλογή δειγμάτων χταποδιού με τον αριθμό δειγμάτων, την ημερομηνία συλλογής το βάρος του κάθε ατόμου που συλλέχθηκε και την περιοχή. Σημαντικό να σημειωθεί ότι τα άτομα χταποδιού 500γρ και κάτω, έπειτα από την λήψη ιστού αφέθηκαν ελεύθερα.

Κάθε δείγμα χταποδιού χειρίστηκε με προσοχή για να αποφευχθεί το άγχος ή η ζημιά. Μετά τη σύλληψη, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη με αιθανόλη 70% σε sterilized tubes και μεταφέρθηκαν σε εργαστηριακές εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Ιχθυολογίας-Υδροβιολογίας, του Τμ. Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την διαδικασία εξαγωγής του DNA .



Εικόνα 2 :Χάρτης περιοχών δειγματοληψιών σε Σαρωνικό και Κορινθιακό κόλπο

Η εικόνα 2 αποτελεί τον χάρτη των περιοχών δειγματοληψιών στον Σαρωνικό και Κορινθιακό κόλπο, που περιλαμβάνει τις περιοχές Λουτράκι, Άγιοι Θεόδωροι, Λέχαιο, Λουτρά Ωραίας Ελένης και Άγιο Χαράλαμπο για την συλλογή των 23 ατόμων *O. vulgaris* .Συνολικά 17 άτομα χταποδιών συλλέχθηκαν από τον κορινθιακό κόλπο στις περιοχές Λουτράκι και Λέχαιο , ενώ 6 άτομα συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό .

2.2 Εξαγωγή γενετικού υλικού

Μέσω της κατάδυσης με ψαροντούφεκο στον Κορινθιακό και Σαρωνικό κόλπο συλλέχθηκαν 23 άτομα *O. vulgaris*. Από τα 23 δείγματα πραγματοποιήθηκε εξαγωγή ιστού με την βοήθεια αποστειρωμένου με αιθανόλη ψαλιδιού, κόβοντας ένα κομμάτι βραχιόνων από κάθε άτομο και τοποθετώντας τα ξεχωριστά σε 70% αιθανόλη sterilized tube, και στην συνέχεια σε δοχείο με πάγο για την μεταφορά τους στο εργαστήριο για την διεξαγωγή απομόνωσης του ιστού. Για την διαδικασία απομόνωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε :

- Νυστέρι
- Λαβίδα
- Πιπέτες 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l
- 23 Eppendorf tubes
- Λύχνος μπούνσεν
- Διάλυμα αιθανόλης 100%
- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο
- Ποτήρι ζέσεως
- Ζυγός ακριβείας
- Διάλυμα αιθανόλης 80%

Αρχικά τα 23 eppendorf τοποθετήθηκαν σε απολυμασμένη επιφάνεια και προστέθηκε σε αυτά με την βοήθεια της πιπέτας διάλυμα αιθανόλης 80%. Κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης διαδικασίας η φλόγα του λύχνου έμενε αναμμένη για την αποτροπή επιμολύνσεων. Από κάθε δείγμα βραχιόνων χταποδιού ένα μικρό κομμάτι ιστού απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το νυστέρι και την λαβίδα για την τοποθέτηση στο αντίστοιχο Eppendorf. Ύστερα από κάθε επανάληψη για κάθε ένα από τα 23 δείγματα το νυστέρι και η λαβίδα απολυμαίνονταν με την χρήση αλκοόλης 100% και κάψιμο με τον λύχνο. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και για τα 23 δείγματα του *O. vulgaris*.

- Τοποθέτηση τμήματος ιστού 1mg σε αποστειρωμένο Eppendorf
- Προστέθηκαν 100 μ l Tris-HCl lysis buffer από διάλυμα (100 mM TNE, 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl και 1 mM EDTA διαλύει την πυρηνική και κυτταρική μεμβράνη και απελευθερώνει το γενετικό υλικό. Διατηρεί το pH 8 σταθερό κατά τη διάρκεια της εξαγωγής του DNA. Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης διατηρεί την ακεραιότητα του DNA, διαχωρίζει το DNA από άλλα κυτταρικά υπολείμματα και το προστατεύει από την όξινη αποικοδόμηση

- Προστέθηκαν 80 µl SDS σαπούνι απορρυπαντικό που βοηθάει στη λύση των κυττάρων κατά την εξαγωγή DNA
- Προστέθηκαν 10 µl PrK (πρωτεϊνάση K) που μετουσιώνει τις πρωτεΐνες.
- Τοποθέτηση σε 60° υδατόλουτρο όλο το βράδυ ώστε να αποικοδομηθούν οι πρωτεΐνες των κυττάρων και να απελευθερωθεί το DNA.
- Προστέθηκαν 300 διαλύματος χλωροφορμίου /ισοαμυλικής αλκοόλης αναλογίας 24:1+ 300 µl φαινόλης
- Ελαφριά ανάδευση για 10 λεπτά
- Φυγοκέντριση 12000 rpm για 10 λεπτά σε 4°C
- Λήψη υπερκείμενου DNA, χρήση νέων Eppendorf
- Χρήση πιπέτας 550 µl για λήψη υπερκείμενου
- Προστέθηκαν 300 µl χλωροφορμίου /ισοαμυλικής αλκοόλης + 300 φαινόλης
- Φυγοκέντριση 12000 rpm για 10 λεπτά
- Λήψη υπερκείμενου
- Προστέθηκαν 600 µl χλωροφορμίου /ισοαμυλικής αλκοόλης
- Φυγοκέντριση 12000 rpm για 10 λεπτά
- Λήψη υπερκείμενου
- Προστέθηκαν 1000µl EtoH 100%
- Προστέθηκαν 15µl οξικού νατρίου
- Τοποθέτηση για 45 λεπτά στους -20C για την κατακρήμνιση του DNA
- Φυγοκέντριση 12000 rpm για 10 λεπτά
- Απόχυση Eppendorf και προσθήκη 200µL αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντριση σε ταχύτητα 12.000 στροφές για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα πελέτας με 200µL αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντριση σε ταχύτητα 12.000 στροφές για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση αιθανόλης με τοποθέτηση στον κλίβανο επώασεως με ανοιχτό πώμα για περίπου 20 λεπτά στους 55°C. Για τη σωστή λειτουργία της PCR πρέπει τα υπολείμματα αιθανόλης να εξατμιστούν πλήρως.
- Προσθήκη 30µL διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) στα φιαλίδια με το απομονωμένο DNA



Εικόνα 3: Φωτογραφία από την φυγόκεντρο

Η αποτελεσματικότητα της εξαγωγής DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% w/v σε διάλυμα TBE, παρατήρηση σε υπεριώδες φως (UV) και φωτογράφιση του πηκτώματος που περιγράφεται στην ενότητα 2.3.

2.3 Ηλεκτροφόρηση

Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης του DNA απαιτούσε την προετοιμασία και χρήση των παρακάτω υλικών

- 1.1 Κωνική φιάλη
- 1.2 Ογκομετρικός κύλινδρος
- 1.3 Ζυγαριά ακριβείας
- 1.4 Σπάτουλα
- 1.5 Αγαρόζη 0,8% (υψηλής καθαρότητας)

1.6 Δείκτη Midori Green

1.7 Διάλυμα TBE buffer (1x)

1.8 Parafilm

1.9 Loading buffer (6x) με μπλε χρώμα (βρωμοφαινόλη, γλυκερόλη)

1.10 Πιπέτες

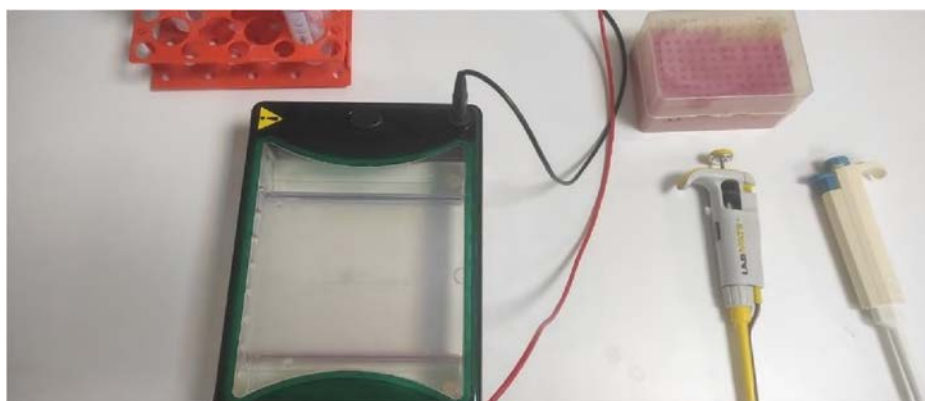
1.11 Συσκευή ηλεκτροφόρησης

A.a Το πρώτο βήμα ήταν η παρασκευή διαλύματος αгарόζης 0,8% σε TBE buffer σε θερμοανθεκτική φιάλη. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 0,8g σε 100 ml TBE buffer.

A.b Το διάλυμα αναδεύθηκε και στη συνέχεια έβρασε σε συσκευή θέρμανσης (KENWOOD microwave) μέχρι να γίνει απολύτως διαυγές για περίπου 3 λεπτά. Όταν έγινε διαυγές, μειώθηκε η θερμοκρασία του προσεκτικά κάτω από τρεχούμενο νερό.

A.c Έπειτα προστέθηκαν 5 ml Δείκτη Midori Green ώστε να είναι εφικτή η παρακολούθηση DNA μέσω φθορισμού ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες γενετικού υλικού στην πηκτή της αгарόζης.

A.d Το διάλυμα στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη βάση-εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, μαζί με τα ειδικά διαχωριστικά (χτένα), ώστε να δημιουργηθούν κενά (πηγάδια) στο τζελ.



Εικόνα 4: Συσκευή ηλεκτροφόρησης, πιπέτες και *εppendorf*

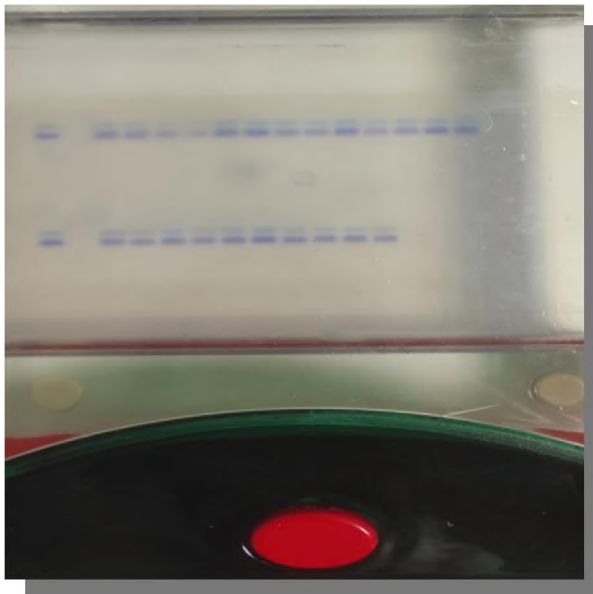
A.e Ακολούθησε το στάδιο τοποθέτησης του loading buffer σε ένα κομμάτι parafilm. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 5 μl από το DNA δείγματος, εκτός από το 24^ο δείγμα, όπου προστέθηκε 1 μl kb ladder.



Εικόνα 5: Προετοιμασία & τοποθέτηση δειγμάτων στο parafilm

Α.φ Αφού όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα κενά του τζελ αгарόζης, συνδέθηκαν τα καλώδια στους αντίστοιχους πόλους της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Α.γ Όταν άρχισε η τροφοδοσία ηλεκτρικού φορτίου, παρατηρήθηκε η δημιουργία φυσαλίδων στα ηλεκτρόδια, επιβεβαιώνοντας τη σωστή σύνδεση. Στο πρώτο πηγάδι φορτώθηκε ποσότητα 1 μL μάρτυρα (DNA Ladder) μοριακού βάρους 1Kb και 2 μL διαλύματος φόρτωσης.



Εικόνα 6: Φόρτωση δειγμάτων στα πηγάδια με σταδιακό διαχωρισμό των δειγμάτων

A.h Το διάλυμα φόρτωσης χρωματίζει τα δείγματα και διευκολύνει την φόρτωση στα πηγάδια του πηκτώματος. Περιέχει επίσης γλυκερόλη, η οποία αυξάνει την πυκνότητα του μοριακού υλικού, το οποίο κατακάθεται στον πυθμένα του πηγαδιού της ηλεκτροφόρησης. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διήρκεσε 15 λεπτά, και στη συνέχεια το τζελ συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε συσκευή UV για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν μέσω υπολογιστή.



Εικόνα 7: Συσκευή UV για ανάγνωση τζελ (δεξιά) & H/Y για αποτελέσματα (αριστερά)

2.4 PCR

Προηγουμένως της διαδικασίας PCR εφαρμόστηκε τζελ αγαρόζης πιο πυκνό λόγω θραυσμάτων με την ίδια διαδικασία της ενότητας 2,3 ωστόσο το τζελ παρασκευάστηκε με 1,2g αγαρόζης στα 100ml. Η διαδικασία της PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση ενός τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου COI. Το πρωτόκολλο PCR περιλάμβανε 30 κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, με τις ακόλουθες συνθήκες:

- 1 95 °C για 15 λεπτά (αρχική αποδιάταξη)
- 2 95 °C για 1 λεπτό (αποδιάταξη)
- 3 50 °C για 45 δευτερόλεπτα (υβριδοποίηση εκκινήτη)
- 4 72 °C για 1 λεπτό (επιμήκυνση)
- 5 Επανάληψη των σταδίων 2, 3 και 4 για 30 κύκλους
- 6 72 °C για 10 λεπτά (τελική επιμήκυνση)
- 7 10 °C έως την αφαίρεση δειγμάτων από την PCR



Εικόνα 8: Συσκευή της PCR με τοποθετημένα δείγματα

Η τεχνική διαβαθμισμένης θερμοκρασίας PCR εφαρμόστηκε στα δείγματα σε θερμοκρασίες που κυμαίνονταν από 50 °C -60 °C βαθμούς προκειμένου να βρεθεί η ιδανική θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών. Πιο συγκεκριμένα οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :50 °C, 52,6 °C, 55,7 °C, 58,2 °C, 60 °C. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία του master mix της PCR για τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν σε Eppendorf απεικονίζονται ως εξής:¹

Πίνακας 4: Συστατικά PCR mastermix

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR	Όγκος ανά δείγμα (μL)
DNA	1 μl	1
Taq buffer	6 μl	150
Forward primer	1 μl	25
Reverse primer	1 μl	25
PCR water	11 μl	275

¹ Οι ποσότητες είναι πολλαπλασιασμένες με τον αριθμό των συνολικών δειγμάτων 23 μαζί με ένα τυφλό (negative control)

Σε 22 αριθμημένα Eppendorf PCR tubes περιεκτικότητας 500μl προστέθηκε 1 μl DNA από το δείγμα και 19μl από το mastermix. Στο 23^ο Eppendorf προστέθηκαν 19μl από το mastermix χωρίς DNA, για τυφλό δείγμα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών ήταν οι σύμφωνα με τον (Folmer et al. 1994). :

LCO1490: 5'-ggtcaacaaatcataaagatattgg-3'(FORWARD)

HC02198: 5'-taaacttcagggtgaccaaaaaaatca-3'(REVERSE)

Η αποτελεσματικότητα της PCR μέσω ηλεκτροφόρησης των 23 δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2g 100 TBE. Η διαδικασία έγινε όπως και στην ενότητα 2.3 της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα πηγάδια του πηκτώματος και χρησιμοποιήθηκε και 1μl δείκτης όπου στο τέλος το πήκτωμα παρατηρήθηκε σε υπεριώδες φως και φωτογραφήθηκε.

2.4.2 REPCR

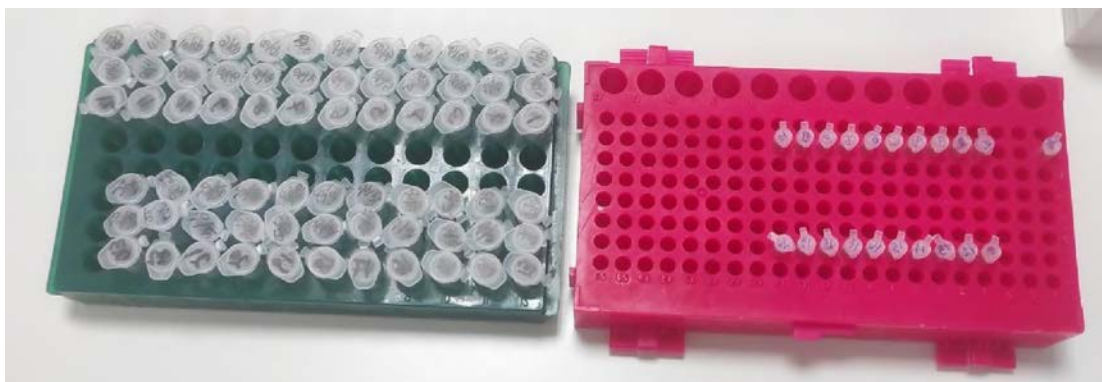
Από την διαδικασία της PCR με τα αποτελέσματα 12 δείγματα δεν είχαν καλή απεικόνιση, ουσιαστικά υπήρχε ελάχιστο ίχνος DNA για αυτό επαναλήφθηκε η διαδικασία με REPCR των 11 υπολοίπων δειγμάτων στους 55,7°C. Η REPCR (RE-amplification PCR) εφαρμόζεται επιτρέποντας την ενίσχυση του DNA από τα υπάρχοντα προϊόντα PCR ώστε να επιτευχθεί καλύτερη ανίχνευση και σαφέστερα αποτελέσματα.

2.4.3 Εξωτερικό εργαστήριο αλληλούχισης

Για την περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων τα 15/23 δείγματα αποστάλθηκαν σε εξωτερικό εξειδικευμένο εργαστήριο (ABI3730) για αλληλούχιση. Μετά την αλληλούχιση και την επιβεβαίωση του είδους (*O. vulgaris*) των 15 δειγμάτων ακολούθησαν οι παρακάτω αναλύσεις.

Πίνακας 5: Συστατικά REPCR mastermix

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR	Όγκος ανά δείγμα (μL)
DNA	1μl	1
Taq buffer	6 μl	48
Forward primer	1μl	13
Reverse primer	1μl	13
PCR water	11 μl	143



Εικόνα 9: Δείγματα για εφαρμογή REPCR

2.5 Στατιστική ανάλυση

Η παγκόσμια βάση δεδομένων της GenBank (NCBI) χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση και των αλληλουχιών *O. vulgaris* χρησιμοποιώντας ως φιλτράρισμα το γονίδιο COI.

Επιλέχθηκαν αλληλουχίες για σύγκριση των πληθυσμών *O. vulgaris* από την Ιταλία, την Ισπανία, την Τουρκία και από την Ελλάδα (Σάμος και Ικαρία). Η ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα AliView, FaBox και Arlequin.

Πίνακας 6: Αλληλουχίες μέσω NCBI για σύγκριση πληθυσμών

GREECE :	13
ΣΑΜΟΣ	10
ΙΚΑΡΙΑ	3
ITALY	17
TURKEY	20
SPAIN	27

Το AliView (v.1.28) αποτελεί ένα πρόγραμμα για την προβολή και επεξεργασία ευθυγράμμισης των αλληλουχιών απεριόριστου μεγέθους σε μορφή πχ FASTA. Για αυτό και χρησιμοποιήθηκε για την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών και την αφαίρεση περιοχών νουκλεοτιδίων που εμφάνιζαν ασυμβατότητα στην αρχή και στο τέλος τους, ώστε να υπάρχει συνοχή της στοίχισης, η οποία είναι κρίσιμη για τις ύστερες γενετικές αναλύσεις.

Το πρόγραμμα FaBox αποτελεί μια διαδικτυακή εργαλειοθήκη για την διαχείριση αλληλουχιών του DNA. Με αυτό έγινε μορφοποίηση των αλληλουχιών σε απλότυπους, δηλαδή γενετικούς τύπους που εμφανίζονται στους πληθυσμούς, και δημιουργήθηκαν τα αρχεία εισόδου για το πρόγραμμα Arlequin.

Το Arlequin (v.3.5.2.2) είναι ένα λογισμικό ανάλυσης δεδομένων πληθυσμιακής γενετικής, που παρέχει μεθόδους για την ανάλυση της γενετικής διαφοροποίησης και των χαρακτηριστικών ενός πληθυσμού. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της AMOVA (Ανάλυση Μοριακής διακύμανσης) που εξετάζει της διακύμανση της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών μέσω του δείκτη F_{ST} , ο οποίος κυμαίνεται από 0 (καμία διαφοροποίηση) έως 1 (πλήρης διαφοροποίηση). Στην έρευνα έγινε επίσης έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας του p-value για το εάν η γενετική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς είναι στατιστικά σημαντική ή όχι (Reynolds et al. 1983).

Το Tajima's D είναι μια στατιστική πληθυσμιακής γενετικής δοκιμής όπου υπολογίζει το μέτρο του συνολικού αριθμού διαχωρισμού στο DNA των δειγμάτων καθώς και τον μέσο αριθμό των μεταλλάξεων .

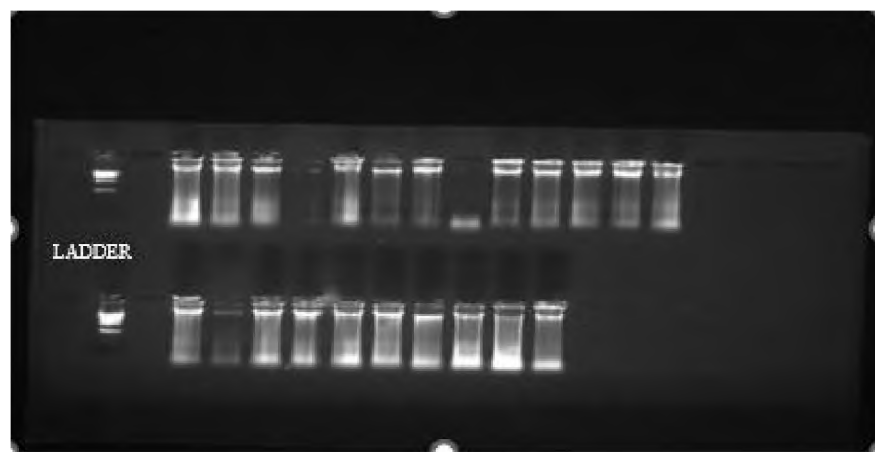
- Όταν Tajima's D=0 , Παρατηρούμενη παραλλαγή παρόμοια με την αναμενόμενη διακύμανση, Ο πληθυσμός εξελίσσεται ουδέτερα. Δεν υπάρχουν στοιχεία επιλογής.
- Όταν Tajima's D < 0 , Σπάνια αλληλόμορφα άφθονα (περίσσεια των σπάνιων αλληλόμορφων) , Πρόσφατη επιλεκτική σάρωση, αύξηση πληθυσμού μετά από πρόσφατη μείωση σύνδεση με ένα σαρωμένο γονίδιο
- Όταν Tajima's D > 0 , Σπάνια αλληλόμορφα (έλλειψη σπάνιων αλληλόμορφων) , ο πληθυσμός μειώνεται ξαφνικά λόγω στενοπού (bottleneck).

Χρησιμοποιήθηκε επίσης το πρόγραμμα Microsoft excel για την διαμόρφωση γραφημάτων πίτας συχνοτήτων και κατανομής απλότυπων σε κάθε περιοχή της Μεσογείου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα DNA extraction

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της απομόνωσης γενετικού υλικού, μέσω της τεχνικής διαβαθμισμένης θερμοκρασίας PCR που εφαρμόστηκε στα δείγματα βρέθηκε η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού του εκκινητή COI 55,7 °C η οποία χρησιμοποιήθηκε και για την διαδικασία της PCR ενώ η αραίωση των δειγμάτων που επιλέχθηκε ήταν 1:20. Στην εικόνα 10 απεικονίστηκαν τα 23 δείγματα από την εξαγωγή του DNA τα οποία πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία μέσω της ηλεκτροφόρησης και ο μάρτυρας ladder 1kb που χρησιμοποιήθηκε εις διπλούν. Στην επάνω σειρά της εικόνας(Εικόνα 10) απεικονίζονται τα πρώτα 13 δείγματα μαζί με τον δείκτη μοριακού βάρους (ladder), ενώ στην κάτω σειρά απεικονίζονται τα υπόλοιπα 10 δείγματα συνοδευόμενα επίσης από το ladder.

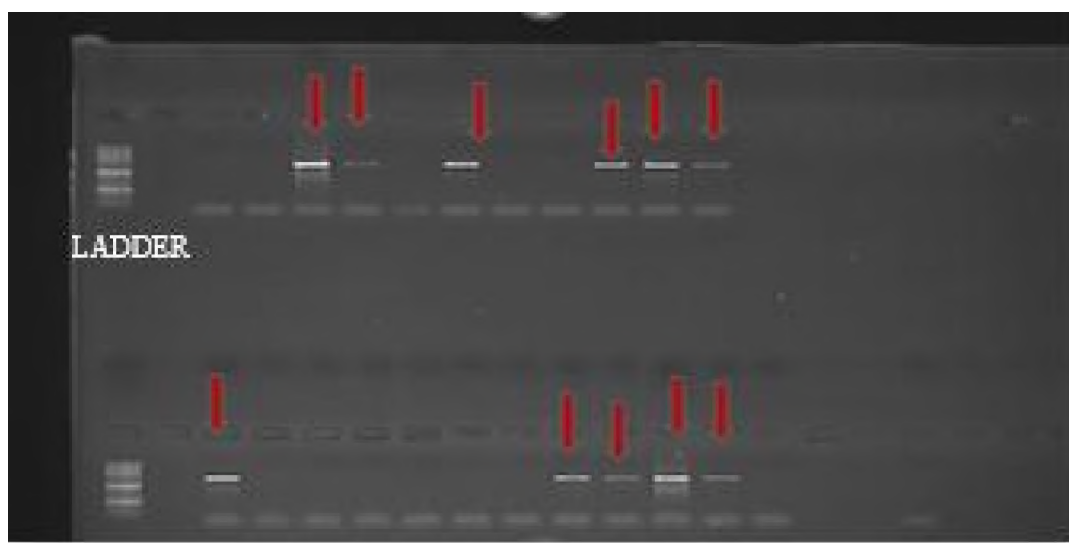


Εικόνα 10: Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης 23 δειγμάτων σε H/Y

3.2 Αποτελέσματα PCR & REPCR

Αφού ολοκληρώθηκαν η προηγούμενες διαδικασίες ξεκίνησε η διαδικασία της PCR όπου και προέκυψε η παρακάτω εικόνα (Εικόνα 11). Είναι εμφανή ότι και τα 23 δείγματα, το τυφλό δείγμα και ο μάρτυρας, ωστόσο τα 11 δείγματα(που απεικονίζονται με βέλος) έχουν πιο καλή απεικόνιση, ενώ τα υπόλοιπα 12 δεν εμφανίζουν καλή απεικόνιση με ελάχιστο ίχνος DNA. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα ακολουθεί επανάληψη της PCR με REPCR, όπως

περιγράφεται στην ενότητα 2.4.2.

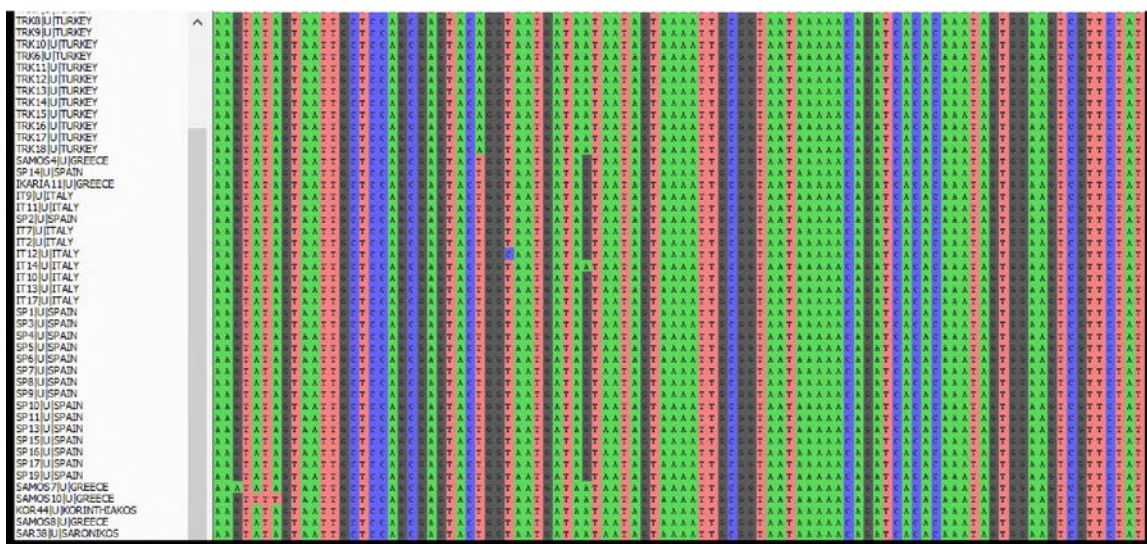


Εικόνα 11: Αποτελέσματα της διαδικασίας PCR (βέλη= επιτυχές δείγματα)

Με βάση τα αποτελέσματα της αρχικής PCR όπου τα 12 δείγματα ιστού *O. vulgaris* έδειξαν αμυδρές ζώνες με ελάχιστο ίχνος DNA, εφαρμόστηκε για πιο αξιόπιστα (Εικόνα 12) αποτελέσματα REPCR, όπου στα δείγματα 13 και 23 που παρουσιάζονται με βέλος στην εικόνα είχαν διπλή μπάντα.



Εικόνα 12: Αποτελέσματα της διαδικασίας REPCR (βέλη=διπλή μπάντα)



Εικόνα 13:Επεξεργασία αλληλουχιών στο πρόγραμμα AliView

3.3 Αποτελέσματα απλότυπων & μονοειδικές αλληλουχίες

Στον παρακάτω πίνακα 7 φαίνεται ο αριθμός των διαφορετικών απλοτύπων από όλα τα δείγματα που βρέθηκαν είναι 25, κάτι που απεικονίζεται στην πρώτη αριστερή στήλη του πίνακα .Στην αμέσως επόμενη στήλη απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης του κάθε απλότυπου. Η ελάχιστη συχνότητα είναι μία φορά ενώ η μέγιστη 24 για τον απλότυπο 21. Στην επόμενη στήλη εμφανίζεται το μήκος του κάθε απλότυπου το οποίο είναι ίδιο για όλους και ανέρχεται σε 444bp. Στην δεξιά στήλη παρατηρείται σε ποιες συγκεκριμένες αλληλουχίες ανήκει ο κάθε απλότυπος, και πιο συγκεκριμένα απεικονίζονται οι αλληλουχίες μαζί με την τοποθεσία τους. Πιο ειδικά ο απλότυπος 7 περιλαμβάνει 9 αλληλουχίες, όλες με προέλευση την Τουρκία, ενώ ο απλότυπος 15 περιλαμβάνει 18 αλληλουχίες από την Ισπανία και την Ιταλία.

Πίνακας 7:Αποτελέσματα επεξεργασίας του προγράμματος AliView

Απλότυπος	Συχνότητα εμφάνισης	Μήκος απλότυπου (bp)	Αλληλουχίες που ανήκουν σε απλότυπο
1	1	444	TRK20 U TURKEY
2	1	444	KOR47 U KORINTHIAKOS
3	1	444	SP12 U SPAIN
4	4	444	TRK1 U TURKEY, TRK2 U TURKEY, TRK3 U TURKEY, TRK4 U TURKEY
5	1	444	SAR34 U SARONIKOS
6	5	444	TRK5 U TURKEY, TRK7 U TURKEY, TRK8 U TURKEY, TRK9 U TURKEY, TRK10 U TURKEY

7	9	444	TRK6 U TURKEY, TRK11 U TURKEY, TRK12 U TURKEY, TRK13 U TURKEY, TRK14 U TURKEY, TRK15 U TURKEY, TRK16 U TURKEY, TRK17 U TURKEY, TRK18 U TURKEY
8	1	444	SAMOS4 U GREECE
9	1	444	SP14 U SPAIN
10	2	444	IKARIA11 U GREECE, IT2 U ITALY
11	2	444	IT9 U ITALY, IT11 U ITALY
12	2	444	SP2 U SPAIN, IT7 U ITALY
13	1	444	IT12 U ITALY
14	1	444	IT14 U ITALY
15	18	444	IT10 U ITALY, IT13 U ITALY, IT17 U ITALY, SP1 U SPAIN, SP3 U SPAIN, SP4 U SPAIN, SP5 U SPAIN, SP6 U SPAIN, SP7 U SPAIN, SP8 U SPAIN, SP9 U SPAIN, SP10 U SPAIN, SP11 U SPAIN, SP13 U SPAIN, SP15 U SPAIN, SP16 U SPAIN, SP17 U SPAIN, SP19 U SPAIN
16	1	444	SAMOS7 U GREECE
17	1	444	SAMOS10 U GREECE
18	1	444	KOR44 U KORINTHIAKOS
19	1	444	SAMOS8 U GREECE
20	1	444	SAR38 U SARONIKOS
21	24	444	IT6 U ITALY, KOR46 U KORINTHIAKOS, IT15 U ITALY, TRK19 U TURKEY, IT8 U ITALY, KOR33 U KORINTHIAKOS, KOR26 U KORINTHIAKOS, KOR45 U KORINTHIAKOS, KOR48 U KORINTHIAKOS, KOR31 U KORINTHIAKOS, SAR35 U SARONIKOS, SAR36 U SARONIKOS, SAR37 U SARONIKOS, KOR28 U KORINTHIAKOS, IT16 U ITALY, SP18 U SPAIN, SAMOS1 U GREECE, SAMOS2 U GREECE, SAMOS3 U GREECE, SAMOS5 U GREECE, SAMOS6 U GREECE, SAMOS9 U GREECE, IKARIA12 U GREECE, IKARIA13 U GREECE
22	1	444	IT1 U ITALY
23	1	444	IT3 U ITALY
24	1	444	IT4 U ITALY
25	1	444	IT5 U ITALY

3.4 Αποτελέσματα Tajima's D, Fst, AMOVA

Στον παρακάτω πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για κάθε περιοχή ξεχωριστά. Στην σειρά του sample size φαίνεται πόσα δείγματα

βρέθηκαν και συγκρίθηκαν σε κάθε περιοχή, με την Τουρκία να έχει τα περισσότερα (20) και τον Σαρωνικό να έχει τα λιγότερα (5). Σαν αποτέλεσμα οι αρνητικές τιμές του Tajima's D μεταφράζονται ως αύξηση του πληθυσμού, οι θετικές τιμές ως μείωση ή ξαφνική συρρίκνωση του και οι τιμές ίσες με το μηδέν ως ισορροπία. Στην δική μας περίπτωση παρατηρείται σε όλες τις περιοχές αρνητικό πρόσημο ενώ η Ισπανία με την Σάμο με την Ικαρία (Ελλάδα στήλη 2) με σημαντικό p-value και η Ιταλία, Κορινθιακός, Σαρωνικός και η Τουρκία με στατιστικά μη σημαντικό p-value .

Πίνακας 8: Αποτελέσματα Tajima's D test

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ	ΕΛΛΑΔΑ	ΙΤΑΛΙΑ	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ	ΙΣΠΑΝΙΑ	ΤΟΥΡΚΙΑ	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	A
Tajima's D test								
Sample size	13	17	9	5	19	20	13,8333	
S	10	10	2	4	9	25	10,0000	
Pi	1,7949	2,5147	0,44444	1,6000	0,94737	4,8790	2,0301	
Tajima's D	-1,7698	0,54869	-1,3624	-1,0938	-2,2052	-1,1906	-1,3618	
Tajima's D p-value	0,0303	0,3199	0,0909	0,0801	0,0023	0,1125	0,106	

Στον πίνακα 9 πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA) και παρατηρείται ότι μεταξύ πληθυσμών το ποσοστό διακύμανσης είναι 43,8% ενώ εντός των πληθυσμών είναι 51,55%. Από την άλλη το ποσοστό διακύμανσης μεταξύ πληθυσμών είναι μόλις 4,98% με στατιστικά σημαντικό p-value.

Πίνακας 9: Ανάλυση μοριακής διακύμανσης (AMOVA)

	Βαθμός ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνων	Συνιστώσες διακύμανσης	Ποσοστό διακύμανσης	P -values
Μεταξύ πληθυσμών	2	59,481	0.99387 Va	43,48%	0.01436+- 0.00115 Va and FCT
Μεταξύ πληθυσμών εντός ομάδων	3	7,489	0.11373 Vb	4,98%	0.00069+- 0.00025Vb and FSC
Εντός πληθυσμών	77	90,741	1.17845 Vc	51,55%	0.00000+- 0.00000Vc and FST
Σύνολο	82	157,11	2,28606	100%	0,01645

Στον πίνακα 10 παρουσιάζεται το p-value που υποδεικνύει την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς και επισημαίνεται με έντονη γραφή η τιμή των πληθυσμών που εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική γενετική διαφοροποίηση, μεταξύ των πληθυσμών Ιταλίας και Ελλάδας(Σάμου και Ικαρίας) με τιμή p-value 0.02663+-0.0017 και Ιταλίας με Κορινθιακό με τιμή p-value 0.01198+-0.0010 και Ιταλία με Σαρωνικό με τιμή p-value 0.04089+-0.0019 και Ισπανία με Ιταλία με τιμή p-value 0.00059+-0.0002 , μικρότερη από 0,05. Οι υπόλοιπες τιμές p-value είναι μεγαλύτερες από 0,05 και επομένως στατιστικά μη σημαντικές στο 0,05.

Πίνακας 10: Fst p Values

	ΕΛΛΑΔΑ	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ	ΙΤΑΛΙΑ	ΙΣΠΑΝΙΑ	ΤΟΥΡΚΙΑ
ΕΛΛΑΔΑ						
ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ	0.45471+- 0.0052					
ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ	0.39333+- 0.0052	0.25027+- 0.0042				
ΙΤΑΛΙΑ	0.02663+- 0.0017	0.01198+- 0.0010	0.04089+- 0.0019			
ΙΣΠΑΝΙΑ	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00059+- 0.0002		
ΤΟΥΡΚΙΑ	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	0.00178+- 0.0004	0.00000+- 0.0000	0.00000+- 0.0000	

Στον πίνακα 11 παρουσιάζονται οι τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των πληθυσμών του *O.vulgaris*. Σύμφωνα με το πρόγραμμα Arlequin πραγματοποιήθηκε ανάλυση όπου οι μικρότερες τιμές για τον F_{ST} συντελεστή παρατηρήθηκαν μεταξύ Ελλάδας και Κορινθιακού(0,00112) και Κορινθιακού και Σαρωνικού(0,06285), ενώ οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν μεταξύ Ελλάδας και Ισπανίας (0.60613), Κορινθιακού και Ισπανίας (0.77102), Σαρωνικού και Ισπανίας(0.71950), και Τουρκίας και Ισπανίας(0.55920).

Πίνακας 11: Τιμές του δείκτη της γενετικής παραλλακτικότητας (F_{ST})

	ΕΛΛΑΔΑ	ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ	ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ	ΙΤΑΛΙΑ	ΙΣΠΑΝΙΑ	ΤΟΥΡΚΙΑ
ΕΛΛΑΔΑ	0.00000					
ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΟΣ	0.00112	0.00000				
ΣΑΡΩΝΙΚΟΣ	0,00733	0,06285	0.00000			
ΙΤΑΛΙΑ	0,12758	0,25588	0,20898	0.00000		
ΙΣΠΑΝΙΑ	0,60613	0,77102	0,7195	0,25623	0.00000	
ΤΟΥΡΚΙΑ	0,37805	0,38903	0,33226	0,3885	0,5592	0.00000

3.5 Κατανομή απλοτύπων σε χάρτη

Οι περιοχές της μελέτης ήταν η Ελλάδα, η Τουρκία, η Ισπανία και η Ιταλία. Από τις προηγούμενες αναλύσεις προκύπτει ότι υπήρχαν συνολικά 25 διαφορετικοί απλότυποι με διαφορετική συχνότητα εμφάνισης ο καθένας. Η Ιταλία εμφανίζει την μεγαλύτερη ποικιλία απλότυπων 11 συνολικά ακολουθούμενη από την Ελλάδα με 6 και την Τουρκία και Ισπανία με 5 απλότυπους ενώ ο Σαρωνικός και ο Κορινθιακός με 3. Με βάση λοιπόν τα προηγούμενα αποτελέσματα προκύπτει η εικόνα (Εικόνα 14) στην οποία παρουσιάζονται οι αλληλουχίες σε μορφή πιτών ανά κάθε περιοχή.



Εικόνα 14: Κατανομή των συχνοτήτων των απλοτύπων στις περιοχές μελέτης

Τα seq(sequences) αναφέρονται στην πρώτη στήλη στον πίνακα 5 με την μορφή «Απλότυπος» στην ενότητα 3.3 των Αποτελεσμάτων.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη για τη ανάλυση της πληθυσμιακής δομής του *O. vulgaris* βασική ήταν η σύγκριση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό και τον Κορινθιακό κόλπο με αυτά που ανακτήθηκαν μέσω της βάσης NCBI, όπου έγινε σύγκριση των 100 δειγμάτων με την υπομονάδα I του κυτοχρώματος της c οξειδάσης (COI)', ενώ έπειτα από την αλληλούχιση, αναλύθηκαν τα 91. Όλα τα δείγματα καταχωρήθηκαν σε ένα αρχείο σημειωματάριου, χρησιμοποιώντας ονομασίες με κωδικούς ανάλογα με την περιοχή προέλευσης. Σημαντικό να τονιστεί ότι η εμφάνιση διπλής μπάντας στα δείγματα 13 και 23 μπορεί να οφείλεται σε μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών (primers) σε διαφορετικές θέσεις του DNA, με αποτέλεσμα την ενίσχυση δύο διαφορετικών περιοχών .

Έπειτα τα δεδομένα επεξεργάστηκαν μέσω του προγράμματος AliView & Fabox, τα οποία αποτελέσματα ανέδειξαν 25 αλληλουχίες με συχνότητα εμφάνισης και μήκος βάσεων (444) που παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Παρατηρήθηκε ότι ο απλότυπος 21 εμφανίστηκε 24 φορές με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης του κυρίως σε περιοχές της Ελλάδας συμπεριλαμβάνοντας τον Σαρωνικό και τον Κορινθιακό και στις υπόλοιπες περιοχές γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι ευρέως κατανεμημένο στους Μεσογειακούς πληθυσμούς. Αντιθέτως απλότυποι όπως ο απλότυπος 1 ή ο απλότυπος 2, απλότυπος 3, απλότυπος 5, απλότυπος 8, απλότυπος 9, απλότυπος 13, απλότυπος 14 απλότυπος 16, απλότυπος 17, απλότυπος 18, απλότυπος 19, απλότυπος 20, απλότυπος 21, απλότυπος 22, απλότυπος 23, απλότυπος 24, και απλότυπος 25 έχουν μία ακολουθία ο καθένας υποδεικνύοντας ότι είναι μοναδικοί απλότυποι που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένες περιοχές.

Πιο συγκεκριμένα στην Ελλάδα, 13 δείγματα συνδέονται με 6 διακριτούς απλότυπους, υποδηλώνοντας ένα μέτριο επίπεδο γενετικής ποικιλότητας σε αυτόν τον πληθυσμό. Ο απλότυπος 21 είναι ο πιο κοινός, εμφανίζεται σε 8 άτομα, ενώ άλλοι απλότυποι όπως αντιπροσωπεύονται από μεμονωμένα άτομα.

Η Ιταλία εμφανίζει το υψηλότερο επίπεδο γενετικής ποικιλότητας, με 17 δείγματα να συμβάλλουν σε 11 διαφορετικούς απλότυπους. Ο απλότυπος 21 είναι και πάλι ο πιο συχνός, ακολουθούμενο από άλλους απλότυπους όπως απλότυπος 10, απλότυπος 11, απλότυπος 12, απλότυπος 13, απλότυπος 14 και απλότυπος 15, οι οποίοι κατανέμονται σε λιγότερα δείγματα. Η παρουσία 11 απλοτύπων σε 17 δείγματα δείχνει σημαντική γενετική διαφοροποίηση εντός της Ιταλίας. Η αφθονία της ποικιλομορφίας των απλοτύπων στην Ιταλία αποδίδεται στη γεωγραφική θέση της Μεσογείου, την παρουσία ενδημικών ειδών και προσφάτων ταξινομικών αναθεωρήσεων της οικογένειας των χταποδιών. Επιπλέον, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως οι συγκεντρώσεις Χλωροφύλλης α και οι θερμότερες θερμοκρασίες, ενισχύουν τη ποικιλομορφία.

Σημαντικό να αναφερθεί για τον Κορινθιακό ότι από τα 10 δείγματα που έγινε αλληλούχιση το 1 διαγράφηκε λόγω ασαφών αποτελεσμάτων. Ο πληθυσμός από τον Κορινθιακό αντιπροσωπεύεται από 9 δείγματα κατανεμημένα σε 3 απλότυπους. Ο απλότυπος 21 κυριαρχεί και εδώ, συνεισφέροντας 7 δείγματα, ενώ ο απλότυπος 2 και απλότυπος 18 αντιπροσωπεύονται από ένα δείγμα το καθένα. Αυτή η σχετικά χαμηλή ποικιλομορφία απλοτύπων υποδηλώνει υψηλότερο βαθμό γενετικής ομοιογένειας στον Κορινθιακό, πιθανώς λόγω γεωγραφικής απομόνωσης ή περιορισμένης γονιδιακής ροής από άλλους πληθυσμούς.

Ο πληθυσμός του Σαρωνικού, που αντιπροσωπεύεται από 5 άτομα, εμφανίζει 3 απλότυπους. Όπως και ο Κορινθιακός, ο απλότυπος 21 είναι παρών σε 3 δείγματα υπογραμμίζοντας περαιτέρω την ευρεία κατανομή αυτού του απλότυπου στους μεσογειακούς πληθυσμούς. Ο απλότυπος 5 και απλότυπος 20 είναι επίσης παρόντες, ο καθένας αντιπροσωπεύεται από ένα δείγματα, υποδηλώνοντας περιορισμένη γενετική ποικιλότητα σε αυτήν την περιοχή.

Η Ισπανία έχει 19 δείγματα που συμβάλλουν σε 5 διακριτούς απλότυπους. Το πιο αξιοσημείωτο εύρημα είναι η παρουσία αρκετών φορών του απλότυπου 15, ο οποίος εντοπίζεται σε 15 δείγματα, καταδεικνύοντας υψηλό επίπεδο γενετικής ομοιογένειας στον Ισπανικό πληθυσμό. Αυτό υποδηλώνει ότι αυτός ο απλότυπος μπορεί να προήλθε και να επεκτάθηκε εντός αυτής της περιοχής. Άλλοι απλότυποι που υπάρχουν στην Ισπανία περιλαμβάνουν τον απλότυπο 3, απλότυπο 9, απλότυπο 12 και απλότυπο 21, με τον τελευταίο να μοιράζεται με πολλούς άλλους πληθυσμούς, υποδεικνύοντας πιθανές γενετικές ανταλλαγές ή κοινή καταγωγή.

Στην Τουρκία, 20 δείγματα συνδέονται με 5 απλότυπους, υποδηλώνοντας μέτρια γενετική ποικιλότητα. Η μεγαλύτερη ομάδα απλοτύπων εδώ είναι ο απλότυπος 7, ο οποίος αποτελείται από 9 άτομα, υποδεικνύοντας έναν βαθμό ομαδοποίησης στην Τουρκία. Άλλοι απλότυποι που υπάρχουν περιλαμβάνουν τον απλότυπο 1, απλότυπο 4, απλότυπο 6 και απλότυπο 21, ο τελευταίος είναι παρών σε πολλές περιοχές που προαναφέρθηκαν, συμπεριλαμβανομένης της Τουρκίας, υποστηρίζοντας περαιτέρω την κοινή γενετική κληρονομιά των γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών του είδους στη Μεσόγειο.

Η ευρεία εμφάνιση του απλότυπου 21 στην Ελλάδα, την Ιταλία, την Τουρκία, την Ισπανία, τον Κορινθιακό και τον Σαρωνικό υποδηλώνει κοινή καταγωγή ή ροή γονιδίων μεταξύ αυτών των περιοχών. Η υψηλή συχνότητα αυτού του απλότυπου δείχνει πιθανές διαδρομές μετανάστευσης, ή μια κοινή γενετική προέλευση μεταξύ αυτών των πληθυσμών. Η παρουσία του σε πολλές χώρες υπογραμμίζει τη διασύνδεση των πληθυσμών της Μεσογείου. Τα δεδομένα δείχνουν επίσης διαφορετικά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των περιοχών. Για παράδειγμα, ο πληθυσμός της Ιταλίας παρουσιάζει υψηλό βαθμό ποικιλομορφίας απλοτύπων, με 11 διαφορετικούς απλότυπους κατανεμημένους σε 17 δείγματα. Από την άλλη πλευρά, πληθυσμοί όπως ο Κορινθιακός και ο Σαρωνικός εμφανίζουν χαμηλότερη γενετική ποικιλότητα, με τα περισσότερα άτομα να μοιράζονται τον ίδιο απλότυπο, κάτι που θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα μειωμένης γονιδιακής ροής.

Όσον αφορά τη ανάλυση των δειγμάτων χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση την θέση τους στην Μεσόγειο. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει δείγματα από την Ελλάδα (Σάμος, Ικαρία, Κορινθιακός, Σαρωνικός και την Τουρκία(Ανατολική Μεσόγειος). Η δεύτερη περιλαμβάνει την Ιταλία (Κεντρική Μεσόγειος) και η τρίτη την Ισπανία(Δυτική Μεσόγειος).

Με το πρόγραμμα Arlequin όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.5 ,ορίστηκε επίπεδο σημαντικότητας με $p=0,05$ ή 5%, δηλαδή μια πιθανότητα στις 20 (Fisher) ως επίπεδο απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης. Οι πίνακες 10,11 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του Arlequin με το F_{ST} και p value .Ο δείκτης F_{ST} δείχνει τον βαθμό ομοιότητάς μεταξύ των αλληλόμορφων συχνοτήτων μεταξύ των πληθυσμών με τιμές από 0-1,όσο πιο κοντά βρίσκεται στο 1 η τιμή τόσο μεγαλύτερη διαφοροποίηση των αλληλόμορφων συχνοτήτων μεταξύ των πληθυσμών. Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 11 οι μικρότερες τιμές που πλησιάζουν στο 0 και δείχνουν χαμηλή γενετική διαφοροποίηση, παρατηρήθηκαν μεταξύ της Ελλάδας και του Κορινθιακού(0,00112),ενώ η Ισπανία παρουσιάζει τη μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση με τιμές κοντά στο 1,από άλλους πληθυσμούς, ιδιαίτερα με τον Κορινθιακό(0.77102)και τον Σαρωνικό (0.71950). Με βάση τις τιμές p -value στον πίνακα 10 μεταξύ των πληθυσμών υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών Ιταλίας και Ελλάδας(Σάμου και Ικαρίας) με τιμή p -value 0.02663 ± 0.0017 και Ιταλίας με Κορινθιακό με τιμή p -value 0.01198 ± 0.0010 και Ιταλίας με Σαρωνικό με τιμή p -value 0.04089 ± 0.0019 και Ισπανίας με Ιταλία με τιμή p -value 0.00059 ± 0.0002 . Οι υπόλοιπες τιμές p -value είναι μεγαλύτερες από 0,05 και επομένως στατιστικά μη σημαντικές.

Κατά την ανάλυση της μοριακής διακύμανσης AMOVA στον πίνακα 9 προκύπτει το ποσοστό 4,98% ενώ στην ενδοπληθυσμιακή διακύμανση το ποσοστό είναι σημαντικά μεγαλύτερο και ανέρχεται στο 51,55%. Η κατανομή της γενετικής ποικιλίας εντός και μεταξύ πληθυσμών εξαρτάται από το ρυθμό μετάλλαξης, τη γενετική παρέκκλιση, τη διασπορά ή τη ροή γονιδίων και την επιλογή. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το ποσοστό της μοριακής παραλλακτικότητας μεταξύ των πληθυσμών είναι πολύ μικρότερο από αυτό των δειγμάτων ενδοπληθυσμιακά και το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν αναμενόμενο, καθώς η πολύ μικρή διακύμανση μεταξύ των πληθυσμών (4,98%) συγκριτικά με την υψηλή ενδοπληθυσμιακή διακύμανση (51,55%) υποδηλώνει σημαντική γενετική ομοιογένεια μεταξύ των πληθυσμών. Αναμενόταν μεγαλύτερη διαχωριστική διακύμανση εφόσον οι πληθυσμοί είναι γεωγραφικά σε διαφορετικές περιοχές. Η υψηλή ενδοπληθυσμιακή διακύμανση πιθανότατα εξηγείται από φαινόμενα διασποράς (δηλαδή ροή γονιδίων), τα οποία οδηγούν σε μείωση της διαπληθυσμιακής γενετικής διακύμανσης και αύξηση της γενετικής ποικιλότητας εντός των

πληθυσμών. Αυτή η ροή γονιδίων εξομαλύνει τις συχνότητες των αλληλόμορφων και εξηγεί την ομοιογένεια που παρατηρείται μεταξύ των πληθυσμών. Οι τιμές p-value δείχνουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, με τις πιο σημαντικές τιμές να παρατηρούνται εντός των πληθυσμών ($p=0.00000$), ενώ και η διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.01436$).

Ύστερα ακολούθησε το Tajima's D test, στους έξι πληθυσμούς δείχνουν σταθερές τάσεις αρνητικών τιμών, που υποδηλώνουν έντονα την επιλεκτική σάρωση ή αύξηση πληθυσμού. Η Σάμος και Ικαρία (δηλαδή τους πληθυσμούς από Ελλάδα) με την Ισπανία εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ενώ η Ιταλία, ο Κορινθιακός, ο Σαρωνικός και η Τουρκία έχουν μη σημαντικά αποτελέσματα.

Η διανομή των απλότυπων στον χάρτη της Μεσογείου και η οπτικοποίησή τους πραγματοποιήθηκε μέσα από το πρόγραμμα excel. Προκύπτει η εικόνα 14 όπου στην εικόνα αυτή παρατηρείται η διανομή των δειγμάτων *O. vulgaris* στην Μεσόγειο θάλασσα. Σε κάθε χώρα εμφάνισης εμφανίζονται οι αλληλουχίες και η συχνότητα αυτών. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι αλληλουχίες που βρέθηκαν ήταν 25, με την αλληλουχία 21 να έχει την μεγαλύτερη συχνότητα. Αυτό που φαίνεται είναι ότι η Ιταλία έχει την μεγαλύτερη ποικιλία απλότυπων 11 σε αριθμό ακολουθούμενη από την Ελλάδα με 6 και την Τουρκία και Ισπανία με 5 απλότυπους ενώ ο Σαρωνικός και ο Κορινθιακός με 3 αντιστοίχως.

Η ανάλυση γενετικών δεδομένων για το μεσογειακό κοινό χταπόδι αποκαλύπτει σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, με τη γεωγραφική θέση και τις περιβαλλοντικές συνθήκες να είναι σημαντικοί παράγοντες. Ο απλότυπος 21 κυριαρχεί στους Ελληνικούς, Ιταλικούς, Τουρκικούς και Ισπανικούς πληθυσμούς, υποδηλώνοντας μια γενετική σύνδεση στην περιοχή της Μεσογείου, ενισχύοντας την υπόθεση ενός κοινού γενετικού προγόνου ή γονιδιακής ροής μέσω θαλάσσιων οδών. Οι χαμηλού επιπέδου διαφορές, όπως αυτές μεταξύ Κορίνθου και των υπολοίπων περιοχών των δειγμάτων στην Ελλάδα, υποδεικνύουν την γενετική ομοιογένεια του είδους. Ωστόσο, περιοχές όπως η Ισπανία εμφανίζουν υψηλότερη γενετική ποικιλότητα, η οποία μπορεί να οφείλεται σε γεωγραφικούς ή περιβαλλοντικούς φραγμούς, όπως το κανάλι της Σικελίας, σύμφωνα με μελέτες (Fadhlaoui-Zid et al., 2012; Ruggeri et al., 2012), το οποίο λειτουργεί ως γενετικό εμπόδιο μεταξύ Δυτικής και Ανατολικής Μεσογείου. Αυτές οι αλλαγές σχετίζονται άμεσα με περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα και πρωτογενή παραγωγικότητα των ωκεανών όπως και στη έρευνα του Mangold (1983) που έδειξε ότι η αφθονία αυτού του είδους είναι υψηλότερη στη Δυτική Μεσόγειο λόγω πιο ευνοϊκών

συνθηκών. Η ίδια ανάλυση βρέθηκε στη μελέτη των Belcari et al. (2002), ο οποίος διαπίστωσε ότι η θάλασσα του Λεβάντε έχει χαμηλότερες πυκνότητες πληθυσμών του είδους λόγω των ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών. Οι αρνητικές τιμές του Tajima D σε όλες τις περιοχές δείχνουν πρόσφατη πληθυσμιακή αύξηση ή επιλεκτική απομάκρυνση. Η τρέχουσα ανάλυση υπογραμμίζει την ανάγκη για περισσότερη έρευνα στην Ανατολική Μεσόγειο, όπως αναφέρεται στη μελέτη των Maltagliati et al. (2002) και Casu et al. (2002), που δείχνει έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης και των Keskin & Atar (2011) όπου τόνισαν τις διαφορές στα Τουρκικά ύδατα με την Δυτική μεσόγειο.

Οι ανθρωπογενείς πιέσεις, όπως η υπεραλίευση, η κλιματική αλλαγή και η ρύπανση, επηρεάζουν σημαντικά τη γενετική ποικιλομορφία του *O. vulgaris*, τόσο στα Ελληνικά νερά όσο και σε ολόκληρη τη Μεσόγειο. Η υπεραλίευση, ειδικότερα, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του αριθμού των ατόμων που συμμετέχουν στην αναπαραγωγή, περιορίζοντας τη γενετική ποικιλία και αυξάνοντας τον κίνδυνο για διακοπή της γονιδιακής ροής μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Αυτό μπορεί να μειώσει την ικανότητα των πληθυσμών να προσαρμοστούν σε μεταβαλλόμενες συνθήκες, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας των υδάτων και η μεταβολή στη διαθεσιμότητα τροφής λόγω της κλιματικής αλλαγής. Επιπλέον, η αυξανόμενη ρύπανση, όπως οι μικροπλαστικοί ρύποι και οι χημικοί ρύποι, επηρεάζουν την ποιότητα των ενδιαιτημάτων, επιδεινώνοντας το πρόβλημα. Η κλιματική αλλαγή, με την άνοδο της θερμοκρασίας των θαλασσών και τη μεταβολή στα ρεύματα, ενδέχεται επίσης να επιδεινώσει τη γενετική διαφοροποίηση, καθώς αλλάζει τις συνθήκες μετακίνησης των νεαρών ατόμων και μειώνει την πιθανότητα διασύνδεσης μεταξύ των πληθυσμών και να προκαλέσει αντίθετα αποτελέσματα σε σχέση με έρευνες που αναφέρθηκαν την εισαγωγή Κατσανεβάκης και Βερριόπουλος (2006); Mangold (1983); Quetglas et al. (1998).

Αυτές οι ανθρωπογενείς πιέσεις λειτουργούν ως ισχυρές εξελικτικές δυνάμεις που όχι μόνο επηρεάζουν άμεσα τη βιολογική ποικιλότητα, αλλά και τη μακροπρόθεσμη σταθερότητα των πληθυσμών. Οι περιβαλλοντικές και κλιματικές αλλαγές σε συνδυασμό με την υπερεκμετάλλευση των φυσικών πόρων δημιουργούν έντονες πιέσεις που μπορεί να ξεπερνούν τις προσαρμοστικές δυνατότητες των πληθυσμών, γεγονός που τονίζει την ανάγκη για μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση στη διαχείριση των θαλάσσιων πόρων.

Η διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας εξασφαλίζει ότι το είδος διατηρεί τη φυσική του ικανότητα να προσαρμόζεται σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, κάτι που είναι απαραίτητο για τη μακροπρόθεσμη επιβίωσή του.

Από πλευράς διαχείρισης, η γνώση της γενετικής δομής των πληθυσμών μπορεί να βοηθήσει στην εφαρμογή πιο στοχευμένων στρατηγικών. Για παράδειγμα, αν οι πληθυσμοί σε ορισμένες περιοχές είναι γενετικά πιο ευάλωτοι, μπορεί να χρειάζεται η εφαρμογή πιο αυστηρών μέτρων αλιείας ή η δημιουργία προστατευόμενων περιοχών, όπου τα χταπόδια θα μπορούν να αναπαραχθούν χωρίς πιέσεις από την αλιεία. Ως αποτέλεσμα, η διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας μέσω της ρύθμισης της αλιείας και της προστασίας κρίσιμων περιοχών είναι κρίσιμη για τη μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα του *O. vulgaris* και τη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας στη Μεσόγειο.

Απορρίπτουμε συμπερασματικά, τη μηδενική υπόθεση (H_0) και γίνεται αποδεκτή η εναλλακτική υπόθεση (H_1). Αυτό σημαίνει ότι τα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη σημαντικής γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών του κοινού χταποδιού στη Δυτική και Ανατολική Μεσόγειο, όχι όμως ανάμεσα στην Σάμο και στην Ικαρία σε σύγκριση με τον Κορινθιακό και τον Σαρωνικό (καθώς και μεταξύ τους) δηλαδή εντός των πληθυσμών των περιοχών της Ελλάδας όπου μπορούν να συνδεθούν με τις παραπάνω βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις, τονίζοντας την ανάγκη για περισσότερες περιφερειακές μελέτες για τη σαφέστερη χαρτογράφηση της γενετικής ποικιλότητας του *O. vulgaris* τόσο εντός της Ελλάδος όσο και στην Ανατολική και Δυτική Μεσόγειο.

ABSTRACT

In this work, the genetic diversity of *Octopus vulgaris* populations in the Mediterranean Sea is analyzed with emphasis on samples collected from the Saronic Gulf and Corinthian Gulf. The sampling was done by scuba diving and using a snorkel. 77 more sequences of the cytochrome oxidase (COI) subunit I coding region were retrieved from samples from Italy, Spain, Turkey, Samos and Ikaria regions through the NCBI global database. A total of 100 sequences were analyzed to assess genetic diversity, population structure and genetic flow in the Mediterranean basin. The analysis, despite the high connectivity and gene flow of the Mediterranean populations, showed genetic differentiation between the Eastern and Western Mediterranean, but not between the other 2 Greek (Samos, Ikaria) with Saronic and Corinthian Gulfs.

Keywords: *Octopus vulgaris*, population structure, Saronic Gulf, Corinthian Gulf, COI ,genetic diversity, Mediterranean Sea

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Adam, W. (1967). Cephalopoda from the Mediterranean Sea. Bull. Sea Fish. Res. Sta. Haifa , 45, 65–78.
- Albertin, C., Simakov, O., Mitros, T., Wang, Z., Pungor, J., Edsinger, E., Brenner, S., Ragsdale, C., & Rokhsar, D. (2015). The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. Nature , 524, 220–224.
<https://doi.org/10.1038/nature14668>
- Belcari, P., Cuccu, D., Gonzalez, M., Srairi, A., & Vidoris, P. (2002). Distribution and abundance of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Cephalopoda: Octopoda) in the Mediterranean Sea. Sci. Mar. , 62, 157–166.
- Bello, G. (1995). Cephalopods in the Adriatic Sea. Acta Adriatica .
- Boletzky, S. V. (2003). Biology of early life stages in cephalopod molluscs.
[https://doi.org/10.1016/s0065-2881\(03\)44003-0](https://doi.org/10.1016/s0065-2881(03)44003-0)
- Borges, F., Guerreiro, M., Santos, C., Paula, J. R., & Rosa, R. (2022). Projecting future climate change impacts on the distribution of the ‘ *Octopus vulgaris* species complex’. Frontiers in Marine Science , 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1018766>
- Boyle, P. R., Boletzky, S. V., & Clarke, M. R. (1996). Cephalopod populations: Definition and dynamics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences , 351, 985–1002. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0089>
- Casu, M., Maltagliati, F., Belcari, P., Casu, D., Sartor, P., & Vargiu, G. (2002). Allozyme genetic variability and gene flow in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Octopodidae) from the Mediterranean Sea. Bull. Mar. Sci. , 71, 473–486.

. Cortez, T., Castro, B., & Guerra, A. (1995). Reproduction and recruitment of *Octopus vulgaris* on the southwestern coast of Portugal. *ICES Marine Science Symposium* , 199, 393–405.

De Luca, D., Catanese, G., Procaccini, G., & Fiorito, G. (2014). An integration of historical records and genetic data to the assessment of global distribution and population structure in *Octopus vulgaris* . *Frontiers in Ecology and Evolution* , 2.

<https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00055>

. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. (n.d.). No. 4, Vol. 3. Rome, FAO.
<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/57241695-4904-470b-b9e2-ee36fbc1a947/content>

. Fadhlouzi-Zid, K., Knittweis, L., Aurelle, D., Nafkha, C., Ezzeddine, S., Fiorentino, F., Ghmati, H., Ceriola, L., Jarboui, O., & Maltagliati, F. (2012). Genetic structure of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Octopodidae) in the central Mediterranean Sea inferred from the mitochondrial COIII gene. *Comptes rendus biologies* .
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2012.10.004>

Fuchs, D., Kruta, I., & Mapes, R. H. (2020). Cephalopoda. In *Fossil Marine Animals* . Springer.

.GFCM. (2009). General Fisheries Commission for the Mediterranean. RES
GFCM/33/2009/2. <http://www.gfcmonline.org/decisions/>

González, M., Barcala, E., Pérez-Gil, N., Carrasco, & Garcia-Martinez, M. (2011). Fisheries and reproductive biology of *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) in the Gulf of Alicante (Northwestern Mediterranean). *Mediterranean Marine Science* , 12(2), 369–389. <https://doi.org/10.12681/mms.38>

. Guerra, A. (1982). Systematics and geographical distribution of cephalopods in the Mediterranean Sea. *Vie et Milieu* , 32(1), 215–223.

Hermosilla, C., Rocha, F., & Valavanis, V. D. (2011). Assessing *Octopus vulgaris* distribution using presence-only model methods. *Hydrobiologia* , 670, 35–47.

<https://doi.org/10.1007/s10750-011-0671-y>

Jassoud, A., Lucas, M., Insua, T., Miliou, A., & Schizas, N. (2012). Population genetic structure of *Octopus vulgaris* . <https://doi.org/10.13140/2.1.3809.5048>

. Katsanevakis, S., & Verriopoulos, G. (2004). Abundance of *Octopus vulgaris* on soft sediment: A case study in the Saronikos Gulf. *Scientia Marina* , 68(S1), 147–156.

Keskin, M., & Atar, H. H. (2011). Genetic divergence of *Octopus vulgaris* species in the eastern Mediterranean. *Biochem. Syst. Ecol.* , 39, 277–282.

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.08.015>

Koutsikopoulos, C., et al. (1997). Environmental factors affecting the spatial distribution of demersal fish in the Korinthiakos Gulf. *Fisheries Research* , 30(3), 297–305.

Kröger, B., Vinther, J., & Fuchs, D. (2011). Cephalopod origin and evolution: A congruent picture emerging from fossils, development, and molecules. *BioEssays* , 33(8), 602–613. <https://doi.org/10.1002/bies.201100001>

Lee, Y. H., et al. (2003). Molecular phylogeny of Mollusca: Evolution of the cephalopods. *Journal of Evolutionary Biology* , 16(4), 530–541.

Mangold, K. (1983). *Octopus vulgaris* . In P. R. Boyle (Ed.), *Cephalopod Life Cycles* (Vol. I, pp. 335–364). London: Academic Press.

Mapes, W., & Kröger, B. (2015). Ammonoid paleobiology: From macroevolution to paleogeography. <https://doi.org/10.5167/uzh-112640>

Norman, M. D., & Finn, J. (2001). Revision of the *Octopus vulgaris* species complex. *Zoological Journal of the Linnean Society* , 130(2), 241–266.

Quetglas, A., Alemany, F., Carbonell, A., Merella, P., & Sanchez, P. (1998). Biology and fishery of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, caught by trawlers in Mallorca (Balearic Sea, Western Mediterranean). *Fisheries Research* , 36, 237–249.

Reynolds, J., Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics* , 105(3), 767–779.

Ruby, G., & Knudsen, J. (1972). Cephalopoda from the eastern Mediterranean. *Israel J. Zool.* , 21, 83–97.

Salman, A. (2009) Cephalopod research in the eastern Mediterranean (East of 23°E): A review. *Boll. Malacol.* , 45, 47.

Vaz-Pires, P., Seixas, P., & Barbosa, A. (2004). Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): A review. *Aquaculture* , 238, 221–238.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.018>

Voight, J. R. (2012). Deep-sea octopuses (Mollusca: Cephalopoda) of the northeastern Pacific. *Biological Bulletin* , 222(1), 45–51.

Young, R. E., Vecchione, M., & Donovan, D. T. (1998). The evolution of coleoid cephalopods and their present biodiversity. *Smithsonian Contributions to Zoology* , 586, 3–13.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Κατσανεβάκης, Σ., & Βερριόπουλος, Γ. (2006). Εποχιακή πληθυσμιακή δυναμική του *Octopus vulgaris* στην ανατολική Μεσόγειο. *Marine Biology*, 149(5), 1353-1365

Καπίρης Κ. (n.d) «Ο Σαρωνικός και η ιχθυοπανίδα του»
<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://imbriw.hcmr.gr/wpcontent/uploads/2014/01/SARONIKOS.pdf&ved=2ahUKEwi>

[d8qiCmP2IAxUWiv0HHTIIDK4QFnoECBIQAQ&usg=AOvVaw0cbnLuu9gSe8XdlO4UACX6](https://doi.org/10.1111/pala.12265)

Οδυσσέας Παναγιώτης Τζωρτζάτος (2020) Γενετική παραλλακτικότητα
πληθυσμών του εμπορικού είδους *Holothuria*

<https://ir.lib.uth.gr/xmlui/bitstream/handle/11615/53734/21124.pdf?sequence=1>

Χατζικωνσταντίνου, Δ. (2022). Πληθυσμιακή δομή του *Pagellus erythrinus*
στην Ανατολική Μεσόγειο με τη χρήση κυτοχρωμικής οξειδάσης I. Βόλος:
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. <http://hdl.handle.net/11615/60593>

Βιβλιογραφία εικονών

- Εικόνα 1 : Isabelle Kruta et al November 2016 «*Proteroctopus Ribeti* in Coleoid Evolution», Vol. 59 <https://doi.org/10.1111/pala.12265>
- Εικόνα 2 :Χάρτης περιοχών δειγματοληψιών σε Σαρωνικό και Κορινθιακό κόλπο :GOOGLE MAPS
- Εικόνα 2-13 :Προσωπικό αρχείο συγγραφέα
- Εικόνα 14:Διανομή των δειγμάτων *Octopus vulgaris* στην Μεσόγειο θάλασσα: GOOGLE MAP

Παράρτημα

ACCESSION NUMBERS

ΤΟΥΡΚΙΑ

ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΛΕΥΣΗΣ	ACCESSION NUMBER
TRK1	KC789333.1
TRK2	KC789332.1
TRK3	KC789331.1
TRK4	KC789330.1
TRK5	KC789329.1
TRK6	KC789328.1
TRK7	KC789327.1
TRK8	KC789326.1
TRK9	KC789325.1
TRK10	KC789324.1
TRK11	KC789323.1
TRK12	KC789322.1
TRK13	KC789321.1
TRK14	KC789320.1
TRK15	KC789319.1
TRK16	KC789318.1
TRK17	KC789317.1
TRK18	KC789316.1
TRK19	KC789315.1
TRK20	KC789314.1

ΕΛΛΑΔΑ(ΣΑΜΟΣ & ΙΚΑΡΙΑ)

ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΛΕΥΣΗΣ2	ACCESSION NUMBER2
SAMOS1	JX500639.1
SAMOS2	JX500638.1
SAMOS3	JX500637.1
SAMOS4	JX500636.1
SAMOS5	JX500635.1
SAMOS6	JX500634.1
SAMOS7	JX500633.1
SAMOS8	JX500632.1
SAMOS9	JX500631.1
SAMOS10	JX500630.1
IKARIA 1	JX500629.1
IKARIA 2	JX500628.1
IKARIA 3	JX500627.1

ΙΣΠΑΝΙΑ

ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΛΕΥΣΗΣ	ACCESSION NUMBER
SPAIN1	JX500677.1
SPAIN2	JX500676.1
SPAIN3	JX500675.1
SPAIN4	JX500674.1
SPAIN5	JX500673.1
SPAIN6	X500672.1
SPAIN7	JX500671.1
SPAIN8	JX500670.1
SPAIN9	JX500669.1
SPAIN10	JX500668.1
SPAIN11	JX500667.1
SPAIN12	JX500666.1
SPAIN13	JX500665.1
SPAIN14	JX500664.1
SPAIN15	JX500663.1
SPAIN16	JX500662.1
SPAIN17	JX500661.1
SPAIN18	JX500660.1
SPAIN19	JX500659.1
SPAIN20	JX500658.1
SPAIN21	JX500657.1
SPAIN22	JX500656.1
SPAIN23	JX500655.1
SPAIN24	KU525765.1
SPAIN25	KU525764.1
SPAIN26	KU525763.1
SPAIN27	KU525762.1

ΙΤΑΛΙΑ

ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΛΕΥΣΗΣ	ACCESSION NUMBER
ITALY1	KT008578.1
ITALY2	KT008577.1
ITALY3	KT008576.1
ITALY4	KT008575.1
ITALY5	KT008574.1
ITALY6	KT008573.1
ITALY7	KT008572.1
ITALY8	KT008571.1
ITALY9	KT008570.1
ITALY10	KT008569.1
ITALY11	KT008568.1
ITALY12	KT008567.1

ITALY13	KT008566.1
ITALY14	KT008565.1
ITALY15	KT008564.1
ITALY16	KT008563.1
ITALY17	KT008562.1